

BIOMEDICAL PHOTONICS

BIOMEDICAL PHOTONICS –

научно-практический, рецензируемый,
мультидисциплинарный журнал.
Выходит 4 раза в год.
Тираж – 1000 экз., ежеквартально.

Издательство «Агентство МОРЕ».
Москва, Хохловский пер., д. 9

Редакция:

Зав. редакцией	Иванова-Радкевич В.И.
Научный редактор	проф. Мамонтов А.С.
Литературный редактор	Моисеева Р.Н.
Переводчик	Урлова А.Н.
Компьютерный дизайн	Кренева Е.И.
Компьютерная верстка	Иванова К.С.

Адрес редакции:

Россия, Москва, 2-й Боткинский пр., д. 3
Тел. 8 (495) 945-86-60
www: PDT-journal.com
E-mail: PDT-journal@mail.ru

Адрес для корреспонденции:

125284, Москва, а/я 13

Свидетельство о регистрации ПИ

№ ФС 77-51995, выдано 29.11.2012 г.
Федеральной службой по надзору в сфере
связи, информационных технологий
и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Индекс по каталогу агентства

«Роспечать» – 70249

Редакция не несет ответственности за
содержание рекламных материалов.

В статьях представлена точка зрения авторов,
которая может не совпадать с мнением
редакции журнала.

К публикации принимаются только статьи,
подготовленные в соответствии с правилами
для авторов, размещенными на сайте журнала.

Полное или частичное воспроизведение
материалов, опубликованных в журнале,
допускается только с письменного разрешения
редакции.

УЧРЕДИТЕЛИ:

Национальная Фотодинамическая Ассоциация
Московский научно-исследовательский онкологический институт
им. П.А. Герцена

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР:

Филоненко Е.В., доктор медицинских наук, профессор, руководитель
Центра лазерной и фотодинамической диагностики и терапии опухолей
Московского научно-исследовательского онкологического института
им. П.А. Герцена (Москва, Россия)

ЗАМ. ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:

Грин М.А., доктор химических наук, профессор, заведующий
кафедрой химии и технологии биологически активных соединений
им. Н.А. Преображенского Московского технологического университета
(Москва, Россия)

Лощенов В.Б., доктор физико-математических наук, профессор,
заведующий лабораторией лазерной биоспектроскопии в Центре
естественно-научных исследований Института общей физики
им. А.М. Прохорова РАН (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Каплан М.А., доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела
фотодинамической диагностики и терапии Медицинского радиологического
научного центра им. А.Ф. Цыба (Обнинск, Россия)

Каприн А.Д., чл.-корр. РАН, доктор медицинских наук, профессор,
генеральный директор Национального медицинского исследовательского
радиологического центра Минздрава России (Москва, Россия)

Лукьянец Е.А., доктор химических наук, профессор, заведующий
лабораторией Государственного научного центра «Научно-
исследовательский институт органических полупроводников и красителей»,
(Москва, Россия)

Миронов А.Ф., доктор химических наук, профессор кафедры химии
и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского
Московского технологического университета (Москва, Россия)

Пономарев Г.В., доктор химических наук, профессор, главный научный
сотрудник Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН
(Москва, Россия)

Романко Ю.С., доктор медицинских наук, профессор, руководитель
научно-организационного отдела Медицинского радиологического научного
центра им. А.Ф. Цыба (Обнинск, Россия)

Странадко Е.Ф., доктор медицинских наук, профессор, руководитель
отделения лазерной онкологии и сосудистой терапии Государственного
научного центра лазерной медицины Минздрава России (Москва, Россия)

Якубовская Р.И., доктор биологических наук, профессор, руководитель
отделения модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии
Московского научно-исследовательского онкологического института
им. П.А. Герцена (Москва, Россия)

Истомин Ю.П., доктор медицинских наук, профессор, заведующий
лабораторией фотодинамической терапии и гипертермии с группой
химиотерапии Республиканского научно-практического центра онкологии
и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова (Минск, Республика
Беларусь)

Bolotine L., профессор научно-исследовательского центра автоматизации
и управления Нанси (Нанси, Франция)

Douplik A., профессор Университета Райерсона (Торонто, Канада)

Steiner R., профессор, почетный директор Института лазерных технологий
в медицине и измерительной технике Университета Ульма (Ульм, Германия)

BIOMEDICAL PHOTONICS

FOUNDERS:

National Photodynamic Association
P.A. Herzen Moscow Cancer Research Institute

EDITOR-IN-CHIEF:

Filonenko E.V., Dr. Sci. (Med.), professor, head of the Centre of laser and photodynamic diagnosis and therapy of tumors in P.A. Herzen Moscow Cancer Research Institute (Moscow, Russia)

DEPUTY CHIEF EDITOR:

Grin M.A., Dr. Sci. (Chem.), professor, chief of department of Chemistry and technology of biological active substances named after Preobragenskiy N.A. in Moscow Technological University (Moscow, Russia)

Loschenov V.B., Dr. Sci. (Phys and Math), professor, chief of laboratory of laser biospectroscopy in the Natural Sciences Center of General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD:

Kaplan M.A., Dr. Sci. (Med.), professor, chief of department of photodynamic diagnosis and therapy in A.F. Tsyb «Medical Radiological Research Center» (Obninsk, Russia)

Kaprin A.D., Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Med.), professor, general director of National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Lukyanets E.A., Dr. Sci. (Chem.), professor, chief of laboratory in State Research Center «Research Institute of Organic Intermediates and Dyes» (Moscow, Russia)

Mironov A.F., Dr. Sci. (Chem.), professor of department of Chemistry and technology of biological active substances named after Preobragenskiy N.A. in Moscow Technological University (Moscow, Russia)

Ponomarev G.V., Dr. Sci. (Chem.), professor, principal researcher in the V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry (IBMC) of RAS (Moscow, Russia)

Romanko Yu.S., Dr. Sci. (Med.), professor, chief of scientific organizational in A.F. Tsyb «Medical Radiological Research Center» (Obninsk, Russia)

Stranadko E.F., Dr. Sci. (Med.), professor, chief of department of laser oncology and vascular therapy in State research centre of laser medicine of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Yakubovskaya R.I., Dr. Sci. (Biol.), professor, chief of department of modifiers and protectors for cancer therapy in P.A. Herzen Moscow Cancer Research Institute (Moscow, Russia)

Istomin Yu.P., Dr. Sci. (Med.), professor, chief of laboratory of photodynamic therapy and hyperthermia with group of chemotherapy in N.N. Aleksandrov Republican Scientific and Practical Centre of Oncology and Radiology» (Minsk, Belarus)

Bolotine L., PhD, professor of Research Center for Automatic Control of Nancy (Nancy, France)

Douplik A., PhD, professor in Ryerson University (Toronto, Canada)

Steiner R., PhD, professor, the honorary director of Institute of Laser Technologies in Medicine and Metrology at Ulm University (Ulm, Germany)

BIOMEDICAL PHOTONICS –

research and practice, peer-reviewed, multidisciplinary journal.

The journal is issued 4 times per year.

The circulation – 1000 copies., on a quarterly basis.

The publisher «Agentstvo MORE».
Moscow, Khokhlovskiy lane., 9

Editorial staff:

Chief of the editorial staff	Ivanova-Radkevich V.I.
Science editor professor	Mamontov A.S.
Literary editor	Moiseeva R.N.
Translator	Urlova A.N.
Computer design	Kreneva E.I.
Desktop publishing	Ivanova K.S.

The Address of Editorial Office:

Russia, Moscow, 2nd Botkinskiy proezd, 3
Tel. 8 (495) 945-86-60
www: PDT-journal.com
E-mail: PDT-journal@mail.ru

Corresponding to:

125284, Moscow, p/o box 13

Registration certificate ПИ № ФС 77-51995, issued on 29.11.2012 by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology, and Mass Media of Russia

The subscription index

of «Rospechat» agency – 70249

The editorial staff is not responsible for the content of promotional material. Articles represent the authors' point of view, which may be not consistent with view of the journal's editorial board. Editorial Board admits for publication only the articles prepared in strict accordance with guidelines for authors. Whole or partial presentation of the material published in the Journal is acceptable only with written permission of the Editorial board.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Исследование распределения хлориновых фотосенсибилизаторов в двухмерных и трехмерных клеточных культурах

Д.С. Фаррахова, И.В. Яковец, В.Б. Лощенов, L.N. Bolotine, В.П. Зорин

4

Экспериментальное обоснование выбора режимов облучения для интраперитонеальной фотодинамической терапии с фотосенсибилизаторами на основе порфиринов и фталоцианинов

А.А. Панкратов, Э.А. Сулейманов, Е.А. Лукьянец, Ю.Б. Венедиктова, А.Д. Плютинская

12

Использование аутофлуоресцентной дерматоскопии у больных псориазом

Н.Н. Петрищев, Г.В. Папаян, А.В. Крылов, Е.В. Крылова, S. Kim

21

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

Фотосенсибилизаторы как радиосенсибилизирующие агенты в экспериментальной и клинической нейроонкологии

Д.А. Церковский

27

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

Интраоперационная фотодинамическая терапия больной раком молочной железы IIIC стадии (8-летний период безрецидивного наблюдения)

А.Д. Каприн, Е.А. Рассказова, Е.В. Филоненко, Э.К. Сарибекян, А.Д. Зикиряходжаев, В.И. Чиссов

34

Фотодинамическая терапия плоскоклеточного рака кожи щеки (клиническое наблюдение)

Д.Н. Стрункин, И.П. Жарикова, Ю.А. Кожевников, Н.С. Задонцева

38

ORIGINAL ARTICLES

Investigation of chlorin photosensitizers distribution in monolayer and spheroid cell cultures

Farrakhova D.S., Yakavets I.V., Loschenov V.B., Bolotine L.N., Zorin V.P.

4

Experimental confirmation for selection of irradiation regimens for intraperitoneal photodynamic therapy with porphyrin and phthalocyanine photosensitizers

Pankratov A.A., Suleymanov E.A., Lukyanets E.A., Venediktova Yu.B., Plyutinskaya A.D.

12

Use of autofluorescence dermatoscopy in patients with psoriasis

Petrishchev N.N., Papayan G.V., Krylov A.V., Krylova E.V., Kim S.

21

REVIEWS OF LITERATURE

Photosensitizers as radiosensitizing agents in experimental and clinical neurooncology

Tzerkovsky D.A.

27

CASE REPORTS

Intraoperative photodynamic therapy in patient with stage IIIC breast cancer (8 years without recurrence)

Kaprin A.D., Rasskazova E.A., Filonenko E.V., Saribekyan E.K., Zikiryakhodzhaev A.D., Chissov V.I.

34

Photodynamic therapy for squamous cell skin cancer of the cheek (case report)

Strunkin D.N., Zharikova I.P., Kozhevnikov I.A., Zadontceva N.S.

38

ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ХЛОРИНОВЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ДВУХМЕРНЫХ И ТРЕХМЕРНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ

Д.С. Фаррахова^{1,2}, И.В. Яковец^{3,4,5}, В.Б. Лощенов^{1,2}, L.N. Bolotine^{4,5}, В.П. Зорин^{3,6}

¹Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ, Москва, Россия

²Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия

³Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

⁴Centre de Recherche en Automatique de Nancy, CNRS, Université de Lorraine, Nancy, France

⁵Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

⁶Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, МГЭИ БГУ, Минск, Республика Беларусь

Резюме

Цель данного исследования заключалась в оценке распределения хлориновых фотосенсибилизаторов – хлорина e_6 (Ce6) и его диметилового эфира (DME) – в клетках HT29 аденокарциномы человека в моделях монослоя клеток и мультিকлеточных сфероидов. Согласно полученным данным, DME накапливается в 2,3 раза более эффективно в клетках монослоя по сравнению с Ce6. Высказано предположение, что химическая модификация молекул Ce6 приводит к изменению внутриклеточной локализации, а также к увеличению фотосенсибилизирующей активности. Так, проведение фотодинамической терапии на клетках монослоя с использованием DME показало увеличение способности к фотоповреждению более чем в 2 раза по сравнению с его немодифицированным аналогом.

Процессы распределения DME и Ce6 в опухолевой ткани были изучены на модели мультиклеточных опухолевых сфероидов. Общее количество DME в опухолевых сфероидов превышало накопление Ce6 в 1,3 раза. Согласно данным флуоресцентной микроскопии, характер распределения Ce6 и DME в сфероидов не отличается. Использование двух- и трёхмерных моделей для анализа процессов связывания фотосенсибилизаторов может позволить прогнозировать особенности процессов распределения фотосенсибилизаторов при проведении фотодинамической терапии *in vivo*.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, хлорин e_6 , диметил эфир хлорина e_6 , фотодинамическая терапия, мультиклеточные опухолевые сфероиды.

Для цитирования: Фаррахова Д.С., Яковец И.В., Лощенов В.Б., Bolotine L.N., Зорин В.П., Исследование распределения хлориновых фотосенсибилизаторов в двухмерных и трехмерных клеточных культурах // Biomedical Photonics – 2017. – Т. 6, № 2 – С. 4-11.

Контакты: Зорин В.П., e-mail: vpzorin@mail.ru

INVESTIGATION OF CHLORIN PHOTSENSITIZERS DISTRIBUTION IN MONOLAYER AND SPHEROID CELL CULTURES

Farrakhova D.S.^{1,2}, Yakavets I.V.^{3,4,5}, Loschenov V.B.^{1,2}, Bolotine L.N.^{4,5}, Zorin V.P.^{3,6}

¹National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russia

²General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³Belarusian State University, Minsk, Belarus

⁴Centre de Recherche en Automatique de Nancy, CNRS, Université de Lorraine, Nancy, France

⁵Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

⁶Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Belarus

Abstract

The aim of this study was to analyze the distribution of chlorin type photosensitizers (PS): chlorin e_6 (Ce6) and dimethyl ester of chlorin e_6 (DME), in human adenocarcinoma HT29 monolayer and multicellular spheroid cell cultures. There is an assumption, that the chemical modification of Ce6 molecules causes a change of intracellular location and the enhanced photosensitizing activity. Indeed, photodynamic therapy on monolayer cell culture with DME showed two times higher photokilling ability comparing with that of non-modified analogue.

Ce6 and DME biodistribution processes in tumor tissue were studied on multicellular tumor spheroids model. Total amount of DME in multicellular tumor spheroids exceeded 1,3 times accumulation of Ce6. According to fluorescence microscopy studies, Ce6 and DME distribution patterns in the spheroids bulk were similar. Application of 2D and 3D tumor models for the analysis of photosensitizer distribution may allow predicting the photosensitizer biodistribution features for photodynamic therapy *in vivo*.

Key words: photosensitizers, chlorin e_6 , chlorin e_6 dimethyl ester, photodynamic therapy, multicellular tumor spheroids.

For citations: Farrakhova D.S., Yakavets I.V., Loschenov V.B., Bolotine L.N., Zorin V.P. Investigation of chlorin photosensitizers distribution in monolayer and spheroid cell cultures, *Biomedical Photonics*, 2017, T. 6, No. 2, pp. 4-11 (in Russian)

Contacts: Zorin V.P., e-mail: vpzorin@mail.ru

Введение

Процессы распределения фотосенсибилизаторов (ФС) в организме являются одним из ключевых факторов, определяющих результативность фотодинамической терапии (ФДТ). Это связано с тем, что синглетный кислород, основной интермедиатор фотодинамических процессов, обладает крайне малым временем жизни в биологических системах [1]. Теоретическая оценка показывает, что средняя длина диффузионного пробега синглетного кислорода в биологических системах составляет 10-100 нм [2]. Поэтому фотодинамическое воздействие приводит к повреждению молекулярных и клеточных структур, расположенных в непосредственной близости от сайтов связывания молекул ФС. В этой связи значительный интерес представляет установление взаимосвязи между особенностями химической структуры молекул ФС и факторами, контролирующими процессы его распространения в различных биологических системах (клетки, ткани, организм).

В данной работе приведены результаты сравнительного исследования процессов связывания, локализации и фотосенсибилизирующей активности хлорина e_6 (Се6) и его диметилового эфира (DME) в клетках HT29 аденокарциномы человека. Се6 является известным фотосенсибилизатором второго поколения и является действующим веществом ряда коммерческих лекарственных препаратов-фотосенсибилизаторов, в том числе фотолон (РУП «Белмед-препараты», Республика Беларусь, регистрационное удостоверение П N015948/01 от 30.11.2012) и рада хлорина (ООО «РАДА-ФАРМА», Россия, регистрационное удостоверение №ЛС-001868 от 16.12.2011), которые применяются в настоящее время в клинической практике [3,4]. Ранее было показано, что DME также является перспективным ФС для ФДТ [5-7]. Показано, что этерифицирование боковых карбоксильных групп в молекуле Се6 сопровождается значительным увеличением накопления ФС в ряде типов опухолевых клеток, в клетках эндотелия кровеносных сосудов и ряде типов клеток крови [8,9], а также увеличением эффективности их фотосенсибилизированного повреждения. Предполагается, что повышенная фотосенсибилизирующая активность DME обусловлена кинетическими особенностями процессов его распределения в биологических системах.

В данной работе были изучены процессы распределения ФС в двухмерной (монослой) и трёхмерной (мультиклеточные опухолевые сфероиды) моделях клеток HT29 аденокарциномы человека. Монослой клеток использовали для исследования процессов взаимодействия препаратов с единичными клетками. Мультиклеточные опухолевые сфероиды представляют собой трёхмерную модель опухолевой ткани сферической формы, которая отражает все основ-

ные морфологические и функциональные особенности неваккуляризованной опухолевой ткани *in vivo* и позволяет моделировать процессы распределения противоопухолевых препаратов в опухолевой ткани [10,11].

Материал и методы

Исследуемые фотосенсибилизаторы

В работе использовали Се6 производства Frontier Scientific (США). DME предоставлен НИЛ биофизики и биотехнологии Белорусского государственного университета (Минск, Беларусь). Структурные формулы ФС приведены на рис. 1. Концентрацию Се6 и DME определяли фотометрически в длинноволновом максимуме поглощения с использованием коэффициента молярной экстинкции $50\,000\text{ см}^{-1}(\text{моль/л})^{-1}$ [12]. Для экспериментов *in vitro* использовали раствор ФС с концентрацией 5 мкмоль/л, предварительно проинкубированный с 2% сыворотки в культуральной среде RPMI-1640 в течение 1 ч.

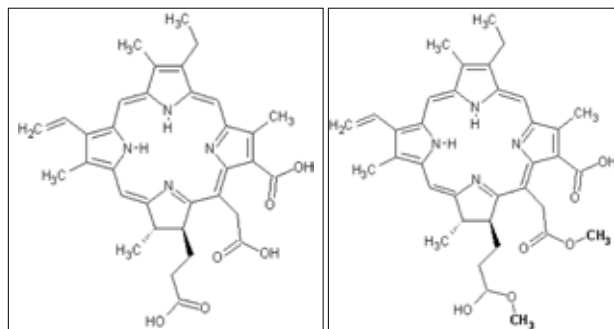


Рис. 1. Химические формулы:

а – хлорина e_6 ;
б – диметилового эфира хлорина e_6

Fig. 1. The chemical formulas of:

а – chlorin e_6 ;
б – dimethyl ester of chlorin e_6

Биологические модели

Для проведения эксперимента в качестве биологических моделей были использованы монослой и опухолевые сфероиды модели клеточных структур, образованные клетками HT29 аденокарциномы человека. Культивирование монослоя клеток проводили в среде RPMI-1640 без фенолового красного (Sigma, США) с добавлением 9% инактивированной телячьей сыворотки (Sigma, США) и 1 ммоль/л глутамин (Invitrogen, Франция). Монослой инкубировали при температуре 37 °C в 5% атмосфере CO_2 . Жизнеспособность клеток, использованных в экспериментах, была не менее 95%.

В работе использовали мультиклеточные сфероиды размером 370-520 мкм. Опухолевые сфероиды инкубировали в колбах со спинерами 75 об/с (Integra Biosciences, США), содержащих 150 мл культуральной среды, помещенных на магнитную подставку (Integra

Biosciences, США) при температуре 37°C в газовой среде, содержащей 5% CO₂. Для отсева сфероидов нужного размера использовали фильтры 370 нм и 520 нм.

Исследование накопления ФС в клеточных культурах

Для оценки накопления ФС клетки инкубировали с раствором ФС в течение 1, 3, 6 и 15 ч для монослоя и 6 ч для мультиклеточных опухолевых сфероидов. После инкубации клетки/сфероиды дважды отмывали от несвязанного ФС с использованием буфера и трипсинизировали для получения суспензии клеток. После трипсинизации клеток монослоя/сфероидов накопление ФС оценивали с использованием проточного цитометра FACSCalibur (Becton Dickinson, США), оснащенного аргоновым лазером с длиной волны возбуждения 488 нм (20 мВ). Регистрацию флуоресцентного сигнала производили в канале FL4 (661±16 нм).

Эпифлуоресцентная микроскопия

Распределение ФС в клетках/сфероидах было изучено при помощи эпифлуоресцентной микроскопии на микроскопе AX-70 Provis (Olympus, Япония), оборудованном 100 Вт ртутной лампой. Клетки/сфероиды инкубировали с раствором ФС в течение 6 ч. Изображения были получены при возбуждении ФС с использованием возбуждающего фильтра с полосой пропускания 400–440 нм и были зарегистрированы в видимом диапазоне длин волн более 590 нм.

Фотодинамическое воздействие на монослой клеток

Оценка фототоксичности ФС на модели монослоя клеток была проведена с использованием диодного лазера (Biolitec AG, Germany), излучение которого соответствует длине волны 652±4 нм. В ходе эксперимента были использованы различные дозы облучения равные 0,2; 0,5 и 1,0 Дж/см². Мощность лазерного излучения на выходе из волокна составляла 0,45 Вт. В контроле облучение не проводили. Инкубация клеток с раствором ФС происходила в течение 15 ч. Трипсинизацию производили спустя 1 ч после облучения для оценки доли погибших клеток методом проточной цитометрии.

Для оценки токсических свойств ФС использовали тест на целостность цитоплазматической мембраны, а также проточную цитофлуориметрию. Клетки с нарушенной плазматической мембраной – некротические клетки и клетки на поздних стадиях апоптоза – способны накапливать флуоресцентный краситель пропидиум йодид (PI) на 2-3 порядка больше относительно интактных клеток.

Статистический анализ

Все экспериментальные данные представлены как $M \pm m$ (M – среднее значение, m – относительная погрешность). Статистический анализ проводили с использованием системы Microsoft Excel 2007.

Результаты и обсуждение

Исследование взаимодействия ФС с клетками в монослое

Анализ процессов накопления ФС в монослой клеток HT29 проводили с использованием техники проточной цитофлуориметрии. Монослой клеток инкубировали в присутствии 5 мкмоль/л ФС, затем трипсинизировали. Регистрировали гистограммы распределения единичных клеток по уровню интенсивности флуоресценции в полосе испускания ФС (661±16 нм).

При увеличении времени инкубации клеток с ФС наблюдали смещение гистограммы распределения в сторону большей интенсивности флуоресценции, что свидетельствует о связывании и локализации исследуемых ФС в клетках. Ранее было показано, что спектрально-флуоресцентные характеристики Себ и DME практически не различаются [7, 12], поэтому интенсивность флуоресценции единичных клеток может быть использована для сравнения процессов накопления данных ФС. На рис. 2 представлена кинетика изменения средней интенсивности флуоресценции клеток, инкубированных различное время в присутствии 5 мкмоль/л ФС.

Согласно полученным данным, кинетика накопления DME и Себ в клетках существенно отличаются. Для Себ наблюдается медленное увеличение интенсивности флуоресценции клеток на протяжении 5-6 ч инкубации. Для DME равновесный уровень окраски достигается значительно быстрее, при этом максимальное значение средней интенсивности флуоресценции превышает данный параметр для Себ в 2,3 раза. Аналогичные результаты исследования кинетики накопления Себ и DME были получены ранее для лейкозных клеток Raji [5] и клеток рака мочевого пузыря [12].

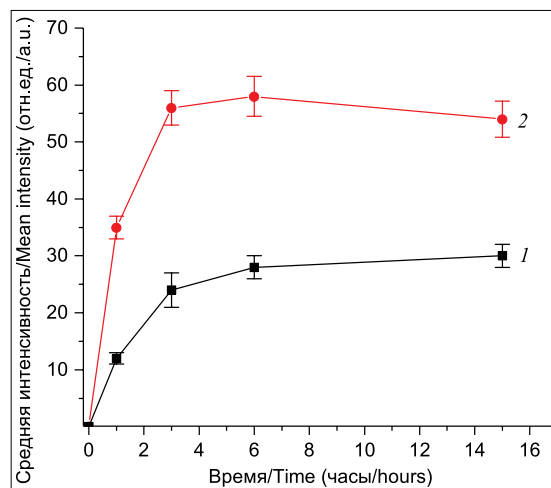


Рис. 2. Кинетика изменения средней интенсивности флуоресценции клеток HT29, инкубированных с:

- 1 – хлорином e_6 (5 мкмоль/л);
- 2 – диметилэстером хлоринового эфира e_6 (5 мкмоль/л)

Fig. 2. The mean fluorescence intensity kinetics of HT29 monolayer cells treated by:

- 1 – chlorin e_6 (5 μ M);
- 2 – dimethyl ester of chlorin e_6 (5 μ M)

Особенности окрашивания монослоя клеток HT29 исследуемыми ФС были также исследованы методом флуоресцентной микроскопии. На рис. 3 представлены фотографии монослоя клеток HT29 в свете флуоресценции ФС. Как видно из изображений, клетки накапливают значительное большее количество DME по сравнению с Себ. Компьютерный анализ полученных изображений показал, что средняя интенсивность флуоресценции DME в клетках в 2,5 раза выше в сравнении с Себ, что полностью согласуется с данными проточной цитофлуориметрии.

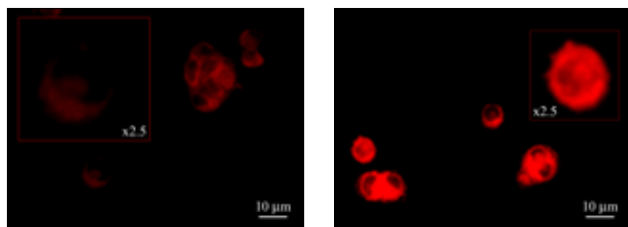


Рис. 3. Флуоресцентные изображения клеток HT29 через 6 ч после начала инкубации с:
а – хлорином e_6 (5 мкмоль/л);
б – диметилловым эфиром хлорина e_6 (5 мкмоль/л)
Fig. 3. Fluorescence images of HT29 monolayer cells 6 hours post treated by:

а – chlorin e_6 (5 μ M);
б – dimethyl ester of chlorin e_6 (5 μ M)

Флуоресцентная микроскопия позволяет оценить характер распределения ФС по телу клеток. Согласно полученным результатам (рис. 3), Себ и DME в основном распределены в плазматической мембране и цитоплазме клеток и практически не накапливаются в области локализации клеточного ядра. Детальный анализ процессов локализации Себ и DME, проведенный в работах [13-15], выявил отличия в характере распределения исследуемых ФС между цитоплазматическими структурами. Низкая скорость трансмембранного переноса полярного Себ обуславливает больший вклад в общую флуоресценцию клеток молекул ФС, связанных с плазматической мембраной [8,13,16]. В то же время, высокая скорость пересечения мембраны в случае DME способствует быстрому прокрашиванию всех цитоплазматических структур клетки. Использование техники колокализационного анализа указывает на возможные отличия в сайтах преимущественного связывания ФС внутри клетки [14,15]. Если Себ накапливается преимущественно в эндоплазматическом ретикулуле клеток плоскоклеточной карциномы FaDu [14], то DME локализуется преимущественно в митохондриях клеток Raji [15].

Согласно литературным данным, схожие закономерности были установлены в случае исследования процессов накопления DME и Себ на клетках Raji [5,15]. Показано, что изменение химической структуры молекулы ФС оказывает значительное влияние на процессы взаимодействия ФС с клетками, при этом не

влияя на фотофизические свойства молекулы хлорина [12]. Этерифицирование молекулы Себ приводит к увеличению уровня накопления ФС в клетках. Так, умеренно неполярный DME, имеющий относительно высокую диффузионную подвижность, с максимальной скоростью проникает через плазматическую мембрану, накапливается в клетках в концентрации, в несколько раз превышающей концентрацию полярного Себ, для которого характерны более низкие значения константы скорости трансмембранного перемещения [17].

Считается, что ФС может проникать в клетки как путем пассивной диффузии через плазматическую мембрану, так и за счет эндоцитоза [18]. При этом, ключевым фактором, обуславливающим транспорт ФС в клетку является взаимодействие с различными транспортными белками сыворотки крови [8,19]. Связывание с различными белками сыворотки в основном определяется зарядом и гидрофобностью молекулы ФС. Так, ранее было показано, что повышение гидрофобности молекул DME приводит к увеличению сродства данного ФС к липопротеинам, в то время как полярный Себ главным образом связывается с сывороточным альбумином [8]. При этом связывание ФС с липопротеинами облегчает транспорт препарата в клетки путем эндоцитоза [19], когда как транспортировка в составе сывороточного альбумина способствует накоплению ФС в строме опухоли [20].

Различия в механизмах транспорта в клетку в свою очередь могут оказывать влияние на локализацию ФС в клетках, как это было показано в работах [13,16]. В этой связи, преимущественное накопление DME в митохондриях может увеличивать эффективность фотодинамического воздействия путем запуска процессов апоптоза уже при малых дозах светового излучения [21].

Себ и DME обладают хорошими фотосенсибилизирующими свойствами, что подтверждается высокой фотоповреждающей активностью в отношении клеточных и тканевых структур [22,23]. Исследуемые ФС характеризуются низкой темновой токсичностью. Согласно работам [5,15,22,24], присутствие ФС во внеклеточной среде в концентрациях вплоть до 10 мкмоль/л не оказывает цитотоксического эффекта. Полученные в нашей работе результаты согласуются с опубликованными ранее данными. Инкубирование монослоя клеток HT29 в присутствии 5 мкмоль/л ФС в течение 15 ч сопровождается лишь незначительным увеличением числа поврежденных клеток (2-4%) по сравнению с образцами, инкубированными в среде, не содержащей ФС.

Результаты исследования способности ФС индуцировать фотоповреждение клеток HT29 представлены в таблице. Согласно полученным данным, фотоцитотоксичность Себ и DME значительно различается. Облучение монослоя клеток, окрашенных ФС, в световой дозе 0,5 Дж/см² и более сопровождается гибелью практически всех клеток. При менее интенсивном облучении эф-

Таблица

Темновая и фотоиндуцированная токсичность хлорина e_6 и его диметилового эфира в клетках HT29

Table

Dark and photoinduced cellular toxicity of chlorin e_6 and dimethyl ester of chlorin e_6 in HT29 monolayer

ФС PS	Концентрация ФС PS concentration	Доля погибших клеток: Death cells fraction:			
		в контроле in control	при облучении: 10 мВт/см ² , 0,2 Дж/см ² , for irradiation: 10 mW/cm ² , 0.2 J/cm ²	при облучении: 10 мВт/см ² , 0,5 Дж/см ² , for irradiation: 10 mW/cm ² , 0.5 J/cm ²	при облучении: 10 мВт/см ² , 1,0 Дж/см ² , for irradiation: 10 mW/cm ² , 1.0 J/cm ²
Себ	5 мкмоль/л 5 μ M	2 $\pm$ 1%	11 $\pm$ 2%	83 $\pm$ 6%	92 $\pm$ 4%
DME	5 мкмоль/л 5 μ M	4 $\pm$ 1%	40 $\pm$ 5%	91 $\pm$ 8%	97 $\pm$ 2%

ФС – фотосенсибилизатор; Себ – хлорин e_6 ; DME – диметилловый эфир хлорина e_6 PS – photosensitizer; Себ – chlorin e_6 ; DME – dimethyl ester of chlorin e_6

фективность фотодеструкции клеток значительно выше в случае DME. Полученные результаты подтверждают хорошо известную зависимость фоточувствительности клеток от количества ФС, накопленного ими [15,16].

Исследование распределения ФС в мультиклеточных сфероидов

Установление механизмов накопления препарата в клетках может быть недостаточно для описания особенностей процессов распределения ФС в твердых тканях *in vivo*. Сложная трехмерная структура организации и морфологические особенности опухолевой ткани обуславливают различия в доступности препарата к различным слоям клеток ткани. Для изучения процессов распределения ФС в опухолевой ткани в работе была использована модель мультиклеточных опухолевых сфероидов. Данная модель воспроизводит неваккуляризованную опухолевую ткань с общими морфологическими особенностями, такими как наличие пролиферирующих слоев клеток, находящихся на поверхности сфероидов, а также клеток с ограниченным доступом к кислороду и питательным веществам, находящихся в глубине опухолевой ткани (рис. 4) [10].

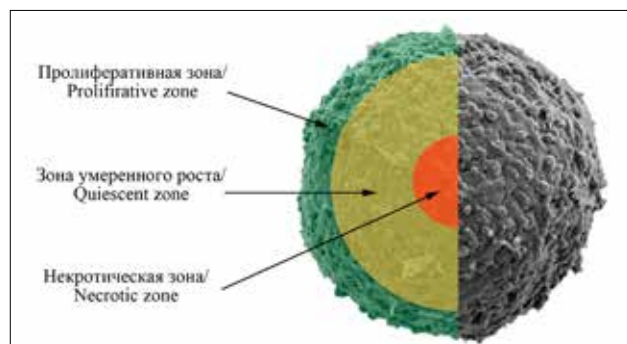


Рис. 4. Схематическое изображение мультиклеточного опухолевого сфероида

Fig. 4. Scheme of multicellular tumor spheroid

Процессы накопления и локализации Себ и DME в сфероидов HT29 были исследованы с использованием эпифлуоресцентной микроскопии. На рис. 5 представлены изображения флуоресцирующих сфероидов, инкубированных в присутствии хлоринов в течение 24 ч.

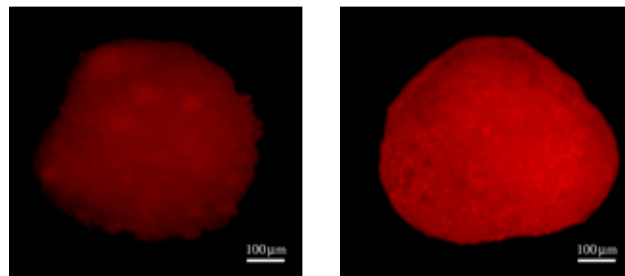


Рис. 5. Флуоресцентные изображения окрашенных сфероидов через 24 ч после начала инкубации с:

а – хлорином e_6 (5 мкмоль/л);б – диметилловым эфиром хлорина e_6 (5 мкмоль/л)

Fig. 5. Fluorescence images of spheroid in 24 hours post treated by:

а – chlorin e_6 (5 μ M)б – dimethyl ester of chlorin e_6 (5 μ M)

Количественная оценка свечения (по группам из 7 сфероидов) свидетельствует, что уровень средней интенсивности флуоресценции сфероидов, окрашенных DME, более чем в 2 раза выше в сравнении с Себ. Как видно из полученных флуоресцентных изображений, ФС распределяются равномерно по сфероидов.

Неравномерность окрашивания отдельных клеточных слоев сфероида обычно проявляется в увеличении степени гетерогенности распределения отдельных клеток по уровню накопления ФС, что может быть легко зафиксировано с использованием проточной цитофлуориметрии [25]. Согласно данным, представленным на рис. 6, гистограммы распределения окрашенных в течение 24 ч хлоринами клеток в составе сфероида

близки по своим параметрам к гистограммам клеток, окрашенных в монослой. При этом, значение средней интенсивности флуоресценции клеток сфероидов, окрашенных DME, в 1,3 раза выше по сравнению с Себ, что согласуется с результатами эпифлуоресцентной микроскопии. Следует отметить, что процедура разделения сфероидов на отдельные клетки путем трипсинизации осуществляется быстро (около 5 мин), поэтому она не может оказывать значительного влияния на уровень накопления ФС отдельными клетками. Исходя из полученных данных, можно заключить, что относительный уровень внутриклеточного накопления ФС при длительных временах окраски не зависит от расположения клеток в составе сфероида. Сходные результаты анализа распределения Себ были получены на модели сфероидов A375 [26]. В то же время, согласно работам [27,28], для некоторых ФС и их лекарственных форм может наблюдаться значительная гетерогенность локализации в мультиклеточных опухолевых сфероидах. Так, уровень накопления темпорфина в клетках, локализованных на поверхности сфероида, повышен в 50 раз в сравнении с клетками, локализованными во внутренних слоях сфероида. В отличие от производных Себ, молекулы тем-

порфина характеризуются крайне низкой скоростью диссоциации из комплексов с липопротеинами, что значительно снижает вероятность окрашивания клеток, расположенных в глубине сфероида [28].

Эффективность накопления ФС (оцененная по уровню флуоресценции) в опухолевых клетках в зависимости от расположения клеток в сфероидах, очевидно, определяется кинетическими и равновесными параметрами, контролирующими распространение молекул ФС в тканевых структурах. Среди кинетических характеристик основное влияние на процессы распределения оказывают скорости перемещения молекул ФС между различными центрами связывания во внеклеточной среде, а также скорость трансмембранного перемещения молекулы ФС через плазматическую мембрану. В качестве равновесных параметров выступают относительное сродство молекул ФС к белкам сыворотки и клеточным мембранным структурам. Себ и DME характеризуются высокой скоростью диффузии между различными центрами связывания во внеклеточной среде и способны равномерно окрашивать мультиклеточный сфероид при длительных временах инкубирования. Более высокий уровень накопления DME в клетках может быть обусловлен повышенным сродством его молекул к клеточным структурам в сравнении с Себ.

Заключение

Исследования, проведенные в модельных клеточных системах, показали, что изменение физико-химических свойств ФС оказывает значительное влияние на процессы взаимодействия ФС с опухолевыми клетками и процессы распределения ФС в опухолевой ткани.

На модели монослоя клеток HT29 были изучены процессы взаимодействия хлорина и его диметилового эфира с индивидуальными клетками. Показано, что изменение химической структуры молекулы Себ оказывает значительное влияние на процессы взаимодействия ФС с клетками и относительную фотосенсибилизирующую активность Себ и DME. Согласно полученным данным, химическая модификация молекулы Себ, связанная с этерификацией боковых карбоксильных групп, сопровождается увеличением накопления и изменением характера локализации ФС в клетках. Данные изменения также обуславливают увеличение фотосенсибилизирующей активности DME в отношении клеток HT29 в сравнении с Себ.

С использованием трёхмерной модели, показано, что этерификация молекулы Себ не оказывает влияния на характер распределения ФС по телу сфероида. В то же время, повышенное сродство DME к опухолевым клеткам обуславливают увеличение общего уровня накопления ФС в сфероидах.

Использование двух- и трёхмерных моделей для анализа процессов связывания ФС может позволить прогнозировать особенности процессов распределения ФС при проведении ФДТ *in vivo*.

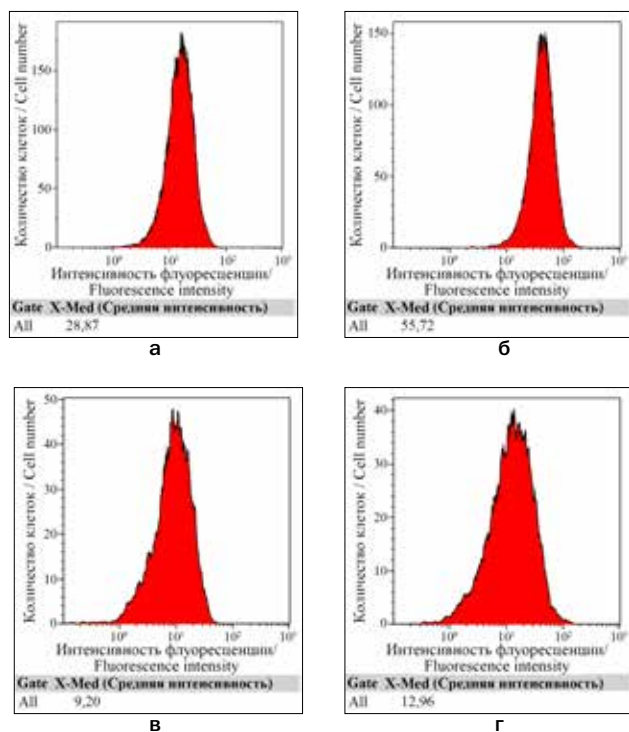


Рис. 6. Гистограммы накопления:

- а – в клетках монослоя хлорина e_6 (5 мкмоль/л);
- б – в клетках монослоя диметилового эфира хлорина e_6 (5 мкмоль/л);
- в – в клетках сфероида хлорина e_6 (5 мкмоль/л);
- г – в клетках сфероида диметилового эфира хлорина e_6 (5 мкмоль/л)

Fig. 6. Uptake histograms:

- а – in monolayer cells of chlorin e_6 (5 μ M)
- б – in monolayer cells dimethyl ester of chlorin e_6 (5 μ M)
- в – in spheroid cells of chlorin e_6 (5 μ M)
- г – in spheroid cells of dimethyl ester of chlorin e_6 (5 μ M)

ЛИТЕРАТУРА

1. Baker A., Kanofsky J.R. Quenching of singlet oxygen by biomolecules from L1210 leukemia cells // *Photochem. Photobiol.* – 1992. – Vol. 55, No. 4. – P. 523-528.
2. Moan J. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 1990. – Vol. 6, No. 3. – P. 343-344.
3. Shliakhtsin S.V., Trukhachova T.V., Isakau H.A., Istomin Y.P. Pharmacokinetics and biodistribution of Photolon (Fotolon) in intact and tumor-bearing rats // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* – 2009. – Vol. 6, No. 2. – P. 97-104.
4. Kochneva E.V., Filonenko E.V., Vakulovskaya E.G., et al. Photosensitizer Radachlorin: Skin cancer PDT phase II clinical trials // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* – 2010. – Vol. 7, No. 4. – P. 258-267.
5. Zorina T.E., Yankovskii I.V., Kravchenko I.E., et al. Liposomal formulations of chlorin e6 ester derivatives and features of their cellular uptake // *BSU Her.* – 2013. – No. 3. – P. 30-35.
6. Zorin V.P., Michalovsky I.S., Zorina T.E., Khludeyev I.I. Distribution of chlorin-e6 derivatives in biological systems: investigation of pH-effect // *Proceeding SPIE.* – 1996. – Vol. 2625. – P. 146-155.
7. Соколов С.Н., Федорук С.Л., Трухачева Т.В., Хейдоров В.П. 13{1},15{2}-диметилловый эфир хлорина Е6 – новый фотосенсибилизатор. Доказательство структуры и чистоты // *Вестник Фармации.* – 2016. – № 4 (74). – С. 53-61.
8. Zorin V.P., Khludeyev I.I., Mikhlovsky I.S., et al. Kinetic characteristics of porphyrin distribution in the blood // *Proceeding SPIE.* – 2000. – Vol. 4059. – P. 139-146.
9. Savitsky V.P., Zorin V.P., Potapnev M.P. Selective phototoxicity of chlorin-e6 derivatives toward leukemic cells // *Exp. Oncol.* – 2002. – Vol. 24, No. 2. – P. 142-144.
10. Khanna S., Bhatt A.N., Dwarakanath B.S. Chapter 11 – Multicellular Spheroid: 3-D Tissue Culture Model for Cancer Research A2 – Verma, Ashish S. // *Animal Biotechnology* / ed. Singh A. – San Diego: Academic Press, 2014. – P. 195-210.
11. Patel N.R., Aryasomayajula B., Abouzeid A.H., Torchilin V.P. Cancer cell spheroids for screening of chemotherapeutics and drug-delivery systems // *Ther. Deliv.* – 2015. – Vol. 6, No. 4. – P. 509-520.
12. Losev A.P., Nichiporovich I.N., Zhuravkin I.N., Zhavrid E.I. Energetics of chlorins as potent photosensitizers of PDT // *Proceeding SPIE.* – 1996. – Vol. 2924. – P. 40-48.
13. Mojzisoava H., Bonneau S., Vever-Bizet C., Brault D. Cellular uptake and subcellular distribution of chlorin e6 as functions of pH and interactions with membranes and lipoproteins // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – Vol. 1768, No. 11. – P. 2748-2756.
14. Bastien E., Schneider R., Hackbarth S., et al. PAMAM G4.5-chlorin e6 dendrimeric nanoparticles for enhanced photodynamic effects // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2015. – Vol. 14, No. 12. – P. 2203-2212.
15. Zorina T.E., Yankovsky I.V., Kravchenko I.E., et al. Evaluation of Phototoxicity and cytotoxicity for chlorin e6 ester derivatives and their liposomal forms // *Biophysics.* – 2015. – Vol. 60, No. 5. – P. 759-766.
16. Cunderlíková B., Gangeskar L., Moan J. Acid-base properties of chlorin e6: relation to cellular uptake // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 1999. – Vol. 53, No. 1-3. – P. 81-90.
17. Zorin V.P. et al. Intra- and intermembrane distribution of chlorin e6 derivatives // *Proceedings SPIE.* – 1994. – Vol. 2325. – P. 87-101.
18. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* – 2004. – Vol. 1, No. 4. – P. 279-293.
19. Jori G., Reddi E. The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers // *Int. J. Biochem.* – 1993. – Vol. 25, No. 10. – P. 1369-1375.
20. Akhlynina T.V., Rosenkranz A.A., Jans D.A., Sobolev A.S. Insulin-mediated intracellular targeting enhances the photodynamic

REFERENCES

1. Baker A., Kanofsky J.R. Quenching of singlet oxygen by biomolecules from L1210 leukemia cells, *Photochem. Photobiol.*, 1992, Vol. 55, No. 4, pp. 523-528.
2. Moan J. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 1990, Vol. 6, No. 3, pp. 343-344.
3. Shliakhtsin S.V., Trukhachova T.V., Isakau H.A., Istomin Y.P. Pharmacokinetics and biodistribution of Photolon (Fotolon) in intact and tumor-bearing rats, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2009, Vol. 6, No. 2, pp. 97-104.
4. Kochneva E.V., Filonenko E.V., Vakulovskaya E.G., Scherbakova E.G., Seliverstov O.V., Markichev N.A., Reshetnikov A.V. Photosensitizer Radachlorin: Skin cancer PDT phase II clinical trials, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2010, Vol. 7, No. 4, pp. 258-267.
5. Zorina T.E., Yankovskii I.V., Kravchenko I.E., Shman I.E., Zorin V.P. Liposomal formulations of chlorin e6 ester derivatives and features of their cellular uptake, *BSU Her.*, 2013, No. 3, pp. 30-35.
6. Zorin V.P., Michalovsky I.S., Zorina T.E., Khludeyev I.I. Distribution of chlorin-e6 derivatives in biological systems: investigation of pH-effect, *Proceeding SPIE*, 1996, Vol. 2625, pp. 146-155.
7. Sokolov S.N., Fedoruk S.L., Trukhacheva T.V., Kheidorov V.P. 13¹,15²-Dimethyl ester of chlorin e6 is a new photosensitizer. the proof of structure and purity, *Vestnik Farmatsii*, 2016, No. 4 (74), pp. 53-61. (in Russian).
8. Zorin V.P., Khludeyev I.I., Mikhlovsky I.S., Zorina T.E., Savitskiy V.P., Kochubyeva N.D., Kravchenko I.E. Kinetic characteristics of porphyrin distribution in the blood, *Proceeding SPIE*, 2000, Vol. 4059, pp. 139-146.
9. Savitsky V.P., Zorin V.P., Potapnev M.P. Selective phototoxicity of chlorin-e6 derivatives toward leukemic cells, *Exp. Oncol.*, 2002, Vol. 24, No. 2, pp. 142-144.
10. Khanna S., Bhatt A.N., Dwarakanath B.S. Chapter 11 – Multicellular Spheroid: 3-D Tissue Culture Model for Cancer Research A2 – Verma, Ashish S. In *Animal Biotechnology*, by ed. Singh A. San Diego, Academic Press Publ., 2014. pp. 195-210.
11. Patel N.R., Aryasomayajula B., Abouzeid A.H., Torchilin V.P. Cancer cell spheroids for screening of chemotherapeutics and drug-delivery systems, *Ther. Deliv.*, 2015, Vol. 6, No. 4, pp. 509-520.
12. Losev A.P., Nichiporovich I.N., Zhuravkin I.N., Zhavrid E.I. Energetics of chlorins as potent photosensitizers of PDT, *Proceeding SPIE*, 1996, Vol. 2924, pp. 40-48.
13. Mojzisoava H., Bonneau S., Vever-Bizet C., Brault D. Cellular uptake and subcellular distribution of chlorin e6 as functions of pH and interactions with membranes and lipoproteins, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2007, Vol. 1768, No. 11, pp. 2748-2756.
14. Bastien E., Schneider R., Hackbarth S., Dumas D., Jasnowski J., Röder B., Bezdetnaya L., Lassalle H.P. PAMAM G4.5-chlorin e6 dendrimeric nanoparticles for enhanced photodynamic effects, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2015, Vol. 14, No. 12, pp. 2203-2212.
15. Zorina T.E., Yankovsky I.V., Kravchenko I.E., Zorin V.P., Shman T.V., Belevtsev M.V. Evaluation of Phototoxicity and cytotoxicity for chlorin e6 ester derivatives and their liposomal forms, *Biophysics*, 2015, Vol. 60, No. 5, pp. 759-766.
16. Cunderlíková B., Gangeskar L., Moan J. Acid-base properties of chlorin e6: relation to cellular uptake, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 1999, Vol. 53, No. 1-3, pp. 81-90.
17. Zorin V.P. et al. Intra- and intermembrane distribution of chlorin e6 derivatives, *Proceedings SPIE*, 1994, Vol. 2325, pp. 87-101.
18. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2004, Vol. 1, No. 4, pp. 279-293.
19. Jori G., Reddi E. The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers, *Int. J. Biochem.*, 1993, Vol. 25, No. 10, pp. 1369-1375.

- activity of chlorin e6 // *Cancer Res.* – 1995. – Vol. 55, No. 5. – P. 1014-1019.
21. Oleinick N.L., Morris R.L., Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2002. – Vol. 1, No. 1. – P. 1-21.
22. Gurinovich G.P., Zorina T.E., Melnov S.B., et al. Photodynamic activity of chlorin e6 and chlorin e6 ethylenediamide in vitro and in vivo // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 1992. – Vol. 13, No. 1. – P. 51-57.
23. Sheleg S.V., Zhavrid E.A., Khodina T.V., et al. Photodynamic therapy with chlorin e(6) for skin metastases of melanoma // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* – 2004. – Vol. 20, No. 1. – P. 21-26.
24. Luo W., Liu R.S., Zhu J.G., et al. Subcellular location and photodynamic therapeutic effect of chlorin e6 in the human tongue squamous cell cancer Tca8113 cell line // *Oncol. Lett.* – 2015. – Vol. 9, No. 2. – P. 551-556.
25. West C.M., Moore J.V. Mechanisms behind the resistance of spheroids to photodynamic treatment: a flow cytometry study // *Photochem. Photobiol.* – 1992. – Vol. 55, No. 3. – P. 425-430.
26. Yuan A., Yang B., Wu J., et al. Dendritic nanoconjugates of photosensitizer for targeted photodynamic therapy // *Acta Biomater.* – 2015. – Vol. 21. – P. 63-73.
27. Gaio E., Scheglmann D., Reddi E., Moret F. Uptake and phototoxicity of Foscan®, Foslip® and Fospeg® in multicellular tumor spheroids // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 2016. – Vol. 161. – P. 244-252.
28. Coutier S., Bezdetnaya L.N., Foster T.H., et al. Effect of irradiation fluence rate on the efficacy of photodynamic therapy and tumor oxygenation in meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin (mTHPC)-sensitized HT29 xenografts in nude mice // *Radiat. Res.* – 2002. – Vol. 158, No. 3. – P. 339-345.
20. Akhlylina T.V., Rosenkranz A.A., Jans D.A., Sobolev A.S. Insulin-mediated intracellular targeting enhances the photodynamic activity of chlorin e6, *Cancer Res.*, 1995, Vol. 55, No. 5, pp. 1014-1019.
21. Oleinick N.L., Morris R.L., Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2002, Vol. 1, No. 1, pp. 1-21.
22. Gurinovich G.P., Zorina T.E., Melnov S.B., Melnova N.I., Gurinovich I.F., Grubina L.A., Sarzhevskaya M.V., Cherenkevich S.N. Photodynamic activity of chlorin e6 and chlorin e6 ethylenediamide *in vitro* and *in vivo*, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 1992, Vol. 13, No. 1, pp. 51-57.
23. Sheleg S.V., Zhavrid E.A., Khodina T.V., Kochubeev G.A., Istomin Y.P., Chalov V.N., Zhuravkin I.N. Photodynamic therapy with chlorin e(6) for skin metastases of melanoma, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 2004, Vol. 20, No. 1, pp. 21-26.
24. Luo W., Liu R.S., Zhu J.G., Li Y.C., Liu H.C. Subcellular location and photodynamic therapeutic effect of chlorin e6 in the human tongue squamous cell cancer Tca8113 cell line, *Oncol. Lett.*, 2015, Vol. 9, No. 2, pp. 551-556.
25. West C.M., Moore J.V. Mechanisms behind the resistance of spheroids to photodynamic treatment: a flow cytometry study, *Photochem. Photobiol.*, 1992, Vol. 55, No. 3, pp. 425-430.
26. Yuan A., Yang B., Wu J., Hu Y., Ming X. Dendritic nanoconjugates of photosensitizer for targeted photodynamic therapy, *Acta Biomater.*, 2015, Vol. 21, pp. 63-73.
27. Gaio E., Scheglmann D., Reddi E., Moret F. Uptake and phototoxicity of Foscan®, Foslip® and Fospeg® in multicellular tumor spheroids, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2016, Vol. 161, pp. 244-252.
28. Coutier S., Bezdetnaya L.N., Foster T.H., Parache R.M., Guillemin F. Effect of irradiation fluence rate on the efficacy of photodynamic therapy and tumor oxygenation in meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin (mTHPC)-sensitized HT29 xenografts in nude mice, *Radiat. Res.*, 2002, Vol. 158, No. 3, pp. 339-345.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА РЕЖИМОВ ОБЛУЧЕНИЯ ДЛЯ ИНТРАПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРАМИ НА ОСНОВЕ ПОРФИРИНОВ И ФТАЛОЦИАНИНОВ

А.А. Панкратов¹, Э.А. Сулейманов², Е.А. Лукьянец³, Ю.Б. Венедиктова¹, А.Д. Плютинская¹

¹Национальный медицинский исследовательский радиологический центр Минздрава России, Москва, Россия

²Республиканский Онкологический Диспансер, Грозный, Россия

³Научно-исследовательский институт органических полупродуктов и красителей, Москва, Россия

Резюме

В экспериментальных исследованиях *in vitro* и *in vivo* определены оптимальные режимы облучения для проведения интраперитонеальной фотодинамической терапии с фотосенсибилизаторами на основе порфиринов и фталоцианинов.

В эксперименте на культуре клеток HEP2 показано, что снижение плотности мощности при постоянной световой дозе достоверно приводит к увеличению эффективности фотодинамического воздействия (снижение плотности мощности с 20-80 мВт/см² до 10 мВт/см² позволило достигнуть такого же результата (гибель 90% клеток) при вдвое меньшей концентрации фотосенсибилизатора).

Полученные результаты были подтверждены в экспериментах *in vivo* на мышах с перевивной опухолью S-37. При использовании световой дозы 90 Дж/см² и плотности мощности 25 мВт/см² ни у одного животного в экспериментальной группе не было достигнуто полной резорбции опухоли. При той же световой дозе и снижении плотности мощности до 12 мВт/см² полная резорбция опухоли была получена у 34% животных, 66% животных погибло от фототоксического шока. При снижении световой дозы в два раза – до 45 Дж/см², и использовании такой же низкоинтенсивной плотности мощности (12 мВт/см²) удалось добиться полной резорбции опухоли у 100% животных.

В ходе дальнейших экспериментальных исследований по определению оптимального режима облучения для интраперитонеальной фотодинамической терапии была оценена реакция здоровой брюшины крыс на фотодинамическое воздействие и определены оптимальные параметры лазерного облучения, которые не вызывали некроза и выраженной воспалительной реакции брюшины – световая доза 10 Дж/см² при плотности мощности излучения 10 мВт/см².

Таким образом, экспериментально обоснована целесообразность применения для интраперитонеальной фотодинамической терапии низкоинтенсивных режимов облучения, что позволяет достичь высокой эффективности лечения без развития воспалительной реакции брюшины.

Ключевые слова: фотосенс, фотогем, фотодинамическая терапия, низкоинтенсивное облучение.

Для цитирования: Панкратов А.А., Сулейманов Э.А., Лукьянец Е.А., Венедиктова Ю.Б., Плютинская А.Д. Экспериментальное обоснование выбора режимов облучения для интраперитонеальной фотодинамической терапии с фотосенсибилизаторами на основе порфиринов и фталоцианинов // Biomedical Photonics. – 2017. – Т. 6, № 2. – С. 12-20.

Контакты: Панкратов А.А., e-mail: andreimnioi@yandex.ru

EXPERIMENTAL CONFIRMATION FOR SELECTION OF IR- RADIATION REGIMENS FOR INTRAPERITONEAL PHOTODY- NAMIC THERAPY WITH PORPHYRIN AND PHTHALOCYANINE PHOTSENSITIZERS

Pankratov A.A.¹, Suleymanov E.A.², Lukyanets E.A.³, Venediktova Yu.B.¹, Plyutinskaya A.D.¹

¹National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

²Republican Oncology Dispenser, Grozny, Russia

³State Scientific Center Scientific Research Institute Organic Intermediates and Dyes, Moscow, Russia

Abstract

Optimized irradiation regimens for intraperitoneal photodynamic therapy with porphyrin and phthalocyanine photosensitizers are determined in *in vitro* and *in vivo* studies.

The experimental study on HEP2 cell line showed that reduce of power density for constant light dose increased significantly the efficacy of photodynamic therapy (the reduce of power density from 20-80 mW/cm² to 10 mW/cm² had the same results (90% cell death) for half as much concentration of the photosensitizer).

The obtained results were confirmed *in vivo* in mice with grafted tumor S-37. For light dose of 90 J/cm² and power density of 25 mW/cm² none of animals in the experimental group had total resorption of the tumor. For the same light dose and decrease of power density to 12 mW/cm² total tumor resorption was achieved in 34% of animals, 66% of animals died from phototoxic shock. For twofold decrease of light dose – to 45 J/cm² with the same low-intensity power density (12 mW/cm²) we managed total tumor resorption in 100% of animals.

In the following studies of optimized irradiation regimen for intrapleural photodynamic therapy the reaction of intact peritoneum of rats on photodynamic exposure was assessed and optimized parameters of laser irradiation, which did not cause necrosis and intense inflammatory reaction of peritoneum, were determined – light dose of 10 J/cm² with power density of mW/cm².

Thus, the reasonability for use of low-intensity regimens of irradiation for intraperitoneal photodynamic therapy was confirmed experimentally with possibility of high efficacy of treatment without inflammatory reactions of peritoneum.

Key words: photosens, fotogem, photodynamic therapy, low-intensity irradiation.

For citations: Pankratov A.A., Suleymanov E.A., Lukyanets E.A., Venediktova Yu.B., Plyutinskaya A.D. Experimental confirmation for selection of irradiation regimens for in-traperitoneal photodynamic therapy with porphyrin and phthalocyanine photosensitizers, *Biomedical Photonics*, 2017, T. 6, No. 2, pp. 12-20 (in Russian).

Contacts: Pankratov A.A., e-mail: andreimnioi@yandex.ru

Введение

В настоящее время в широкую медицинскую практику интенсивно внедряются новые высокотехнологичные методы лечения, базирующиеся на последних достижениях современной науки. Одним из таких методов является фотодинамическая терапия (ФДТ) больных злокачественными новообразованиями [1-3].

Показаниями для проведения ФДТ являются доброкачественные опухоли, тяжелые дисплазии, злокачественные опухоли кожи и полых органов (желудочно-кишечный тракт, дыхательные пути, мочевой пузырь). Данный метод лечения показан также больным с тяжелой сопутствующей патологией, функциональной нерезектабельностью опухолей при первично-множественном поражении, при рецидивах заболевания после хирургического, комбинированного и других видов противоопухолевого лечения. Для ряда сложных локализаций ФДТ рассматривается как альтернатива хирургическому лечению. В последние годы исследуются возможности проведения ФДТ при диссеминированных формах рака [4-7].

В настоящее время в клинике, как правило, при проведении ФДТ используется «высокоинтенсивное» по мощности лазерное излучение (50-100 мВт/см² и выше). Однако при ряде локализаций (при опухолях брюшины и плевры) использование такого режима облучения не представляется возможным в виду высокого риска развития тяжелых побочных реакций.

Целью настоящего исследования являлось изучение в экспериментах *in vitro* и *in vivo* противоопухолевой эффективности и безопасности ФДТ с препаратами фотосенс и фотогем в «низкоинтенсивном» режиме облучения (плотность мощности лазерного излучения до 20 мВт/см²).

Материал и методы

Исследования *in vitro*

Исследования *in vitro* проводили на культуре опухолевых клеток человека – эпидермоидной карциноме гортаноглотки (HEp2). Клетки культивировали в среде ИГЛА-МЕМ, с добавлением 2 мМ L-глутамин и 10% эмбриональной телячьей сыворотки, при 37°C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂. Клетки рассевали в лунки плоскодонного 96-луночного микропланшета в концентрации 8×10⁴кл/мл. Через 24 ч роста клеток в лунки вносили по 50 мкл препарата фотосенс (ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Россия, регистрационное удостоверение РN000199/02 от 04.03.2010) в серийных разведениях и инкубировали в CO₂-инкубаторе. Световое воздействие осуществляли через 2 ч инкубации клеток с красителем. В качестве источника оптического излучения применяли светодиодный источник с максимумом излучения 670 нм. Плотность мощности составляла 10, 20, 40 и 80 мВт/см² (технические ограничения прибора не позволяли использовать плотность мощности ниже 10 мВт/см² из-за значительной ошибки измерений). После воздействия клетки инкубировали в стандартных условиях в течение 24 ч.

Оценку выживаемости клеток проводили как визуально, так и колориметрическим методом с использованием МТТ-теста [8]. Оценку фототоксического эффекта *in vitro* проводили, используя величины ИК₉₀ (концентрация, при которой наблюдается 90% гибель клеток).

Исследования *in vivo*

Исследования *in vivo* выполнены на мышах-гибридах BDF₁, самках, весом 20-25 г. Животных получали из ГУ НЦБМТ РАМН (филиал «Андреевка»). В качестве опухолевой модели исполь-

зовали саркому мыши S-37 (S-37). Опухолевый штамм S-37 поддерживали *in vivo* в асцитном варианте. Для экспериментов асцитическую жидкость в разведении 1:3 изотоническим раствором хлористого натрия прививали подкожно на наружную поверхность бедра в количестве 0,05 мл/животное. Лечение начинали на 6-ой или 7-ой день после прививки опухолевого материала. Размер опухолей на день лечения составлял 4-5 мм x 4-5 мм.

Препарат фотосенс 0,2%-ый раствор животным вводили внутривенно за 24 ч до сеанса ФДТ в дозах от 0,6 мг/кг до 5 мг/кг.

Препарат фотогем (лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения, Россия) животным вводили внутривенно за 48 ч до сеанса ФДТ в дозе, равной 35 мг/кг.

В качестве источника оптического излучения при проведении процедуры ФДТ с препаратом фотосенс использовали лазер MRL250 (КНР) с длиной волны излучения, равной 671 нм (общая мощность – 250 мВт). В экспериментах применяли следующие параметры облучения: плотность мощности (P_s) – от 5 мВт/см² до 100 мВт/см²; плотность энергии (P_w) – от 10 Дж/см² до 90 Дж/см².

При проведении процедуры ФДТ с препаратом фотогем использовали лазер «Кристалл-635» (ООО «Полироник», Москва) с длиной волны, равной 635 нм (максимальная мощность – 1000 мВт). В экспериментах применяли следующие параметры излучения: плотность мощности (P_s) – от 10 мВт/см² до 100 мВт/см²; плотность энергии (P_w) – от 10 Дж/см² до 90 Дж/см².

При проведении исследований на животных были использованы режимы проведения процедуры ФДТ, которые применяются у человека:

- в/в введение фотосенса, 24 ч → лазерное облучение;
- в/в введение фотогема, 48 ч → лазерное облучение.

Перед проведением сеанса ФДТ животных седировали путем внутримышечного введения дроперидола в дозе 6,25 мг/кг.

Противоопухолевый эффект оценивали по общепринятым в экспериментальной онкологии критериям, а также по критериям, разработанными нами для оценки эффективности ФДТ в системе *in vivo*: средней продолжительности жизни животных (СПЖ, сут), увеличению продолжительности жизни (УПЖ, %), торможению роста опухоли (ТРО, %), полной регрессии опухолевого узла (ПР, %) и излечению от опухоли, о котором судили по отсутствию ее продолженного роста у животных в течение 90 дней после лечения. Минимальным биологически-значимым эффектом считали ТРО, равное 50% [8].

Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica ver. 7.0. Достоверность различий между группами данных оценивали с применением t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни в зависимости от числа наблюдений и характера распределения величин параметров в группе. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

Результаты

Противоопухолевая эффективность и переносимость ФДТ с препаратом фотосенс при использовании «высокоинтенсивных» и «низкоинтенсивных» режимов облучения

В биологической системе *in vitro* на культуре клеток HEp2 с использованием в качестве фотосенсибилизатора препарата фотосенс установлено, что противоопухолевая эффективность зависит от плотности мощности. Так, при $P_w = 3,0$ Дж/см² и $P_s = 10$ мВт/см² ИК₉₀ составило величину, равную $2,6 \pm 0,7$ мкМ (рис. 1), в то время как при более высокой плотности мощности излучения – 20, 40 и 80 мВт/см² величина ИК₉₀ повышалась в 2 раза – до величины, равной $5,9 \pm 0,4$ мкМ. При снижении плотности энергии до 1,5 Дж/см² при плотности мощности 10, 20, 40 и 80 мВт/см² специфическая активность фотодинамического воздействия с фотосенсом была в 1,5-3 раза ниже, чем при световой дозе 3,0 Дж/см² (рис. 1).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о большей эффективности *in vitro* фотодинамического воздействия с препаратом фотосенс в «низкоинтенсивном» режиме облучения.

Это послужило основанием для проведения дальнейших исследований на животных-опухоленосителях.

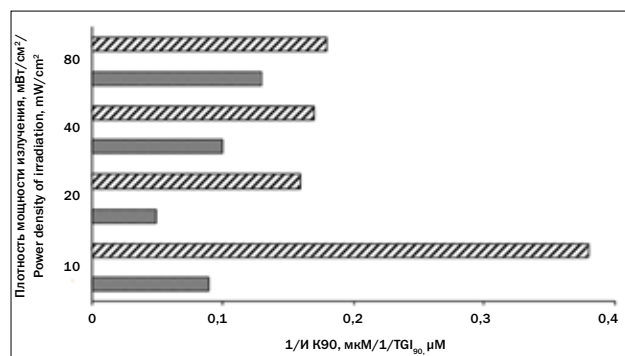


Рис. 1. Фотоиндуцированная активность фотосенса в зависимости от режимов облучения:

- ▨ световая доза 3,0 Дж/см²;
- световая доза 1,5 Дж/см²

Fig. 1. Photoinduced activity of photosens depending on irradiation regimens:

- ▨ light dose of 3,0 J/cm²;
- light dose of 1,5 J/cm²

Таблица 1

Противоопухолевая эффективность и переносимость ФДТ с препаратом фотосенс в зависимости от плотности мощности излучения у мышей с саркомой S-37

Table 1

Antitumor efficacy and tolerability of PDT with photosens depending on power density in mice with sarcoma S-37

№ группы # of the group	Доза фотосенса, мг/кг Dose of photosens, mg/kg	Параметры облучения Parameters of irradiation		Гибель мышей от фототоксического шока, % Death of mice from phototoxic shock, %	Выраженность местнотканевых реакций, баллы Intensity of local tissue reactions, points	Полная резорбция опухолевого узла, % Total resorption of tumor node, %	ТРО, % (сут после лечения) TGI, % (days after treatment)			
		Ps, мВт/см² Ps, mW/cm²	Pw, Дж/см² Pw, J/cm²							
1	5,00	100	90	0	++	0	54*(6)	51(8)	23(10)	9(15)
2	5,00	25		0	++	0	72*(6)	76*(8)	77*(10)	78*(15)
3	5,00	12		66	+++	34	100*(6)	100*(8)	100*(10)	100*(15)
4	5,00	12	45	0	+++	100	100*(7)	100*(9)	100*(12)	100*(14)
5	2,50			0	++	0	100*(11)	98*(15)	95*(18)	74*(27)
6	1,25			0	++	0	84*(7)	87*(9)	82*(12)	74*(14)
7	0,60			0	+	0	44(7)	51(9)	47(12)	54*(14)

Мыши F₁ или BDF₁, самки. Лечение начинали на 6-ой день после инокуляции опухолевого материала.

Режим лечения: фотосенс, 24 ч → облучение.

Ps – плотность мощности лазерного излучения; Pw – плотность энергии лазерного излучения; ТРО – торможение роста опухоли.

* – V опухоли у мышей в опытной группе достоверно отличается от V опухоли у мышей в контрольной группе при p<0,05.

Mice F₁ or BDF₁, female. The treatment was started on the 6th day after tumor inoculation.

Treatment regimen: photosens, 24 h → irradiation.

Ps – power density of laser irradiation; Pw – energy density of laser irradiation; TGI — tumor growth inhibition.

* – V of tumor in mice in the study group differs significantly from V of tumor in mice of the control group, p<0,05.

При проведении ФДТ с фотосенсом на мышах с опухолью S-37 наблюдали ту же закономерность, что и в опытах *in vitro*: эффективность ФДТ в значительной степени определялась режимом облучения.

Результаты экспериментов по оценке эффективности и безопасности различных световых ре-

жимов при проведении ФДТ с препаратом фотосенс у мышей с саркомой S-37 приведены в табл. 1.

Как видно из представленных данных, ФДТ в стандартном «высокоинтенсивном» режиме облучения (Ps = 100 мВт/см²; Pw = 90 Дж/см²) при использовании терапевтической дозы фотосенса 5 мг/кг приводила к ингибированию роста опухоли на 51-54% в течение

8 сут после лечения (табл. 1, опытная группа 1). Снижение плотности мощности излучения со 100 мВт/см² до 12 мВт/см² при той же плотности энергии и дозе фотосенсибилизатора существенно увеличивало эффективность лечения: максимальный терапевтический эффект (полная резорбция опухолевого узла у 34% мышей) был отмечен у животных при Ps = 12 мВт/см² (табл. 1, опытная группа 3).

Однако, при высокой плотности энергии (90 Дж/см²) со снижением плотности мощности лазерного излучения со 100 мВт/см² до 12 мВт/см² одновременно с повышением эффективности лечения наблюдали увеличение общей токсичности, которая при плотности мощности 12 мВт/см² характеризовалась гибелью животных от фототоксического

шока и выраженными местно-тканевыми реакциями в зоне облучения (табл.1, опытные группы 1-3).

С целью снижения токсического компонента лечения в дальнейших исследованиях мы пошли по пути снижения, как световой дозы лазерного излучения, так и дозы фотосенсибилизатора.

Уменьшение плотности энергии в 2 раза (до 45 Дж/см²) при сохранении «низкой» плотности мощности излучения – 12 мВт/см² и терапевтической дозы фотосенсибилизатора 5 мг/кг приводило к высокому терапевтическому эффекту без проявлений токсичности лечения: у всех животных опытной группы 4 наблюдали полную резорбцию опухолевого узла, отсутствие гибели и умеренно выраженные местно-тканевые реакции в зоне облучения (табл. 1).

Таблица 2

Противоопухолевая эффективность «низкоинтенсивной» ФДТ с препаратом фотосенс у мышей с саркомой S-37 в зависимости от плотности мощности и плотности энергии лазерного излучения.

Table 2

Antitumor efficacy of "low-intensity" PDT with photosens in mice with sarcoma S-37 depending on power density and energy density of laser irradiation

№ группы # of the group	Доза фотосенса, мг/кг Dose of photosens, mg/kg	Параметры облучения Parameters of irradiation		ТРО, % TGI, %				
		Ps, мВт/см ² Ps, mW/cm ²	Pw, Дж/см ² Pw, J/cm ²	7-е сутки после ФДТ 7 days after PDT	10-е сутки после ФДТ 10 days after PDT	13-е сутки после ФДТ 13 days after PDT	17-е сутки после ФДТ 17 days after PDT	20-е сутки после ФДТ 20 days after PDT
1	5,00	5	10	66*	43	45	46	30
2		10		73*	52	54	40	34
3		10	20	67*	62*	54*	46	38
4		20		52	48	39	39	37
5		10	30	100*	99*	99*	99*	97*
6		20		87*	86*	70*	50	56
7		10	40	100	100	100	100	100
8		20		81*	81*	73*	67*	50

Мыши BDF₁, самки.

S-37 прививали подкожно на наружную поверхность бедра.

Лечение начинали на 7-е сутки после инокуляции опухолевого материала.

Режим лечения: фотоенс, 24 ч → облучение.

Ps – плотность мощности лазерного излучения. Pw – плотность энергии лазерного излучения.

* - V опухоли у мышей в опытной группе достоверно отличается от V опухоли у мышей в контрольной группе при p<0,05.

Mice BDF₁, female.

S-37 was grafted subcutaneously on the lateral surface of thigh

The treatment was started on the 7th day after tumor inoculation.

Treatment regimen: photosens, 24 h → irradiation.

Ps – power density of laser irradiation; Pw – energy density of laser irradiation; TGI — tumor growth inhibition.

* – V of tumor in mice in the study group differs significantly from V of tumor in mice of the control group, p<0,05.

При снижении дозы фотосенсибилизатора с 5 мг/кг до 0,6 мг/кг при тех же параметрах облучения наблюдали пропорциональное снижение эффективности лечения (табл. 1, опытные группы 5-7).

Для оптимизации параметров светового воздействия ФДТ с фотосенсом в «низкоинтенсивном» режиме облучения мы варьировали параметры облучения в более широких пределах (P_s – от 5 мВт/см² до 20 мВт/см² и P_w – от 10 Дж/см² до 45 Дж/см²) при фиксированной дозе фотосенсибилизатора 5 мг/кг. Результаты по противоопухолевой эффективности приведены в табл. 2.

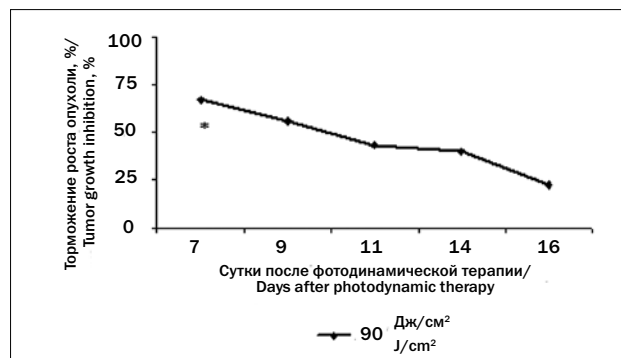
Как видно из приведенных данных, максимальный терапевтический эффект отмечен при плотности мощности 10 мВт/см² и плотности энергии 30 Дж/см² и 40 Дж/см² (табл. 2, опытные группы 5 и 7, соответственно). У животных опытной группы 5 ($P_s = 10$ мВт/см²; $P_w = 30$ Дж/см²) наблюдали длительное ТРО на уровне 97-100%, а у животных 7 группы ($P_s = 10$ мВт/см²; $P_w = 40$ Дж/см²) – полную резорбцию опухолевого узла. При снижении плотности энергии до 20 Дж/см² и ниже отмечено резкое снижение эффективности лечения (табл. 2).

Противоопухолевая эффективность и переносимость ФДТ с препаратом фотогем при использовании «высокоинтенсивных» и «низкоинтенсивных» режимов облучения

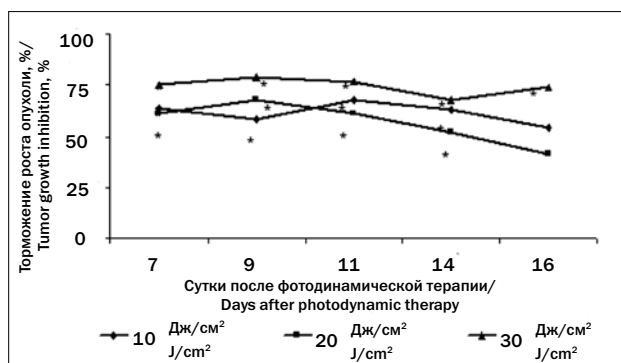
При оценке противоопухолевой эффективности ФДТ в «низкоинтенсивном» режиме облучения с другим фотосенсибилизатором, являющегося производным гематопорфирина – препаратом фотогем, также установлена высокая терапевтическая эффективность метода.

При использовании «высокоинтенсивного» режима облучения ($P_s = 100$ мВт/см²; $P_w = 90$ Дж/см²) терапевтическая эффективность ФДТ с препаратом фотогем была низкой: ТРО на уровне 56-67% наблюдали только в течение 9 сут после проведения лечебной процедуры (рис. 2). В то время как использование «низкоинтенсивных» режимов облучения ($P_s = 10$ и 20 мВт/см²; $P_w = 30$ Дж/см²) эта лечебная процедура оказывала выраженное терапевтическое действие, приводя у мышей с S-37 к ТРО на уровне 79-90% в течение 16 сут после лечения (рис. 2).

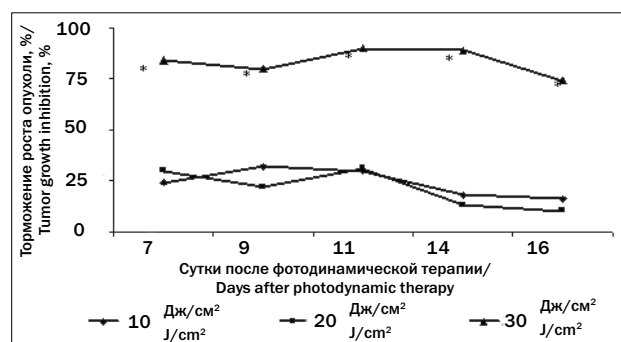
Противоопухолевая эффективность ФДТ с препаратом фотогем в «низкоинтенсивном» режиме облучения при $P_s = 10$ мВт/см² практически не зависела от плотности энергии, а при $P_s = 20$ мВт/см² наблюдали существенное повышение эффективности лечения при увеличении световой дозы излучения с 10 до 30 Дж/см² (рис. 2).



а



б



в

Рис. 2. Противоопухолевая эффективность ФДТ с препаратом фотогем в «высокоинтенсивном» и «низкоинтенсивном» режимах облучения (мыши BDF₁, самки; S-37 прививали подкожно на наружную поверхность бедра; лечение начинали на 7-е сутки после инокуляции опухолевого материала; режим лечения: фотосенсибилизатор, 48 ч → облучение):

а – плотность мощности излучения 100 мВт/см²;

б – плотность мощности излучения 10 мВт/см²;

в – плотность мощности излучения 20 мВт/см²

* – V опухоли у мышей в опытной группе достоверно отличается от V опухоли у мышей в контрольной группе при $p < 0,05$

Fig. 2. Antitumor efficacy of PDT with fotogem in “high-intensity” and “low-intensity” regimens of irradiation (mice BDF₁, female; S-37 was implanted subcutaneously in the lateral thigh; treatment was started at 7th day after tumor inoculation; treatment regimen: PS, 48 h → irradiation):

a – power density of irradiation 100 mW/cm²;

b – power density of irradiation 10 mW/cm²;

v – power density of irradiation 20 mW/cm²

* – V of tumor in mice in the experimental group differs significantly from V of tumor in mice in the control group, $p < 0,05$

Оценка местно-тканевых реакций интраперитонеальной ФДТ с препаратом фотосенс при использовании «низкоинтенсивного» режима облучения

Поскольку при проведении такого вида лечения очень важно оценить реакцию здоровой брюшины на лечение и определить оптимальные параметры лазерного облучения, которое не вызывало бы некроза и выраженной воспалительной реакции брюшины с развитием слипчивого перитонита, нами оценена реакция здоровой брюшины крыс на ФДТ с препаратом фотосенс.

Исследовали два «низкоинтенсивных» режима облучения: $Ps = 10 \text{ мВт/см}^2$ и $Pw = 10 \text{ Дж/см}^2$, а также $Ps = 10 \text{ мВт/см}^2$ и $Pw = 30 \text{ Дж/см}^2$. Фотосенсибилизатор вводили за 24 ч до ФДТ в терапевтической дозе 5 мг/кг (табл. 3). Как видно из данных, представленных в табл. 3, у крыс интраперитонеальная ФДТ с фотосенсом при $Pw = 30 \text{ Дж/см}^2$ и $Ps = 10 \text{ мВт/см}^2$ приводила к развитию выраженной воспалительной реакции в зоне облучения, которая сохранялась более 14 сут после воздействия. При снижении световой дозы до 10 Дж/см^2 у животных наблюдали значительно менее выраженные местно-тканевые реакции: гиперемию и отек брюшины,

которые сохранялись в течение 7 сут после ФДТ (табл. 3).

Обсуждение

Различия в степени выраженности противоопухолевого эффекта ФДТ с фотосенсом и фотогемом в зависимости от плотности мощности лазерного излучения («низко- и высокоинтенсивный» режимы облучения), на наш взгляд, могут быть обусловлены различной скоростью утилизации кислорода в зоне облучения. Так, облучение патологического очага после введения препарата фотосенс в жестком «высокоинтенсивном» режиме ($Ps = 100 \text{ мВт/см}^2$) приводило к резкому (в течение нескольких секунд) снижению парциального давления кислорода в опухолевой ткани практически до нулевого уровня (рис. 3а). В связи с тем, что кислород является неотъемлемым компонентом фотохимической реакции, в результате которой происходит образование активных форм кислорода и иных свободных радикалов, обладающих высоким цитотоксическим потенциалом, дальнейшее световое воздействие в данном режиме облучения является малоэффективным. Напротив, при облучении опухоли лазерным излучением с плотностью мощности, равной 25 мВт/см^2 («низкоинтенсив-

Таблица 3

Реакция здоровой брюшины у крыс на ФДТ с препаратом фотосенс в «низкоинтенсивном» режиме облучения (макроскопическая оценка)

Table 3

Reaction of normal peritoneum in rats on PDT with photosens in "low-intensity" regimen of irradiation (macroscopic assessment)

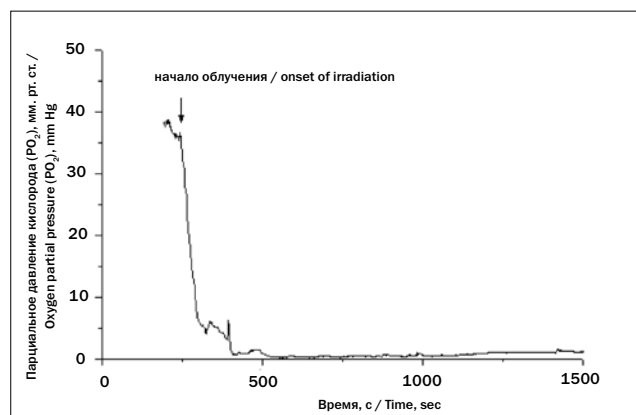
№ группы # of the group	Доза фотосенса, мг/кг Dose of photosens, mg/kg	Параметры облучения Parameters of irradiation		Местно-тканевые реакции Local tissue reactions	
		$Ps, \text{ мВт/см}^2$ $Ps, \text{ mW/cm}^2$	$Pw, \text{ Дж/см}^2$ $Pw, \text{ J/cm}^2$	7-е сутки после ФДТ 7 days after PDT	14-е сутки после ФДТ 14 days after PDT
1	5	10	30	Выраженная локальная воспалительная реакция брюшины (гиперемия, отек, кровоизлияния, налет фибрина) Intense local inflammatory reaction of peritoneum (hyperemia, edema, haemorrhaging, fibrin plaque)	Воспалительная реакция менее выражена (гиперемия, налет фибрина) Less intense inflammatory reaction (hyperemia, fibrin plaque)
2			10	Слабовыраженная воспалительная реакция брюшины (гиперемия, отек) Mild local inflammatory reaction of peritoneum (hyperemia, edema)	Без особенностей No specific findings

Режим лечения: фотосенс, 24 ч → облучение.

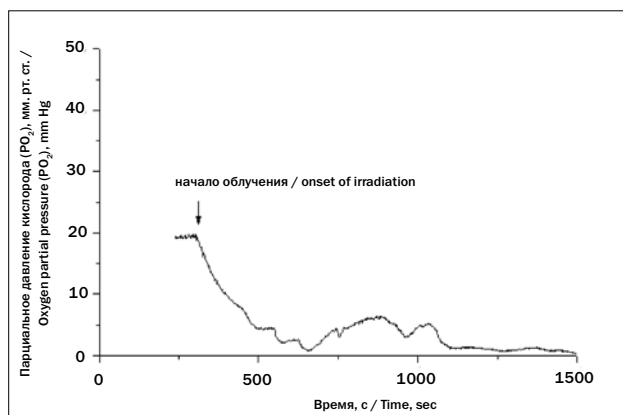
Ps – плотность мощности лазерного излучения. Pw – плотность энергии лазерного излучения.

Treatment regimen: photosens, 24 h → irradiation.

Ps – power density of laser irradiation; Pw – energy density of laser irradiation; TGI — tumor growth inhibition.



а



б

Рис. 3. Изменение парциального давления кислорода в опухолевой ткани мышей в процессе ФДТ с препаратом фотосенс в разных режимах облучения:

а – плотность мощности 100 мВт/см²; световая доза 90 Дж/см²;

б – плотность мощности 25 мВт/см²; световая доза 90 Дж/см²

Fig. 3. Change of oxygen partial pressure in tumor tissue of mice during PDT with photosens for:

а – power density of 100 mW/cm²; light dose of 90 J/cm²;

б – power density of 25 mW/cm²; light dose of 90 J/cm²

ное» световое воздействие), процесс деоксигенации опухолевой ткани протекает более медленно (рис. 3б), в результате чего в течение всего времени облучения образуется достаточное количество цитотоксических продуктов фотохимической реакции, способных эффективно индуцировать повреждение различных структурных элементов опухолевой ткани и как следствие – приводить к выраженному терапевтическому эффекту.

Таким образом, получены данные о высокой противоопухолевой эффективности и безопасности ряда «низкоинтенсивных» режимов облучения при ФДТ с препаратами фотосенс и фотогем, что чрезвычайно важно для обоснования возможности изучения использования интраперитонеальной ФДТ при первичном и метастатическом опухолевом поражении брюшины в клинике.

Заключение

Проведенные исследования в биологических системах *in vitro* на культуре опухолевых клеток чело-

века (культура клеток НЕр-2) и *in vivo* на животных с перевиваемой злокачественной опухолью (саркома S-37) показали высокую противоопухолевую эффективность метода ФДТ с препаратами фотосенс (*in vitro* и *in vivo*) и фотогем (*in vivo*) в «низкоинтенсивном» режиме облучения.

Максимальная противоопухолевая эффективность фотодинамического воздействия с препаратом фотосенс *in vitro* на монослой опухолевых клеток была достигнута при $P_s = 10$ мВт/см² и $P_w = 3$ Дж/см², а *in vivo* на опухолевом узле объемом 48-75 см³ – при $P_s = 10$ мВт/см² и $P_w = 30-40$ Дж/см²; максимальная противоопухолевая эффективность ФДТ с препаратом фотогем *in vivo* на опухолевом узле объемом 48-75 см³ – при $P_s = 10$ и 20 мВт/см² и $P_w = 30$ Дж/см².

Интраперитонеальная ФДТ с препаратом фотосенс при $P_w = 30$ Дж/см² и $P_s = 10$ мВт/см² приводила к развитию сильной воспалительной реакции брюшины, а при $P_w = 10$ Дж/см² и $P_s = 10$ мВт/см² местнотканевые реакции в зоне облучения были слабо выражены.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чиссов В.И., Соколов В.В., Филоненко Е.В. Фотодинамическая терапия злокачественных опухолей. Краткий очерк развития и опыт клинического применения в России // Российский химический журнал. – 1998. – Т. XLII, № 5. – С. 5-9.
2. Agostinis P, Berg K, Cengel K.A., et al. Photodynamic therapy of cancer: an update // CA Cancer J Clin. – 2011. – Vol. 61, No. 4. – P. 250-281.

REFERENCES

1. Chissov V.I., Sokolov V.V., Filonenko E.V. Photodynamic therapy of malignant tumors. A brief history of development and clinical use in Russia, *Rossiiskii khimicheskii zhurnal*, 1998, Vol. XLII, No. 5, pp. 5-9. (in Russian).
2. Agostinis P, Berg K, Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B.C., Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update, *CA Cancer J Clin.*, 2011, Vol. 61, No. 4, pp. 250-281.

3. Dougherty T.J., Marcus S.L. Photodynamic therapy // *Eur J Cancer*. – 1992. – Vol. 28A, No. 10. – P. 1734-1742.
4. Соколов В.В., Филоненко Е.В., Карпова Е.С., Мамонтов А.С. Возможности фотодинамической терапии больных раком пищевода стадии T1N0M0: клинические наблюдения // *Российский онкологический журнал*. – 2007. – № 6. – С. 36-38.
5. Филоненко Е.В., Вашакмадзе Л.А., Кириллов Н.В. и др. Интраоперационная фотодинамическая терапия при лечении местнораспространенного и диссеминированного рака желудка // *Онкохирургия*. – 2012. – Т. 4, № 3. – С. 57-61.
6. Ivanova-Radkevich V. I., Filonenko E. V., Slovokhodov E.K., et al. Organization of clinical trials of photosensitizer based on 5-aminolevulinic acid hexyl ester // *Indian Journal of Science and Technology*. – 2016. – Vol. 9(18). – P. 1-7. DOI: 10.17485/ijst/2016/v9i18/93759
7. Filonenko E.V., Kaprin A.D., Alekseev B.Ya., Apolikhin O.I., Slovokhodov E.K., Ivanova-Radkevich V.I., Urlova A.N. 5-Aminolevulinic acid in intraoperative photodynamic therapy of bladder cancer (results of multicenter trial) // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2016. – Vol. 16. – P. 106-109.
8. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1 / под ред. Миронова А.Н., Бутаняна Н.Д. и др. – М.: Гриф и К., 2012. – 944 с.
3. Dougherty T.J., Marcus S.L. Photodynamic therapy, *Eur J Cancer*, 1992, Vol. 28A, No. 10, pp. 1734-1742.
4. Sokolov V.V., Filonenko E.V., Karpova E.S., Mamontov A.S. Opportunities of photodynamic therapy of patients with esophageal cancer stage T1N0M0: case report, *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal*, 2007, No. 6, pp. 36-38. (in Russian).
5. Filonenko E.V., Vashakmadze L.A., Kirillov N.V., Khomyakov V.M., Kolobaev I.V., Krylova G.I. Intraoperative photodynamic therapy for locally advanced and disseminated gastric cancer, *Onkokhirurgiya*, 2012, Vol. 4, No. 3, pp. 57-61. (in Russian).
6. Ivanova-Radkevich V.I., Filonenko E.V., Slovokhodov E.K., Smirnova I.P., Kuznetsova O.M., Lobaeva T.A., Gushchina Yu.Sh. and Khadasheva Z.S. Organization of clinical trials of photosensitizer based on 5-aminolevulinic acid hexyl ester, *Indian Journal of Science and Technology*, 2016, Vol. 9(18), pp. 1-7. DOI: 10.17485/ijst/2016/v9i18/93759
7. Filonenko E.V., Kaprin A.D., Alekseev B.Ya., Apolikhin O.I., Slovokhodov E.K., Ivanova-Radkevich V.I., Urlova A.N. 5-Aminolevulinic acid in intraoperative photodynamic therapy of bladder cancer (results of multicenter trial), *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2016, Vol. 16, pp. 106-109.
8. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' 1* [Handbook for management of pre-clinical studies of pharmaceutical preparations. Part 1], by eds Mironov A.N., Butanyan N.D. Moscow, Grif i K. Publ., 2012. 944 p.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АУТОФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕРМАТОСКОПИИ У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ

Н.Н. Петрищев¹, Г.В. Папаян¹, А.В. Крылов¹, Е.В. Крылова¹, S. Kim²

¹Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

²SOI-Korea Center (KERI), Republic of Korea

Резюме

Приведены результаты аутофлуоресцентной дерматоскопии с помощью видеодерматоскопа «EcoSkin» у пациентов с различными дерматологическими заболеваниями. В исследование были включены 64 пациента, 27 из которых страдали различными формами псориаза, 11 – угревой болезнью, 3 – розацеа, 5 – экземой, 3 – клещевым дерматитом, 4 – микозом гладкой кожи, 7 – atopическим дерматитом, 4 – себорейным дерматитом. Наибольшие изменения аутофлуоресценции были выявлены в патологических очагах у больных псориазом. Авторы предполагают, что повышенная аутофлуоресценция порфиринов в псориазных бляшках в данном исследовании связана с усиленной пролиферацией в патологических тканях, а также с нарушением функции печени. При анализе аутофлуоресцентных изображений у больных, страдающих розацеа, экземой, atopическим и клещевым дерматитом, не было определено достоверных отличий в картине аутофлуоресценции участков пораженной кожи в сравнении с неизменной кожей у тех же пациентов. При обследовании пациентов с угревой болезнью была выявлена картина точечной красно-оранжевой аутофлуоресценции кожи в себорейных зонах, соответствующая расположению устьев сально-волосяного аппарата, что авторы связывают с инфицированием *Propionibacterium acnes*.

Ключевые слова: псориаз, фотосенсибилизатор, 5-аминолевулиновая кислота, флуоресцентная диагностика, протопорфирин IX, аутофлуоресценция.

Для цитирования: Петрищев Н.Н., Папаян Г.В., Крылов А.В., Крылова Е.В., Kim S. Использование аутофлуоресцентной дерматоскопии у больных псориазом // Biomedical Photonics. – 2017. – Т. 6, № 2. – С. 21–26.

Контакты: Крылов А.В., e-mail: krylspb@mail.ru

USE OF AUTOFLUORESCENCE DERMATOSCOPY IN PATIENTS WITH PSORIASIS

Petrishchev N.N.¹, Papayan G.V.¹, Krylov A.V.¹, Krylova E.V.¹, Kim S.²

¹Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, Russia

²SOI-Korea Center (KERI), Republic of Korea

Abstract

Results of autofluorescence dermatoscopy using videodermatoscope «EcoSkin» in patients with different dermatologic diseases are represented. The study included 64 patients, 27 of them had different types of psoriasis, 11 – acne, 3 – rosacea, 5 – eczema, 3 – mite-induced dermatitis, 4 – superficial mycosis of the glabrous skin, 7 – atopical dermatitis, 4 – seborrheic dermatitis. The major changes of autofluorescence were detected in pathological foci in patients with psoriasis. Authors suppose that increased autofluorescence of porphyrins in psoriatic plaques in the study is associated with enhanced proliferation in pathological tissues and with liver dysfunction. The analysis of autofluorescence images in patients with rosacea, eczema, atopical and mite-induced dermatitis did not show significant difference in autofluorescence images of affected skin comparing with intact skin in same patients. In patients with acne a pattern of spot red-orange autofluorescence of skin in seborrheic areas corresponding with location of openings of pilosebaceous apparatus was detected that was associated by authors with *Propionibacterium acnes* infection.

Key words: psoriasis, photosensitizer, 5-aminolevulinic acid, fluorescence diagnosis, protoporphyrin IX, autofluorescence.

For citations: Petrishchev N.N., Papayan G.V., Krylov A.V., Krylova E.V., Kim S. Use of autofluorescence dermatoscopy in patients with psoriasis, *Biomedical Photonics*, 2017, T. 6, No. 2, pp. 21–26 (in Russian).

Contacts: Krylov A.V., e-mail: krylspb@mail.ru

Введение

Псориаз остается одним из наиболее распространенных хронических заболеваний кожи, занимая одно из ведущих мест в структуре заболеваемости населения Российской Федерации. Считается, что частота

заболевания в различных странах колеблется от 0,1% до 3%, при этом доля таких пациентов среди дерматологических больных составляет до 12–15% [1]. Как правило, псориаз не приводит к инвалидизации, тягелому повреждению функции внутренних органов,

исключая случаи, когда развивается псориатический артрит. Тем не менее, качество жизни пациентов, в том числе и за счет социальной дезадаптации, оказывается сравнимым с качеством жизни больных с серьезной патологией внутренних органов, особенно при наличии высыпаний на лице и открытых участках тела [2]. В настоящее время диагностика данного заболевания основывается на анализе клинической картины, сборе анамнеза, при этом правильность постановки диагноза в значительной мере зависит от квалификации и опыта врача-дерматолога. Решающее значение при дифференциальной диагностике остается за проведением морфологической диагностики, включающей взятие биопсии кожи с последующим гистологическим исследованием. Однако в практической реализации этот метод часто вызывает затруднения, в связи с технической сложностью, дороговизной и инвазивностью. Совокупность этих факторов, материальные затруднения и переживания относительно косметического дефекта после взятия биопсии зачастую определяют отрицательное отношение к этому исследованию со стороны пациентов. Возможность применения подобного метода в амбулаторной практике во многом ограничена и используется в исключительных случаях, для проведения дифференциальной диагностики неясного дерматоза. Кроме того, контроль состояния больного и эффективности проводимого лечения остается на данный момент также на уровне визуальной оценки врача, поскольку объективизация состояния больного, например, при помощи расчета специальных индексов (PASI) представляет длительный и трудоемкий процесс, который трудно использовать в рутинной работе.

Разработка и введение в клиническую практику неинвазивных, быстрых и простых в применении методов диагностики и оценки состояния кожи сделает возможным проведение массового, рутинного обследования и обеспечит как профилактический мониторинг, так и наиболее адекватный подбор терапии. Одним из таких методов может стать оценка флуоресценции кожи.

Флуоресцентное свечение ткани может быть обусловлено различными эндогенными веществами – белками (коллагеном и эластином), пиридиннуклеотидами, флавопротеинами и порфиринами, которые под действием ультрафиолетового или фиолетового излучения вызывают свечение ткани, называемое собственной флуоресценцией или аутофлуоресценцией [3,4]. Кроме того, флуоресценция может быть вызвана введенными в организм извне специальными красителями – флуорохромами или фотосенсибилизаторами. Подобное свечение экзогенных веществ, обычно возбуждаемое синими лучами, относится к вторичной флуоресценции. Наконец, существуют препараты, которые стимулируют синтез флуоресцирующих эндогенных веществ. Таким веществом является 5-аминолевулиновая кислота (5-АЛК), которая сама по себе не флуоресцирует, но

способна превращаться в протопорфирин IX (ППІХ), обладающий флуоресцентными свойствами. Этот эффект лежит в основе метода флуоресцентной диагностики. При использовании этого метода по картине кожи, возникающей в результате 5-АЛК-индуцированной флуоресценции ППІХ, возможно проведение дифференциальной диагностики различных дерматологических патологий: базалиомы, плоскоклеточного рака кожи, сенильной кератомы, саркомы Капоши, меланомы, псориаза и др. [5]. Возможность применения метода 5-АЛК-индуцированной флуоресценции ППІХ для диагностики псориаза, а также для контроля его лечения при использовании фотодинамической терапии подробно исследовано в ряде работ [6-11].

Начиная с прошлого века, многие авторы показывают корреляцию между флуоресценцией после аппликаций 5-АЛК и содержанием ППІХ, в том числе при псориазе и актиническом кератозе [5,12,13].

В одной из работ Т. Smits и соавт. [10] отмечают, что возможна макроскопическая визуализация накопления ППІХ, однако существуют трудности в интерпретации этих данных в силу низкой воспроизводимости процедуры диагностики и недостаточного понимания механизмов, вовлеченных в процесс избирательного накопления ППІХ. В исследовании участвовали пациенты, страдающие псориазом и актиническим кератозом, которым наносили 20%-ю мазь с 5-АЛК на пораженную и здоровую кожу с 3-часовой экспозицией. После проведения флуоресцентной диагностики, производили биопсию интенсивно флуоресцирующих пораженных и здоровых участков кожи. Оценка материала, взятого при помощи биопсии, осуществляли методом спектрофлуориметрии. Кроме этого, при помощи специального программного обеспечения анализировали цифровые фотографии, полученные в ходе флуоресцентной диагностики. Уровень ППІХ в биоптате пораженной кожи, как при псориазе, так и при актиническом кератозе, оказался значительно выше, по сравнению со здоровой кожей ($p < 0,05$). При этом наблюдали значительную корреляцию определяемой макроскопически флуоресценции и содержания ППІХ.

В последующих работах Т. Smits и соавт. попробовали оценить клиническую эффективность, иммуногистохимические изменения и накопление ППІХ у пациентов, страдающих псориазом, проходивших фотодинамическую терапию с 5-АЛК [7]. В исследование были включены пациенты с вульгарным бляшечным псориазом в стационарной стадии. Две симметрично расположенные бляшки у каждого пациента в случайном порядке обрабатывали при помощи 10%-ой 5-АЛК или плацебо с 2-часовой экспозицией, после чего проводили фотодинамическую терапию один раз в неделю, в течение 4 нед (разовая и суммарная световые дозы – 2 Дж/см² и 8 Дж/см², соответственно). Перед проведением, в процессе и после облучения осуществляли флуоресцент-

ную диагностику. До терапии, на 1-ой и на 6-ой неделе происходило взятие биопсии для иммуногистохимического анализа (анализ пролиферации, дифференцировки и Т-клеточной инфильтрации: Ki67, K10, CD4, CD8 и CD45RO). Оценка псориазных бляшек производилась при помощи расчета специальных индексов. В интервале от 1-ой до 6-ой недели в результате фотодинамической терапии значительно снизилось число Ki67, в то время как экспрессия K10 нарастала. После 6 нед значительное улучшение наблюдалось для CD8 и CD45RO. При этом в участках, получавших лечение при помощи плацебо, подобные изменения выявлены не были. Индекс тяжести псориазного поражения оказался также значительно ниже для бляшек, подвергшихся лечению с использованием 5-АЛК. Неоднородность макроскопической флуоресценции отмечали в течение всего периода лечения, несмотря на использование кератолитических препаратов. Таким образом, авторам удалось показать положительную клиническую динамику у пациентов с псориазом при проведении фотодинамической терапии с 5-АЛК наряду с гистологическим улучшением, выражавшемся в нормализации эпидермальной дифференцировки, пролиферации и Т-клеточной инфильтрации. Авторы предположили, что дальнейшие исследования с оптимизацией режимов ФДТ смогут увеличить возможную клиническую эффективность.

Также в 2006 г. М.М. Kleinpenning, T. Smits и соавт. провели иммуногистохимическое исследование гетерогенности флуоресценции, наблюдаемой при псориазе после аппликации 5-АЛК [8]. Авторы пришли к заключению, что неоднородность 5-АЛК-индуцированной флуоресценции в псориазных бляшках соотносится с гетерогенным распределением ППХ в эпидермисе, что может быть результатом неравномерного проникновения в эпидермис 5-АЛК и/или света вследствие различной толщины рогового слоя. Этим же может быть объяснена различная клиническая эффективность фотодинамической терапии при псориазе. Представленные наблюдения предполагают, что для наилучших результатов флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии необходимым условием является достаточная степень десквамации эпидермиса.

В работе R. Bissonnette, H. Zeng и соавт. [14] показано, что диагностика псориаза возможна также на основе исследования аутофлуоресцентных свойств кожи, которые регистрировали с помощью специализированного макроспектрофлуориметра [4]. Данный прибор построен на основе волоконно-оптического многоканального спектрометра (PC 1000, Ocean Optics, США), оснащенного He-Cd лазером (442 нм). Спектры флуоресценции измеряли путем зондирования различных участков кожи диаметром около 3 мм. В исследование были включены 75 пациентов с псориазом и 66 паци-

ентов с другими дерматологическими заболеваниями. Внутри псориазных бляшек у 34 из 75 (45%) пациентов с псориазом была зарегистрирована флуоресценция с длиной волны 635 нм. Этот пик отсутствовал внутри псориазных бляшек у 41 пациента с псориазом, в нормальной коже всех больных псориазом и у всех включенных в исследование пациентов с другими дерматологическими заболеваниями. Наблюдение участков кожи с флуоресценцией на длине волны 635 нм с помощью лампы Вуда выявило, что флуоресценция распределяется внутри псориазных бляшек гетерогенным образом: у одного и того же пациента в части псориазных бляшек с большим наслоением роговых чешуек флуоресценция присутствовала, а в части – полностью отсутствовала. Микроспектрофотометрическое исследование отдельных слоев кожи показало, что красная аутофлуоресценция наблюдается только в эпидермисе, преимущественно в поверхностном роговом слое. Анализ спектров возбуждения и флуоресценции отдельных псориазных бляшек показал, что они идентичны аналогичным спектрам растворов ППХ. Высокоэффективная жидкостная хроматография также показала присутствие ППХ в кислотных экстрактах из бляшек от тех же пациентов. Все это позволило авторам сделать вывод, что неизменные псориазные элементы способны демонстрировать красную флуоресценцию за счет повышенного уровня протопорфирина IX в поверхностных роговых чешуйках.

Результаты данной работы позволили предложить патенты на устройство и способ диагностики псориаза [15,16], основанный на регистрации спектров флуоресценции в отдельных участках кожи и оценке уровня эндогенного порфирина по характерному пику флуоресценции с максимумом на 630-635 нм.

У локальной флуоресцентной спектроскопии имеется ряд недостатков затрудняющих диагностику:

а) небольшая площадь анализируемого участка, обусловленная размерами оптического зонда, имеющего, как правило, диаметр 1-3 мм;

б) ограниченное число случайно отбираемых участков (как это делается при рандомизированной биопсии) приводит к тому, что можно легко пропустить флуоресцирующий участок, учитывая гетерогенность свечения;

в) отсутствие данных о пространственной структуре объекта в свете флуоресценции исключает возможность получения морфологической информации, которая может оказаться полезной для диагностики.

Для того чтобы устранить эти недостатки, необходимо наряду со спектральной информацией получать флуоресцентные изображения, что можно сделать при использовании метода цветной флуоресцентной видеодерматоскопии.

Целью настоящей работы является исследование возможности диагностики псориаза по аутофлуорес-

центной картине, регистрируемой с помощью флуоресцентного видеодерматоскопа «EcoSkin» (SOI-Korea Center (KERI), Корея).

Материал и методы

Для регистрации и оценки флуоресценции кожи был использован флуоресцентный видеодерматоскоп «EcoSkin», разработанный в процессе российско-корейского научно-технического сотрудничества в SOI-Korea Center (KERI) [17]. Прибор представляет собой компактное ручное устройство, которое обеспечивает легкий доступ к различным участкам тела. Флуоресценцию возбуждают фиолетовыми лучами вблизи 400 нм с помощью светодиодов, а регистрацию флуоресцентной картины осуществляют с помощью телевизионного RGB-детектора.

Высокая чувствительность прибора и выбранные условия возбуждения и регистрации флуоресценции позволяют получать флуоресцентные изображения кожи с высоким пространственным разрешением и контрастом, как в свете вторичной, так и собственной флуоресценции. Изображение формируется в цветном виде, позволяющем, в определенной степени, совместить преимущества спектроскопических и изображающих флуоресцентных методов исследования кожи, поскольку спектральные различия флуоресценции отражаются в изменениях цветового тона и насыщенности формируемой картины. Видео-способ наблюдения позволяет оперативно просматривать один участок кожи за другим и регистрировать динамические процессы.

Пониженная чувствительность камерной головки к внешней засветке позволяет работать в светлом помещении, а дистанционные элементы управления позволяют быстро изменять режимы работы прибора. Прибор функционирует под управлением специализированной программы «Skin-Matrix». Программа обеспечивает возможность документирования результатов исследования в режимах фото- и видео-регистрации и выполнения измерительных функций, позволяющих объективно оценивать параметры флуоресцентной картины по интенсивности, цветовым различиям и размерам. Кроме диагностики, прибор может использоваться для контроля эффективности препаратов и фотодинамического лечебного воздействия.

При проведении исследования имелась возможность одновременного наблюдения одного и того же участка в свете флуоресценции и в белом свете, при этом пониженная чувствительность камерной головки к внешней засветке позволяла проводить работу в светлом помещении, не требуя организации специального помещения, как при работе с лампой с фильтром Вуда.

Перед проведением диагностических манипуляций у всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Были

обследованы больные, обратившиеся на амбулаторный прием к врачу-дерматологу. Отбирали пациентов, не получавших на момент осмотра наружной или системной терапии.

Исследуемая группа составила 64 человека, в том числе 39 женщин и 25 мужчин, в возрасте от 19 до 57 лет. Из них 27 человек страдали различными формами псориаза (11 женщин, 16 мужчин), 11 – угревой болезнью (7 женщин, 4 мужчин), 3 – розацеа (3 женщины), 5 – экземой (3 женщины, 2 мужчин), 3 – клещевым дерматитом (2 женщины, 1 мужчина), 4 – микозом гладкой кожи (3 женщины, 1 мужчина), 7 – атопическим дерматитом (4 женщины, 3 мужчины), 4 – себорейным дерматитом (4 женщины, 2 мужчин). Данное распределение нозологических форм является случайным и отражает в большей степени специфику работы конкретного учреждения, нежели общую городскую статистику заболеваемости.

Результаты и обсуждение

При анализе изменений кожи больных, страдающих розацеа, экземой, атопическим и клещевым дерматитом, не было определено достоверных отличий в картине аутофлуоресценции участков пораженной кожи в сравнении с неизменной кожей у тех же пациентов. При обследовании пациентов с угревой болезнью была выявлена картина точечной красно-оранжевой аутофлуоресценции кожи в себорейных зонах, соответствующая расположению устьев сально-волосяного аппарата. Данная картина, вероятно, обусловлена флуоресценцией продуктов метаболизма *Propionibacterium acnes*, что было ранее описано в ряде работ [18].

При оценке способности к аутофлуоресценции кожи пациентов, страдающих псориазом, у основной части больных было определена красная флуоресценция в области расположения псориазных элементов. При этом ни нормальная кожа вне псориазных элементов, ни кожа здоровых людей и пациентов с иной дерматологической патологией не показали при дерматоскопии столь значимых изменений. Пример полученного изображения псориазных элементов показан на рис.

Можно предположить, что красная аутофлуоресценция, связанная с присутствием эндогенных порфиринов, определяется за счет увеличения их количества в кератиноцитах, вследствие ускоренной пролиферации. С другой стороны, порфирины могут усиленно накапливаться в коже при нарушении функции печени, что зачастую имеет место в патогенезе псориаза.

При выполнении данного исследования, были отобраны пациенты, не получавшие ранее никакой аппликационной терапии. Также клинически у всех данных больных не определялось признаков, характерных для инфекционного поражения кожи. Поэтому мы считаем, что повышенная аутофлуоресценция порфиринов в нашем исследовании связана только с усиленной про-

лиферацией в тканях псориазической бляшки и нарушением функции печени, а вклад других механизмов повышенной аккумуляции эндогенных порфиринов ничтожно мал.

Установлено, что ключевую роль в синтезе порфиринов, необходимых не только для связывания кислорода эритроцитами, но и для процессов деградации токсинов в печени, а также для высвобождения клетками энергии питательных веществ, играет белок ABCB6.

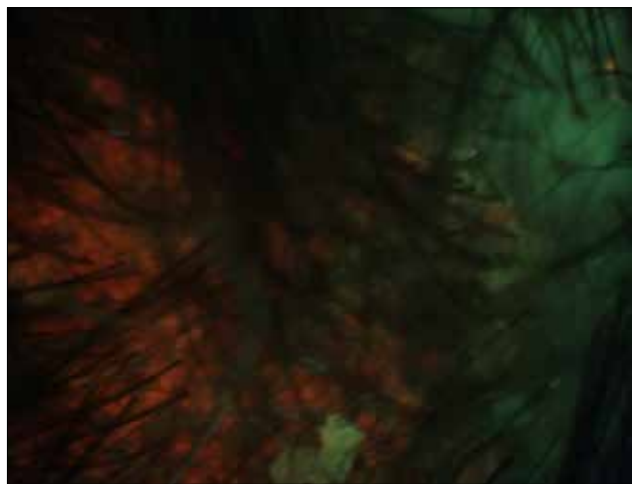


Рис. Красная флуоресценция псориазической бляшки кожи волосистой части головы при осмотре в режиме аутофлуоресценции

Fig. Red fluorescence of psoriatic plaque on scalp for examination in autofluorescence regimen

Белок ABCB6 входит в структуру наружной мембраны митохондрий и транспортирует порфирин внутрь митохондрий, где последний превращается в гем. Гем является связывающей кислород частью молекулы гемоглобина, активной частью ряда разрушающих токсины печеночных ферментов, а также звеном «дыхательной цепи» митохондриальных ферментов, использующих кислород для синтеза богатых энергией соединений. Следует отметить, что ускоренная пролиферация кератиноцитов требует значительных энергетических затрат. Между белком ABCB6 и уровнями порфирина и гема в клетке существует сложная динамическая взаимосвязь. Так, повышение содержания ABCB6 в митохондриальной мембране приводит к усиленной продукции клеткой порфирина, являющегося сырьем для синтеза

гема. Вероятно, изменение накопления протопорфирина кератиноцитами при псориазе связано с нарушением нормальных механизмов транспорта и функционирования белка ABCB6 [19].

Следует отметить, что дифференциальная диагностика стертых клинических форм псориаза и других, сходных по наблюдаемой картине дерматозов может вызывать значительные затруднения. Иногда сложность постановки окончательного диагноза велика настолько, что, например, в ряде европейских стран широкое распространение получил термин «себопсориаз». Это диагноз, к которому склоняются доктора в случае картины изолированного псориазического поражения кожи волосистой части головы, практически неразличимого с проявлениями себорейного дерматита.

В большинстве случаев, картину более интенсивной аутофлуоресценции наблюдали в области псориазических высыпаний на закрытых участках тела, особенно при инверсном псориазе, что возможно связано с «эффектом выгорания» эндогенных флуорофоров при инсоляции. Не было замечено четких различий наблюдаемой картины в зависимости от пола и возраста, что вероятно связано с недостаточным размером имеющейся статистической выборки и требует дальнейшего изучения. Анализ подобных закономерностей технически возможен при количественной оценке интенсивности флуоресценции в очагах поражения по критерию превышения яркости красной компоненты изображения относительно заранее выбранного порогового уровня.

Методика, не связанная с нанесением на кожу дополнительных препаратов и/или парентеральным либо наружным введением фотосенсибилизаторов, оказывается предпочтительной в отсутствии рисков аллергических реакций, в виду технической простоты и доступности для амбулаторной практики.

Заключение

Таким образом, получение аутофлуоресцентных изображений кожи и количественное определение интенсивности флуоресценции могут быть использованы для объективизации оценки состояния больного. Видеодерматоскоп «EcoSkin» расширяет возможности неинвазивной диагностики псориаза в клинической практике и имеет ряд преимуществ перед рутинными методами обследования кожи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соколовский Е.В., Петухова А.В., Смирнова Т.С. и др. Анализ заболеваемости псориазом в Санкт-Петербурге // Журнал дерматовенерологии и косметологии. – 2002. – № 2. – С. 6-9.
2. Кучеренко В.З., Стукалова Н.Я. Измерение показателей качества жизни у больных псориазом как важной составляющей лечебно-диагностического процесса // Здоровье и образование в XXI веке. – 2006. – Т. 8, № 9. – С. 433.

REFERENCES

1. Sokolovskii E.V., Petukhova A.V., Smirnova T.S., Slobodzyan G.V., Kudryashov Yu.M., Lungu S.M., Bychkova A.A. Analysis of psoriasis incidence in Saint-Petersburg, *Zhurnal dermatovenerologii i kosmetologii*, 2002, No. 2, pp. 6-9. (in Russian).
2. Kucherenko V.Z., Stukalova N.Ya. Study of life quality characteristics in patients with psoriasis as important step of treatment and diagnosis process, *Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke*, 2006, Vol. 8, No. 9, pp. 433. (in Russian).

3. Parrish J.A., Jaenicke K.F., Anderson R.R. Erythema and melanogenesis action spectra of normal human skin // *Photochem Photobiol.* – 1982. – Vol. 36 (2). – P. 187-191.
4. Zeng H., MacAulay C., Palcic B., McLean D. A computerized autofluorescence and diffuse reflectance spectroanalyser system for in vivo skin studies // *Phys Med Biol.* – 1993. – Vol. 38. – P. 231-240.
5. Fritch C., Ruzichka T. *Fluorescence Diagnosis and Photodynamic Therapy of Skin Diseases. Atlas and Handbook.* – Wien-New-York: Springer-Verlag, 2003. – 124 p.
6. Stringer M.R., Collins P., Robinson D.J., et al. The accumulation of protoporphyrin IX in plaque psoriasis after topical application of 5-aminolevulinic acid indicates a potential for superficial photodynamic therapy // *J Invest Dermatol.* – 1996. – Vol. 10, No. – P. 176-181.
7. Smits T., Kleinpenning M.M., van Erp P.E.J., et al. A placebo-controlled randomized study on the clinical effectiveness, immunohistochemical changes and protoporphyrin IX accumulation in fractionated 5-aminolaevulinic acid-photodynamic therapy in patients with psoriasis // *British Journal of Dermatology.* – 2006. – Vol. 155, No. 2. – P. 429-436.
8. Kleinpenning M.M., Smits T., Ewalds E., et al. Heterogeneity of fluorescence in psoriasis after application of 5-aminolaevulinic acid: an immunohistochemical study // *British Journal of Dermatology.* – 2006. – Vol. 155, No. 3. – P. 539-545.
9. Bissonnette R., Zeng H., McLean D.I., et al. Oral aminolevulinic acid induces protoporphyrin IX fluorescence in psoriatic plaques and peripheral blood cells // *Photochemistry and Photobiology.* – 2001. – Vol. 74, No. 2. – P. 339-345.
10. Smits T., Robles C.A., van Erp P.E.J., et al. Correlation Between Macroscopic Fluorescence and Protoporphyrin IX Content in Psoriasis and Actinic Keratosis Following Application of Aminolevulinic Acid // *Journal of Investigative Dermatology.* – 2005. – Vol. 125. – P. 833-839.
11. Stringer M.R., Robinson D.J., Collins P. Establishment of treatment parameters for ALA-PDT of plaque psoriasis // *Proceedings of SPIE.* – 1996. – Vol. 2924. – P. 314-318.
12. Филоненко Е.В., Гришаева А.Б. Методологические аспекты флюоресцентной диагностики злокачественных опухолей с препаратом аласенс // *Российский онкологический журнал.* – 2011. – № 5. – С. 30-33.
13. Филоненко Е.В., Ханмурзаева А.Г. Флюоресцентная диагностика с аласенсом у больных раком кожи // *Лазерная медицина.* – 2012. – Т. 16, № 3. – С. 32-34.
14. Bissonnette R., Zeng H., McLean D., et al. Psoriatic Plaques Exhibit Red Autofluorescence that is Due to Protoporphyrin IX // *Journal of Investigative Dermatology.* – 1998. – Vol. 111. – P. 586-591.
15. Zeng H., Lui H., MacAulay C., et al. Spectrometer system for diagnosis of skin disease. – US6008889, 1999.
16. Lui H., MacAulay C., Zeng H., et al. Photoactivation of endogenous porphyrins for treatment of psoriasis. – US6269818, 2001.
17. Kang U., Папаян Г.В., Вае С.-J. и др. Флуоресцентный видеодерматоскоп // *Оптический журнал.* – 2008. – Т. 75, № 1. – С. 32-38.
18. Папаян Г.В., Петрищев Н.Н., Аравийская Е.Р. и др. Оценка эффективности наружной терапии акне путем анализа цветных флуоресцентных изображений кожи // *Актуальные проблемы лазерной медицины / Под ред. Н.Н.Петрищева.* – Санкт-Петербург: Международный общественный Фонд культуры и образования, 2016. – С.201-210.
19. Вельшер З.В., Стаханов Л.М., Котова О.Е. Применение аутофлуоресцентного исследования в диагностике рецидива базальноклеточного рака кожи и оценке адекватности лазерного удаления опухоли // *Хирург.* – 2008. – № 1. – С. 51-57.
3. Parrish J.A., Jaenicke K.F., Anderson R.R. Erythema and melanogenesis action spectra of normal human skin, *Photochem Photobiol.*, 1982, Vol. 36 (2), pp. 187-191.
4. Zeng H., MacAulay C., Palcic B., McLean D. A computerized autofluorescence and diffuse reflectance spectroanalyser system for in vivo skin studies, *Phys Med Biol*, 1993, Vol. 38, pp. 231-240.
5. Fritch C., Ruzichka T. *Fluorescence Diagnosis and Photodynamic Therapy of Skin Diseases. Atlas and Handbook.* Wien-New-York, Springer-Verlag Publ., 2003. 124 p.
6. Stringer M.R., Collins P., Robinson D.J., Stables G.I., Sheehan-Dare R.A. The accumulation of protoporphyrin IX in plaque psoriasis after topical application of 5-aminolevulinic acid indicates a potential for superficial photodynamic therapy, *J Invest Dermatol*, 1996, Vol. 107, No 1, pp. 176-181.
7. Smits T., Kleinpenning M.M., van Erp P.E.J., van de Kerkhof P.C.M., Gerritsen M.-J.P. A placebo-controlled randomized study on the clinical effectiveness, immunohistochemical changes and protoporphyrin IX accumulation in fractionated 5-aminolaevulinic acid-photodynamic therapy in patients with psoriasis, *British Journal of Dermatology*, 2006, Vol. 155, No. 2, pp. 429-436.
8. Kleinpenning M.M., Smits T., Ewalds E., van Erp P.E.J., van de Kerkhof P.C.M., Gerritsen M.J.P. Heterogeneity of fluorescence in psoriasis after application of 5-aminolaevulinic acid: an immunohistochemical study, *British Journal of Dermatology*, 2006, Vol. 155, No. 3, pp. 539-545.
9. Bissonnette R., Zeng H., McLean D.I., Korbelik M., Lui H. Oral aminolevulinic acid induces protoporphyrin IX fluorescence in psoriatic plaques and peripheral blood cells, *Photochemistry and Photobiology*, 2001, Vol. 74, No. 2, pp. 339-345.
10. Smits T., Robles C.A., van Erp P.E.J., van de Kerkhof P.C.M., Gerritsen M.-J.P. Correlation Between Macroscopic Fluorescence and Protoporphyrin IX Content in Psoriasis and Actinic Keratosis Following Application of Aminolevulinic Acid, *Journal of Investigative Dermatology*, 2005, Vol. 125, pp. 833-839.
11. Stringer M.R., Robinson D.J., Collins P. Establishment of treatment parameters for ALA-PDT of plaque psoriasis, *Proceedings of SPIE*, 1996, Vol. 2924, pp. 314-318.
12. Filonenko E.V., Grishaeva A.B. Methodological aspects of the fluorescence diagnosis of malignancies by using alase, *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal*, 2011, No. 5, pp. 30-33. (in Russian).
13. Filonenko E.V., Khanmurzaeva A.G. Fluorescent diagnostics with alase in patients with skin cancer, *Lazernaya meditsina*, 2012, Vol. 16, No. 3, pp. 32-34. (in Russian).
14. Bissonnette R., Zeng H., McLean D., Schreiber W., Roscoe D., Lui H. Psoriatic Plaques Exhibit Red Autofluorescence that is Due to Protoporphyrin IX, *Journal of Investigative Dermatology*, 1998, Vol. 111, pp. 586-591.
15. Zeng H., Lui H., MacAulay C., Palcic B., McLean D. *Spectrometer system for diagnosis of skin disease.* US6008889, 1999.
16. Lui H., MacAulay C., Zeng H., McLean D., Bissonnette R. *Photoactivation of endogenous porphyrins for treatment of psoriasis.* US6269818, 2001.
17. Kang U., Papayan G.V., Bae S.-J., Berezin B.B., Kim S. Fluorescence dermatoscope, *Opticheskii zhurnal*, 2008, Vol. 75, No. 1, pp. 32-38. (in Russian).
18. Papayan G.V., Petrishchev N.N., Araviiskaya E.R., Sokolovskii E.V., Romanova O.L., Dmitrieva N.Yu., Kang U. Evaluation of efficacy of external therapy for acne by analysis of color fluorescence images of skin, in *Aktual'nye problemy lazernoi meditsiny* [Current issues of laser medicine], by eds Petrishchev N.N. Saint Petersburg, Mezhdunarodnyi obshchestvennyi Fond kul'tury i obrazovaniya Publ., 2016, pp. 201-210.
19. Vel'sher Z.V., Stakhanov L.M., Kotova O.E. Use of autofluorescence study in diagnosis of recurrent basal cell skin cancer and estimation of sufficiency of laser removal of tumor, *Khirurg*, 2008, No. 1, pp. 51-57. (in Russian).

ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ КАК РАДИОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИЕ АГЕНТЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ НЕЙРООНКОЛОГИИ

Д.А. Церковский

Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, Лесной, Республика Беларусь

Резюме

В статье обобщены основные механизмы, лежащие в основе радиосенсибилизирующего эффекта фотосенсибилизаторов. Как показал анализ литературных данных, многие авторы считают, что ключевым звеном в реализации противоопухолевого эффекта ионизирующего излучения, переводящего молекулу фотосенсибилизатора из основного состояния в возбужденное, является образование активных форм кислорода. Их образование приводит к развитию окислительного стресса. Следствием реализации индуцированного ионизирующим излучением окислительного стресс-синдрома является апоптоз опухолевых клеток.

Первыми фотосенсибилизаторами, радиосенсибилизирующая активность которых была подтверждена в экспериментальных исследованиях, были гематопротопирин и фотофрин II. В обзоре произведен подробный анализ результатов экспериментальных исследований радиосенсибилизирующего действия фотосенсибилизаторов на культурах клеток и лабораторных животных с перививными штаммами злокачественных глиом (глиома C6, глиосаркома 9L, глиобластома U87-MG).

В ряде онкологических центров метод радиосенсибилизации опухолей введением фотосенсибилизаторов апробирован у пациентов с рецидивными глиомами головного мозга grade III-IV. Полученные результаты свидетельствуют о его хорошей переносимости и противоопухолевой эффективности.

В доступных источниках литературы нами не были найдены публикации, в основе которых лежит изучение радиосенсибилизирующего эффекта фотосенсибилизаторов хлоринового ряда, что делает актуальными дальнейшие исследования в этом направлении.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, лучевая терапия, радиосенсибилизирующий эффект, свободнорадикальное окисление.

Для цитирования: Церковский Д.А. Фотосенсибилизаторы как радиосенсибилизирующие агенты в экспериментальной и клинической нейроонкологии // Biomedical Photonics. – 2017. – Т. 6, № 2. – С. 27–33.

Контакты: Церковский Д.А., e-mail: tzerkovsky@mail.ru

PHOTOSENSITIZERS AS RADIOSENSITIZING AGENTS IN EXPERIMENTAL AND CLINICAL NEUROONCOLOGY

Tzerkovsky D.A.

N.N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, Lesnoy, Republic of Belarus

Abstract

The article summarizes the main mechanisms underlying the radiosensitizing effect of photosensitizers.

According to literature data many authors consider the formation of reactive oxygen species to be the key element in the implementation of the antitumor effect of ionizing radiation, which transfers the photosensitizer molecule from the ground state to the excited state. Their formation leads to the development of oxidative stress. The consequence of the realization of the oxidative stress induced by ionizing radiation is apoptosis of tumor cells.

The first photosensitizers, which radiosensitizing activity was confirmed, were hematoporphyrin and photophryn II. A detailed analysis of the results of experimental studies of radiosensitizing effect of photosensitizers on cell culture and laboratory animals with transplanted lines of malignant gliomas (glioma C6, gliosarcoma 9L, glioblastoma U87-MG) was made.

The method of tumor radiosensitizing by administration of photosensitizers has been tested in patients with recurrent gliomas grade III-IV in a number of oncological centers. The obtained results show its good tolerability and antitumor efficacy.

We have not found publications on the study of the radiosensitizing effect of chlorine-based photosensitizers in the available literature, that makes following studies in this field relevant.

Key words: photosensitizer, radiation therapy, radiosensitizing effect, free radical oxidation.

For citations: Tzerkovsky D.A. Photosensitizers as radiosensitizing agents in experimental and clinical neurooncology, Biomedical Photonics, 2017, T. 6, No. 2, pp. 27-33 (in Russian).

Contacts: Tzerkovsky D.A., e-mail: tzerkovsky@mail.ru

Введение

Злокачественные глиомы являются серьезной проблемой современной нейроонкологии. Наиболее распространенной глиальной опухолью с наименее благоприятным прогнозом является глиобластома высокой степени злокачественности. Глиобластомы являются самой частой причиной смерти при патологии центральной нервной системы. По данным А. Omuro и L.M. DeAngelis, заболеваемость злокачественной глиомой в странах Европы в 2013 г. составила 5-7 случаев на 100 тыс. человек [1].

На данный момент «золотым» стандартом в лечении первичных форм глиобластомы является комплексный подход, включающий хирургическое удаление опухоли в сочетании с химиолучевой терапией. Несмотря на очевидные достижения медицинской науки последних десятилетий, результаты лечения пациентов с глиобластомой остаются неутешительными. По данным многочисленных эпидемиологических исследований, показатель 5-летней выживаемости у пациентов с данной патологией составляет в среднем 4-5%, а медиана выживаемости с момента гистологической верификации – от 12,6 до 19 мес [2-4]. Основной причиной высоких показателей летальности является возникновение локальных рецидивов в области первичного опухолевого очага. Так, глиомы grade IV рецидивируют в 100% случаев, чаще всего в пределах 2-3 см от места резекции первичной опухоли [5].

Стандартного подхода к лечению пациентов с рецидивами злокачественных глиом не существует. Основными методами лечения являются повторное оперативное вмешательство, системная химиотерапия, повторное облучение и симптоматическое лечение. Основополагающим является хирургический метод, направленный на резекцию рецидивной опухоли. Объем хирургического вмешательства во многом определяет прогноз заболевания и показатели выживаемости. Системная химиотерапия в большинстве случаев не обеспечивает достоверного увеличения медианы выживаемости после операции [2,3,5].

Лучевая терапия в лечении злокачественных глиом

Следует отметить, что в последние годы достигнуты определенные успехи в применении лучевой терапии (ЛТ) первичных и рецидивных форм злокачественных глиом. Как компонент комплексного лечения первичных форм злокачественных глиом ЛТ широко применяется в различных режимах фракционирования дозы облучения. Вместе с тем, стоит отметить, что возможности ЛТ в лечении рецидивных форм заболевания ограничены, поскольку многие пациенты к моменту верификации рецидива уже получили курс облучения, а последующее лучевое воз-

действие ассоциировано с высоким риском нежелательных реакций и явлений [6-8].

Стандартной схемой ЛТ является вариант дистанционной гамма-терапии с использованием разовой очаговой дозы (РОД) 1,2-2,65 Гр и суммарной очаговой дозы (СОД) 60-65 Гр. Медиана выживаемости данной категории пациентов составляет 10 мес [9].

Ряд авторов изучали возможность повышения СОД с 60 Гр до 80-90 Гр. Медиана выживаемости пациентов с глиобластомой, получивших облучение в СОД = 90 Гр, достигла 16,2 мес, а после СОД = 60 Гр – 12,4 мес. Двухлетняя выживаемость составила 38,4% и 11,4%, соответственно [10].

C.G. Rusthoven и соавт. оценили эффективность применения адъювантной ЛТ у 12 115 пациентов с глиобластомами после оперативного вмешательства. Авторы пришли к выводу, что включение ЛТ в схему лечения достоверно повышает показатель 2-годичной выживаемости с 7% до 17% по сравнению с пациентами, получившими только хирургическое лечение ($p < 0,001$) [11].

Следует отметить, что применяемые традиционные методики облучения в большинстве случаев характеризуются недостаточной эффективностью, частым развитием постлучевых нежелательных реакций и явлений, что существенно влияет на качество жизни пациентов. Дальнейшие успехи ЛТ связывают с разработкой методов селективного воздействия на основании различной радиочувствительности опухолевой и нормальной тканей.

Альтернативу открытым хирургическим вмешательствам при злокачественных опухолях головного мозга составляет стереотаксическая радиохирургия, которую проводят с помощью гамма-ножа, линейного ускорителя или циклотрона путем прецизионного воздействия на опухолевый очаг излучения в высокой дозе с минимальным лучевым повреждением смежных мозговых структур.

Метод стереотаксической радиохирургии применяют при опухолях, диаметр которых не превышает 3 см, расположенных в труднодоступных для хирургического удаления отделах и критических зонах головного мозга. Метод является высокоэффективным при лечении доброкачественных (невринома, менингиома, пинеалома, аденома гипофиза) и злокачественных (анапластическая астроцитома, мультиформная глиобластома) опухолей и метастазах рака [12].

С целью расширения возможностей применения ЛТ ведется активный поиск новых направлений, модифицирующих лучевое воздействие на опухолевые клетки, одним из которых является использование радиомодифицирующих агентов.

Применение радиомодификаторов в клинической онкологии

Радиомодифицирующие агенты применяют с целью избирательного усиления повреждающего

противоопухолевого действия ЛТ или ослабления ее негативного воздействия на нормальные ткани [13]. К основным радиомодифицирующим агентам относят электроноакцепторные соединения (метронидазол, мезонидазол и др.), локальную и общую гипертермию, искусственную гипергликемию, гипоксические газовые смеси (8-10% кислорода и 90-92% азота) и др. В качестве химических и физических факторов, способных модифицировать радиочувствительность опухолей, используют также химиотерапевтические препараты, ультразвуковое излучение, микроволны, лазерное излучение, магнитные и электрические поля [14]. Использование перечисленных выше агентов позволяет повысить радиочувствительность гипоксических опухолевых клеток без влияния на степень радиационного повреждения нормальных оксигенированных клеток.

Физиология опухолей характеризуется низким напряжением кислорода (гипоксия и аноксия), высоким содержанием лактата и низким содержанием глюкозы, внеклеточным ацидозом, интерстициальной гипертензией и дефицитом энергии. Сосудистая сеть опухоли характеризуется мощной пролиферацией эндотелиоцитов, что приводит к дефектам структуры и функциональной несостоятельности микрокапилляров. В результате этих изменений внутриопухолевый кровоток характеризуется гетерогенностью и хаотичностью с наличием зон недостаточной васкуляризации [15]. Именно опухолевые клетки, находящиеся в состоянии выраженной гипоксии, обладают повышенной устойчивостью к действию ионизирующего излучения и требуют использования высоких доз радиации или препаратов, полностью или частично сглаживающих этот эффект. Эффект радиомодифицирующего действия многих модификаторов основан на преодолении этой неблагоприятной ситуации [15].

В клинической практике широко используют электроноакцепторные соединения, в частности, метронидазол, способный повышать чувствительность гипоксических клеток опухоли к лучевой терапии и воздействию ряда химиотерапевтических препаратов. При применении низких доз препарата наблюдается эффект химиосенсибилизации. Результатами экспериментальных и клинических исследований подтвержден выраженный эффект химиосенсибилизации метронидазолом для производных платины, циклофосфана, блеомицина, оксимочевина, мелфалана и ряда других лекарственных препаратов [16].

По мнению профессора И.А. Гладилиной (РОНЦ им. Н.Н. Блохина), использование химиотерапевтических препаратов, обладающих радиосенсибилизирующими свойствами, одновременно с ЛТ, является перспективным направлением клинических исследований [17].

В настоящее время активно рассматривается вопрос об использовании фотосенсибилизаторов (ФС) в качестве радиосенсибилизирующих агентов.

Радиосенсибилизирующий эффект фотосенсибилизаторов

Первыми ФС, радиосенсибилизирующая активность которых была подтверждена в экспериментальных исследованиях *in vitro* и *in vivo*, были гематопорфирин и фотофрин II [18-23]. В ряде работ сообщается о клинических исследованиях, доказавших эффективность применения в качестве радиосенсибилизатора ароматического металлопорфирина тексафирина гадолиния (Gd-Tex) [24]. Рядом авторов отмечена меньшая радиосенсибилизирующая активность 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК) при однократном облучении опухолевых клеток по сравнению с гематопорфирином и фотофрином II, что объясняется низкой концентрацией этих препаратов во внутриклеточном матриксе [25].

При объяснении основных механизмов, лежащих в основе повреждения опухолевой клетки, многие авторы приходят к выводу, что ключевым звеном в реализации противоопухолевого эффекта ионизирующего излучения, переводящего молекулу ФС из основного состояния в возбужденное, являются активные формы кислорода [26].

Результатом данного взаимодействия является образование промежуточных радикалов, вступающих в химическое взаимодействие с кислородом тканей с образованием высокоактивных продуктов, запускающих окислительный стресс. Наиболее токсичными продуктами окисления являются гидроксил-радикал ($\text{OH}\cdot$) и супероксид-анион ($\text{O}_2\cdot^-$) [27]. Обладая высоким окислительным потенциалом, активные формы кислорода взаимодействуют с липидами мембран органелл опухолевой клетки с образованием продуктов окисления, дестабилизацией и последующим разрушением клетки в целом.

Следствием реализации индуцированного ионизирующим излучением окислительного стресс-синдрома является апоптоз.

В основе апоптотической гибели клетки лежит активация специальных ферментов, ответственных за разрушение ее компонентов (нуклеазы, протеазы, липазы). Их инициация осуществляется каскадами каспаз (каспазы 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12). Запуск каскада каспазных ферментов, ответственных за основные процессы, происходящие при апоптозе, происходит двумя путями. Во-первых, процесс гибели клетки начинается со связывания специальных лигандов ($\text{TNF-}\alpha$: tumor necrosis factor- α ; FasL: fas-ligand; TNF-related apoptosis-inducing ligand и др.) с мембранными рецепторами tumor necrosis factor 1; Fas и TRAIL R. Результатом чего является последовательная активация

каспазы-8 и далее каспазы-3 и дальнейшее развитие апоптотической гибели клетки [28].

Также инициация апоптоза возможна при получении соответствующих сигналов из внутриклеточных органелл. Так, при повреждении мембран митохондрий в цитоплазму высвобождаются специальные белки-активаторы апоптоза: цитохром C, SMAC-DIABLO, AIF, OMI-Htr и ряд других, каждый из которых играет важную роль в реализации клеточной гибели [28].

Из разрушенных лизосом в цитоплазму опухолевой клетки поступают протеолитические белки – катепсины, функцией которых является активация каспазы-3 и белка Bid, стимулирующего выход цитохрома C из митохондрий, с развитием митохондриального пути апоптоза.

Результатом повреждения структур эндоплазматического ретикула является высвобождение большого количества ионов Ca^{2+} , стимулирующего фермент кальпаин, активирующий каспазу-3 и каспазу-12 [28]. Ключевым моментом в развитии апоптотической гибели опухолевой клетки является активация каспазы-3, имеющая место, как при первом, так и втором путях запуска запрограммированной гибели клетки.

Интерпретация основных результатов экспериментальных исследований, обзор имеющейся литературы и объяснение механизмов радиосенсибилизирующих свойств фотофрина II представлены в обзоре M. Schaffer и соавт. Особое внимание авторами уделено тому факту, что ионизирующее излучение в комбинации с фотофрином II оказывает выраженное цитотоксическое воздействие на радиорезистентные, находящиеся в гипоксических зонах опухолевые клетки. Проанализированные данные свидетельствуют о значительных перспективах данного направления в экспериментальной нейроонкологии [29].

Радиосенсибилизирующий эффект фотосенсибилизаторов в экспериментах *in vitro* и *in vivo*

J. Yamamoto и соавт. (Department of Neurosurgery, University of Occupational and Environmental Health, Фукуока, Япония) в эксперименте *in vitro* на клеточных линиях глиомы C6 и глиосаркомы 9L изучили возможность использования 5-АЛК в качестве радиосенсибилизирующего агента при осуществлении ЛТ. Облучение производили как в однократном режиме через 4 ч инкубации опухолевых клеток с 5-АЛК (1 мкл), СОД = 8 Гр на γ -излучателе (Gammacell 40 Extractor; Nordion International, Inc., Канада), так и при многократном режиме – ежедневное облучение в течение 4 дней, РОД = 2 Гр/день, СОД = 8 Гр. Полученные результаты свидетельствуют о чувствительности глиосаркомы 9L к ионизирующему лечению в сочетании с добавлением в питательную среду 5-АЛК при однократном воздействии ($p < 0,05$). Количество жизнеспособных

клеток глиомы C6 при этом же режиме воздействия статистически не отличалось от контрольной группы ($p = 0,096$). В случае применения многократного режима облучения (СОД = 8 Гр), радиочувствительность была выше в обеих клеточных линиях ($p < 0,05$) [30].

Этими же исследователями на подкожной модели глиосаркомы 9L была подтверждена высокая эффективность комбинированного использования ионизирующего излучения (РОД = 2 Гр, СОД = 10 Гр) и 5-АЛК. Авторы пришли к выводу, что предложенная схема лечения оказывает как прямой цитотоксический эффект на опухоли, так и приводит к развитию выраженного иммунного ответа за счет Iba1-позитивных макрофагов [30].

T. Kitagawa (Department of Neurosurgery, University of Occupational and Environmental Health, Фукуока, Япония) объясняет этот феномен значительным увеличением внутриклеточной продукции свободных радикалов кислорода, приводящих к радиосенсибилизации опухолевых клеток [31].

Группой авторов из Institute of Oncology, Vilnius University (Литва) исследованы радиосенсибилизирующие свойства деривата гематопорфирина (1 мкг/мл) и темопорфина (0,1 мкг/мл) на культуре клеток глиомы C6. Облучение культуры клеток в монослое осуществляли γ -лучами с использованием кобальта-60 (мощность дозы 1,1 Гр/мин) с варьированием РОД от 2 до 8 Гр. Показано, что применение ФС без облучения не оказывало токсического действия на глиому C6. Облучение без ФС в СОД = 2 Гр сокращало количество жизнеспособных клеток на 20%, в СОД = 4 Гр – на 50%. Радиосенсибилизация гематопорфирином в сочетании с облучением в СОД = 2-8 Гр достоверно сокращало данный показатель по сравнению с группой облучения ($p < 0,05$). Темопорфин не проявил радиосенсибилизирующих свойств [32].

Авторы предположили, что в основе повреждения опухолевой клетки лежит повреждение мембраны митохондрий, в которых в значительных концентрациях аккумулируется протопорфирин IX. Дополнительное воздействие на клетку ионизирующим излучением приводит к образованию активных форм кислорода, инициирующих развитие оксидативного стресса, результатом чего является сублетальное или летальное повреждение клеток, которые, по всей видимости, включают пути сигнальной трансдукции, вызывающие апоптоз [32].

Группа израильских исследователей под руководством L. Benaouin в экспериментах *in vitro* и *in vivo* и на подкожной модели глиобластомы U-87 MG изучили противоопухолевую эффективность сочетанного использования ионизирующего излучения и ФС фотофрин II (Axcap Pharma, Канада). В эксперименте *in vitro* фоторин II добавляли в питательную среду Dulbecco, модифицированную Eagle's medium

(DMEM), в дозе 1 мкг/мл (0,166 μ M). Затем на линейном ускорителе Elekta Precise (ElektaOncology Systems, Швеция) производили облучение в РОД = 5 Гр. В эксперименте *in vivo* после подкожной перевивки 5×10^6 клеток глиобластомы U-87 MG и достижения опухоли объема в 50 мм³, лабораторным животным внутривенно капельно вводили раствор фотофрина II в дозе 10 мг/кг. Через 48 ч производили облучение в РОД = 5 Гр до достижения СОД = 10 Гр. Полученные *in vitro* и *in vivo* результаты свидетельствуют о выраженном радиосенсибилизирующем эффекте фотофрина II при данных режимах. Авторы пришли к выводу, что предложенная схема лечения экспериментальной глиомы приводит к торможению роста опухоли, нарушениям в процессах ангиогенеза и васкулогенеза и существенной инициации апоптоза в опухолевых клетках [33].

Радиосенсибилизирующий эффект фотосенсибилизаторов в клинической нейроонкологии

В начале 2000-х гг. начато использование фотосенсибилизирующих агентов в сочетании с ионизирующим излучением с целью терапии злокачественных глиом.

В 2002 г. L. Blozelytė-Plėnienė и A. Stančius (Lithuanian Oncology Centre, Литва) опубликовали первые клинические результаты лечения пациента с рецидивной формой глиобластомы. В качестве фотосенсибилизатора применяли гематопорфирин, который вводили внутривенно в дозе 5 мг/кг. Через 24, 48 и 72 ч после введения фотосенсибилизатора опухоль облучали гамма-излучением в РОД = 2 Гр до достижения СОД = 6 Гр (3 фракции). При контрольном МРТ-исследовании у пациента зарегистрирована частичная регрессия опухоли. Авторы отметили хорошую переносимость проведенного лечения, подтвержденную отсутствием нежелательных реакций. В данной публикации впервые введен термин «гамма-динамическая терапия» (ГДТ) или «*gammadynamic therapy*» – метод терапии, основанный на усилении цитотоксичности лечения при воздействии на опухолевый очаг ионизирующим излучением, с радиосенсибилизацией фотосенсибилизаторами (в данной статье – гематопорфирином) [34].

Этими же исследователями представлены результаты использования ГДТ у 48 пациентов с первичными и метастатическими злокачественными опухолями головного мозга и других локализаций. Через 24, 48 и 72 ч после введения ФС деривата гематопорфирина в дозе 5 мг/кг опухоли подвергали облучению гамма-излучением радиоактивного кобальта-60 в РОД = 2 Гр до достижения СОД = 6 Гр (3 фракции). Длительность курса лечения составила 4 дня. 12 пациентов получили 1 курс лечения; 6 – 2 курса; 9 – 3 курса; 4 – 4 курса; 6 – 5 курсов; 6 – 6 курсов, 1 – 7 курсов; 1 – 8 курсов и 3 – 9 курсов. Серьезных нежелательных реакций

после проведенного лечения выявлено не было. У 9 пациентов после 1 и более курсов лечения отмечена полная регрессия опухоли, однако, в сроки 6 и 24 мес у них отмечен локальный рецидив. Частичная регрессия с периодом ремиссии более 6 мес была достигнута у 17 пациентов; кратковременная ремиссия (2 – 6 мес) – также у 17; отсутствие эффекта зарегистрировано у 5. В результате исследования авторы приходят к заключению, что гамма-динамическая терапия является эффективной опцией в лечении данной тяжелой патологии [35].

В 2006 г. M. Schaffer и соавт. изучили возможность клинического применения фотофрина II в качестве радиосенсибилизатора у 12 пациентов (7 – с нерезектабельными солидными опухолями малого таза, 3 – со злокачественными глиомами, 1 – с рецидивом орофарингеальной карциномы, 1 – с рецидивом аденокарциномы сфеноидального синуса). Облучение производили в СОД = 30-50,4 Гр через 24 ч после внутривенного введения ФС в дозе 1 мг/кг. Медиана наблюдения составила 12,9 мес. Серьезных нежелательных реакций отмечено не было. Частота полной регрессии – 33,3% (4 пациента), уменьшение объема опухоли на 45% и более – 33,3% (4 пациента) и стабилизация процесса – 33,3 % (4 пациента). Только у 1 пациента через 5 мес после лечения отмечено возникновение локального рецидива заболевания [23].

В 2013 г. этим же коллективом авторов опубликованы результаты лечения пациента с астроцитомой grade III с использованием дистанционной ЛТ (СОД = 60 Гр) с предварительной радиосенсибилизацией фотофрином II в дозе 1 мг/кг, вводимым за 24 ч до начала облучения. Авторы отмечают длительный период наблюдения (106 мес) без прогрессирования заболевания, наличия нежелательных реакций и явлений [36].

Заключение

В последнее время для реализации радиосенсибилизирующего эффекта все большее внимание уделяют использованию фотосенсибилизирующих агентов [30,31,36]. Первыми фотосенсибилизаторами, радиосенсибилизирующая активность которых была подтверждена в экспериментальных исследованиях *in vitro* и *in vivo*, были гематопорфирин и фотофрин II [21-23]. В последние годы появился ряд работ, посвященных изучению радиосенсибилизирующих свойств 5-АЛК-индуцированного протопорфирина IX, металлопорфирина тексафирина гадолиния, темопорфина [24,25,30,32]. Вместе с тем, в доступных источниках литературы нами не были найдены публикации, в основе которых лежит изучение радиосенсибилизирующего эффекта фотосенсибилизаторов хлоринового ряда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Omuro A., DeAngelis L.M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review // *JAMA*. – 2013. – Vol. 310, No. 17. – P. 1842-1850.
2. Carlsson S.K., Brothers S.P., Wahlestedt C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme // *EMBO Mol Med*. – 2014. – Vol. 6, No. 11. – P. 1359-1370.
3. Patel M.A., Kim J.E., Ruzevick J., et al. The future of glioblastoma therapy: synergism of standard of care and immunotherapy // *Cancers*. – 2014. – Vol. 6, No. 4. – P. 1953-1985.
4. Thomas A.A., Brennan C.W., DeAngelis L.M., et al. Emerging therapies for glioblastoma // *JAMA Neurol*. – 2014. – Vol. 71, No. 11. – P. 1437-1444.
5. Nieder C., Grosu A.L., Molls M. A comparison of treatment results for recurrent malignant gliomas // *Cancer Treat. Rev.* – 2000. – Vol. 26. – P. 397-409.
6. Pavarati A.J. Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma and anaplastic astrocytoma: validation of Radiation Therapy Oncology Group – recursive partitioning analysis in the IMRT and temozolomide era // *J. Neurooncol.* – 2011. – Vol. 104, No. 1. – P. 339-349.
7. Malmstrom A., Gronberg B.H., Marosi C., et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial // *Lancet Oncol.* – 2012. – Vol. 13, No. 9. – P. 916-926.
8. Dhermain F. Radiotherapy of high-grade gliomas: current standards and new concepts, innovations in imaging and radiotherapy, and new therapeutic approaches // *Chin. J. Cancer*. – 2014. – Vol. 33, No. 1. – P. 16-24.
9. Buckner A.J., Ballman K.V., Michalak J.C., et al. Phase III trial of Carmustine and Cisplatin compared with Carmustine alone and standard radiation therapy or accelerated radiation therapy in patients with glioblastoma multiforme: North Central Cancer Treatment Group 93-72-52 and Southwest Oncology Group 9503 Trials // *Clin. Oncol.* – 2006. – Vol. 24, No. 24. – P. 3871-3879.
10. Tanaka M., Ino Y., Nakagawa K., et al. High-dose conformal radiotherapy for supratentorial glioma: a historical comparison // *Lancet Oncol.* – 2005. – Vol. 6, No. 12. – P. 953-960.
11. Rusthoven C.G., Carlson J.A., Waxweiler T.V., et al. The impact of adjuvant radiation therapy for high-grade gliomas by histology in the United States population // *Int. J. Radiat. Oncol.* – 2014. – Vol. 90, No. 4. – P. 894-902.
12. Park K.J., Kano H., Iyer A., et al. Salvage gamma knife stereotactic radiosurgery followed by bevacizumab for recurrent glioblastoma multiforme: a case-control study // *J. Neurooncol.* – 2012. – Vol. 107. – P. 323-333.
13. Ткачев С.И., Барсуков Ю.А., Трофимова О.П. и соавт. Полирадиоимодификация – перспективный вариант улучшения результатов комбинированного лечения больных злокачественными опухолями // *Радиац. онкол. ядерн. мед.* – 2011. – № 1. – С. 7-13.
14. Козин С.В. Динамическая модификация тканевой радиочувствительности при лучевой терапии опухолей // *Вестник АМН СССР*. – 1981. – № 7. – С. 76-83.
15. Vaupel P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology // *Semin. Radiat. Oncol.* – 2004. – Vol. 14. – P. 198-206.
16. Fowler J.F. Chemical modifiers of radiosensitivity theory and reality: review // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 1985. – Vol. 11, No. 4. – P. 665-674.
17. Гладиллина И.А. Радиосенсибилизация в лучевой терапии злокачественных новообразований // *ЭФ. Онкология, гематология и радиология*. – 2011. – № 1. – С. 46-53.
18. Figge F.H., Wichterman R. Effect of hematoporphyrin on X-radiation sensitivity in *Paramecium* // *Science*. – 1955. – Vol. 122, No. 3167. – P. 468-469.

REFERENCES

1. Omuro A., DeAngelis L.M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review, *JAMA*, 2013, Vol. 310, No. 17, pp. 1842-1850.
2. Carlsson S.K., Brothers S.P., Wahlestedt C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme, *EMBO Mol Med*, 2014, Vol. 6, No. 11, pp. 1359-1370.
3. Patel M.A., Kim J.E., Ruzevick J., Li G., Lim M. The future of glioblastoma therapy: synergism of standard of care and immunotherapy, *Cancers*, 2014, Vol. 6, No. 4, pp. 1953-1985.
4. Thomas A.A., Brennan C.W., DeAngelis L.M., Omuro A.M. Emerging therapies for glioblastoma, *JAMA Neurol*, 2014, Vol. 71, No. 11, pp. 1437-1444.
5. Nieder C., Grosu A.L., Molls M. A comparison of treatment results for recurrent malignant gliomas, *Cancer Treat. Rev.*, 2000, Vol. 26, pp. 397-409.
6. Pavarati A.J. Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma and anaplastic astrocytoma: validation of Radiation Therapy Oncology Group – recursive partitioning analysis in the IMRT and temozolomide era, *J. Neurooncol.*, 2011, Vol. 104, No. 1, pp. 339-349.
7. Malmstrom A., Gronberg B.H., Marosi C., Stupp R., Frappaz D., Schultz H., Abacioglu U., Tavelin B., Lhermitte B., Hegi M.E., Rosell J., Henriksson R. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial, *Lancet Oncol.*, 2012, Vol. 13, No. 9, pp. 916-926.
8. Dhermain F. Radiotherapy of high-grade gliomas: current standards and new concepts, innovations in imaging and radiotherapy, and new therapeutic approaches, *Chin. J. Cancer*, 2014, Vol. 33, No. 1, pp. 16-24.
9. Buckner A.J., Ballman K.V., Michalak J.C., Burton G.V., Cascino T.L., Schomberg P.J., Hawkins R.B., Scheithauer B.W., Sandler H.M., Marks R.S., O'Fallon J.R. Phase III trial of Carmustine and Cisplatin compared with Carmustine alone and standard radiation therapy or accelerated radiation therapy in patients with glioblastoma multiforme: North Central Cancer Treatment Group 93-72-52 and Southwest Oncology Group 9503 Trials, *Clin. Oncol.*, 2006, Vol. 24, No. 24, pp. 3871-3879.
10. Tanaka M., Ino Y., Nakagawa K., Tago M., Todo T. High-dose conformal radiotherapy for supratentorial glioma: a historical comparison, *Lancet Oncol.*, 2005, Vol. 6, No. 12, pp. 953-960.
11. Rusthoven C.G., Carlson J.A., Waxweiler T.V., Dally M.J., Barón A.E., Yeh N., Gaspar L.E., Liu A.K., Ney D.E., Damek D.M., Lillehei K.O., Kavanagh B.D. The impact of adjuvant radiation therapy for high-grade gliomas by histology in the United States population, *Int. J. Radiat. Oncol.*, 2014, Vol. 90, No. 4, pp. 894-902.
12. Park K.J., Kano H., Iyer A., Liu X., Niranjan A., Flickinger J.C., Lieberman F.S., Lunsford L.D., Kondziolka D. Salvage gamma knife stereotactic radiosurgery followed by bevacizumab for recurrent glioblastoma multiforme: a case-control study, *J. Neurooncol.*, 2012, Vol. 107, pp. 323-333.
13. Tkachev S.I., Barsukov Yu.A., Trofimova O.P., Nazarenko A.V., Tsaryuk V.F., Glebovskaya V.V., Medvedev S.V., Ivanov S.M. Polyradio-modification - a promising option to improve results of combined treatment for patients with malignant tumors, *Radiats. onkol. yadern. med.*, 2011, No. 1, pp. 7-13. (in Russian).
14. Kozin S.V. Dynamic modification of tissue radiosensitivity for cancer radiotherapy, *Vestnik AMN SSSR*, 1981, No. 7, pp. 76-83. (in Russian).
15. Vaupel P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology, *Semin. Radiat. Oncol.*, 2004, Vol. 14, pp. 198-206.
16. Fowler J.F. Chemical modifiers of radiosensitivity theory and reality: review, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1985, Vol. 11, No. 4, pp. 665-674.
17. Gladilina I.A. Radiosensitizing in radiotherapy of malignant neoplasms, *EF. Onkologiya, gematologiya i radiologiya*, 2011, No. 1, pp. 46-53. (in Russian).

19. Chen D.Y. The use of hematoporphyrin derivative (HpD) as a sensitizer to radiotherapy in treatment of S180 in mice // *Pract. Laser.* – 1985. – Vol. 5. – P. 137.
20. Kostron H., Swartz M.R., Miller D.C., et al. The interaction of hematoporphyrin derivative, light, and ionizing radiation in a rat glioma model // *Cancer.* – 1986. – Vol. 57. – P. 964-970.
21. Kulka U., Schaffer M., Siefert A. Photofrin as a radiosensitizer in an in vitro cell survival assay // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – Vol. 311. – P. 98-103.
22. Luksiene Z., Juzenas P., Moan J. Radiosensitization of tumours by porphyrins // *Cancer Lett.* – 2006. – Vol. 235. – P. 40-47.
23. Schaffer M., Ertl-Wagner B., Schaffer P.M. Feasibility of photofrin II as a radiosensitizing agent in solid tumors – preliminary results // *Onkologie.* – 2006. – Vol. 29. – P. 514-519.
24. Viala J., Vanel D., Meingan P., et al. Phases IB and II multidose trial of gadolinium texaphyrin, a radiation sensitizer detectable at MR imaging: preliminary results in brain metastases // *Radiology.* – 1999. – Vol. 212. – P. 755-759.
25. Schaffer M., Schaffer P.M., Jori G. Radiation therapy combined with photofrin or 5-ALA: effect on Lewis sarcoma tumor lines implanted in mice. Preliminary results // *Tumori.* – 2002. – Vol. 88. – P. 407-410.
26. Schaffer M., Kulka U., Schaffer P. The role of radical derivatives of high reactivity in the radiosensitizing action of Photofrin II // *J Porphyrins Phthalocyanines.* – 2006. – Vol. 10. – P. 1398-1402.
27. Berg K., Bommer J.C., Moan J. Evaluation of sulfonated aluminum phthalocyanines for use in photochemo-therapy. A study on the relative efficiencies of photoinactivation // *Photochem. Photobiol.* – 1989. – Vol. 49, No. 5. – P. 587-594.
28. Узденский А.Б. Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии. – Санкт-Петербург: Наука, 2010. – 327 с.
29. Schaffer M., Ertl-Wagner B., Schaffer P.M., et al. Porphyrins as radiosensitizing agents for solid neoplasms // *Curr. Pharm. Des.* – 2003. – Vol. 9, No. 25. – P. 2024-2035.
30. Yamamoto J., Ogura S., Shimajiri S., et al. 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX with multi-dose ionizing irradiation enhances host antitumor response and strongly inhibits tumor growth in experimental glioma in vivo // *Mol. Med. Rep.* – 2015. – Vol. 11, No. 3. – P. 1813-1819.
31. Kitagawa T., Yamamoto J., Tanaka T., et al. 5-Aminolevulinic acid strongly enhances delayed intracellular production of reactive oxygen species (ROS) generated by ionizing irradiation: Quantitative analyses and visualization of intracellular ROS production in glioma cells in vitro // *Oncol. Rep.* – 2015. – Vol. 33, No. 2. – P. 583-590.
32. Rutkovskienė L., Plėšnienė L., Sendiulienė D., et al. Sensitization of rat C6 glioma cells to ionizing radiation by porphyrins // *Acta Medica Lituanica.* – 2011. – Vol. 18, No. 2. – P. 56-62.
33. Benayoun L., Schaffer M., Bril R., et al. Porphyrin-sodium (Photofrin-II) in combination with ionizing radiation inhibits tumor-initiating cell proliferation and improves glioblastoma treatment efficacy // *Cancer Biol. Ther.* – 2013. – Vol. 14, No. 1. – P. 64-74.
34. Bloznelytė-Plėšnienė L., Stančius A. Gamadinaminis i.plitusių piktybinių navikų gydymas // *Medicina.* – 2002. – Vol. 38, No. 2. – P. 186-189.
35. Bloznelytė-Plėšnienė L., Rutkovskienė L. Radiosensitized treatment of primary or metastatic malignant brain tumors with hematoporphyrin derivative // *Electron. Electric. Engineer.* – 2006. – Vol. 4, No. 68. – P. 83-86.
36. Schaffer M., Hofstetter A., Ertl-Wagner B., et al. Treatment of astrocytoma grade III with Photofrin II as a radiosensitizer. A case report // *Strahlenther Onkol.* – 2013. – Vol. 189, No. 11. – P. 972-976.
37. Figge F.H., Wichterman R. Effect of hematoporphyrin on X-radiation sensitivity in *Paramecium*, *Science*, 1955, Vol. 122, No. 3167, pp. 468-469.
38. Chen D.Y. The use of hematoporphyrin derivative (HpD) as a sensitizer to radiotherapy in treatment of S180 in mice, *Pract. Laser.*, 1985, Vol. 5, pp. 137.
39. Kostron H., Swartz M.R., Miller D.C., Martuza R.L. The interaction of hematoporphyrin derivative, light, and ionizing radiation in a rat glioma model, *Cancer*, 1986, Vol. 57, pp. 964-970.
40. Kulka U., Schaffer M., Siefert A. Photofrin as a radiosensitizer in an in vitro cell survival assay, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, Vol. 311, pp. 98-103.
41. Luksiene Z., Juzenas P., Moan J. Radiosensitization of tumours by porphyrins, *Cancer Lett.*, 2006, Vol. 235, pp. 40-47.
42. Schaffer M., Ertl-Wagner B., Schaffer P.M. Feasibility of photofrin II as a radiosensitizing agent in solid tumors – preliminary results, *Onkologie*, 2006, Vol. 29, pp. 514-519.
43. Viala J., Vanel D., Meingan P., LArtigau E., Carde P., Renschler M. Phases IB and II multidose trial of gadolinium texaphyrin, a radiation sensitizer detectable at MR imaging: preliminary results in brain metastases, *Radiology*, 1999, Vol. 212, pp. 755-759.
44. Schaffer M., Schaffer P.M., Jori G. Radiation therapy combined with photofrin or 5-ALA: effect on Lewis sarcoma tumor lines implanted in mice. Preliminary results, *Tumori*, 2002, Vol. 88, pp. 407-410.
45. Schaffer M., Kulka U., Schaffer P. The role of radical derivatives of high reactivity in the radiosensitizing action of Photofrin II, *J Porphyrins Phthalocyanines*, 2006, Vol. 10, pp. 1398-1402.
46. Berg K., Bommer J.C., Moan J. Evaluation of sulfonated aluminum phthalocyanines for use in photochemo-therapy. A study on the relative efficiencies of photoinactivation, *Photochem. Photobiol.*, 1989, Vol. 49, No. 5, pp. 587-594.
47. Узденский А.Б. *Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии* [Cell and molecular mechanisms of photodynamic therapy]. Saint Petersburg, Nauka Publ., 2010. 327 p.
48. Schaffer M., Ertl-Wagner B., Schaffer P.M., Kulka U., Hofstetter A., Dühmke E., Jori G. Porphyrins as radiosensitizing agents for solid neoplasms, *Curr. Pharm. Des.*, 2003, Vol. 9, No. 25, pp. 2024-2035.
49. Yamamoto J., Ogura S., Shimajiri S., Nakano Y., Akiba D., Kitagawa T., Ueta K., Tanaka T., Nishizawa S. 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX with multi-dose ionizing irradiation enhances host antitumor response and strongly inhibits tumor growth in experimental glioma in vivo, *Mol. Med. Rep.*, 2015, Vol. 11, No. 3, pp. 1813-1819.
50. Kitagawa T., Yamamoto J., Tanaka T., Nakano Y., Akiba D., Ueta K., Nishizawa S. 5-Aminolevulinic acid strongly enhances delayed intracellular production of reactive oxygen species (ROS) generated by ionizing irradiation: Quantitative analyses and visualization of intracellular ROS production in glioma cells in vitro, *Oncol. Rep.*, 2015, Vol. 33, No. 2, pp. 583-590.
51. Rutkovskienė L., Plėšnienė L., Sendiulienė D., Stačius A., Liutkeviciūtė-Navickienė J. Sensitization of rat C6 glioma cells to ionizing radiation by porphyrins, *Acta Medica Lituanica*, 2011, Vol. 18, No. 2, pp. 56-62.
52. Benayoun L., Schaffer M., Bril R., Gingis-Velitski S., Segal E., Nevelsky A., Satchi-Fainaro R., Shaked Y. Porphyrin-sodium (Photofrin-II) in combination with ionizing radiation inhibits tumor-initiating cell proliferation and improves glioblastoma treatment efficacy, *Cancer Biol. Ther.*, 2013, Vol. 14, No. 1, pp. 64-74.
53. Bloznelytė-Plėšnienė L., Stančius A. Gamadinaminis i.plitusių piktybinių navikų gydymas, *Medicina*, 2002, Vol. 38, No. 2, pp. 186-189. (in Lithuanian).
54. Bloznelytė-Plėšnienė L., Rutkovskienė L. Radiosensitized treatment of primary or metastatic malignant brain tumors with hematoporphyrin derivative, *Electron. Electric. Engineer*, 2006, Vol. 4, No. 68, pp. 83-86.
55. Schaffer M., Hofstetter A., Ertl-Wagner B., Batash R., Pöschl J., Schaffer P.M. Treatment of astrocytoma grade III with Photofrin II as a radiosensitizer. A case report, *Strahlenther Onkol.*, 2013, Vol. 189, No. 11, pp. 972-976.

ИНТРАОПЕРАЦИОННАЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ БОЛЬНОЙ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ IIIC СТАДИИ (8-ЛЕТНИЙ ПЕРИОД БЕЗРЕЦИДИВНОГО НАБЛЮДЕНИЯ)

А.Д. Каприн¹, Е.А. Рассказова¹, Е.В. Филоненко^{1,2}, Э.К. Сарибекян¹, А.Д. Зикиряходжаев^{1,2}, В.И. Чиссов^{1,2}

¹Национальный медицинский исследовательский радиологический центр Минздрава России, Москва, Россия

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Резюме

В статье представлено клиническое наблюдение пациентки 38 лет с диагнозом рак левой молочной железы IIIC стадии ypT4bN3M0L1V1. На первом этапе лечения пациентке выполнено 2 курса неoadъювантной химиотерапии по схеме CAF, на втором этапе – радикальная расширенная мастэктомия слева с интраоперационной фотодинамической терапией и закрытием дефекта TRAM-лоскутом, на третьем этапе – продолжение полихимиотерапии (8 курсов), на четвертом этапе – лучевая терапия на грудную стенку слева и зоны регионарного лимфооттока, таргетная терапия герцептином (1 год). Через 4 года выполнена установка силиконового эндопротеза в левую молочную железу. Корректирующая операция (редукционная маммопластика справа) проведена в апреле 2017 г. В настоящее время у пациентки ремиссия заболевания левой молочной железы – период ремиссии 8 лет.

Ключевые слова: рак молочной железы, местно-распространенный рак молочной железы, интраоперационная фотодинамическая терапия, фотосенс, реконструктивно-пластические операции, TRAM-лоскут.

Для цитирования: Каприн А.Д., Рассказова Е.А., Филоненко Е.В., Сарибекян Э.К., Зикиряходжаев А.Д., Чиссов В.И. Интраоперационная фотодинамическая терапия больной раком молочной железы IIIC стадии (8-летний период безрецидивного наблюдения) // *Biomedical Photonics*. – 2017. – Т. 6, № 2. – С. 34-37.

Контакты: Рассказова Е.А., e-mail: rasskaz2@yandex.ru

INTRAOPERATIVE PHOTODYNAMIC THERAPY IN PATIENT WITH STAGE IIIC BREAST CANCER (8 YEARS WITHOUT RECURRENCE)

Kaprin A.D.¹, Rasskazova E.A.¹, Filonenko E.V.^{1,2}, Saribekyan E.K.¹, Zikiryakhodzhaev A.D.^{1,2}, Chissov V.I.^{1,2}

¹National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

²Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Abstract

The article presents a clinical observation of the patient of 38 y.o. with cancer of the left breast stage IIIC ypT4bN3M0L1V1. On the 1st step of the treatment the patient had 2 courses of CAF neoadjuvant chemotherapy, on the 2nd step – extended radical mastectomy on the left with intraoperative photodynamic therapy and closure of the defect with TRAM-flap, on the 3rd step – continuation of the chemotherapy (8 courses), on the 4th step – radiation therapy to the chest wall on the left and zones of regional lymph drainage, targeted therapy with herceptin a (1 year). Four years later a silicone implant was inserted into the left breast. Corrective surgery (reduction mammoplasty on the right side) was performed in april, 2017. Currently, the patient has remission of the disease of the left breast, the period of remission accounts for 8 years.

Key words: breast cancer, locally advanced breast cancer, intraoperative photodynamic therapy, photosens, reconstructive plastic surgery, TRAM-flap.

For citations: Kaprin A.D., Rasskazova E.A., Filonenko E.V., Saribekyan E.K., Zikiryakhodzhaev A.D., Chissov V.I. Intraoperative photodynamic therapy in patient with stage IIIC breast cancer (8 years without recurrence), *Biomedical Photonics*, 2017, T. 6, No. 2, pp. 34-37 (in Russian).

Contacts: Rasskazova E.A. e-mail: rasskaz2@yandex.ru

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) занимает первое место среди онкологических заболеваний у женщин в мире. В РФ рак молочной железы в 2014 г. выявлен у 65088 женщин, что составляет 21,2% в структуре заболеваемости злокачественной патологией [1].

Пациентки с местно-распространенным РМЖ III В,С стадиями составляют до 20% в структуре РМЖ в России. Данная клиническая группа характеризуется рецидивом заболевания до 50% в коже грудной стенки, в области послеоперационного рубца, в зонах регионарной лимфаденэктомии. Рецидивы возникают в срок до 2 лет [2].

Для уменьшения риска рецидива в МНИОИ им.П.А. Герцена разработан метод интраоперационной фотодинамической терапии (ИОФДТ) для лечения больных раком молочной железы с высоким риском рецидива заболевания. Метод ФДТ основан на способности фотосенсибилизатора при локальном воздействии света определенной длины волны, соответствующей его пику поглощения, генерировать образование цитотоксических агентов, в частности синглетного кислорода, вызывающих повреждение структурных элементов опухолевой ткани [3-5]. В настоящее время рассматривается три основных механизма противоопухолевого действия ФДТ — прямое повреждение опухолевых клеток, нарушение сосудистой стромы опухолей, элиминация под действием иммунных клеток [3,4].

Клиническое наблюдение

Пациентка П., 38 лет, диагноз – рак левой молочной железы IIIС стадии урТ46N3M0L1V1, отечно-узловая форма.

На 1-ом этапе лечения больной проведено 2 курса полихимиотерапии (ПХТ) по схеме CAF с 10.08.09 по 7.09.09 в поликлинике по месту жительства (Бурятия).

Для хирургического лечения пациентка обратилась в МНИОИ им. П.А.Герцена.

При осмотре – в левой молочной железе в центральном отделе узловое образование 10х12 см, отечность в центральном квадранте, в левой подмышечной области увеличенные лимфатические узлы до 1,5 см в диаметре, плотные при пальпации (рис. 1).

2-ым этапом 13.10.09 выполнена расширенная радикальная мастэктомия слева с проведением ИОФДТ и с закрытием дефекта TRAM-лоскутом. На рис. 2 представлен объем удаляемых тканей (маркирован красителем), на рис. 3 – состояние раны после удаления молочной железы, прилежащих тканей и клетчатки с лимфатическими узлами.

Сеанс ИОФДТ проводили с использованием препарата фотосенс (ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Россия, регистрационное удостоверение РN000199/02 от 04.03.2010). Фотосенс вводили внутривенно



Рис. 1. Вид пациентки после проведения 2 курсов ПХТ
Fig. 1. Appearance of the patient after 2 courses of CT



Рис. 2. Вид пациентки на операционном столе: объем удаляемых тканей обозначен зеленым маркером
Fig. 2. Appearance of the patient on the operative table: the volume of removed tissues is marked with green dye

за 2 ч до хирургического лечения в дозе 0,2 мг/кг массы тела больной. После удаления молочной железы и регионарных лимфатических узлов проводили сеанс ИОФДТ с использованием лазера с длиной волны 675 нм и макролинзы. Мощность лазера – 1500 мВт, плотность энергии облучения – 30 Дж/см². Применяли полипозиционное облучение с двух полей. Время облучения одного поля облучения составило 12,8 мин, общее время облучения – 25,6 мин (рис. 4). Интраоперационных или послеоперационных осложнений, связанных с проведением ИОФДТ, не было.



Рис. 3. Вид операционной раны после резекционного этапа
Fig. 3. The appearance of wound after resection step



Рис. 4. Сеанс интраоперационной фотодинамической терапии:
а – общий вид операционной во время сеанса ФДТ;
б – вид операционного поля в границах светового пятна
Fig. 4. Session of intraoperative photodynamic therapy:
а – a general view of operative room during the PDT session;
б – a view of operative field in the borders of the light spot



Рис. 5. Вид пациентки после завершения операции
Fig. 5. Appearance of the patient after the termination of the surgery

Для закрытия дефекта грудной стенки слева использовали TRAM-лоскут на одной прямой мышце живота (рис. 5).

Плановое гистологическое исследование (С 24829-51): макро – узел в левой молочной железе 10,5х7,5х5,5 см; микро – инвазивный дольковый рак молочной железы с периваскулярным и периневральным ростом, наличием множественных опухолевых эмболов в лимфатических сосудах. Лечебный патоморфоз не выражен. Опухоль врастает в дерму соска. В окружающей ткани – мастопатия. В 14 из 17 лимфатических узлов метастазы рака молочной железы с инвазией за пределы капсулы, наличием опухолевых эмболов в лимфатических и кровеносных сосудах окружающей клетчатки лимфатических узлов.

Плановое иммуногистохимическое исследование (№ 16669-70/б): рецепторы эстрогенов – 2 балла, рецепторы прогестерона – 2 балла, реакция с Her2/neu положительная 2+, FISH – реакция положительная.

Проведен консилиум с участием химиотерапевта, радиолога, хирургов – рекомендовано продолжение ПХТ по схеме 4АС+4Т. Через 4 нед после операции, на 4-ом этапе – проведение лучевой терапии. Затем проведение таргетной терапия герцептином в течение года. Учитывая высокий риск рецидива заболевания – пластическое восстановление удаленной молочной железы на данном этапе не показано.

В 2012 г. пациентка повторно обратилась в МНИОИ им. П.А. Герцена для оценки возможности корригирующей операции на левой молочной железе. При обследовании данных за отдаленное метастазирование и местный рецидив не получено. В августе 2012 г. произведена хирургическая пласти-



Рис. 6. Вид пациентки через 8 лет после проведения специализированного противоопухолевого лечения и 5 лет после пластической операции. Асимметрия молочных желез
Fig. 6. Appearance of the patient 8 years after special antitumor treatment and 5 years after plastic surgery: breast asymmetry



Рис. 7. Вид пациентки на 2-е сутки после редукционной маммопластики справа
Fig. 7. Appearance of the patient 2 days after reduction mammoplasty on the right side

ческая операция – установка импланта (330 см³) в левую молочную железу.

В 2017 г., через 8 лет после проведения специализированного противоопухолевого лечения и 5 лет после пластической операции, пациентка повторно обратилась в МНИОИ им. П.А. Герцена из-за асимметрии молочных желез (рис. 6).

При обследовании данных за рецидив или прогрессирование заболевания не выявлено. В апреле 2017 г. выполнена редукционная маммопластика справа. Вид пациентки на 2-е сутки после операции представлен на рис. 7.

Заключение

Данное клиническое наблюдение – пример успешного комплексного лечения с использованием интраоперационной фотодинамической терапии больной раком молочной железы IIIС стадии с высоким риском местного рецидивирования. На настоящий момент срок безрецидивного наблюдения составил 8 лет.

Таким образом, данный клинический пример демонстрирует обоснованность и целесообразность применения интраоперационной фотодинамической терапии у больных с высоким риском местного рецидива.

ЛИТЕРАТУРА

1. Злокачественные новообразования в России в 2014 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2016. – 250 с.
2. Вакуловская Е.Г., Летыгин В.П., Погодина Е.М. Фотодинамическая терапия и флуоресцентная диагностика у больных раком молочной железы // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 4, № 2. – С. 57-60.
3. Филоненко Е.В., Пак Д.Д., Сарибекян Э.К. и др. Методологические аспекты интраоперационной фотодинамической терапии при местно-распространенном раке молочной железы // Российский онкологический журнал. – 2010. – № 6. – С. 28-32.
4. Хусаинова Г.Н., Дуглав Е.А., Савинова А.Р. и др. Современные возможности фотодинамической терапии в диагностике и лечении злокачественных новообразований // Поволжский онкологический вестник. – 2013. – № 2. – С. 33-37.
5. Горанская Е.В., Каплан М.А. Влияние биологических подтипов рака молочной железы на эффективность фотодинамической терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 21.

REFERENCES

1. *Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2014 godu (zabolevaemost' i smertnost')* [Malignant neoplasms in Russia in 2014 (incidence and mortality)], by eds Kaprin A.D., Starinskii V.V., Petrova G.V. Moscow, MNIOL im. P.A. Gertsena Publ., 2016. 250 p.
2. Vakulovskaya E.G., Letyagin V.P., Pogodina E.M. Photodynamic therapy and fluorescence diagnosis in patient with breast cancer, *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal*, 2003, Vol. 4, No. 2, pp. 57-60. (in Russian).
3. Filonenko E.V., Pak D.D., Saribekyan E.K., Barsamyan G.S., Frank G.A., Andreeva Yu.Yu., Krylova G.P., Ermoshchenkova M.V. Methodological aspects of intraoperative photodynamic therapy for locally advanced breast cancer, *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal*, 2010, No. 6, pp. 28-32. (in Russian).
4. Khusainova G.N., Duglav E.A., Savinova A.R., Busygin M.A., Gataulin I.G., Khasanov R.Sh. Modern possibilities photodynamic therapy for diagnosis and treatment of cancer, *Povolzhskii onkologicheskii vestnik*, 2013, No. 2, pp. 33-37. (in Russian).
5. Goranskaya E.V., Kaplan M.A. Influence of biological subtypes of breast cancer on efficacy of photodynamic therapy, *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal*, 2013, Vol. 12, No. 2, p.21. (in Russian).

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА КОЖИ ЩЕКИ (КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ)

Д.Н. Стрункин¹, И.П. Жарикова¹, Ю.А. Кожевников¹, Н.С. Задонцева²

¹Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

²Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул, Россия

Резюме

Приведены результаты клинического наблюдения за пациенткой с плоскоклеточным раком кожи щеки, пролеченной методом фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором фотодитазин. Пациентке проведен однократный курс фотодинамической терапии. Фотодитазин вводили в дозе 0,8 мг/кг массы тела путем однократной внутривенной инфузии в 0,9%-ом растворе натрия хлорида. Облучение проводили однократно, через 2,5 ч после введения фотосенсибилизатора (плотность мощности лазерного излучения – 200-300 мВт/см², световая доза одного сеанса – 300-350 Дж/см²). Побочных эффектов после введения фотосенсибилизатора и проведения облучения не зарегистрировано. Результат лечения оценен как частичная регрессия опухоли. В настоящее время пациентка находится под динамическим наблюдением, срок наблюдения 2 мес. Планируется проведение повторного курса ФДТ.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, фотодитазин, плоскоклеточный рак кожи.

Для цитирования: Стрункин Д.Н., Жарикова И.П., Кожевников Ю.А., Задонцева Н.С. Фотодинамическая терапия плоскоклеточного рака кожи щеки (клиническое наблюдение) // Biomedical Photonics. – 2017. – Т. 6, № 2. – С. 38-40.

Контакты: Жарикова И.П., e-mail: Ir.Kutc@mail.ru

PHOTODYNAMIC THERAPY FOR SQUAMOUS CELL SKIN CANCER OF THE CHEEK (CASE REPORT)

Strunkin D.N.¹, Zharikova I.P.¹, Kozhevnikov I.A.¹, Zadontceva N.S.²

¹Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

²Altay State Medical University, Barnaul, Russia

Abstract

The results of the clinical observation of a female patient with squamous cell carcinoma of the cheek skin treated by the method of photodynamic therapy (PDT) using the photosensitizer of fotoditazin are represented. The patient had single course of PDT. Fotoditazin was injected in a dose of 0.8 mg/kg of body weight as a single intravenous infusion in 0.9% sodium chloride. The irradiation was performed once, 2.5 h after injection of the photosensitizer (power density of laser irradiation – 200-300 mW/cm², light dose of a single session of 300-350 J/cm²). There were no side effects after photosensitizer injection and after irradiation. The result of the treatment was defined as partial tumor regression. For nowadays the follow-up period is 2 months. The repeated course of PDT is scheduled.

Key words: photodynamic therapy, fotoditazin, squamous cell skin carcinoma.

For citations: Strunkin D.N., Zharikova I.P., Kozhevnikov I.A., Zadontceva N.S. Photodynamic therapy for squamous cell skin cancer of the cheek (case report), *Biomedical Photonics*, 2017, T. 6, No. 2, pp. 38-40 (in Russian).

Contacts: Zharikova I.P., e-mail: Ir.Kutc@mail.ru

Введение

Плоскоклеточный рак кожи – злокачественная эпителиальная опухоль кожи и слизистых оболочек, развивающаяся из кератиноцитов. Анализ статистических данных по Российской Федерации за последние 7 лет свидетельствует о тенденции к росту заболеваемости новообразованиями кожи [1]. В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями кожи на долю плоскоклеточного рака приходится около 20% [2].

Плоскоклеточный рак кожи в основном поражает людей пожилого и старческого возраста. Однако в последние годы обозначилась тенденция роста заболеваемости раком кожи у лиц среднего возраста. Несмотря на

наружную локализацию опухолей, а, следовательно, доступность для осмотра, удельный вес запущенных форм злокачественных новообразований кожи остается высоким [1].

Плоскоклеточный рак чаще всего представляет собой солитарную (одиночную) опухоль в виде плотного шаровидного образования в толще кожи. Может локализоваться на любой части тела, но чаще возникает в местах перехода кожи в слизистую. Протекает сравнительно быстро и тяжело, часто дает метастазы [1,2].

Лечение больных злокачественными опухолями кожи лица представляет определенные трудности, связанные с анатомическими особенностями расположения опухоли. Лечение плоскоклеточного рака кожи должно

быть оптимально радикальным, при этом сохраняя анатомическую целостность жизненно важных структур при локализации опухоли на лице [1].

Как правило, план лечения больных плоскоклеточным раком кожи может включать в себя хирургическое лечение, лучевую терапию, лазерную деструкцию, фотодинамическую терапию, электрокоагуляцию, криодеструкцию, химиотерапию [1,2]. Наиболее щадящим, органосохраняющим и эффективным методом лечения злокачественных новообразований является фотодинамическая терапия (ФДТ). Метод сочетает в себе эффективность, простоту, отсутствие побочных реакций и ограниченность противопоказаний при проведении процедур [2-4].

В данной статье приведен клинический пример успешного применения ФДТ у пациентки с плоскоклеточным раком кожи.

Больная А., 1924 г.р., в феврале 2017 г. поступила в клинику с диагнозом: плоскоклеточный рак кожи левой щеки в стадии T2N0M0. На момент начала лечения определена бугристая экзофитная опухоль площадью 4х4 см, неподвижная, с распространением на левой щеке, с признаками распада и инфильтрацией подлежащих тканей (рис. 1). По данным УЗИ опухоль прорастает в кожу и инфильтрирует подкожную клетчатку. Периферические лимфатические узлы не увеличены.

Сеанс фотодинамической терапии проведен 14.02.2017. Для проведения ФДТ использовали препарат фотодитазин (ООО «БЕТА-ГРАНД», Россия, регистрационное удостоверение №ЛС 001246 от 18.05.2012), который успешно зарекомендовал себя при лечении опухолевых поражений кожи [5-7]. Фотосенсибилизатор вводили в виде однократной внутривенной 30-минутной инфузии в разведении в 0,9%-ном растворе натрия хлорида в дозе



Рис. 1. Состояние до лечения: плоскоклеточный рак кожи щеки
Fig. 1. The appearance before treatment: squamous cell skin cancer of the cheek

0,8 мг/кг. Через 2,5 ч проведен сеанс фотодинамической терапии с использованием макролинзы. Применена методика полипозиционного облучения (7 полей облучения); плотность энергии одной позиции облучения составила 300 Дж/см² и 350 Дж/см². Плотность мощности лазерного излучения – 200-300 мВт/см². Сеанс ФДТ больная перенесла удовлетворительно.

При контрольном осмотре через 2 нед после проведения лечения отмечено формирование некротического струпа с образованием фибриновых пленок (рис. 2).

Через 1 мес после ФДТ отмечено постепенное очищение зоны светового воздействия от некроза с четко визуализируемой границей между неизмененным и облученным эпителием.

Через 2 мес после лечения на большей части площади воздействия зарегистрирован выраженный процесс эпителизации (рис. 3). В результате лечения получена частичная регрессия опухоли. При осмотре: рубец в области проведения ФДТ бледно-розового цвета, определяется продолженный рост опухоли в виде отдельных участков инфильтрации по переднему краю рубца.

Пациентка после проведенного лечения жалоб не предъявляла. Планируется повторный курс ФДТ для полного регресса опухолевого процесса.



Рис. 2. Состояние через 2 нед после ФДТ: некротический струп в зоне опухоли

Fig. 2. The appearance 2 weeks after PDT: necrotic crust in the tumor area



Рис. 3. Состояние через 2 мес после ФДТ: частичная регрессия опухоли

Fig. 3. The appearance 2 months after PDT: partial tumor regression

ЛИТЕРАТУРА

1. Ганцев Ш.Х., Юсупов А.С. Плоскоклеточный рак кожи // Практическая онкология. – 2012. – Т. 13, № 2. – С. 80-91.
2. Шенталь В.В., Пустынский И.Н., Малаев С.Г. Рак кожи // Мед. Помощь. – 2000. - № 4. – С. 6-10.
3. Кузнецов В.В. Использование фотодинамической терапии в отечественной онкологии (обзор литературы) // Исследования и практика в медицине. – 2015. – Т. 2, № 4. – С. 98-105.
4. Вакуловская Е.Г., Шенталь В.В., Кувшинов Ю.П., Поддубный Е.К. Фотодинамическая терапия у больных с опухолями головы и шеи // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2003. – Т. 14, № 2. – С. 46-49.
5. Капинус В.Н., Романко Ю.С., Каплан М.А. и др. Эффективность флюоресцентной диагностики и фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором Фотодитазин у больных раком кожи // Рос. биотер. жур. – 2005. – Т. 4, № 3. – С. 71-78.
6. Волгин В.Н., Странадко Е.Ф. Изучение фармакокинетики фотодитазина при базально-клеточном раке кожи // Лазерная медицина. – 2011. – Т. 15, № 1. – С. 33-37.
7. Каплан М.А., Романко Ю.С., Попучиев В.В. и др. Влияние плотности световой энергии на противоопухолевую эффективность фотодинамической терапии с фотодитaziном // Лазерная медицина. – 2005. – Т. 9, № 2. – С. 46-54.

REFERENCES

1. Gantsev Sh.Kh., Yusupov A.S. Squamous cell skin cancer, *Prakticheskaya onkologiya*, 2012, Vol. 13, No. 2, pp. 80-91. (in Russian).
2. Shental' V.V., Pustynskii I.N., Malaev S.G. Skin cancer, *Med. Pomoshch'*, 2000, No. 4, pp. 6-10. (in Russian).
3. Kuznetsov V.V. Application of photodynamic therapy in the national oncology (review of literature), *Issledovaniya i praktika v meditsine*, 2015, Vol. 2, No. 4, pp. 98-105. (in Russian).
4. Vakulovskaya E.G., Shental' V.V., Kuvshinov Yu.P., Poddubnyi E.K. Photodynamic therapy in patients with head and neck tumors, *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina RAMN*, 2003, Vol. 14, № 2, pp. 46-49. (in Russian).
5. Kapinus V.N., Romanko Yu. S., Kaplan M.A., Ponomarev G.V. Efficacy of fluorescence diagnosis and photodynamic therapy with photosensitizer Fotoditazin in patients with skin cancer, *Ros bioter zhur*, 2005, Vol. 4, No. 3, pp. 71-78. (in Russian).
6. Volgin V.N., Stranadko E.F. Studies of Photoditazin pharmacokinetics in basal-cell skin cancer, *Lazernaya meditsina*, 2011, Vol. 15, No. 1, pp. 33-37. (in Russian).
7. Kaplan M.A., Romanko Yu.S., Popuchiev V.V., Yuzhakov V.V., Bandurko L.N., Mikhina L.N., Fomina N.K., Malygina A.I., Ingel' I.E. Effect of light energy density on the antitumor efficacy of photodynamic therapy with fotoditazin, *Lazernaya meditsina*, 2005, Vol. 9, No. 2, pp. 46-54. (in Russian).