

## КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ В ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ПЕРВИЧНОЙ МЕЛАНОМЫ КОЖИ

Г.И. Гафтон, В.В. Анисимов, М.Л. Гельфонд, Ю.В. Семилетова,  
И.А. Балдуева, Т.Л. Нехаева, А.В. Новик, М.Ю. Мяснянкин

ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова» Минздрава РФ, г. Санкт-Петербург  
197758, г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 68, e-mail: mark.gelfond@gmail.com

### Аннотация

В экспериментально-клиническом исследовании проведена оценка эффективности неоадъювантной ФДТ с фотодитазином и радахлорином при лечении 42 больных первичной меланомой кожи I–III стадий. В контрольной группе хирургическое лечение по поводу МК получили 42 пациента. При анализе отдаленных результатов (2,5-летняя общая и безрецидивная выживаемость) установлено, что эти показатели в группе больных, получавших неоадъювантную ФДТ, значимо выше, чем в контрольной группе. Выявлено, что неоадъювантная ФДТ, проведенная за 2 дня до хирургического вмешательства, способствует активации Т- и В-клеточного звена иммунной системы. В экспериментальной части работы выявлено, что увеличение времени лазерного облучения культуры клеток меланомы сопровождается достоверным повышением доли поздних форм апоптоза.

**Ключевые слова:** первичная меланома, неоадъювантная ФДТ, апоптоз, иммунный ответ.

Меланома кожи (МК) представляет собой чрезвычайно актуальную проблему клинической онкологии. Заболеваемость МК в Российской Федерации составляет 5,65 на 100 тыс. населения, занимая по темпам прироста 3-е место. Эта нозологическая форма среди пациентов в возрасте 20–25 лет является четвертой по удельному весу среди всей онкопатологии [4]. Ежегодно 56,7 % больных меланомой кожи получают лечение по поводу местнораспространенного опухолевого процесса. Большинство из них в дальнейшем умирает от прогрессирования заболевания. Пятилетняя выживаемость составляет 35 % у мужчин и 53 % у женщин [5]. Столь низкие показатели эффективности лечения при меланоме кожи связаны с высоким риском микрометастазирования до и во время хирургического вмешательства. Это обстоятельство делает необходимым поиск новых методов системного и местного неоадъювантного лечения [6, 7].

Теоретические предпосылки и практический опыт последних лет делают перспективным использование у больных с локализованной формой МК неоадъювантной фотодинамической терапии (ФДТ). Хотя ФДТ в клинической практике используется с 60-х годов XX столетия, только в последнее время детальное изучение механизмов фотодинамического эффекта выявило реализацию 3 компонентов фотоповреждения опухолевых клеток: прямое цитотоксическое действие синглетного кислорода; повреждение эндотелия сосудов

опухоли с развитием ее ишемии и инициализацию иммунного ответа. Реакция иммунной системы в ответ на фотоиндуцированный апоптоз и некроз опухолевых клеток выражается в инфильтрации опухоли нейтрофилами и макрофагами и сопровождается выделением цитокинов и медиаторов. Активация Т-лимфоцитов приводит к уничтожению оставшихся опухолевых клеток [14, 35].

Однако на пути широкого клинического применения фотодинамической терапии существуют и определенные трудности, связанные с несколькими обстоятельствами. В ряде случаев эффективность фотодинамической терапии явно невысока, что одни авторы связывают с недостаточным накоплением фотосенсибилизаторов в опухоли или невозможностью доставки к опухолевым клеткам оптимальной дозы лазерного излучения из-за поглощения света меланином [3]. Другие исследователи указывают на опухоль-ассоциированную иммуносупрессию и дисфункцию антигенпрезентирующих клеток [2, 25].

Не подлежит сомнению, что единственным радикальным методом лечения первичных меланом кожи пока является хирургический, представляется оправданным стремление улучшить его результаты, в том числе за счет фотоиндуцированных системных реакций организма больного. Научным обоснованием этой работы стали недавние исследования, показавшие, что такие инициированные фотодинамической терапией процессы, как апоптоз опухолевых клеток, развитие острой

воспалительной реакции и распознавание CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами МНС I\* рестриктированных эпитопов опухолеассоциированных антигенов (ОАА), могут стать триггерным механизмом в активации противоопухолевого иммунного ответа [1, 15–17, 28, 29]. Кроме того, ФДТ обладает прямым цитотоксическим эффектом. Погибшие опухолевые клетки фагоцитируются, процессируются и презентуются макрофагами и дендритными клетками «наивным» Т-лимфоцитам в лимфатических узлах [20, 25].

**Целью исследования** явилось улучшение результатов лечения первичной меланомы кожи с помощью неoadьювантной фотодинамической терапии.

### Материал и методы

#### Методика экспериментального исследования

Для опытов *in vitro* использовали клеточную линию меланомы кожи человека (Mel 226), полученную в лаборатории клеточных технологий отделения химиотерапии и инновационных клеточных технологий и депонированную в Российском банке клеточных линий позвоночных. Фотосенсибилизатор Фотодитазин добавляли в культуральную среду в разных концентрациях: 1) 0,5 мкг/мл, 2) 1 мкг/мл (эквивалент дозе 1 мг/кг, рекомендованной в инструкции по применению Фотодитазина), 3) 2,5 мкг/мл. Через 30 мин проводили облучение культуры клеток лазерным излучением с длиной волны 662 нм с экспозицией на чашку Петри 6 и 10 мин. Суммарная доза облучения составила 40 Дж и 60 Дж. Анализ эффекта проводили через 1 и 4 ч после фотодинамического воздействия. Для этого к полученной суспензии клеток (1×10<sup>6</sup>/мл) добавляли аннексин V-FITC (Annexin V-FITC, FITC (Fluorescein Isothiocyanate) («BD», USA) и пропидиум йодид (PI (Propidium Iodide)) («BD», USA), инкубировали 15 мин в темноте при комнатной температуре. Подсчет клеток проводили с использованием флуоресцентного микроскопа («Carl Zeiss», Германия). Уровень апоптоза оценивали по апоптотическому индексу (АИ). Данный

параметр отражает относительное число клеток с характерными для апоптоза морфологическими или биохимическими признаками и определяется по следующей формуле:

$$AI = \frac{\text{Количество апоптотических клеток}}{\text{Общее количество клеток}} \times 100 \%$$

АИ учитывали отдельно для всех анализируемых клеток:

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

#### Методика клинического исследования

В исследование включено 84 больных локализованной меланомой кожи, получавших лечение в ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России с июля 2012 г. по декабрь 2014 г. Пациенты были разделены на 2 группы, полностью сопоставимые по всем клиническим параметрам. В 1-ю (контрольную) группу были включены 42 больных, которым проводилось хирургическое лечение по стандартной методике в объеме радикального вмешательства. Во 2-й (основной) группе (42 больных) первичная опухоль за 2 дня до операции подвергалась ФДТ с препаратами Фотодитазин или Радахлорин. Фотосенсибилизатор в дозе 0,8–1,0 мг/кг вводился внутривенно капельно в течение 30 мин в 200 мл 0,9 % раствора хлорида натрия. Через 2 ч после инфузии фотосенсибилизатора проводили флуоресцентное картирование накопления фотосенсибилизатора в опухоли, а затем ее лазерное облучение (662 нм, 400 Дж).

#### Методы определения

##### иммунокомпетентных клеток

Методом проточной цитометрии на приборе FACSCalibur (BD, США) оценивали количественное содержание субпопуляций лимфоцитов в периферической крови больных: Т-лимфоцитов CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>, Т-хелперов CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, активированных Т-хелперов CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup>, цитотокси-

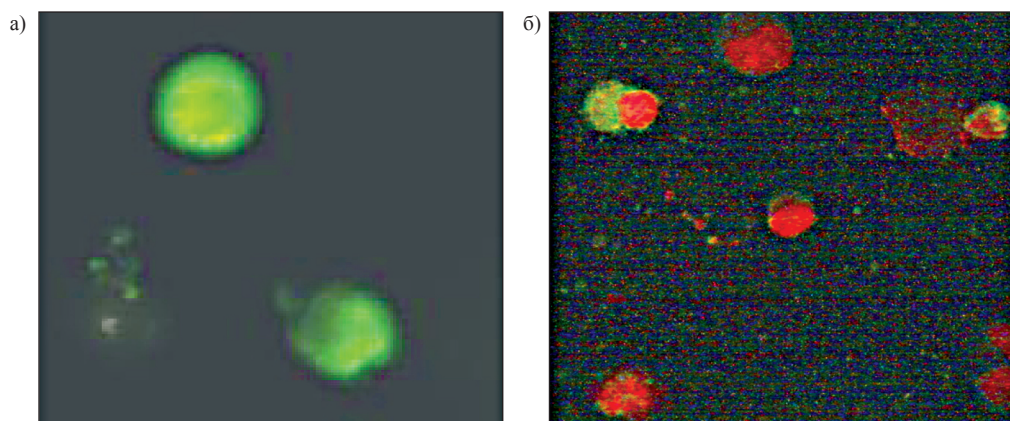


Рис. 1. Микрофото. Клетки на стадии «раннего» (а) и «позднего» апоптоза (б)

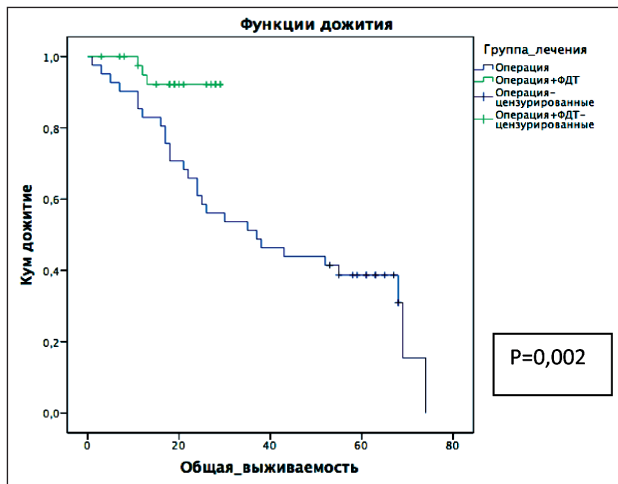


Рис. 2. Общая выживаемость больных первичной меланомой кожи в основной (ФДТ + операция) и контрольной (операция) группах

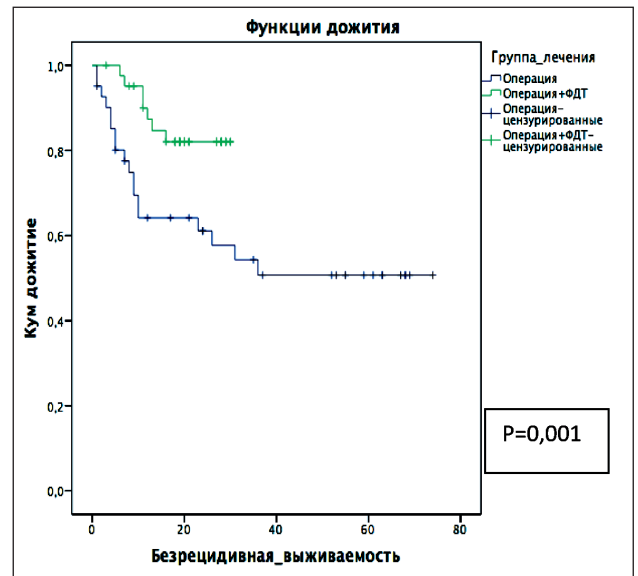


Рис. 3. Безрецидивная выживаемость больных первичной меланомой кожи в основной (ФДТ + операция) и контрольной (операция) группах

ческих Т-лимфоцитов (ЦТЛ)  $CD3^+CD8^+$ , двойных положительных Т-лимфоцитов  $CD4^+CD8^+$ , NK-клеток  $CD3^+CD16^+CD56^+$ . Для окрашивания клеток использовали панель МКА, меченных FITC (изоотиоцианат флуоресцеина), PE (фикоэритрин), PC5 (комплекс PE с цианином-5), PerCP (перидинин-хлорофилл протеин) или PerCP-Cy5.5 (комплекс PerCP с цианином 5.5) к белкам-маркерам (CD) клеточной мембраны лейкоцитов. Осуществляли регистрацию прямого светорассеяния (под углами  $1-10^\circ$ ) и бокового светорассеяния (под углом  $90^\circ$ ). В каждом образце анализировали не менее  $10^5$  клеток. Для оценки данных иммунофенотипического анализа использовали программное обеспечение CellQuest Pro (tm).

При анализе субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток учитывали абсолютное содержание Т-лимфоцитов ( $CD3^+CD19^-$ ), Т-хелперов ( $CD3^+CD4^+$ ), цитотоксических Т-лимфоцитов ( $CD3^+CD8^+$ ), двойных положительных Т-клеток ( $CD3^+CD4^+CD8^+$ ), В-лимфоцитов ( $CD19^+CD3^-$ ), активированных Т-хелперов ( $CD3^+CD4^+HLA\ DR^+$ ).

### Результаты исследования

При анализе уровня общей и безрецидивной выживаемости по методу Каплана–Мейера в сравниваемых группах установлено, что в группе больных МК, подвергшихся неoadъювантной фотодинамической терапии, эти показатели были значительно выше, чем в контрольной группе (рис. 2, 3).

При экспериментальной оценке уровня АИ в культуре клеток меланомы через 1 и 4 ч после ФДТ выявлено, что дозы фотосенсибилизатора 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл и 2,5 мкг/мл соответственно обладают сопоставимой способностью индуцировать ранний апоптоз (рис. 4, 5). При увеличении времени лазерного облучения происходит более быстрый переход фотосенсибилизированных опухолевых клеток в позднюю фазу апоптоза ( $p < 0,05$ ).

При оценке уровней основных субпопуляций лимфоцитов у больных МК в основной группе (неoadъювантная ФДТ + операция) выявлено, что на 7-е сут после лечения наблюдается статистически значимое повышение числа

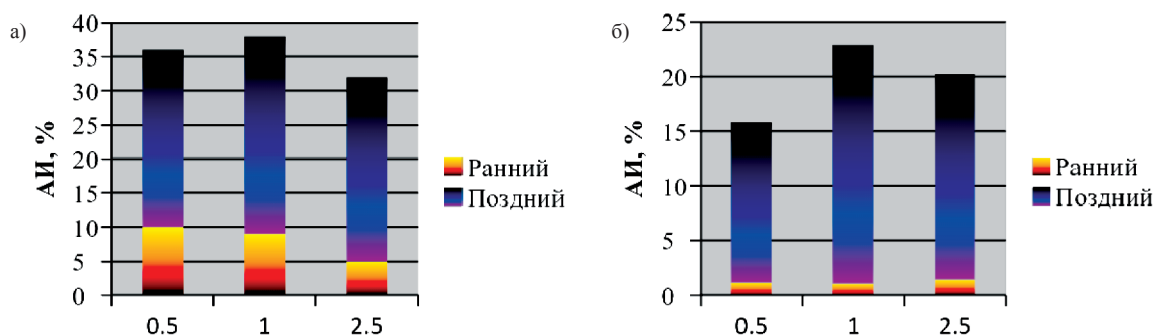


Рис. 4. Апоптотический индекс через 1 ч после ФДТ, экспозиция 6 мин (а) и 10 мин (б)

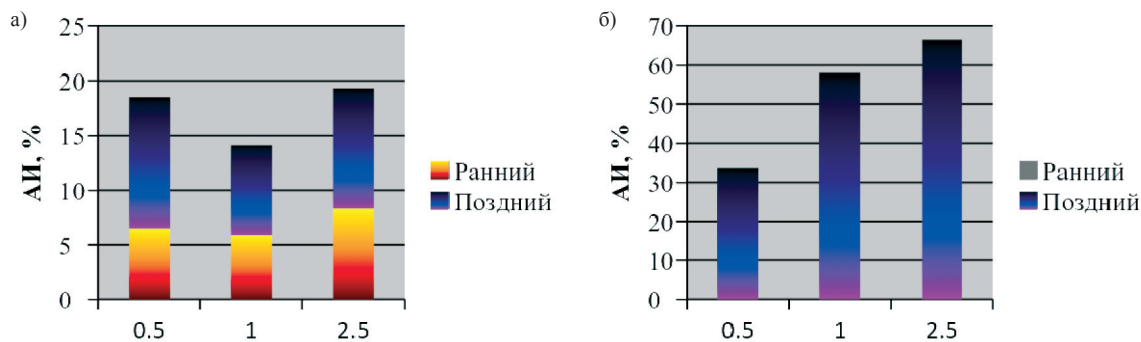


Рис. 5. Апоптотический индекс через 4 ч после ФДТ, экспозиция 6 мин (а) и 10 мин (б)

CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup> Т-лимфоцитов, двойных положительных CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Т- клеток, CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов, активированных Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup>), CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> NK-клеток в периферической крови (таблица). Полученные данные коррелируют с увеличением общей и безрецидивной выживаемости (рис. 2, 3) при назначении неoadъювантной ФДТ. У больных контрольной группы, получавших хирургическое лечение, подобные статистически значимые различия не были выявлены.

**Обсуждение**

Противоопухолевый эффект ФДТ обусловлен тремя взаимосвязанными процессами: прямой гибелью опухолевых клеток, повреждением сосудов и активацией неспецифического иммунного ответа [14, 35]. В то время как их общий вклад в результат лечения хорошо известен, относительную значимость каждого из этих механизмов определить трудно. Оптимизируя дозу света и фотосенсибилизатора, время облучения после введения фотосенсибилизатора, можно оценить их роль в общем ответе на фотодинамическое действие. Большинство экспериментальных данных свидетельствует о том, что при оптимальных режимах ФДТ опухолевые клетки некротизируются. Факторы, способствующие некрозу, включают экстрамитохондриальную (мембранную) локали-

зацию фотосенсибилизатора, высокие дозы света, гипогликемию [8, 21, 26]. Кроме того, после ФДТ на форму гибели клеток может влиять генотип клетки [37].

При глубокой локализации опухоли в тканях (с освещением субоптимальными дозами света в начале сеанса), а также при большом содержании меланина в тканях эффективность ФДТ может снижаться. При этом клетки опухоли способны восстанавливать повреждения, вызванные проводимой терапией. В этом случае выживший клон опухолевых клеток даст начало рецидиву (если не будут иметь место летальная ишемия или активация иммунного ответа). Однако развитие событий возможно и по другому сценарию, когда опухолевые клетки вступают в процесс апоптоза (программированной гибели). Апоптоз является жестко контролируемым, энергозависимым процессом программированной самоликвидации клеток при активации гидролитических ферментов, протеаз и нуклеаз, что приводит к фрагментации ДНК и деградации внутриклеточных структур [30].

Морфологически важнейшими элементами апоптоза являются конденсация хроматина, клеточная фрагментация и продукция апоптотических телец, которые поглощаются окружающими клетками и фагоцитами. После ФДТ с различными сенсибилизаторами и типами клеток апоптоз является быстрой и доминирующей формой

Таблица

**Содержание основных субпопуляций лимфоцитов в крови больных локализованной меланомой кожи до лечения и на 7-й день после операции**

Лимфоцитарный гейт	Абсолютное значение уровня лимфоцитов	
	До лечения (n=10)	После операции (n=32)
CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup>	0,349	0,019*
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	0,493	0,383
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0,419	0,026*
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	-	0,125
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	-	0,010*
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> HLADR <sup>+</sup>	-	0,050*
CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,227	0,002*

Примечание: \* - различия статистически значимы (p<0,05).

клеточной гибели [27]. Фотодинамическая терапия вызывает апоптоз двумя основными путями: митохондрий-опосредованный (внутренний) путь и рецептор-опосредованная гибель (внешний путь) [8]. Фотоиндуцированный апоптоз зависит также от отличных от внутреннего и внешнего клеточных сигнальных путей, таких как гомеостаз кальция, церамида и МАРК-киназ.

Поскольку ДНК кодирует генетическую информацию, любые повреждения, происходящие в геноме, способны создать крайне опасную ситуацию для клетки. Механизмы повреждений ДНК, индуцированных ФДТ, до конца не изучены, тем не менее известно, что она может привести к окислению оснований, полимеризации нитей ДНК или обмену родственными хроматидов (структурных элементов хромосом) [19, 23, 36].

В экспериментальном разделе нашего исследования после фотодинамического воздействия на культуру клеток меланомы зафиксирован ранний и поздний апоптоз. При этом индукция раннего апоптоза не зависела от концентрации фотосенсибилизатора и наблюдалась даже при минимальных дозах препарата. Однако при увеличении времени лазерного облучения и, соответственно, поглощенной дозы света происходил более быстрый переход фотосенсибилизированных опухолевых клеток в позднюю фазу апоптоза.

В отличие от еще только формирующихся представлений о влиянии ФДТ на процесс апоптоза, механизмы системного иммунного ответа кажутся в достаточной степени изученными. Вместе с тем значительно в меньшей степени известны принципы реализации местных иммунных реакций в коже. Неясно, как процессы апоптоза или некроза, развивающиеся в ответ на ФДТ, взаимосвязаны с характером и силой иммунного ответа. Согласно современным исследованиям, основными участниками иммунных реакций в кожных покровах являются клетки лимфоидного и макрофагального ряда [6]. Во многих работах ставилась задача найти взаимосвязь между механизмом гибели клеток и эффективностью иммунного ответа [9, 22]. Однако полученные данные носят противоречивый характер. В некоторых публикациях было показано, что сила иммунного ответа на клетки в состоянии апоптоза выше, чем на некротические клетки [31–33]. Другие авторы приводят результаты, свидетельствующие о более эффективном системном иммунном ответе на те методы терапии, которые индуцируют гибель клеток по типу некроза, поскольку в этом случае происходит разрушение плазматической мембраны и содержимое цитозоля попадает во внеклеточное пространство, провоцируя иммунный ответ [39].

Начало иммунной реакции при ФДТ сопровождается захватом опухолевого антигена незрелыми дендритными клетками. Этот процесс может проходить тремя путями: фагоцитоз погибающих клеток, захват фрагментов погибших клеток или

представление антигена в комплексе с внеклеточным белком теплового шока 70 (hps70) [18, 24, 34]. Hps70 образуют стабильные комплексы с цитоплазматическими антигенами опухолевых клеток, а затем связываются с рецепторами на поверхности дендритных клеток, что приводит к их активации и созреванию [38]. Зрелые дендритные клетки мигрируют в лимфатические узлы, где они представляют опухолевые антигены в комплексе с молекулами класса I и II МНС Т-лимфоцитам: цитотоксичным CD8<sup>+</sup> и хелперам CD4<sup>+</sup>. Для эффективной активации Т-лимфоцитов требуется наличие трех сигналов: распознавание антигена, стимулирующие сигналы, доставляемые молекулами CD28, OX40, 4-1BB, и освобождение цитокинов, отвечающих за силу иммунного ответа [13].

Активированные CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты мигрируют из лимфатических узлов к опухоли. Клетки CD8<sup>+</sup> непосредственно уничтожают опухолевые клетки, CD4<sup>+</sup> действуют опосредованно через другие клетки иммунной системы (NK и макрофаги). Иммунный ответ после ФДТ носит системный характер и распространяется не только на область первичного очага опухоли, но и на метастазы [10–12]. Кроме того, было высказано предположение, что реакция иммунной системы после ФДТ имеет продолжительное действие.

В нашем исследовании показано, что ФДТ при незначительной плотности мощности лазерного излучения приводит к иммуностимулирующему эффекту, и дальнейшее повышение концентрации ФС и увеличение времени облучения не имеют значения. Вследствие этого в клинической практике можно воздержаться от максимальных терапевтических доз фотосенсибилизатора, что позволяет снизить нежелательную световую фототоксичность.

Фотодинамическая терапия, действуя как локальная травма для биологического объекта, вызывает хемотаксис нейтрофилов и активацию С3 компонента комплемента. В результате опухолевая ткань инфильтрируется нейтрофилами, а под влиянием ряда цитокинов запускается множество каскадов иммунных реакций и стимулируются неспецифический и специфический иммунные ответы [15–17, 29]. Наши исследования показали, что при хирургическом лечении отмечалась активация Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>). При этом содержание Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), активированных Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup>), цитотоксических Т-эффекторов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), двойных положительных Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) не менялось. Напротив, неoadьювантная ФДТ активирует Т-клеточное звено иммунной системы (увеличение абсолютного содержания Т-хелперов CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) и В-клеточное звено (повышение числа CD19<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>). Отмечается тенденция к увеличению содержания активированных Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup>). Таким образом, наблюдается отчетливая активация как

T-клеточного, так и B-клеточного звена иммунной системы. Вероятнее всего, это происходит вследствие апоптоза, который запускает выраженный противоопухолевый иммунный ответ.

### Заключение

Таким образом, фотодинамическая терапия является одним из наиболее перспективных терапевтических методов, которые появились в онкологии за последние 30 лет. Несмотря на огромное количество научных статей, опубликованных на эту тему в последние годы, мы еще далеки от ясного понимания молекулярных механизмов гибели клеток

опухоли после фотодинамического воздействия. Опубликованные отчеты полны противоречивых результатов. Одной из возможных причин этих расхождений являются чрезвычайно сложные взаимодействия между светом, фотосенсибилизатором, молекулярным кислородом и внутриклеточными структурами. Будущие исследования должны быть комплексными и включать в себя анализ многих компонентов фотодинамического действия. Выяснение механизмов фотоиндуцированной клеточной гибели и влияния ФДТ на иммунную систему пациентов позволит создать более эффективные схемы лечения онкологических больных.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Балдуева И.А. Иммунологические особенности взаимоотношения опухоли и организма при меланоме // Практическая онкология. 2001. № 4 (8). С. 37–41.
2. Васильев Н.Е. Иммунологические аспекты фотодинамической терапии // Матер. науч.-практ. конф. «Применение полупроводниковых лазеров в медицине». СПб., 2006. С. 62.
3. Гейнциц А.В., Сорокатый А.Е., Ясудаев Д.М., Трухманов Р.С. Фотодинамическая терапия. История создания метода и ее механизмы // Лазерная медицина. 2007. Т. 11, № 3. С. 42–46.
4. Злокачественные новообразования в России в 2009 г. (заболеваемость и смертность) / Под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М., 2011. 260 с.
5. Мерабишвили В.М. Выживаемость онкологических больных. СПб., 2006. 438 с.
6. Михайлова И.Н., Иванов П.В., Петенко Н.Н., Барышников К.А., Морозова Л.Ф., Бурова О.С., Черемушкин Е.А., Субраманиан С., Чадауа К.З., Барышников А.Ю., Демидов Л.В. Внутрикожная клеточная реакция на фоне вакцинации меланомы кожи // Российский биотерапевтический журнал. 2010. Т. 9, № 1. С. 63–68.
7. Чернов В.И., Афанасьев С.Г., Синилкин И.Г., Тицкая А.А., Августинювич А.В. Радионуклидные методы исследования в выявлении «сторожевых» лимфатических узлов // Сибирский онкологический журнал. 2008. № 4. С. 5–10.
8. Almeida R.D., Mandas B.J., Carvalho A.P., Duarte C.B. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy // Biochim. Biophys. Acta. 2004. Vol. 1704. (2). P. 59–86.
9. Bartholomae W.C., Rininsland F.H., Eisenberg J.C., Boehm B.O., Lehmann P.V., Tary-Lehmann M. T cell immunity induced by live, necrotic and apoptotic tumor cells // J. Immunol. 2004. Vol. 173 (2). P. 1012–1022.
10. Chen B., Roskams T., Xu Y., Agostinis P., de Witte P.A. Photodynamic therapy with hypericin induces vascular damage and apoptosis in the RIF-1 mouse tumor model // Int. J. Cancer. 2002. Vol. 98 (2). P. 284–290.
11. Chen W.R., Korbelik M., Bartels K.E., Liu H., Sun J., Nordquist R.E. Enhancement of laser cancer treatment by a chitosan-derived immunoadjuvant // Photochem. Photobiol. 2005. Vol. 81 (1). P. 190–195.
12. Chen W.R., Zhu W.G., Dynlacht J.R., Nordquist R.E. Long-term tumor resistance induced by laser photo-immunotherapy // Int. J. Cancer. 1999. Vol. 81 (5). P. 808–812.
13. Cottrez F., Groux H. Specialization in tolerance: innate CD(4+) CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells // Transplantation. 2004. Vol. 77. Suppl. 1. S. 12–15.
14. Golab J., Wilczynski G., Zagodzón R., Stokłosa T., Dąbrowska A., Rybczyńska J., Wasik M., Machaj E., Ołda T., Kozar K., Kamiński R., Giermasz A., Czajka A., Lasek W., Feleszko W., Jakóbsiak M. Potentiation of the anti-tumor effects of Photofrin-based photodynamic therapy by localized treatment with G-CSF // Br. J. Cancer. 2000. Vol. 82 (8). P. 1485–1491.
15. Gollnick S., Evans S., Baumann H., Owczarczak B., Maier P., Vaughan L., Wang W.C., Unger E., Henderson B.W. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation // Br. J. Cancer. 2003. Vol. 88 (11). P. 1772–1779.
16. Gollnick S., Vaughan L., Henderson B. Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy // Cancer Res. 2002. Vol. 62 (6). P. 1604–1608.
17. Gollnick S.O., Brackett C.M. Enhancement of anti-tumor immunity by photodynamic therapy // Immunol. Res. 2010. Vol. 46 (1–3). P. 216–226. doi: 10.1007/s12026-009-8119-4.
18. Gomer C., Ryter S.W., Ferrario A., Rucker N., Wong S., Fisher A.M. Photodynamic therapy-mediated oxidative stress can induce expression of heat shock proteins // Cancer Res. 1996. Vol. 56 (10). P. 2355–2360.

19. Haylett A.K., Ward T.H., Moore J.V. DNA damage and repair in Gorlin syndrome and normal fibroblasts aer aminolevulinic acid photodynamic therapy: a comet assay study // Photochem. Photobiol. 2003. Vol. 78 (4). P. 337–341.
20. Huang Z., Xu H., Meyers A.D., Musani A.I., Wang L., Tagg R., Barqawi A.B., Chen Y.K. Photodynamic therapy for treatment of solid tumors-potential and technical challenges // Technol. Cancer Res. Treat. 2008. Vol. 7 (4). P. 309–320.
21. Kiesslich T., Plaetzer K., Oberdanner C.B., Berlanda J., Obermaier F.J., Krammer B. Differential effects of glucose deprivation on the cellular sensitivity towards photodynamic treatment-based production of reactive oxygen species and apoptosis-induction // FEBS Lett. 2005. Vol. 579 (1). P. 185–190.
22. Magner W.J., Tomasi T.B. Apoptotic and necrotic cells induced by different agents vary in their expression of MHC and costimulatory genes // Mol. Immunol. 2005. Vol. 42 (9). P. 1033–1042.
23. McNair F.I., Marples B., West C.M., Moore J.V. A comet assay of DNA damage and repair in K562 cells aer photodynamic therapy using haematoporphyrin derivative, methylene blue and meso-tetrahydroxyphenylchlorin // Br. J. Cancer. 1997. Vol. 75 (12). P. 1721–1729.
24. Mitra S., Goren E., Frelinger J., Foster T.H. Activation of heat shock protein 70 promoter with meso-tetrahydroxyphenyl chlorine photodynamic therapy reported by green fluorescent protein in vitro and in vivo // Photochem. Photobiol. 2003. Vol. 78 (6). P. 615–622.
25. Mroz P., Szokalska A., Wu M.X., Hamblin M.R. Photodynamic Therapy of Tumors Can Lead to Development of Systemic Antigen-Specific Immune Response // PLoS ONE. 2010. Vol. 5 (12). P. 151–194. doi: 10.1371/journal.pone.0015194.
26. Oberdanner C.B., Kiesslich T., Krammer B., Plaetzer K. Glucose is required to maintain high ATP-levels for the energy-utilizing steps during PDT-induced apoptosis // Photochem. Photobiol. 2002. Vol. 76 (6). P. 695–703.
27. Oleinick N., Morris R., Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: What, where, why and how // Photochem. Photobiol. Sci. 2002. Vol. 1 (1). P. 1–21.
28. Preise D., Oren R., Glinert I., Kalchenko V., Jung S., Scherz A., Salomon Y. Systemic antitumor protection by vascular-targeted photodynamic therapy involves cellular and humoral immunity // Cancer Immunol. Immunother. 2009. Vol. 58 (1). P. 71–84. doi: 10.1007/s00262-008-0527-0.
29. Preise D., Scherz A., Salomon Y. Antitumor immunity promoted by vascular occluding therapy: lessons from vascular-targeted photodynamic therapy (VTP) // Photochem. Photobiol. Sci. 2011. Vol. 10 (5). P. 681–688. doi: 10.1039/c0pp00315h.
30. Reed M., Miller F., Weiman T., Tseng M.T., Pietsch C.G. The effect of photodynamic therapy on the microcirculation // J. Surg. Res. 1988. Vol. 45 (5). P. 452–459.
31. Scheffer S.R., Nave H., Korangy F., Schlote K., Pabst R., Jaffee E.M., Manns M.P., Greten T.F. Apoptotic, but not necrotic tumor cell vaccines induce a potent immune response in vivo // Int. J. Cancer. 2003. Vol. 103 (2). P. 205–211.
32. Seya T., Akazawa T., Uehori J., Matsumoto M., Azuma I., Toyoshima K. Role of toll-like receptors and their adaptors in adjuvant immunotherapy for cancer // Anticancer Res. 2003. Vol. 23 (6a). P. 6441–6447.
33. Shaif-Muthana M., McIntyre C., Sisley K., Rennie I., Murray A. Dead or alive: immunogenicity of human melanoma cells when presented by dendritic cells // Cancer Res. 2000. Vol. 60 (22). P. 6441–6447.
34. Sierra-Rivera E., Voorhees G.J., Freedman M.L. Gamma irradiation increases hsp-70 in Chinese hamster ovary cells // Radiat. Res. 1993. Vol. 135 (1). P. 40–45.
35. Van Duijnhoven F.H., Aalbers R.I., Rovers J.P., Terpstra O.T., Kuppen P.J. The immunological consequences of photodynamic treatment of cancer, a literature review // Immunobiology. 2003. Vol. 207 (2). P. 105–113.

36. Woods J.A., Traynor N.J., Brancalion L., Moseley H. The effect of photofrin on DNA strand breaks and base oxidation in HaCaT keratinocytes: a comet assay study // *Photochem. Photobiol.* 2004. Vol. 79 (1). P.105–113.

37. Wyld L., Reed M.W., Brown N.J. Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type // *Br. J. Cancer.* 2001. Vol. 84 (10). P. 1384–1386.

38. Yenari M., Liu J., Zheng Z., Vexler Z.S., Lee J.E., Giffard R.G. Antiapoptotic and anti-inflammatory mechanisms of heat shock protein protection // *Ann. NY Acad. Sci.* 2005. Vol. 1053. P. 74–83.

39. Zitvogel L., Casares N., Péquignot M.O., Chaput N., Albert M.L., Kroemer G. Immune response against dying tumor cells // *Adv. Immunol.* 2004. Vol. 84. P. 131–179.

Поступила 10.03.15

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Гафтон Георгий Иванович**, доктор медицинских наук, зав. хирургическим отделением общей онкологии, ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68

**Анисимов Валентин Вадимович**, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник, ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68

**Гельфонд Марк Львович**, старший научный сотрудник, отделение торакальной онкологии, ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68. E-mail: [mark.gelfond@gmail.com](mailto:mark.gelfond@gmail.com). SPIN-код: 7120-8633

**Семилетова Юлия Вадимовна**, ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68

**Балдуева Ирина Александровна**, доктор медицинских наук, отдел терапевтической онкологии, ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68. SPIN-код: 7512-8789

**Нехаева Татьяна Леонидовна**, отдел иммуноонкологии, ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68. SPIN-код: 5366-8969

**Новик Алексей Викторович**, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела онкоиммунологии ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, врач-онколог отделения химиотерапии и инновационных технологий ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, доцент кафедры онкологии с курсом лучевой диагностики и лучевой терапии ГБОУ ВПО СПбГПМУ Минздрава России, ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова» Минздрава РФ. E-mail: [anovik@list.ru](mailto:anovik@list.ru). ResearcherID H-7700-2014, ORCID 0000-0002-2430-7409, SPIN 4549-7885

**Мяснянкин Михаил Юрьевич**, ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68.

**Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки / конфликта интересов, о котором необходимо сообщить**

## CLINICAL-IMMUNOLOGICAL ASSESSMENT OF EFFICACY OF NEOADJUVANT PHOTODYNAMIC THERAPY IN SURGICAL MANAGEMENT OF PRIMARY MELANOMA

**G.I. Gafton, V.V. Anisimov, M.L. Gelfond, Yu.V. Semiletova, I.A. Baldueva, T.L. Nekhaeva, A.V. Novik, M.Yu. Myasnynankin**

N.N. Petrov Research Institute of Oncology  
68, Leningradskay Street, 197758-St. Petersburg, Pesochny, Russia, e-mail: [mark.gelfond@gmail.com](mailto:mark.gelfond@gmail.com)

#### Abstract

Efficacy of neoadjuvant photodynamic therapy (PDT) with photoditazine and radachlorine was assessed in 42 patients with stage I–III primary melanoma. The control group consisted of 42 patients with melanoma who underwent surgery alone. The 2.5-year overall and recurrence-free survival rates were significantly higher in patients who received neoadjuvant PDT than in the control group patients. Neoadjuvant PDT performed 2 days before surgery was found to promote the activation of T- and B-cell immunity. In the experimental study it was shown that the increase in time of laser irradiation of melanoma cell culture accompanied by a significant increase in the proportion of late apoptotic cells.

**Key words:** primary melanoma, neoadjuvant PDT, apoptosis, immune response.

#### REFERENCES

1. Baldueva I.A. Immunological characteristics of the relationship between the tumor and the body in melanoma // *Prakticheskaja onkologija*. 2001. № 4 (8). P. 37–41. [in Russian]
2. Vasil'ev N.E. Immunological aspects of photodynamic therapy // *Mater. nauch.-prakt. konf. «Primenenie poluprovodnikovyh lazerov v medicene»*. SPb., 2006. P. 62. [in Russian]

3. Geinitz A.V., Sorokaty A.E., Yagudajev D.M., Trukhmanov R.S. Photodynamic therapy. The history and mechanisms of its action // *Lazernaja medicina*. 2007. Vol. 11 (3). P. 42–46. [in Russian]
4. *Cancer incidence (morbidity and mortality) in Russia in 2009* / Eds. V.I. Chissoy, V.V. Starinskij, G.V. Petrova. M., 2011. 260 p. [in Russian]
5. Merabishvili V.M. Survival of cancer patients. SPb., 2006. 438 p. [in Russian]

6. Mikhaylova I.N., Ivanov P.V., Petenko N.N., Baryshnikov K.A., Morosova L.F., Burova O.S., Cheremushkin E.A., Subramanian S., Chkadua G.Z., Baryshnikov A.Yu., Demidov L.V. Immune reaction of the skin in melanoma patients vaccine therapy // Rossijskij bioterapevticheskij zhurnal. 2010. Vol. 9 (1). P. 63–68. [in Russian]
7. Chernov V.I., Afanasyev S.G., Similkin I.G., Tickaja A.A., Avgustinovich A.V. Radionuclide diagnosis for detection of sentinel lymph nodes // Sibirskij onkologicheskij zhurnal. 2008. № 4. P. 5–10. [in Russian]
8. Almeida R.D., Manadas B.J., Carvalho A.P., Duarte C.B. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy // Biochim. Biophys. Acta. 2004. Vol. 1704. (2). P. 59–86.
9. Bartholomae W.C., Rininsland F.H., Eisenberg J.C., Boehm B.O., Lehmann P.V., Tary-Lehmann M. T cell immunity induced by live, necrotic and apoptotic tumor cells // J. Immunol. 2004. Vol. 173 (2). P. 1012–1022.
10. Chen B., Roskams T., Xu Y., Agostinis P., de Witte P.A. Photodynamic therapy with hypericin induces vascular damage and apoptosis in the RIF-1 mouse tumor model // Int. J. Cancer. 2002. Vol. 98 (2). P. 284–290.
11. Chen W.R., Korbelik M., Bartels K.E., Liu H., Sun J., Nordquist R.E. Enhancement of laser cancer treatment by a chitosan-derived immunoadjuvant // Photochem. Photobiol. 2005. Vol. 81 (1). P. 190–195.
12. Chen W.R., Zhu W.G., Dynlacht J.R., Nordquist R.E. Long-term tumor resistance induced by laser photo-immunotherapy // Int. J. Cancer. 1999. Vol. 81 (5). P. 808–812.
13. Cottrez F., Groux H. Specialization in tolerance: innate CD(4+) CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells // Transplantation. 2004. Vol. 77. Suppl. 1. S. 12–15.
14. Golab J., Wilczynski G., Zagodzón R., Stokłosa T., Dabrowska A., Rybczyńska J., Wasik M., Machaj E., Olda T., Kozar K., Kamiński R., Giermasz A., Czajka A., Lasek W., Feleszko W., Jakóbsiak M. Potentiation of the anti-tumor effects of Photofrin-based photodynamic therapy by localized treatment with G-CSF // Br. J. Cancer. 2000. Vol. 82 (8). P. 1485–1491.
15. Gollnick S., Evans S., Baumann H., Owczarczak B., Maier P., Vaughan L., Wang W.C., Unger E., Henderson B.W. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation // Br. J. Cancer. 2003. Vol. 88 (11). P. 1772–1779.
16. Gollnick S., Vaughan L., Henderson B. Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy // Cancer Res. 2002. Vol. 62 (6). P. 1604–1608.
17. Gollnick S.O., Brackett C.M. Enhancement of anti-tumor immunity by photodynamic therapy // Immunol. Res. 2010. Vol. 46 (1–3). P. 216–226. doi: 10.1007/s12026-009-8119-4.
18. Gomer C., Rytter S.W., Ferrario A., Rucker N., Wong S., Fisher A.M. Photodynamic therapy-mediated oxidative stress can induce expression of heat shock proteins // Cancer Res. 1996. Vol. 56 (10). P. 2355–2360.
19. Haylett A.K., Ward T.H., Moore J.V. DNA damage and repair in Gorlin syndrome and normal fibroblasts aer aminolevulinic acid photodynamic therapy: a comet assay study // Photochem. Photobiol. 2003. Vol. 78 (4). P. 337–341.
20. Huang Z., Xu H., Meyers A.D., Musani A.I., Wang L., Tagg R., Barqawi A.B., Chen Y.K. Photodynamic therapy for treatment of solid tumors-potential and technical challenges // Technol. Cancer Res. Treat. 2008. Vol. 7 (4). P. 309–320.
21. Kiesslich T., Plaetzer K., Oberdanner C.B., Berlanda J., Obermair F.J., Krammer B. Differential effects of glucose deprivation on the cellular sensitivity towards photodynamic treatment-based production of reactive oxygen species and apoptosis-induction // FEBS Lett. 2005. Vol. 579 (1). P. 185–190.
22. Magner W.J., Tomasi T.B. Apoptotic and necrotic cells induced by different agents vary in their expression of MHC and costimulatory genes // Mol. Immunol. 2005. Vol. 42 (9). P. 1033–1042.
23. McNair F.I., Marples B., West C.M., Moore J.V. A comet assay of DNA damage and repair in K562 cells aer photodynamic therapy using haematoporphyrin derivative, methylene blue and meso-tetrahydroxyphenylchlorin // Br. J. Cancer. 1997. Vol. 75 (12). P. 1721–1729.
24. Mitra S., Goren E., Frelinger J., Foster T.H. Activation of heat shock protein 70 promoter with meso-tetrahydroxyphenyl chlorine photodynamic therapy reported by green fluorescent protein in vitro and in vivo // Photochem. Photobiol. 2003. Vol. 78 (6). P. 615–622.
25. Mroz P., Szokalska A., Wu M.X., Hamblin M.R. Photodynamic Therapy of Tumors Can Lead to Development of Systemic Antigen-Specific Immune Response // PLoS ONE. 2010. Vol. 5 (12). P. 151–194. doi: 10.1371/journal.pone.0015194.
26. Oberdanner C.B., Kiesslich T., Krammer B., Plaetzer K. Glucose is required to maintain high ATP-levels for the energy-utilizing steps during PDT-induced apoptosis // Photochem. Photobiol. 2002. Vol. 76 (6). P. 695–703.
27. Oleinick N., Morris R., Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: What, where, why and how // Photochem. Photobiol. Sci. 2002. Vol. 1 (1). P. 1–21.
28. Preise D., Oren R., Glinert I., Kalchenko V., Jung S., Scherz A., Salomon Y. Systemic antitumor protection by vascular-targeted photodynamic therapy involves cellular and humoral immunity // Cancer Immunol. Immunother. 2009. Vol. 58 (1). – P. 71–84. doi: 10.1007/s00262-008-0527-0.
29. Preise D., Scherz A., Salomon Y. Antitumor immunity promoted by vascular occluding therapy: lessons from vascular-targeted photodynamic therapy (VTP) // Photochem. Photobiol. Sci. 2011. Vol. 10 (5). P. 681–688. doi: 10.1039/c0pp00315h.
30. Reed M., Miller F., Weiman T., Tseng M.T., Pietsch C.G. The effect of photodynamic therapy on the microcirculation // J. Surg. Res. 1988. Vol. 45 (5). P. 452–459.
31. Scheffer S.R., Nave H., Korangy F., Schlote K., Pabst R., Jaffee E.M., Manns M.P., Greten T.F. Apoptotic, but not necrotic tumor cell vaccines induce a potent immune response in vivo // Int. J. Cancer. 2003. Vol. 103 (2). P. 205–211.
32. Seya T., Akazawa T., Uehori J., Matsumoto M., Azuma I., Toyoshima K. Role of toll-like receptors and their adaptors in adjuvant immunotherapy for cancer // Anticancer Res. 2003. Vol. 23 (6a). P. 4369–4376.
33. Shaif-Muthana M., McIntyre C., Sisley K., Rennie J., Murray A. Dead or alive: immunogenicity of human melanoma cells when presented by dendritic cells // Cancer Res. 2000. Vol. 60 (22). P. 6441–6447.
34. Sierra-Rivera E., Voorhees G.J., Freedman M.L. Gamma irradiation increases hsp-70 in Chinese hamster ovary cells // Radiat. Res. 1993. Vol. 135 (1). P. 40–45.
35. Van Duijnhoven F.H., Aalbers R.I., Rovers J.P., Terpstra O.T., Kuppen P.J. The immunological consequences of photodynamic treatment of cancer, a literature review // Immunobiology. 2003. Vol. 207 (2). P. 105–113.
36. Woods J.A., Traynor N.J., Brancalion L., Moseley H. The effect of photofrin on DNA strand breaks and base oxidation in HaCaT keratinocytes: a comet assay study // Photochem. Photobiol. 2004. Vol. 79 (1). P. 105–113.
37. Wylid L., Reed M.W., Brown N.J. Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type // Br. J. Cancer. 2001. Vol. 84 (10). P. 1384–1386.
38. Yenari M., Liu J., Zheng Z., Vexler Z.S., Lee J.E., Giffard R.G. Antiapoptotic and anti-inflammatory mechanisms of heat shock protein protection // Ann. NY Acad. Sci. 2005. Vol. 1053. P. 74–83.
39. Zitvogel L., Casares N., Péquignot M.O., Chaput N., Albert M.L., Kroemer G. Immune response against dying tumor cells // Adv. Immunol. 2004. Vol. 84. P. 131–179.

## ABOUT THE AUTORS

**Gafton Georgij Ivanovich**, MD, DSc., N.N. Petrov Research Institute of Oncology, Leningradskaya St. 68, Pesochny-2  
**Anisimov Valentin Vadimovich**, MD, DSc., Principal Investigator, N.N. Petrov Research Institute of Oncology, Leningradskaya St. 68, Pesochny-2  
**Gelfond Mark Lvovich**, Senior Researcher, N.N. Petrov Research Institute of Oncology, Leningradskaya St. 68, Pesochny-2. E-mail: mark.gelfond@gmail.com  
**Semiletova Yulia Vadimovna**, N.N. Petrov Research Institute of Oncology, Leningradskaya St. 68, Pesochny-2  
**Baldueva Irina Aleksandrovna**, MD, DSc., N.N. Petrov Research Institute of Oncology, Leningradskaya St. 68, Pesochny-2  
**Nekhaeva Tatjana Leonidovna**, N.N. Petrov Research Institute of Oncology, Leningradskaya St. 68, Pesochny-2  
**Novik Aleksej Viktorovich**, MD., PhD., Senior Researcher, N.N. Petrov Research Institute of Oncology, Leningradskaya St. 68, Pesochny-2. E-mail: anovik@list.ru  
**Myasnankin Michael Jurevich**, N.N. Petrov Research Institute of Oncology, Leningradskaya St. 68, Pesochny-2