



Действие фотодинамической терапии с производным бактериохлорофилла *a* на рост и функциональную морфологию саркомы М-1 крыс

Южаков В.В.¹ • Романко Ю.С.¹ • Каплан М.А.¹ • Галкин В.Н.¹ • Мажуга А.Г.² • Грин М.А.³ • Бурмистрова Н.В.¹ • Фомина Н.К.¹ • Бандурко Л.Н.¹ • Севанькаева Л.Е.¹ • Яковлева Н.Д.¹ • Ингель И.Э.¹ • Мозеров С.А.¹ • Старовойтова А.В.¹

Актуальность. В последние годы в клинической онкологии все чаще и успешно применяется метод фотодинамической терапии (ФДТ). Для реализации противоопухолевого эффекта ФДТ ключевую роль играют три нетоксичных компонента: фотосенсибилизатор (ФС), локальное облучение опухоли светом/лазером определенной длины волны, соответствующей пику поглощения сенсибилизатора, и кислород. Образующиеся в ходе фотохимических реакций высокоактивные биологические окислители оказывают деструктивное действие на клетки и сосудистую сеть опухоли с последующей активацией иммунного ответа. Эффективность ФДТ определяется уровнем накопления ФС в опухоли, а также его фотофизическими параметрами и фотохимической активностью. Для создания новых ФС особый интерес представляют природные хлорофиллы и их производные с интенсивным поглощением в длинноволновой области спектра. **Цель** – изучение эффективности и механизма действия ФДТ с применением в качестве ФС конъюгата, содержащего две молекулы дипропоксисбактериопурпуринида с остатком цистамина, на рост и функциональную морфологию солидной соединительнотканной перевиваемой опухоли. **Материал и методы.** Работа выполнена на самках белых

беспородных крыс с имплантированной подкожно саркомой М-1. ФС вводили крысам опытной группы внутривенно. ФДТ проводили в период максимального индекса контрастности опухоль/здоровая ткань после введения ФС. Критерием эффективности действия ФДТ было изменение коэффициента роста/регрессии опухолей. Методы исследования включали иммуноокрашивание на PCNA и CD31, определение митотической активности и апоптотической гибели опухолевых клеток, а также компьютерный анализ микроскопических изображений. **Результаты.** На фоне ФДТ с новым ФС зарегистрировано снижение коэффициента роста опухолевых узлов в 16 раз. Показано, что фотоиндуцированное противоопухолевое действие обусловлено разрушением сосудистого русла саркомы М-1, быстрым ингибированием пролиферативной активности и девитализацией опухолевых клеток. В ранние сроки после ФДТ деструкция микроциркуляторного русла и фотоцитостатический шок опухолевых клеток с последующим развитием некроза, по-видимому, обусловлены прямым воздействием лазерного излучения на сенсибилизированные клеточные элементы паренхимы и стромы опухолей. **Заключение.** Конечный результат ФДТ определяется последовательностью деструктивных

и воспалительных изменений в паренхиме опухоли и окружающих тканях, а также пролиферативным потенциалом выживших после лечения опухолевых клеток. Возможно, из-за недостаточно эффективной концентрации сенсибилизатора в отдельных слабо васкуляризованных участках саркомы М-1 сохраняются выжившие опухолевые клетки, которые определяют рецидивирующий рост новообразований после ФДТ.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, производное бактериохлорофилла *a*, саркома М-1, некроз, иммуногистохимия, PCNA, CD31

Для цитирования: Южаков ВВ, Романко ЮС, Каплан МА, Галкин ВН, Мажуга АГ, Грин МА, Бурмистрова НВ, Фомина НК, Бандурко ЛН, Севанькаева ЛЕ, Яковлева НД, Ингель ИЭ, Мозеров СА, Старовойтова АВ. Действие фотодинамической терапии с производным бактериохлорофилла *a* на рост и функциональную морфологию саркомы М-1 крыс. Альманах клинической медицины. 2017;45(4):333–47. doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-4-333-347

Поступила 21.04.2017;
принята к публикации 29.05.2017



Южаков Вадим Васильевич – канд. мед. наук, заведующий лабораторией радиационной патоморфологии¹
✉ 249036, Калужская область, г. Обнинск, ул. Королева, 4, Российская Федерация. Тел.: +7 (903) 635 79 71. E-mail: yuzh_vad@mail.ru

Романко Юрий Сергеевич – д-р мед. наук, руководитель научно-организационного отдела¹

Каплан Михаил Александрович – д-р мед. наук, профессор, заведующий отделом фотодинамической диагностики и терапии¹

Галкин Всеволод Николаевич – д-р мед. наук, профессор, директор¹

Мажуга Александр Георгиевич – д-р хим. наук, профессор, кафедра органической химии химического факультета²

Грин Михаил Александрович – д-р хим. наук, профессор, кафедра химии и технологии биологически активных соединений тонкого органического синтеза³

¹ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Минздрава России; 249036, Калужская область, г. Обнинск, ул. Королева, 4, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1, Российская Федерация

³ ФГБОУ ВО «Московский технологический университет»; 119571, г. Москва, пр. Вернадского, 86, Российская Федерация

Фотодинамическая терапия (ФДТ) считается перспективным методом лечения целого ряда онкологических заболеваний вследствие малой инвазивности, высокой избирательности поражения, низкой токсичности вводимых препаратов и отсутствия риска развития тяжелых местных и системных осложнений [1, 2]. Для реализации противоопухолевого эффекта ФДТ ключевую роль играют три нетоксичных компонента: фотосенсибилизатор (ФС), локальное облучение опухоли светом/лазером определенной длины волны, соответствующей пику поглощения сенсибилизатора, и кислород [1, 3, 4]. ФДТ включает в себя введение ФС, его накопление в ткани опухоли и последующее воздействие лазерным излучением на сенсибилизированные ткани. Образующиеся в ходе фотохимических реакций при межмолекулярном переносе энергии от возбужденного светом сенсибилизатора к кислороду ткани высокоактивные биологические окислители оказывают деструктивное действие на клетки и сосудистую сеть опухоли с последующей активацией иммунного ответа [3–5]. По существующим представлениям, включение того или иного механизма в реализацию противоопухолевого эффекта ФДТ определяется локализацией и уровнем накопления ФС в опухоли, а также его фотофизическими параметрами и фотохимической активностью [6].

Сегодня при создании новых ФС для лечения крупных, глубокозалегающих опухолей особый интерес представляют природные хлорофиллы и их производные с интенсивным поглощением в длинноволновой области спектра [7, 8].

Цель данного исследования – изучение механизма действия ФДТ с применением в качестве ФС конъюгата, содержащего две молекулы дипропоксикарбиопурпуринимида с остатком цистамина (дисульфид-БПИ) [9], на рост и функциональную морфологию солидной соединительнотканной перевиваемой опухоли, а также анализ эффективности воздействия на разрушение сосудов, пролиферативную активность и гибель клеток саркомы М-1.

Материал и методы

Работа выполнена с соблюдением международных рекомендаций (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (CIOMS. Geneva, 1985) на самках белых беспородных крыс с имплантированной подкожно с внешней стороны бедра саркомой М-1 от животного-опухоленосителя.

Перевивку саркомы и определение объема опухолей осуществляли по ранее описанной нами методике [10]. При достижении объемов опухолей 0,8–1,5 см³ животных распределяли на две группы – контрольную и опытную (по 20 особей в каждой).

Дисульфид-БПИ вводили крысам опытной группы внутрибрюшинно из расчета 2,5 мг/кг массы тела. ФДТ проводили в период максимального индекса контрастности опухоль/здоровая ткань через 2,5–3 часа после введения ФС. Для лазерного облучения использовали терапевтический полупроводниковый лазер «Латус» (длина волны излучения 810 нм). Плотность энергии лазерного облучения – 300 Дж/см², плотность мощности – 0,51 Вт/см².

В контрольной группе животных выводили из опыта на 12-, 14-, 23- и 32-е сутки после перевивки; в опытной группе – через 1, 3, 12 и 21 сутки после ФДТ по 5 особей на каждый срок для изучения функциональной морфологии саркомы М-1. Критерием эффективности действия ФДТ было изменение коэффициента роста/регрессии опухолей (КРО), вычисляемого по формуле: $(V_i - V_0) / V_0$, где V_0 – объем опухоли в день экспериментального воздействия, V_i – объем опухоли через i сутки.

Опухолевые узлы выделяли под тиопенталовым наркозом. Ткань опухоли фиксировали 24 часа в кислой жидкости Буэна, обезвоживали и заливали в Гистомикс. Общую гистологию саркомы М-1 изучали на срезах, 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, M-20-R, “Santa Cruz”, 1:20) согласно ранее описанным нами методам [9].

Интегральные показатели, включающие объемное содержание структурных компонентов опухолевых узлов, рассчитывали с помощью системы компьютерного анализа микроскопических изображений с применением программы AnalySIS 5.0 (“Soft Imaging System GmbH”, Германия) [9]. Относительную фракцию пролиферирующих клеток в паренхиме опухоли определяли по формуле: $\Phi_{PCNA} (\%) = V_{PCNA} / V_{VPO} \times 100$, где V_{PCNA} – объемное содержание PCNA-положительной



опухолевой ткани, а V_{VIO} – объемное содержание жизнеспособной паренхимы опухолей при окрашивании гематоксилином и эозином. Митотический индекс и индекс апоптоза в зонах роста опухолевых узлов определяли по стандартной методике при иммерсионном увеличении микроскопа при подсчете не менее 3000 клеток.

Ангиоархитектуру саркомы М-1 при иммуноокрашивании на CD31 оценивали согласно принципам, описанным в работах [11, 12]. Качественные характеристики сосудов определяли в перитуморальной области и в «горячих точках» (“hot spots”), представляющих зоны солидного строения паренхимы опухоли, содержащие наибольшее количество капилляров и мелких венул. Перитуморальная область включала периферический край опухолей и окружающую их соединительную ткань.

Статистическую обработку полученных результатов выполняли с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США). Рассчитанные параметры описательной статистики представлены в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$); разброса между наименьшим и наибольшим значением показателя в выборке (Min–Max). Для оценки уровня значимости межгрупповых различий полученных показателей использовали непараметрический U-критерий Манна – Уитни. Различия между показателями считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Рост и функциональная морфология саркомы М-1 в контроле

В контрольной группе рост саркомы М-1 соответствовал кривой, характерной для большинства быстрорастущих экспериментальных новообразований (рис. 1). Наиболее интенсивный рост опухолевых узлов наблюдался до 23-х суток и носил экспоненциальный характер. В период от 11 до 32 суток КРО по средним значениям составил 37,2. Расчетные объемы опухолевых узлов в разные периоды после перевивки саркомы представлены в таблице.

В экспоненциальной фазе роста паренхима саркомы М-1 имела солидный тип строения с оксифильными участками спонтанного некроза в центральных отделах опухолевых узлов (рис. 2А). В зонах роста саркомы М-1 отчетливо выражен градиент снижения интенсивности иммуноокрашивания ядер опухолевых клеток на PCNA от периферии к центру опухолевых узлов

(рис. 2Б). В периферических зонах опухолевые клетки были диссоциированы друг от друга (рис. 3А). В полях солидного строения наблюдались относительно многочисленные фигуры митоза и единичные клетки, погибающие путем апоптоза (рис. 3В). Пролиферирующие клетки с положительной реакцией их ядер на PCNA располагались как в периферических зонах (рис. 3Б), так и в участках солидного строения (рис. 3Г) опухолей, концентрируясь вокруг сосудов.

В перитуморальной зоне микроциркуляторное русло состояло из тонкостенных сосудов капиллярного и синусоидного типа. От венул, располагающихся в здоровой ткани, ответвлялись капиллярные петли, врастающие в паренхиму опухоли (см. рис. 3А). Сосуды, врастающие в паренхиму саркомы М-1, выстланы уплощенным эндотелием с реакцией их ядер на PCNA (см. рис. 3Б). Типичная картина распределения сосудов, иммуноокрашенных на CD31, в локусах васкулогенеза и в «горячей точке» паренхимы показана на рис. 3Д, Е.

Результаты количественного анализа исследованных параметров саркомы М-1 на 12- и 14-е сутки после перевивки даны в таблице. На 23-и сутки после перевивки объем опухолевых узлов увеличился до $12,4 \pm 2,7 \text{ см}^3$. PCNA-положительная паренхима просматривалась в основном в виде тяжелой по периферии опухолей (рис. 2В, Г). В зонах экспансивного роста саркомы М-1 (рис. 4А) и в участках солидного строения (рис. 4В) визуализировались области неравномерного иммуноокрашивания ядер опухолевых клеток на PCNA (рис. 4Б, Г). В паренхиме чаще встречались микроочаги некроза и усиливался полиморфизм опухолевых клеток (см. рис. 4В). В перитуморальной области видны участки повышенной васкуляризации (см. рис. 4А). В солидной зоне паренхимы сосуды выстланы уплощенным эндотелием с PCNA-положительными ядрами (см. рис. 4Б, Г). На срезах, иммуноокрашенных на CD31, многочисленные кровеносные сосуды располагались как в перитуморальной области (рис. 4Д), так и в паренхиме (рис. 4Е). В локусах ангиогенеза солидного строения паренхимы видны уплощенные, иногда разветвленные микрососуды с четкими контурами.

В центре опухолевых узлов определялись поля спонтанного некроза, заполненные клеточным детритом. По периферии зон некроза и на границе с сохранившейся жизнеспособной паренхимой просматривались скопления полиморфно-ядерных лейкоцитов.

Бурмистрова Нелли Владиславовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр., заведующая лабораторией экспериментальной фотодинамической терапии¹

Фомина Наталья Константиновна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаборатория радиационной патоморфологии¹

Бандурко Любовь Николаевна – канд. мед. наук, вед. науч. сотр., лаборатория радиационной патоморфологии¹

Севаньяева Лариса Евгеньевна – ст. науч. сотр., лаборатория радиационной патоморфологии¹

Яковлева Нина Дмитриевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаборатория радиационной патоморфологии¹

Ингель Ирина Эдуардовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаборатория радиационной патоморфологии¹

Мозеров Сергей Алексеевич – д-р мед. наук, заведующий клинико-морфологическим отделом¹

Старовойтова Анна Владимировна – мл. науч. сотр., лаборатория экспериментальной фотодинамической терапии¹

¹ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Минздрава России; 249036, Калужская область, г. Обнинск, ул. Королева, 4, Российская Федерация



Количественные характеристики исследованных параметров саркомы М-1 в контроле и после фотодинамической терапии с применением дисульфидного производного бактериопурпуринамида

Показатель	Группа	¹ Срок после перевивки саркомы М-1, сутки / ² Время после ФДТ, сутки			
		¹ 12 / ² 1	¹ 14 / ² 3	¹ 23 / ² 12	¹ 32 / ² 21
Объем опухолей, см ³	Контроль	1,22±0,18; 0,7–1,68	1,6±0,26; 1,2–2,62	12,4±2,7; 5–18,7	36±3,7; 22,1–41,6
	ФДТ	1,13±0,18; 0,76–1,77	0,59±0,09**; 0,41–0,94	0,44±0,18**; 0,03–1,06	3,84±1,9**; 0–9,9
Объемное содержание паренхимы опухолей при окрашивании гематоксилином и эозином, %	Контроль	68,5±5,5; 55,1–86,2	69,7±3,6; 59,2–76,4	55,6±3,1; 47,2–63,6	43,4±3; 31,8–47,6
	ФДТ	39,3±11*; 7,4–66,1	23,4±6,3**; 7,5–41	29±10,4; 7,9–64,9	49,3±19,5; 2,4–90,3
Объемное содержание паренхимы опухолей при иммуноокрашивании на PCNA, %	Контроль	48,8±4,7; 38,9–66,8	56,6±4,6; 42,8–67,7	40,2±3,1; 27,4–50,3	28,7±2,5; 20,6–35,6
	ФДТ	10,4±4,8**; 0–27,1	10,8±4,1**; 0,6–19,6	14,5±6,6*; 0–33,6	26,8±11,8; 0–53,3
Объемное содержание PCNA-положительных клеток в паренхиме опухолей (Ф _{PCNA}), %	Контроль	71,1±2,5; 63,4–77,5	80,7±3,1; 72,4–90,7	72±5,1; 58,1–81,8	66,1±2,9; 59–76,4
	ФДТ	26,1±11,2**; 0–52,9	38±12,4**; 5–71,1	38,8±12,1*; 0–66,8	33,1±13,5*; 0–59
Объемное содержание зон некроза, %	Контроль	31,5±5,5; 13,8–45,4	30,3±3,6; 23,5–40,8	44,4±3,1; 36,4–52,8	56,6±3; 52,4–68,2
	ФДТ	60,7±11*; 33,9–92,6	76,6±6,3**; 59–92,5	71±10,4; 35,1–92,1	50,7±19,5; 9,7–97,6
Митотический индекс, %	Контроль	1,9±0,2; 1,35–2,4	1,84±0,04; 1,76–1,98	1,94±0,22; 1,22–2,35	1,9±0,03; 1,83–1,96
	ФДТ	1,18±0,23*; 0,64–1,82	1,84±0,11; 1,62–2,12	1,78±0,19; 1,40–2,02	1,94±0,14; 1,77–2,23
Индекс апоптоза, %	Контроль	0,29±0,02; 0,22–0,37	0,31±0,02; 0,25–0,34	0,37±0,06; 0,21–0,57	0,41±0,02; 0,37–0,48
	ФДТ	0,39±0,04; 0,28–0,5	0,43±0,01*; 0,4–0,47	0,42±0,09; 0,25–0,55	0,39±0,09; 0,31–0,56

ФДТ – фотодинамическая терапия

Данные представлены в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$); разброса между наименьшим и наибольшим значением показателя в выборке (Min–Max)

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

По данным морфометрии (см. таблицу), у крыс контрольной группы на 23-и сутки роста саркомы М-1 содержание паренхимы с PCNA-положительными клетками снизилось до $40,2 \pm 3,1\%$, а спонтанного некроза повысилось до $44,4 \pm 3,1\%$. В периферических зонах, определяющих рост опухолей, митотический индекс

опухолевых клеток составил $1,94 \pm 0,22\%$, а апоптотический индекс – $0,37 \pm 0,06\%$.

В терминальной стадии роста саркомы М-1, на 32-е сутки после ее перевивки, объем опухолевых узлов у особей контрольной группы вырос до $36 \pm 3,7 \text{ см}^3$. Большинство опухолей прорастало кожу, при этом на поверхности наиболее крупных



Рис. 1. Рост саркомы М-1 в контроле и после фотодинамической терапии с дисульфидным производным бактериопурпуринамида

новообразований появлялись обширные трофические изъязвления с отторжением некротических масс.

Паренхима саркомы М-1 просматривалась преимущественно в проксимальной части опухолевых узлов в виде тяжелой неравномерной ширины и цилиндров по ходу сохранившихся сосудов (рис. 2Д, Е). Заметно усиливалась зональная неоднородность строения опухолевой ткани (рис. 5А, В). В зонах солидного строения наблюдались признаки усиления гипоксии саркомы с дистрофическими изменениями в паренхиме, цитолитической деструкцией опухолевых клеток и увеличением содержания микроочагов спонтанного некроза. На препаратах, иммуноокрашенных на PCNA, выявлялась неравномерность распределения пролиферирующих опухолевых клеток в зонах роста опухолевых узлов (рис. 5Б, Г).

В перитуморальных областях были видны многочисленные очаги васкуляризации (рис. 5Д). В участках солидного строения опухолевой ткани капилляры, как правило, имели щелевидную форму (рис. 5Е).

Центральные области опухолевых узлов были представлены обширными сливными полями некроза, заполненными распадающимися опухолевыми клетками, клеточным детритом и межклеточной жидкостью.

Согласно результатам количественного анализа, в терминальной стадии роста саркомы М-1 содержание паренхимы опухолей снизилось до $43,4 \pm 3\%$. Расчетное значение Φ_{PCNA} в паренхиме, митотический индекс и индекс апоптоза опухолевых клеток изменились не существенно (см. табл.).

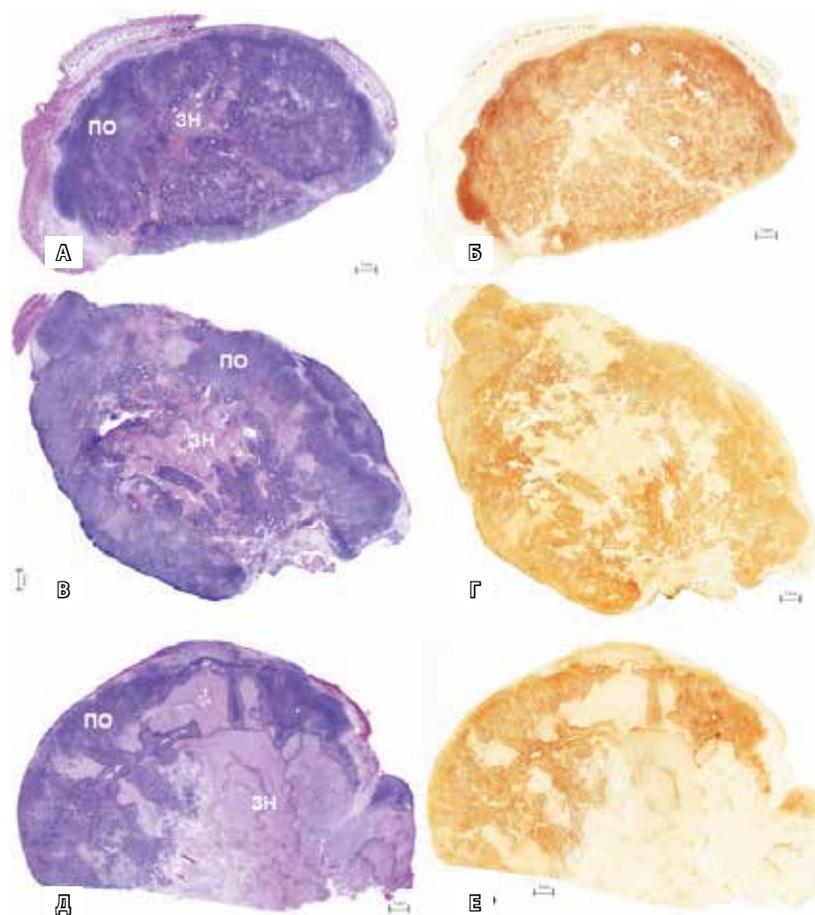


Рис. 2. Гистологический рисунок опухолевых узлов и пролиферативная активность клеток саркомы М-1 на серийных срезах в контроле на 14-е (А, Б), 23-и (В, Г) и 32-е (Д, Е) сутки после перевивки; ПО – паренхима опухоли, ЗН – зоны спонтанного некроза. А, В, Д – окрашивание гематоксилином и эозином; Б, Г, Е – иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA

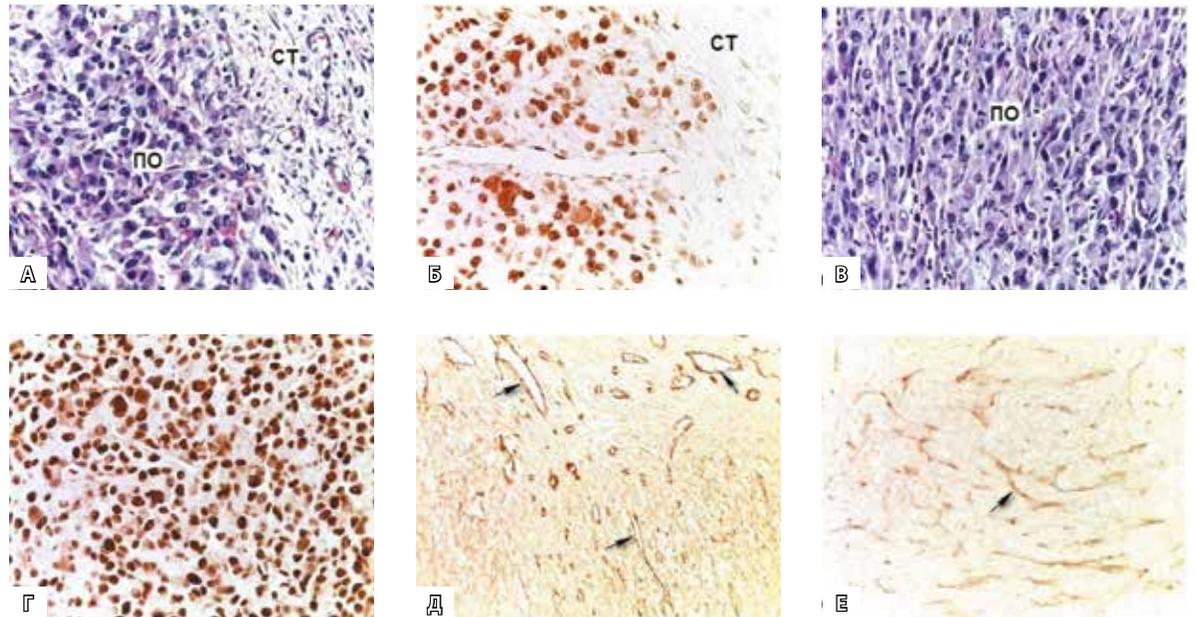


Рис. 3. Функциональная морфология саркомы М-1 в контроле на 12-е сутки после перевивки. **А** – гистология опухоли в периферической зоне (ПО – паренхима опухоли, СТ – соединительная ткань); **Б** – пролиферативная активность клеток в зоне роста опухоли; **В** – зона сплошного строения опухоли; **Г** – пролиферативная активность опухолевых клеток в зоне сплошного строения. **А, В** – окрашивание гематоксилином и эозином; **Б, Г** – иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA; иммуногистохимическая реакция эндотелия сосудов с антителами к CD31 (стрелки) в перитуморальной зоне (**Д**) и в «горячей точке» паренхимы (**Е**); **А–Г** × 140, **Д, Е** × 70

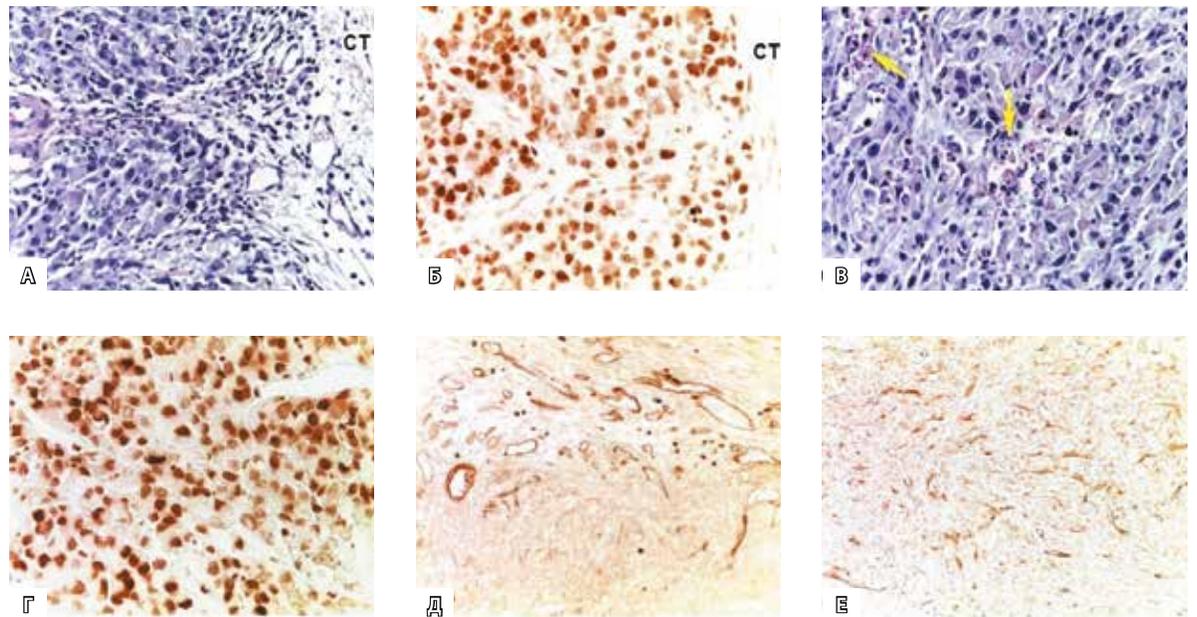


Рис. 4. Функциональная морфология саркомы М-1 в контроле на 23-и сутки после перевивки. **А** – зона роста опухоли с врастанием сосудов в ее паренхиму (СТ – соединительная ткань); **Б** – пролиферирующие опухолевые клетки в зоне роста; **В** – микроочаги некроза (стрелки) в зоне сплошного строения опухоли; **Г** – пролиферация опухолевых клеток в зоне сплошного строения. **А, В** – окрашивание гематоксилином и эозином; **Б, Г** – иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA; иммуногистохимическая реакция эндотелия сосудов с антителами к CD31 в перитуморальной зоне (**Д**) и в «горячей точке» паренхимы (**Е**); **А–Г** × 140, **Д, Е** × 70

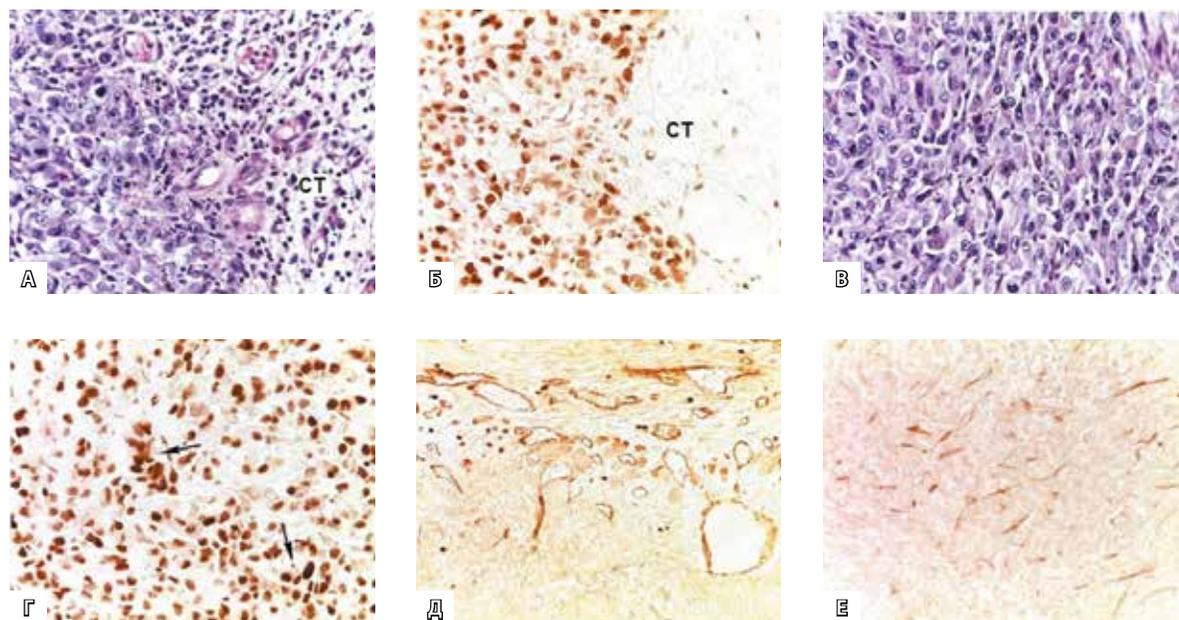


Рис. 5. Функциональная морфология саркомы М-1 в контроле на 32-е сутки после перевивки. **А** – гистология опухоли в периферической зоне (СТ – соединительная ткань); **Б** – пролиферативная активность опухолевых клеток в зоне роста; **Б'** – зона сплошного строения опухоли; **Г** – пролиферация опухолевых клеток в зоне сплошного строения (стрелками показаны просветы сосудов). **А', Б'** – окрашивание гематоксилином и эозином; **Б, Г** – иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA; иммуногистохимическая реакция эндотелия сосудов с антителами к CD31 в перитуморальной зоне (**Д**) и в «горячей точке» паренхимы (**Е**); **А-Г** × 140, **Д, Е** × 70

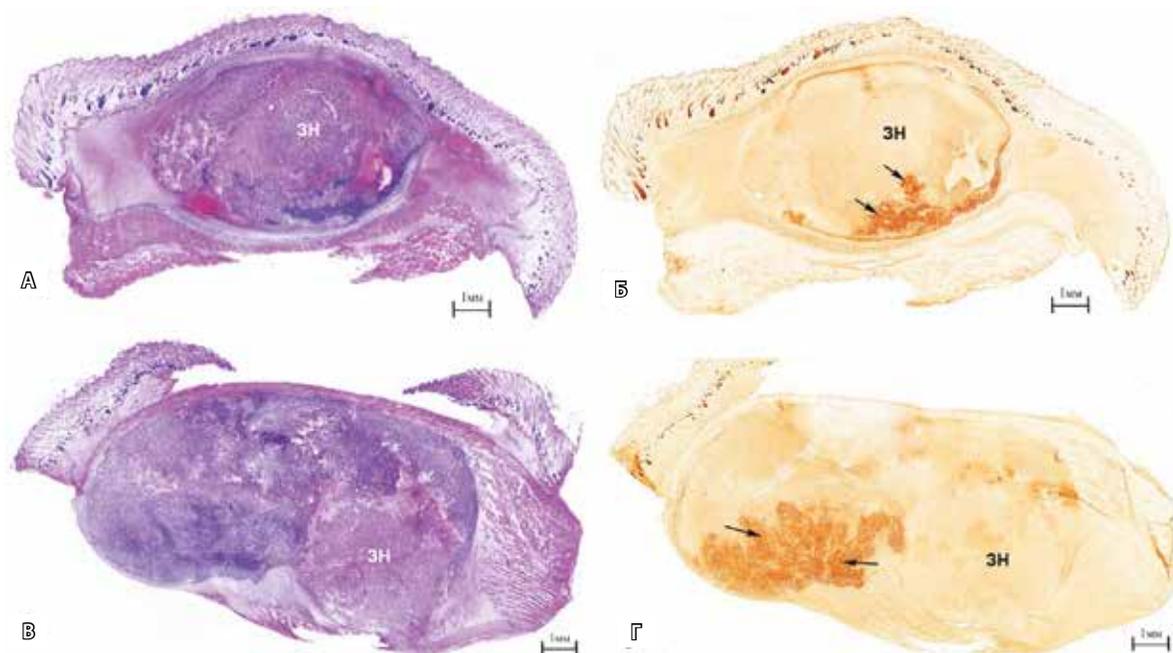


Рис. 6. Гистологический рисунок опухолевых узлов (**А, Б**) и пролиферативная активность клеток саркомы М-1 (**Б', Г**) на серийных срезах через 1 сутки после фотодинамической терапии с дисульфидным производным бактериопурпуринамида; ЗН – зоны некроза, стрелками показаны участки пролиферации опухолевых клеток. **А, Б** – окрашивание гематоксилином и эозином; **Б', Г** – иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA

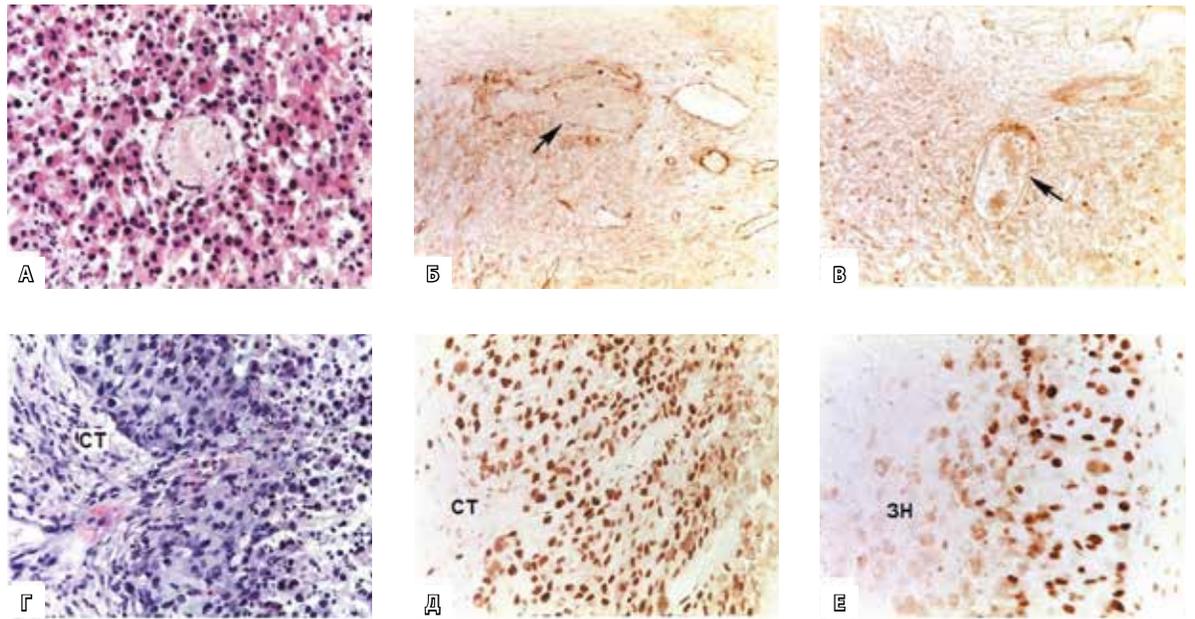


Рис. 7. Функциональная морфология саркомы М-1 через 1 сутки после фотодинамической терапии с дисульфидным производным бактериопурпуринамида. **А** – зона коагуляционного некроза; **Б, Б'** – деструкция стенок сосудов (стрелки); **Г** – фрагмент опухоли в периферической зоне (СТ – соединительная ткань). **Д–Е** – пролиферативная активность опухолевых клеток в участках сохранившейся паренхимы (ЗН – зона индуцированного некроза). **А, Г** – окрашивание гематоксилином и эозином; иммуногистохимическая реакция эндотелия сосудов с антителами к CD31 в перитуморальной зоне (**Б**) и в «горячей точке» паренхимы (**Б'**). **Д, Е** – иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA; **А, Г, Д, Е** × 140, **Б, Б'** × 70

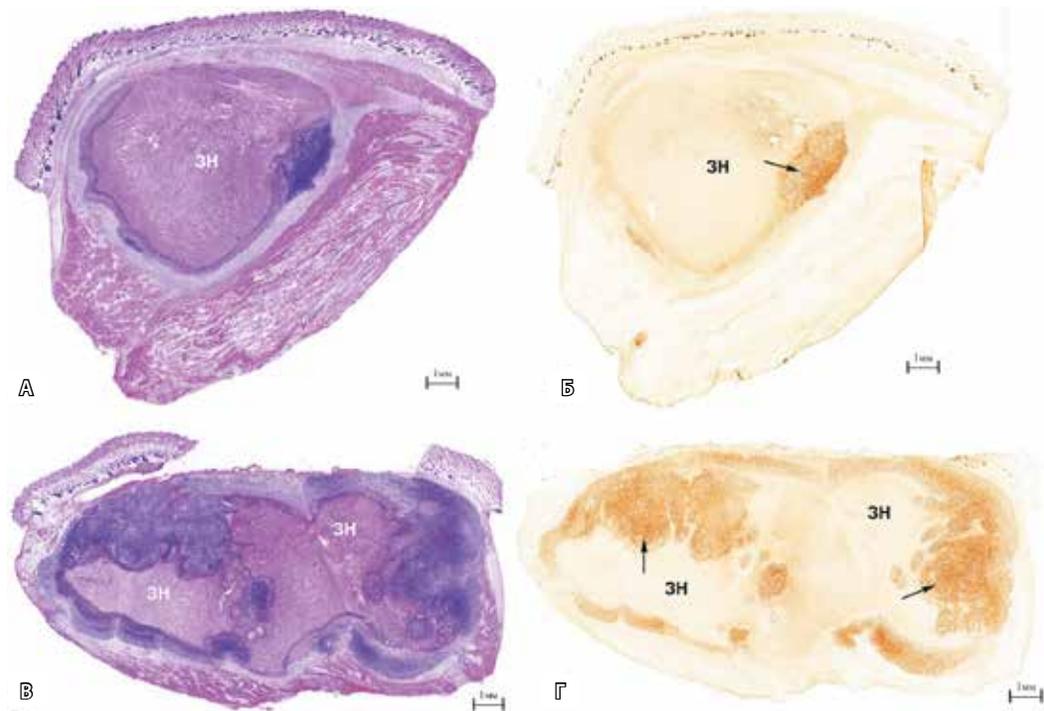


Рис. 8. Гистологический рисунок опухолевых узлов (**А, Б**) и пролиферативная активность клеток саркомы М-1 (**Б, Г**) на серийных срезах через 3 суток после фотодинамической терапии с дисульфидным производным бактериопурпуринамида; ЗН – зоны некроза, стрелками показаны участки пролиферации опухолевых клеток. **А, Б** – окрашивание гематоксилином и эозином; **Б, Г** – иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA

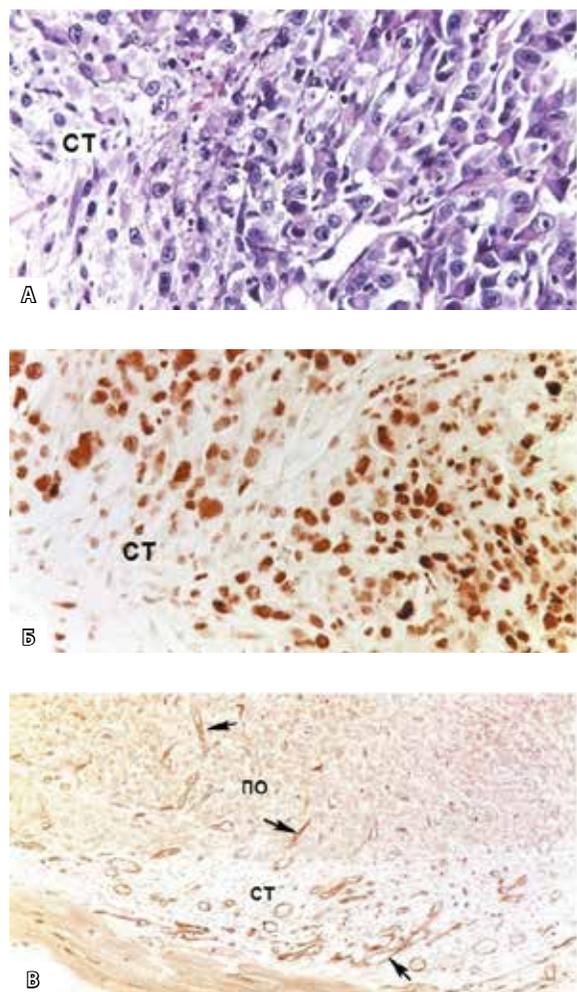


Рис. 9. Функциональная морфология саркомы М-1 через 3 суток после фотодинамической терапии с дисульфидным производным бактериопурпуринамида. **А** – гистология опухоли в периферической зоне, окрашивание гематоксилином и эозином; **Б** – пролиферативная активность опухолевых клеток на серийном срезе (СТ – соединительная ткань), иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA; **В** – иммуногистохимическая реакция эндотелия сосудов с антителами к CD31 (стрелки) в перитуморальной зоне (ПО – паренхима опухоли). **А, Б** × 200, **В** × 50

Рост и функциональная морфология саркомы М-1 после фотодинамической терапии с дисульфидным производным бактериопурпуринамида. Как видно из рис. 1, уже на 3-и сутки после ФДТ наблюдалось отчетливое замедление роста саркомы М-1. К 12-м суткам зарегистрирована регрессия опухолевых узлов с последующим возобновлением их роста. В период до 12 суток КРО стал «отрицательным», а его значение – 0,61 – свидетельствовало о высокой противоопухолевой эффективности ФДТ с дисульфид-БПИ. В исследованном интервале времени от начала

эксперимента до 21-х суток темп роста опухолей снизился в 16 раз – КРО составил 2,3.

Через 1 сутки после ФДТ на обзорных препаратах обширные зоны опухолей были представлены полями дистрофически измененной и некротизированной ткани с кровоизлияниями и очагами плазматического пропитывания (рис. 6А, В). В некоторых случаях глубина повреждения достигала основания опухолевых узлов. Фрагменты паренхимы саркомы М-1 с пролиферирующими опухолевыми клетками сохранялись в виде узких полосок на границе с подкожной клетчаткой и небольших разветвленных островков в основании опухолей (рис. 6Б, Г).

Значительная часть опухолевой ткани представлена полями коагуляционного некроза с эозинофильными контурами погибших сосудов (рис. 7А). Результаты иммуноокрашивания на CD31 свидетельствовали, что разрушение тканевых структур саркомы М-1 связано с деструкцией стенок сосудистого русла (рис. 7Б, В). При ИГХ-окрашивании на PCNA видно, что в периферических участках паренхимы (рис. 7Г) выжившие после ФДТ опухолевые клетки сохраняют репопуляционный потенциал (рис. 7Д, Е).

Согласно результатам морфометрии (см. табл.), через 1 сутки после ФДТ статистически значимо относительно контроля снижалось содержание паренхимы, окрашенной гематоксилином и эозином, Φ_{PCNA} и митотической активности опухолевых клеток в 1,7, 2,7 и 1,6 раза соответственно.

На 3-и сутки после ФДТ в 2 случаях наблюдалась картина субтотальной деструкции опухолей (рис. 8А). В 3 опухолевых узлах паренхима саркомы М-1 сохранялась в виде отдельных тяжей и фрагментов (рис. 8В), расположенных в основном по периферии, чаще над подлежащей мышечной тканью. Выжившие на этот срок опухолевые клетки локализовались поблизости от соединительной ткани и, судя по окрашиванию их ядер на PCNA, сохраняли пролиферативный потенциал (рис. 8Б, Г).

В сохранившихся участках опухолевой ткани часть клеток выглядели сжатыми и имели гиперхромный вид, другие подвергались лизису. Однако в периферических зонах саркомы М-1, прилегающих к соединительной ткани, опухолевые клетки мало отличались от «интактных» (рис. 9А), а их ядра показывали интенсивное иммуноокрашивание на PCNA (рис. 9Б).

Отчетливо визуализировалось замещение зон фотодинамического повреждения грануляционной тканью с интенсивным ангиогенезом. Из

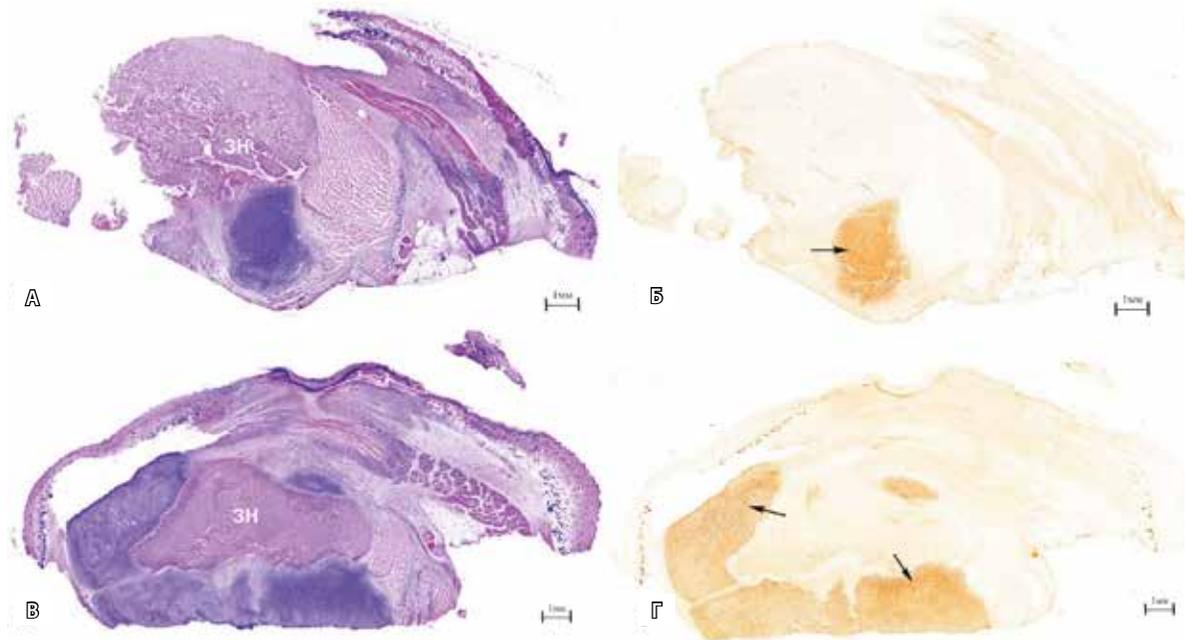


Рис. 10. Гистологический рисунок опухолевых узлов (**А, В**) и пролиферативная активность клеток саркомы М-1 (**Б, Г**) на серийных срезах через 12 суток после фотодинамической терапии с дисульфидным производным бактериопурпинимида; ЗН – зоны некроза, стрелками показаны участки пролиферации опухолевых клеток. **А, В** – окрашивание гематоксилином и эозином; **Б, Г** – иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA

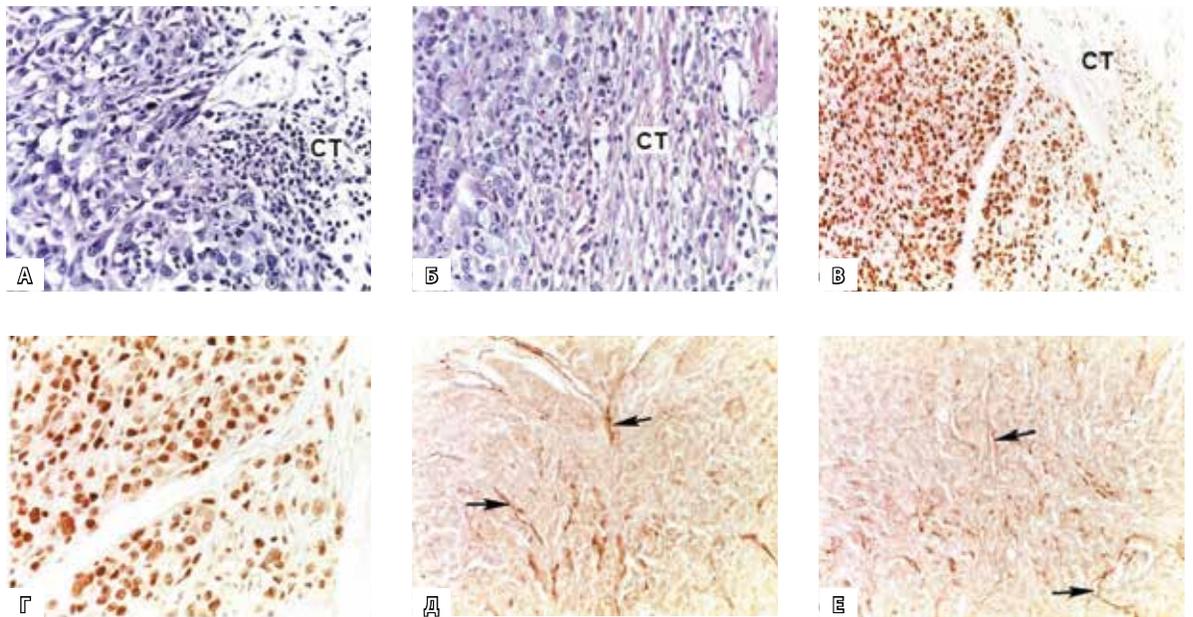


Рис. 11. Функциональная морфология саркомы М-1 через 12 суток после фотодинамической терапии с дисульфидным производным бактериопурпинимида. **А, Б** – инфильтрация перитуморальной соединительной ткани лимфоидными элементами, окрашивание гематоксилином и эозином (СТ – соединительная ткань); **Б, Г** – пролиферативная активность опухолевых клеток в зоне рецидивирующего роста, иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA; иммуногистохимическая реакция эндотелия сосудов с антителами к CD31 (стрелки) в перитуморальной зоне (**Д**) и «горячей точке» паренхимы (**Е**). **А, Б, Г** × 140, **В, Д, Е** × 70

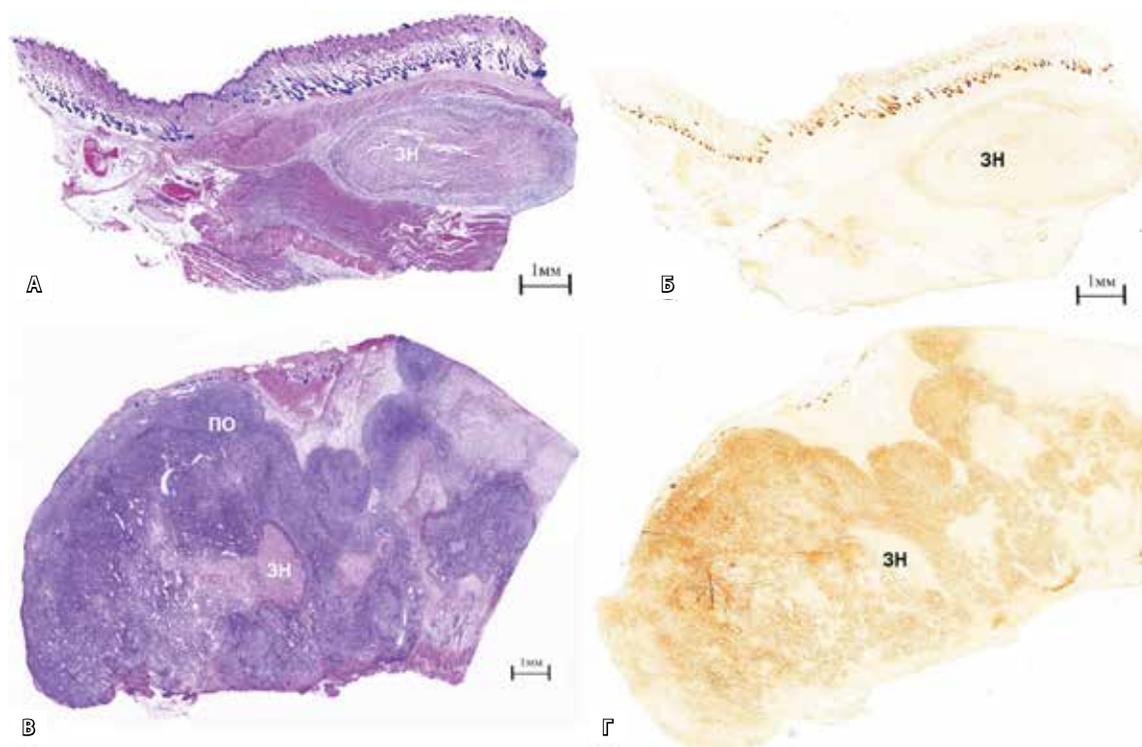


Рис. 12. Гистологический рисунок опухолевых узлов (**А, В**) и пролиферативная активность клеток саркомы М-1 (**Б, Г**) на серийных срезах через 21 сутки после фотодинамической терапии с дисульфидным производным бактериопурпуринимида. **А** – полная деструкция опухоли; **Б** – мультифокальный рост опухоли (ЗН – зоны некроза, ПО – паренхима опухоли). **А, В** – окрашивание гематоксилином и эозином; **Б, Г** – иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA

разрастающейся соединительной ткани в сохранившиеся островки опухолевой ткани врастали многочисленные микрососуды (рис. 9В). На серийных срезах видно: как только соединительная ткань и капиллярная сеть достигали опухолевых клеток, последние начинали активно пролиферировать.

На 3-и сутки после ФДТ содержание паренхимы опухолей снизилось до $23,4 \pm 6,3\%$ ($p < 0,01$ относительно контроля), однако Φ_{PCNA} увеличилась относительно предыдущего срока в 1,5 раза. Повышение репопуляционной активности опухолевых клеток и их митотического индекса указывало на усиление репаративных процессов, обусловленных, по-видимому, прорастанием капиллярных петель до выживших после ФДТ опухолевых клеток, восстановлением микроциркуляторного русла в ранее поврежденных участках и реоксигенацией паренхимы.

Начиная с 12-х суток после ФДТ поврежденная поверхность кожи в зоне облучения покрыта плотными темно-коричневыми, слегка вдавленными в центре струпами. Под струпами видны язвы, иногда доходившие до середины

опухолевых узлов. У 3 особей выявлен повторный рост опухолей. При микроскопическом исследовании видно, что рецидивирующий рост носил как моно-, так и мультифокальный характер (рис. 10).

По морфофункциональным и количественным характеристикам в этот период рецидивирующего роста саркомы опухолевые клетки практически не отличались от соответствующего контроля (см. табл., рис. 11), однако Φ_{PCNA} была достоверно ниже, чем в контроле. Обращала особое внимание интенсивная инфильтрация соединительной ткани, замещающей погибшие ткани и окружающей опухолевые узлы, лимфоидными элементами (см. рис. 11А, Б). Иногда в области соединительнотканной капсулы скопления лимфоцитов формировали лимфоцитарные островки. В местах инфильтрации лимфоцитами часть опухолевых клеток подвергалась лизису. Периферия опухолей была заполнена активно пролиферирующими клетками (рис. 11В), концентрирующимися вокруг врастающих сосудов (рис. 11Г) с характерной для саркомы М-1 ангиоархитектоникой (рис. 11Д, Е).

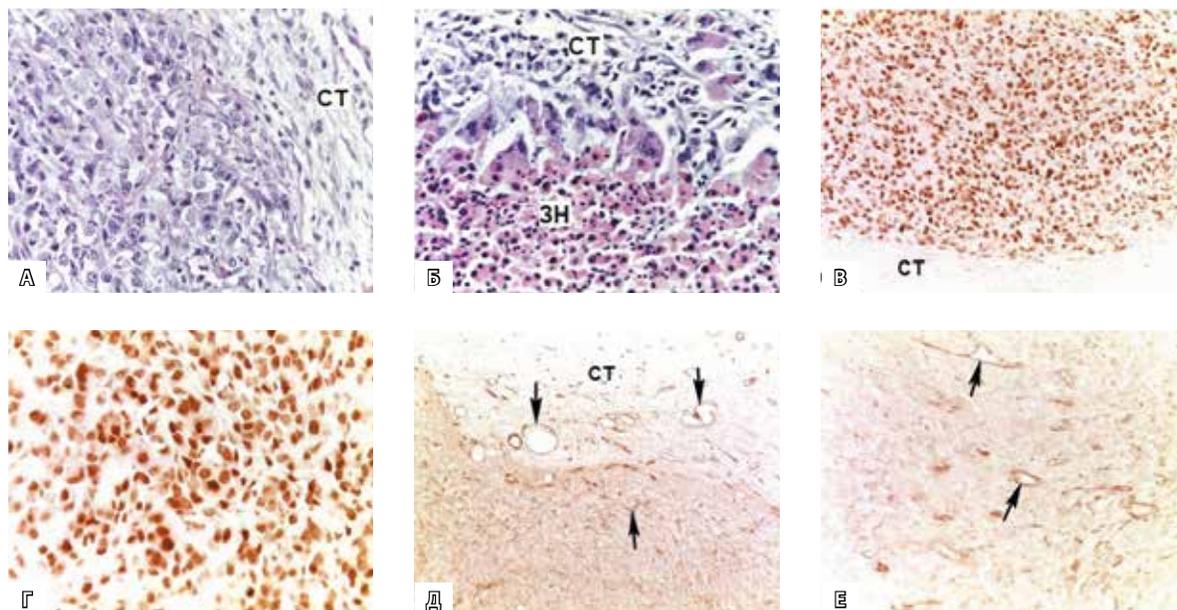


Рис. 13. Функциональная морфология саркомы М-1 на 21-е сутки после фотодинамической терапии с дисульфидным производным бактериопурпуринимида. **А** – гистология опухоли в зоне рецидивирующего роста (СТ – соединительная ткань); **Б** – элиминация погибших клеток макрофагами (ЗН – зона некроза); **В, Г** – пролиферативная активность опухолевых клеток в зоне рецидивирующего роста. **А, Б** – окрашивание гематоксилином и эозином; **В, Г** – иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA; иммуногистохимическая реакция эндотелия сосудов с антителами к CD31 (стрелки) в перитуморальной зоне (**Д**) и «горячей точке» паренхимы (**Е**). **А, Б, Г** × 140, **В, Е** × 70, **Д** × 35

На 21-е сутки после ФДТ у 2 крыс выявлена полная деструкция опухолей (рис. 12А, Б) с замещением их периферии фиброзной тканью. Мультифокальный рост саркомы М-1 (рис. 12В, Г) отмечен у 3 крыс. Периферические зоны роста с репопулирующими опухолевыми клетками (рис. 13А, В, Г) имели типичное строение. По периметру очагов некроза концентрировались полиморфно-ядерные лейкоциты и крупные многоядерные макрофаги, элиминирующие погибшие опухолевые клетки (рис. 13Б).

При иммуноокрашивании на CD31 в перитуморальной области были видны очаги неоангиогенеза с вращанием сосудов в паренхиму (рис. 13Д), а в «горячих точках» солидного строения опухолевой ткани – многочисленные неравномерно расширенные ветвящиеся капилляры (рис. 13Е).

Обсуждение

Анализ полученных результатов свидетельствует, что дисульфид-БПИ обладает высокой противоопухолевой активностью *in vivo* при ФДТ солидной соединительнотканной опухоли. Как известно, 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 [13]. Кроме того, следует учитывать избирательность накопления ФС в паренхиме солидных опухолей в связи с особенностями их васкуляризации и формирования микроциркуляторного русла [9]. 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 и могут привести к снижению эффективности химиотерапии, лучевой терапии и иммунотерапии [14, 15]. Аномальное кровоснабжение опухоли также препятствует адекватному накоплению и распределению в опухолях ФС. Очевидно, 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 избегают прямого повреждающего действия ФДТ, является неравномерность распределения сенсibilизатора в достаточных концентрациях в отдельных участках быстрорастущих и склонных к спонтанной некротизации опухолях с аномальным



кровоснабжением. Именно поэтому 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 ФС к опухолевым клеткам, возможно, путем превентивного локального усиления микроциркуляции в паренхиме [9]. Активация гемодинамики в опухолях с неадекватным кровоснабжением до введения сенсibilизатора дает дополнительные факторы усиления эффективности ФДТ.

Ранее мы отмечали [4], 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 неоангиогенезом – образованием разветвленной сети новых капилляров. Можно полагать, что ангиогенез в зонах сохранившихся жизнеспособными опухолевых клеток способствует их выживанию и/или активизирует их пролиферацию. Так, по нашим наблюдениям, в ранние сроки после ФДТ в некоторых опухолях выжившие клетки локализуются поблизости от сохранившихся сосудов соединительной ткани, окружающей опухолевые узлы. И не случайно в понимании биологии злокачественных новообразований и их таргетного лечения все большую роль исследователи отводят клеточным и молекулярным механизмам опухолевого ангиогенеза [16] и перспективам применения антиангиогенных мероприятий при ФДТ [17, 18].

По данным литературы, сильная воспалительная реакция и активированная ФДТ иммунная защита организма против опухолей представляют одно из центральных событий в механизме деструкции опухоли и включают комплексный ряд взаимодействующих специфических и неспецифических реакций разных типов клеток, способных эффективно уничтожить опухолевые клетки путем цитолитических и апоптотических

механизмов [13, 19]. Результаты наших исследований также свидетельствуют, что индукторные факторы, включающие воспалительную реакцию в зоне фотодинамического воздействия с активизацией клеток микроокружения – макрофагов, нейтрофилов и лимфоцитов, оказывают влияние на опухолевые клетки в период рецидивирующего роста саркомы М-1.

Заключение

Противоопухолевое действие ФДТ с дисульфид-БПИ обусловлено разрушением сосудистого русла, ингибированием пролиферативной активности и девитализацией опухолевых клеток путем некроза. В ранние сроки после ФДТ снижение пролиферативной активности опухолевых клеток, развитие коагуляционного некроза, а также деструкция микроциркуляторного русла, по-видимому, обусловлены прямым действием продуктов фотохимических реакций используемого сенсibilизатора на соответствующие внутриклеточные структуры и механизмы. Не вызывает сомнения и вклад гипоксии, быстро развивающейся в условиях не только нарушения гемодинамики, но и уменьшения уровня кислорода в процессе фотохимической реакции. Конечный результат ФДТ с дисульфид-БПИ определяется последовательностью деструктивных и воспалительных изменений в паренхиме опухолей и окружающих тканях, а также пролиферативным потенциалом выживших после лечения опухолевых клеток. Не исключено, что по причине неравномерности распределения сенсibilизатора в достаточно эффективной концентрации в отдельных слабо васкуляризованных участках саркомы М-1 сохраняются выжившие опухолевые клетки, определяющие рецидивирующий рост новообразований после ФДТ.

Полученные результаты указывают на перспективность применения нового ФС для ФДТ солидных злокачественных новообразований, возможно, в сочетании с имеющимися ингибиторами ангиогенеза. ☺

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

Литература

- Каплан МА, Капинус ВН, Попучиев ВВ, Романко ЮС, Ярославцева-Исаева ЕВ, Спиченкова ИС, Шубина АМ, Боргуль ОВ, Горанская ЕВ. Фотодинамическая терапия: результаты и перспективы. Радиация и риск. 2013;22(3):115–23.
- Филоненко ЕВ, Серова ЛГ. Фотодинамическая терапия в клинической практике. Biomedical Photonics. 2016;5(2):26–37.
- Sibata CH, Colussi VC, Oleinick NL, Kinsella TJ. Photodynamic therapy in oncology. Expert Opin Pharmacother. 2001;2(6):917–27. doi: 10.1517/14656566.2.6.917.
- Каплан МА, Романко ЮС, Попучиев ВВ, Южаков ВВ, Бандурко ЛН, Фомина НК, Михина ЛН, Малыгина АИ, Ингель ИЭ. Действие фотодинамической терапии с Фотодитазином на рост и функциональную морфологию саркомы М-1. Лазерная медицина. 2005;9(4):41–7.
- Pervaiz S. Reactive oxygen-dependent production of novel photochemotherapeutic agents. FASEB J. 2001;15(3):612–7. doi: 10.1096/fj.00-0555rev.
- Kessel D, Dougherty TJ. Agents used in photodynamic therapy. Reviews in Contemporary Pharmacotherapy. 1999;10(1):19–24.



7. Grin MC, Mironov AF, Shtil AC. Bacteriochlorophyll a, and its derivatives: chemistry and perspectives for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2008;8(6):683–97. doi: 10.2174/187152008785133128.
8. Пантюшенко ИВ, Грин МА, Якубовская РИ, Плотникова ЕА, Морозова НБ, Цыганков АА, Миронов АФ. Новый высокоэффективный ИК-фотосенсибилизатор для фотодинамической терапии рака. Тонкие химические технологии. 2014;9(3):3–10.
9. Южаков ВВ, Бурмистрова НВ, Фомина НК, Бандурко ЛН, Севаньяева ЛЕ, Старовойтова АВ, Яковлева НД, Цыганова МГ, Ингель ИЭ, Островерхов ПВ, Каплан МА, Грин МА, Мажуга АГ, Миронов АФ, Галкин ВН, Романко ЮС. Морфофункциональные характеристики саркомы М-1 крыс после фотодинамической терапии с производным бактериохлорофилла а. *Biomedical Photonics.* 2016;5(4):4–14.
10. Южаков ВВ, Хавинсон ВХ, Кветной ИМ, Фомина НК, Кузнецова МН. Кинетика роста и функциональная морфология саркомы М-1 у интактных крыс и после гамма-облучения. *Вопросы онкологии.* 2001;47(3):328–34.
11. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991;324(1):1–8. doi: 10.1056/NEJM199101033240101.
12. Al-Najar A, Al-Sanabani S, Korda JB, Hegeler A, Bolenz C, Herbst H, Jönemann KP, Naumann CM. Microvessel density as a prognostic factor in penile squamous cell carcinoma. *Urol Oncol.* 2012;30(3):325–9. doi: 10.1016/j.urolonc.2010.03.016.
13. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(12):889–905.
14. Rak JW, St Croix BD, Kerbel RS. Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer therapy. *Anticancer Drugs.* 1995;6(1):3–18.
15. Goel S, Duda DG, Xu L, Munn LL, Boucher Y, Fukumura D, Jain RK. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev.* 2011;91(3):1071–121. doi: 10.1152/physrev.00038.2010.
16. Plate KH, Scholz A, Dumont DJ. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in malignant gliomas revisited. *Acta Neuropathol.* 2012;124(6):763–75. doi: 10.1007/s00401-012-1066-5.
17. Ferrario A, von Tiehl KF, Rucker N, Schwarz MA, Gill PS, Gomer CJ. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res.* 2000;60(15):4066–9.
18. Gomer CJ, Ferrario A, Luna M, Rucker N, Wong S. Photodynamic therapy: combined modality approaches targeting the tumor microenvironment. *Lasers Surg Med.* 2006;38(5):516–21. doi: 10.1002/lsm.20339.
19. Каплан МА, Романко ЮС, Попучиев ВВ, Южаков ВВ, Бандурко ЛН, Михина ЛН, Фомина НК, Малыгина АИ, Ингель ИЭ. Влияние плотности световой энергии на противоопухолевую эффективность фотодинамической терапии с Фотодитазин. *Лазерная медицина.* 2005;9(2):46–54.
1. Kaplan MA, Kapinus VN, Popuchiev VV, Romanko YuS, Yaroslavtseva-Isaeva EV, Spichenkova IS, Shubina AM, Borgul OV, Goranskaya EV. Photodynamic therapy: results and prospects. *Radiation and Risk.* 2013;22(3):115–23. Russian.
2. Filonenko EV, Serova LG. Photodynamic therapy in clinical practice. *Biomedical Photonics.* 2016;5(2):26–37. Russian.
3. Sibata CH, Colussi VC, Oleinick NL, Kinsella TJ. Photodynamic therapy in oncology. *Expert Opin Pharmacother.* 2001;2(6):917–27. doi: 10.1517/14656566.2.6.917.
4. Kaplan MA, Romanko YS, Popuchiev VV, Yuzhakov VV, Bandurko LN, Fomina NK, Mikhina LN, Malygina AI, Ingel IE. Action of photodynamic therapy with photoditazin on growth and functional morphology of sarcoma M-1. *Lazernaya meditsina [Laser Medicine].* 2005;9(4):41–7. Russian.
5. Pervaiz S. Reactive oxygen-dependent production of novel photochemotherapeutic agents. *FASEB J.* 2001;15(3):612–7. doi: 10.1096/fj.00-0555rev.
6. Kessel D, Dougherty TJ. Agents used in photodynamic therapy. *Reviews in Contemporary Pharmacotherapy.* 1999;10(1):19–24.
7. Grin MC, Mironov AF, Shtil AC. Bacteriochlorophyll a, and its derivatives: chemistry and perspectives for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2008;8(6):683–97. doi: 10.2174/187152008785133128.
8. Pantyushenko IV, Grin MA, Yakubovskaya RI, Plotnikova EA, Morozova NB, Tsygankov AA, Mironov AF. The novel highly effective IR-photosensitized for photodynamic therapy of cancer. *Fine Chemical Technologies.* 2014;9(3):3–10. Russian.
9. Yuzhakov VV, Burmistrova NV, Fomina NK, Bandurko LN, Sevanykaeva LE, Starovoytova AV, Yakovleva ND, Tsyganova MG, Ingel IE, Ostroverkhov PV, Kaplan MA, Grin MA, Mazhuga AG, Mironov AF, Galkin VN, Romanko YS. Morphofunctional characteristics of rat sarcoma M-1 after photodynamic therapy with the bacteriochlorophyll a derivative. *Biomedical Photonics.* 2016;5(4):4–14. Russian.
10. Iuzhakov VV, Khavinson VK, Kvetnoy IM, Fomina NK, Kuznetsova MN. Growth kinetics and functional morphology of M-1 sarcoma in rats before and after gamma-irradiation. *Problems in Oncology.* 2001;47(3):328–34. Russian.
11. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991;324(1):1–8. doi: 10.1056/NEJM199101033240101.
12. Al-Najar A, Al-Sanabani S, Korda JB, Hegeler A, Bolenz C, Herbst H, Jönemann KP, Naumann CM. Microvessel density as a prognostic factor in penile squamous cell carcinoma. *Urol Oncol.* 2012;30(3):325–9. doi: 10.1016/j.urolonc.2010.03.016.
13. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Peng Q. Photody-



Effect of photodynamic therapy with the bacteriochlorophyll *a* derivative on growth and functional morphology of rat sarcoma M-1

Yuzhakov V.V.¹ • Romanko Yu.S.¹ • Kaplan M.A.¹ • Galkin V.N.¹ • Majouga A.G.² • Grin M.A.³ • Burmistrova N.V.¹ • Fomina N.K.¹ • Bandurko L.N.¹ • Sevankaeva L.E.¹ • Yakovleva N.D.¹ • Ingel I.E.¹ • Mozerov S.A.¹ • Starovoytova A.V.¹

Background: In recent years, the method of photodynamic therapy (PDT) has been increasingly used in clinical oncology. Three non-toxic components play a key role in realization of the anti-tumor effect of PDT: a photosensitizer (PS), local irradiation of the tumor with light/laser of a certain wavelength corresponding to the sensitizer absorption peak, and oxygen. The highly reactive biological oxidants formed during photochemical reactions exert a destructive effect on cells and tumor vasculature with subsequent activation of the immune response. Efficiency of PDT is determined by the level of PS accumulation in tumors, as well as by its photophysical parameters and photochemical activity. To create a new PS, natural chlorophylls and their derivatives with intense absorption in the long-wave region of the spectrum are of particular interest. **Aim:** To study the efficacy and mechanism of PDT action (using a conjugate containing two molecules of dipropoxy-bacteriopurpurinimide with a cystamine residue as a PS) on the growth and functional morphology of transplanted solid connective tissue tumor. **Materials and methods:** The study was carried out in female white outbred rats with subcutaneously implanted sarcoma M-1. PS was injected to rats of the experimental group intraperitoneally. PDT was performed during the maximal index of tumor/healthy tissue contrast after the administration of the PS. The criterion of PDT efficacy was a change in the tumor growth/regression coefficient. 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. **Results:** After PDT with the new PS, a 16-fold decrease of

growth coefficient of tumor nodes was registered. The photo-induced antitumor effect was shown to be due to destruction of sarcoma M-1 vascular bed, rapid inhibition of proliferative activity and devitalization of tumor cells. At early stages after PDT, destruction of the microvasculature and photo-cytostatic shock of tumor cells with subsequent development of necrosis appears to be caused by direct influence of the light flux on sensitized cellular elements in tumor parenchyma and stroma. **Conclusion:** The final result of PDT is determined by the sequence of destructive and inflammatory changes in the tumor parenchyma and surrounding tissues, as well as by a proliferative potential of malignant cells surviving after treatment. The surviving tumor cells, which determine the recurrent growth of neoplasms after PDT, are still present, maybe due to an insufficient concentration of the sensitizer in certain weakly vascularized areas of sarcoma M-1.

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

For citation: Yuzhakov VV, Romanko YuS, Kaplan MA, Galkin VN, Majouga AG, Grin MA, Burmistrova NV, Fomina NK, Bandurko LN, Sevankaeva LE, Yakovleva ND, Ingel IE, Mozerov SA, Starovoytova AV. Effect of photodynamic therapy with the bacteriochlorophyll *a* derivative on growth and functional morphology of rat sarcoma M-1. Almanac of Clinical Medicine. 2017;45(4):333–47. doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-4-333-347

Received 21 April 2017; Accepted 29 May 2017

Yuzhakov Vadim V. – MD, PhD, Head of Laboratory of Radiation Pathomorphology¹

✉ 4 Koroleva ul., Obninsk, Kaluzhskaya oblast', 249036, Russian Federation. Tel.: +7 (903) 635 79 71. E-mail: yuzh_vad@mail.ru

Romanko Yuriy S. – MD, PhD, Professor, Head of Scientific and Organizational Department¹

Kaplan Mikhail A. – MD, PhD, Professor, Head of Department of Photodynamic Diagnosis and Therapy¹

Galkin Vsevolod N. – MD, PhD, Professor, Director¹

Majouga Aleksandr G. – PhD (in Chemistry), Professor, Chair of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry²

Grin Mikhail A. – PhD (in Chemistry), Professor, Chair of Chemistry and Technology of Biologically Active Substances Produced by Fine Organic Synthesis³

Burmistrova Nelly V. – PhD (in Biology), Senior Researcher, Head of Laboratory of Experimental Photodynamic Therapy¹

Fomina Natalia K. – PhD (in Biology), Senior Researcher, Laboratory of Radiation Pathomorphology¹

Bandurko Lyubov N. – MD, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Radiation Pathomorphology¹

Sevankaeva Larisa E. – Senior Researcher, Laboratory of Radiation Pathomorphology¹

Yakovleva Nina D. – PhD (in Biology), Leading Researcher, Laboratory of Radiation Pathomorphology¹

Ingel Irina E. – PhD (in Biology), Senior Researcher, Laboratory of Radiation Pathomorphology¹

Mozerov Sergey A. – MD, PhD, Head of Clinico-Morphological Department¹

Starovoytova Anna V. – Research Assistant, Laboratory of Experimental Photodynamic Therapy¹

¹ A. Tsyb Medical Radiological Research Centre – branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation; 4 Koroleva ul., Obninsk, Kaluzhskaya oblast', 249036, Russian Federation

² Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation

³ Moscow Technological University; 86 Vernadskogo prospekt, Moscow, 119571, Russian Federation

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.