

BIOMEDICAL

PHOTONICS

Том 6, № 3, 2017

В НОМЕРЕ:

- Интраоперационная фотодинамическая терапия при мезотелиоме брюшины
- Влияние фотоактивированного бенгальского розового на микроциркуляцию
- Исследование фотосенсибилизатора для антибактериальной фотодинамической терапии на основе циклодекстриновой композиции метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил) бактериопурпуринимида
- Значение регистрации выцветания фотосенсибилизатора для оценки механизма действия препаратов на фотоиндуцированный гемолиз
- Изучение апоптоза в лимфатических узлах зоны абдоминальной лимфодиссекции после интраоперационной фотодинамической терапии при злокачественных новообразованиях желудочно-кишечного тракта

BMP

ДИСТРИБЬЮЦИЯ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ
ТЕРАПИИ И ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ НА
ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И СТРАН СНГ



- + «ФОТОДИТАЗИН»™
- + «ФОТОСЕНС»™
- + «АЛАСЕНС»™
- + «ЛЕВУЛОН»™

Лицензия № ЛО-54-02-001917 от 22 декабря 2015 г. на осуществление фармацевтической деятельности.



ЗАО «Компания Витамакс»

Россия, 630001, г. Новосибирск, ул. Калинина, 57
Для писем: 630001, г. Новосибирск, а/я 310
Тел/факс: 8 (383)225-24-06, 225-53-14

BIOMEDICAL PHOTONICS

BIOMEDICAL PHOTONICS –

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

Входит в Перечень ведущих рецензируемых
научных журналов ВАК РФ.
Индексируется в международной
реферативной базе данных Scopus.

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	Ганеева И.Я.

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 полупродуктов и красителей»,
(Москва, Россия)

Мионов 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)

Bolotina 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 journal is included into the List of peer-reviewed science press of the State Commission for Academic Degrees and Titles of Russian Federation

The journal is indexed in the international abstract and citation database – Scopus.

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	Kreueva E.I.
Desktop publishing	Ganeeva I.Ya.

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

Интраоперационная фотодинамическая терапия при мезотелиоме брюшины

А.Д. Каприн, Э.А. Сулейманов, Е.В. Филоненко, Н.А. Гришин, В.М. Хомяков, Д.В. Сидоров, А.Н. Урлова

4

Влияние фотоактивированного бенгальского розового на микроциркуляцию

Т.Г. Гришачёва, И.А. Михайлова, А.В. Струй, С.Г. Чефу, Н.Н. Петрищев

11

Исследование фотосенсибилизатора для антибактериальной фотодинамической терапии на основе циклодекстриновой композиции метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил) бактериопурпуринимида

Г.А. Меерович, Е.В. Ахлюстина, И.Г. Тиганова, А.В. Панов, В.С. Тюкова, Э.Р. Толордава, Н.В. Алексеева, К.Г. Линьков, Ю.М. Романова, М.А. Грин, А.Ф. Миронов, В.Б. Лощенов, А.Д. Каприн, Е.В. Филоненко

16

Значение регистрации выцветания фотосенсибилизатора для оценки механизма действия препаратов на фотоиндуцированный гемолиз

Л.В. Галебская, И.Л. Соловцова, Е.Б. Мирошникова, И.А. Михайлова, М.Е. Сушкин, А. В. Разумный, А.В. Бабина, В.А. Фомина

33

Изучение апоптоза в лимфатических узлах зоны абдоминальной лимфодиссекции после интраоперационной фотодинамической терапии при злокачественных новообразованиях желудочно-кишечного тракта

К.В. Павелец, В.И. Орёл, В.Ю. Кравцов, М.А. Протченков, А.П. Дысин, У.А. Дрозд, Т.И. Кузьмина, Ю.Д. Костина, М.К. Павелец, Д.С. Русанов, Е.Ф. Лацко

39

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

Фотодинамическая терапия остаточной опухоли гортани после ДЛТ (клиническое наблюдение)

В.М. Легостаев, Г.М. Мальдонадо, Е.Ф. Исламова

45

Циторедуктивное хирургическое лечение с интраоперационной фотодинамической терапией больной с муцинозным канцероматозом брюшины

Н.А. Гришин, Э.А. Сулейманов, М.Н. Ложкин, В.И. Чиссов, А.Н. Урлова, М.А. Шульгин, А.Д. Каприн, Е.В. Филоненко

49

ORIGINAL ARTICLES

Intraoperative photodynamic therapy for peritoneal mesothelioma

Kaprin A.D., Suleimanov E.A., Filonenko E.V., Grishin N.A., Khomyakov V.M., Sidorov D.V., Urlova A.N.

4

Influence of photoactivated rose bengal on microcirculation

Gryshachova T.G., Mikhailova I.A., Struy A.V., Chephu S.G., Petrishchev N.N.

11

Study of photosensitizer for antibacterial photodynamic therapy based on cyclodextrin formulation of 13³-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester

Meerovich G.A., Akhlyustina E.V., Tiganova I.G., Panov V.A., Tyukova V.S., Tolordava E.R., Alekseeva N.V., Linkov K.G., Romanova Yu.M., Grin M.A., Mironov A.F., Loshchenov V.B., Kaprin A.D., Filonenko E.V.

16

The importance of a photosensitizer bleaching registration for the evaluation of mechanism of preparation action on the photo-induced hemolysis

Galebskaya L.V., Solovtsova I.L., Miroshnikova E.B., Mikhailova I.A., Sushkin M.E., Razumny A.V., Babina A.V., Fomina V.A.

33

Apoptosis in the lymph nodes of the abdominal lymphodissection zone after local intraoperative photodynamic therapy of gastrointestinal cancers

Pavelec K.V., Orel V.I., Kravtsov V.Yu., Protchencov M.A., Dysin A.V., Drozd U.A., Kuzmina T.I., Kostina U.D., Pavelec M.K., Rusanov D.S., Lacko E.F.

39

CASE REPORTS

Photodynamic therapy of residual laryngeal tumor after EBRT (case report)

Legostaev V.M., Maldonado G.M., Islamova E.F.

45

Cytoreductive surgical treatment with intraoperative photodynamic therapy in patients with mucinous peritoneal carcinomatosis

Grishin N.A., Suleimanov E.A., Lozhkin M.N., Chissov V.I., Urlova A.N., Shul'gin M.A., Kaprin A.D., Filonenko E.V.

49

ИНТРАОПЕРАЦИОННАЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ПРИ МЕЗОТЕЛИОМЕ БРЮШИНЫ

А.Д. Каприн, Э.А. Сулейманов, Е.В. Филоненко, Н.А. Гришин, В.М. Хомяков, Д.В. Сидоров, А.Н. Урлова

Национальный медицинский исследовательский радиологический центр Минздрава России, Москва, Россия

Резюме

Приведены результаты применения разработанной в МНИОИ им. П.А. Герцена новой технологии интраоперационной фотодинамической терапии (ИОФДТ) у больных с мезотелиомой брюшины. В исследование включено 8 пациентов. 3 пациентам выполнено оперативное вмешательство в различном объеме: 1 – ограниченная перитонэктомия в объеме резекции опухолевых очагов и резекция большого сальника, 1 – ограниченная перитонэктомия в объеме резекции опухолевых очагов и атипичная резекция правой доли печени, 1 – только резекция большого сальника в связи с тем, что опухолевые очаги располагались только в большом сальнике и признаков поражения париетальной брюшины при интраоперационной ревизии выявлено не было. Хирургическое вмешательство у этих пациентов завершали проведением ИОФДТ. У остальных 5 пациентов была выполнена только ИОФДТ. После проведенного лечения у 2 больных дополнительно были проведены повторные курсы лапароскопической ИОФДТ.

Из 8 пациентов, включенных в исследование, 4 умерли от основного заболевания, 1 – от сердечно-сосудистой патологии с рецидивом заболевания, 1 – от сердечно-сосудистой патологии без признаков рецидива заболевания, 2 – находятся под наблюдением в течение 6 мес и 146 мес (12 лет). Таким образом, в группе больных мезотелиомой брюшины максимальный срок наблюдения составил 146 мес, медиана выживаемости равнялась 48,4 мес, общая специфическая 1-летняя выживаемость составила $85,7 \pm 13,2\%$, 3-летняя – $68,5 \pm 18,6\%$, 5-летняя – $45,7 \pm 22,4\%$. Средняя продолжительность жизни после лечения у больных с повторными курсами лапароскопической ИОФДТ составила 87 мес, без повторных курсов – 35,8 мес. Таким образом, продолжительность жизни была выше у больных с повторными курсами лапароскопической ИОФДТ. Малое число наблюдений, связанное с редкостью данной патологии, не позволяет делать статистически значимых выводов. Однако результаты исследования свидетельствуют о перспективности применения многокурсовой интраоперационной фотодинамической терапии у пациентов с мезотелиомой брюшины.

Ключевые слова: интраоперационная фотодинамическая терапия, мезотелиома брюшины.

Для цитирования: Каприн А.Д., Сулейманов Э.А., Филоненко Е.В., Гришин Н.А., Хомяков В.М., Сидоров Д.В., Урлова А.Н. Интраоперационная фотодинамическая терапия при мезотелиоме брюшины // Biomedical Photonics. – 2017. – Т. 6, № 3. – С. 4–10.

Контакты: Филоненко Е.В., e-mail: derkul23@yandex.ru

INTRAOPERATIVE PHOTODYNAMIC THERAPY FOR PERITONEAL MESOTHELIOMA

Kaprin A.D., Suleimanov E.A., Filonenko E.V., Grishin N.A., Khomyakov V.M., Sidorov D.V., Urlova A.N.

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

Abstract

Results of application of a new technology of intraoperative photodynamic therapy (IOPDT) in patients with peritoneal mesothelioma developed at P. Herzen Moscow Oncology Research Institute are presented. The study included 8 patients. 3 patients underwent surgery in various amount: 1 – limited peritonectomy in the volume of tumor foci resection and resection of a large omentum, 1 – limited peritonectomy in the volume of tumor foci resection and atypical resection of the right lobe of the liver, 1 – only resection of the large omentum due to the fact that the tumor was located only in a large omentum and no signs of lesions of the parietal peritoneum was revealed by intraoperative revision. Surgical intervention in these patients was concluded by IOPDT. The remaining 5 patients underwent only IOPDT. After the treatment, two patients underwent additional courses of laparoscopic IOPDT.

Of the 8 patients enrolled in the study, 4 died from the underlying disease, 1 from cardiovascular disease with recurrence of the disease, 1 from cardiovascular disease without signs of recurrence, 2 were monitored for 6 months and 146 months (12 years). Thus, in the group of patients with peritoneal mesothelioma, the maximum observation period was 146.44 months, the median survival was 48.4 months, the total specific 1-year survival was $85.7 \pm 13.2\%$, the three-year survival was $68.5 \pm 18.6\%$, the 5-year survival was $45.7 \pm 22.4\%$. The average life expectancy after treatment of patients with repeated courses of laparoscopic IOPDT was 87 months, without repeated

courses – 35.8 months. Thus, life expectancy was higher in patients with repeated courses of laparoscopic IOPDT. Small sample size caused by the rarity of this pathology does not allow for statistically significant conclusions. However, the results of the study indicate the prospects of multi-course intraoperative photodynamic therapy in patients with peritoneal mesothelioma.

Key words: intraoperative photodynamic therapy, peritoneal mesothelioma.

For citations: Kaprin A.D., Suleimanov E.A., Filonenko E.V., Grishin N.A., Khomyakov V.M., Sidorov D.V., Urlova A.N. Intraoperative photodynamic therapy for peritoneal mesothelioma, *Biomedical Photonics*, 2017, T. 6, No. 3, pp. 4–10 (in Russian).

Contacts: Filonenko E.V., e-mail: derkul23@yandex.ru

Введение

Мезотелиома брюшины – редкая злокачественная опухоль, исходящая из мезотелиальных клеток брюшины [1]. В общей структуре заболеваемости злокачественными опухолями данная патология составляет 0,16%. Болеют преимущественно мужчины старше 40 лет [2]. Макроскопически мезотелиома брюшины похожа на канцероматоз брюшины при эпителиальных опухолях яичников и характеризуется множественными просовидными опухолевыми очагами на брюшине. Это агрессивное заболевание четко коррелирует с воздействием асбеста. Исследования по мезотелиоме брюшины встречаются редко, поскольку 93–95% всех мезотелиом локализируются в плевральной полости [3,4].

Мезотелиома брюшины плохо отвечает на системную химиотерапию [5]. Медиана выживаемости без лечения составляет менее 1 года. Редкая диссеминация опухоли за пределы брюшной полости позволяет предположить, что локорегионарные методы лечения могут быть эффективны в отношении долгосрочного контроля заболевания.

Роль хирургического лечения при мезотелиоме и объем операции являются предметом дискуссий в связи с отсутствием рандомизированных исследований. В литературе имеются немногочисленные публикации опыта отдельных центров, в которых описаны разнородные группы, отсутствует контрольная группа нехирургического лечения, описаны различные хирургические техники и выбор различных видов адъювантного лечения, не позволяющий достоверно оценить эффективность того или иного подхода [6–8].

Материал и методы

В МНИОИ им. П.А. Герцена разработана методика интраоперационной фотодинамической терапии (ИОФДТ) для лечения больных с мезотелиомой брюшины.

К настоящему времени число пациентов с мезотелиомой брюшины которым было выполнено хирургическое лечение (лапаротомия с ограниченной перитонэктомией или лапароскопия) с ИОФДТ, составило 8 человек.

Всего в исследуемой группе больных было 6 женщин (75%) и 2 мужчин (25%). Возраст пациентов варьировал от 20 до 67 лет. Средний возраст больных составил 49 ± 14 лет. В возрасте до 29 лет был 1 больной, от 40 и до 49 лет — 2 больных, от 50 до 59 лет — 3 больных, от 60 до 69 лет — 2 больных.

Согласно данным комплексного обследования у 6 (75%) из 8 пациентов имелась различная сопутствующая патология, медикаментозно компенсированная или вне обострения. При этом у данных больных отмечалось наличие более одного заболевания, в связи с чем общее число пациентов не совпадает с общим числом нозологических форм. В соответствии со структурой сопутствующих заболеваний ($n=6$) гипертоническая болезнь при поступлении диагностирована у 2 (25%) больных, хронический гастрит – у 2 (25%), хронический цистит – у 1 (12,5%), хронический простатит – у 1 (12,5%), вирусный гепатит С – у 1 (12,5%), сахарный диабет II типа – у 1 (12,5%) (табл. 1).

Таблица 1

Распределение пациентов в зависимости от структуры сопутствующих заболеваний ($n=8$)

Table 1

The distribution of patients according to the structure of concomitant diseases ($n=8$)

Сопутствующая патология Concomitant pathology	Число больных, абс. (%) Number of patients, abs. (%)
Гипертоническая болезнь Hypertonic disease	2 (25%)
Хронический гастрит Chronic gastritis	2 (25%)
Хронический цистит Chronic cystitis	1 (12,5%)
Хронический простатит Chronic prostatitis	1 (12,5%)
Вирусный гепатит С Viral hepatitis C	1 (12,5%)
Сахарный диабет II типа Diabetes mellitus type II	1 (12,5%)

Согласно классификации ВОЗ (1999) выделяют следующие гистологические варианты злокачественных мезотелиом: эпителиоидный, тубуло-папиллярный солидный, саркоматоидный, бифазный, а также редко встречаемые сосочковый и мультикистозный. В соответствии с этой классификацией пациенты с мезотелиомой брюшины были распределены следующим образом: эпителиоидная форма мезотелиомы диагностирована у 6 (75%) пациентов, саркоматоидная форма – у 1 (12,5%), мультикистозная форма – у 1 (12,5%) больного (табл. 2). Таким образом, чаще всего у пациентов наблюдали эпителиоидную форму мезотелиомы.

Таблица 2

Распределение больных в зависимости от гистологической структуры опухоли (n=8)

Table 2

The distribution of patients according to the histological structure of the tumor (n=8)

Морфологическая форма мезотелиомы Morphological form of mesothelioma	Число больных, абс. (%) Number of patients, abs. (%)
Эпителиоидная Epithelioid	6 (75%)
Саркоматоидная Sarcomatoid	1 (12,5%)
Мультикистозная Multi-cystic	1 (12,5%)
Всего Total	8 (100%)

Мезотелиома брюшины имела первичный характер у 6 (75%) больных, вторичный – у 2 (25%).

До включения в исследование у 7 (87,5%) пациентов из 8 было выполнено противоопухолевое лечение в различном объеме:

- у 1 пациентки в связи с подозрением на опухоль яичника выполнена экстирпация матки с придатками, резекция большого сальника, диагностирована мезотелиома брюшины, по данным гистологического исследования яичников – без опухолевого роста. Проведено 6 курсов ПХТ, через 8 мес в связи с дальнейшим прогрессированием заболевания включена в протокол исследования;
- у 1 пациента по поводу мезотелиомы брюшины проведена ПХТ с двукратным интраперитонеальным введением 5-фторурацила, в связи с неэффективностью лечения в виде быстрых темпов накопления жидкости в брюшной полости через 2 мес больной включен в исследование;
- у 1 пациентки по поводу кистозного образования яичника выполнена резекция яичника с удалением обеих маточных труб, при пересмотре гистологиче-

ских препаратов диагностирована мезотелиома, через 2 мес после нерадикального хирургического лечения при дообследовании выявлены опухолевые очаги в брюшной полости, пациентка включена в исследование;

- у 1 пациентки во время операции по поводу миомы матки диагностирована мезотелиома брюшины, выполнена резекция большого сальника, через 7 мес в связи с дальнейшим прогрессированием заболевания включена в настоящее исследование;
- у 2 пациенток по поводу мезотелиомы плевры было проведено комбинированное лечение в объеме внутривисцеральной ФДТ с ПХТ. У одной из них по окончании ПХТ за 3 мес до включения в исследование диагностировано прогрессирование заболевания в виде специфического асцита с быстрыми темпами накопления жидкости. У второй пациентки через 16 мес после окончания лечения диагностировано прогрессирование заболевания в виде специфического асцита с быстрыми темпами накопления жидкости, проведена ПХТ без эффекта, через 2 мес после окончания ПХТ пациентка включена в исследование;
- у 1 пациентки по поводу мезотелиомы брюшины выполнено хирургическое лечение в объеме: экстирпация матки с придатками, аппендэктомия. Через 2 мес в связи с дальнейшим прогрессированием заболевания выполнена субтотальная колэктомия, НРПАС. Через 4 и 6 мес после циторедуктивной операции с профилактической целью проведено 2 курса РИПАС. Через 3 мес выявлен продолженный рост заболевания. Через 6 мес после окончания лечения пациентка включена в исследование.

Таким образом, до включения в протокол исследования только хирургическое лечение проведено у 2 (25%) пациентов, хирургическое лечение + ПХТ – у 1 (12,5%), хирургическое лечение + НРПАС + РИПАС – у 1 (12,5%), только системная ПХТ – у 2 (25%), системная ПХТ с интраперитонеальным введением химиопрепарата – у 1 (12,5%) пациента.

У всех 8 больных течение заболевания было осложнено наличием асцита. При этом, у 3 (37,5%) из 8 пациентов со специфическим асцитом неоднократно выполняли лапароцентез: от 3 до 5 раз на протяжении 3–6 мес. Данное обстоятельство несомненно ухудшало качество жизни данных больных.

После постановки диагноза мезотелиома брюшины пациенты были включены в исследование в следующие сроки: через 2 мес – 2 больных, через 3 мес – 1, через 5 мес – 1, через 7 мес – 1, через 8 мес – 1, через 13 мес – 1.

После завершения предшествующего лечения пациенты были включены в исследование в следующие сроки: через 2 мес – 3 больных, через 3 мес – 1, через 6 мес – 1, через 7 мес – 1, через 8 мес – 1.

Характеристика хирургического этапа

Хирургический этап у больных мезотелиомой брюшины подразумевал предварительное проведение лапароскопической диагностики, включая флуоресцентную диагностику с оценкой резектабельности опухолевого процесса. При наличии резектабельных очагов на париетальной брюшине выполняли ограниченную перитонэктомию. При наличии очагов в большом сальнике выполняли резекцию большого сальника. Операцию завершали проведением ИОФДТ. При отсутствии возможности выполнения резекционного этапа операция ограничивалась ИОФДТ.

Согласно данным ревизии брюшной полости у всех пациентов выполнена оценка индекса перитонеального канцероматоза (ИПК). ИПК пациентов варьировал от 6 до 39. Среднее значение ИПК составило 21±15. Низкий ИПК (до 10) определен у 4 (50%) пациентов, высокий ИПК (более 20) — у 4 (50%), промежуточных значений ИПК (11-20) в исследуемой группе не было (табл. 3).

Всем пациентам выполнено оперативное вмешательство в различном объеме. Из 4 больных с низким ИПК: у 1 (12,5%) пациента выполнена ограниченная перитонэктомия и резекция большого сальника. У 1 (12,5%) пациента выполнена ограниченная перитонэктомия и атипичная резекция правой доли печени. В обоих случаях ограниченная перитонэктомия выполнена в объеме резекции опухолевых очагов. У 1 (12,5%) пациента выполнена только резекция большого сальника в связи с тем, что опухолевые очаги

Таблица 3

Распределение больных мезотелиомой брюшины в зависимости от индекса перитонеального канцероматоза (n=8)

Table 3
 Distribution of patients with peritoneal mesothelioma depending on the peritoneal cancer index (n=8)

ИПК PCI	Число больных, абс. (%) Number of patients, abs. (%)
0–10	4 (50%)
11–20	0
21–39	4 (50%)
Всего Total	8 (100%)

ИПК – индекс перитонеального канцероматоза
 PCI – peritoneal cancer index

располагались только в большом сальнике и признаков поражения париетальной брюшины при интраоперационной ревизии выявлено не было. Циторедукция в объеме СС 0 достигнута у всех 3 (100%) пациентов. У остальных 5 (62,5%) пациентов выполнена только ИОФДТ (табл. 4).

Распределение больных, которым была выполнена хирургическая резекция, в зависимости от ИПК представлено в табл. 5.

Таблица 4

Объемы оперативного вмешательства у больных мезотелиомой брюшины (n=8)

Table 4
 Amount of surgical intervention in patients with peritoneal mesothelioma (n=8)

Характеристика резекционного этапа Characteristics of the resection	Число пациентов, абс. (%) Number of patients, abs. (%)	ИПК PCI	
		0–10	21–39
Ограниченная перитонэктомия+резекция большого сальника Limited peritonectomy + resection of the greater omentum	1 (12,5%)	1	–
Ограниченная перитонэктомия+атипичная резекция правой доли печени Limited peritonectomy + atypical resection of the right lobe of the liver%	1 (12,5%)	1	–
Резекция большого сальника Resection of the greater omentum	1 (12,5%)	1	–
Без циторедукции Without cytoreduction	5 (62,5%)	1	4
Всего Total	8 (100%)	4	4

ИПК – индекс перитонеального канцероматоза
 PCI – peritoneal cancer index

Таблица 5

Распределение больных в зависимости от индекса перитонеального канцероматоза и объема операции

Table 5

Distribution of patients according to the peritoneal cancer index and the scope of operation

ИПК PCI	Объем хирургического лечения Amount of surgical treatment		Итого, абс. (%) Total, abs. (%)
	Циторедукция + ИОФДТ, абс. (%) Cytoreduction + IOPDT, abs. (%)	ИОФДТ, абс. (%) IOPDT, abs. (%)	
0–10	3 (75%)	1 (25%)	4 (100%)
21–39	0	4 (100%)	4 (100%)
Всего Total	3 (37,5%)	5 (62,5%)	8 (100%)

ИПК – индекс перитонеального канцероматоза, ИОФДТ – интраоперационная фотодинамическая терапия

PCI – peritoneal cancer index, IOPDT – intraoperative photodynamic therapy

Как видно из табл. 5, у 3 (37,5%) пациентов с низким показателем ИПК было выполнено оперативное вмешательство с максимальной циторедукцией и ИОФДТ. У 1 (12,5%) пациентки с низким ИПК и у 4 (50%) пациентов с высоким ИПК от циторедукции решено воздержаться в связи с нерезектабельностью опухолевых поражений – им проведена ИОФДТ как самостоятельный вариант противоопухолевого лечения.

После проведенного лечения у 2 (25%) больных из 8 были проведены повторные курсы лапароскопической ИОФДТ: у 1 больной – после оптимальной циторедукции + ИОФДТ (всего 6 курсов, включая 5 курсов лапароскопической ИОФДТ); у 1 – только лапароскопическая ИОФДТ, всего 4 курса. Периодичность выполнения лапароскопической ИОФДТ – 1 курс 1–3 раза в год. У обоих больных получена стабилизация процесса, что свидетельствует о целесообразности проведения многокурсовой ИОФДТ у пациентов с максимальной циторедукцией.

Течение раннего послеоперационного периода

Для оценки течения послеоперационного периода выбраны следующие показатели: частота ранних послеоперационных осложнений, структура ранних послеоперационных осложнений, тяжесть ранних послеоперационных осложнений (определяемая необходимостью хирургического лечения) и летальность. Выбранные показатели позволяют оценить возможность проведения ИОФДТ без увеличения риска ранних осложнений лечения.

В послеоперационном периоде ни у одного из 8 пациентов послеоперационных осложнений не зарегистрировано, смертельных исходов не было.

После проведенного лечения тактика дальнейшего ведения пациентов обсуждена на консилиуме с участием хирурга, химиотерапевта, специалистов по лучевой терапии и ФДТ. Из 5 больных без циторедуктивного вмешательства – 2 пациентам назначена ПХТ с препаратами платины; еще одной пациентке с из этой подгруппы с низким ИПК и одной пациентке после циторедукции СС 0 – были выполнены повторные курсы лапароскопической ИОФДТ (4 и 6, соответственно); другие 2 пациента данной подгруппы, а также 2 пациента с циторедукцией СС 0 оставлены под динамическим наблюдением.

Результаты

Для оценки эффективности ИОФДТ проанализированы отдаленные результаты у пациентов с мезотелиомой. В связи с тем, что только у 3 (37,5%) больных из 8 выполнена циторедукция в объеме СС 0, оценка безрецидивной выживаемости невозможна из-за того, что основную группу больных составили пациенты без циторедукции, поэтому оценивали только общую выживаемость больных в данной группе.

При оценке общей специфической выживаемости пациентов в качестве конечной точки выбрана смерть пациента от онкологического заболевания. Из 8 пациентов 4 (50%) больных умерло от основного заболевания, 1 (12,5%) – от сердечно-сосудистой патологии с рецидивом заболевания, 1 (12,5%) – от сердечно-сосудистой патологии без признаков рецидива заболевания, 2 (12,5%) – находятся под наблюдением в течение 6 мес и 146 мес (12 лет) после ИОФДТ (табл. 6).

Таким образом, в группе больных мезотелиомой брюшины максимальный срок наблюдения составил 146 мес, медиана выживаемости рав-

Таблица 6

Продолжительность жизни больных мезотелиомой брюшины после интраоперационной фотодинамической терапии

Table 6

Life expectancy of patients with peritoneal mesothelioma after intraoperative photodynamic therapy

Статус после лечения Condition after treatment	Сроки наблюдения (мес) Observation period (months)								Всего Total	
	6	12	28	33	42	52	70	146		
Живы Survived	1	-	-	-	-	-	-	-	1	2
Умерли от основного заболевания Died from the underlying disease	-	1	-	1	-	1	1	-	-	4
Умерли от других причин Died from other causes	-	-	1	-	1	-	-	-	-	2
Итого Total	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8

нялась 48,4 мес, общая специфическая 1-летняя выживаемость составила $85,7 \pm 13,2\%$, 3-летняя – $68,5 \pm 18,6\%$, 5-летняя – $45,7 \pm 22,4\%$ (рис.).

Средняя продолжительность жизни после лечения: у больных с повторными курсами лапароскопической ИОФДТ (n=2) составила 87 мес, без повторных курсов (n=6) – 35,8 мес; у больных, получавших курсы ПХТ в послеоперационном периоде (n=2), – 38 мес, не получавших (n=6) – 52,2 мес (табл. 7).

Таким образом, продолжительность жизни была выше у больных с повторными курсами ИОФДТ, которые проводили с использованием лапароскопии.

Заключение

Разработана новая технология интраоперационной фотодинамической терапии, показавшая безопасность даже при неоднократном применении у больных с мезотелиомой брюшины.

Малое число наблюдений, связанное с редкостью данной патологии, не позволяет делать статистически значимых выводов. Однако результаты исследования свидетельствуют о перспективности применения многокурсовой интраоперационной фотодинамической терапии у пациентов с данной патологией.

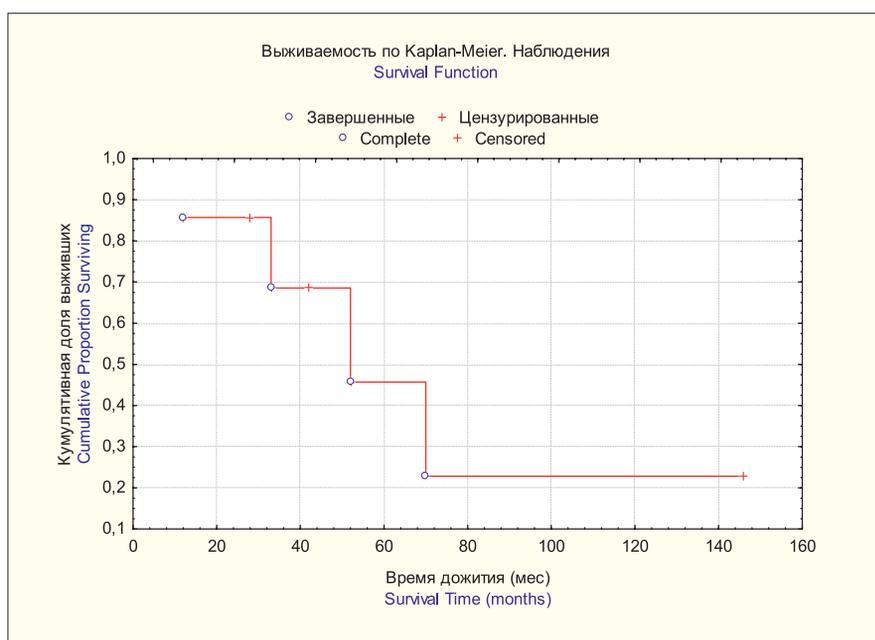


Рис. Общая специфическая выживаемость в группе больных мезотелиомой брюшины
Fig. General specific survival in the group of patients with peritoneal mesothelioma

Таблица 7

Средняя продолжительность жизни больных мезотелиомой брюшины

Table 7

The average life expectancy of patients with peritoneal mesothelioma

	Группы Groups			
	с проведением лапароскопической ИОФДТ laparoscopic IOPDT		с послеоперационной ПХТ postoperative PCT	
	есть with	нет without	есть with	нет without
Средняя продолжительность жизни (мес) Average life expectancy (months)	87	35,8	38	52,2

ИОФДТ – интраоперационная фотодинамическая терапия, ПХТ – полихимиотерапия

IOPDT – intraoperative photodynamic therapy, PCT – polychemotherapy

ЛИТЕРАТУРА

1. Van Baal J.O., Van de Vijver K.K., Nieuwland R., et al. The histophysiology and pathophysiology of the peritoneum // *Tissue Cell*. – 2017. – Vol. 49(1). – P. 95-105.
2. Музалевский П.Н., Шойхет Я.Н., Лазарев А.Ф., Григорук О.Г. Мезотелиома: распространенность и модифицирующие факторы (литературный обзор) // *Сибирский онкологический журнал*. – 2007. – № 2. – С. 77-83.
3. Soeberg M.J., Creighton N., Currow D.C., et al. Patterns in the incidence, mortality and survival of malignant pleural and peritoneal mesothelioma, New South Wales, 1972-2009 // *Aust N Z J Public Health*. – 2016. – Vol. 40(3). – P. 255-262.
4. Stolnicu S., Quiñonez E., Boros M., et al. Case report: Papillary mesothelioma of the peritoneum with foamy cell lining // *Diagnostic pathology*. – 2013. – Vol. 8. – P. 162.
5. Sugarbaker S.H. Two Decades of Progress in the Management of a Rare Disease – Peritoneal Mesothelioma // *Oncology & Hematology Review*. – 2015. – Vol. 11(1). – P. 67-73.
6. Mossman B.T., Shukla A., Heintz N.H., et al. New Insights into Understanding the Mechanisms, Pathogenesis, and Management of Malignant Mesotheliomas // *The American Journal of Pathology*. – 2013. – Vol. 182(4). – P. 1065-1077.
7. Lim J.Y., Wolf A.S., Flores R.M. The use of surgery in mesothelioma // *Lancet Respir Med*. – 2013. – Vol. 1(3). – P. 184-186.
8. Lee Y.K., Jun H.J., Nahm J.H., et al. Therapeutic strategies for well-differentiated papillary mesothelioma of the peritoneum // *Jpn J Clin Oncol*. – 2013. – Vol. 43(10). – P. 996-1003.

REFERENCES

1. Van Baal J.O., Van de Vijver K.K., Nieuwland R., van Noorden C.J., van Driel W.J., Sturk A., Kenter G.G., Rikkers L.G., Lok C.A. The histophysiology and pathophysiology of the peritoneum, *Tissue Cell*, 2017, Vol. 49(1), pp. 95-105.
2. Muzalevskii P.N., Shoikhet Ya.N., Lazarev A.F., Grigoruk O.G. Mesothelioma: prevalence and modifying factors (literature review), *Sibirskii onkologicheskii zhurnal*, 2007, No. 2, pp. 77-83.
3. Soeberg M.J., Creighton N., Currow D.C., Young J.M., van Zandwijk N. Patterns in the incidence, mortality and survival of malignant pleural and peritoneal mesothelioma, New South Wales, 1972-2009, *Aust N Z J Public Health*, 2016, Vol. 40(3), pp. 255-262.
4. Stolnicu S., Quiñonez E., Boros M., Molnar C., Dulcey I., Nogales F.F. Case report: Papillary mesothelioma of the peritoneum with foamy cell lining, *Diagnostic pathology*, 2013, Vol. 8, p. 162.
5. Sugarbaker S.H. Two Decades of Progress in the Management of a Rare Disease – Peritoneal Mesothelioma, *Oncology & Hematology Review*, 2015, Vol. 11(1), pp. 67-73.
6. Mossman B.T., Shukla A., Heintz N.H., Verschraegen C.F., Thomas A., Hassan R. New Insights into Understanding the Mechanisms, Pathogenesis, and Management of Malignant Mesotheliomas, *The American Journal of Pathology*, 2013, Vol. 182(4), pp. 1065-1077.
7. Lim J.Y., Wolf A.S., Flores R.M. The use of surgery in mesothelioma, *Lancet Respir Med*, 2013, Vol. 1(3), pp. 184-186.
8. Lee Y.K., Jun H.J., Nahm J.H., Lim T.S., Park J.S., Ahn J.B., Rha S.Y., Chung H.C., Oh H.E., Song J.S., Yang W.I., Kim H.S. Therapeutic strategies for well-differentiated papillary mesothelioma of the peritoneum, *Jpn J Clin Oncol*, 2013, Vol. 43(10), pp. 996-1003.

ВЛИЯНИЕ ФОТОАКТИВИРОВАННОГО БЕНГАЛЬСКОГО РОЗОВОГО НА МИКРОЦИРКУЛЯЦИЮ

Т.Г. Гришачёва^{1,2}, И.А. Михайлова¹, А.В. Струй¹, С.Г. Чефу^{1,2}, Н.Н. Петрищев^{1,2}

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

²Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Резюме

В работе представлены исследования изменения кровотока в венах (15–30 мкм) брыжейки крысы при фотоактивации ($\lambda = 532$ нм; 0,175 Вт/см²; 300 с) введенного внутривенно бенгальского розового (17 мг/кг). Методом прижизненной биомикроскопии регистрировали прогрессирующее уменьшение скорости кровотока как во время лазерного облучения, так и после прекращения процесса фотоактивации фотосенсибилизатора. Проведённые численные оценки тепловых эффектов в облучаемом участке микрососуда за счёт поглощения лазерного излучения гемоглобином крови и бенгальским розовым показали, что повышение температуры не превышает 0,2°C над исходным уровнем. Таким образом, термический эффект практически не оказывает существенного влияния на расстройство микроциркуляции, вызванное фотоактивацией бенгальского розового.

Ключевые слова: микроциркуляция, фотосенсибилизатор, бенгальский розовый, средняя скорость кровотока.

Для цитирования: Гришачёва Т.Г., Михайлова И.А., Струй А.В., Чефу С.Г., Петрищев Н.Н. Влияние фотоактивированного бенгальского розового на микроциркуляцию // *Biomedical Photonics*. – 2017. – Т. 6, № 3. – С. 11–15.

Контакты: Михайлова И.А., e-mail: fisika45@mail.ru

INFLUENCE OF PHOTOACTIVATED ROSE BENGAL ON MICROCIRCULATION

Gryshachova T.G.^{1,2}, Mikhailova I.A.¹, Struy A.V.¹, Chephu S.G.^{1,2}, Petrishchev N.N.^{1,2}

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

²Medical Research Centre, St-Petersburg, Russia

Abstract

The study of mean blood velocity changes in rat mesenteric venules (15–30 μ m) due to photoactivation ($\lambda = 532$ nm, 0,175 W/cm², 300 s) of i.v. injected Rose Bengal (17 mg/kg) is represented in the article. Using *in vivo* biomicroscopy the progressive decrease of mean blood velocity both during the laser irradiation and after it was registered. The calculation of thermal effects in the irradiated part of microvessel due to laser absorption by hemoglobin and Rose Bengal showed the rise of temperature was not exceed 0.2°C as compared to initial level. Thus, thermal effect has nearly no significant influence on microvascular disturbances caused by Rose Bengal photoactivation.

Key words: microcirculation, photosensitizer, Rose Bengal, mean blood velocity.

For citations: Grishacheva T.G., Mikhailova I.A., Struy A.V., Chephu S.G., Petrishchev N.N. Influence of photoactivated Rose Bengal on microcirculation. *Biomedical Photonics*, 2017, T. 6, No. 3, pp. 11–15 (in Russian).

Contacts: Mikhailova I.A., e-mail: fisika45@mail.ru

Введение

В механизме фотодинамического действия на клетки большое значение имеет прямое воздействие активированного кислорода не только на клетки опухоли, но и на сосуды микроциркуляционного русла как самой опухоли, так и окружающих тканей. Наиболее характерные изменения проявляются в спазме сосу-

дов, замедлении кровообращения, внутрисосудистой агрегации эритроцитов и тромбоцитов, образовании тромбов. При фотодинамической терапии [1] фотосенсибилизатор вводят в организм либо внутривенно, либо локально. Затем проводят облучение области новообразования. Фотохимические реакции, приво-

дящие к появлению активных форм кислорода, либо непосредственно ведут к гибели опухолевых клеток, либо вызывают повреждение сосудистого русла опухоли или микрососудов в ее окрестности. Это прежде всего связано с увеличением проницаемости сосудистой стенки и сужением микрососудов. Структурно-функциональные изменения сосудов зависят от вида фотосенсибилизатора и условий облучения [2]. Реакции артериол и венул на фотодинамическое воздействие существенно отличаются. Так, по данным работы [3], у артериол (20–30 мкм) при воздействии лазерного облучения ($\lambda = 630$ нм; 135 Дж/см²; время облучения 30 мин) после введения фотосенсибилизатора первого поколения (фотофрин, 10 и 25 мг/кг) в первые минуты облучения происходило резкое сужение артериол (15–20 мкм), хотя в некоторых случаях происходило расширение. Часть артериол стала неактивна для кровотока, по крайней мере, в течение 1 ч после окончания облучения, другая же часть быстро восстановила первоначальный диаметр. Отмечается, что при указанных концентрациях фотосенсибилизатора иногда образовывались тромбоцитарные тромбы. Влияние фотодинамического воздействия на венулы аналогичного диаметра было менее значительно. При дозе фотосенсибилизатора 10 мг/кг наблюдались незначительные изменения диаметров венул при увеличении плотности энергии до 135 Дж/см², статистически не отличающиеся от контроля. Отмечено образование отдельных тромбов. При дозе фотосенсибилизатора 25 мг/кг происходило значительное (до 60% от начальной величины) сокращение диаметров венул, но без прекращения кровотока, и в течение 1 ч после окончания облучения не происходило восстановления первоначального диаметра [3].

Исследования изменения диаметра и скорости кровотока микрососудов кожи при совмещении изображений, полученных с помощью доплеровской оптической томографии и конфокальной биомикроскопии [4] в присутствии производного бензопорфирина на основе порфиринов (визудин), также показали, что при плотности энергии локального облучения около 260 Дж/см² артериола (40 ± 4 мкм) начинала сокращаться, и кровоток полностью останавливался после 6-минутного облучения. В венулах аналогичного диаметра следствием такого же воздействия была адгезия тромбоцитов и последующее образование тромбов. Таким образом, изучение фотореактивности сосудов микроциркуляторного русла в присутствии фотосенсибилизаторов является необходимым этапом к изучению путей оптимизации режимов фотодинамической терапии (ФДТ).

Материал и методы

Исследования выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 250–350 г (питомник лабораторных

животных «Рапполово» РАМН) в полном соответствии с «Руководством по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей в ПСПБГМУ им. акад. И.П. Павлова» (2014). Животные содержались на неограниченном потреблении корма (стандартный рацион для лабораторных крыс К-120 фирмы «Информкорм», Россия) и воды при фиксированном световом режиме 12.00:12.00 ч (свет:темнота). Температура поддерживалась в пределах 18–20°C, относительная влажность – 50–70%. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляла 14 дней. Животных разделили на 4 группы: 1-я группа – контрольная, интактные крысы; 2-я группа – введение бенгальского розового, 3-я группа – лазерное облучение; 4-я группа – лазерное облучение на фоне предварительного введения бенгальского розового.

Бенгальский розовый (Acros Organics, USA) в дозе 17 мг/кг вводили в хвостовую вену крысы за 1 ч до облучения (период максимальной концентрации в крови). Выбранная концентрация была ниже предельной, которая при выбранной дозе облучения приводит к образованию в микрососудах стабильного тромба [5].

Далее животных наркотизировали: смесь Золетил-50 (Virbac Sante Animale, Франция) – 2 мл и Ксила (Ксилазин гидрохлорид 20 мг/мл, «Interchemie werken «De Adelaar» B.V», Нидерланды) – 1 мл вводили внутримышечно в дозе 0,75 мл/кг.

Оценку фотоиндуцированных нарушений микроциркуляции проводили с использованием общепринятого метода прижизненной биомикроскопии. Через нижнесрединный доступ извлекали петлю тонкой кишки, примыкающую к мезоаппендиксу, для исследования микроциркуляции в венулах брыжейки (15–30 мкм).

Животное размещали на термостатируемый предметный столик (СНТ-1), имеющий наблюдательное окно для проходящего света, выполненное из кварцевого стекла, над которым размещали петлю брыжейки тонкой кишки. Исследуемый участок брыжейки постоянно орошали с помощью шприцевого автоматизированного дозатора SK-500I стерильным физиологическим раствором (NaCl, 0,9%), температура раствора – 37,5°C.

Для визуальной фиксации нарушения микроциркуляции использовали Макроскоп Wild M420, объектив (Makrozoom 6.3-32x), быстродействующую цифровую камеру Basler acA2000-165uc USB3.0 с матрицей CMOSIS CMV2000 (180 кадров в секунду). Обработку результатов наблюдений проводили с помощью программного обеспечения «МультиМедиа Каталог» (Россия).

Фотоактивацию бенгальского розового *in vivo* проводили с помощью полупроводникового лазера с непрерывной генерацией (DPSS Laser, $\lambda = 532$ нм, 34 мВт, Южная Корея) через 180 с после начала наблюдения в течение 300 с. Время наблюдения процесса состав-

ляло 300 с после окончания фотодинамического воздействия. Мощность облучения на объекте (0,35 мВт) контролировали с помощью измерителя мощности (Advantest Q8230) перед каждым экспериментом. Лазерный луч ($\lambda = 532$ нм) в оптическую систему вводили с помощью световода. Для непосредственного воздействия лазерного излучения на микрососуд с целью подбора режима облучения для минимального теплового повреждения микрососуда, при котором начиналось тромбообразование, луч фокусировали через объектив микроскопа МТ-9 (ЛОМО, Россия) с входящим в комплект микроскопа опак-иллюминатором и водно-иммерсионным объективом (20×0,20, ЛОМО, Россия). При этом диаметр лазерного луча на объекте не превышал 20 мкм, а плотность мощности 318 Вт/см², время облучения 0,1 с [6].

Данные по сосудам в каждой группе были объединены в один ряд. Все значения, попавшие в интервал, проинтегрированы и усреднены, получены средние интегральные для каждого интервала. Полученный временной ряд сглажен преобразованием Фурье с полосой пропускания 3 (использовали табличный процессор Microsoft Excel программную аналитическую платформу Deductor Studio). На графике отмечены пределы разброса данных (\pm SEM, $p < 0,05$).

Результаты

Воздействие на микрососуды сфокусированным лазерным излучением в присутствии фотосенсибилизаторов является в настоящее время наиболее адекватным способом моделирования расстройств микроциркуляции, инициированных ФДТ. В предварительных исследованиях подобные опыты производили в отсутствие фотосенсибилизаторов при использовании лазерного излучения на длинах волн, хорошо поглощаемых гемоглобином крови. Прямое воздействие лазерного излучения на сосудистый эндотелий обусловлено поглощением энергии облучения белками крови (прежде всего, гемоглобином), повышением температуры внутри облучаемого объема крови, и, как следствие, тепловым повреждением луминальной поверхности микрососуда. Определяющими параметрами являются выходная мощность лазера и длительность облучения. При времени воздействия излучения, меньшем характеристического времени релаксации тепла из облучаемого объема микрососуда

$$\tau = \frac{d^2}{6\chi}$$

где $\chi = 1,2 \cdot 10^{-7}$ м²/с – коэффициент термодиффузии и d – диаметр микрососуда), теплоотвод из нагретого объема сосуда практически отсутствует. Если в качестве объекта рассматривать венулы ($d = 2 \cdot 10^{-5}$ мкм), то $\tau = 0,5 \cdot 10^{-3}$ с.

В наших экспериментальных условиях тепло диффундирует в соседние области и происходит нагрев окружающей ткани в характерной зоне тепловой диффузии, где $\Delta t > \tau$, и L за время облучения достигает 0,1 мм. Тогда повышение температуры зоны тепловой диффузии (a , значит, и микрососуда) над температурой окружающей ткани не превысит

$$\Delta T = \frac{S \Delta t d}{\rho C L^2 \pi} = 32,4^\circ$$

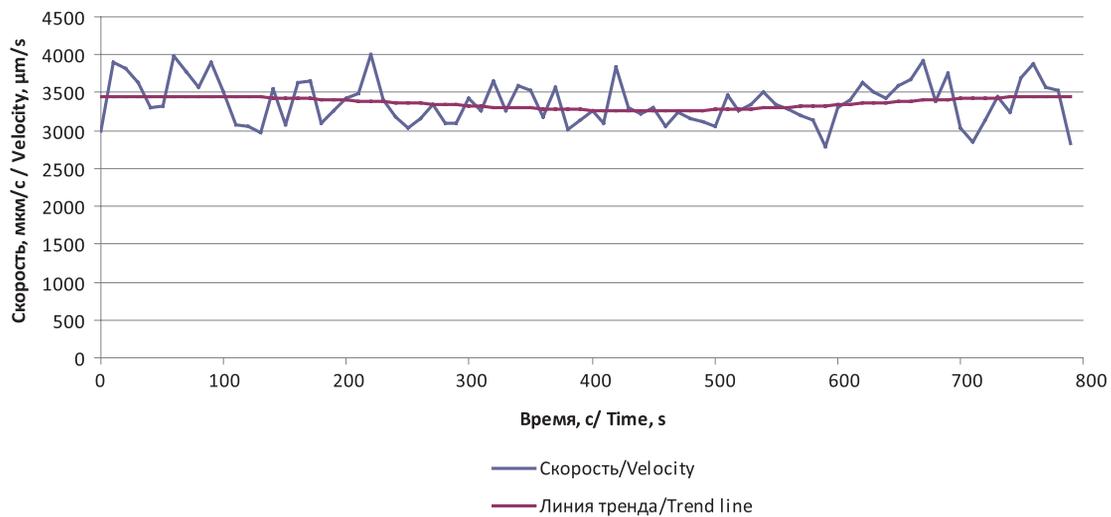
где S – плотность мощность излучения, C – удельная теплоемкость и ρ – плотность биологической ткани. В результате воздействия на эндотелий происходила адгезия и агрегация тромбоцитов к поврежденному участку луминальной поверхности микрососуда.

При исследовании реакции микрососуда на фотодинамическое воздействие в присутствии бенгальского розового у контрольных крыс 1-й группы при наблюдении в течение всего времени эксперимента (13 мин) изменений гидродинамических параметров сосудов достоверно не наблюдалось. Такая же картина наблюдалась и во 2-й группе животных, которым перед наблюдением вводили фотосенсибилизатор. При лазерном облучении на фоне предварительного введения бенгальского розового (4-я группа) наблюдали снижение скорости кровотока сразу после начала облучения (рис.), которое продолжалось и после прекращения процесса фотоактивации.

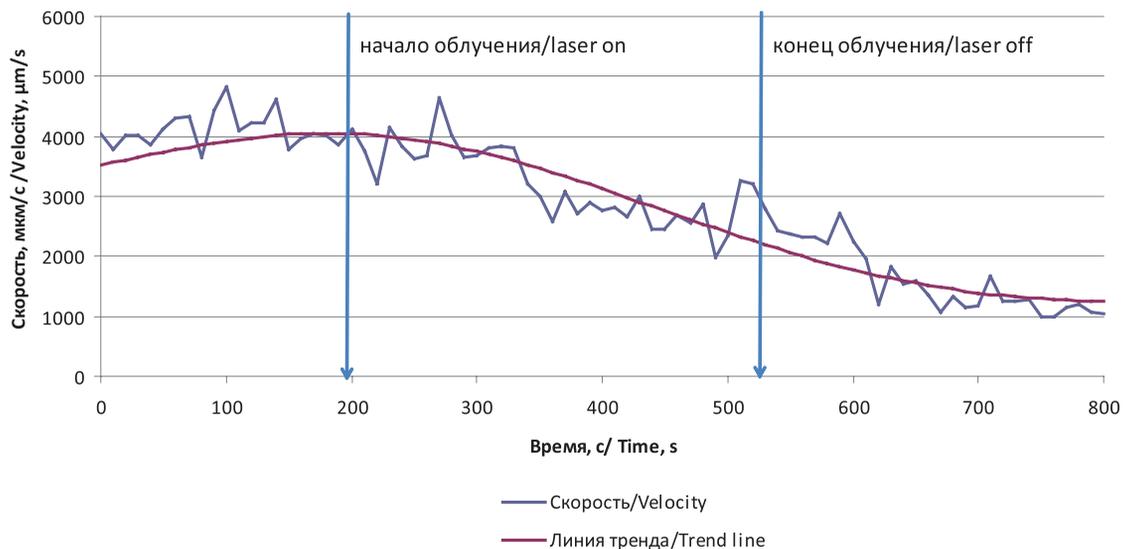
Оценка теплового эффекта в микрососудах крыс 3-й группы при длительности облучения лазером 300 с (плотность мощности 0,175 Вт/см²), проведенная по указанной выше формуле с учетом коэффициента экстинкции гемоглобина на длине волны лазера, показала, что в этих условиях повышение температуры облучаемой зоны над температурой окружающей ткани не превысит $\Delta T = 0,15^\circ\text{C}$. Такое повышение температуры не влияет на динамику кровообращения, тем более что микрососуды находились в режиме термостатирования [8]. Подобная оценка повышения температуры в присутствии бенгальского розового, коэффициент экстинкции которого на длине волны 532 нм сравним с коэффициентом экстинкции гемоглобина, показала, что при используемой концентрации фотосенсибилизатора она не превышает $0,22^\circ\text{C}$. Однако после окончания облучения в микрососудах этой группы крыс наблюдалось постепенное нарастание тромба, причем нарушения микроциркуляции наблюдались не только в районе непосредственного действия излучения, но и на соседних участках.

Обсуждение

Бенгальский розовый – это фотосенсибилизатор из группы ксантеновых красителей (тетрайодо-



а



б

Рис. Влияние лазерного облучения на среднюю скорость кровотока в венах брыжейки крысы при внутривенном введении бенгальского розового (17 мг/кг):

а – в эксперименте без облучения;

б – в эксперименте с облучением ($\lambda = 532$ нм; $0,175$ Вт/см²)

Fig. Effect of laser irradiation on mean blood velocity in mesenteric rat venules for i.v. injected Rose Bengal (17 mg/kg):

а – in the experiment without irradiation;

б – in the experiment with irradiation ($\lambda = 532$ нм; $0,175$ W/cm²)

тетрахлоро-производное флуоресцеина), обладающий высоким коэффициентом поглощения в видимой области и достаточно большим квантовым выходом синглетного кислорода (0,76). Известно, что бенгальский розовый накапливается в эндотелии сосудов, и генерация синглетного кислорода происходит при воздействии облучения в области

его поглощения в районе 530–560 нм. Однако тенденция бенгальского розового агрегировать в растворе в физиологических условиях и сравнительно небольшая растворимость в липидах в настоящее время ограничивает его широкое применение в клинике для ФДТ. По данным электронной микроскопии [9] результатом этого воздействия является повреж-

дение эндотелиальных клеток, причем этот процесс выходит за область непосредственного воздействия облучения, видимо, вследствие диффузии молекул фотосенсибилизаторов, что наблюдалось и в наших опытах. При этом не происходит деэндотелизации субэндотелиальных слоев, что является хорошей моделью артериального тромбоза при разрушении атеросклеротической бляшки. Эта модель широко применяется для процессов моделирования внутрисосудистого тромбообразования в экспериментах на микрососудах животных [5].

Проведенное в работе [5] детальное исследование тромбоза микрососудов ушных раковин мышей с помощью аргонового лазера ($\lambda = 514$ нм) показало, что образование тромба в результате прямого теплового воздействия и при предварительном введении бенгальского розового (40 мг/кг) в венулах (100–350 нм) являлись следствием адгезии и агрегации тромбоцитов к сосудистой стенке, что более характерно для артериального тромбоза. В модели прямого лазерного воздействия тромбообразование подавлялось антагонистом GPIIb/IIIa (G4120), влияние антикоагулянтов (ингибиторов тромбина) в этом случае минимально. Тромбы, образующиеся в результате

фотохимического повреждения, имеют более длительный период роста, на который могут оказывать действие как антикоагулянты, так и антиагрегационные препараты [5].

Заключение

В результате проведенных исследований было установлено, что само по себе лазерное облучение ($\lambda = 532$ нм) при указанных условиях не вызывает значимых изменений скорости кровотока в венулах брыжейки крысы. Хотя, как показали расчеты, повышение температуры облучаемого объема происходит (приблизительно на $0,1^\circ\text{C}$), этого недостаточно для проявления расстройств в микроциркуляторном русле в отличие от опытов в работе [6], где условия облучения существенно отличались. Введение фотосенсибилизатора с последующим облучением приводит к резким изменениям кровотока, что свидетельствует о том, что расстройства микроциркуляции в присутствии бенгальского розового не связаны с повышением температуры внутри микрососуда (приблизительно на $0,2^\circ\text{C}$), а определяются фотохимическим повреждением эндотелия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Филоненко Е.В. Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия в онкологии // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 85.
2. Wang W., Moriyama L.T., Bagnato V.S. Photodynamic therapy induced vascular damage: an overview of experimental PDT // *Laser Phys. Lett.* – 2013. – Vol. 10(2) – 023001.
3. Fingar V.H., Wieman T.J., Wiehle S.A., Cerrito P.B. The Role of Microvascular Damage in Photodynamic Therapy: The Effect of Treatment on Vessel Constriction, Permeability and Leukocyte Adhesion // *Canc. Res.* – 1992. – Vol. 52. – P. 4914-4921.
4. Khurana M., Moriyama E.H., Mariampillai A., Wilson B.C. Intravital high-resolution optical imaging of individual vessel response to photodynamic treatment // *J. Biomed. Opt.* – 2008. – Vol. 13, No. 4. – 040502.
5. Rosen E.D., Raymond S., Zollmann A., Noria F., Sandoval-Cooper M., Shulman A., Merz J.L., Castellino F.J. Laser-Induced Non-Invasive Vascular Injury Models in Mice Generate Platelet and Coagulation-Dependent Thrombi // *Am. J. Path.* – 2001. – Vol. 158, No. 5. – P. 1613-1622.
6. Кондратьев А.С., Михайлова И.А., Петрищев Н.Н. Моделирование различных форм повреждения сосудистой стенки с помощью лазерного излучения // *Рос. физиол. журнал им. И.М.Сеченова.* – 2013. – № 6. – С. 744-749.
7. Kelly K.M., Kimel S., Smith T.S., Stacy A., Hammer-Wilson M.J., Svaasand L., Nelson J.S. Combined Photodynamic and Photothermal Induced Injury Enhances Damage to In Vivo Model Blood Vessels // *Lasers Surg Med.* – 2004. – Vol. 34. – P. 407-413.
8. Zhu D., Lu W., Weng Y., Cui H., Luo Q. Monitoring Thermal-Induced Changes in Tumor Blood Flow and Microvessels with Laser Speckle Contrast Imaging // *Applied Optics.* – 2007. – Vol. 46, No. 10. – P. 1911-1917.
9. Kretz C.A., Vaezzadeh N., Gross P.L. Tissue Factor and Thrombosis Models // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2010. – Vol. 30. – P. 900-908.

REFERENCES

1. Filonenko E.V. Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy in oncology, *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal*, 2013, Vol. 12, No. 2, p. 85.
2. Wang W., Moriyama L.T., Bagnato V.S. Photodynamic therapy induced vascular damage: an overview of experimental PDT, *Laser Phys. Lett.*, 2013, Vol. 10(2), 023001.
3. Fingar V.H., Wieman T.J., Wiehle S.A., Cerrito P.B. The Role of Microvascular Damage in Photodynamic Therapy: The Effect of Treatment on Vessel Constriction, Permeability and Leukocyte Adhesion, *Canc. Res.*, 1992, Vol. 52, pp. 4914-4921.
4. Khurana M., Moriyama E.H., Mariampillai A., Wilson B.C. Intravital high-resolution optical imaging of individual vessel response to photodynamic treatment, *J. Biomed. Opt.*, 2008, Vol. 13, No. 4, 040502.
5. Rosen E.D., Raymond S., Zollmann A., Noria F., Sandoval-Cooper M., Shulman A., Merz J.L., Castellino F.J. Laser-Induced Non-Invasive Vascular Injury Models in Mice Generate Platelet and Coagulation-Dependent Thrombi, *Am. J. Path.*, 2001, Vol. 158, No. 5, pp. 1613-1622.
6. Kondrat'ev A.S., Mikhailova I.A., Petrishchev N.N. Modeling of different degrees of microvessel laser-induced endothelium damage, *Ros. fiziol. zhurnal im. I.M. Sechenova*, 2013, No. 6, pp. 744-749.
7. Kelly K.M., Kimel S., Smith T.S., Stacy A., Hammer-Wilson M.J., Svaasand L., Nelson J.S. Combined Photodynamic and Photothermal Induced Injury Enhances Damage to In Vivo Model Blood Vessels, *Lasers Surg Med.*, 2004, Vol. 34, pp. 407-413.
8. Zhu D., Lu W., Weng Y., Cui H., Luo Q. Monitoring Thermal-Induced Changes in Tumor Blood Flow and Microvessels with Laser Speckle Contrast Imaging, *Applied Optics*, 2007, Vol. 46, No. 10, pp. 1911-1917.
9. Kretz C.A., Vaezzadeh N., Gross P.L. Tissue Factor and Thrombosis Models, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, Vol. 30, pp. 900-908.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ДЛЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ ЦИКЛОДЕКСТРИНОВОЙ КОМПОЗИЦИИ МЕТИЛОВОГО ЭФИРА 13³-N-(N-МЕТИЛНИКОТИНИЛ) БАКТЕРИОПУРПУРИНИМИДА

Г.А. Меерович^{1,2}, Е.В. Ахлюстина², И.Г. Тиганова³, А.В. Панов⁴, В.С. Тюкова⁴,
 Э.Р. Толордава³, Н.В. Алексеева³, К.Г. Линьков¹, Ю.М. Романова³, М.А. Грин⁴,
 А.Ф. Миронов⁴, В.Б. Лощенов^{1,2}, А.Д. Каприн⁵, Е.В. Филоненко⁵

¹Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия

²Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ, Москва, Россия

³Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного акад. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

⁴Московский технологический университет МИРЭА, Москва, Россия

⁵Национальный медицинский исследовательский радиологический центр Минздрава России, Москва, Россия

Резюме

Катионные бактериохлорины перспективны как антимикробные фотосенсибилизаторы для антибактериальной фотодинамической терапии. Настоящая работа посвящена изучению свойств нового наноструктурированного катионного фотосенсибилизатора на основе циклодекстриновой дисперсии производного бактериохлорина – метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида (КБХ), с целью оптимизации состава дисперсии и выбора интервала времени от введения фотосенсибилизатора до проведения фотодинамической терапии инфицированных гнойных ран. Оценены особенности поглощения и флуоресценции фотосенсибилизатора в зависимости от его концентрации и соотношения между компонентами дисперсии. Изучена фармакокинетика и биораспределение фотосенсибилизатора в органах и тканях интактных мышей и гнойных ранах, инфицированных *P. aeruginosa* или *S. aureus*.

Предварительные исследования показали высокую эффективность антимикробной фотодинамической терапии инфицированных гнойных ран с циклодекстрированной дисперсией КБХ. Проведенные исследования поглощения и спектрально-флуоресцентных свойств его лекарственной формы в зависимости от ее состава позволили рекомендовать использование массового отношения КБХ : циклодекстрин около 1:200 и введение для уменьшения агрегации 0,1% Твин-80.

Установлено, что КБХ быстро выводится из кровотока мыши: более 70% – за 2 ч, 95% – за 1 сут, более 99% – за 6 сут. Из кожи и мышц около 98% выводится за 6 сут. Фотосенсибилизатор накапливается и удерживается до 24 ч в печени и почках. Это позволяет предположить, что элиминирование фотосенсибилизатора из организма мышей происходит через почки и печень. Обнаружено, что в тканях, в частности, в коже и мышцах, через 24 ч наблюдается частичная агрегация фотосенсибилизатора. Это позволяет предположить, что уменьшение интенсивности его флуоресценции через 24 и более часа связано не только с его элиминацией из организма, но и с агрегацией. Спектрально-флуоресцентное исследование показали, что КБХ селективно накапливается в инфицированных ранах, флуоресцентная контрастность лежит в пределах 3–4. Наиболее высокие значения концентрации и селективности его накопления в инфицированных ранах были достигнуты через 1,5–3 ч после внутривенного введения. Облучение через 2 ч после введения обеспечило высокую эффективность терапии инфицированных гнойных ран.

Ключевые слова: антимикробная фотодинамическая терапия, метиловый эфир 13³-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида, производные бактериохлорина, поглощение, флуоресценция, агрегация, циклодекстрин.

Для цитирования: Меерович Г.А., Ахлюстина Е.В., Тиганова И.Г., Панов А.В., Тюкова В.С., Толордава Э.Р., Алексеева Н.В., Линьков К.Г., Романова Ю.М., Грин М.А., Миронов А.Ф., Лощенов В.Б., Каприн А.Д., Филоненко Е.В. Исследование фотосенсибилизатора для антибактериальной фотодинамической терапии на основе циклодекстриновой композиции метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида // Biomedical Photonics. – 2017. – Т. 6, № 3. – С. 16–32.

Контакты: Меерович Г.А., e-mail: meerovich@mail.ru

STUDY OF PHOTOSENSITIZER FOR ANTIBACTERIAL PHOTODYNAMIC THERAPY BASED ON CYCLODEXTRIN FORMULATION OF $13^3\text{-N-(N-METHYLNICOTINYL)-BACTERIOPURPURINIMIDE METHYL ESTER}$

Meerovich G.A.^{1,2}, Akhlyustina E.V.², Tiganova I.G.³, Panov V.A.⁴, Tyukova V.S.⁴, Tolordava E.R.³, Alekseeva N.V.³, Linkov K.G.¹, Romanova Yu.M.³, Grin M.A.⁴, Mironov A.F.⁴, Loshchenov V.B.^{1,2}, Kaprin A.D.⁵, Filonenko E.V.⁵

¹Prokhorov General Physics Institute RAS, Moscow, Russia

²National research nuclear university "MEPHI", Moscow, Russia

³N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology & Microbiology, Moscow, Russia

⁴Moscow Technological University MIREA, Moscow, Russia

⁵National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract

Cationic bacteriochlorins are promising as antibacterial photosensitizers (PS) for antibacterial photodynamic therapy. Current work is devoted to the study of properties of new nanostructured cationic photosensitizer based on cyclodextrin dispersion of bacteriochlorine derivative – $13^3\text{-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester}$, for optimization of dispersion composition and selection of time interval between administration of the PS and photodynamic therapy of infected septic wounds. Specifics of absorption and fluorescence of PS in dependence of its concentration and proportions of components in dispersion was assessed. Pharmacokinetics and biodistribution of PS were studied *in vivo* in organs and tissues of intact mice and septic wounds infected with *P. aeruginosa* or *S. aureus*. The preliminary studies have shown high efficiency of antimicrobial photodynamic therapy of septic wounds with cyclodextrin dispersion of $13^3\text{-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester}$. Results of study of absorption and spectral and fluorescence properties of its drug formulation depending on its composition allowed to recommend the use of weight ratio $13^3\text{-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester}$: cyclodextrin about 1:200 and addition of 0,1% Tween 80 to reduce aggregation.

The study showed that $13^3\text{-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester}$ was rapidly cleared from mouse blood circulation: more than 70% – for 2 h, 95% – for 1 day, more than 99% – for 6 days. About 98% was cleared from skin and muscles for 6 days. The long-term (up to 24 h) persistence of PS were observed in liver and kidneys, however more than 99% was cleared for 6 days. Thus, it may be supposed that elimination of PS from mice body is through kidneys and liver. After 24 h partial PS aggregation in tissues, particularly in skin and muscles, was observed. Thus, it may be supposed that the reduce of fluorescence intensity after 24 h later was associated not only with its elimination from body but with its aggregation. Spectral and fluorescence studies showed that $13^3\text{-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester}$ selectively accumulated in septic wounds, fluorescence contrast was in the range of 3–4. The highest values of concentration and selectivity of its accumulation were achieved at 1.5–3 h after intravenous injection. The irradiation 2 h after injection provided high efficacy of the therapy of septic wounds.

Key words: antibacterial photodynamic therapy, $13^3\text{-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester}$, bacteriochlorine derivative, absorption, fluorescence, aggregation, cyclodextrin.

For citations: Meerovich G.A., Akhlyustina E.V., Tiganova I.G., Panov V.A., Tyukova V.S., Tolordava E.R., Alekseeva N.V., Linkov K.G., Romanova Yu.M., Grin M.A., Mironov A.F., Loshchenov V.B., Kaprin A.D., Filonenko E.V. Photosensitizer for antibacterial photodynamic therapy based on cyclodextrin formulation of $13^3\text{-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester}$, *Biomedical Photonics*, 2017, T. 6, No. 3, pp. 16–32 (in Russian).

Contacts: Meerovich G.A., e-mail: meerovich@mail.ru

Введение

Бактериальные инфекции являются серьезной угрозой для здоровья, одной из основных причин смертности пациентов с хирургическими ранами или травматическими повреждениями [1], особенно пациентов с ослабленным иммунитетом. До 75% таких случаев вызвано грамположительными бактериями *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, стафилококк золотистый) и до 25% – грамотрицательными бактериями *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, синегнойная

палочка) [2]. Проблема усугубляется тем, что эти бактерии способны образовывать биопленки – сообщества микроорганизмов одного или нескольких видов, защищенные матриксом из экзополимеров, который они сами продуцируют. Бактерии в биопленках устойчивы к внешним воздействиям за счет сниженного метаболизма и наличия матрикса [3–5]. Кроме того, в последнее время из-за нерационального использования антибиотиков в медицине [1, 6] и животновод-

стве появляются бактериальные штаммы с большим разнообразием механизмов резистентности ко многим антибиотикам одновременно. Это делает антибиотикотерапию недостаточно эффективной в лечении бактериальных инфекций, и обуславливает актуальность разработки новых эффективных подходов к борьбе с инфекционными заболеваниями [7].

Грамположительные и грамотрицательные бактерии имеют принципиальные различия в своем строении и чувствительности к лекарственному воздействию. Клеточная стенка грамположительных бактерий имеет относительно высокую степень пористости, и различные макромолекулы, например, гликопептиды и полисахариды с молекулярной массой в диапазоне 30000–60000 Да, достаточно легко диффундируют через плазматическую мембрану [8]. Для наиболее часто используемых фотосенсибилизаторов, молекулярная масса которых обычно не превышает 1500–1800 Да, внешняя стенка грамположительных бактерий не является барьером проницаемости. В то же время внешняя стенка грамотрицательных бактерий обладает дополнительным структурным элементом – наружной мембраной толщиной 10–15 нм, который является внешним по отношению к пептидогликановой сети и имеет очень гетерогенный состав (белки с пориновой функцией, липополисахаридные тримеры и липопотеины, которые создают внешнюю псевдоповерхность плотно упакованных отрицательных зарядов). Такая высокоорганизованная система препятствует проникновению гуморальных защитных факторов организма и запускает механизмы устойчивости ко многим антибиотикам: только относительно гидрофильные соединения с молекулярной массой ниже 600–700 Да диффундируют через пориновые каналы [9, 10]. Взаимодействие катионных соединений с грамотрицательными бактериями, благодаря заряду их поверхности, существенно выше по сравнению с анионными или нейтральными.

Фотодинамическая инактивация бактерий в свободном состоянии и биопленках рассматривается как перспективный способ лечения локальных инфицированных очагов, в частности, инфицированных ран [7, 11], получивший название антибактериальная фотодинамическая терапия (АФДТ). АФДТ способна эффективно разрушать бактериальные клетки без развития резистентности в ответ на облучение [12, 13], не воздействуя при этом, в отличие от антибиотиков, на нормальную микрофлору пациента. При ФДТ молекулы фотосенсибилизатора (ФС), локализованные в биоткани, под воздействием поглощаемого ими света в присутствии внутритканевого молекулярного триплетного кислорода ($^3\text{O}_2$), катализируют образование активных форм кислорода (АФК), в первую очередь – синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$). АФК вызывают повреждение бактерий при взаимодействии с разными их

компонентами (в зависимости от внутриклеточной локализации ФС), что в конечном итоге приводит к клеточной гибели [14, 15]. Продемонстрирована восприимчивость к АФДТ многих патогенных микроорганизмов, в том числе устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий [1, 16].

Для широкого клинического использования АФДТ важно, чтобы ФС селективно связывался с бактериями, минимально взаимодействуя с эукариотическими клетками [17]. Одним из путей достижения этой цели является создание и использование катионных фотосенсибилизаторов, так как бактерии в целом имеют более выраженный отрицательный заряд по сравнению с эукариотическими клетками, что способствует селективному связыванию катионного ФС с патогенной микрофлорой. Кроме того, связывание ФС с бактериями происходит относительно быстро, в то время как взаимодействие катионного ФС с эукариотическими клетками происходит более медленно, что может дать еще один путь обеспечения высокой селективности при оптимизации временных параметров сенсibilизации [18]. Преимущества АФДТ в качестве потенциальной клинической антибактериальной терапии укрепились, когда стало ясно, что на эффективность АФДТ не влияет резистентность бактерий к антибиотику [19] и, кроме того, до сих пор не обнаружена выработка резистентности [20] к ФС и АФДТ (даже после 20 последовательных циклов частичного уничтожения бактериальной микрофлоры с последующим ее ростом [21]). Еще одним преимуществом является то, что при АФДТ ФС можно применять местно или локально в инфицированном очаге. Было показано, что АФДТ уничтожает бактерии в биопленках как *in vitro*, так и *in vivo* [22]. Разрушение бактерий при АФДТ протекает быстро (секунды), в то время как действие антибиотиков может занять несколько часов или дней, что дает потенциальное преимущество в отношении быстро распространяющихся инфекций. Кроме того, лечение с помощью АФДТ может быть начато до того, как инфекционные агенты будут идентифицированы [23].

Многие инфекции могут возникать глубоко внутри тела, и АФДТ таких очагов может быть реализована путем системного введения ФС и использования для облучения оптоволоконных средств доставки лазерного излучения через эндоскопические или интерстициальные игольные интродьюсеры [24].

Настоящая работа посвящена изучению свойств нового наноструктурированного фотосенсибилизатора на основе циклодекстриновой дисперсии катионного производного бактериохлорина метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида (КБХ) с целью оптимизации состава дисперсии и выбора времени проведения антибактериальной фотодинамической терапии инфицированных гнойных ран.

В работе решали следующие задачи:

- исследование поглощения и спектрально-флуоресцентных свойств циклодекстриновой дисперсии КБХ в зависимости от соотношения ее компонентов и концентрации фотоактивной субстанции для оценки агрегации ФС и выработки требований по оптимизации состава;
- исследование флуоресценции КБХ в органах и тканях интактных мышей в различные моменты времени после внутривенного введения циклодекстриновой дисперсии для оценки фармакокинетики и биораспределения ФС;
- спектрально-флуоресцентные исследования в динамике содержания и селективности накопления КБХ в инфицированных ранах с целью выбора оптимального времени начала облучения;
- оценка антибактериальной эффективности лекарственного препарата на основе циклодекстриновой дисперсии КБХ оптимизированного состава.

Материал и методы

Субстанция на основе КБХ [25] получена в Московском технологическом университете совместно с МНИОИ им. П.А.Герцена (филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России) из природного бактериохлорофилла *a* путем последовательных химических модификаций.

Полученная субстанция гидрофобна, поэтому для создания инъекционной формы ее вводили в циклодекстриновый наноноситель. В состав наночастиц входила фотоактивная субстанция КБХ и вспомогательные вещества: гидроксипропил-бета-циклодекстрин (ГПЦД) и Твин-80 (Полисорбат-80).

Изучение фотоинактивации планктонных бактерий проводили на клинических изолятах *S. aureus 15* и *P. aeruginosa 21*. Бактерии выращивали в питательном бульоне LB или на 1%-ом агаре LB (Difco, США). Для планктонных культур определяли минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) ФС в стандартных условиях: инкубация бактерий с ФС 30 мин, плотность дозы облучения 20 Дж/см². Исходный титр бактерий – 1x10⁸ КОЕ/мл (колониеобразующих единиц в мл). Использовали двукратные разведения ФС, начиная с 1мМ. После инкубации бактериальную суспензию центрифугировали, ФС удаляли, бактерии ресуспендировали в фосфатном буфере и разливали по 100 мкл из каждой концентрации и контроля без ФС в лунки двух 96-луночных плоскодонных планшетов: 1 – с облучением, 2 – необлученный контроль. Для облучения использовали светодиодный источник СФД-М-820 с длиной волны спектрального максимума 820 нм, полушириной спектра 35 нм и плотностью мощности около 50 мВт/см². Плотность мощности контролировали с помощью измерителя мощности «Coherent labmax» («Coherent», США), и она

составляла 27 мВт/см². После облучения 50 мкл раствора из каждой лунки высевали на чашки Петри с LB агаром и инкубировали в темноте при 37°C в течение 20 ч. Отмечали наименьшую концентрацию ФС, высев из которой не давал роста. Эту концентрацию принимали за минимальную бактерицидную концентрацию (МБК).

Исследования *in vivo* проводили на иммунокомпетентных мышах BALB/c, самцах массой 20–22 г. ФС вводился в хвостовую вену однократно струйно.

Для создания инфицированных гнойных ран использовали методику, предложенную в [26]. Хирургические раны у мышей инфицировали клиническими изолятами *P. aeruginosa 21* или *S. aureus 15*, которые вызывали гнойную раневую инфекцию у мышей, но при этом не приводили к генерализованной инфекции и гибели мышей. Доза заражения составляла 1x10⁷ КОЕ/мышь. Местное обезболивание при исследованиях проводили спреем или инъекцией 10%-го лидокаина, обездвиживали животное внутримышечным введением препарата золетил (из расчета 40 мг/кг массы животного). Животных подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации.

Исследования фармакокинетики на интактных мышах проводили на опытных группах из 3 животных по 1 группе на каждую временную точку. Исследования фармакокинетики на мышах с инфицированными ранами проводили на 2 опытных группах из 3 животных в группе. Для изучения эффективности АФДТ инфицированных гнойных ран использовали 4 группы мышей с ранами, инфицированными *P. aeruginosa 21* или *S. aureus 15* (2 опытных и 2 контрольных группы по 6 животных в группе).

Для облучения использовали светодиодный источник СФД-М-820 на основе светодиодов с длиной волны спектрального максимума 820 нм, полушириной спектра 35 нм и плотностью мощности около 50 мВт/см².

В работе проводили изучение оптико-спектральных и спектрально-флуоресцентных свойств КБХ в растворах, а также органах и тканях животных *in vivo* и *ex vivo*. Поглощение ФС в широком диапазоне концентраций изучали в двухлучевом спектрофотометре «Hitachi U-3410» («Hitachi», Япония). Спектрально-флуоресцентные исследования в широком диапазоне значений концентрации (от 0,001 мМ до 1 мМ) проводили с использованием спектроанализатора ЛЭСА-01 «БИОСПЕК» (ЗАО «БИОСПЕК», Россия). Возбуждение флуоресценции осуществляли лазерным излучением с длиной волны 785 нм, возбуждающим флуоресценцию благодаря поглощению КБХ на коротковолновом краю основной полосы либо с длиной волны 532 нм, попадающей в его Q₁-полосу.

Для повышения точности исследований, увеличения отношения «сигнал-шум» и расширения динами-

ческого диапазона спектроанализатора учитывали аппаратную функцию экспериментальной установки. В связи с этим регистрируемый сигнал делили на время накопления сигнала и мощность возбуждающего лазерного излучения.

Результаты и обсуждение

Поглощение и флуоресценция циклодекстриновой дисперсии фотосенсибилизатора

Для оптимизации состава циклодекстриновой дисперсии КБХ изучали его влияние на поглощение и флуоресценцию. Исследования образцов с разным содержанием Твин-80 показали (рис. 1), что при низком его содержании (0,01–0,05% от общей массы дисперсии) наблюдается уширение спектра и снижение интенсивности поглощения. Это может быть связано с агрегацией КБХ. Увеличение содержания Твин-80 до максимально разрешенного уровня для лекарственных средств (0,1%) привело к существенному сужению спектрального пика и увеличению его амплитуды.

Зависимость оптической плотности интегрального поглощения дисперсии КБХ с содержанием Твин-80 0,1% в полосе 827±20 нм от молярной концентрации КБХ при толщине кюветы 1 мм представлена на рис. 2. Эта зависимость близка к линейной, что позволяет высказать предположение о преобла-

дании в дисперсии неагрегированной формы изучаемого соединения [27].

Оптимизацию соотношения компонентов дисперсии КБХ при содержании Твин-80, равном 0,1%, проводили под спектрально-флуоресцентным контролем, варьируя массовое соотношение КБХ к циклодекстрину и изменяя концентрацию КБХ от 1 мМ до 0,03 мМ путем разбавления дисперсии дистиллированной водой. Характерные спектры флуоресценции дисперсий КБХ разной концентрации при возбуждении излучением с длиной волны 785 нм приведены на рис. 3, а зависимость интегральной интенсивности флуоресценции (площади под спектральной кривой) от концентрации – на рис. 4.

Зависимость интегральной интенсивности флуоресценции от концентрации сублинейна, хотя в рабочем диапазоне концентраций (<0,2 мМ) близка к линейной. Наблюдаемые явления, проявляющиеся в сублинейной зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации, могут быть связаны, предположительно, с двумя явлениями. Одно из таких явлений обусловлено перепоглощением коротковолнового края спектра флуоресценции с последующим переизлучением в той же полосе, вследствие чего спектральный максимум флуоресценции полосы сдвигается в сторону ее длинноволнового края. Явление характерно для фотосенси-

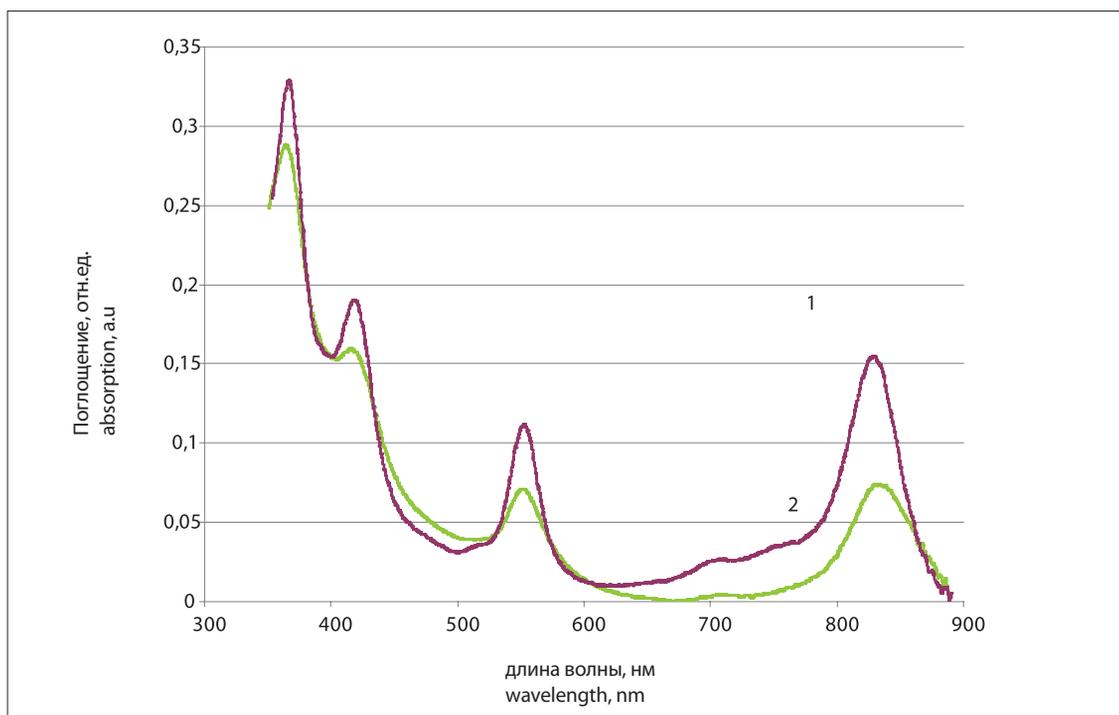


Рис. 1. Спектры поглощения лекарственного средства (концентрация метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида 1 мМ, массовое соотношение метиловый эфир 13³-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида : циклодекстрин = 1:74) с разным содержанием Твин-80: 1 – 0,1%; 2 – 0,01%

Fig. 1. Absorption spectra of PS (the concentration of 13³-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester of 1 mM, the mass ratio of 13³-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester to cyclodextrin is 1:74) with different concentrations of Tween-80: 1 – 0.1%, 2 – 0.01%

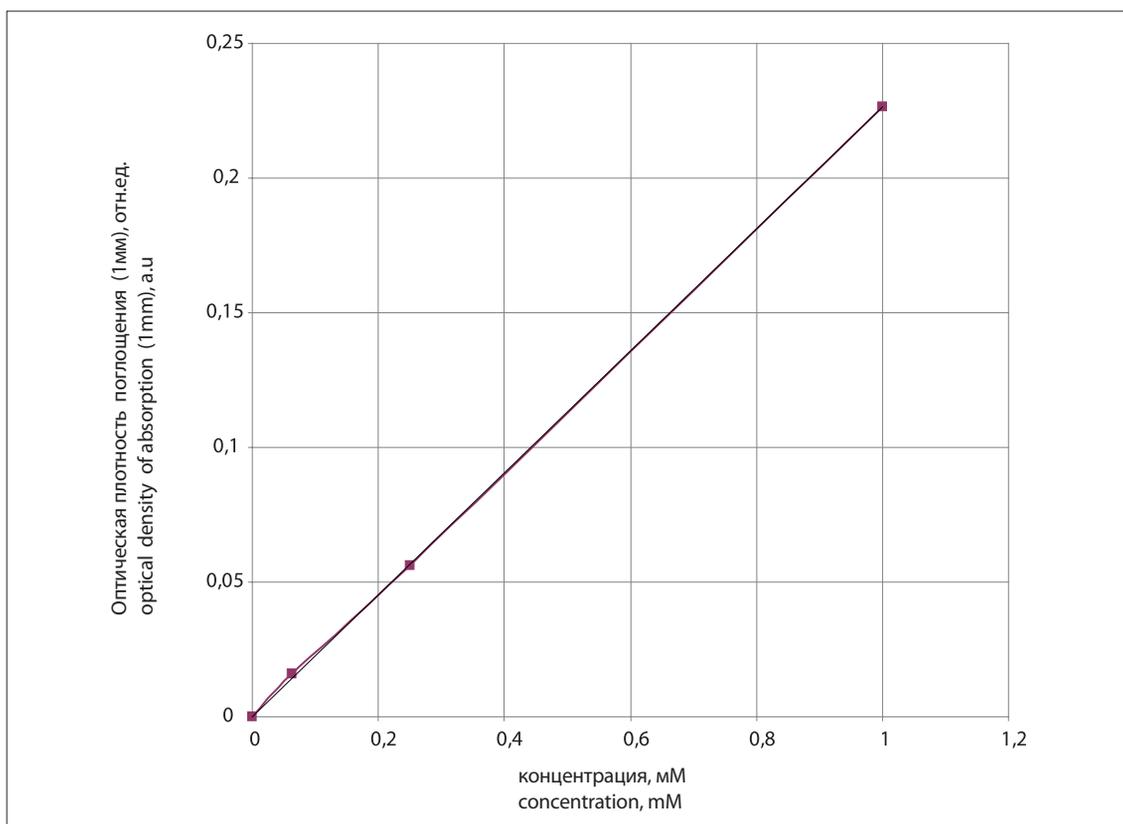


Рис. 2. Зависимость оптической плотности интегрального поглощения в полосе 827±20 нм от молярной концентрации метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида (кювета 1 мм)

Fig. 2. Dependence of integral optical absorption in 827±20 nm range on molar concentration of 13³-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester (optical path 1 mm)

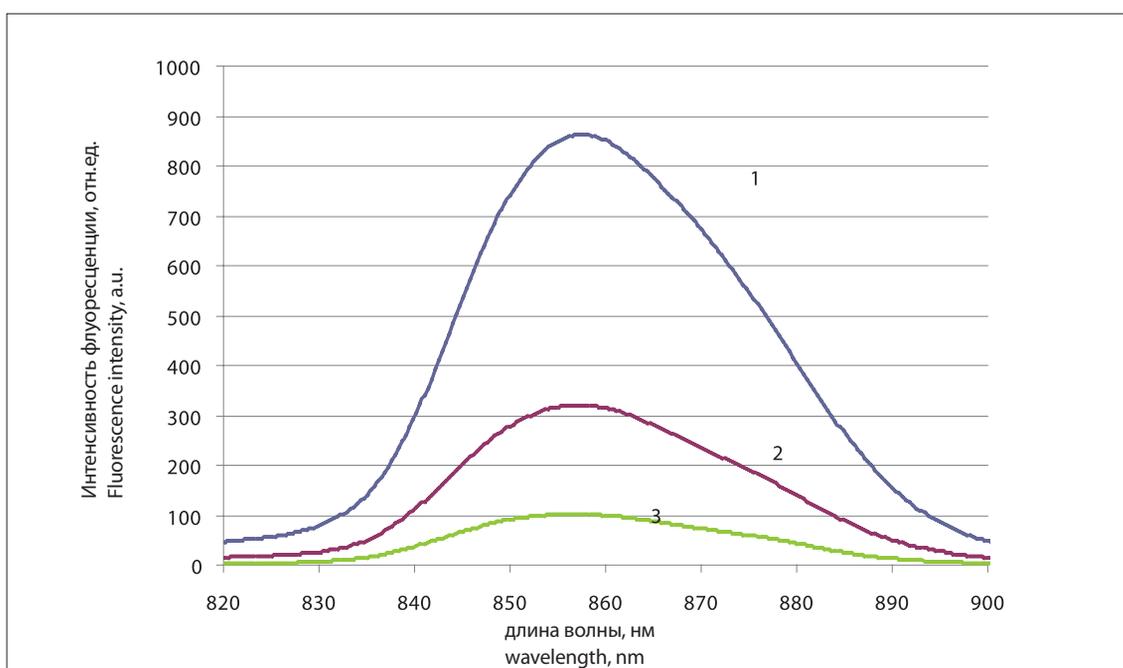


Рис. 3. Спектры флуоресценции метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида (массовое соотношение метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида : циклодекстрин = 1:117) в разных концентрациях: 1 – 1,0 мМ; 2 – 0,25 мМ; 3 – 0,0625 мМ

Fig. 3. Fluorescence spectra of 13³-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester (the mass ratio of 13³-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester to cyclodextrin 1:117) at different concentrations: (1) 1.0 mM; (2) 0.25 mM; (3) 0.0625 mM

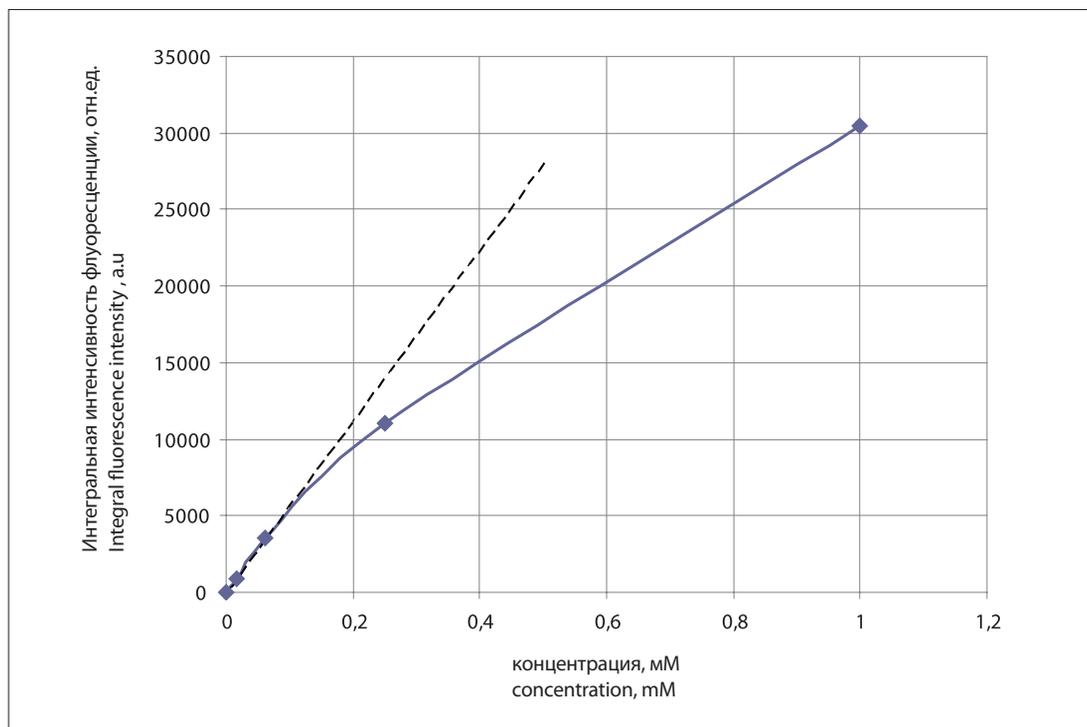


Рис. 4. Зависимость интегральной интенсивности флуоресценции в полосе 857 ± 26 нм от молярной концентрации метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринамида (массовое соотношение метиловый эфир 13³-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринамида : циклодекстрин = 1:117)

Fig. 4. Dependence of integral fluorescence intensity in the 857 ± 26 nm band on molar concentration of 13³-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester (the mass ratio of 13³-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester to cyclodextrin 1:117)

билизаторов с высокой степенью спектрального перекрытия между спектрами поглощения и флуоресценции и невысоким квантовым выходом флуоресценции; оно проявляется как в агрегирующих, так и в неагрегирующих системах [28]. Сравнение формы спектров дисперсий с разными концентрациями КБХ, полученными при двух значениях соотношения КБХ : циклодекстрин, обнаруживает сдвиг максимума в длинноволновую область при увеличении концентрации. Это подтверждает предположение о перепоглощении, с которым связана сублинейность зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации. Перепоглощение может влиять на характеристики флуоресцентной диагностики, но оно, в первом приближении, не сказывается на эффективности ФДТ.

С другой стороны, на форму спектра и полуширину его спектрального контура может влиять агрегация молекул фотосенсибилизатора. Поскольку при агрегации молекул тетрапирролов снижается время жизни их возбужденного состояния, снижается и эффективность передачи энергии молекулярному кислороду, а значит, снижается скорость образования синглетного кислорода и эффективность ФДТ, а также ухудшаются флуоресцентные свойств. Кроме

того, поскольку спектры поглощения агрегатов не совпадают со спектром поглощения неагрегированных молекул, то полоса поглощения уширяется, а интенсивность поглощения (экстинкция) в основной полосе уменьшается, что также может привести к снижению фотодинамической эффективности.

Для оценки изменения формы спектрального контура и полуширины спектров флуоресценции в зависимости от содержания КБХ вычисляли нормированную интенсивность флуоресценции. Для этого спектры флуоресценции делили на значение интенсивности в их спектральном максимуме. Полученные кривые, по существу, описывали форму спектральных контуров. Анализ результатов, приведенных на рис. 5 и 6 показал, что при более высоких значениях массового соотношения КБХ : циклодекстрин спектр флуоресценции уширен, полуширина спектра заметно больше даже при невысоком содержании КБХ в дисперсии из-за уширения и изменения формы длинноволнового края спектра. В этой спектральной области находятся полосы флуоресценции тримерных и тетрамерных агрегатов, и наблюдается, предположительно, суммарный спектр флуоресценции КБХ в мономолекулярном и агрегированном состоя-

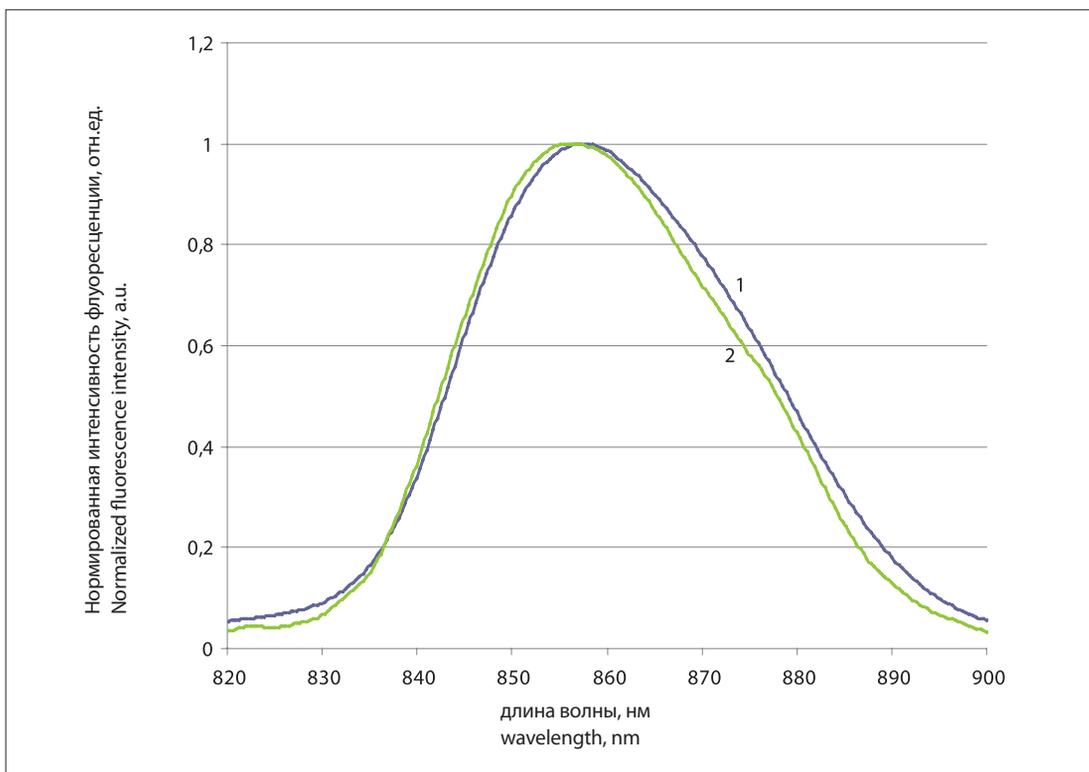


Рис. 5. Форма спектров флуоресценции метилового эфира ^{13}C -N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринамида (массовое соотношение метилового эфира ^{13}C -N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринамида : циклодекстрин = 1:117) с разными концентрациями: 1 – 1 мМ; 2 – 0,0625 мМ

Fig. 5. Shape of fluorescence spectra of ^{13}C -N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester (the mass ratio of ^{13}C -N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester to cyclodextrin 1:117) at different concentrations: 1 – 1 mM; 2 – 0.0625 mM

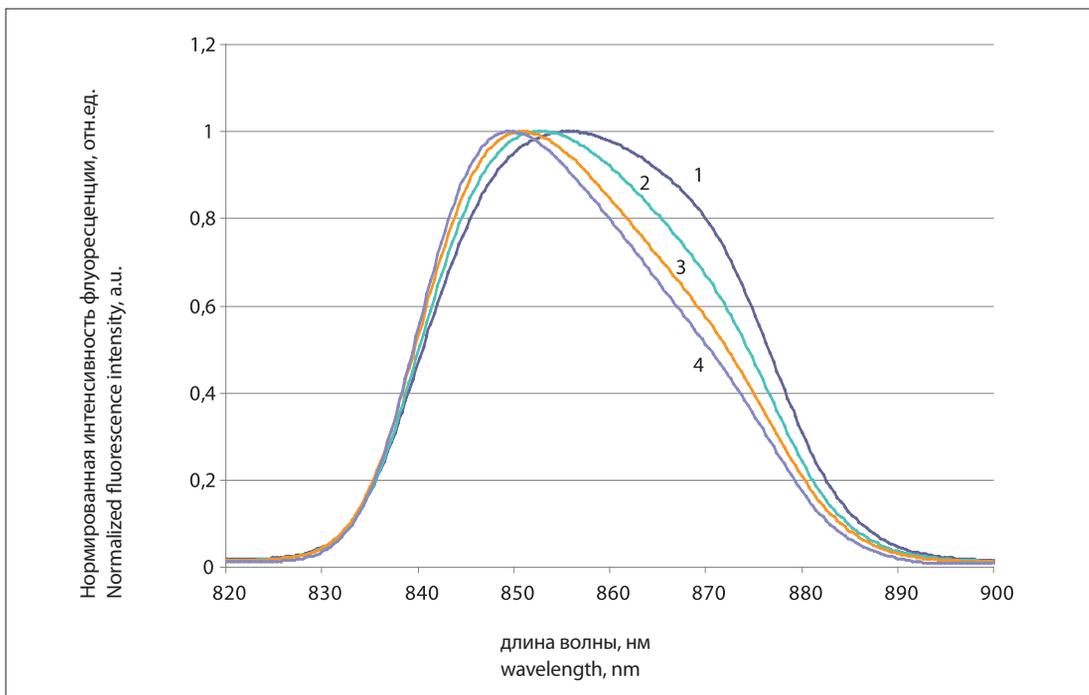


Рис. 6. Форма спектров флуоресценции метилового эфира ^{13}C -N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринамида (массовое соотношение метилового эфира ^{13}C -N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринамида : циклодекстрин = 1:213) с разными концентрациями: 1 – 1 мМ; 2 – 0,33 мМ; 3 – 0,11 мМ; 4 – 0,037 мМ

Fig. 6. Shape of fluorescence spectra of ^{13}C -N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester (the mass ratio of ^{13}C -N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester to cyclodextrin 1:213) at different concentrations: 1 – 1 mM; 2 – 0.33 mM; 3 – 0.11 mM; 4 – 0.037 mM

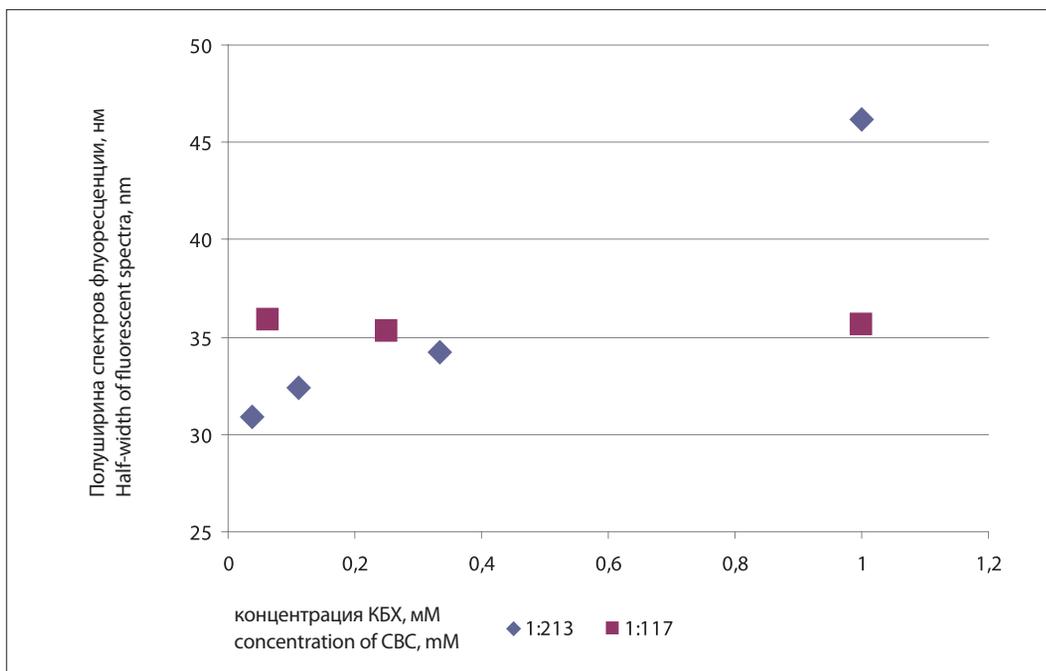


Рис. 7. Полуширина спектров флуоресценции метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида (КБХ) в зависимости от концентрации для разных соотношений метиловый эфир 13³-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида : циклодекстрин
Fig. 7. Dependence of half-width of fluorescent spectra on the concentration of 13³-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester for different of 13³-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester to cyclodextrin mass ratios

нии [29]. Спектры флуоресценции дисперсий с меньшими значениями соотношения КБХ : циклодекстрин в рабочем диапазоне концентраций (<0,2 мМ) имеют заметно меньшую полуширину. Это позволяет сделать вывод, что в таких дисперсиях молекулы КБХ в циклодекстриновых наноносителях существенно меньше агрегированы, т.е. уменьшение соотношения КБХ : циклодекстрин способствует снижению агрегации. Но при высоких (0,2–1,0 мМ) концентрациях в них происходит уширение в области длинноволнового края: проявляется в виде «плеча» дополнительный пик с максимумом примерно при 865–870 нм и увеличивается полуширина. Это позволяет предположить, что в изучаемых дисперсиях реализуется два механизма агрегации, один из которых связан с взаимодействием молекул КБХ внутри циклодекстринового комплекса, другой происходит при сближении циклодекстриновых комплексов друг с другом.

С учетом полученных результатов для дальнейших биологических исследований использовали циклодекстриновую дисперсию с содержанием Твин-80 0,1%, при массовом соотношении КБХ : циклодекстрин не более 1:200.

Результаты исследования нормированной интенсивности флуоресценции в органах и тканях мышей приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, КБХ быстро выводится из кровотока мышей (более 70 % выводится за 2 ч, более 95% – за 1 сут, более 99% – за 6 сут). КБХ накапливается и удержи-

вается в значительной концентрации в печени и почках в течение 24 ч (его содержание в этих органах через 24 ч составляет 40% и 45% от максимальных значений, соответственно); за 6 сут из этих органов выводится более 99%. Это позволяет предположить, что основные пути элиминирования КБХ из организма мышей проходят через почки и печень.

В коже и мышцах через 24 ч после введения концентрация КБХ составляет 22% и 34% соответственно, от максимальных значений, а через 6 сут она составляет около 2%.

Для количественной оценки содержания КБХ (по крайней мере, в крови) была изучена зависимость интенсивности флуоресценции, регистрируемой системой на основе ЛЭСА при фиксированной геометрии опыта, от количественного содержания КБХ в плазме крови. Результаты приведены на рис. 8.

Из полученных данных следует, что эта зависимость с высокой точностью может быть описана полиномом 2-ой степени:

$$I = 49922 C - 79398 C^2,$$

а в диапазоне значений концентрации до 0,05 мМ (0,043 мг/мл), соответствующем содержанию КБХ в органах и тканях на временном отрезке, в котором проводится ФДТ, – линейной функцией

$$I = 43688 C,$$

где I – нормированная интенсивность флуоресценции [отн.ед.], C – концентрация КБХ в плазме [мг/мл].

Таблица 1

Интенсивность (усл.ед.) флуоресценции метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринамида в органах и тканях мышей при внутривенном введении в дозе 20 мг/кг в зависимости от времени после введения

Table 1

Intensity of 13³-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester fluorescence in organs and tissues of mice in dependence on time after intravenous administration in a dose of 20 mg/ kg

Органы и ткани Organs and tissues	Интенсивность флуоресценции метилового эфира 13 ³ -N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринамида (усл.ед.) Intensity of 13 ³ -N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester fluorescence (r.u.)					
	5 мин 5 min	30 мин 30 min	2 ч 2 h	4 ч 4 h	24 ч 24 h	6 сут 6 d
Печень Liver	1200±100	1690±480	2440±315	1225±150	965±70	23±3
Селезенка Spleen	400±65	395±65	349±30	340±65	235±45	7±1
Почки Kidney	890±90	1065±230	1270±121	930±240	480±50	8±1
Сердце Heart	350±160	330±100	335±85	200±25	70±40	3±1
Легкие Lung	2175±470	1235±195	1255±205	670±170	310±70	4±2
Плазма крови Blood plasma	3475±290	1415±350	990±280	930±235	165±75	2±1
Кожа Skin	360±90	715±130	585±120	195±70	160±40	9±2
Мышца Muscle	65±10	160±35	140±30	85±25	55±15	4±1

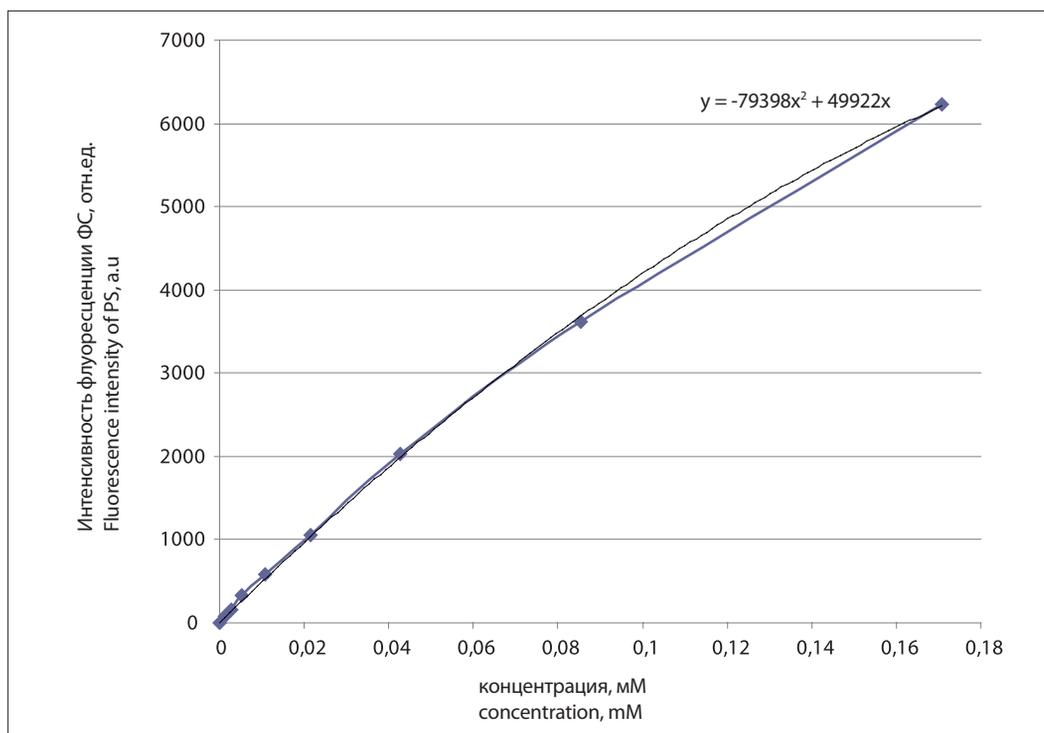


Рис. 8. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринамида в плазме крови

Fig. 8. Dependence of fluorescence intensity on 133-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester concentration in blood plasma

На рис. 9 представлена кривая «концентрация – время» для плазмы крови при внутривенном введении КБХ в дозе 20 мг/кг.

Использование полученных результатов позволяет оценить фармакокинетические параметры для плазмы крови животных, которым был введен внутривенно КБХ:

- период полувыведения КБХ (время, необходимое для уменьшения вдвое концентрации КБХ в крови) $T_{1/2} = 3,1$ ч;
- объем распределения КБХ (условный объем жидкости, в котором нужно растворить всю попавшую в организм дозу КБХ, чтобы получилась концентрация, равная начальной концентрации в сыворотке крови) $V_d = 4,7$ см³;
- общий клиренс (отражает объем тест-ткани, освобождающийся от КБХ в единицу времени, который определяется отношением дозы к площади под кривой «концентрация – время») $Cl_T = 0,8$ см³/ч.

Исследования флуоресценции КБХ в органах и тканях животных показывают, что, несмотря на различия в интенсивности спектров в разных органах в первые часы после введения, формы их спектральных контуров достаточно близки как между собой, так и со спектральным контуром флуоресценции вводимой дисперсии. Однако с течением времени меняется не только интенсивность флуоресценции, но претерпевает изменения и форма спектра. Через 24 ч после введения в кожу и мышечной ткани наблюдается существенное уширение спектрального контура с длинноволновой стороны (рис. 10).

Полученные результаты позволяют предположить, что уменьшение интенсивности флуоресценции КБХ через 24 и более часов связано не только с его элиминацией из организма, но и с агрегацией.

При исследовании инфицированных *S. aureus* или *P. aeruginosa* ран с использованием 2D-системы на основе высокочувствительной CCD-камеры с узкополосным интерференционным фильтром FF01-857/30-25 (Semrock, США) обнаружено, что распределение интенсивности флуоресценции по гнойным ранам неоднородно. В ранах, инфицированных *S. aureus*, участки с повышенной интенсивностью локализованы в основном в центральной части раны, а в ранах, инфицированных *P. aeruginosa*, – преимущественно в периферической части. Это согласуется с микробиологическими данными о локализации биопленок *S. aureus* и *P. aeruginosa* в гнойных ранах.

Спектрально-флуоресцентные исследования у мышей с инфицированными гнойными ранами (рис. 11–12) позволили оценить в динамике уровень нормированной флуоресценции с целью выбора оптимального интервала времени для начала облучения и вычислить флуоресцентную контрастность как отношение интенсивности нормированной флуоресценции в ране по отношению к интенсивности нормированной флуоресценции в прилегающей ткани (коже). Высокая интенсивности флуоресценции в ране наблюдается уже через 30 мин после внутривенного введения КБХ в концентрации 1 мМ (доза 20 мг/кг массы тела мышей) и вплоть до 24 ч после введения. Интенсивность

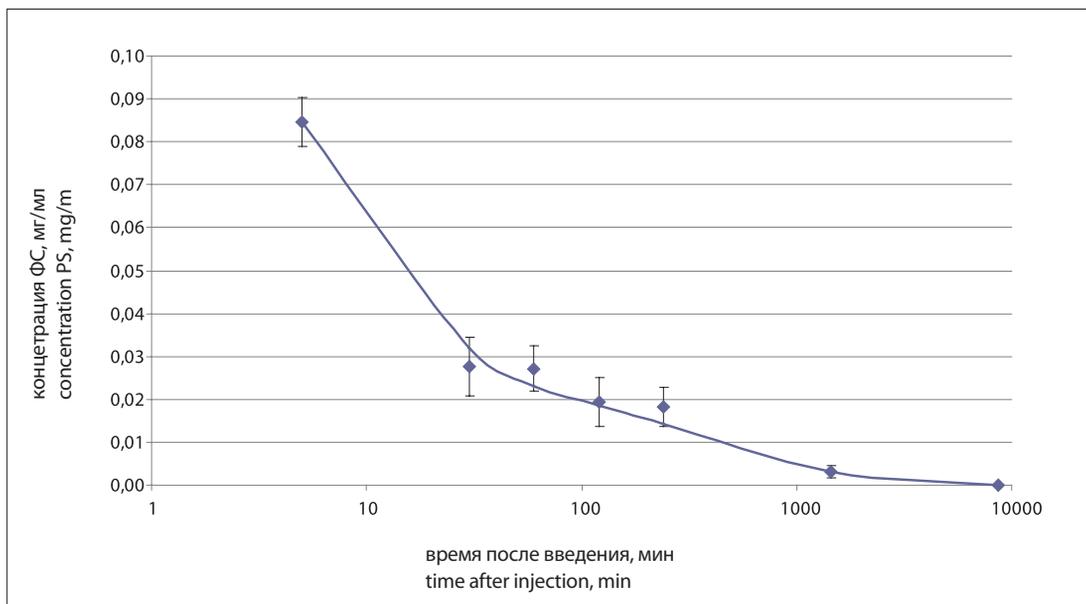


Рис. 9. Динамика изменения концентрации метилового эфира 13^3-N -(N-метилникотинил)бактериопурпуринамида в плазме крови после введения мышам в дозе 20 мг/кг

Fig. 9. Dependence of 13^3-N -(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester concentration in blood plasma of mice on time after administration at a dose of 20 mg/kg

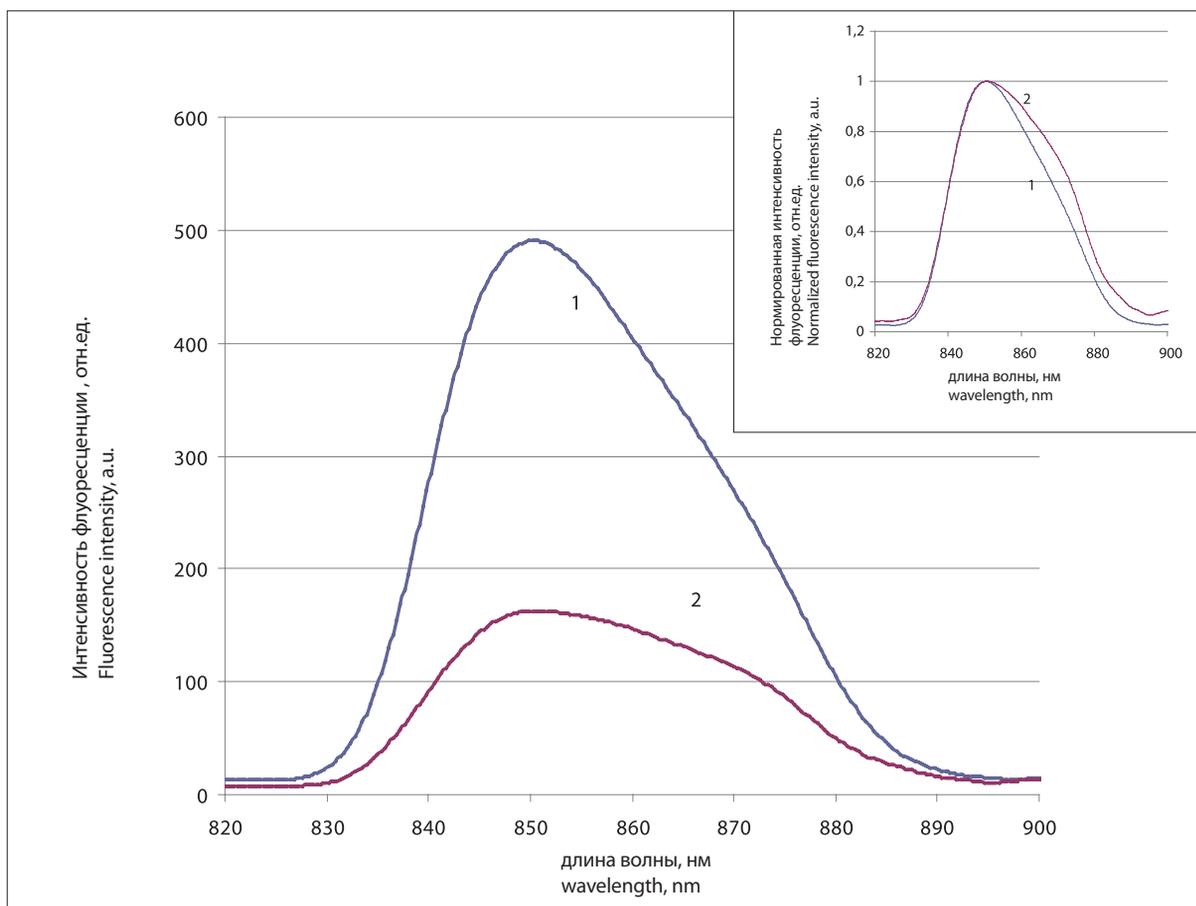


Рис. 10. Спектры флуоресценции метилового эфира ^{13}C -N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида в коже через 2 ч (1) и 24 ч (2) после внутривенного введения в дозе 20 мг/кг. На вкладке спектры флуоресценции нормированы делением на интенсивность флуоресценции в спектральном максимуме полосы

Fig. 10. Fluorescence spectra of ^{13}C -N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester in the skin of mice 2 h (1) and 24 h (2) after administration at a dose of 20 mg/kg. Insert: Fluorescent spectra normalized on intensity at their spectral maxima

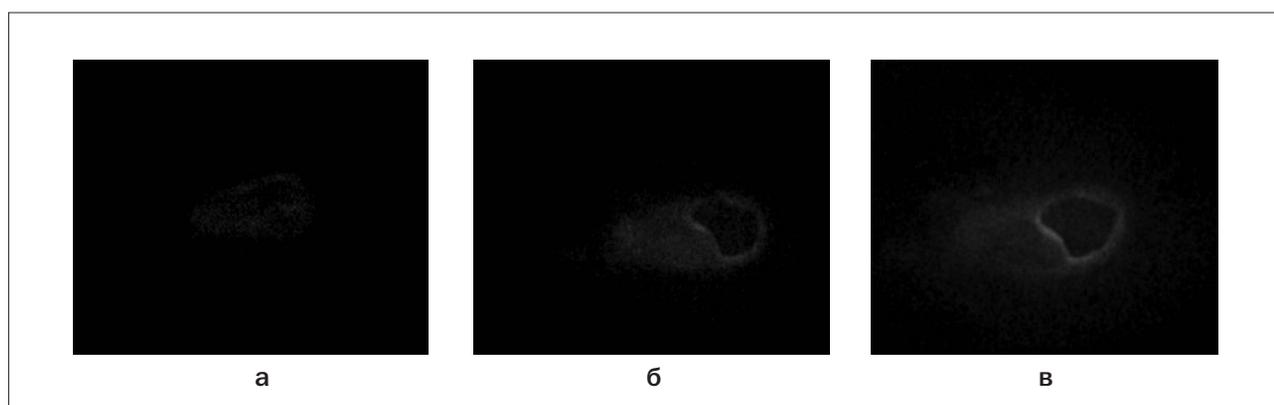


Рис. 11. Флуоресцентные изображения инфицированной *P. aeruginosa* раневой поверхности кожи мышей, полученные через разные интервалы времени после введения метилового эфира ^{13}C -N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида:

- а – до введения;
- б – через 90 мин после введения;
- в – через 120 мин после введения

Fig. 11. Fluorescence images of a wound surface of the mice skin infected by *P. aeruginosa*, at different time intervals after the intravenous administration of ^{13}C -N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester:

- а – before administration;
- б – 90 min after administration;
- в – 120 min after administration

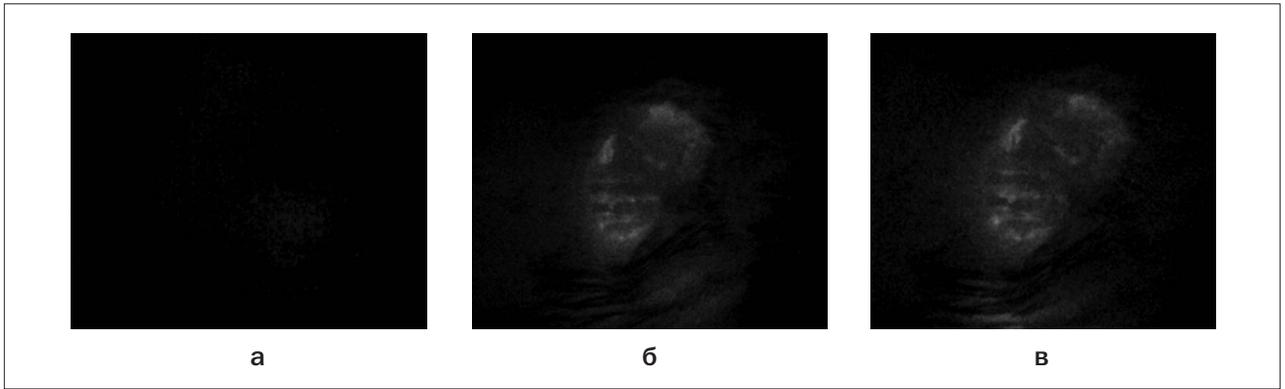


Рис. 12. Флуоресцентные изображения инфицированной *S. aureus* раневой поверхности кожи мышей через разные интервалы времени после внутривенного введения метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида:

- а – до введения;
 б – через 30 мин после введения;
 в – через 120 мин после введения

Fig. 12. Fluorescence images of a wound surface of the mice infected by *S. aureus*, at different time intervals after the intravenous administration of 13³-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester:

- а – before administration;
 б – 30 min after administration;
 в – 120 min after administration

флуоресценции в неинфицированной ране незначительно (примерно в 1,5 раза) превышает интенсивность флуоресценции на прилегающих участках кожи; интенсивность флуоресценции в инфицированной ране значительно выше, селективность

накопления в ней по отношению к нормальной коже (флуоресцентная контрастность) через 2–4 ч после введения КБХ достигает 3,6. Таким образом, накопление КБХ происходит в очаге инфекционного процесса.

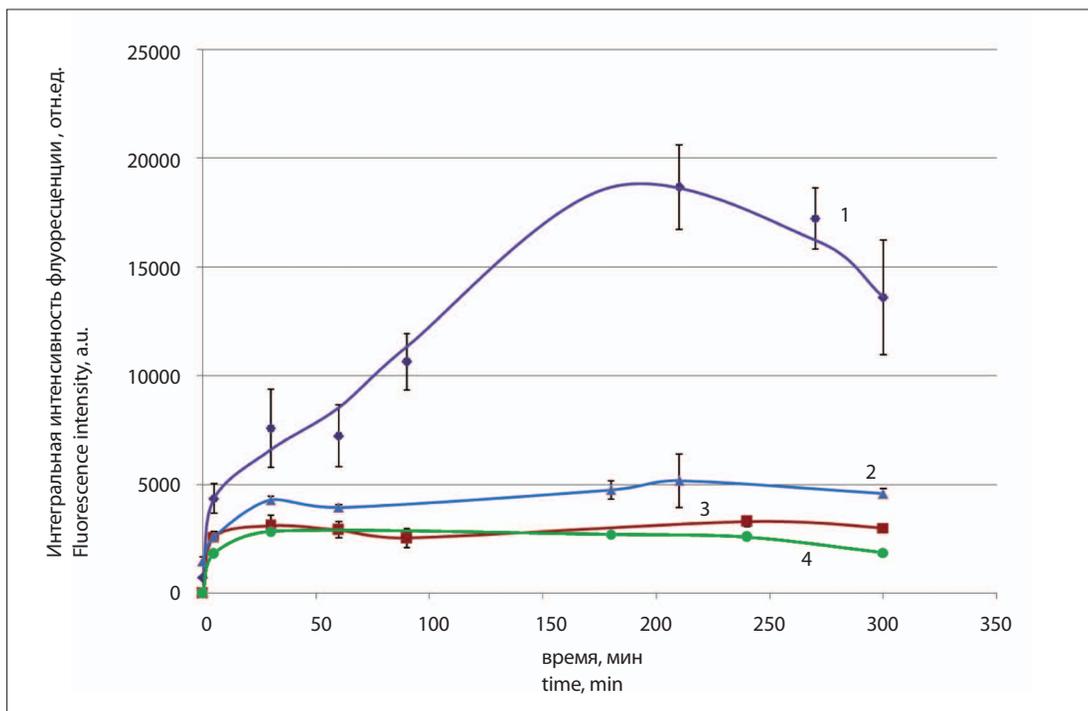


Рис. 13. Интегральная интенсивность флуоресценции раневой поверхности и кожи у мышей, инфицированных *P. aeruginosa*, в зависимости от времени после внутривенного введения метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида: 1 – инфицированная рана; 2 – неинфицированная рана; 3, 4 – кожа

Fig. 13. Integral intensity of fluorescence of wound surface and skin of mice infected by *P. aeruginosa* at different time intervals after the intravenous administration of 13³-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester: 1 – infected wound; 2 – non-infected wound; 3, 4 – skin

В экспериментах *in vitro* была оценена минимальная бактерицидная концентрация (МБК) по отношению к антибиотикорезистентным клиническим изолятам *S. Aureus 15* и *P. Aeruginosa 21*, которые вызывали раневую инфекцию на модели хирургической раны (табл. 2–3). Исследования проводили при времени инкубация бактерий с КБХ 30 мин, и плотности дозы облучения 20 Дж/см².

Таким образом, МБК КБХ в выбранных условиях составляет 1,6 мкМ по отношению к *S. Aureus 15* и 500 мкМ по отношению к *P. Aeruginosa 21*.

При АФДТ инфицированных гнойных ран с использованием ФС оптимизированного состава облучение, в соответствии с полученными результатами, начинали через 2–3 ч после внутривенного введения дисперсии. Доза облучения составляла 15 Дж/см². Мышам, инфицированным *P. aeruginosa*, вводили ФС в дозе 20 мг/кг, инфицированным *S. aureus* – 10 мг/кг. В результате АФДТ достигнуто сокращение сроков эпителизации у мышей ран, инфицированных *P. aeruginosa*, с 15 до 8 дней (рис. 14), а ран, инфицированных *S. aureus*, с 11 до 7 дней (рис. 15).

Таблица 2

Фотодинамическая инактивация патогенных бактерий *S. aureus 15* при разных концентрациях метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида

Table 2

Photodynamic inactivation of pathogenic bacteria *S. aureus 15* for different concentrations of 13³-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester

Штамм Strain	Концентрация метилового эфира 13 ³ -N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида (мкМ) Concentration of 13 ³ -N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester (µM)										Доза света (Дж/см ²) Light dose (J/cm ²)	
	100	50	25	12,5	6,3	3,1	1,6	0,8	0,4	0,2		
<i>S. aureus 15</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
<i>S. aureus 15</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	20

«-» отсутствие бактерий, «+» наличие бактерий

«-» absence of bacteria, «+» presence of bacteria

Таблица 3

Фотодинамическая инактивация патогенных бактерий *P. aeruginosa 21* при разных концентрациях метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида

Table 3

Photodynamic inactivation of pathogenic bacteria *P. aeruginosa 21* for different concentrations of 13³-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester

Штамм Strain	Концентрация метилового эфира 13 ³ -N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида (мкМ) Concentration of 13 ³ -N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester (µM)										Доза света (Дж/см ²) Light dose (J/cm ²)	
	1000	500	250	125	63	31	16	8	4	2		
<i>P. aeruginosa 21</i>	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
<i>P. aeruginosa 21</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	20

«-» отсутствие бактерий, «+» наличие бактерий

«-» absence of bacteria, «+» presence of bacteria



Рис. 14. Динамика заживления инфицированных *P. aeruginosa* ран:
 а – после ФДТ;
 б – без ФДТ

Fig. 14. Dynamics of regeneration of wounds infected by *P. aeruginosa*:
 а – after PDT;
 б – without PDT

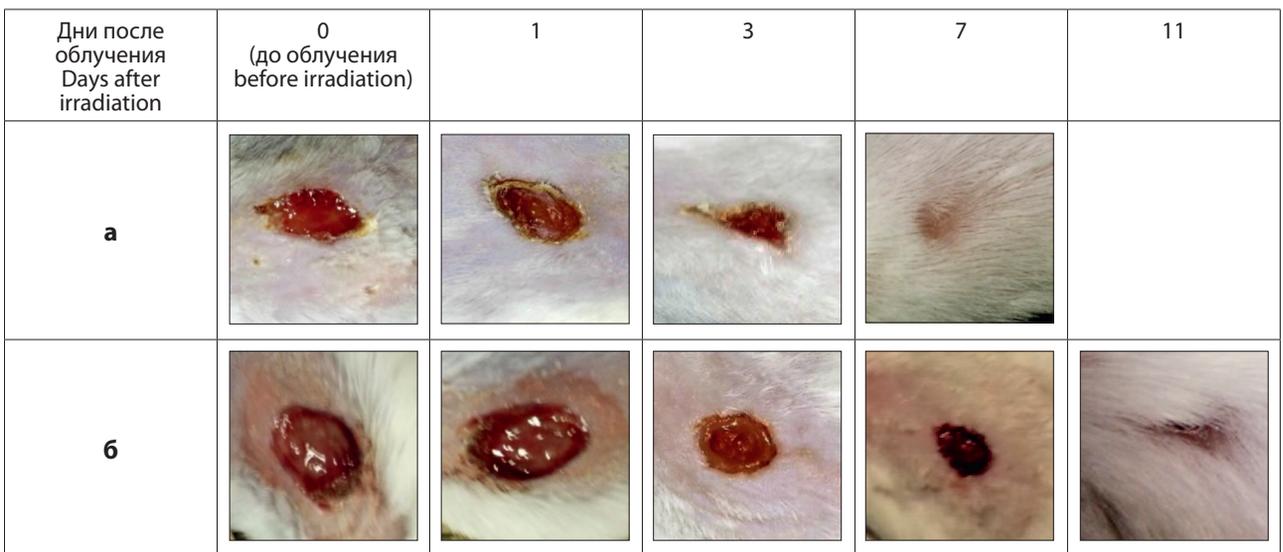


Рис. 15. Динамика заживления инфицированных *S. aureus* ран:
 а – после ФДТ;
 б – без ФДТ

Fig. 15. Dynamics of regeneration of wounds infected by *S. aureus*:
 а – after PDT;
 б – without PDT

Заключение

Проведенные исследования поглощения и спектрально-флуоресцентных свойств ФС на основе циклодекстрированной дисперсии КБХ в зависимости от его состава позволяют рекомендовать для уменьшения агрегации содержание Твин-80, равное 0,1%, а массовое отношение КБХ : циклодекстрин около 1:200.

При изучении фармакокинетики и биораспределения КБХ в органах и тканях мышей установлено, что он быстро выводится из кровотока мышей (более 70% выводится за 2 ч, 95% – за 1 сут, более 99% – за 6 сут). КБХ накапливается и удерживается в значительной концентрации в печени и почках в течение 24 ч (его содержание в этих органах через 24 ч составляет 40% и 45%

от максимальных значений, соответственно); за 6 сут из этих органов выводится более 99%. Это позволяет предположить, что основные пути элиминирования КБХ из организма мышей проходят через почки и печень.

В коже и мышцах через 24 ч после введения концентрация КБХ составляет 22% и 34% от максимальных значений, соответственно, а через 6 сут – около 2%. Обнаружено, что в тканях, в частности, в коже и мышцах, через 24 ч наблюдается частичная агрегация КБХ. Это позволяет предположить, что уменьшение интенсивности флуоресценции КБХ через 24 и более часа связано не только с его элиминацией из организма, но и с агрегацией.

Спектрально-флуоресцентные исследования показали, что КБХ селективно накапливается в инфицированных

ранах, флуоресцентная контрастность лежит в пределах 3–4. Высокие значения концентрации и селективности КБХ в инфицированных ранах достигается через 1,5–3 ч после внутривенного введения. Облучение через 2 ч после введения обеспечило высокую эффективность АФДТ инфицированных гнойных ран.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Государственного контракта № 14. N08.11.0062 по ФЦП Фарма 2020 «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

ЛИТЕРАТУРА

1. Porphyrins as antimicrobial photosensitizing agents, in *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications* / Eds. M.R. Hamblin and G. Jori. – London, 2011.
2. Banfi S., Caruso E., Buccafurni L., et al. Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: an in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria // *Photochem. Photobiol.*, B. – 2006. – Vol. 85. – P. 28.
3. Boyle-Vavra S., Labischinski H., Ebert C.C., et al. A spectrum of changes occurs in peptidoglycan composition of glycopeptide-intermediate clinical *Staphylococcus aureus* isolates // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2001. – Vol. 45. – P. 280-287.
4. Roland K.L., Esther C.R., Spitznagel J.K. Isolation and characterization of a gene, *pmrD*, from *Salmonella typhimurium* that confers resistance to polymyxin when expressed in multiple copies // *Bacteriol.* – 1994. – Vol. 176. – P. 589-597.
5. Harder K.J., Nikaido H., Matsuhashi M. Mutants of *Escherichia coli* that are resistant to certain beta-lactam compounds lack the *ompF* porin // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1981. – Vol. 20. – P. 549-552.
6. Park Y.S., Lee H.B., Chin S., et al. Acquisition of extensive drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients: risk factors and resistance mechanisms to carbapenems // *Hosp. Infect.* – 2011. – Vol. 79. – P. 54.
7. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy // *Antimicrob Chemother.* – 1998. – Vol. 42. – P. 13-28.
8. Friedrich C.L., Moyles D., Beveridge T.J., Hancock R.E. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on Gram-positive bacteria // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2000. – Vol. 44. – P. 2086-2092.
9. Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barrier and active efflux // *Science.* – 1994. – Vol. 264. – P. 362-368.
10. Leive L. The barrier function of the Gram-negative envelope // *Ann NY Acad Sci.* – 1974. – Vol. 235. – P. 109-129.
11. Bertoloni G., Rossi F., Valduga G., et al. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells // *Microbios.* – 1992. – Vol. 71. – P. 33-46.
12. Nakonieczna J., Michta E., Rybicka M., et al. Superoxide dismutase is upregulated in *Staphylococcus aureus* following protoporphyrin-mediated photodynamic inactivation and does not directly influence the response to photodynamic treatment // *BMC Microbiol.* – 2010. – Vol. 10. – P. 323.

REFERENCES

1. *Porphyrins as antimicrobial photosensitizing agents, in Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications*, by eds M.R. Hamblin and G. Jori. London, 2011.
2. Banfi S., Caruso E., Buccafurni L., Battini V., Zazzaron S., Orlandi V. Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: an in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria, *Photochem. Photobiol.*, B., 2006, Vol. 85, p. 28.
3. Boyle-Vavra S., Labischinski H., Ebert C.C., Ehler K., Daum R.S. A spectrum of changes occurs in peptidoglycan composition of glycopeptide-intermediate clinical *Staphylococcus aureus* isolates, *Antimicrob Agents Chemother.*, 2001, Vol. 45, pp. 280-287.
4. Roland K.L., Esther C.R., Spitznagel J.K. Isolation and characterization of a gene, *pmrD*, from *Salmonella typhimurium* that confers resistance to polymyxin when expressed in multiple copies, *Bacteriol.*, 1994, Vol. 176, pp. 589-597.
5. Harder K.J., Nikaido H., Matsuhashi M. Mutants of *Escherichia coli* that are resistant to certain beta-lactam compounds lack the *ompF* porin, *Antimicrob Agents Chemother.*, 1981, Vol. 20, pp. 549-552.
6. Park Y.S., Lee H.B., Chin S., Han S.H., Hong S.G., Hong S.K., Kim H.Y., Uh Y., Shin H.B., Choo E.J., Han S.H., Song W., Jeong S.H., Lee K., Kim J.M. Acquisition of extensive drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients: risk factors and resistance mechanisms to carbapenems, *Hosp. Infect.*, 2011, Vol. 79, p. 54.
7. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy // *Antimicrob Chemother.*, 1998, Vol. 42, pp. 13-28.
8. Friedrich C.L., Moyles D., Beveridge T.J., Hancock R.E. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on Gram-positive bacteria, *Antimicrob Agents Chemother.*, 2000, Vol. 44, pp. 2086-2092.
9. Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barrier and active efflux, *Science*, 1994, Vol. 264, pp. 362-368.
10. Leive L. The barrier function of the Gram-negative envelope, *Ann NY Acad Sci.*, 1974, Vol. 235, pp. 109-129.
11. Bertoloni G., Rossi F., Valduga G., Jori G., Ali H., van Lier J.E. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells, *Microbios.*, 1992, Vol. 71, pp. 33-46.
12. Nakonieczna J., Michta E., Rybicka M., Grinholc M., Gwizdek-Wiśniewska A., Bielawski K.P. Superoxide dismutase is upregulated in *Staphylococcus aureus* following protoporphyrin-mediated photodynamic inactivation and does not directly influence the response to photodynamic treatment, *BMC Microbiol.*, 2010, Vol. 10, p. 323.

13. Tavares A., Carvalho C.M.B., Faustino M.A., et al. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment // *Mar. Drugs*. – 2010. – Vol. 8. – P. 91.
14. Caminos D.A., Spesia M.B., Pons P., Durantini E.N. Mechanisms of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by an amphiphilic tricationic porphyrin and 5,10,15,20-tetra(4-N,N,N trimethylammoniumphenyl) porphyrin // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2008. – Vol. 7. – P. 1071.
15. Hamblin M.R., Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2004. – Vol. 3. – P. 436.
16. Wardlaw J.L., Sullivan T.J., Lux C.N., Austin F.W. Photodynamic therapy against common bacteria causing wound and skin infections // *Vet.* – 2012. – Vol. 192. – P. 374.
17. Malik Z., Ladan H., Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions // *Photochem Photobiol B.* – 1992. – Vol. 14. – P. 262-266.
18. Dai T., Huang Y.Y., Hamblin M.R. Photodynamic therapy for localized infections — state of the art // *Photodiagn Photodyn Ther.* – 2009. – Vol. 6. – P. 170-188.
19. Vera D.M., Haynes M.H., Ball A.R., et al. Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes // *Photochem Photobiol.* – 2012. – Vol. 88. – P. 499-511.
20. Maisch T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria // *Photochem Photobiol Sci.* – 2015. – Vol. 14. – P. 1518-1526.
21. Giuliani F., Martinelli M., Cocchi A., et al. In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2010. – Vol. 54. – P. 637-642.
22. de Melo W.C., Avci P., de Oliveira M.N., et al. Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection // *Expert Rev Anti Infect Ther.* – 2013. – Vol. 11. – P. 669-693.
23. Ferreyra D.D., Reynoso E., Cordero P., et al. Synthesis and properties of 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-N,N-dimethylaminopropoxy)phenyl] chlorin as potential broad-spectrum antimicrobial photosensitizers // *Photochem Photobiol B.* – 2016. – Vol. 158. – P. 243-251.
24. Gad F., Zahra T., Francis K.P., et al. Targeted photodynamic therapy of established soft-tissue infections in mice // *Photochem Photobiol Sci.* – 2004. – Vol. 3. – P. 451-458.
25. Брусков С.С., Тиганова И.Г., Романова Ю.М. и др. Способ фотодинамической терапии локальных очагов инфекции // Патент России № 2610566. – 2017.
26. Ermolaeva S.A., Varfolomeev A.F., Chernukha M.Yu., et al. Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and the animal model of infected wounds. // *J. Med. Microbiol.* – 2011. – Vol. 60 (Pt.1) – P.75-83.
27. Tayana M.T., Gustavo B., Bruno H.V. Aggregation of aluminum phthalocyanine hydroxide in water/ethanol mixtures // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2014. – Vol. 25(5). – P. 890-897.
28. Ластовой А.П., Авраменко Г.В. Спектрально-люминесцентные свойства замещенных тетраазхлоринов, солюбилизированных в растворах неионогенных поверхностно-активных веществ // *Макрогетероциклы.* – 2013. – Т. 2, № 2. – С. 137-143.
29. Dhami S., De Mello A. J., Rumbles G., et al. Phthalocyanine fluorescence at high concentration: dimers or reabsorption effect? // *Photochemistry and Photobiology.* – 1995. – Vol. 61(4). – P. 341-346.
13. Tavares A., Carvalho C.M.B., Faustino M.A., Neves M.G., Tomé J.P., Tomé A.C., Cavaleiro J.A., Cunha A., Gomes N.C., Alves E., Almeida A. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment, *Mar. Drugs*, 2010, Vol. 8, p. 91.
14. Caminos D.A., Spesia M.B., Pons P., Durantini E.N. Mechanisms of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by an amphiphilic tricationic porphyrin and 5,10,15,20-tetra(4-N,N,N trimethylammoniumphenyl) porphyrin, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2008, Vol. 7, pp. 1071.
15. Hamblin M.R., Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2004, Vol. 3, p. 436.
16. Wardlaw J.L., Sullivan T.J., Lux C.N., Austin F.W. Photodynamic therapy against common bacteria causing wound and skin infections, *Vet.*, 2012, Vol. 192, p. 374.
17. Malik Z., Ladan H., Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions, *Photochem Photobiol B*, 1992, Vol. 14, pp. 262-266.
18. Dai T., Huang Y.Y., Hamblin M.R. Photodynamic therapy for localized infections — state of the art, *Photodiagn Photodyn Ther*, 2009, Vol. 6, pp. 170-188.
19. Vera D.M., Haynes M.H., Ball A.R., Dai T., Astrakas C., Kelso M.J., Hamblin M.R., Tegos G.P. Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes, *Photochem Photobiol*, 2012, Vol. 88, pp. 499-511.
20. Maisch T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria, *Photochem Photobiol Sci*, 2015, Vol. 14, pp. 1518-1526.
21. Giuliani F., Martinelli M., Cocchi A., Arbia D., Fantetti L., Roncucci G. In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy, *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, Vol. 54, pp. 637-642.
22. de Melo W.C., Avci P., de Oliveira M.N., Gupta A., Vecchio D., Sadasivam M., Chandran R., Huang Y.Y., Yin R., Perussi L.R., Tegos G.P., Perussi J.R., Dai T., Hamblin M.R. Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection, *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2013, Vol. 11, pp. 669-693.
23. Ferreyra D.D., Reynoso E., Cordero P., Spesia M., Alvarez M.G., Milanesio M.E., Durantini E. Synthesis and properties of 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-N,N-dimethylaminopropoxy)phenyl] chlorin as potential broad-spectrum antimicrobial photosensitizers, *Photochem Photobiol B*, 2016, Vol. 158, pp. 243-251.
24. Gad F., Zahra T., Francis K.P., Hasan T., Hamblin M.R. Targeted photodynamic therapy of established soft-tissue infections in mice, *Photochem Photobiol Sci.*, 2004, Vol. 3, pp. 451-458.
25. Brusov S.S., Tiganova I.G., Romanova Yu.M., Grin M.A., Meerovich G.A. The process of photodynamic therapy for local foci of infection, Patent RF No. 2610566, 2017.
26. Ermolaeva S.A., Varfolomeev A.F., Chernukha M.Yu., et al. Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and the animal model of infected wounds, *J. Med. Microbiol.*, 2011, Vol. 60 (Pt.1), pp.75-83.
27. Tayana M.T., Gustavo B., Bruno H.V. Aggregation of aluminum phthalocyanine hydroxide in water/ethanol mixtures, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2014, Vol. 25(5), pp. 890-897.
28. Lastovoi A.P., Avramenko G.V. Spectral-Luminescent Properties of the Substituted Tetraazachlorins Solubilized in Solutions of Nonionic Surfactants, *Makrogeterotsikly*, 2013, Vol. 2, No. 2, pp. 137-143.
29. Dhami S., De Mello A.J., Rumbles G., Bishop S.M., Philips D., Beeby A. Phthalocyanine fluorescence at high concentration: dimers or reabsorption effect? *Photochemistry and Photobiology*, 1995, Vol. 61(4), pp. 341-346.

ЗНАЧЕНИЕ РЕГИСТРАЦИИ ВЫЦВЕТЕНИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ДЛЯ ОЦЕНКИ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТОВ НА ФОТОИНДУЦИРОВАННЫЙ ГЕМОЛИЗ

Л.В. Галебская¹, И.Л. Соловцова¹, Е.Б. Мирошникова¹, И.А. Михайлова^{1,2}, М.Е. Сушкин¹, А. В. Разумный¹, А.В. Бабина¹, В.А. Фомина¹

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

²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Исследовано влияние трех лекарственных препаратов на фотоиндуцированный гемолиз (облучение светодиодом 653 нм) взвеси эритроцитов человека в присутствии фотосенсибилизатора радахлорин, а также на квантовый выход фотовыцветания радахлорина. Оба процесса опосредованы генерацией активных форм кислорода, поэтому могут быть объектами регуляции антиоксидантами и прооксидантами. Используемый в качестве антиоксиданта и мембранопротектора пиридиновый препарат мексидол (действующее начало – 3-окси-6-метил-2-этилпиридина сукцинат) в концентрации 152 мкМ и аминазин (действующее начало – хлорпромазин) в концентрации 70 мкМ многократно ускоряли фотоиндуцированный гемолиз. При этом только мексидол в несколько раз увеличивал квантовый выход выцветания радахлорина. Полученные данные свидетельствуют о прямом прооксидантном действии мексидола, но не аминазина, который ускорял фотоиндуцированный гемолиз иным механизмом. Пиридиновый препарат никотиновая кислота, испытанный в эквимоларной мексидолу концентрации не оказывал влияния ни на скорость фотоиндуцированного гемолиза, ни на квантовый выход выцветания радахлорина. Проведенное исследование демонстрирует возможность использования регистрации фотовыцветания фотосенсибилизатора для выявления прооксидантов прямого действия.

Ключевые слова: фотоиндуцированный гемолиз, фотовыцветание, квантовый выход, прооксидант.

Для цитирования: Галебская Л.В., Соловцова И.Л., Мирошникова Е.Б., Михайлова И.А., Сушкин М.Е., Разумный А. В., Бабина А.В., Фомина В.А. Значение регистрации выцветания фотосенсибилизатора для оценки механизма действия препаратов на фотоиндуцированный гемолиз // Biomedical Photonics. – 2017. – Т. 6, № 3. – С. 33–38.

Контакты: Соловцова И.Л., e-mail: irina_solovtsova@mail.ru

THE IMPORTANCE OF A PHOTOSENSITIZER BLEACHING REGISTRATION FOR THE EVALUATION OF MECHANISM OF PREPARATION ACTION ON THE PHOTO-INDUCED HEMOLYSIS

Galebskaya L.V.¹, Solovtsova I.L.^{1,2}, Miroshnikova E.B.¹, Mikhailova I.A.¹, Sushkin M.E.¹, Razumny A.V.¹, Babina A.V.¹, Fomina V.A.¹

¹Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, L'va Tolstogo str. 6-8 Saint Petersburg, Russia

²Department of Medical Physics Peter the Great St.Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia

Abstract

The influence of three pharmaceutical preparations on photo-induced lysis (irradiation with light-emitting diode of 653 nm) of human erythrocytes in the presence of photosensitizer radachlorin and also on the quantum yield of radachlorin photobleaching was studied. Both processes are mediated by singlet oxygen generation and therefore can become a target for antioxidant or prooxidant regulation. The pyridine preparation mexidol (action principle – 3-hydroxy-6-methyl-2-ethylpyridine succinate) in concentration of 152 μM used as an antioxidant and a membrane protector and aminazine (action principle – chlorpromazine) in concentration of 70 μM many times accelerated manifold the photo-induced hemolysis. However only mexidol increased the quantum yield of radachlorin photobleaching in many times. The obtained data showed the direct prooxidant action of mexidol, but not aminazine that accelerated a photo-induced hemolysis due to other mechanism. A pyridine preparation nicotinic acid tested in equimolar to mexidol concentration, failed to influence both the velocity of the photo-induced hemolysis and the quantum yield of radachlorin photobleaching. Our study shows the possible use of a photobleaching tests for detection of the direct prooxidant action.

Key words: photo-induced hemolysis, quantum yield, photobleaching, prooxidant.

For citations: Galebskaya L.V., Solovtsova I.L., Miroshnikova E.B., Mikhailova I.A., Sushkin M.E., Razumny A.V., Babina A.V., Fomina V.A. The importance of a photosensitizer bleaching registration for the evaluation of mechanism of preparation action on the photo-induced hemolysis, *Biomedical Photonics*, 2017, T. 6, No. 2, pp. 33–38 (in Russian).

Contacts: Solovtsova I.L., e-mail: irina_solovtsova@mail.ru

Введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ) находит все большее применение в онкологии [1–2], лечении неопухолевых заболеваний [3], а также для противовирусной обработки препаратов крови [4]. Фотоиндуцированное повреждение клеток или вирусов требует подбора эффективных фотосенсибилизаторов (ФС), селективных в отношении объекта воздействия и обладающих достаточным квантовым выходом синглетного кислорода при облучении. Препараты хлорина e_6 отвечают этим требованиям [5] и хорошо зарекомендовали себя в клинической практике [6–7].

Хлориновые ФС имеют максимумы поглощения в длинноволновой области спектра видимого света, их действие опосредуется генерацией синглетного кислорода, выход которого зависит от микроокружения препарата [5, 8]. Несмотря на вовлеченность синглетного кислорода в механизм фотодинамического эффекта, широко используемый тушитель синглетного кислорода азид натрия не влияет на самовыцветание моноаспартил-L-хлорина e_6 , а препарат метранидазол в 2–4 раза увеличивает квантовый выход выцветания этого ФС [9]. Нами было обнаружено ускорение фотоиндуцированного лизиса эритроцитов человека под действием мексидола, который позиционируется в качестве антиоксиданта [10].

Целью настоящей работы явилось сравнение действия трех лекарственных препаратов на фотоиндуцированный гемолиз и квантовый выход выцветания ФС радахлорин (ООО «РАДА-ФАРМА», Россия), основным компонентом которого является хлорин e_6 . Лекарственные препараты были выбраны исходя из того, что мексидол, как нами было установлено ранее, по неизвестному механизму ускорял фотоиндуцированный гемолиз, никотиновая кислота, подобно мексидолу, относится к пиридинам, а аминазин, помимо своих специфических эффектов, является ингибитором фосфолипазы A2 [11], а значит блокирует антиоксидантную систему эритроцита.

Материал и методы

Лекарственные препараты

Мексидол (ООО «Фармасофт»; действующее начало – 3-окси-6-метил-2-этилпиридина сукцинат; раствор для внутривенного и внутримышечного введения, 50 мг/мл).

Никотиновая кислота (ОАО «Дальхимфарм»; раствор для инъекций, 10 мг/мл).

Аминазин (ОАО «Новосибхимфарм»; действующее начало – 2-хлор-10-[3-(диметиламинопропил)] фенотиазина гидрохлорид; раствор для внутривенного и внутримышечного введения, 25 мг/мл).

Радахлорин (ООО «РАДА-ФАРМА», Россия, регистрационное удостоверение №ЛС-001868 от 16.12.2011, 0,35%-й раствор для внутривенного введения; основной компонент – хлорин e_6 или (7S,8S)-13-винил-5-(карбоксиметил)-7-(2-карбоксиэтил)-2,8,12,17-тетраметил-18-этил-7Н,8Н-порфирин-3-карбоновая кислота).

Определение квантового выхода выцветания радахлорина

Квантовый выход выцветания радахлорина определяли по методике, описанной в работе J. Ana Paula и соавт. в 2004 г. [12]. Для регистрации выцветания ФС инкубационную смесь объемом 0,8 мл, содержащую 0,02 мл раствора радахлорина, 0,68 мл вероналово-мединалового буфера (рН 7,4) и 0,1 мл физиологического раствора, помещали в экранированную кювету и подвергали облучению (красный светодиод 653 нм, выходная мощность – 9 мВт, плотность энергии лазерного облучения – от 0,14 до 3,41 Дж/см²). Конечная концентрация радахлорина составляла 6,25 мкг/мл (7,52 мкМ). После облучения снимали спектр радахлорина (600–700 нм) с помощью спектрофотометра СФ-2000 (ЛОМО, СПб, Россия) (рис. 1). Измеряли высоту «красного» пика ФС (A_i). Рассчитывали отношение A_0/A_i , где A_0 – величина «красного пика» радахлорина без облучения. Строили график зависимости величины $\ln(A_0/A_i)$ от дозы облучения и определяли тангенс угла наклона полученной кривой (рис. 2).

Квантовый выход фотовыцветания (ϕ_{Ph}) радахлорина определяли как отношение между числом молей выцветшего за определенное время радахлорина (n_{PX}^t) и числом фотонов, поглощенных 1 молем радахлорина за этот же промежуток времени (n_{Ph}^t) по формуле:

$$\phi_{Ph} = \frac{n_{PX}^t}{n_{Ph}^t}$$

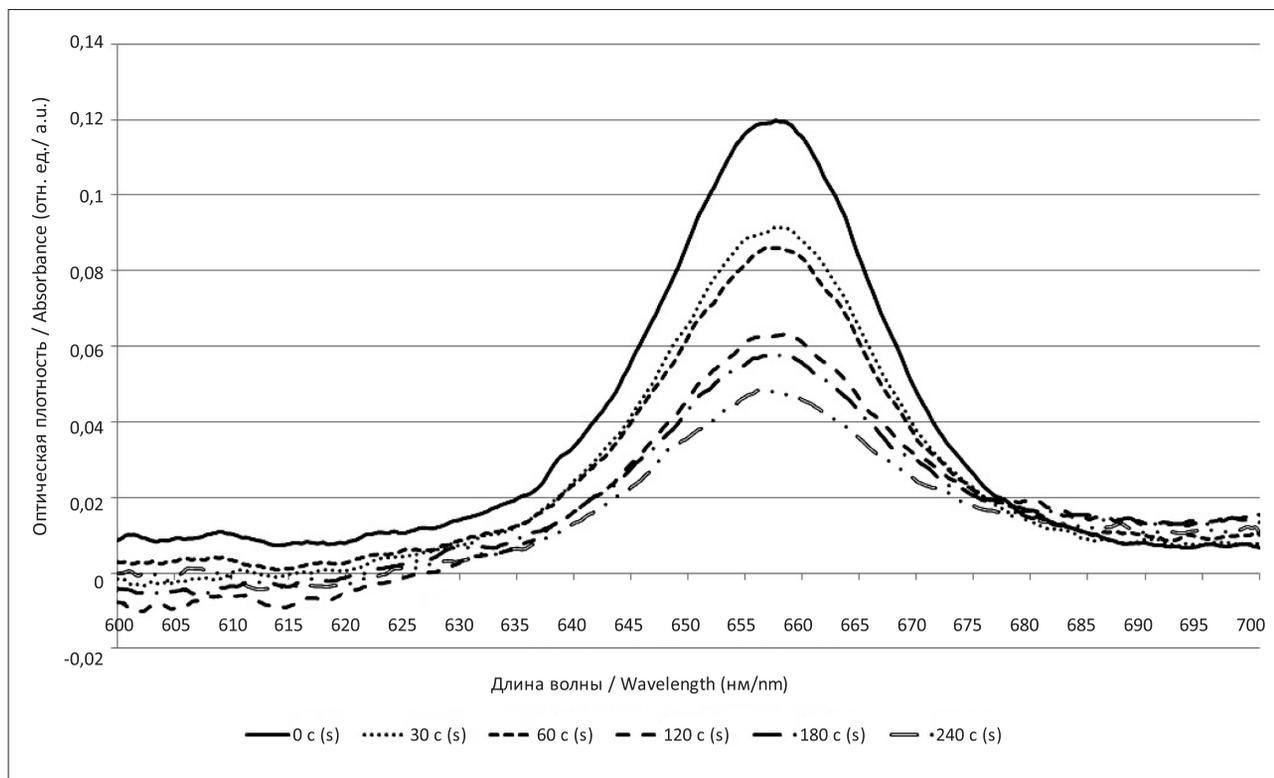


Рис. 1. Спектры поглощения радахлорина (6,25 мкг/мл) в мединалово-вероналовом буфере (рН 7,4) без облучения и через различные интервалы времени (от 30 до 240 с) после облучения (653 нм, выходная мощность – 9 мВт)
Fig. 1. Spectra of radachlorin (6.25 µg/ml) absorption in Veronal-Medinalum buffer (pH 7.4) with no irradiation and after different time intervals (from 30 to 240 sec) after irradiation (635 nm, output power – 9 mW)

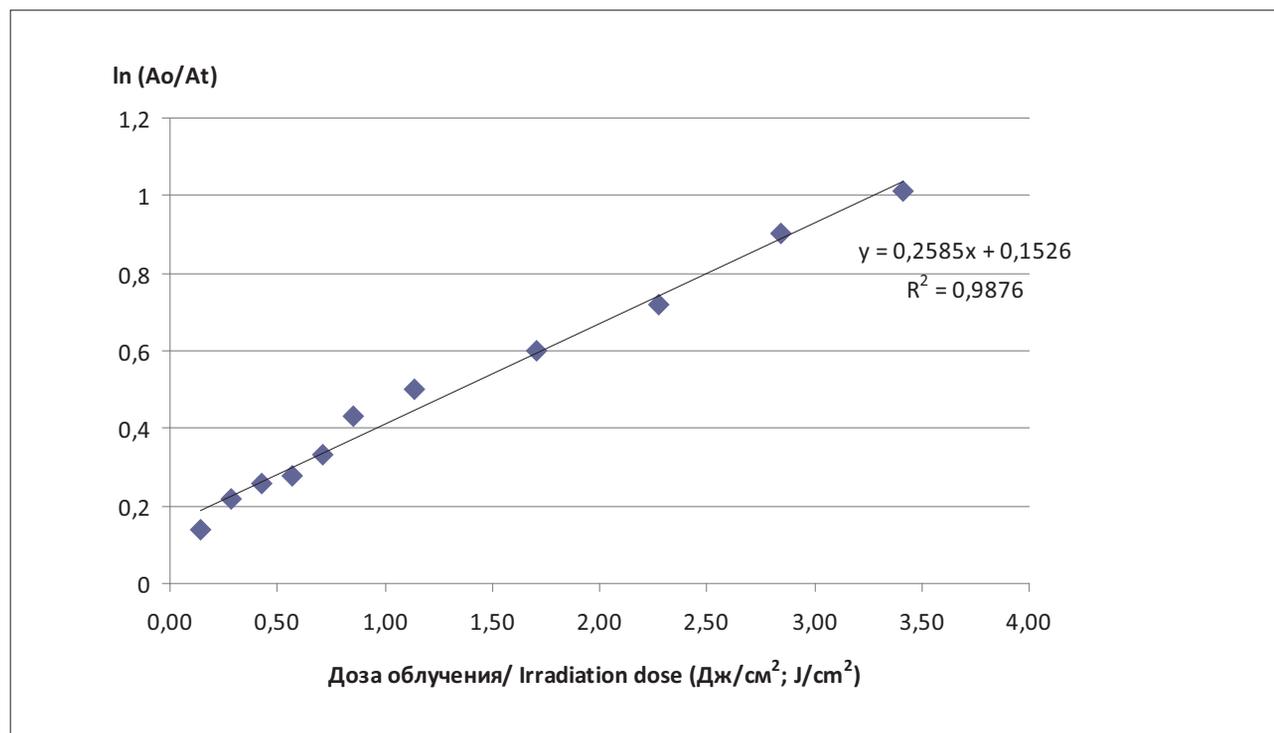


Рис. 2. График зависимости степени выцветания радахлорина (6,25 мкг/мл) по величине $\ln(A_0/A_t)$ от дозы облучения светодиодом (653 нм, выходная мощность – 9 мВт). A_0 и A_t – оптическая плотность раствора радахлорина при 658 нм до и после облучения, соответственно
Fig. 2. Diagram of dependence of radachlorin's bleaching rate (6.25 µg/ml) by $\ln(A_0/A_t)$ on light dose from light-emitted diode (635 nm, output power – 9 mW). A_0 and A_t – optical density of radachlorin solution for 658 nm prior to and after irradiation, respectively

Количество молей выцветшего радахлорина (n_{PX}^t) рассчитывали по формуле:

$$n_{PX}^t = \left[\frac{A_0 - A_t}{\varepsilon \cdot L} \right] V_s,$$

где ($A_0 - A_t$) – разность между оптическими плотностями радахлорина при 658 нм до и после облучения (см. рис. 1); ε – молярный коэффициент экстинкции радахлорина при 658 нм (в моль⁻¹·л·см⁻¹); L – длина оптического пути (в см); V_s – объем пробы (в л).

Число фотонов, абсорбированных пробой (N_{Ph}^t), может быть вычислено путем деления величины световой энергии, поглощенной пробой за время t (I_{abs}^t), на энергию 1 Э фотонов данной длины волны облучения (653 нм) (3):

$$N_{Ph}^t = \frac{I_{abs}^t}{N_A \cdot h\nu} = \frac{I_{abs}^t \cdot \lambda}{N_A \cdot hc} \quad (3)$$

Где N_A – число Авогадро, ν – частота, λ – длина волны облучения, h – постоянная Планка, c – скорость света в вакууме.

Величину I_{abs}^t определяли по формуле:

$$I_{abs}^t = I_0 \int_0^t [1 - 10^{-A_0} e^{-kt}] dt \quad (4)$$

где I_0 – энергия, поглощаемая в единицу времени (в Дж/с), k – константа скорости выцветания (в с⁻¹), равная тангенсу угла наклона прямой аппроксимации, представленной на рис. 2.

Для упрощения формулы определения ϕ_{Ph} , использовали величину потока фотонов (N_{Ph}^t), определяемую по формуле:

$$N_{Ph}^t = \frac{I_0 \cdot \lambda}{N_A \cdot hc} \quad (5)$$

Квантовый выход фотовыцветания радахлорина определяли по формуле:

$$\phi_{Ph} = \frac{(A_0 - A_t) \cdot V_s}{\varepsilon L N_{Ph}^t \int_0^t [1 - 10^{-A_0} e^{-kt}] dt}$$

Для оценки влияния лекарственных препаратов на квантовый выход выцветания радахлорина в инкубационную смесь вместо 0,1 мл физиологического раствора добавляли 0,1 мл раствора препарата, приготовленного на физиологическом растворе.

Метод регистрации фотоиндуцированного лизиса эритроцитов человека

Эритроциты, полученные из циратной крови здоровых доноров путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10 мин, трижды отмывали физиологическим раствором. Готовили стандартную взвесь клеток в 5 мМ вероналово-мединаловом буфере (рН 7,4), оптическая плотность которой после

разведения ее в 8 раз буферным раствором составляла $0,560 \pm 0,020$ при 750 нм.

Влияние лекарственных препаратов на фотоиндуцированный гемолиз регистрировали с помощью устройства для исследования фотоиндуцированного цитолиза [13]. В экранированной кювете с длиной оптического слоя 5 мм готовили инкубационную смесь, содержащую 0,1 мл стандартной взвеси эритроцитов, 0,58 мл вероналово-мединалового буферного раствора (рН 7,4), 0,1 мл физиологического раствора (контроль) или раствора фармакологического препарата в физиологическом растворе (опыт) и 0,02 мл радахлорина. Конечная концентрация радахлорина в пробе составляла 6,25 мкг/мл (7,52 мкМ). Инкубационную смесь, общим объемом 0,8 мл, облучали источником монохроматического света (красный светодиод 653 нм, выходная мощность – 9 мВт, доза облучения – 1,15–2,0 Дж/см²). После завершения облучения регистрировали снижение оптической плотности раствора при 750 нм. По регистрируемой гемолитической кривой, имеющей плавный S-образный характер, с помощью программного обеспечения СФ-2000 определяли T_{50} – время от завершения облучения до лизиса 50% эритроцитов инкубационной смеси [5]. Величина T_{50} находится в обратной зависимости от скорости гемолитического процесса.

Статистическую обработку данных осуществляли методом непараметрического дисперсионного анализа с помощью программы SAS Enterprise Guide 6.1. Достоверность различий оценивали по парному t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Результаты влияния исследованных препаратов на фотоиндуцированный лизис эритроцитов человека представлены в табл. 1. Мексидол в 4–5 раз ускорял радахлорин-зависимый фотогемолиз. В контролях (в темноте или без добавления фотосенсибилизатора) сам препарат не оказывал гемолитического действия. Еще более сильным (в 8–11 раз) было ускорение фотоиндуцированного гемолиза под действием амиनाзина. Никотиновая кислота не влияла на фотоиндуцированный лизис эритроцитов человека.

Для установления механизма действия препаратов нами были определены величины квантового выхода выцветания радахлорина в отсутствие и в присутствии лекарственных препаратов. Полученная величина квантового выхода выцветания радахлорина в водной среде была близка данным литературы [14].

Результаты влияния исследованных препаратов на квантовый выход фотовыцветания представлены в табл. 2.

Таблица 1

Влияние фармакологических препаратов на величину T_{50} фотоиндуцированного лизиса эритроцитов человека (фотосенсибилизатор радахлорин (6,25 мкг/мл), источник монохроматического света – красный светодиод (653 нм), n = 6-8)

Table 1

Influence of pharmaceutical preparations on the value of T_{50} of human erythrocytes photo-induced lysis (photosensitizer radachlorin (6.25 µg/ml), the source of monochromatic light – red light-emitting diode (653 nm), n = 6-8)

Препарат Preparation	Концентрация активного компонента Concentration of active component	T_{50} (в % к контролю) $M \pm m$ T_{50} (% of control one) $M \pm m$	Достоверность Significance
Мексидол Mexidol	3,9 мкг/мл (152 мкМ) 3.9 µg/ml (152 µm)	22±14	p<0,0001
Никотиновая кислота Nicotinic acid	10,5 мкг/мл (152 мкМ) 10.5 µg/ml (152 µm)	100±18	Недостоверно Not evident
Аминазин Aminazine	25 мкг/мл (70 мкМ) 25 µg/ml (70 µm)	11±5	p<0,0001

Таблица 2

Влияние лекарственных препаратов на квантовый выход фотovyцветания (фотосенсибилизатор радахлорин (6,25 мкг/мл), источник монохроматического света – красный светодиод (653 нм), n = 6)

Table 2

Influence of pharmaceutical preparations on the quantum yield of photo-bleaching ((photosensitizer radachlorin (6.25 µg/ml), the source of monochromatic light – red light-emitting diode (653 nm), n = 6)

Препарат Preparation	Концентрация активного компонента Concentration of active component	Квантовый выход $M \pm m$ Quantum yield $M \pm m$	Достоверность Significance
Контроль Control	-	0,000414±0,000037	-
Мексидол Mexidol	3,9 мкг/мл (152 мкМ) 3.9 µg/ml (152 µm)	0,001321±0,000131	p<0,0001
Никотиновая кислота Nicotinic acid	10,5 мкг/мл (152 мкМ) 10.5 µg/ml (152 µm)	0,000374±0,000027	Недостоверно Not evident
Аминазин Aminazine	25 мкг/мл (70 мкМ) 25 µg/ml (70 µm)	0,000427±0,000022	Недостоверно Not evident

По данным табл. 2 видно, что из трех исследованных препаратов только Мексидол оказывал влияние на выцветание радахлорина. Препарат значительно (в 3–4 раза) увеличивал квантовый выход выцветания фотосенсибилизатора, который, как это было доказано экспериментально [15], отражает квантовый выход синглетного кислорода. Механизм изменения свойств радахлорина в присутствии мексидола может быть связан с образованием комплекса между фотосенсибилизатором и пиридиновой частью мексидола (3-окси-6-метил-2-этилпиридин). В работе Н. Weitman [16] описано увеличение генерации синглетного кислорода под действием незамещенного пиридина, правда, в отношении Mg-тетрабензопорфирина,

который образовывал комплекс с одной или двумя молекулами пиридина. Отсутствие металла в структуре хлорина e_6 делает менее вероятным образование такого комплекса.

Заключение

Таким образом, даже без установления механизма действия препарата можно утверждать, что мексидол ускоряет фотоиндуцированный лизис эритроцитов путем прямого прооксидантного действия. Обнаруженный факт свидетельствует о необходимости соблюдать осторожность в назначении мексидола пациентам, подвергающимся фотодинамическому воздействию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dolmans D.E., Fukumura D., Jain R.K. Photodynamic therapy for cancer // *Nature Reviews Cancer*. – 2003. – Vol. 3(5). – P. 380-387.
2. Филоненко Е.В. История развития флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии и их возможности в онкологии // *Российский химический журнал*. – 2013. – Т. LVII, № 2, вып. 1. – С. 5-9.
3. Reinhard A., Sandborn W.J., Melhem H., et al. Photodynamic therapy as a new treatment modality for inflammatory and infectious conditions // *Expert Review of Clinical Immunology*. – 2015. – Vol. 11(5). – P. 637-657.
4. Wagner S.J., Skripchenko A., Thompson-Montgomery D., et al. Use of a red cell band 3-ligand/antioxidant to improve red cell storage properties following virucidal phototreatment with chalcogenoxanthylum photosensitizers // *Photochem. Photobiol.* – 2006. – Vol. 82(6). – P. 1595-1600.
5. Пархоц М.В., Галиевский В.А., Сташевский А.С. и др. Динамика и эффективность фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода хлорином е6: влияние рН раствора и поливинилпирролидона // *Оптика и спектроскопия*. – 2009. – Т. 107, № 6. – С. 1026-1032.
6. Филоненко Е.В., Блисева А.В. Флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия с препаратом радахлорин при базально-клеточном раке кожи. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2012. – 10 с.
7. Торчинов А.М., Умаханова М.М., Дуванский Р.А., Садуллаева Э.Т. Фотодинамическая терапия с фотосенсибилизаторами хлороинового ряда в лечении дисплазии шейки матки // *Лазерная медицина*. – 2015. – Т. 19, № 1. – С. 29-32.
8. Shubhajit P., Paul W.S.H., Lai W.C. Optimization in Solvent Selection for Chlorin e6 in Photodynamic Therapy // *Journal of Fluorescence*. – 2013. – Vol. 23(2). – P. 283-291.
9. Spikes J.D., Bommer J.C. Photobleaching of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6): a candidate sensitizer for the photodynamic therapy of tumors // *Photochem. Photobiol.* – 1993. – Vol. 58(3). – P. 346-350.
10. Галебская Л.В., Соловцова И.Л., Мирошникова Е.Б. и др. Парадоксальный эффект антиоксиданта в системе фотоиндуцированного гемолиза // *Вестник СПбГУ. Медицина*. – 2016. – Т. 11, № 3. – С. 95-102.
11. Lindahl M., Tagesson C. Selective inhibition of group II phospholipase A2 by quercetin // *Inflammation*. – 1993. – Vol. 17(5). – P. 573-582.
12. Maestrin A.P., Ribeiro A.O., Tedesco A.C., et al. A novel chlorin derivative of Meso-tris(pentafluorophenyl)-4-pyridylporphyrin: synthesis, photophysics and photochemical properties // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2004. – Vol. 15(6). – P. 923-930.
13. Мажуль В.М., Слепцов Н.Д., Конев С.В. и др. Устройство для исследования фотоиндуцированного цитолиза // *Пат. России на полезную модель 114157*, 2012.
14. Bonnett R., Martinez G. Photobleaching of sensitizers of used in photodynamic therapy // *Tetrahedron*. – 2001. – Vol. 57. – P. 9513-9547.
15. Bonacin J.A., Engelmann F. M., Severino D., et al. Singlet oxygen quantum yields ($\Phi\Delta$) in water using beetroot extract and an array of LEDs // *J. Brazil. Chem. Soc.* – 2009. – Vol. 20(1). – P. 31-36.
16. Weitman H., Shatz S., Ehrenberg B. Complexation of Mg-tetrabenzoporphyrin with pyridine enhances singlet oxygen generation and affects its partitioning into apolar microenvironments // *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*. – 2009. – Vol. 203(1). – P. 7-12.

REFERENCES

1. Dolmans D.E., Fukumura D., Jain R.K. Photodynamic therapy for cancer, *Nature Reviews Cancer*, 2003, Vol. 3(5), pp. 380-387.
2. Filonenko E.V. The main steps of development of fluorescent diagnosis and photodynamic therapy and its possibilities in oncology, *Rossiiskii khimicheskii zhurnal*, 2013, Vol. LVII, No. 2, Is. 1, pp. 5-9.
3. Reinhard A., Sandborn W.J., Melhem H., Bolotine L., Chamailard M., Peyrin-Biroulet L. Photodynamic therapy as a new treatment modality for inflammatory and infectious conditions, *Expert Review of Clinical Immunology*, 2015, Vol. 11(5), pp. 637-657.
4. Wagner S.J., Skripchenko A., Thompson-Montgomery D., Awatefe H., Donnelly D.J., Detty M.R. Use of a red cell band 3-ligand/antioxidant to improve red cell storage properties following virucidal phototreatment with chalcogenoxanthylum photosensitizers, *Photochem. Photobiol.*, 2006, Vol. 82(6), pp. 1595-1600.
5. Parkhots M.V., Galievskii V.A., Stashevskii A.S., Trukhacheva T.V., Dzhagarov B.M. Dynamics and efficacy of photosensitized production of singlet oxygen by chlorine e6: influence of solution pH and polyvinyl pyrrolidone, *Optika i spektroskopiya*, 2009, Vol. 107, No. 6, pp. 1026-1032.
6. Filonenko E.V., Bliseeva A.V. *Flyuoresstentnaya diagnostika i fotodinamicheskaya terapiya s preparatom radakhlorin pri bazal'no-kletochnom rake kozhi* [Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy with agent radachlorine for basal cell skin cancer]. Moscow, MNIIOI im. P.A.Gertsena Publ., 2012. 10 p.
7. Torchinov A.M., Umakhanova M.M., Duvanskii R.A., Sadullaeva E.T. Photodynamic therapy with photosensitizers of chlorine raw for treating uterine cervix dysplasia, *Lazernaya meditsina*, 2015, Vol. 19, No. 1, pp. 29-32.
8. Shubhajit P., Paul W.S.H., Lai W.C. Optimization in Solvent Selection for Chlorin e6 in Photodynamic Therapy, *Journal of Fluorescence*, 2013, Vol. 23(2), pp. 283-291.
9. Spikes J.D., Bommer J.C. Photobleaching of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6): a candidate sensitizer for the photodynamic therapy of tumors, *Photochem. Photobiol.*, 1993, Vol. 58(3), pp. 346-350.
10. Galebskaya L.V., Solovtsova I.L., Miroshnikova E.B., Sushkin M.A., Razumnyi A.V. Paradoxical effects of antioxidant action in the photohaemolysis system, *Bestnik SPbGU. Meditsina*, 2016, Vol. 11, No. 3, pp. 95-102.
11. Lindahl M., Tagesson C. Selective inhibition of group II phospholipase A2 by quercetin, *Inflammation*, 1993, Vol. 17(5), pp. 573-582.
12. Maestrin A.P., Ribeiro A.O., Tedesco A.C., Neri C.R., Vinhaido F.S., Serra O.A., Martin P.R., Yamamoto Y., Silva A.M., Tom A.C., Neves M.G., Cavaleiro J.A. A novel chlorin derivative of Meso-tris(pentafluorophenyl)-4-pyridylporphyrin: synthesis, photophysics and photochemical properties, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2004, Vol. 15(6), pp. 923-930.
13. Mazhul' V.M., Sleptsov N.D., Konev S.V., Mokhort V.A., Strotskii A.V., Grigorovich N.A. Device for the photo-induced cytotoxicity registration. Pat. RF na poleznyuyu model' No. 114157, 2012.
14. Bonnett R., Martinez G. Photobleaching of sensitizers of used in photodynamic therapy, *Tetrahedron*, 2001, Vol. 57, pp. 9513-9547.
15. Bonacin J.A., Engelmann F. M., Severino D., Toma H.E., Baptista M.S. Singlet oxygen quantum yields ($\Phi\Delta$) in water using beetroot extract and an array of LEDs, *J. Brazil. Chem. Soc.*, 2009, Vol. 20(1), pp. 31-36.
16. Weitman H., Shatz S., Ehrenberg B. Complexation of Mg-tetrabenzoporphyrin with pyridine enhances singlet oxygen generation and affects its partitioning into apolar microenvironments, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, 2009, Vol. 203(1), pp. 7-12.

ИЗУЧЕНИЕ АПОПТОЗА В ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ ЗОНЫ АБДОМИНАЛЬНОЙ ЛИМФОДИСЕКЦИИ ПОСЛЕ ИНТРАОПЕРАЦИОННОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

К.В. Павелец^{1,2,3}, В.И. Орёл², В.Ю. Кравцов^{3,4,5}, М.А. Протченков¹, А.П. Дысин^{4,6}, У.А. Дрозд², Т.И. Кузьмина⁵, Ю.Д. Костина^{1,2}, М.К. Павелец^{1,2}, Д.С. Русанов^{1,2}, Е.Ф. Лацко^{1,2}

¹Городская Мариинская больница, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

³Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

⁴Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

⁵Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург, Россия

⁶Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Методом ДНК-электрофореза исследован апоптоз в лимфоузлах после интраоперационной фотодинамической терапии (ФДТ) зоны абдоминальной лимфодиссекции при злокачественных новообразованиях желудочно-кишечного тракта. Апоптоз («апоптотическую лестницу») определяли в четырех клеточных популяциях лимфоузлов:

- в лимфоузлах с метастазами, не подвергавшихся ФДТ;
- в тех же лимфоузлах с метастазами после ФДТ;
- в лимфоузлах без метастазов, не подвергавшихся ФДТ;
- в тех же лимфоузлах без метастазов после ФДТ.

Дизайн исследования включал интраоперационное разделение лимфоузлов на две части, одна из которых была сразу удалена и не подвергалась воздействию ФДТ, а вторая оставалась неудаленной и подвергалась ФДТ, затем через 60–90 мин после сеанса ФДТ также была удалена и исследована на апоптоз. В результате оказалось, что апоптоз обнаруживается только в лимфоузлах с метастазами, облучённых во время ФДТ. Полученные результаты указывают на тот факт, что в лимфоузлах зоны абдоминальной лимфодиссекции в результате местной интраоперационной ФДТ при злокачественных новообразованиях желудочно-кишечного тракта злокачественные клетки избирательно гибнут путём апоптоза, а незлокачественные клетки при этом в апоптоз не вступают ($p < 0,01$). Таким образом, полученные клинические данные позволили оценить таргетный эффект ФДТ и подтвердить безопасность фотодинамического воздействия на здоровые ткани лимфоидной системы, находящиеся в зоне облучения.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, апоптоз, фотосенсибилизатор, цитологическое исследование, ДНК-электрофорез.

Для цитирования: Павелец К.В., Орёл В.И., Кравцов В.Ю., Протченков М.А., Дысин А.П., Дрозд У.А., Кузьмина Т.И., Костина Ю.Д., Павелец М.К., Русанов Д.С., Лацко Е.Ф. Изучение апоптоза в лимфатических узлах зоны абдоминальной лимфодиссекции после интраоперационной фотодинамической терапии при злокачественных новообразованиях желудочно-кишечного тракта // Biomedical Photonics. – 2017. – Т. 6, № 3. – С. 39–44.

Контакты: Кравцов В.Ю., e-mail: kvyspb@mail.ru

АПОПТОСИС IN THE LYMPH NODES OF THE ABDOMINAL LYMPHODISSECTION ZONE AFTER LOCAL INTRAOPERATIVE PHOTODYNAMIC THERAPY OF GASTROINTESTINAL CANCERS

Pavelec K.V.^{1,2,3}, Orel V.I.², Kravtsov V.Yu.^{3,4,5}, Protchencov M.A.¹, Dysin A.V.^{4,6}, Drozd U.A.², Kuzmina T.I.⁵, Kostina U.D.^{1,2}, Pavelec M.K.^{1,2}, Rusanov D.S.^{1,2}, Lacko E.F.^{1,2}

¹City Mariinsky hospital, St-Petersburg, Russia²Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, St-Petersburg, Russia³North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St-Petersburg, Russia⁴Military Medical Academy of S.M. Kirov, St-Petersburg, Russia⁵All-Russian Scientific Research Institute of Genetics and Breeding of Agricultural Animals, St-Petersburg, Russia⁶Saint-Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, St-Petersburg, Russia

Abstract

The method of DNA-electrophoresis was used to study apoptosis in the lymph nodes of the abdominal lymphodissection zone after local intraoperative photodynamic therapy (PDT) for the gastrointestinal cancers. Apoptosis (apoptotic ladder) was determined in the four cell populations of lymph nodes:

- in the lymph nodes with metastases that have not been irradiated;
- in the irradiated during PDT lymph nodes with metastases;
- in the lymph nodes without metastases that have not been irradiated;
- in the irradiated during PDT lymph nodes without metastases.

The implementation of this study was possible due to intraoperative division of lymph nodes into two parts, one of which was removed while another one intentionally wasn't removed and was irradiated (in human). It was also removed 60-90 minutes after PDT treatment and examined for apoptosis.

As a result, it was found that apoptosis is detected in the irradiated during PDT lymph nodes with metastases. The obtained results show the fact that in the lymph nodes of the abdominal lymphodissection zone tumor cells selectively die by apoptosis as a result of the local intraoperative photodynamic therapy (PDT) for the gastrointestinal cancers while in non-malignant cells apoptosis doesn't occur after PDT ($p < 0.01$).

Thus, the obtained clinical and experimental data made it possible to evaluate the target PDT effect and confirm the safety of the photodynamic effect on healthy tissues of the lymphoid system located in the irradiation zone.

Key words: photodynamic therapy, apoptosis, photosensitizer, cytopathological examination, DNA electrophoresis.

For citations: Pavelec K.V., Orel V.I., Kravcov V.U., Protchencov M.A., Dysin A.V., Drozd U.A., Kuzmina T.I., Kostina U.D., Pavelec M.K., Rusanov D.S., Lacko E.F. Apoptosis in the lymph nodes of the abdominal lymphodissection zone after local intraoperative photodynamic therapy of gastrointestinal cancers, *Biomedical Photonics*, 2017, T. 6, No. 3, pp. 39–44 (in Russian).

Contacts: Kravtsov V.Yu., e-mail: kvyspb@mail.ru

Введение

Метод фотодинамической терапии (ФДТ) по биологическим механизмам предполагает эффективный и селективный способ разрушения клеток злокачественных опухолей без повреждения окружающих здоровых тканей [1]. ФДТ утверждена в качестве самостоятельного метода лечения ряда форм рака благодаря своей низкой системной токсичности и отсутствию феномена опухолевой резистентности к данному воздействию [2–4].

Одним из возможных путей клеточной гибели при ФДТ, наряду с некрозом и аутофагией, является апоптоз [5]. При этом апоптоз рассматривается наиболее эффективным механизмом уничтожения клетки с клинической точки зрения, поскольку образующиеся в результате апоптотические тельца поглощаются макрофагами и соседними клетками, что исключает появление воспалительной реакции [6]. Современные фотосенсибилизаторы (ФС) хлоринового ряда второго поколения, такие как фотодитазин и радахлорин широко используются для ФДТ и хорошо изучены на экспериментальных моделях.

Вместе с тем, до настоящего времени нет сведений о том, что злокачественные клетки, избирательно накопившие фотосенсибилизаторы, после фотоактивации во время сеанса ФДТ гибнут путем апоптоза при ФДТ злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) – пищевода, желудка поджелудочной железы, толстой кишки [7, 8].

Целью настоящей работы было клиническое исследование апоптоза в лимфоузлах зоны абдоминальной лимфодиссекции после местной интраоперационной фотодинамической терапии при злокачественных новообразованиях желудочно-кишечного тракта. При этом были спланированы такие условия, при которых мы протестировали апоптоз в облученных и необлученных лимфоузлах с метастазами и без. Полученные данные позволили оценить таргетный эффект ФДТ и подтвердить безопасность фотодинамических воздействий на здоровые ткани лимфоидной системы, находящиеся в зоне облучения.

Материал и методы

Исследование проводили в два этапа. Первый – на базе Городской Мариинской больницы, где были оперированы больные злокачественными новообразованиями ЖКТ с проведением интраоперационной ФДТ и был выполнен забор материала для исследований. Второй – на базах Ленинградского государственного университета и Всероссийского научно-исследовательского института генетики и разведения сельскохозяйственных животных, где были осуществлены ДНК-технологии и цитологические исследования.

Метод фотодинамической терапии

За 90–180 мин до начала операций по поводу рака желудка, пищевода, толстой кишки и поджелудочной железы пациентам внутривенно вводили ФС фотодитазин (ООО «БЕТА-ГРАНД», Россия, регистрационное удостоверение №ЛС 001246 от 18.05.2012) или радахлорин (ООО «РАДА-ФАРМА», Россия, регистрационное удостоверение №ЛС-001868 от 16.12.2011) в дозах до 1–1,5 мг/кг массы тела.

При описанных выше локализациях опухолей, после выполнения лапаротомии, ревизии органов брюшной полости и оценки резектабельности пораженного органа через 90–180 мин после введения фотосенсибилизатора в брюшной полости для исследования выбирали лимфатический узел или группу лимфоузлов из зоны предстоящей лимфодиссекции. Критерием выбора узла для исследования являлось его поверхностное расположение с возможностью разделения на две части и удаления одной из частей до сеанса облучения, с последующей диссекцией (после удаления органа, пораженного опухолью) облученной части узла, находящейся *in vivo* еще в течение 60–90 мин. Предпочтение отдавали лимфоузлам плотной консистенции с размером более 1 см (которые имели косвенные макроскопические признаки метастатического поражения). Наиболее часто использовали передне-верхние группы лимфоузлов общей печеночной артерии, чревного ствола – 8 а и 9 по классификации Японской ассоциации по изучению рака желудка (Japanese Gastric Cancer Association, 2015).

Выбранный для исследования лимфоузел разделяли примерно на две равные части острым путем. Для соблюдения принципов антибластики срез удаляемой части лимфоузла коагулировали. Половину узла сразу извлекали, отпечатывали на предметное стекло для цитологических исследований и помещали во флакон с фосфатным буфером для дальнейшего изучения.

Далее проводили сеанс ФДТ с облучением зоны предстоящей лимфодиссекции с оставшейся удаленной частью лимфоидной ткани монохромным красным светом с длиной волны 662 нм, излучаемым

аппаратом «Фара-2» («Аткус», РФ), время облучения – 20 мин, суммарная световая доза – 24 Дж/см².

Облученная по вышеприведенной схеме часть лимфатической ткани оставалась *in vivo* от 60 до 90 мин с сохранением кровоснабжения вплоть до завершения этапа удаления опухоли. Таким образом, после сеанса ФДТ достигалось адекватное моделирование прижизненных эффектов постлучевого патоморфоза.

По прошествии 60–90 мин, как правило, на этапе мобилизации препарата с опухолью выполняли лимфодиссекцию с удалением облученной оставшейся *in vivo* части лимфоузла. Ее отпечатывали на другое предметное стекло для цитологических исследований и переносили во флакон с фосфатным буфером. Материал маркировали и направляли в лабораторию. Флаконы с необлученными и облученными половинами лимфоузлов транспортировали в лабораторию в термостате при температуре 37°C.

Исследование проведено в 80 разделенных (до и после облучения) половинах 40 лимфоузлов, полученных от 30 пациентов оперированных по поводу злокачественных новообразований органов ЖКТ и получивших сеансы интраоперационной ФДТ.

Метод ДНК-электрофореза

Из клеточных суспензий половин лимфоузлов выделяли ДНК методом фенольной экстракции для определения «апоптотической лестницы».

Для анализа фрагментации ДНК использовали метод ДНК-электрофореза. Для этого 1% агарозный гель, содержащий 1 мкг/мл бромистого этидия, помещали в камеру для электрофореза с буфером ТВЕ, после чего окрашенные растворы ДНК заношили в лунки агарозного геля. Электрофорез проходил 1 ч под напряжением 80 В. Дорожки фрагментов ДНК визуализировали путем воздействия на гель УФ-излучения, а затем фотографировали.

Цитопатологическое исследование

Цитологический метод при определении эффективности фотодитазина и радахлорина был необходим для выявления в лимфоузлах наличия метастатических клеток. Препараты, полученные отпечатыванием облученных и необлученных частей лимфоузлов, были окрашены азур-эозином по Романовскому, после чего были изучены с помощью световой микроскопии под увеличением 400х. Таким образом, отбирали половинки лимфоузлов с метастазами и без метастазов.

Исследовательское решение

Выдвинута гипотеза: злокачественные клетки, избирательно накапливающие ФС, после фотоактивации (облучения монохромным светом определенной длины волны, соответствующей максимуму поглощения ФС) во время сеанса ФДТ гибнут путем апоптоза;

незлокачественные клетки после ФДТ в апоптоз не вступают.

Выявление апоптоза электрофоретическим методом фрагментации ДНК («апоптотической лестницы») осуществляли в четырех клеточных популяциях лимфоузлов:

- в лимфоузлах с метастазами, не подвергавшихся ФДТ;
- в тех же лимфоузлах с метастазами после ФДТ;
- в лимфоузлах без метастазов, не подвергавшихся ФДТ;
- в тех же лимфоузлах без метастазов после ФДТ.

Предложенное исследовательское решение возможно, если интраоперационно разделять лимфоузел (или группу лимфоузлов) на две части:

1. часть, удаленную для исследования до сеанса ФДТ и не подвергшуюся облучению;
2. облученную часть, которая во время и после облучения оставалась in human и через 60–90 мин была удалена для исследования на фоне протекающих постфотодинамических внутриклеточных изменений.

Статистический анализ полученных результатов проводили по критерию χ^2 и G-критерию знаков.

На проведение исследования получено разрешение этического комитета Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета, протокол №3/7 от 23.03.2017.

Результаты и обсуждение

Нами были исследованы 40 лимфоузлов, каждый из которых был разделен надвое – 80 половин лимфоузлов. В 23 исследованных лимфоузлах цитологически выявлены метастазы (МТС) рака, в 17 – МТС рака отсутствовали.

В таблице представлены факторные и результативные признаки.

Таким образом, выдвинутая гипотеза о том, что в лимфоузлах зоны абдоминальной лимфодиссекции в результате интраоперационной ФДТ при злокачественных новообразованиях ЖКТ злокачественные клетки избирательно гибнут путем апоптоза, а незлокачественные клетки при этом в апоп-

Таблица

Распределение облученных и необлученных частей лимфоузлов по признакам метастатического поражения и наличию апоптоза (n = 80)

Table

Distribution of irradiated and not irradiated parts of lymph nodes based on the metastatic lesions and the presence of apoptosis (n = 80)

Факторный признак (части лимфоузла) Lymph node parts	Результативный признак (наличие апоптоза) The presence of apoptosis		Итого Total
	АП AR	АН AN	
Метастатически пораженный ЛУ, облученный Lymph node with metastases, irradiated	17	6	23
Метастатически пораженный ЛУ, не облученный Lymph node with metastases, not irradiated	3	20	23
Интактный (без МТС) ЛУ, облученный Lymph node without metastases, irradiated	4	13	17
Интактный (без МТС) ЛУ, не облученный Lymph node without metastases, not irradiated	2	15	17
Всего Total	26	54	80

АП – апоптоз выявлен

АН – апоптоз не выявлен

ЛУ – лимфоузел

Расчетное значение критерия χ^2 составляет 25.905. Критическое значение χ^2 при уровне значимости $p < 0.01$ составляет 11.345. Связь между факторным и результативным признаками статистически значима при уровне значимости $p < 0.01$

AR – Apoptosis identified

AN – Apoptosis not identified

The calculated value of the χ^2 criterion is 25.905. The critical value of χ^2 at the significance level of $p < 0.01$ is 11.345. The relationship between the factor and the outcome is statistically significant at a significance level of $p < 0.01$

тоз не вступают, подтверждается ($p < 0,01$ по критерию χ^2).

Мы использовали еще один статистический критерий – критерий знаков. Если рассматривать необлученные половины лимфоузлов как клеточные популяции до облучения, а вторые половины этих же лимфоузлов после ФДТ – как клеточные популяции после облучения, то получается следующая статистика.

Из 23 лимфоузлов, пораженных МТС, в необлученных частях апоптоз отмечен в 3 случаях. Из 23 лимфоузлов, пораженных МТС, в облученных частях апоптоз отмечен в 17 случаях. Это означает, что при облучении в ходе ФДТ индуцируется апоптоз ($p < 0,01$ по G-критерию знаков).

Из 17 лимфоузлов без МТС в необлученных их частях апоптоз отмечен в 2 случаях. Из 17 лимфоузлов без МТС, в облученных частях апоптоз отмечен в 4 случаях. Это означает, что при облучении в ходе ФДТ апоптоз в лимфоузлах без метастазов не индуцируется ($p > 0,05$, по G-критерию знаков).

Таким образом, критерий χ^2 и G-критерий знаков выявили индукцию апоптоза после ФДТ в лимфоузлах с МТС и не выявили индукцию апоптоза после ФДТ в лимфоузлах с МТС.

Необходимостью продлить сроки и качество жизни пациентов определяется разработка и внедрение новых эффективных методов воздействия на опухолевую ткань в том числе на микроскопические резидуальные участки опухоли, лимфогенные, гематогенные и имплантационные метастазы до, во время и после хирургического вмешательства. Такими признанными методами являются гипертермия, ФДТ, ЛТ и т.д.

В настоящее время, комбинированное лечение злокачественных новообразований определено порядками и стандартами оказания медицинской помощи онкологическим больным. Результаты многоцентровых исследований и метаанализов последнего десятилетия на многотысячных выборках свидетельствуют о достоверном улучшении показателей выживаемости без негативного влияния на ближайшие результаты у пациентов, пролеченных комбинированными методами [8–13].

Хирургические методы лечения исторически и по праву считаются основными в лечении злокачествен-

ных новообразований желудочно-кишечного тракта, они обеспечивают радикализм и оставляют надежду на выживание.

Мультидисциплинарный подход в обеспечении пери- и послеоперационного периода позволяет предусматривать, профилактировать и успешно бороться с осложнениями послеоперационного периода. Нераспознанные микрометастазы рака, резидуальные микроскопические участки первичного очага представляют основную клиническую проблему, снижая результативность хирургического лечения, уменьшая выживаемость и ухудшая прогноз, особенно для пациентов с местно-распространенным опухолевым процессом. Комбинации местного и системного воздействия в сочетании химических, физических и фармакологических методов на опухолевые ткани, в силу их взаимодополнения, представляются наиболее перспективными в решении проблемы результативности лечения онкологических больных.

Результаты представленной работы, в которой фактически дана очень высокая оценка таргетного противоопухолевого эффекта ФДТ, в значительной степени обнадеживают.

Заключение

Используя метод определения ДНК-фрагментации с целью выявления апоптоза, мы доказали, что апоптоз после фотодинамической терапии индуцируется в лимфоузлах, содержащих метастазы, и не возникает в интактных лимфоузлах. Это свидетельствует об избирательной способности фотосенсибилизаторов вызывать гибель злокачественных клеток. Так же подтверждено отсутствие побочного эффекта в виде апоптоза лимфоидных клеток. Это доказывает одно из преимуществ интраоперационной фотодинамической терапии, касающееся отсутствия иммуносупрессии.

Таким образом, результаты данной работы подтверждают способность фотодинамической терапии с использованием фотодитазина и радахлорина избирательно вызывать апоптоз метастатических клеток в лимфоузлах зоны абдоминальной лимфодиссекции при злокачественных новообразованиях органов ЖКТ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dougherty T.J. Photodynamic therapy // *Photochemistry and Photobiology*. – 1993. – Vol. 58. – P. 895-900.
2. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbek M., Moan J., Peng Q. Photodynamic therapy // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1998. – Vol. 90. – P. 889-905.
3. Reynolds T. Photodynamic therapy expands its horizons // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1997. – Vol. 89. – P. 112-114.
4. Rowe P.M. Photodynamic therapy begins to shine // *Lancet*. – 1998. – Vol. 351. – P. 1496.
5. Mroz P., Yaroslavsky A., Kharkwal G.B., Hamblin M.R. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer // *Cancers (Basel)*. – 2011. – Vol. 3(2). – P. 2516-2539.
6. Сербин М.Е., Щербак Е.В. Апоптоз и его молекулярные эффекторы / Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии: Сборник // Под ред. проф., д.м.н. Н.Н. Ильинских. – Томск: Сибирский государственный медицинский университет, 2004. – Вып. 1.
7. Wen L.Y., Bae S.-M., Do J.H., et al. The effects of photodynamic therapy with Photodithazine on HPV 16 E6/E7 associated cervical cancer model // *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. – 2011. – Vol. 15(3). – P. 174-180.
8. Mirzaei H., Djavid G.E., Hadizadeh M., et al. The efficacy of Radachlorin-mediated photodynamic therapy in human hepatocellular carcinoma cells // *Photochemistry and Photobiology*. – 2015. – Vol. 142. – P. 86-91.
9. Ajani J.A., Bentrem D.J., Besh S., et al. Gastric Cancer, Version 2.2013: featured updates to the NCCN Guidelines // *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. – 2013. – Vol. 11(5). – P. 531-546.
10. Ajani J.A., D'Amico Th.A., Almhanna K., et al. Esophageal and Esophagogastric Junction Cancers, version 1.2015. // *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. – 2015. – Vol. 13(2). – P. 194-227.
11. Tempero M. Active Systemic Treatment of Pancreatic Cancer // *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. – 2017. – Vol. 15. – P. 723-725.
12. Messersmith W.A. Systemic Management of Colorectal Cancer // *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. – 2017. – Vol. 15. – P. 699-670.
13. Соколов В.В., Филоненко Е.В. Комбинированное лечение стенозирующего рака пищевода: реканализация, эндопротезирование и фотодинамическая терапия // *Паллиативная медицина и реабилитация*. – 2004. – № 2. – С. 49b-49.

REFERENCES

1. Dougherty T.J. Photodynamic therapy, *Photochemistry and Photobiology*, 1993, Vol. 58, pp. 895-900.
2. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbek M., Moan J., Peng Q. Photodynamic therapy, *Journal of the National Cancer Institute*, 1998, Vol. 90, pp. 889-905.
3. Reynolds T. Photodynamic therapy expands its horizons, *Journal of the National Cancer Institute*, 1997, Vol. 89, pp. 112-114.
4. Rowe P.M. Photodynamic therapy begins to shine, *Lancet*, 1998, Vol. 351, pp. 1496.
5. Mroz P., Yaroslavsky A., Kharkwal G.B., Hamblin M.R. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer, *Cancers (Basel)*, 2011, Vol. 3(2), pp. 2516-2539.
6. Serbin M.E., Shcherbak E.V. Apoptosis and its molecular effectors, in *Aktual'nye problemy biologii, meditsiny i ekologii, Sbornik [Actual problems of biology, medicine and ecology, Collection]*, by ed Il'inskih N.N. Tomsk, Sibirskii gosudarstvennyi meditsinskii universitet Publ., 2004, Is. 1. (in Russian).
7. Wen L.Y., Bae S.-M., Do J.H., Park K.-S., Ahn W.S. The effects of photodynamic therapy with Photodithazine on HPV 16 E6/E7 associated cervical cancer model, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2011, Vol. 15(3), pp. 174-180.
8. Mirzaei H., Djavid G.E., Hadizadeh M., Jahanshiri-Moghadam M., Hajian P. The efficacy of Radachlorin-mediated photodynamic therapy in human hepatocellular carcinoma cells, *Photochemistry and Photobiology*, 2015, Vol. 142, pp. 86-91.
9. Ajani J.A., Bentrem D.J., Besh S., D'Amico T.A., Das P., Denlinger C., Fakih M.G., Fuchs C.S., Gerdes H., Glasgow R.E., Hayman J.A., Hofstetter W.L., Ilson D.H., Keswani R.N., Kleinberg L.R. Gastric Cancer, Version 2.2013: featured updates to the NCCN Guidelines, *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 2013, Vol. 11(5), pp. 531-546.
10. Ajani J.A., D'Amico Th.A., Almhanna K., Bentrem D.J., Besh S., Chao J., Das P., Denlinger C., Fanta P., Fuchs C.S., Gerdes H., Glasgow R.E., Hayman J.A., Hochwald S., Hofstetter W.L., Ilson D.H., Jaroszewski D., Jaspersen K., Keswani R.N., Kleinberg L.R., Korn W. M., Leong S., Lockhart A.C., Mulcahy M.F., Orringer M.B., Posey J.A., Poultsides G.A., Sasson A.R., Scott W.J., Strong V.E., Varghese T.K.Jr, Washington M.K., Willett C.G., Wright C.D., Zelman D., McMillian N., Sundar H. Esophageal and Esophagogastric Junction Cancers, version 1.2015., *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 2015, Vol. 13(2), pp. 194-227.
11. Tempero M. Active Systemic Treatment of Pancreatic Cancer, *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 2017, Vol. 15, pp. 723-725.
12. Messersmith W.A. Systemic Management of Colorectal Cancer, *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 2017, Vol. 15, pp. 699-670.
13. Sokolov V.V., Filonenko E.V. Combined treatment of obstructing esophageal cancer: recanalization, endoprosthesis and photodynamic therapy, *Palliativnaya meditsina i reabilitatsiya*, 2004, No. 2, pp. 49b-49. (in Russian).

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ОСТАТОЧНОЙ ОПУХОЛИ ГОРТАНИ ПОСЛЕ ДЛТ (КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ)

В.М. Легостаев, Г.М. Мальдонадо, Е.Ф. Исламова

Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону, Россия

Резюме

Приведено клиническое наблюдение успешной фотодинамической терапии остаточной опухоли гортани после ДЛТ. Пациентке с диагнозом рак гортани, T1N0M0, было проведен курс ДЛТ на область гортани, РОД = 2 Гр, 5 фракций в неделю, СОД = 60 Гр. Через 1 мес после завершения курса ДЛТ диагностирован продолженный рост остаточной опухоли левой голосовой складки. Пациентке проведено 4 курса фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором фотодитазин в дозе 100 мг в сочетании с электрорезекцией остаточной опухоли гортани. При контрольной видеоларингоскопии через 1 мес после 4-го курса фотодинамической терапии гортань подвижна, голосовая функция полностью восстановлена, опухоль левой голосовой складки не определяется. Безрецидивный период наблюдения составляет 10 мес. Пациентка находится под динамическим наблюдением.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, опухоль гортани, фотодитазин.

Для цитирования: Легостаев В.М., Мальдонадо Г.М., Исламова Е.Ф. Фотодинамическая терапия злокачественной остаточной опухоли гортани (клиническое наблюдение) // *Biomedical Photonics*. – 2017. – Т. 6, № 3. – С. 45–48.

Контакты: Легостаев В.М., e-mail: legostaev_vladis@mail.ru

PHOTODYNAMIC THERAPY OF RESIDUAL LARYNGEAL TUMOR AFTER EBRT (CASE REPORT)

Legostaev V.M., Maldonado G.M., Islamova E.F.

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Abstract

A case of successful photodynamic therapy of residual laryngeal tumor after external beam radiotherapy (EBRT) is reported. The female patient with diagnosis of laryngeal cancer T1N0M0 underwent a course of EBRT on larynx, fraction dose = 2 Gy, 5 fractions per week, total radiation dose = 60 Gy. One month after EBRT the continued growth of residual tumor in the left vocal fold was diagnosed. The patient had 4 courses of photodynamic therapy with photosensitizer fotoditazin at a dose of 100 mg combined with electroresection of residual laryngeal tumor. The control video-assisted laryngoscopy 1 month after the 4th course of photodynamic therapy showed that larynx was flexible, vocal function was fully restored, tumor of the left vocal fold wasn't detected. Non-recurrence follow-up period is 10 month. The patient is under follow-up.

Key words: photodynamic therapy, laryngeal tumor, fotoditazin.

For citations: Legostaev V.M., Maldonado G.M., Islamova E.F. Photodynamic therapy of residual laryngeal tumor after EBRT (case report), *Biomedical Photonics*, 2017, T. 6, No. 3, pp. 45–48 (in Russian).

Contacts: Legostaev V.M., e-mail: legostaev_vladis@mail.ru

По данным статистики, заболеваемость раком гортани в 2016 г. составила 30,3 человек на 100 тыс. населения. За последние 10 лет установлено снижение заболеваемости на 2,8% у мужчин и прирост на 18,2% у женщин. При этом удельный вес больных с опухолевым процессом, выявленным на ранних стадиях (I–II), от числа больных с впервые в жизни установленным

диагнозом злокачественного новообразования гортани в России составляет 38,0% [1, 2].

По данным ряда авторов, на сегодняшний день нет единого алгоритма лечения злокачественных новообразований гортани стадии T1–3N0M0. В зависимости от стадии заболевания и распространенности процесса применяют различные методы противоопу-

холевого лечения (хирургический, лучевой, лекарственный) как самостоятельно, так и в сочетании друг с другом [3, 4].

Показатель частоты применения лучевой терапии в качестве самостоятельного вида лечения при злокачественных новообразованиях гортани в 2016 г. составил 23,5%, лекарственную терапию как самостоятельный метод противоопухолевого лечения применяли в 45,0%, химиолучевой метод – в 7,4% [2].

В последние годы разработаны новые методы как консервативного, так и хирургического лечения больных раком гортани. В терапии пациентов со стадиями T1-2N0M0, в некоторых случаях и T3N0M0, применяют следующие методы: лучевое и химиолучевое лечение, эндоларингеальную хирургию с использованием лазера, фотодинамическую терапию, открытые функционально-щадящие операции.

В отделении внутрисветовой эндоскопической диагностики ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России успешно применяется метод фотодинамической терапии (ФДТ) в лечении как первичных, так и рецидивных опухолей гортани. Приводим клиническое наблюдение успешной ФДТ в сочетании с электрорезекцией остаточной опухоли гортани после ДЛТ.

Больная С., 53 лет, считает себя больной с июля 2015 г., когда появилась осиплость голоса. Лечилась консервативно без эффекта. В ноябре 2015 г. обратилась в поликлинику ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, где была осмотрена ЛОР-онкологом, который направил пациентку в отделение внутрисветовой эндоскопической диагностики с подозрением на папилломатоз гортани.

20.11.2015 выполнена видеоларингоскопия: гортань подвижна; в передней трети левой голосовой складки визуализируется экзофитное образование размером 0,4–0,5 см, рыхлой структуры, покрытое белесоватым налётом, передним полюсом тесно прилежащее к передней комиссуре. Выполнена биопсия. Остальные отделы гортани без особенностей.

Цитологический диагноз: участки плоского эпителия с признаками дисплазии 2 степени на фоне папилломатоза. Гистологический диагноз: плоскоклеточный рак с ороговением G2. Установлен заключительный диагноз: рак гортани, T1N0M0, клиническая группа 2 (рис. а).

В декабре 2015 г. пациентке первым этапом лечения проведен курс конформной дистанционной гамма-терапии на область гортани, облучение с 2 противоположных полей, в статичном режиме, РОД = 2 Гр, 5 фракций в неделю, СОД = 40 Гр.

В январе 2016 г. выполнен контрольный осмотр ЛОР-онколога: при непрямой ларингоскопии гортань подвижна, опухоль не определяется. Пациентке проведен 2-ой курс конформной дистанционной гамма-терапии на область гортани, облучение с 2 противо-

положных полей, в статичном режиме, РОД = 2 Гр, 5 фракций в неделю, СОД = 20 Гр.

Через 1 мес после завершения дистанционной гамма-терапии выполнена контрольная видеоларингоскопия: в передней трети левая голосовая складка утолщена; в области локализации первичной опухоли, выявлена инфильтрация с изъязвлением размером 0,4x0,6 см с белесоватым экзофитом размером 0,3 см, расположенным в области заднего края изъязвления. Выполнена биопсия с субтотальным удалением образования. Передняя комиссура в процесс не вовлечена. Остальные отделы гортани без особенностей.

Эндоскопическое заключение: рак левой половины гортани T1N0M0, состояние после ДЛТ (СОД = 60 Гр), продолженный рост остаточной опухоли левой голосовой складки (рис. б).

Гистологический диагноз: папилломатоз, дисплазия 3 ст. на границе с cancer in situ.

В связи с продолженным ростом остаточной опухоли после лучевой терапии пациентке предложено оперативное лечение в объеме: резекция левой половины гортани. От предложенного оперативного вмешательства пациентка отказалась, в связи с чем принято решение о проведении ФДТ, которая выполнена 05.07.2016.

Пациентке внутривенно введен фотодитазин (ООО «БЕТА-ГРАНД», Россия, регистрационное удостоверение №ЛС 001246 от 18.05.2012) в дозе 100 мг в 100 мл 0,9%-го хлорида натрия. Через 2 ч проведена ФДТ с использованием источника лазерного излучения ЛахтаМилон (662 нм) и гибкого световода с микролинзой (мощность на выходе составила 250 Вт, плотность энергии лазерного излучения – 300 Дж/см²).

После ФДТ у пациентки в течение 7 сут сохранялся болевой синдром в области гортаноглотки, который купировали приемом нестероидных противовоспалительных средств. Наблюдали выраженную дисфонию.

Контрольная видеоларингоскопия выполнена 26.07.2016: через 3 нед после ФДТ выявлена выраженная положительная динамика: уменьшение степени дисфонии, левая голосовая складка уменьшилась в размере, по толщине приблизилась к правой голосовой складке. Однако в передней трети складка по-прежнему утолщена, в этом отделе визуализируются белесоватая туморозная инфильтрация, из-за чего голосовая щель полностью не смыкается. Выполнена биопсия.

Эндоскопическое заключение: состояние после 1 курса ФДТ по поводу продолженного роста опухоли левой голосовой складки с выраженным положительным эффектом (рис. в). Гистологический диагноз: пласты плоскоклеточного рака с дистрофиче-

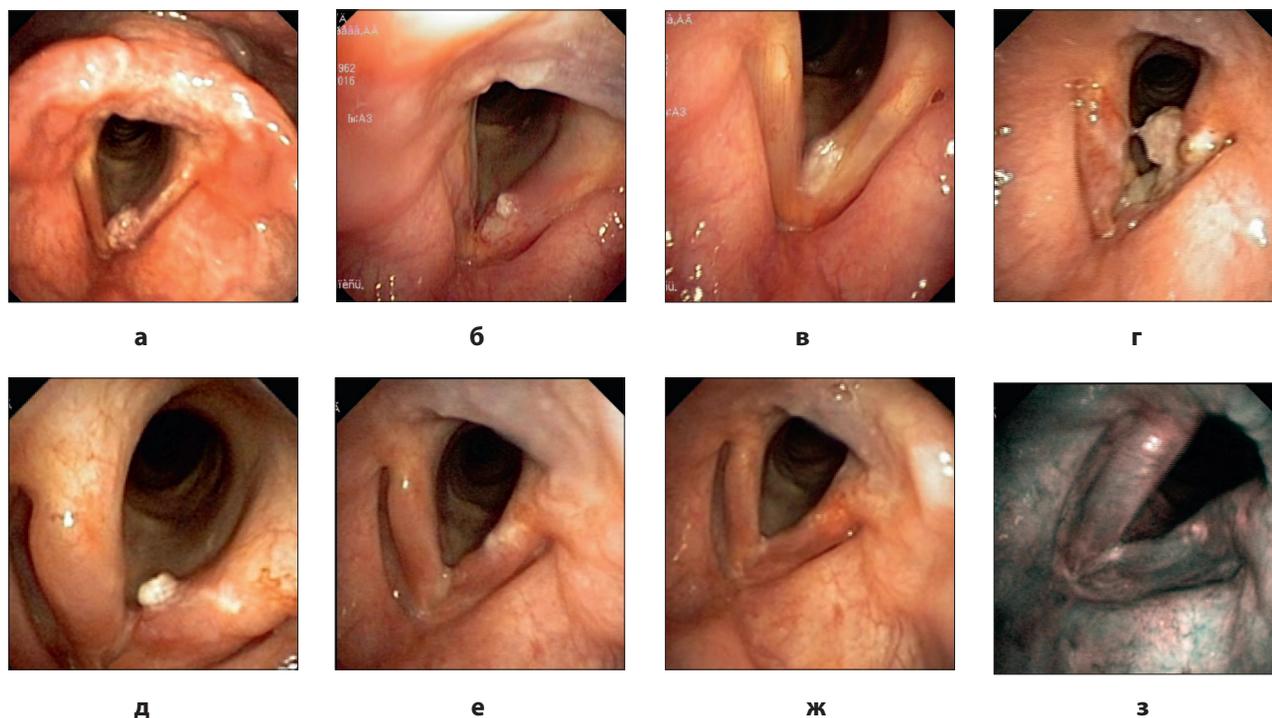


Рис. Рак левой голосовой складки:

а – до лечения;

б – остаточная опухоль после ДЛТ;

в – состояние через 3 нед после 1-го курса ФДТ (некроз опухоли, остаточная опухоль);

г – состояние через 3 нед после 2-го курса ФДТ (некроз опухоли, остаточная опухоль);

д – состояние через 4 нед после 3-го курса ФДТ (некроз опухоли, остаточная опухоль);

е – состояние через 4 нед после 4-го курса ФДТ (полная регрессия опухоли);

ж, з – состояние через 3 мес после 4-го курса ФДТ (полная регрессия опухоли)

Fig. Cancer of the left vocal fold:

а – before treatment;

б – residual tumor after EBRT;

в – appearance 3 weeks after 1st course of PDT (necrosis of tumor, residual tumor);

г – appearance 3 weeks after 2nd course of PDT (necrosis of tumor, residual tumor);

д – appearance 4 weeks after 3rd course of PDT (necrosis of tumor, residual tumor);

е – appearance 4 weeks after 4th course of PDT (complete tumor regression);

ж, з – appearance 3 months after 4th course of PDT (complete tumor regression)

скими изменениями опухолевых клеток, очаговые кровоизлияния; пласты многослойного плоского эпителия с дистрофическими изменениями без подлежащей ткани.

12.08.2016 в связи с остаточной опухолью левой голосовой складки проведен 2-ой курс ФДТ. Пациентке внутривенно введен фотодитазин в дозе 100 мг в 100 мл 0,9%-го хлорида натрия. Через 2 ч проведена ФДТ с использованием источника лазерного излучения ЛахтаМилон (662 нм) и гибкого световода с микролинзой (мощность на выходе составила 350 Вт, плотность энергии лазерного излучения – 200 Дж/см²).

Контрольная видеоларингоскопия выполнена через 3 нед: гортань подвижна. В области передних двух третей левая голосовая складка изъязвлена, покрыта налетом фибрина. В средней трети появи-

лось экзофитное образование размером около 0,6–0,7 см, расположенное на широком основании. Выполнена биопсия. Правая голосовая складка отечная, гиперемирована.

Эндоскопическое заключение: состояние после 2 курсов ФДТ по поводу остаточной опухоли левой голосовой складки, продолжающаяся фаза некроза опухоли. Гистологический диагноз: плоскоклеточный рак с ороговением.

Через 7 сут пациентке выполнен 3-ий курс ФДТ. Через 2,5 ч после внутривенного введения 100 мг фотодитазина выполнено тотальное удаление экзофитного образования диатермической петлей и проведена ФДТ (мощность на выходе составила 250 Вт, плотность энергии лазерного излучения – 80 Дж/см²).

При контрольном осмотре через 4 нед выявлена выраженная положительная динамика: изъязвление левой голосовой складки полностью эпителизировалось, подвижность складки в полном объеме. Однако в средней трети складки визуализируется экзофит размером 0,3 см. Выполнена тотальная биопсия.

Эндоскопическое заключение: состояние после 3 курсов ФДТ с неполным положительным эффектом. Гистологический диагноз: плоскоклеточный орговевающий рак G2.

Через 1,5 мес после 3-го курса ФДТ пациентке проведен 4-ый курс с аналогичными параметрами. При контрольной видеоларингоскопии через 1 мес после ФДТ гортань подвижна, голосовая функция полностью восстановилась, опухоль левой голосовой складки не определяется (рис. е). Эффект подтвержден при контрольной видеоларингоскопии через 3 мес после завершения лечения (рис. ж, з).

Безрецидивный период наблюдения составляет 10 мес.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петрова Г.В., Старинский В.В., Грецова О.П. Злокачественные новообразования головы и шеи в России (обзор статистической информации) // Голова и шея. – 2015. – № 4. – С. 41-44.
2. Состояние онкологической помощи населению в 2016 году / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2017. – 236 с.
3. Кицманюк З.Д., Чойнзонов Е.Л., Мусабаева Л.И., Новиков В.А. Тактика лечения рака гортани на современном этапе // Сибирский онкологический журнал. – 2003. – № 2. – С. 3-11.
4. Справочник специалиста по лечению опухолей головы и шеи. Приложение к Клиническим рекомендациям по лечению опухолей головы и шеи Общенациональной онкологической сети (США) / под ред. С.О. Подвязникова, А.М. Мудунова. – М.: АБВ-пресс, 2011.

REFERENCES

1. Petrova G.V., Starinskii V.V., Gretsova O.P. Head and neck malignancies in russia (statistical review), *Golova i sheya*, 2015, No. 4, pp. 41-44.
2. *Sostoyanie onkologicheskoi pomoshchi naseleniyu v 2016 godu* [State of cancer care delivery in population in 2016], by eds Kaprin A.D., Starinskii V.V., Petrova O.V. Moscow, MNIIOI im. P.A.Gertsena Publ., 2017. 236 p.
3. Kitsmanyuk Z.D., Choinzonov E.L., Musabaeva L.I., Novikov V.A. Management of laryngeal cancer in the modern era, *Sibirskii onkologicheskii zhurnal*, 2003, No. 2, pp. 3-11.
4. *Spravochnik spetsialista po lecheniyu opakholei golovy i shei. Prilozhenie k Klinicheskim rekomendatsiyam po lecheniyu opakholei golovy i shei Obshchenatsional'noi onkologicheskoi seti (SShA)* [Reference book of a professional in therapy of the head and the neck tumors. Supplement to Clinical Recommendations to Therapy of the Head and the Neck Tumors of the Nation-Wide Oncological Network (USA)], by eds Podvyaznikov S.O., Mudunov A.M. Moscow, ABV-press Publ., 2011.

ЦИТОРЕДУКТИВНОЕ ХИРУРГИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ С ИНТРАОПЕРАЦИОННОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИЕЙ БОЛЬНОЙ С МУЦИНОЗНЫМ КАНЦЕРОМАТОЗОМ БРЮШИНЫ

Н.А. Гришин, Э.А. Сулейманов, М.Н. Ложкин, В.И. Чиссов, А.Н. Урлова, М.А. Шульгин, А.Д. Каприн, Е.В. Филоненко

Национальный медицинский исследовательский радиологический центр Минздрава России, Москва, Россия

Резюме

Приведено клиническое наблюдение за пациенткой с орфанным заболеванием – муцинозным канцероматозом брюшины – после проведения 2 курсов интраоперационной фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором фотогем. При проведении первого курса фотодинамической терапии фотогем вводили в дозе 2,5 мг/кг, плотность энергии лазерного излучения составила 10 Дж/см². Продолжительность стабилизации после первого курса лечения – 2 года, после чего зарегистрировано прогрессирование заболевания. Второй курс фотодинамической терапии проводили в том же режиме. Продолжительность стабилизации после второго курса лечения – 2,5 года. Пациентка погибла в результате несчастного случая, не связанного с заболеванием.

Ключевые слова: интраоперационная фотодинамическая терапия, муцинозный канцероматоз брюшины.

Для цитирования: Гришин Н.А., Сулейманов Э.А., Ложкин М.Н., Чиссов В.И., Урлова А.Н., Шульгин М.А., Каприн А.Д., Филоненко Е.В. Циторедуктивное хирургическое лечение с интраоперационной фотодинамической терапией больной с муцинозным канцероматозом брюшины // *Biomedical Photonics*. – 2017. – Т. 6, № 3. – С. 49–52.

Контакты: Филоненко Е.В., e-mail: derkul23@yandex.ru

CYTOREDUCTIVE SURGICAL TREATMENT WITH INTRAOPERATIVE PHOTODYNAMIC THERAPY IN PATIENTS WITH MUCINOUS PERITONEAL CARCINOMATOSIS

Grishin N.A., Suleimanov E.A., Lozhkin M.N., Chissov V.I., Urlova A.N., Shul'gin M.A., Kaprin A.D., Filonenko E.V.

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

Abstract

Clinical observation of a patient with an orphan disease (mucinous peritoneal carcinomatosis) after 2 courses of intraoperative photodynamic therapy with photogem photosensitizer is presented. During the first course of photodynamic therapy, photogem was administered at a dose of 2.5 mg/kg, the energy density of the laser radiation was 10 J/cm². The duration of stabilization after the first course of treatment was 2 years, after which the progression of the disease was registered. The second course of photodynamic therapy was carried out in the same way. The duration of stabilization after the first course of treatment was 2.5 years. The patient died as a result of an accident unrelated to the disease.

Key words: intraoperative photodynamic therapy, mucinous peritoneal carcinomatosis.

For citations: Grishin N.A., Suleimanov E.A., Lozhkin M.N., Chissov V.I., Urlova A.N., Shul'gin M.A., Kaprin A.D., Filonenko E.V. Cytorreductive surgical treatment with intraoperative photodynamic therapy in patients with mucinous peritoneal carcinomatosis, *Biomedical Photonics*, 2017, T. 6, No. 3, pp. 49–52. (in Russian).

Contacts: Filonenko E.V., e-mail: derkul23@yandex.ru

Муцинозный канцероматоз (псевдомиксома брюшины) аппендикулярного генеза является редкой патологией и характеризуется диссеминацией и прогрессирующим накоплением в брюшной полости и малом тазу муцинозных масс различной плотности.

Он относится к числу так называемых орфанных заболеваний (PMP, ORPHA26790). Заболеваемость составляет 1–2 больных на миллион [1]. Обнаруживается преимущественно у лиц среднего возраста, примерно в 2 случаях на 10 000 лапаротомий [2]. Патогенез опу-

холи, а также лечебная тактика и прогноз до сих пор являются предметом для дискуссии, в силу немногочисленности имеющихся наблюдений. В настоящее время большинство исследователей считают, что в основе развития псевдомиксома брюшины лежит перфорация муцинозной опухоли червеобразного отростка, при которой происходит диссеминация так называемых бокаловидных клеток (goblet cells), которые фиксируются в отдаленных местах брюшной полости и продуцируют муцин [2, 3]. Возможность гистологического исследования на современном этапе позволяет дифференцировать так называемый перитонеальный аденомуциноз от муцинозного перитонеального канцероматоза. Эти два понятия определяют степень злокачественности процесса и его прогноз. Течение процесса обычно прогрессирует с фатальным финалом вследствие развития абдоминального компартного синдрома, кишечной непроходимости и интоксикации [4, 5]. По мнению большинства авторов, методом выбора в лечении больных псевдомиксомой брюшины является циторедуктивная операция в комбинации с интраоперационными методами воздействия – фотодинамической терапией или внутрибрюшной гипертермической химиотерапией [6].

Приводим клиническое наблюдение больной с диагнозом: рак червеобразного отростка IV ст., pT4N0M1, метастазирование в брюшину и сальник, псевдомиксома брюшины. Больной М., 55 лет, 08.09.1997 по месту жительства произведена экстирпация матки с придатками по поводу симптомной миомы матки и поликистоза обоих яичников. При плановом гистологическом исследовании удаленного препарата – серозная киста в одном яичнике и фолликулярная киста в другом. Ухудшение состояния больная отметила в течение 2007–2008 гг., когда появились жалобы на увеличение живота в объеме, наличие уплотнения и периодические боли в нижних отделах живота слева, похудение, субфебрильную температуру по вечерам. К врачам не обращалась, лечилась консервативно самостоятельно. В связи с прогрессированием вышеперечисленных жалоб, в мае 2008 г. обратилась за медицинской помощью по месту жительства. При обследовании заподозрена псевдомиксома брюшины, направлена на консультацию в МНИОИ им. П.А. Герцена.

В МНИОИ им. П.А. Герцена выполнено комплексное обследование. При обследовании, по данным УЗИ: в брюшной полости жидкость с гиперэхогенными смещающимися включениями. В области правого латерального канала инфильтрация по брюшине до 8 мм. Большой сальник окружен жидкостью, гиперэхогенный с анэхогенными включениями, толщиной до 40 мм. Спаечный процесс в брюшной полости и в полости малого таза. В полости малого таза имеется образование, выходящее в гипогастральную область, общими размерами 190x88x132 мм, которое

сверху и спереди ограничено измененным большим сальником. Данные КТ исследования брюшной полости: справа в поддиафрагмальном, подпеченочном пространствах, латеральных каналах с обеих сторон и межпетельно определяется жидкость. Брюшина неравномерно утолщена с наличием узловых образований до 4,0 см, местами сливающихся между собой. Большой сальник, брыжейка тонкой и толстой кишок утолщены за счет инфильтрации с наличием узловых образований, сливающихся в единый конгломерат с тонкой и толстой кишкой, линейными размерами 22x10,8 см, распространяющийся от уровня L3 позвонка до obturatorной ямки. В полости малого таза визуализируется значительное количество жидкости, на этом фоне в тазовой брюшине определяются аналогичные узловых образования, частично сливающиеся между собой (из-за суммационного эффекта достоверно оценить размеры которых не представляется возможным). Больная обсуждена на клиническом консилиуме совместно с хирургами, радиологами, химиотерапевтами и специалистами по ФДТ, выработан план лечения, включающего хирургическое вмешательство с интраоперационной фотодинамической терапией (ИОФДТ).

08.10.2008 выполнена флуоресцентная лапароскопия (рис.) субтотальная перитонэктомия, удаление большого сальника, аппендэктомия, ИОФДТ. Для проведения ИОФДТ фотосенсибилизатор фотогем вводили в дозе 2,5 мг/кг, плотность энергии лазерного излучения составила 10 Дж/см². Индекс перитонеального канцероматоза составил 35, полнота циторедукции – СС 2.

По результатам морфологического исследования операционного материала: высокодифференцированная аденокарцинома червеобразного отростка с очагами инвазии всей толщи стенки, инвазии в прилежащую часть брыжейки, с множественными метастазами в брюшину и сальник с образованием участков по типу псевдомиксомы. На послеоперационном консилиуме в МНИОИ им. П.А. Герцена была выработана тактика дальнейшего ведения больной: учитывая локализацию, распространенность опухолевого процесса, гистологическую форму опухоли, объем и характер выполненного оперативного вмешательства и низкую чувствительность опухоли к существующим химиопрепаратам, дополнительное лечение не назначено.

Впоследствии больная наблюдалась у онколога по месту жительства.

В январе 2011 г. появились боли в верхней половине живота. Больная самостоятельно обратилась в МНИОИ им. П.А. Герцена. При комплексном обследовании, по данным УЗИ брюшной полости: по капсуле печени определяются мелкие очаговые образования кистозно-солидной структуры до 11x5 мм и мельче, без динамики. Желчный пузырь – без особенностей. При прицельном осмотре, спереди от стенки желудка

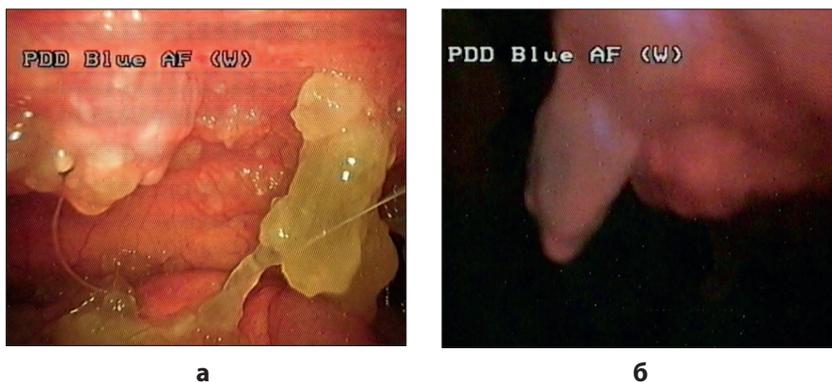


Рис. Флуоресцентная лапароскопия при псевдомиксоме брюшины:
а – осмотр в белом свете;
б – осмотр в режиме флуоресценции
Fig. Fluorescent laparoscopy of pseudomyxoma peritonei
а – observation in the white light;
б – observation of the fluorescence

определяется мелкоячеистое образование эластичной структуры размерами до 106x33 мм, от него исходит тяж до медиальной поверхности селезенки. Кзади от желудка определяется инкапсулированное образование преимущественно кистозной структуры, размерами до 92x64x33 мм. В проекции малого сальника образование размерами до 31x25 мм, в проекции ворот печени – до 31x26 мм. По данным СКТ и МРТ брюшной полости: брюшина неравномерно утолщена, на этом фоне определяются узловые образования, максимальные по брюшине брыжейки тонкой кишки слева от средней линии, состоящие из двух кист, сливающихся между собой, общими размерами до 55x45 мм; в правом латеральном канале до 24x16 мм, плотно прилежащие к петле подвздошной кишки. Забрюшинно на уровне горизонтальной ветви двенадцатиперстной кишки образование аналогичной структуры до 18x12 мм. Данных о метастазировании в отдаленные органы и другой очаговой патологии не получено.

Тактика лечения больной обсуждена на консилиуме с участием хирургов, химиотерапевтов, радиологов и специалистов по ФДТ. Принимая во внимание анамнез, локализацию и распространенность процесса, гистологическую структуру, длительную стабилизацию процесса после ранее проведенного лечения, выработан хирургический план лечения с ИОФДТ.

31.03.2011 выполнено циторедуктивное оперативное вмешательство в объеме удаления опухолевых узлов брюшной полости, экстирпации культи большого сальника, ИОФДТ. Для проведения ИОФДТ фотосенсибилизатор фотогем вводили в дозе 2,5 мг/кг, плотность энергии лазерного излучения составила 10 Дж/см². Результаты послеоперационного морфологического исследования: капсула печени с опухолевым узлом и опухолевые узлы с брюшины желудка

представлены разрастаниями злокачественной псевдомиксомы.

Послеоперационный период протекал гладко, осложнений не было. Послеоперационная рана зажила первичным натяжением. Кожные швы сняты на 10-е сутки. В общем и биохимическом анализах крови – без грубой патологии. Дальнейшая тактика лечения больной обсуждена на консилиуме с участием хирургов, химиотерапевтов, радиологов и специалистов по ФДТ. Принимая во внимание анамнез, гистологическую структуру опухоли, характер выполненного оперативного вмешательства, потенциальная эффективность системной ПХТ признана сомнительной, рекомендовано динамическое наблюдение.

Больная была выписана. Находилась под наблюдением онколога по месту жительства. В последующем, при контрольных обследованиях в МНИОИ им. П.А. Герцена в июне, сентябре, декабре 2011 г., в апреле 2012 г., марте 2013 г. данных за рецидив заболевания не получено. Больная погибла в августе 2013 г. в результате несчастного случая, связанного с автомобильной аварией.

Срок динамического наблюдения за пациенткой от выполнения первой операции до гибели в результате несчастного случая составил 4 года и 10 мес.

Данное клиническое наблюдение демонстрирует эффективность ИОФДТ в сочетании с хирургическим лечением псевдомиксомы брюшины. Несмотря на то, что пациентке был установлен диагноз перитонеального муцинозного канцероматоза, пациентка прожила 4 года и 10 мес и умерла в результате несчастного случая при стабилизации опухолевого процесса. Как свидетельствуют данные литературы, общая пятилетняя выживаемость в данной группе больных при применении стандартных методик лечения, не включающих ИОФДТ, не превышает 24% [7].

ЛИТЕРАТУРА

1. Misdraji J., Yantiss R.K., Graeme-Cook F.M., Balis U.J., Young R.H. Appendiceal mucinous neoplasms: a clinicopathologic analysis of 107 cases // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2003. – Vol. 27. – P. 1089-1103.
2. Moran B.J., Cecil T.D. The etiology, clinical presentation, and management of pseudomyxoma peritonei // *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* – 2003. – Vol. 12. – P. 585-603.
3. Nakakura E.K. Pseudomyxoma peritonei: more questions than answers // *J. Clin. Oncol.* – 2012. – Vol 30(20). – P. 2429-2430.
4. Kahn M.A., Demopoulos R.I. Mucinous ovarian tumors with pseudomyxoma peritonei: a clinicopathological study // *Int. J. Gynecol. Pathol.* – 1992. – Vol. 11. – P. 15-23.
5. Ronnett B.M., Seidman J.D. Mucinous tumors arising in ovarian mature cystic teratomas: relationship to the clinical syndrome of pseudomyxoma peritonei // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2003. – Vol. 27. – P. 650-657.
6. Carr N.J., Finch J., Ilesley I.C., Chandrakumaran K., Mohamed F., Mirnezami A., Cecil T., Moran B. Pathology and prognosis in pseudomyxoma peritonei: a review of 274 cases // *J. Clin. Pathol.* – 2012. – Vol. 65(10). – P. 919-923.
7. Simon A. Fallis, Brendan J. Moran Management of pseudomyxoma peritonei // *JBUON.* – 2015. – Vol. 20, Suppl. 1. – P. 47-55.

REFERENCES

1. Misdraji J., Yantiss R.K., Graeme-Cook F.M., Balis U.J., Young R.H. Appendiceal mucinous neoplasms: a clinicopathologic analysis of 107 cases, *Am. J. Surg. Pathol.*, 2003, Vol. 27, pp. 1089-1103.
2. Moran B.J., Cecil T.D. The etiology, clinical presentation, and management of pseudomyxoma peritonei, *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, 2003, Vol. 12, pp. 585-603.
3. Nakakura E.K. Pseudomyxoma peritonei: more questions than answers, *J. Clin. Oncol.*, 2012, Vol 30(20), pp. 2429-2430.
4. Kahn M.A., Demopoulos R.I. Mucinous ovarian tumors with pseudomyxoma peritonei: a clinicopathological study, *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 1992, Vol. 11, pp. 15-23.
5. Ronnett B.M., Seidman J.D. Mucinous tumors arising in ovarian mature cystic teratomas: relationship to the clinical syndrome of pseudomyxoma peritonei, *Am. J. Surg. Pathol.*, 2003, Vol. 27, pp. 650-657.
6. Carr N.J., Finch J., Ilesley I.C., Chandrakumaran K., Mohamed F., Mirnezami A., Cecil T., Moran B. Pathology and prognosis in pseudomyxoma peritonei: a review of 274 cases, *J. Clin. Pathol.*, 2012, Vol. 65(10), pp. 919-923.
7. Simon A. Fallis, Brendan J. Moran Management of pseudomyxoma peritonei, *JBUON*, 2015, Vol. 20, Suppl. 1, pp. 47-55.

РЕШЕНИЕ СУДА

Арбитражный суд Новосибирской области в составе судьи Смеречинской Я.А., в результате рассмотрения дела № А45-1815/2016 по иску общества с ограниченной ответственностью «РАДА-ФАРМА», г. Москва, к закрытому акционерному обществу «Компания Витамакс», г. Новосибирск, о защите исключительных прав на товарный знак, 26.04.2016 года вынес РЕШЕНИЕ:

Исковые требования удовлетворить частично.

Запретить закрытому акционерному обществу «Компания Витамакс» (ОГРН 1025402464867, ИНН 5406166126) осуществлять распространение брошюры «Методические материалы для организации и комплексного 14 А45-1815/2016 оснащения кабинета и отделения фотодинамической терапии (ФДТ) и флюоресцентной диагностики (ФД) в лечебно – профилактических учреждениях (ЛПУ)», ЗАО «Компания Витамакс» 2015.

Обязать закрытое акционерное общество «Компания Витамакс» (ОГРН 1025402464867, ИНН 5406166126) опубликовать решение суда о допущенном правонарушении в журнале «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (свидетельство о регистрации СМИ – ПИ № ФС 77-51995, выдано 29.11.2012 Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор), ISSN 2306-9597) тиражом не менее 1000 экземпляров.

Взыскать с закрытого акционерного общества «Компания Витамакс» (ОГРН 1025402464867, ИНН 5406166126) в пользу общества с ограниченной ответственностью «РАДА-ФАРМА» (ОГРН 1027738900098, ИНН 7729399114) расходы по уплате государственной пошлины в размере 12 000 рублей. В остальной части иска отказать.

Решение вступило в законную силу.

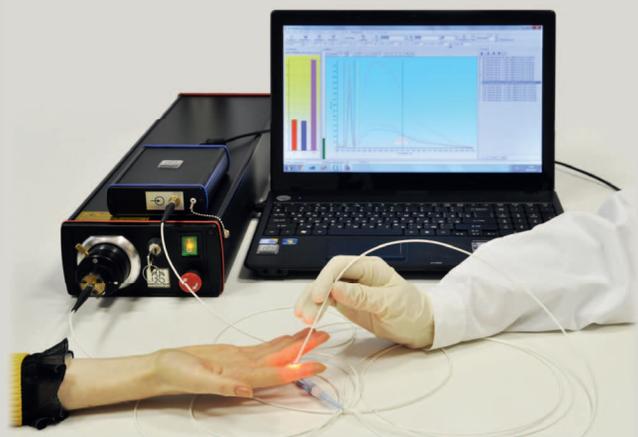
Кабинет для проведения фотодинамической терапии*

ЛЭСА-01-"БИОСПЕК"

Установка для локальной спектроскопии

Установка лазерная электронно-спектральная для флуоресцентной диагностики опухолей и контроля фотодинамической терапии

- Позволяет локально определять степень накопления фотосенсибилизатора в любых органах пациента, доступных для волоконно-оптического зонда
- Диаметр стандартного зонда 1.8 мм, подходит для эндоскопического и лапароскопического оборудования



Регистрационное удостоверение № ФСР 2008/03784 от 12.12.2008

Сертификат соответствия РОСС RU.ИМ32.Н00344 от 24.12.2012

ЛФТ-630/675-01-"БИОСПЕК"

Лазерная терапевтическая установка для фотодинамической терапии

Установка лазерная фото динамической терапии

- Длина волны 635, 662, или 675 нм оптимизирована для проведения терапии с использованием применяемых в РФ фотосенсибилизаторов.
- Установка комплектуется набором световодов для различных локализаций.



Регистрационное удостоверение № ФСР 2009/04649 от 26.03.2009

Сертификат соответствия РОСС RU.ИМ32.Н00345 от 24.12.2012

Видеоэндоскопические комплексы

Расширяем функциональность ваших видеоэндоскопических систем (эндоскопов, лапароскопов) с помощью адаптации к ним одной или нескольких сертифицированных установок собственного производства для наблюдения и анализа цифрового флуоресцентного изображения. Предлагаем аналогичные варианты дооснащения операционных микроскопов, кольпоскопов, щелевых ламп.

* - Соответствует Стандарту оснащения диагностических отделений онкологического диспансера (онкологической больницы) по Приложению № 12 к Порядку оказания медицинской помощи населению по профилю «онкология», утвержденному приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 915н от 15 ноября 2012 г. (оснащение других медицинских организаций, оказывающих медицинскую помощь больным с онкологическими заболеваниями, осуществляется с учетом данного стандарта).

ЗАО "БИОСПЕК"
Россия, 119991, Москва,
ул. Вавилова, д. 38, корп. 5



Тел./факс: 8-499-135-1489
E-mail: biospec@nsc.gpi.ru
<http://www.biospec.ru>



ФОТОДИТАЗИН® [fotoditazin]

фотосенсибилизатор хлоринового ряда

«ФОТОДИТАЗИН®» гель - РУ № ФСР 2012/130043 от 03.02.2012 г.

«ФОТОДИТАЗИН®» концентрат для приготовления раствора для инфузий - РУ № ЛС 001246 от 18.05.2012 г.



«ФОТОДИТАЗИН®» применяется для флюоресцентной диагностики и фотодинамической терапии онкологических заболеваний различных нозологических форм, а так же патологий не онкологического характера в следующих областях медицины:

- ▶ дерматология
- ▶ гинекология
- ▶ урология
- ▶ торакальная хирургия
- ▶ стоматология
- ▶ нейрохирургия
- ▶ офтальмология,
- ▶ травматология и ортопедия
- ▶ комбустиология
- ▶ гнойная хирургия
- ▶ ангиология

В соответствии с приказами МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РФ:

Приказ № 1629н от 29 декабря 2012 г.

«Об утверждении перечня видов высокотехнологичной медицинской помощи»

Приказ № 915н от 15 ноября 2012 г. «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи взрослому населению по профилю «онкология»

ООО «ВЕТА-ГРАНД» €

123056, Россия, г.Москва, ул. Красина, д.27, стр.2

тел.: +7(499)253-61-81, +7(499)250-40-00

e-mail: fotoditazin@mail.ru

 www.fotoditazin.com
www.фотодитазин.рф