

УДК: 616-006.81.04

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ В ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ

Г.И. Гафтон^{1,4}, Ю.В. Семилетова^{1,2}, В.В. Анисимов¹, М.Л. Гельфонд^{1,2},
М.Ю. Мяснянкин², А.В. Новик^{1,3}, Т.Л. Нехаева¹, И.А. Балдуева^{1,2}, И.Г. Гафтон¹

*ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург¹
ГБОУ ВПО «СЗГМУ им. И.И. Мечникова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург²
ГБОУ ВПО «СПбГПМУ» Минздрава России, г. Санкт-Петербург³
ГБОУ ВПО «СПбГМУ им. И.П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург⁴
197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68,
e-mail: doc-tor@mail.ru¹*

В экспериментально-клиническом исследовании изучено влияние неoadъювантной фотодинамической терапии на показатели Т- и В-клеточного иммунного ответа в хирургическом лечении больных меланомой кожи I–III стадии. ФДТ была выполнена 25 пациентам за 2 сут до хирургического удаления первичной опухоли с июля 2012 г. по январь 2013 г. Выявлено, что увеличение концентрации фотодитазина не приводит к увеличению количества опухолевых клеток на стадии раннего апоптоза; удлинение времени экспозиции приводит к увеличению доли поздних форм апоптоза, а использование ФДТ с фотодитазинем в дозе 50,0 мг с последующим облучением (662 нм, 400 Дж) за 2 дня до хирургического вмешательства способствует активации Т- и В-клеточного звена иммунной системы.

Ключевые слова: первичная меланома, неoadъювантная ФДТ, апоптоз, иммунный ответ.

PHOTODYNAMIC THERAPY IN SURGICAL TREATMENT OF PATIENTS BY A SKIN MELANOMA

G.I. Gafton^{1,4}, Yu.V. Semiletova^{1,2}, V.V. Anisimov¹, M.L. Gelfond^{1,2}, M.Yu. Myasnyankin², A.B. Novick^{1,3},
T.L. Nekhayeva¹, I.A. Balduyeva^{1,2}, I. G. Gafton¹

*N.N. Petrov Oncology scientific research institute of Ministry Health of Russia, St. Petersburg¹,
SZGMU of I.I. Mechnikov of Ministry of Health of Russia, St. Petersburg²,
SPBGPMA of Ministry Health of Russia, St. Petersburg³,
SPBGMU of I.P. Pavlov of Ministry Health of Russia, St. Petersburg⁴
68, Leningradskaya Street, 197758-St. Petersburg, Pesochny, Russia
e-mail: doc-tor@mail.ru¹*

In experimental and clinical research carried out studying of influence of neoadjuvant photodynamic therapy on T- and B-cellular immune answer in surgical treatment of patients of a melanoma of skin of the I–III stage. PDT was executed to 25 patients two days prior to surgical removal of primary tumor from July, 2012 to January, 2013. As a result of the conducted research it was revealed that: the increase in concentration fotoditaziny doesn't lead to increase in quantity of tumoral cages at stages early apoptosis; lengthening of time of an exposition leads to increase in a share of late forms apoptosis, and FDT use with fotoditaziny in a dose of 50,0 mg with the subsequent radiation (662 nanometers, 400 J) in 2 days prior to surgical intervention promotes T- and B-cellular link of immune system.

Key words: Primary melanoma, neoadjuvant PDT, apoptosis, immune response.

Лечение больных диссеминированной меланомой кожи с использованием во второй и последующих линиях лекарственной терапии представляет собой клинически важную и до настоящего времени практически не решенную задачу. Увеличение показателей заболеваемости населения меланомой кожи, а также наличие у значительной части больных «скрытых» микрометастазов до хирургического лечения определяют необходимость поиска

новых методов системного неoadъювантного лечения. В этом плане перспективным представляется использование неoadъювантной фотодинамической терапии (ФДТ) у больных с I–III стадией меланомы кожи. ФДТ – относительно новый способ лечения солидных опухолей, он зарекомендовал себя в лечении местнораспространенного рака трахеи и бронхов, пищевода, мочевого пузыря и рака шейки матки [4, 6, 8, 9, 11].

Недавние исследования показали, что ФДТ может являться «пусковым» механизмом в активации противоопухолевого иммунного ответа, связанного с усилением процесса апоптоза опухолевых клеток, а также с развитием острой воспалительной реакции и распознаванием CD8⁺ Т-лимфоцитами МНС I (МНС I – Major histocompatibility complex I) рестриктированных эпитопов опухолеассоциированных антигенов (ОАА) [1, 7, 10, 14]. Кроме того, ФДТ приводит к субклеточной гибели опухолевых клеток, которые фагоцитируются, процессируются и презентуются макрофагами и дендритными клетками «наивным» Т-лимфоцитам в лимфатических узлах [12, 13]. Уникальность метода заключается в избирательной способности опухоли накапливать фотосенсибилизатор (ФС). После облучения патологического очага светом, имеющим длину волны, соответствующую спектру поглощения ФС, запускается фотохимическая реакция с генерацией синглетного кислорода, который повреждает мембраны и органеллы опухолевых клеток и вызывает их гибель [5, 8, 10]. Однако этот процесс часто оказывается малоэффективным. Более того, ФДТ как способ лечения меланомы кожи до настоящего времени остается официально не признанным. Одни авторы связывают это с опухолеассоциированной иммуносупрессией и дисфункцией антигенпрезентирующих клеток [2, 13], другие – с недостаточным накоплением фотосенсибилизирующих препаратов в опухоли, что ставит под сомнение возможность развития достаточных фотодинамических эффектов. Кроме того, отдельные авторы описывают лишь частичную регрессию опухоли при ФДТ [3].

Целью исследования явилось изучение влияния неадьювантной ФДТ на показатели Т- и В-клеточного иммунного ответа в хирургическом лечении больных меланомой кожи I–III стадии.

Материал и методы

В соответствии с задачами исследования работа была разделена на две части – экспериментальную и клиническую. Для экспериментального исследования *in vitro* использовали клеточную линию меланомы кожи человека (Mel 226), полученную в лаборатории клеточных технологий отделения химиотерапии и инновационных клеточных технологий НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова и депонированную в Российском Банке клеточных линий позвоночных. Фотосенсибилизатор добавляли в

разных концентрациях: 1) 0,5 мкг/мл, 2) 1 мкг/мл (эквивалент дозе 1 мг/кг, рекомендованной в инструкции по применению ФС), 3) 2,5 мкг/мл. Через 30 мин проводили облучение клеток меланомы лазерным светом 662 нм, 40 Дж (доза для культуры опухолевых клеток, эквивалентная используемой в клинической практике), экспозиция 6 и 10 мин. Анализ проводили через 1 и 4 ч после фотодинамического воздействия. К полученной суспензии клеток (1×10⁶/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) [1]. Данный параметр характеризует относительное число клеток с характерными морфологическими или биохимическими признаками и определяется по формуле

$$\text{АИ} = \frac{\text{Кол-во апоптотических клеток}}{\text{Общее кол-во клеток}} \times 100 \%$$

АИ учитывали отдельно для всех анализируемых клеток: с зеленым окрашиванием клетки, находящиеся на стадии раннего апоптоза (Annexin +; PI-), клетки с двойным окрашиванием (Annexin +; PI+) – стадия позднего апоптоза. В клиническое исследование были включены больные, получавшие лечение в ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России с июля 2012 г. по январь 2013 г.

Критериями включения в исследование были: подписание письменного информированного согласия, мужчины или женщины старше 18 лет, гистологически верифицированный диагноз меланомы кожи I–III стадии заболевания, установленный на основании клинико-инструментальных и лабораторных исследований, удовлетворительное состояние больных (0–2 балла по шкале ECOG), отсутствие предшествующей противоопухолевой терапии, гематологические показатели: количество лейкоцитов > 3000/мм³, тромбоцитов >120000/мм³, гемоглобин >100 г/л, сохранная функция печени и почек (трансаминазы <5N, креатинин <176 мкмоль/мл, общий билирубин <30 мкмоль/л).

Критерии не включения в исследование: беременность и лактация, недостаточность кро-

вообращения 2–3-й степени, дыхательная недостаточность 2–3-й степени, клинически значимая патология печени, почек, наличие метастазов или резидуальной опухоли, острые инфекционные заболевания, аутоиммунные заболевания в стадии обострения (кроме витилиго), одновременное включение в другое клиническое исследование с другим исследуемым препаратом. Схема исследования представлена на рис. 1.

Всем больным проводился забор крови для оценки содержания основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови до лечения и через 7 дней после операции. Иммунофенотипический анализ проводили на проточном лазерном цитофлуориметре BD FACSCalibur (tm) (BD Biosciense). Для окрашивания клеток использовали панель моноклональных антител меченых FITC (изоцианиат флуоресцеина, PE (фикоэритрин), PC5 (комплекс PE с цианином-5), PerCP (перидинилхлорофилл протеин) или PerCP-Cy5.5 (комплекс PerCP с цианином 5.5) к белкам-маркерам (CD) клеточной мембраны лейкоцитов. Проводили регистрацию прямого светорассеяния (под углами 1–10°), бокового светорассеяния (под углом 90°). Для каждого образца анализировали не менее 10⁵ клеток. Для оценки данных иммунофенотипического анализа использовали программное обеспечение CellQuest Pro (tm).

Хирургическое лечение больных (1-я группа) проводили по стандартной методике в объеме радикальной операции. Второй группе пациентов за 2 дня до хирургического лечения проводили ФДТ отечественным ФС второго поколения – диметилглюкаминная соль хлорина Е6 (фотодитазин, реги-



Рис. 1. Схема исследования (ИС – иммунный статус)

страционный номер № 249188), 50 мг внутривенно капельно в течение 30 мин в 200 мл 0,9 % раствора хлорида натрия. Через 2 ч после этого проводили лазерное облучение опухолевого очага (662 нм, 400 Дж). С начала введения и в последующие 24 ч пациенты носили солнцезащитные очки.

В исследование включено 25 больных локализованной меланомой кожи (табл. 1). Пациенты в сравниваемых группах были сопоставимы по возрасту и полу, а также по стадиям заболевания.

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⁺).

В исследование также были включены 4 больных с интраоперационной ФДТ: I стадия болезни по TNM (7-й пересмотр) – 1 больной, II стадия – 1 пациент, III стадия – 2 больных. ФС вводили за 2 ч до оперативного вмешательства, лазерное облучение проводили после удаления локализованной опухоли и/или метастатического поражения регионарных лимфатических узлов в течение 30 мин. Иммунокомпетентные клетки изучали по

Таблица 1

Характеристика пациентов, включенных в исследование

Характеристика	1-я группа (n=9)		2-я группа (n=16)		Всего (n=25)	
	абс.	% (ДИ)	абс.	% (ДИ)	абс.	%
Возраст:						
- средний		54		53		56
- диапазон		39–87		34–85		34–87
Пол:						
- мужчины	4	44 (12–77)	3	19 (4–41)	7	28 (10–46)
- женщины	5	56 (23–88)	13	81 (59–96)	18	72 (54–90)
Стадия:						
I	5	56 (23–88)	10	63 (39–86)	15	60 (41–79)
II	2	22 (3–53)	6	37 (14–61)	8	32 (14–50)
III	2	22 (3–53)	0	0 (0–6)	2	8 (1–22)

экспрессии дифференцировочных антигенов, описанных выше.

Для статистической обработки полученных данных использовали методы описательной статистики: расчет 95 % доверительного интервала (ДИ) для АИ и критерий знаков Уилкоксона для зависимых наблюдений. Расчеты проводили с использованием программы SPSS v.17. В исследовании был принят уровень значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследование показало, что концентрации ФС 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл и 2,5 мкг/мл обладают сопоставимой способностью индуцировать ранний апоптоз, статистически значимых различий не выявлено ($p > 0,05$). При увеличении времени облучения ФДТ сенсibilизированного опухолевого очага происходит более быстрый переход опухолевых клеток в позднюю фазу апоптоза ($p < 0,05$). Содержание основных субпопуляций лимфоцитов до и после хирургического лечения представлено в табл. 2. У больных 1-й группы хирургическое вмешательство приводило к повышению абсолютного содержания $CD3^+ CD19^-$ Т-лимфоцитов ($p = 0,036$), однако субпопуляционный состав Т-клеток (содержание Т-хелперов ($CD3^+ CD4^+$), активированных Т-хелперов ($CD3^+ CD4^+ HLADR^+$), двойных положительных Т-лимфоцитов ($CD3^+ CD4^+ CD8^+$), Т-эффекторов ($CD3^+ CD8^+$) и число В-лимфоцитов ($CD19^+ CD3^-$) не претерпели значимых изменений ($p > 0,05$).

При добавлении к хирургическому лечению неoadъювантной ФДТ (2-я группа больных) выявлено статистически значимое повышение содержания $CD3^+ CD4^+$ Т-хелперов ($p = 0,02$), активированных $CD3^+ CD4^+ HLADR^+$ Т-хелперов ($p = 0,05$), $CD3^- CD19^+$ В-лимфоцитов ($p = 0,02$), что свидетельствует об активации Т- и В-клеточного звена иммунной системы.

У больных, получавших хирургическое лечение и интраоперационную ФДТ (3-я группа), значимые различия не были выявлены ($p > 0,05$), не исключено, что это объясняется недостаточной мощностью исследования ($n = 4$).

Механизм действия ФДТ основан на избирательном накоплении фотосенсибилизатора в опухолевой ткани. Молекулы ФС избирательно фиксируются на мембранах опухолевых клеток и митохондриях, при облучении опухоли лазером происходит переход нетоксичного триплетного кислорода в синглетный кислород, обладающий выраженным цитотоксическим действием, что приводит к разрушению мембран опухолевых клеток. Ряд биомолекул, входящих в состав мембран (ненасыщенные жирные кислоты, холестерин, триптофан, метионин, гистидин), быстро вступают в реакцию с синглетным кислородом, поэтому мембраны считаются первичными мишенями, повреждение которых ведет к повреждению и гибели клеток, через механизмы апоптоза, важную роль в котором играет фосфатидилсерин (выявляется с помощью

Таблица 2

Содержание основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови больных локализованной меланомой кожи до лечения и на 7-й день после операции ($M \pm m$)

Дифференцировочные антигены (лимфоцитарный гейт)	Группа	До операции	После операции	p
$CD3^+ CD19^-$	ФДТ(-)	1,32 ± 0,16	1,50 ± 0,6	0,036
	ФДТ(+)	1,2 ± 0,09	1,3 ± 0,4	0,18
$CD3^+ CD4^+$	ФДТ(-)	0,83 ± 0,1	0,95 ± 0,4	0,092
	ФДТ(+)	0,72 ± 0,05	0,91 ± 0,3	0,02
$CD3^+ CD8^+$	ФДТ(-)	0,46 ± 0,09	0,48 ± 0,24	0,263
	ФДТ(+)	0,47 ± 0,06	0,47 ± 0,2	0,19
$CD3^+ CD4^+ CD8^+$	ФДТ(-)	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,063
	ФДТ(+)	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,04	0,75
$CD3^- CD19^+$	ФДТ(-)	0,18 ± 0,04	0,23 ± 0,1	0,31
	ФДТ(+)	0,16 ± 0,01	0,19 ± 0,08	0,02
$CD3^+ CD4^+ HLADR^+$	ФДТ(-)	-	-	-
	ФДТ(+)	0,03 ± 0,004	0,05 ± 0,009	0,05

белка аннексина V-FITC). В процессе нахождения клеток в апоптозе наблюдаются усиление экспрессии ОАА и активация иммунного ответа.

В нашем исследовании показано, что ФД-воздействие с низкой мощностью приводит к иммуностимулирующему эффекту, и дальнейшее увеличение концентрации ФС и удлинение времени облучения не имеют значения. Вследствие этого в клинической практике возможно снижение дозы ФД в 2 раза, что позволяет снизить токсичность лечения.

Фотодинамическая терапия действует как локальная травма для биологического объекта, вызывая хемотаксис нейтрофилов и активацию С3 компонента комплемента. В результате опухолевая ткань инфильтрируется нейтрофилами, под влиянием ряда цитокинов запускаются каскады иммунных реакций, стимулируется неспецифический и специфический иммунный ответ. При анализе результатов лабораторных тестов иммунологического обследования больных, получавших хирургическое лечение, отмечалась активация Т-лимфоцитов ($CD3^+ CD19^-$), при этом содержание Т-хелперов ($CD3^+ CD4^+$), активированных Т-хелперов ($CD3^+ CD4^+ HLADR^+$), цитотоксических Т-эффекторов ($CD3^+ CD8^+$), двойных положительных Т-лимфоцитов ($CD3^+ CD4^+ CD8^+$), В-лимфоцитов ($CD19^+ CD3^-$) не менялось. Напротив, неоадьювантная ФДТ активирует Т-клеточное звено иммунной системы (увеличение абсолютного содержания Т-хелперов $CD3^+ CD4^+$) и В-клеточное звено (повышение числа $CD19^+ CD3^-$). Отмечается тенденция к увеличению содержания активированных Т-лимфоцитов ($CD3^+ CD4^+ HLADR^+$). Таким образом, наблюдается отчетливая активация как Т-клеточного, так и В-клеточного звена иммунной системы. Вероятнее всего, это происходит вследствие апоптоза, который запускает выраженный противоопухолевый иммунный ответ [7, 11, 14].

Таким образом, проведенное экспериментальное и клиническое исследование позволило сформулировать следующие выводы:

1. Увеличение концентрации фотодитазина не приводит к увеличению количества опухолевых

клеток на стадии раннего апоптоза (Annexin+; PI-), $p > 0,05$.

2. Удлинение времени экспозиции облучения приводит к увеличению доли поздних форм апоптоза (Annexin +; PI+), $p < 0,05$.

3. Использование ФДТ с фотодитазином в дозе 50,0 мг с последующим облучением (662 нм, 400 Дж) за 2 дня до хирургического вмешательства способствует активации Т- и В-клеточного звена иммунной системы ($p < 0,05$).

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 // Материалы научно-практической конф. «Применение полупроводниковых лазеров в медицине». СПб., 2006. С. 62.
3. Гейниц А.В., Сорокатый А.Е., Язудаев Д.М., Трухманов Р.С. Фотодинамическая терапия. История создания метода и ее механизмы // Лазерная медицина. 2007. Т. 11, вып. 3. С. 42–46.
4. Гельфонд М.Л., Арсеньев А.И., Барчук А.С. Фотодинамическая терапия с Фотодитазином в комбинированном лечении трахеобронхиального рака и рака пищевода // Российский биотерапевтический журнал. 2004. Т. 3, № 2. С. 49–50.
5. Красновский А.А. Фотодинамическое действие и синглетный кислород // Биофизика. 2004. Т. 49, № 2. С. 305–321.
6. Филоненко Е.В., Вашикмадзе Л.А., Кириллов Н.В., Хомяков В.М. Интраоперационная фотодинамическая терапия в хирургическом лечении рака желудка. (Обзор литературы) // Сибирский онкологический журнал. 2012. № 2 (50). С. 84–89.
7. Bracketta C.M., Gollnick S.O. Photodynamic Therapy Enhancement of Anti-Tumor // Immunity Photochem. Photobiol. Sci. 2011. Vol. 10 (5). P. 649–652.
8. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W. et al. Photodynamic therapy // J. Natl. Cancer Inst. 1998. Vol. 90. P. 889–905.
9. Foroulis C.N., Thorpe J.A. Photodynamic therapy (PDT) in Barrett's esophagus with dysplasia or early cancer // J. Cardiothorac Surg. 2006. Vol. 29 (1). P. 30–34.
10. Gollnick S.O., Brackett C.M. Enhancement of anti-tumor immunity by photodynamic therapy // Immunol. Res. 2010. Vol. 46 (1–3). P. 216–226.
11. Gross S.A., Wolfsen H.C. The role of photodynamic therapy in the esophagus // Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am. 2010. Vol. 20 (1). P. 35–53.
12. Huang Z., Xu H., Meyers A.D. et al. Photodynamic therapy for treatment of solid tumors- potential and technical challenges // Technol. Cancer Res. Treat. 2008. Vol. 7 (4). P. 309–320.
13. 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.
14. 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.

Поступила 5.04.13