

Фотодинамическая терапия экспериментальных опухолей лабораторных животных с новым фотосенсибилизатором Гелиохлорин

О. Б. Абрамова,[@] В. В. Дрожжина, Е. А. Козловцева, Т. П. Сиволова,
М. А. Каплан

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава
России, 249036 Обнинск, Россия

^{@E-mail:} olyabramova@gmail.com

Статья посвящается памяти Г. В. Пономарева

Природные хлорины и их производные широко применяются в фотодинамической терапии (ФДТ) в качестве фотосенсибилизаторов (ФС). Поиск, направленный на повышение фотоактивности и противоопухолевой эффективности производных хлорофилла а, является одной из приоритетных задач на сегодняшний день. В данной работе изучали эффективность ФДТ экспериментальных опухолей: карциномы Эрлиха мышей и саркомы М-1 крыс с новым фотосенсибилизатором Гелиохлорин – аминокпроизводным хлорина е₆. Исследовали кинетику накопления ФС в опухолях и окружающих тканях бедра двух видов лабораторных животных для определения оптимального времени проведения лазерного облучения. Для оценки противоопухолевой эффективности ФДТ использовали следующие показатели: объем опухоли, коэффициент абсолютного прироста у животных с ростом неоплазий, торможение роста опухолей, их полная регрессия, увеличение продолжительности жизни особей в опытных группах в сравнении с контролем (животные-опухоленосители без воздействия). Критерием излечения считали полную регрессию опухолей и отсутствие рецидивирования в течение 90 суток после терапии. Проведение лечения в оптимальные сроки после введения ФС с определенными параметрами лазерного воздействия позволило достичь максимального ингибирующего эффекта на злокачественные новообразования (карцинома Эрлиха и саркома М-1) у 100 % животных до 90 суток после ФДТ.

Ключевые слова: Гелиохлорин, фотодинамическая терапия, карцинома Эрлиха мышей, саркома М-1 крыс, регрессия опухоли, увеличение продолжительности жизни.

Photodynamic Therapy of Experimental Tumors of Laboratory Animals with a New Photosensitizer Heliochlorin

Olga B. Abramova,[@] Valentina V. Drozhzhina, Ekatherina A. Kozlovtseva,
Tatyana P. Sivovolova, and Mikhail A. Kaplan

A. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the Federal State Budgetary Institution “National Medical Research Radiological Center” of the Ministry of Health of the Russian Federation, 249036 Obninsk, Russia

^{@Corresponding author E-mail:} olyabramova@gmail.com

Photodynamic therapy (PDT) is a modern treatment method based on the synergistic interaction of a non-toxic photosensitizer (PS), low-energy and non-thermal visible light and tissue oxygen for destruction of target cells and tissues by producing singlet oxygen and its other reactive forms. At present, three main mechanisms of the antitumor effect of PDT have been studied: a direct damaging effect on tumor cells, disruption of the tumor blood supply due to vascular damage, and elimination of malignant cells due to the cytotoxic effect of immune system cells due to the development of acute inflammation. A certain sequence of photochemical and photobiological reactions causes irreversible damage

to tumor tissues, a cascade of photochemical reactions occurs with the formation of reactive oxygen species, which have a strong cytotoxic effect, causing damage to the membranes and organelles of pathological cells. Significant changes in the endothelial cells of the tumor vessels, after photodynamic therapy, lead to the activation of circulating platelets and polymorphonuclear leukocytes and, as a result, to a thrombogenic effect and impaired microcirculation. The biological consequences of PDT-initiated radical-mediated photooxidation can cause autophagic, apoptotic, or necrotic cell death, depending on the energy density (J/cm^2) and power density (W/cm^2) of light and the concentration of the photosensitizer. Sublethal damage initiated by cytotoxic products of photochemical reactions can lead to apoptosis of tumor cells. Also, the response of tissues to photodynamic therapy is vasoconstriction of arterioles and thrombosis of venules, metabolic changes and subsequent necrosis of endothelial cells, which leads to their separation, increased permeability of the vascular wall and necrosis of most of the tumor tissue.^[1-4]

Natural chlorins and their derivatives are widely used in photodynamic therapy as photosensitizers. The development of photodynamic therapy involves the search for new photosensitizers with a chemical modification of natural pigments from chlorophyll *a*, combining optimal photophysical properties and targeted delivery of drugs to specific cellular targets. In this work, we studied the effectiveness of PDT of experimental tumors: Ehrlich carcinoma of mice and M-1 sarcoma of rats with a new photosensitizer Heliochlorin. Heliochlorin – a derivative of chlorin e_6 for PDT – was developed and created by Professor Ponomarev G.V. with co-authors.^[12] Manufacturer – Limited Liability Company “HELIOCHLORIN” (RU). The drug is produced in a freeze-dried form, including trismeglumine salt of chlorin e_6 and, as a cryostabilizer, meglumine in a ratio of 1:0.1–0.2 wt.h. Heliochlorin is a PS based on highly purified chlorin e_6 from methylpheophorbide *a*, with a high content of the main substance in the sample up to 93–98 %.

We studied the kinetics of PS accumulation in tumors and surrounding tissues of the thigh of two types of laboratory animals to determine the optimal time for laser irradiation. To assess the antitumor efficacy of PDT, the following indicators were used: tumor volume, absolute growth rate in animals with neoplasia growth, inhibition of tumor growth, their complete regression, and an increase in the lifespan of individuals in the experimental groups compared with the control (tumor-bearing animals without exposure). The criterion for cure was considered complete regression of tumors and the absence of recurrence within 90 days after therapy. Carrying out treatment at the optimal time after PS administration with certain parameters of laser exposure made it possible to achieve the maximum inhibitory effect on malignant neoplasms (Ehrlich's carcinoma and M-1 sarcoma) in 100 % of animals up to 90 days after PDT.

Keywords: Heliochlorin, photodynamic therapy, Ehrlich carcinoma of mice, M-1 rat sarcoma, tumor regression, increase in life expectancy.

Введение

Фотодинамическая терапия является современным методом лечения, основанным на синергическом взаимодействии нетоксичного фотосенсибилизатора, низкоэнергетического и нетеплового видимого света и тканевого кислорода для разрушения клеток-мишеней и тканей путем производства синглетного кислорода и других его активных форм. В настоящее время изучено три основных механизма противоопухолевого действия ФДТ – прямое повреждающее воздействие на опухолевые клетки, нарушение кровоснабжения опухоли за счет повреждения сосудов и элиминация злокачественных клеток за счет цитотоксического действия клеток иммунной системы вследствие развития острого воспаления. Определенная последовательность фотохимических и фотобиологических реакций вызывает необратимое повреждение опухолевых тканей, происходит каскад фотохимических реакций с образованием активных форм кислорода, которые оказывают сильное цитотоксическое действие, вызывая повреждение мембран и органелл патологических клеток. Значительные изменения эндотелиальных клеток сосудов опухоли, после фотодинамической терапии, ведут к активации циркулирующих тромбоцитов и полиморфноядерных лейкоцитов и, как следствие, к тромбогенному эффекту и нарушению микроциркуля-

ции. Биологические последствия инициируемого ФДТ радикально-опосредованного фотоокисления могут вызывать аутофагическую, апоптотическую или некротическую гибель клеток в зависимости от плотности энергии [$Дж/см^2$] и плотности мощности [$Вт/см^2$] света и концентрации фотосенсибилизатора. Сублетальные повреждения, инициируемые цитотоксическими продуктами фотохимических реакций, могут приводить к апоптозу опухолевых клеток. Также ответом тканей на фотодинамическую терапию является вазоконстрикция артериол и тромбоз венул, изменения метаболизма и последующий некроз эндотелиальных клеток, что приводит к их сепарации, повышению проницаемости сосудистой стенки и некрозу большей части опухолевой ткани.^[1-4]

Развитие фотодинамической терапии предполагает поиск новых фотосенсибилизаторов (ФС) с химической модификацией природных пигментов из хлорофилла *a*, сочетающих оптимальные фотофизические свойства и целевую доставку препаратов в конкретные клеточные мишени.^[5-8] В ряде работ отмечено, что аминокислотные производные хлорина e_6 проявляют большую контрастность накопления в опухолевой ткани по сравнению с нормальной.^[9-11]

Новый препарат Гелиохлорин – производное хлорина e_6 для ФДТ – разработан и создан профессором Пономаревым Г.В. с соавторами.^[12] Производитель –

ООО «Гелиохлорин» (RU). Препарат выпускается в лиофильно высушенной форме, включающей трис-мелглюминовую соль хлорина e_6 и мелглумин в качестве криостабилизатора в соотношении 1:0,1–0,2 вес. ч. Гелиохлорин – ФС на основе высокоочищенного хлорина e_6 из метилфеорбида a , с высоким содержанием основного вещества в образце до 93–98 %.

Цель исследования – изучить противоопухолевую эффективность нового фотосенсибилизатора «Гелиохлорин» на параметры регрессии карциномы Эрлиха мышей и соединительнотканной опухоли саркомы М-1 крыс.

Экспериментальная часть

Исследование проведено на аутбредных животных с имплантированными экспериментальными опухолями саркома М-1 крыс и карцинома Эрлиха мышей с соблюдением биоэтических принципов в соответствии с национальными стандартами. Асцитическую жидкость карциномы Эрлиха от мышей доноров вводили подкожно в область бедра 24 половозрелым самкам массой 20–25 г, для воспроизведения солидной опухоли.^[13–15] Саркому М-1 перевивали 18 половозрелым самкам крыс массой тела 160–190 г под кожу в область бедра кусочками опухоли донора.^[16] На 3 сутки после перевивки при достижении наибольшего диаметра опухолевых узлов у мышей (0,4–0,6 см) и на 7–9 сутки при достижении диаметра саркомы крыс (0,7–1,0 см), животных методом рандомизации распределяли на опытные и контрольные группы (Таблица 1). Контролем служили животные-опухоленосители без воздействия (Таблица 1).

Основным фактором, определяющим эффективность фотодинамического воздействия, является способность клеток аккумулировать фотосенсибилизатор. Флуоресцентный анализ распределения фотохромов в тканях необходим для определения оптимального временного интервала между введением фотосенсибилизатора и воздействием лазером для достижения максимального противоопухолевого эффекта, а также для максимального исключения фотоиндуцированного повреждения нормальных тканей. Локализацию и накопление ФС в тканях изучали методом лазерной спектроскопии с помощью установки ЛЭСА-01-Биоспек, Россия. Характеристики процессов накопления ФС в опухолевой и здоровой тканях бедра определяли на основании измерений интенсивности флуоресценции в полосе испускания хлорина и селективности ФС – по расчету индекса контрастности (опухоль/здоровая ткань). ФС вводили мышам и крысам внутривенно в дозе 5,0 мг/кг. Первое измерение проводили до введения препарата (0 ч), а затем через каждые 15 минут до 120 минут.

Источником лазерного излучения служил полупроводниковый аппарат «Аткус – 2» производства ЗАО «Полупроводниковые приборы» (Санкт-Петербург) с длиной волны излучения 662 ± 1 нм. Диаметры светового пятна составляли:

1,0 см (мышы с карциномой Эрлиха) и 1,5 см (крысы с саркомой М-1).

Объемы злокачественных новообразований измеряли до проведения терапии (V_0) и на 7, 14 и 21 сутки (V_t) после ФДТ.

В качестве критериев определения противоопухолевой эффективности использовали:

1. Коэффициент абсолютного прироста опухоли (K). Для этого сначала вычисляли объемы опухолей по формуле:

$$V = \frac{1}{6} \pi d_1 \cdot d_2 \cdot d_3 \quad (1)$$

где: d_1, d_2, d_3 – три взаимно перпендикулярные диаметры опухоли, V – объем опухоли, см^3 .

Коэффициент абсолютного прироста опухоли (K) рассчитываем по формуле:

$$K = \frac{V_t - V_0}{V_0} \quad (2)$$

где: V_0 – объем опухоли до воздействия, V_t – объем опухоли на определенный срок наблюдения;

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

$$TPO \% = \frac{V_k - V_0}{V_k} 100 \% \quad (3)$$

3. Процент животных в группе с полной регрессией (ПР) опухоли ($K = -1,00$). За полную регрессию опухоли принимали отсутствие видимой и пальпируемой опухоли.

4. Средняя продолжительность жизни животных (СПЖ, сут) животных и увеличение продолжительности жизни (УПЖ%) по сравнению с контролем. Значимым считается $УПЖ \geq 50$ %.

$$УПЖ = \frac{СПЖ_{опыт} - СПЖ_{контроль}}{СПЖ_{контроль}} \times 100\% \quad (4)$$

5. Критерий излеченности животных – отсутствие рецидивирования опухоли в течение 90 суток после ФДТ.

Статистическую обработку полученных результатов для независимых групп выполняли с использованием программ Statistica 6.0. Параметры описательной статистики представлены в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). Для оценки значимости межгрупповых различий использовали U-критерий Манна–Уитни при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Гелиохлорин имеет характерный для соединений хлоринового ряда спектр флуоресценции в области 660 нм (Рисунок 1).

Высокая концентрация препарата ($p < 0,05$), по сравнению с исходными величинами (собственная

Таблица 1. Схема экспериментов.

Опухоль	Тест-система	Доза ФС, мг/кг	Способ введения	Параметры лазерного воздействия	
				E , Дж/см ²	P_s , Вт/см ²
Карцинома Эрлиха	мышы	2,5	внутривенно	150	0,48
		5,0			
Контроль	мышы	–	–	–	–
Саркома М-1	крысы	2,5	внутривенно	150	0,48
		5,0			
Контроль	крысы	–	–	–	–

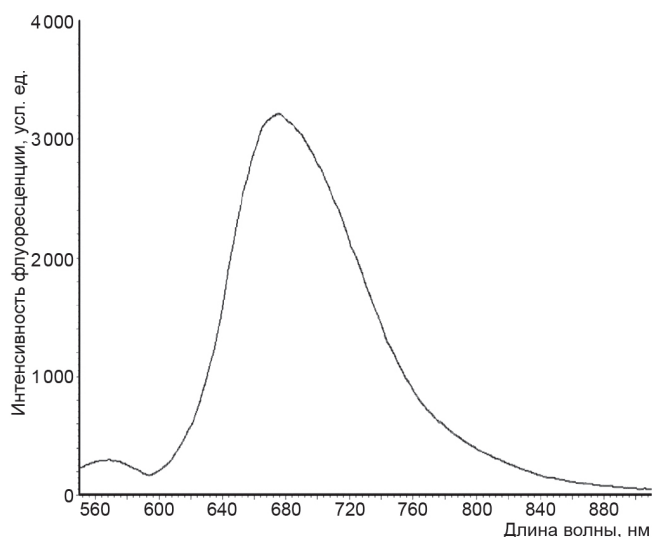


Рисунок 1. Спектр флуоресценции Гелиохлорина в воде.

флуоресценция биологических тканей), в опухоли мышей определялась уже через 15 минут и сохранялась до 60 минут после введения ФС, максимальный индекс контрастности отмечался через 45–60 минут, в опухоли крыс – начинался через 15 минут и сохранялся до 90 минут после введения ФС, максимальный индекс контрастности наблюдался через 60–75 минут, когда уровни накопления ФС в опухолях были значительно выше, чем в окружающих тканях.

На основании этого исследования было определено оптимальное время проведения лазерного облучения – лекарственно световой интервал (ЛСВИ): через 45–60 минут после внутривенного введения ФС мышам и через 60 – 75 минут крысам (Рисунок 2).

После проведения ФДТ возник выраженный отек мягких тканей в зоне облучения, что является закономерной реакцией на фотодинамическое повреждение опухоли с любыми известными ФС. Отек сопровождался гиперемией зоны облучения и окружающих мягких тканей. Наблюдалась альтерация тканей и формирование, в зависимости от размеров облучае-

мой поверхности, на 2–4 день после лечения, плотного струпа темного цвета.

До 21 суток после фотодинамического воздействия (с дозой ФС 5,0 мг/кг и параметрами лазерного воздействия: $E = 150 \text{ Дж/см}^2$; $P_s = 0,48 \text{ Вт/см}^2$) на карциному Эрлиха мышей наблюдался ингибирующий эффект у всех опытных животных, который сохранялся до трёх месяцев у 100 % животных. При уменьшении дозы ФС до 2,5 мг/кг при тех же параметрах лазерного излучения до 21 суток после лечения отмечалась полная регрессия опухоли. В дальнейшем у некоторых животных наблюдались рецидивы опухоли, тем не менее, на 90 сутки после терапии процент излеченных животных составил 66,6 % (Таблица 2), и у 33,4 % мышей с рецидивами опухоли увеличилась продолжительность жизни на 45 % по сравнению с контролем (Таблица 3).

После ФДТ саркомы М-1 со следующими параметрами: дозы ФС 2,5 и 5,0 мг/кг, доза света: $E = 150 \text{ Дж/см}^2$; $P_s = 0,48 \text{ Вт/см}^2$ до 90 суток после терапии отмечалась полная регрессия опухоли у 100 % животных (Таблица 2).

Выводы

Новый препарат Гелиохлорин, производное хлорина e_6 , является эффективным фотосенсибилизатором. Проведение фотодинамической терапии экспериментальных злокачественных опухолей карциномы Эрлиха мышей и саркомы М-1 крыс показало высокую фотодинамическую активность препарата. Терапия, включающая внутривенное введение Гелиохлорина в дозе 5,0 мг/кг (мышам с карциномой Эрлиха) и 2,5 мг/кг (крысам с саркомой М-1) при соблюдении оптимального времени между введением препарата и проведением сеанса лазерного воздействия с плотностью мощности 0,48 Вт/см² и плотностью энергии 150 Дж/см², позволила достичь максимального лечебного эффекта – полной эрадикации опухолей у 100 % животных и отсутствия рецидивирования новообразований до 90 суток после лечения. Таким образом, показано, что Гелиохлорин обладает выраженной противоопухолевой активностью

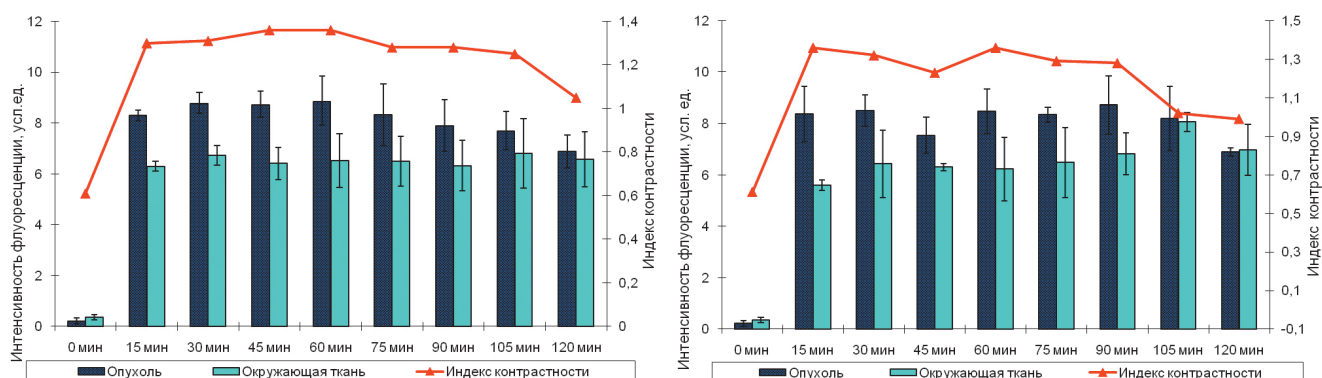


Рисунок 2. Динамика накопления гелиохлорина в опухоли и окружающей ткани бедра животных после его внутривенного введения в дозе 5,0 мг/кг: а) мыши; б) крысы. По оси абсцисс – срок после внутривенного введения ФС; по оси ординат: слева интенсивность флуоресценции, справа – индекс контрастности (красные линии на графиках).

Таблица 2. Показатели противоопухолевой эффективности ФДТ карциномы Эрлиха мышей и саркомы М-1 крыс с внутривенным введением препарата Гелиохлорин (параметры лазерного воздействия $E = 150$ Дж/см²; $P_s = 0,48$ Вт/см²)

№ гр.	Доза ФС, мг/кг	Срок наблюдения, сутки			
		7	14	21	90
Карцинома Эрлиха мышей					
1	2,5		(3 и 4) 100 %		(5) 66 %
2	5,0		(3 и 4) 100 %		(5) 100 %
контроль	V	0,09±0,02	0,94±0,16	4,05±2,43	-
	K	3,1±0,9	10,7±3,2	49,2±30,7	-
Саркома М-1 крыс					
1	2,5		(3 и 4) 100 %		(5) 100 %
2	5,0		(3 и 4) 100 %		(5) 100 %
контроль	V	2,7±0,5	10,2±2,1	17,1±4,2	-
	K	9,1±1,4	42,1±7,4	83,8±24,9	-

Примечание: (1) объем опухоли (V, см³); (2) коэффициент прироста опухоли у животных с продолженным ростом (K); (3) торможение роста опухоли (ТРО,%); (4) процент животных с полной регрессией опухоли (ПР); (5) процент излеченных животных.

Таблица 3. Средняя продолжительность жизни (СПЖ, сут) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) животных после ФДТ в сравнении с контролем.

Доза ФС, мг/кг	СПЖ	УПЖ
Мыши		
2,5	86,0±4,0	45 %
5,0	>90	>100*
Контроль	59,3±3,0	-
Крысы		
2,5	>90	>100*
5,0	>90	>100*
Контроль	37,3±2,2	-

* значимое увеличение продолжительности жизни у животных с ростом опухоли по сравнению с контролем (УПЖ ≥ 50 %); >90 сут и >100 % животные с полной регрессией опухоли, без рецидивирования до 90 суток после ФДТ, выведены из эксперимента с помощью эфирного наркоза.

для фотодинамической терапии при введении в более низких дозах и при меньших параметрах лазерного воздействия, чем у других известных препаратов хлорофинового ряда, применяемых в клинической практике.

References

Список литературы

1. Yakubovskaya R.I., Morozova N.B., Pankratov A.A. *et al. Russ. J. Gen. Chem.* **2015**, 85, 217–239.
2. Allison R.R., Moghissi K. *Clin. Endosc.* **2013**, 46, 24–29.

3. Abakushina E.V., Romanko Yu.S., Kaplan M.A., Kaprin A.D. *Radiation and Risk* **2014**, 23(4), 92–98 (in Russ.).
4. Sharma K., Mroz P., Dai T. *et al. Isr. J. Chem.*, **2012**, 52, 691–705.
5. Zhang J., Jiang C., Longo J.P.F. *et al. Acta Pharmaceutica Sinica B* **2018**, 8, 137–146.
6. Brusov S.S., Efremenko A.V., Lebedeva V.S. *et al. Russ. Biotherapeutic J.* **2015**, 14, 87–92.
7. Krysko D.V., Garg A.D., Kaczmarek A., Krysko O. *Nature Reviews Cancer* **2015**, 12, 860–875.
8. Lange C., Bednarski P.J. *Curr. Pharm. Des.* **2016**, 22, 6956–6974.
9. Gamayunov S.V., Grebenkina E.V., Ermilina A.A. *et al. Clinical Medicine* **2015**, 7(2), 75–82.
10. Machinskaya E.A., Ivanova-Radkevich V.I. *Photodynamic Therapy and Photodiagnosics* **2013**, 4, 19–23 (in Russ.).
11. Zorina T.E., Kravchenko I.E., Koblov I.V. *et al. Amino derivatives of chlorin e_6 – effective photosensitizers for photodynamic therapy. In: Physico-chemical biology as the basis of modern medicine: proc. report Rep. conf. with international participation, Part 1* (Khrustalev V.V., Khrustaleva T.A., Eds.) Minsk. **2019**. p. 113–114 [Зорина Т.Е., Кравченко И.Е., Коблов И.В., др. В кн.: Физико-химическая биология как основа современной медицины: тез. докл. Респ. конф. с междунар. участием, Минск, 24 мая 2019 г., Ч. 1 (Хрусталёв В.В., Хрусталёва Т.А., ред.) Минск, **2019**. с. 113–114].
12. Ponomarev G.V., Koifman O.I., Shestakov V.N. *Patent RF No. 2523380 C1* **2014**.
13. Abramova O.B., Drozhzhina V.V., Churikova T.P. *et al. Biomedical Photonics* **2021**, 10(3), 12–22.
14. Rostovtsev N.M., Kotlyarov A.N., Polyakov V.G., Nosov V.S. *Oncolog* **2015**, 3(2), 212–215.
15. Gardouh A.R., Barakat B.M., Qushawy M.K.E. *et al. Chem. Biol. Interact.* **2018**, 295, 52–63.
16. Abramova O.B., Yuzhakov V.V., Kaplan M.A. *et al. Bull. Exp. Biol. Med.* **2021**, 170, 479–484.

Received 09.12.2021

Accepted 25.01.2022