

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ САРКОМЫ М-1 КРЫС ПОСЛЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ С ПРОИЗВОДНЫМ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА А

В.В. Южаков¹, Н.В. Бурмистрова¹, Н.К. Фомина¹, Л.Н. Бандурко¹, Л.Е. Севаньякаева¹, А.В. Старовойтова¹, Н.Д. Яковлева¹, М.Г. Цыганова¹, И.Э. Ингель¹, П.В. Островерхов², М.А. Каплан¹, М.А. Грин², А.Г. Мажуга^{3,4}, А.Ф. Миронов², В.Н. Галкин¹, Ю.С. Романко¹

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

²Московский технологический университет МИРЭА, Москва, Россия

³Национальный исследовательский технологический университет МИСиС, Москва, Россия

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Резюме

В работе описаны результаты изучения функциональной морфологии саркомы М-1 крыс после фотодинамической терапии с применением в качестве фотосенсибилизатора дисульфидного производного бактериопурпуринимида (дисульфид-БПИ). Методы исследования включали иммуноокрашивание на PCNA и CD31, определение митотической активности и апоптотической гибели опухолевых клеток, а также компьютерный анализ микроскопических изображений. Показано, что фотоиндуцированное противоопухолевое действие обусловлено разрушением сосудистого русла саркомы М-1, быстрым ингибированием пролиферативной активности и девитализацией опухолевых клеток путем апоптоза и некроза. Есть основания полагать, что в ранние сроки после фотодинамической терапии деструкция микроциркуляторного русла и фотоцитостатический шок опухолевых клеток с последующим развитием некроза обусловлены прямым воздействием светового потока на сенсибилизированные клеточные элементы паренхимы и стромы опухолей. Эффективность фотодинамической терапии с новым фотосенсибилизатором определяется последовательностью деструктивных и воспалительных изменений в паренхиме опухолей и окружающих тканях, а также репопуляционным потенциалом выживших после лечения опухолевых клеток.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, бактериохлорофилл а, дисульфидное производное бактериопурпуринимида, фотосенсибилизатор, саркома М-1, апоптоз, некроз, иммуногистохимия, PCNA, CD31.

Для цитирования: Южаков В.В., Бурмистрова Н.В., Фомина Н.К., Бандурко Л.Н., Севаньякаева Л.Е., Старовойтова А.В., Яковлева Н.Д., Цыганова М.Г., Ингель И.Э., Островерхов П.В., Каплан М.А., Грин М.А., Мажуга А.Г., Миронов А.Ф., Галкин В.Н., Романко Ю.С. Морфофункциональные характеристики саркомы М-1 крыс после фотодинамической терапии с производным бактериохлорофилла а // Biomedical Photonics. – 2016. – Т. 5, № 4. – С. 4–14.

Контакты: Южаков В.В., e-mail: yuzh_vad@mail.ru

MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF RAT SARCOMA M-1 AFTER PHOTODYNAMIC THERAPY WITH THE BACTERIOCHLOROPHYLL A DERIVATIVE

Yuzhakov V.V.¹, Burmistrova N.V.¹, Fomina N.K.¹, Bandurko L.N.¹, Sevanykaeva L.E.¹, Starovoytova A.V.¹, Yakovleva N.D.¹, Tsyganova M.G.¹, Ingel' I.E.¹, Ostroverkhov P.V.², Kaplan M.A.¹, Grin M.A.², Mazhuga A.G.^{3,4}, Mironov A.F.², Galkin V.N.¹, Romanko Yu.S.¹

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

²Moscow Technological University (MIREA), Moscow, Russia

³National University of Science and Technology MISiS, Moscow, Russia

⁴Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract

The study of the functional morphology of rat sarcoma M-1 after photodynamic therapy using bacteriopurpurinimide disulfide derivative (disulfide-BPI) as a photosensitizer is described. The research methods included immunohistochemistry for PCNA and CD31, evaluation of mitotic activity and apoptosis of tumor cells, as well as computer analysis of microscopic images. Photoinduced antitumor effect was shown to be due to the destruction of sarcoma M-1 vascular bed, the rapid inhibition of proliferative activity and devitalization of tumor cells by apoptosis and necrosis. It is reasonable to suppose that in the early stages after photodynamic therapy destruction of the microvasculature and photocytostatic shock of tumor cells with subsequent development of necrosis are caused by direct influence of the light flux on sensitized cellular elements in parenchyma and stroma of tumors. The efficiency of photodynamic therapy with the novel photosensitizer is determined by the sequence of destructive and inflammatory changes in tumor parenchyma and surrounding tissues, as well as repopulation potential of tumor cells survived after treatment.

Key words: photodynamic therapy, bacteriochlorophyll *a*, bacteriopurpurinimide disulfide derivative, photosensitizer, sarcoma M-1, apoptosis, necrosis, immunohistochemistry, PCNA, CD31.

For citations: Yuzhakov V.V., Burmistrova N.V., Fomina N.K., Bandurko L.N., Sevankaeva L.E., Starovoytova A.V., Yakovleva N.D., Tsyganova M.G., Ingel I.E., Ostroverhov P.V., Kaplan M.A., Grin M.A., Majouga A.G., Mironov A.F., Galkin V.N., Romanko Yu.S. Morphofunctional characteristics of rat sarcoma M-1 after photodynamic therapy with the bacteriochlorophyll *a* derivative, *Biomedical Photonics*, 2016, T. 5, No. 4, pp. 4–14 (in Russian).

Contacts: Yuzhakov V.V., e-mail: yuzh_vad@mail.ru

Введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ) представляет собой перспективный метод лечения целого ряда онкологических и неонкологических заболеваний [1, 2]. В основе механизма ФДТ лежит цитотоксическое действие синглетного кислорода и других высокоактивных биологических окислителей, которые образуются в ходе фотохимических реакций при межмолекулярном переносе энергии от возбужденного светом сенсibilизатора к кислороду ткани [3–5]. В деструкции опухолевых клеток ключевую роль играют три компонента ФДТ: фотосенсibilизатор (ФС), локальное облучение опухоли светом определенной длины волны, соответствующей пику поглощения сенсibilизатора, и кислород [1, 4, 5]. Известно, что на эффективность ФДТ влияют несколько факторов: доза ФС, временной интервал от его введения до светового воздействия, а также мощность дозы, плотность световой энергии и режим облучения [2, 6–8].

Считается, что для избирательного разрушения опухолей или для длительного сдерживания их роста при ФДТ требуется сочетание четырех основных факторов: гибель опухолевых клеток, разрушение сосудов опухолей, воспалительная реакция и иммунный ответ организма [9]. Кроме того, следует учитывать избирательность накопления ФС в паренхиме солидных опухолей в связи с особенностями их васкуляризации и формирования микроциркуляторного русла. Согласно результатам экспериментальных и клинических исследований, рост опухоли полностью зависит от неоваскуляризации, а сосудистые аномалии и формирующееся микроокружение не только способствуют прогрессии солидных неоплазий, но также могут привести к снижению эффективности химиотерапии, лучевой терапии и иммунотерапии [10, 11]. Не исключено, что аномальное кровоснабжение опу-

холи может также препятствовать адекватному накоплению и распределению в опухолях ФС.

При создании новых ФС для лечения крупных, глубокозалегающих опухолей особый интерес представляют производные бактериохлорофилла *a* с интенсивным поглощением в длинноволновой области спектра [12]. Так, в работе [13] показано, что ФДТ с использованием дипропоксидибактериопурпуринида в виде наноструктурированной водной дисперсии обеспечивает высокую противоопухолевую активность в системах *in vitro* и *in vivo*.

Целью данного исследования являлось изучение механизма действия ФДТ с применением в качестве ФС конъюгата, содержащего две молекулы дипропоксидибактериопурпуринида с остатком цистамина (дисульфид-БПИ), на морфофункциональные характеристики солидной соединительнотканной перевиваемой опухоли, а также анализ эффективности воздействия на деструкцию сосудов, пролиферативную активность и гибель клеток саркомы М-1. Для синтеза целевого соединения был взят О-пропилксим-N-пропоксидибактериопурпуринимид (дипропоксид-БПИ), полученный взаимодействием бактериопурпурина с пропоксиамином [14]. Взаимодействием дипропоксид-БПИ с цистамином в присутствии конденсирующего агента EEDQ (N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина) был получен дисульфид-БПИ, который был исследован в настоящей работе.

Материал и методы

Работа была выполнена на половозрелых самках белых беспородных крыс с имплантированной подкожно с внешней стороны левого бедра саркомой М-1 от животного-опухоленосителя. Перевивку саркомы и определение объема опухолей осуществляли по ранее описанной нами методике [15].

При достижении объемов опухолей 0,8–1,5 см³ животных методом рандомизации распределяли на две группы – контрольную и опытную (по 15 особей в каждой). Дисульфид-БПИ вводили крысам опытной группы внутривенно из расчета 2,5 мг/кг массы тела. ФДТ проводили в период максимального индекса контрастности опухоль/здоровая ткань – через 2,5–3,0 ч после введения ФС. Для лазерного облучения использовали терапевтический полупроводниковый лазер «Латус» (длина волны излучения 810 нм). Плотность энергии лазерного облучения составляла 300 Дж/см², плотность мощности – 0,51 Вт/см². После проведения ФДТ животных выводили из опыта через 3 ч, 1 и 3 сут по 5 особей на каждый срок для изучения функциональной морфологии саркомы М-1.

Опухоли животных контрольной группы не подвергались воздействиям.

Опухолевые узлы выделяли под тиопенталовым наркозом. Ткань опухоли в виде пластинок, ориентированных вдоль длинной оси, фиксировали в течение 24 ч в кислой жидкости Буэна, обезвоживали и заливали в «Гистомикс». Общую гистологию саркомы М-1 изучали на срезах толщиной 5 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином. Иммуногистохимические (ИГХ) исследования на серийных срезах проводили методом биотин-экстравидин-пероксидазного комплекса с использованием моноклональных мышинных антител к ядерному антигену пролиферирующих клеток – PCNA (клон PC10, «Thermo Fisher scientific», 1:200), конъюгированных с биотином, и поликлональных кроличьих антител к маркеру эндотелия – адгезионной молекулы тромбоцит/эндотелиальной клетки-1 – PECAM-1 (CD31, М-20-R, «Santa Cruz», 1:20).

Эндогенную пероксидазу блокировали в 3%-ом растворе перекиси водорода. В блокирующий буфер добавляли 1% бычьего сывороточного альбумина и 0,1% Тритона X-100. До нанесения антител к PCNA депарафинированные срезы, погруженные в цитратный буфер (рН 6,0), прогревали в микроволновой печи (5 мин, 720 Вт). В растворе первичных антител препараты инкубировали в течение ночи во влажной камере при 4°C с последующей промывкой в буферном растворе. Для визуализации PCNA после нанесения биотинилированных первичных антител и отмывки препаратов в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) на срезы наносили экстравидин-пероксидазный комплекс («Sigma», 1:400). Для ИГХ выявления эндотелия сосудистого русла с антителами к CD31 применяли биотинилированные козы антитела к кроличьим IgG (BA-1000, «Vector Lab», 1:250) и экстравидин-пероксидазный комплекс («Sigma», 1:400). Субстратную пероксидазу проявляли диаминобензидином (Liquid DAB+, «Dako»). Оптимальные условия иммуноокрашивания определяли по соотношению интенсивности иммуноположительной реакции к «фону».

Гистологические препараты изучали в микроскопе Leica DM 1000 с микрофотосъемкой на цифровую камеру Leica ICC50 HD. Интегральные показатели рассчитывали с помощью системы компьютерного анализа микроскопических изображений [16] с применением прикладной лицензионной программы AnalySIS 5.0 (Soft Imaging System GmbH, Германия) согласно основным принципам стереологии в морфометрии.

В работе использовали следующие параметры: объемное содержание паренхимы опухолей (Vv_{PO} , %) и некроза ($Vv_{НЕКРОЗА}$, %) как отношение суммарных площадей жизнеспособной паренхимы и зон некроза/деструкции ткани, соответственно, при окрашивании срезов гематоксилином и эозином к общей площади среза опухолевого узла; объемное содержание опухолевой ткани с пролиферирующими клетками (Vv_{PCNA} , %) по отношению суммарной площади PCNA-положительной паренхимы к общей площади среза опухолевого узла.

Относительную фракцию пролиферирующих клеток в паренхиме опухоли рассчитывали по формуле:

$$\Phi_{PCNA} (\%) = Vv_{PCNA} / Vv_{PO} \times 100$$

Митотический индекс и индекс апоптоза в зонах роста опухолевых узлов определяли по стандартной методике [17] при иммерсионном увеличении микроскопа при подсчете не менее 3000 ядер клеток.

Ангиоархитектуру саркомы М-1 и распределение микрососудов в паренхиме опухолей при иммуноокрашивании на CD31 оценивали согласно принципам, описанным в работах [18, 19]. Качественные характеристики сосудов определяли в перитуморальной области и в так называемых «горячих точках» («hot spots»), представляющих зоны солидного строения паренхимы опухоли, содержащие наибольшее количество капилляров и мелких венул, т.е. участки наиболее интенсивной неоваскуляризации. Перитуморальная область включала периферический край опухолей и окружающую их соединительную ткань.

Для оценки уровня значимости межгрупповых различий полученных показателей использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Статистическую обработку полученных результатов выполняли с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США). Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

У животных контрольной группы паренхима саркомы М-1 имела, в основном, солидный тип строения с оксифильными участками спонтанного некроза в центральных отделах опухолевых узлов (рис. 1а). Иногда разветвленные поля некроза, ограничен-

ные локусами кровоизлияний и плазморрагии, распространялись до кожных покровов с появлением над опухолью щелевидных полостей, заполненных гомогенным эозинофильным содержимым. В зонах солидного строения полиморфные клетки саркомы веретеновидной или неправильной формы были плотно упакованы (рис. 1б). В полях зрения наблюдали относительно многочисленные фигуры митоза и единичные клетки, погибающие путем апоптоза. В зонах роста, расположенных в области подкожной

клетчатки и на границе с подлежащими мышцами, паренхима саркомы М-1 контурировалась за счет иммуноокрашивания ядер опухолевых клеток на PCNA. Был отчетливо выражен градиент снижения интенсивности иммуноокрашивания на ядерный антиген пролиферирующих клеток от периферии к центру опухолевых узлов (рис. 1г). Опухолевые клетки с интенсивной положительной реакцией их ядер на этот циклин концентрировались вокруг сосудов (рис. 1д).

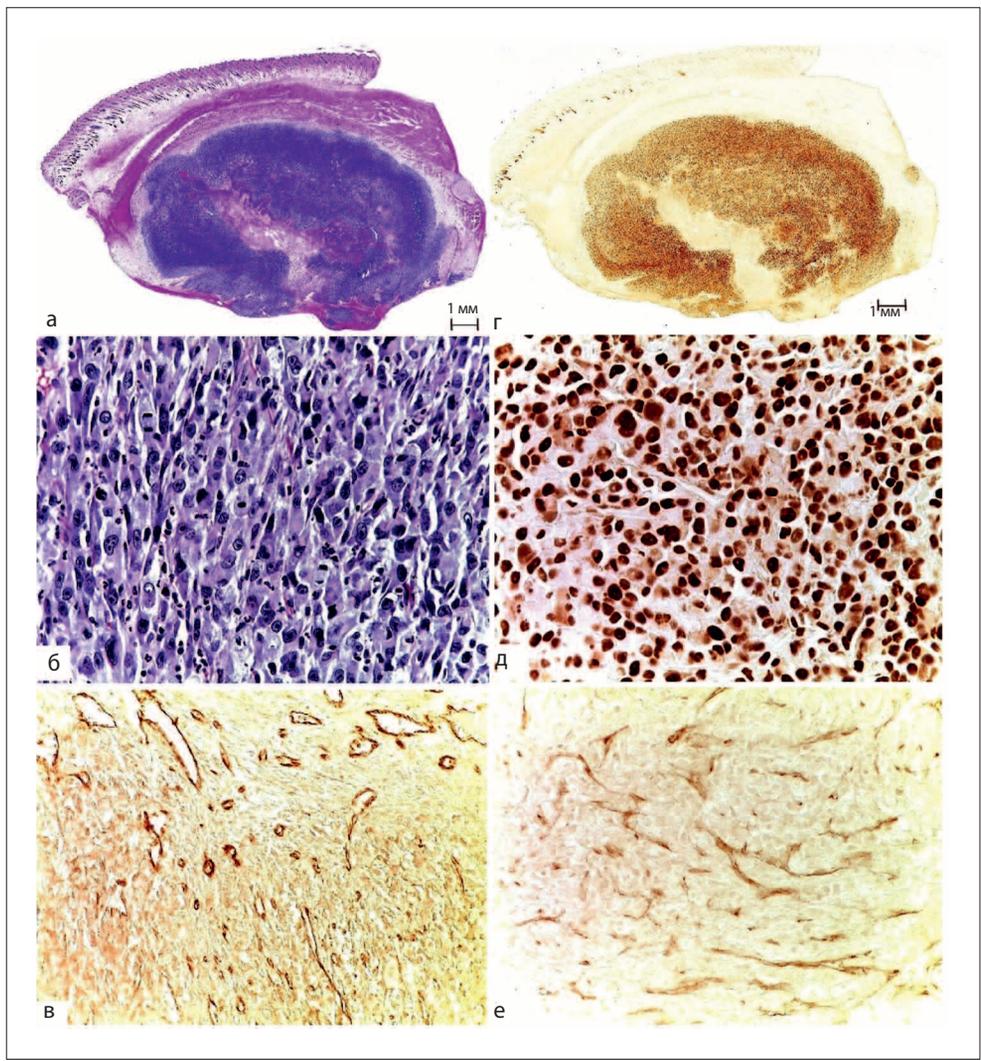


Рис. 1. Гистологический рисунок и функциональная морфология саркомы М-1 в контроле: а, б – окрашивание гематоксилином и эозином; в – иммуноокрашивание эндотелия сосудов с антителами к CD31 в перитуморальной зоне; г, д – иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA; е – иммуноокрашивание эндотелия сосудов с антителами к CD31 в «горячей точке» паренхимы. Увеличение: ×125 (в, е); ×250 (б, д)

Fig. 1. Histological pattern and functional morphology of sarcoma M-1 in the control group: а, б – hematoxylin and eosin staining; в – vascular endothelial immunostaining with anti-CD31 antibodies in peritumoral area; г, д – immunohistochemical reaction of cell nuclei with anti-PCNA antibodies; е – vascular endothelial immunostaining with anti-CD31 antibodies in a «hot spot» of parenchyma. Magnification: ×125 (в, е); ×250 (б, д)

В перитуморальной зоне микроциркуляторное русло состояло из тонкостенных сосудов капиллярного и синусоидного типа. От венул, располагающихся в здоровой ткани, ответвлялись капиллярные петли, растущие в паренхиму опухоли. Сосуды, растущие в паренхиму, были местами расширены, выстланы уплощенным эндотелием с реакцией их ядер на PCNA. На срезах, иммуноокрашенных на CD31, отчетливо определялась выраженная неоднородность распределения в перитуморальной области и в паренхиме кровеносных сосудов. Наиболее васкуляризированной выглядела периферия опухолей, прилегающая к подкожной клетчатке (рис. 1в). В немногочисленных «горячих точках» солидного строения паренхимы были видны уплощенные, часто разветвленные микрососуды (рис. 1е). На серийных срезах просматривалось соответствие между зональной «плотностью» капиллярного русла в паренхиме саркомы М-1 и интенсивностью реакции ядер опухолевых клеток на PCNA.

Результаты количественного анализа исследованных параметров саркомы М-1 у животных контрольной группы представлены в табл.

Макроскопически через 3 ч после ФДТ границы опухолей были стерты из-за отека тканей. На поверхности кожи над опухолями появлялась неярко выраженная эритема. На обзорных препаратах под кожей над опухолями был виден массивный экссудативный выпот, а в окружающей их мышечной ткани – обширные полости, заполненные гомогенным эозинофильным содержимым (рис. 2а). Паренхима опухолевой ткани выглядела «разрыхленной» и менее интенсивно окрашенной гематоксилином и эозином с неравномерным снижением иммуноокрашивания на PCNA (рис. 2г). По патоморфологическим критериям значительная часть опухолевых клеток находилась в состоянии цитотоксического шока с характерным уплотнением кардио- и цитоплазмы и появлением межклеточных щелей, так называемый

Таблица

Количественные характеристики исследованных параметров саркомы М-1 в контроле и после ФДТ с дисульфид-БПИ (M±m)

Table

Quantitative characteristics of the studied parameters of sarcoma M-1 in control and after PDT with disulfide-BPI (M±m)

Показатель Index	Группа Group	Время после ФДТ Time after PDT		
		3 ч 3 hour	1 сут 1 day	3 сут 3 days
Объем опухолей, см ³ Tumor's size, cm ³	Контроль Control	0,94±0,09	1,22±0,18	1,60±0,26
	ФДТ PDT	1,14±0,14	1,13±0,18	0,59±0,09*
Объемное содержание паренхимы опухолей, при окрашивании гематоксилином и эозином, % The volume content of tumor parenchyma by hematoxylin and eosin staining, %	Контроль Control	66,1±4,7	68,5±5,5	69,7±3,6
	ФДТ PDT	61,6±9,0	39,3±11,0*	23,4±6,3**
Объемное содержание зон некроза, % The volume content of necrosis areas, %	Контроль Control	33,9±4,7	31,5±5,5	30,3±3,6
	ФДТ PDT	38,4±9,0	60,7±11,0*	76,6±6,3**
Объемное содержание PCNA-положительных клеток в паренхиме опухолей (F _{PCNA}), % The volume content of PCNA-positive cells in tumor parenchyma (F _{PCNA}), %	Контроль Control	78,2±2,0	71,1±2,5	80,7±3,1
	ФДТ PDT	56,9±7,8*	26,1±11,2**	38,0±12,4**
Митотический индекс, % Mitotic index, %	Контроль Control	1,98±0,08	1,90±0,20	1,84±0,04
	ФДТ PDT	1,62±0,04*	1,18±0,23*	1,84±0,11
Индекс апоптоза, % Apoptosis index, %	Контроль Control	0,34±0,02	0,29±0,02	0,31±0,02
	ФДТ PDT	0,58±0,06**	0,39±0,04	0,43±0,01

*p<0,05; ** p<0,01 по сравнению с соответствующим контролем

*p<0,05; ** p<0,01 compared with the corresponding control

«shrink effect» – эффект сжатия опухолевых клеток. При этом цитоплазма опухолевых клеток выглядела конденсированной, а их ядра имели гиперхромный вид (рис. 2б). Опухолевые клетки были диссоциированы друг от друга, либо соединены между собой в небольшие группы, между которыми были видны широкие оптически прозрачные щели. Кроме того, вдоль разрушающихся сосудов появлялись островки клеток в ранней стадии коагуляционного некроза. В отдельных участках опухолей сохраня-

лись фрагменты паренхимы с реакцией ядер клеток на PCNA (рис. 2д).

Гистологические исследования показали, что большинство сосудов в паренхиме опухолей и окружающих их тканях были паретически расширены и заполнены стазируемыми эритроцитами. В стенках кровеносных сосудов определялись набухание, вакуолизация и гибель эндотелия. Соединительная ткань была отечна, пропитана плотными эозинофильными массами и инфильтрирована клетками

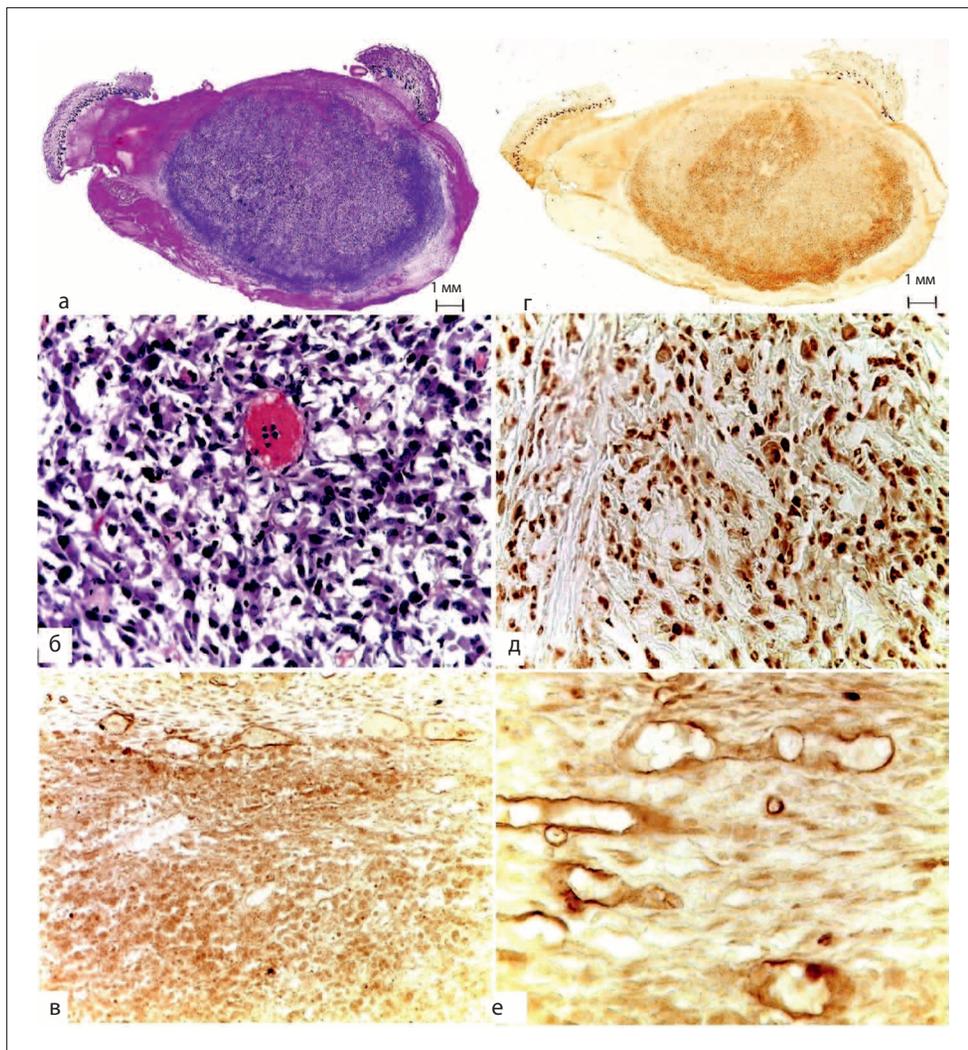


Рис. 2. Функциональная морфология саркомы М-1 через 3 ч после ФДТ с дисульфид-БПИ: а, б – окрашивание гематоксилином и эозином; в – иммуноокрашивание эндотелия сосудов с антителами к CD31 в перитуморальной зоне; г, д – иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA; е – иммуноокрашивание эндотелия сосудов с антителами к CD31 в «горячей точке» паренхимы Увеличение: $\times 125$ (в); $\times 250$ (б, д, е)

Fig. 2. Functional morphology of sarcoma M-1 3 hours after PDT with disulfide-BPI: а, б – hematoxylin and eosin staining; в – vascular endothelial immunostaining with anti-CD31 antibodies in peritumoral area; г, д – immunohistochemical reaction of cell nuclei with anti-PCNA antibodies; е – vascular endothelial immunostaining with anti-CD31 antibodies in a «hot spot» of parenchyma Magnification: $\times 125$ (в); $\times 250$ (б, д, е)

воспалительного инфильтрата. Местами видны были кровоизлияния. Эндотелий сосудов в перитуморальной области давал неравномерное «пунктирное» иммуноокрашивание на CD31 (рис. 2в). В солидных участках паренхимы контуры сосудов были расплывчатые, местами не определялись (рис. 2е). И лишь в зоне локализации «выживших» опухолевых клеток капиллярная сеть была изменена мало.

По данным морфометрии, через 3 ч после ФДТ значение Φ_{PCNA} в паренхиме опухолей статистически значимо снизилось в 1,4 раза относительно соответствующего контроля (табл.). В участках паренхимы с пролиферирующими опухолевыми клетками было зарегистрировано уменьшение их митотической активности на 20% и повышение индекса апоптотической гибели в 1,7 раза.

Через 1 сут после ФДТ усиливался отек облученных тканей, а кожа приобретала серовато-синюшный цвет. На обзорных препаратах обширные зоны опухолей были представлены полями дистрофически измененной и некротизированной ткани с кровоизлияниями и очагами плазматического пропитывания (рис. 3а). В некоторых случаях глубина повреждения достигала основания опухолевых узлов. Фрагменты саркомы М-1 с пролиферирующими клетками сохранялись в виде узких полосок на границе с подкожной клетчаткой и небольших разветвленных островков в основании опухолей над подлежащими мышцами (рис. 3г). Значительная часть опухолевой ткани была представлена полями некроза с эозинофильными контурами погибших сосудов (рис. 3б). Однако при ИГХ окрашивании на PCNA было видно, что в отдельных участках выжившие после ФДТ опухолевые клетки сохраняли репопуляционный потенциал (рис. 3д). Результаты иммуноокрашивания на CD31 свидетельствовали, что разрушение тканевых структур саркомы М-1 отчетливо связано с деструкцией стенок сосудистого русла (рис. 3в,е).

Согласно результатам анализа микроскопических изображений, через 1 сут после ФДТ с дисульфид-БПИ статистически значимо относительно контроля снижались содержание жизнеспособной паренхимы, Φ_{PCNA} и митотическая активность опухолевых клеток в 1,7, 2,7 и 1,6 раз, соответственно.

Через 3 сут после ФДТ на облученной коже над опухолями появлялись точечные поверхностные эрозии, покрытые тонкими струпами. Средний объем опухолевых узлов снизился в 2,7 раза относительно соответствующего контроля. В двух случаях наблюдали картину субтотальной деструкции опухолей. В трех опухолевых узлах паренхима саркомы М-1 была сохранена в виде отдельных тяжей и фрагментов, расположенных, в основном, по периферии, чаще над подлежащей мышечной тканью (рис. 4а). Выжившие на этот срок опухолевые клетки с реак-

цией их ядер на PCNA локализовались поблизости от прослоек соединительной ткани (рис. 4г).

При гистологическом исследовании между погибшей тканью и фрагментами сохранившейся паренхимы были видны опухолевые клетки в состоянии выраженной дистрофии. Часть клеток выглядели сжатыми и имели гиперхромный вид, другие подвергались лизису: цитоплазма практически не определялась, кариолема была истончена, а хроматин просматривался в виде мелких гранул или полностью отсутствовал. Однако в периферических зонах опухолей, прилегающих к соединительной ткани, опухолевые клетки не выглядели поврежденными (рис. 4б), а их ядра показывали интенсивное иммуноокрашивание на PCNA (рис. 4д).

Отчетливо визуализировалось начинающееся замещение зон фотодинамического повреждения грануляционной тканью с активным ангиогенезом и пролиферацией фибробластов. В сохранившиеся островки опухолевой ткани из разрастающихся прослоек соединительной ткани в паренхиму саркомы врастали многочисленные микрососуды (рис. 4в). На серийных срезах было видно, что как только капиллярная сеть достигала опухолевых клеток, последние начинали активно пролиферировать.

Через 3 сут после ФДТ содержание паренхимы опухолей снизилось до $23,4 \pm 6,3\%$ ($p < 0,01$ относительно контроля), однако значение Φ_{PCNA} увеличилось в 1,5 раза относительно предыдущего срока – до $38,0 \pm 12,4\%$. Повышение репопуляционной активности опухолевых клеток по PCNA и их митотического индекса свидетельствовали об усилении репаративных процессов, обусловленных, по-видимому, прорастанием капиллярных петель до выживших после ФДТ опухолевых клеток, восстановлением микроциркуляторного русла в ранее поврежденных участках и реоксигенацией паренхимы.

Одним из важных вопросов повышения эффективности ФДТ является выяснение причин выживания опухолевых клеток. По нашим наблюдениям, в ранние сроки после ФДТ в некоторых опухолях выжившие клетки локализируются поблизости от сохранившихся сосудов в перитуморальных пространствах. Есть основания полагать, что на избирательность накопления и достижение максимально эффективных концентраций ФС в опухолевой ткани влияют индивидуальные особенности ангиоархитектоники и физиологии солидных новообразований. Одной из причин, по которой опухолевые клетки могут избегать прямого повреждающего действия ФДТ является неравномерность распределения сенсibilизатора в достаточных концентрациях в отдельных участках быстрорастущих и склонных к спонтанной некротизации опухолей с аномальным кровоснабжением. Возможно, именно по этой при-

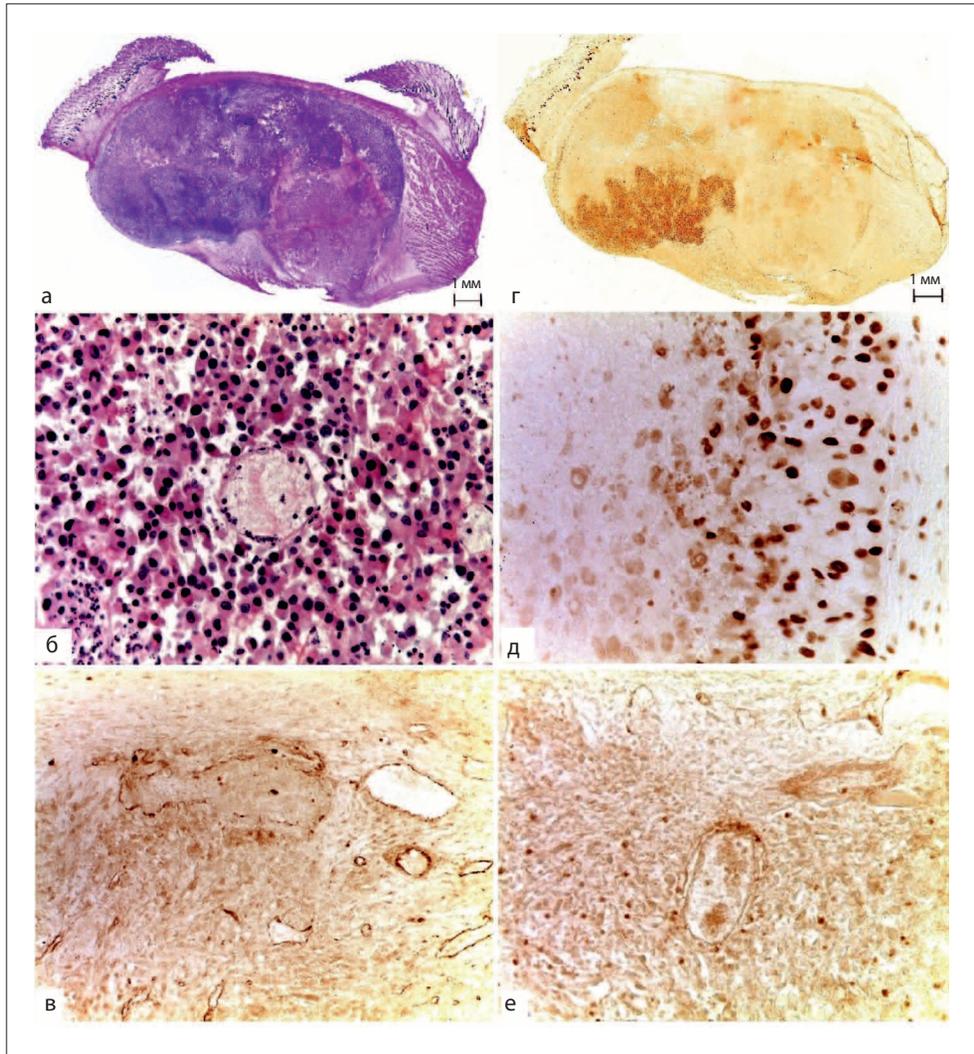


Рис. 3. Функциональная морфология саркомы М-1 через 1 сут после ФДТ с дисульфид-БПИ: а, б – окрашивание гематоксилином и эозином; в – иммуноокрашивание эндотелия сосудов с антителами к CD31 в перитуморальной зоне; г, д – иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA; е – иммуноокрашивание эндотелия сосудов с антителами к CD31 в «горячей точке» паренхимы Увеличение: ×125 (в); ×250 (б, д, е)

Fig. 3. Functional morphology of sarcoma M-1 1 day after PDT with disulfide-BPI: а, б – hematoxylin and eosin staining; в – vascular endothelial immunostaining with anti-CD31 antibodies in peritumoral area; г, д – immunohistochemical reaction of cell nuclei with anti-PCNA antibodies; е – vascular endothelial immunostaining with anti-CD31 antibodies in a «hot spot» of parenchyma Magnification: ×125 (в); ×250 (б, д, е)

чине в саркоме М-1, подвергнутой ФДТ, сохраняются выжившие опухолевые клетки, определяющие в последующем ее рецидивирование. В этой связи считаем целесообразным обратить особое внимание на необходимость усиления избирательности подведения используемого фотосенсибилизатора к опухолевым клеткам [20]. Активация гемодинамики в опухолях с неадекватным кровоснабжением до введения сенсibilизатора может дать два дополнительных фактора для усиления эффективности

ФДТ: более равномерное распределение препарата в паренхиме и насыщение опухолевой ткани кислородом, который необходим для фотохимических реакций.

Ранее мы отмечали [5], что характерной особенностью ФДТ является интенсивное развитие воспалительной реакции и быстрая элиминация погибших опухолевых клеток с замещением этих участков соединительной тканью. Этот процесс сопровождается активным неоваскуляризмом – образованием развет-

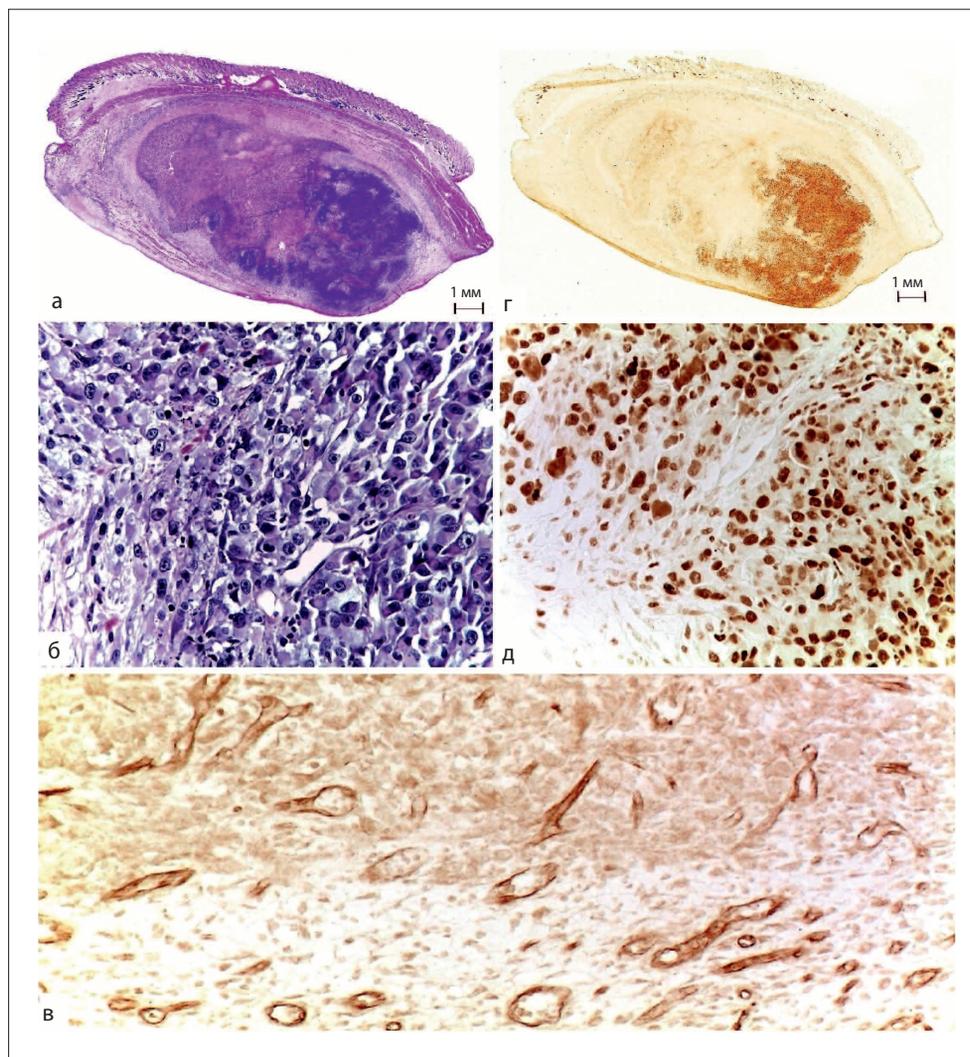


Рис. 4. Функциональная морфология саркомы М-1 через 3 сут после ФДТ с дисульфид-БПИ: а, б – окрашивание гематоксилином и эозином; в – иммуноокрашивание эндотелия сосудов с антителами к CD31 в перитуморальной зоне; г, д – иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA
 Увеличение: $\times 250$ (б, в, д)

Fig. 4. Functional morphology of sarcoma M-1 3 days after PDT with disulfide-BPI: а, б – hematoxylin and eosin staining; в – vascular endothelial immunostaining with anti-CD31 antibodies in peritumoral area; г, д – immunohistochemical reaction of cell nuclei with anti-PCNA antibodies
 Magnification: $\times 250$ (б, в, д)

вленной сети новых капилляров. Можно полагать, что ангиогенез в зонах сохранившихся жизнеспособными опухолевых клеток может способствовать их выживанию и/или активировать их пролиферацию. И не случайно в большинстве представлений о биологии злокачественных новообразований и их таргетного лечения особая роль отводится клеточным и молекулярным механизмам опухолевого ангиогенеза [21] и перспективам применения анти-

ангиогенных мероприятий при фотодинамической терапии [22, 23].

Заключение

Анализ полученных результатов свидетельствует, что дисульфид-БПИ обладает высокой фотодинамической активностью *in vivo* для ФДТ солидной соединительнотканной опухоли. Фотодинамическое действие нового фотосенсибилизатора обусловлено

разрушением сосудистого русла, быстрым ингибированием пролиферативной активности и девитализацией опухолевых клеток путем апоптоза и некроза. В ранние сроки после ФДТ деструкция микроциркуляторного русла и фотоцитостатический эффект в отношении опухолевых клеток с последующим развитием некроза обусловлены, по-видимому, прямым воздействием светового потока на сенсibilизированные дисульфид-БПИ клеточные элементы паренхимы и стромы опухолей. Зарегистрированное снижение пролиферативной активности опухолевых клеток по ИГХ реакции их ядер на PCNA также может быть обусловлено прямым действием продуктов фотохимических реакций используемого сенсibilизатора на соответствующие внутриклеточные структуры. В то же время нельзя исключить и возможный вклад гипоксии, быстро развивающейся в условиях

не только нарушения гемодинамики, но и расхода кислорода в процессе фотохимической реакции.

Согласно полученным данным, конечный результат ФДТ с дисульфид-БПИ определяется последовательностью деструктивных и воспалительных изменений в паренхиме опухолей и окружающих тканях, а также репопуляционным потенциалом выживших после лечения опухолевых клеток. Возможно, по причине неравномерности распределения сенсibilизатора в достаточно эффективной концентрации в отдельных слабо васкуляризованных участках саркомы М-1, подвергнутой ФДТ, сохраняются выжившие опухолевые клетки.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения дисульфид-БПИ для фотодинамической терапии солидных злокачественных новообразований.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант РНФ № 16-13-10092) и Российским фондом фундаментальных исследований (ОФИ-м № 15-29-01156 и № 16-03-00519 А).

ЛИТЕРАТУРА

1. Каплан М.А., Капинус В.Н., Попучиев В.В., и др. Фотодинамическая терапия: результаты и перспективы // Радиация и риск. – 2013. – Т. 22, № 3. – С. 115-123.
2. Филоненко Е.В., Серова Л.Г. Фотодинамическая терапия в клинической практике // Biomedical Photonics. – 2016. – Т. 5, № 2. – С. 26-37.
3. Pervaiz S. Reactive oxygen-dependent production of novel photochemotherapeutic agents // FASEB J. – 2001. – Vol. 15, No. 3. – P. 612-617.
4. Sibata C.H., Colussi V.C., Oleinick N.L., Kinsella T.J. Photodynamic therapy in oncology // Expert Opin. Pharmacother. – 2001. – Vol. 2, No. 6. – P. 917-927.
5. Каплан М.А., Романко Ю.С., Попучиев В.В., и др. Действие фотодинамической терапии с Фотодитазином на рост и функциональную морфологию саркомы М-1 // Лазерная медицина. – 2005. – Т. 9, № 4. – С. 41-47.
6. Каплан М.А., Романко Ю.С., Попучиев В.В., и др. Влияние плотности световой энергии на противоопухолевую эффективность фотодинамической терапии с Фотодитазином // Лазерная медицина. – 2005. – Т. 9, № 2. – С. 46-54.
7. Филоненко Е.В. Флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия – и фотодиагностика. – 2014. – Т. 3, № 1. – С. 3-7.
8. Акопов А.Л., Казаков Н.В., Русанов А.А., Карлсон А. Механизмы фотодинамического воздействия при лечении онкологических больных // Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. – 2015. – Т. 4, № 2. – С. 9-16.
9. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., et al. Photodynamic therapy // J. Natl. Cancer Inst. – 1998. – Vol. 90, No. 12. – P. 889-905.
10. Rak J.W., St. Croix B.D., Kerbel R.S. Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer therapy // Anticancer Drugs. – 1995. – Vol. 6, No. 1. – P. 3-18.
11. Goel S., Duda D.G., Xu L., et al. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases // Physiol Rev. – 2011. – Vol. 91, No. 3. – P. 1071-1121.

REFERENCES

1. Kaplan M.A., Kapinus V.N., Popuchiev V.V., Romanko Yu.S., Yaroslavtseva-Isaeva E.V., Spichenkova I.S., Shubina A.M., Borgul O.V., Goranskaya E.V. Photodynamic therapy: results and prospects, *Radiatsiya i risk*, 2013, Vol. 22, No. 3, pp. 115-123. (in Russian).
2. Filonenko E.V., Serova L.G. Photodynamic therapy in clinical practice, *Biomedical Photonics*, 2016, Vol. 5, No. 2, pp. 26-37. (in Russian).
3. Pervaiz S. Reactive oxygen-dependent production of novel photochemotherapeutic agents, *FASEB J.*, 2001, Vol. 15, No. 3, pp. 612-617.
4. Sibata C.H., Colussi V.C., Oleinick N.L., Kinsella T.J. Photodynamic therapy in oncology, *Expert Opin. Pharmacother.*, 2001, Vol. 2, No. 6, pp. 917-927.
5. Kaplan M.A., Romanko Yu.S., Popuchiev V.V., Yuzhakov V.V., Bandurko L.N., Fomina N.K., Mikhina L.N., Malygina A.I., Ingel' I.E. Action of photodynamic therapy with Photoditazin on the growth and functional morphology of sarcoma M-1, *Lazernaya meditsina*, 2005, Vol. 9, No. 4, pp. 41-47. (in Russian).
6. Kaplan M.A., Romanko Yu.S., Popuchiev V.V., Yuzhakov V.V., Bandurko L.N., Mikhina L.N., Fomina N.K., Malygina A.I., Ingel' I.E. Influence of the density of light energy on the antitumor efficiency of photodynamic therapy with Photoditazin, *Lazernaya meditsina*, 2005, Vol. 9, No. 2, pp. 46-54. (in Russian).
7. Filonenko E.V. Fluorescence diagnostics and photodynamic therapy: justification of applications and opportunities in oncology, *Biomedical Photonics*, 2014, Vol. 3, No. 1, pp. 3-7. (in Russian).
8. Akopov A.L., Kazakov N.V., Rusanov A.A., Karlson A. The mechanisms of photodynamic action for treating of cancer patients, *Biomedical Photonics*, 2015, Vol. 4, No. 2, pp. 9-16. (in Russian).
9. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbeklik M., Moan J., Peng Q. Photodynamic therapy, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1998, Vol. 90, No. 12, pp. 889-905.
10. Rak J.W., St. Croix B.D., Kerbel R.S. Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer therapy, *Anticancer Drugs*, 1995, Vol. 6, No. 1, pp. 3-18.
11. Goel S., Duda D.G., Xu L., Munn L.L., Boucher Y., Fukumura D., Jain R.K. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases, *Physiol Rev.*, 2011, Vol. 91, No. 3, pp. 1071-1121.

12. Grin M.A., Mironov A.F., Shtil A.A. Bacteriochlorophyll a and its derivatives: Chemistry and perspectives for cancer therapy // *Anti-Cancer Agents in Med. Chem.* – 2008. – Vol. 8, No. 6. – P. 683-697.
13. Пантюшенко И.В., Грин М.А., Якубовская Р.И., и др. Новый высокоэффективный ИК-фотосенсибилизатор для фотодинамической терапии рака // *Тонкие химические технологии.* – 2014. – Т. 9, № 3. – С. 3-10.
14. Чиссов В.И., Якубовская Р.И., Миронов А.Ф., и др. Препарат для фотодинамической терапии и способ фотодинамической терапии рака с его использованием // Патент России № 2521327. – 2014. – Бюлл. № 18.
15. Южаков В.В., Хавинсон В.Х., Кветной И.М., и др. Кинетика роста и функциональная морфология саркомы М-1 у интактных крыс и после гамма-облучения // *Вопр. онкол.* – 2001. – Т. 47, № 3. – С. 328-334.
16. Южаков В.В., Севаньяева Л.Е., Коноплянников А.Г., и др. Морфофункциональное изучение действия мезенхимальных стволовых клеток на саркому М-1 // *Молекулярная медицина.* – 2015. – № 1. – С. 39-45.
17. Южаков В.В., Севаньяева Л.Е., Ульяненко С.Е., и др. Эффективность фракционированного воздействия γ -излучения и быстрых нейтронов на саркому М-1 // *Радиационная биология. Радиоэкол.* – 2013. – Т. 53, № 3. – С. 267-279.
18. Weidner N., Semple J.P., Welch W.R., Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma // *N. Engl. J. Med.* – 1991. – Vol. 324, No. 1. – P. 1-8.
19. Al-Najar A., Al-Sanabani S., Korda J.B., et al. Microvessel density as a prognostic factor in penile squamous cell carcinoma // *Urol. Oncol.* – 2012. – Vol. 30, No. 3. – P. 325-329.
20. Южаков В.В., Каплан М.А., Кветной И.М. Функциональная морфология опухолей при действии лазерного и ионизирующего излучения. Перспективы применения низкоинтенсивных лазеров в комплексной противоопухолевой терапии // *Физическая медицина.* – 1993. – Т. 3, № 1-2. – С. 5-13.
21. Plate K.H., Scholz A., Dumont D.J. Tumor angiogenesis and antiangiogenic therapy in malignant gliomas revisited // *Acta Neuropathol.* – 2012. – Vol. 124, No. 6. – P. 763-775.
22. Ferrario A., von Tiehl K.F., Rucker N, et al. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma // *Cancer Res.* – 2000. – Vol. 60, No. 15. – P. 4066-4069.
23. Gomer C.J., Ferrario A., Luna M., et al. Photodynamic therapy: combined modality approaches targeting the tumor microenvironment // *Lasers Surg. Med.* – 2006. – Vol. 38, No. 5. – P. 516-521.
12. Grin M.A., Mironov A.F., Shtil A.A. Bacteriochlorophyll a and its derivatives: Chemistry and perspectives for cancer therapy, *Anti-Cancer Agents in Med. Chem.*, 2008, Vol. 8, No. 6, pp. 683-697.
13. Pantyushenko I.V., Grin M.A., Yakubovskaya R.I., Plotnikova E.A., Morozova N.B., Tsygankov A.A. Mironov A.F. The novel highly effective IR-photosensitized for photodynamic therapy of cancer, *Tonkiye khimicheskiye tekhnologii*, 2014, Vol. 9, No. 3, pp. 3-10. (in Russian).
14. Chissov V.I., Jakubovskaja R.I., Mironov A.F., Grin M.A., Plotnikova E.A., Morozova N.B., Tsygankov A.A. The drug for photodynamic therapy and method of photodynamic therapy for cancer, *Patent RF No. 2521327*, 2014.
15. Iuzhakov V.V., Khavinson V.Kh., Kvetnoi I.M., Fomina N.K., Kuznetsova M.N. Growth kinetics and functional morphology of M-1 sarcoma in rats before and after gamma-irradiation, *Vopr. Onkol.*, 2001, Vol. 47, No. 3, pp. 328-334. (in Russian).
16. IYuzhakov V.V., Sevan'kaeva L.E., Konoplyannikov A.G., Bandurko L.N., Konoplyannikov M.A., Ingel I.E., Fomina N.K., Tsyganova M.G., Kal'sina S.Sh. A morphofunctional study of mesenchymal stem cells' effects on sarcoma M-1, *Molekulyarnaya meditsina*, 2015, No. 1, pp. 39-45. (in Russian).
17. Iuzhakov V.V., Sevan'kaeva L.E., Ul'ianenko S.E., Iakovleva N.D., Kuznetsova M.N., Tsyganova M.G., Fomina N.K., Ingel' I.E., Lychagin A.A. The effectiveness of fractionated exposure of sarcoma M-1 to gamma-radiation and fast neutrons, *Radiats. Biol. Radioecol.*, 2013, Vol. 53, No. 3, pp. 267-279. (in Russian).
18. Weidner N., Semple J.P., Welch W.R., Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis — correlation in invasive breast carcinoma, *N. Engl. J. Med.*, 1991, Vol. 324, No. 1, pp. 1-8.
19. Al-Najar A., Al-Sanabani S., Korda J.B., Hegele A., Bolenz C., Herbst H., Jönemann K.P. Naumann C.M. Microvessel density as a prognostic factor in penile squamous cell carcinoma, *Urol. Oncol.*, 2012, Vol. 30, No. 3, pp. 325-329.
20. Yuzhakov V.V., Kaplan M.A., Kvetnoy I.M. Functional morphology of tumors exposed to laser and ionizing radiation. Prospects of the low level laser applications in complex antitumor therapy, *Fizicheskaya meditsina*, 1993, Vol. 3, No. 1-2, pp. 5-13. (in Russian).
21. Plate K.H., Scholz A., Dumont D.J. Tumor angiogenesis and antiangiogenic therapy in malignant gliomas revisited, *Acta Neuropathol.*, 2012, Vol. 124, No. 6, pp. 763-775.
22. Ferrario A., von Tiehl K.F., Rucker N, Schwarz M.A., Gill P.S., Gomer C.J. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma, *Cancer Res.*, 2000, Vol. 60, No. 15, pp. 4066-4069.
23. Gomer C.J., Ferrario A., Luna M., Rucker N., Wong S. Photodynamic therapy: combined modality approaches targeting the tumor microenvironment, *Lasers Surg. Med.*, 2006, Vol. 38, No. 5, pp. 516-521.