

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА «БАКТЕРИОСЕНС», ПРЕДНАЗНАЧЕННОГО ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ, В ТОМ ЧИСЛЕ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Н.Б. Морозова¹, Е.А. Плотникова¹, А.Д. Плютинская¹, В.О. Страмова¹, М.С. Воронцова¹, А.А. Панкратов¹,
Р.И. Якубовская¹, Е.А. Макарова², Е.А. Лукьянец², А.Д. Каприн¹

¹МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России;
Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, 3;

²ФГУП «Государственный научный центр “НИОПИК”»; Россия, 123001 Москва, ул. Большая Садовая, 1, корп. 4

Контакты: Наталья Борисовна Морозова n.b.morozova@yandex.ru

Введение. Наиболее перспективными фотосенсибилизаторами, поглощающими в ближнем инфракрасном диапазоне спектра, являются бактериохлорины. Их использование позволяет увеличить эффективность фотодинамической терапии за счет более глубокого проникновения излучения в опухоль.

Цель исследования – доклиническое изучение противоопухолевой фотоиндуцированной активности и биораспределения препарата «Бактериосенс».

Материалы и методы. «Бактериосенс» – препарат на основе мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина, поглощающий при 747 нм. Фотоиндуцированную цитотоксичность *in vitro* изучали на опухолевых клетках человека – A549, Hep2, BT-474, MCF-7, SK-BR-3, PC3, EJ и мыши – S37, C26, LLC. Исследования *in vivo* проводили на мышах с опухолями S37, LLC, C26, большого и малого размера.

Результаты. В системе *in vitro* «Бактериосенс» при оптическом облучении приводил к эффективному подавлению роста опухолевых клеток в культуре (величина IC_{50} варьировала от 0,08 мкМ до 1,21 мкМ) и характеризовался отсутствием токсичности без воздействия света. Фотодинамическая терапия с «Бактериосенсом» у мышей с инокулированными опухолями (малого и большого размера) различного генеза, проведенная в эффективном режиме, приводила к регрессии первичного опухолевого узла на 90–100 % при отсутствии рецидива опухоли в течение 90 сут после лечения.

Выводы. «Бактериосенс» является перспективным препаратом для фотодинамической терапии опухолей малого и большого размера, может успешно использоваться в качестве альтернативного, органосохраняющего малоинвазивного метода лечения злокачественных новообразований, в том числе рака предстательной железы.

Ключевые слова: «Бактериосенс», фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, биораспределение, фотоиндуцированная противоопухолевая активность

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-55-64

PRECLINICAL TRIAL OF BACTERIOSENS USED FOR THE PHOTODYNAMIC THERAPY OF MALIGNANT TUMORS, INCLUDING PROSTATE CANCER

N.B. Morozova¹, E.A. Plotnikova¹, A.D. Plyutinskaya¹, V.O. Stramova¹, M.S. Vorontsova¹, A.A. Pankratov¹,
R.I. Yakubovskaya¹, E.A. Makarova², E.A. Lukyanets², A.D. Kaprin¹

¹P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – Branch of the National Medical Research Center of Radiology,
Ministry of Health of Russia; 3, 2nd Botkinskiy Proezd, Moscow 125284, Russia;

²State scientific center “NIOPIK”; Bldg 4, 1 Bolshaya Sadovaya St., Moscow 123001, Russia

Introduction. Bacteriochlorins are the most promising photosensitizers absorbing in the near-infrared spectral region. Their use can enhance the efficiency of photodynamic therapy due to the deeper penetration of radiation into the tumor.

Objective to conduct a preclinical study of the photoinduced antitumor activity and biodistribution of Bacteriosens.

Materials and methods. Bacteriosens is a preparation based on meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin absorbing at 747 nm. Photoinduced cytotoxicity was investigated *in vitro* using human tumor cells: A549, Hep 2, BT-474, MCF-7, SK-BR-3, PC3, and EJ and murine tumor cells: S37, C26, and LLC. *In vivo* studies were performed in mice with large and small tumors (S37, LLC, and C26).

Results. *In vitro* investigation show that bacteriosens during optical irradiation led to the effective suppression of tumor cell growth in culture (the IC_{50} value varied from 0,08 μ M to 1,21 μ M) and had no toxicity without exposure to light. The effective photodynamic

therapy regimen using Bacteriosens in mice with inoculated small and large tumors of different genesis resulted in regression of a primary tumor node on 90–100 % of the animals in the absence of tumor recurrence within 90 days after treatment.

Conclusion. Bacteriosens is a promising agent for the photodynamic therapy of small and large tumors; it can be successfully used as an alternative, organ-sparing minimally invasive treatment for malignant tumors, including prostate cancer.

Keywords: Bacteriosens, photodynamic therapy, photosensitizer, biodistribution, photoinduced antitumor activity

Введение

В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями мужского населения России в 2016 г. рак предстательной железы (РПЖ) занимает 2-е место (14 %) после рака легких (17,6 %). Смертность от данного заболевания в 2016 г. в России составила 7,9 % [1]. Высокий уровень заболеваемости РПЖ является общемировой тенденцией.

Основные способы лечения РПЖ – хирургический метод, химиотерапия, гормональная, лучевая терапия, а также комбинированное лечение [2–6]. У каждого из них есть достоинства, недостатки и ограничения. Одна из наиболее сложных проблем – реабилитация онкологических больных после проведенного радикального лечения. В настоящее время среди возможных вариантов лечения локализованного рака предстательной железы все большее значение приобретают малоинвазивные методики локальной терапии, такие как ультразвуковая и радиочастотная абляция, брахитерапия, криотерапия и фотодинамическая терапия (ФДТ) [7–9].

В последние десятилетия ФДТ показала свою перспективность при лечении опухолей различных локализаций, в том числе РПЖ. Основными преимуществами ФДТ перед общепринятыми методами лечения злокачественных новообразований являются избирательность, отсутствие риска хирургического вмешательства и тяжелых системных осложнений, допустимость многократного повторения, сочетание в одной процедуре флуоресцентной диагностики и лечебного воздействия, низкая стоимость лечения [10].

Фотодинамическая терапия – методика лечения рака, основанная на взаимодействии света, фотосенсибилизатора (ФС) и кислорода. При возбуждении ФС светом определенной длины волны, соответствующей максимуму его поглощения, в ткани при наличии кислорода образуются радикалы, которые обладают большой химической активностью и инициируют свободнорадикальные реакции, приводящие к гибели опухолевых клеток и ткани [10–12].

Фотодинамическая терапия может применяться как малоинвазивная терапия при лечении РПЖ с использованием различных ФС, находящихся на разных стадиях клинических испытаний: «Фоскан» (mTHPC) с длиной волны возбуждения 652 нм, TOOKAD (WST09 и WST11) – 763 нм, MOTEXAFIN LUTETIUM (MLu) – 732 нм, аминоклевулиновая кислота (5-ALA) (как пролекарство – предшествен-

ник протопорфирина IX) и «Фотифрин» – 630 нм, Визудин (Вертепорфин) – 689 нм, производные фталоцианина – 670–690 нм [9, 13, 14].

Успешное применение метода ФДТ для лечения злокачественных новообразований, в том числе РПЖ, стимулирует поиск новых ФС с поглощением в длинноволновой области спектра. Наиболее перспективными для ФДТ являются ФС с максимумом поглощения в дальнем красном и ближнем инфракрасном диапазонах (700–850 нм), так называемом «терапевтическом окне», где собственное поглощение биологической ткани минимально. Это обеспечивает возможность более глубокого проникновения излучения в ткань и, как следствие, высокую эффективность противоопухолевой терапии [14–17].

Наиболее перспективными ФС для ФДТ, поглощающими в ближнем инфракрасном диапазоне спектра, являются бактериохлорины. Использование бактериохлоринов, имеющих интенсивное поглощение в интервале 720–800 нм, позволяет увеличить эффективность ФДТ за счет более глубокого проникновения излучения в опухоль. Однако многие из них имеют ограниченное применение из-за низкой химической стабильности, фотостабильности и высокой гидрофобности, что требует поиска транспортных систем, эффективно доставляющих ФС к опухолевой ткани [9, 13]. Целью данного исследования стало изучение специфической фотоиндуцированной активности нового препарата «Бактериосенс» (на основе синтетического производного бактериохлорина) в системе *in vitro* и *in vivo* с использованием опухолевых моделей различного гистогенеза и РПЖ.

Материалы и методы

Фотосенсибилизатор

Препарат «Бактериосенс» – лиофилизат для приготовления раствора для инфузий производства ФГУП «ГНЦ «НИОПИК»» (Россия). Активный компонент (мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин) [18]. В качестве растворителя используется 0,025 % раствор гидрокарбоната натрия (NaHCO_3) – $\lambda_{\text{max}} = 747$ нм. Для исследований *in vitro* и *in vivo* раствор препарата готовили *ex tempore*.

Исследования *in vitro*

Изучение фотоиндуцированной активности препарата «Бактериосенс» проводили на опухолевых клетках человека эпителиального происхождения

(предстательной железы: аденокарцинома (PC3), карцинома (LnCap4); легкого: карцинома (A549); гортаноглотки: эпидермоидная карцинома (Hep2); молочной железы: карцинома (BT-474); аденокарцинома (MCF-7), аденокарцинома (SK-BR-3); мочевого пузыря: карцинома (EJ); толстой кишки: карцинома (HT-29)) и опухолевых клетках мышцы различного генеза (саркомы мягких тканей (S37), аденокарциномы толстой кишки (C26), карциномы легкого Льюис (LLC)), адаптированных нами для роста в культуре *in vitro*.

Культивирование опухолевых клеток *in vitro* проводилось согласно рекомендациям, указанным в сертификате культуры клеток с использованием соответствующих сред с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) [19, 20]. Пассирование клеток проводилось при 37 °С во влажной атмосфере с содержанием 5 % CO₂ (стандартные условия).

Методика проведения фотодинамического воздействия на опухолевые клетки

Для оценки фотоиндуцированной активности «Бактериосенса» клетки рассеивались в 96-луночные культуральные планшеты, инкубировались в течение 28 ч в стандартных условиях. Посевная концентрация клеток устанавливалась для каждой культуры с таким расчетом, чтобы воздействие проходило в экспоненциальной (логарифмической) фазе роста клеток. Далее в планшеты вносился ФС при варьировании концентрации от 0,002 до 2,4 мкМ (в триплетах) и проводилось облучение галогеновой лампой с использованием широкополосного фильтра КС-19 ($\lambda \geq 720$ нм). Плотность мощности составляла $21,0 \pm 1,0$ мВт/см², а световая доза – 10 Дж/см². Выбранный

временной интервал инкубации – 30 мин, 1, 2, 4 и 6 ч. Облучение проводили в 2 модификациях: с удалением препарата из среды инкубации и без удаления ФС. После воздействия светом клетки инкубировались в стандартных условиях 24–28 ч. Оценка выживаемости клеток проводилась визуально и колориметрическим методом с использованием МТТ-теста [21]. Критериями оценки цитотоксического эффекта являлись величины ИК₅₀ и ИК₉₀, т. е. концентрации лекарственного средства, вызывающие торможение роста клеток на 50 и 90 %.

Исследования *in vivo*

Животные. Исследования проводили на мышах в возрасте 7–10 нед (табл. 1).

Животные находились на стандартной сбалансированной диете с использованием экструдированного комбикорма для содержания мелких лабораторных грызунов SPF категории «ЧАРА» компании ЗАО «Ассортимент-Агро» и водопроводной воды, фильтрованной путем системы обратного осмоса OsmoStreamCompact OD 200.

Исследования были одобрены комиссией по биоэтике и проведены с соблюдением принципов гуманности в соответствии с национальными стандартами. Опухолевый материал прививали мышам подкожно с внешней стороны бедра (при необходимости предварительно удаляли шерстный покров с помощью крема-депилятора).

Изучение биораспределения и флуоресцентной контрастности. Оценку распределения «Бактериосенса» в опухолевой (S37, LLC, C26, Ca755, PC3) и окружающей ткани (кожа) проводили по уровню нормированной флуоресценции, отражающей накопление

Таблица 1. Характеристика опухолевых моделей и используемых животных

Опухолевая модель (аббревиатура)	Мыши		Источник получения животных	Содержание животных
	линия	пол		
Перевивные опухоли				
Саркома мягких тканей (S37)	Гибриды 1-го поколения F ₁ (CBA × C57Bl/6J)	Самки	Научный центр биомедицинских технологий РАМН (филиал НЦБТ «Андреевка»)	Конвенциональные условия
Карцинома легкого Льюис (LLC)	C57Bl/6J	Самки	НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН (Пушино)	SPF
Аденокарцинома молочной железы (Ca755)				
Клеточные линии				
Аденокарцинома толстой кишки мыши (C26)	BALB/c	Самки	Научный центр биомедицинских технологий РАМН (филиал НЦБТ «Андреевка»)	Конвенциональные условия
Аденокарцинома предстательной железы человека (PC3)	BALB/c Nude (nu/nu)	Самцы	НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН (Пушино)	SPF

фотоактивной формы препарата, методом локальной флуоресцентной спектроскопии (ЛФС) *ex vivo*, на лазерной установке для флуоресцентной диагностики и контроля ФДТ «ЛЭСА 6» («БИОСПЕК», Россия). Препарат вводили внутривенно в дозах 1, 2,5 и 6,25 мг/кг. Через различные интервалы времени (5 мин – 24 ч) после введения ФС мышей умерщвляли дислокацией шейных позвонков, извлекали опухолевый узел, окружающую кожу и *ex vivo* регистрировали флуоресценцию в спектральном диапазоне 640–850 нм.

Интегральную интенсивность флуоресценции, соответствующую максимуму флуоресценции «Бактериосенса» ($\lambda_{\max} = 747$ нм), полученную при анализе образцов ткани, нормировали на интегральную интенсивность сигнала обратного диффузного рассеяния возбуждающего лазерного излучения (633 нм) и таким образом определяли нормированную флуоресценцию (ФН) в тканях. Величину флуоресцентной контрастности (ФК) рассчитывали как отношение средней величины ФН в опухоли к средней величине ФН в коже.

Изучение фотоиндуцированной противоопухолевой активности. Эффективность противоопухолевого действия ФДТ с «Бактериосенсом» оценивали у мышей с опухолями малого размера 130 ± 30 мм³ (S37) – 6–7-й день роста опухоли, среднего размера 230 ± 30 мм³ (PC3) – 9–10-й день роста опухоли и большого размера 400 ± 40 мм³ (S37, LLC, C26, Ca755) – 12–14-й день роста опухоли. В качестве анестезии применяли дроперидол (2,5 мг/мл) внутривенно за 10–15 мин до сеанса ФДТ. Для облучения использовали светодиодный источник излучения с $\lambda = 752 \pm 14$ нм (экспериментальный образец, разработанный в ФГУП «ГНЦ «НИОПИК»», с регулятором плотности мощности светового излучения 30–150 мВт/см²).

С целью отработки эффективных режимов проведения ФДТ с «Бактериосенсом» варьировали дозу препарата (0,5–7,5 мг/кг), интервал времени между его введением и облучением (5 мин – 24 ч), дозу света (60–180 Дж/см²) у мышей с саркомой S37. При лечении опухолей большого размера (S37, LLC, C26, Ca755) варьировали количество полей облучения (одно- и полипозиционный режимы, суммарная световая доза 270 Дж/см²).

Эффективность ФДТ оценивали по общепринятым в экспериментальной онкологии критериям в процентах: торможению роста опухоли (ТРО), увеличению продолжительности жизни (УПЖ) и критерию излеченности (КИ) животных [21]. Биологически значимым терапевтическим эффектом считали ТРО ≥ 70 %, УПЖ 50 %, КИ ≥ 25 %. Для статистической оценки различий между группами применяли U-критерий Манна–Уитни, расчеты проводили с использованием программы Primer of Biostatistics

версии 4.03. Отличия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Исследования *in vitro*

В биологических тестах *in vitro* установлено, что препарат «Бактериосенс» в диапазоне концентраций от 0,002 до 2,4 мкМ не обладал темновой цитотоксичностью относительно культур опухолевых клеток человека PC3, LnCap4, A549, HEP2, BT-474, MCF-7, SK-BR-3, EJ и HT-29 и мыши S-37, C26 и LLC (табл. 2). При воздействии светом препарат проявлял высокую специфическую активность в системе *in vitro* (величина ИК₅₀ при оптимальном времени инкубации, варьировала от 0,08 до 1,21 мкМ в зависимости от культуры клеток).

Показано, что максимальная фотоиндуцированная активность «Бактериосенса» для культуры S37 отмечена при 4 ч инкубации до воздействия, для всех остальных клеточных линий максимальный эффект при фотодинамическом воздействии достигался при 2-часовом инкубировании, и с увеличением времени до 6 ч разница в значении величины ИК₅₀ была статистически незначимой. Данные опытов с удалением препарата из среды культивирования косвенно свидетельствуют о том, что «Бактериосенс» эффективно

Таблица 2. Фотоиндуцированная активность препарата «Бактериосенс» (ИК₅₀, мкМ) относительно опухолевых клеток человека и мыши (при оптимальном времени инкубации до воздействия)

Клеточная линия	ИК ₅₀ , мкМ	
	облучение при наличии фотосенсибилизатора в среде инкубации	облучение с удалением фотосенсибилизатора из среды инкубации
Культуры опухолевых клеток человека		
PC3	0,28 ± 0,01	0,38 ± 0,02
LnCap4	0,29 ± 0,02	0,37 ± 0,01
A549	0,32 ± 0,02	0,47 ± 0,01
HEP2	0,24 ± 0,01	0,26 ± 0,02
BT-474	0,30 ± 0,02	0,52 ± 0,02
MCF-7	0,31 ± 0,01	1,21 ± 0,02
SK-BR-3	0,22 ± 0,02	0,23 ± 0,02
EJ	0,25 ± 0,02	0,26 ± 0,02
HT-29	0,39 ± 0,01	0,91 ± 0,03
Культуры опухолевых клеток мыши		
S37	0,08 ± 0,01	0,13 ± 0,01
C26	0,08 ± 0,01	0,13 ± 0,01
LLC	0,12 ± 0,01	0,32 ± 0,01

проникает в опухолевые клетки и накапливается в них в течение определенного временного интервала, при этом накопление препарата в клетках культур MCF-7, HT-29 и LLC было менее выражено.

Таким образом, изучение специфической активности препарата «Бактериосенс» в системе *in vitro* показало его высокую фотоиндуцированную активность относительно опухолевых клеток различного генеза, в частности клеток предстательной железы (PC-3, LNCaP), при отсутствии темновой токсичности и эффективном проникновении внутрь клеток как человека, так и мыши.

Исследования *in vivo*

Изучение распределения препарата «Бактериосенс» у мышей с опухолями различного генеза. Распределение препарата в опухоли (S37, LLC, C26, Ca755, PC3) и окружающей коже оценивали методом ЛФС в интервале от 5 мин до 24 ч по нормированной флуоресценции «Бактериосенса», отражающей уровень его накопления в тканях животных.

Показано, что «Бактериосенс» дозозависимо накапливался в опухолевой и окружающей ткани (кожа) независимо от используемых опухолевых моделей. Нормированная флуоресценция препарата мгновенно регистрировалась в опухолевой ткани, достигая высоких значений уже через 30 мин после введения, и сохранялась на максимальном уровне до 4 ч. На рисунке представлены ФН и ФК «Бактериосенса» в дозе 2,5 мг/кг (терапевтическая доза (ТД)).

Максимальные значения ФН в опухолевой ткани для препарата в ТД 2,5 мг/кг регистрировались в интервале от 0,5 до 4 ч и составляли 5,4–10,4 у. е. С увеличением дозы препарата уровень ФН как в опухолях, так и окружающей ткани увеличивался. Максимальный уровень ФН ФС в окружающей коже у мышей с опухолями регистрировался через 2–4 ч после введения и составлял 2,3–3,9 у. е.

Экспериментальные данные по максимальной нормированной флуоресценции в опухолях и флуоресцентной контрастности относительно кожи представлены в табл. 3.

Биораспределение препарата «Бактериосенс» в опухолях различного гистогенеза имеют схожие характеристики. Значения максимальной нормированной флуоресценции препарата в опухолях LLC, S37, C26, Ca755 и PC3 независимо от дозы регистрировались на ранние сроки после введения – через 0,5–4 ч. Причем наиболее высокий уровень ФН регистрировался в аденокарциноме предстательной железы PC3 на всех сроках наблюдения.

Для всех исследованных опухолей максимальная ФК относительно кожи регистрировалась через 5–60 мин после введения препарата независимо от его дозы и варьировала от 1,9 до 4,5 у. е.

Таким образом, исследования, проведенные с «Бактериосенсом», показали, что препарат мгновенно накапливался в тканях опухолей LLC, S37, C26, Ca755 и PC3, достигая максимальных значений уже через 30 мин после введения, и сохранялся до 4 ч. С увеличением дозы препарата нормированная флуоресценция в опухолевой ткани увеличивалась. Максимальная флуоресцентная контрастность относительно кожи регистрировалась через 5–60 мин после введения. В связи с этим при ФДТ рекомендуется проводить облучение на ранние сроки после введения препарата (0,5–4 ч).

Определение оптимального терапевтического режима ФДТ. Поскольку эффективность ФДТ зависит от ряда параметров, оценку оптимального терапевтического режима ФДТ проводили у мышей с опухолью S37 (как наиболее экономичной и доступной модели) малого размера ($130 \pm 30 \text{ мм}^3$) в зависимости от дозы «Бактериосенса» (0,5–7,5 мг/кг); при облучении как в период накопления ФС в опухолевой ткани – через 15–30 мин после введения препарата, так и через 2 ч – в период полувыведения ФС; в зависимости от дозы света (90–270 Дж/см²) и количества полей облучения (1–3 поля) опухолей большого

Таблица 3. Сравнительная оценка биораспределения препарата «Бактериосенс» в опухолях различного генеза

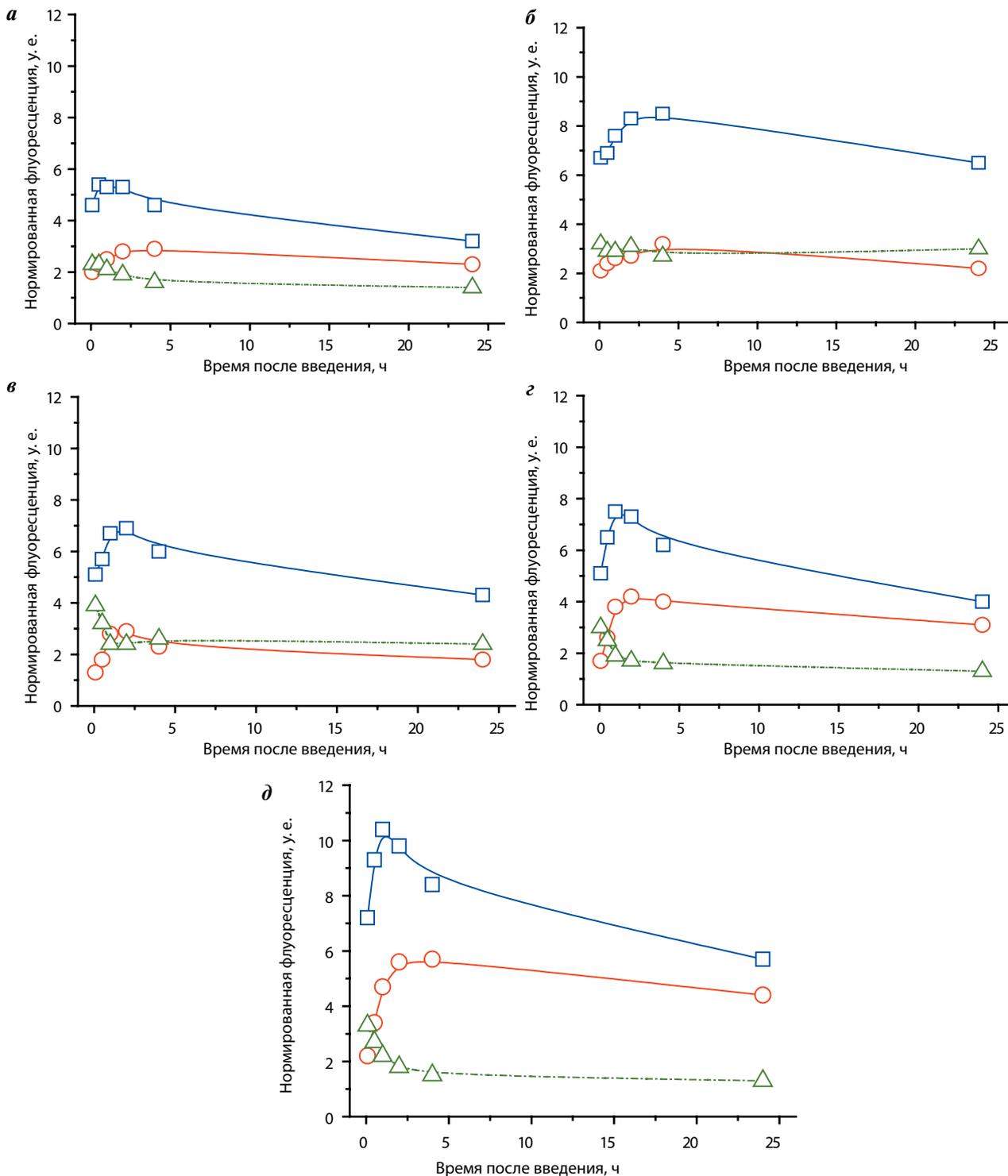
Опухолевая модель	Доза препарата, мг/кг	Максимальная нормированная флуоресценция в опухоли, у. е., через 0,5–4 ч	Максимальная флуоресцентная контрастность, опухоль/кожа, у. е., через 5–60 мин
LLC	1,0	5,4–6,6	2,7–3,1
S37		3,6–4,0	2,1–2,8
C26		3,9–5,2	2,3–3,1
Ca755		5,0–6,2	2,5–3,1
PC3		6,2–7,3	2,6–3,0
LLC	2,5 (терапевтическая доза)	6,9–8,5	2,9–3,2
S37		4,6–5,4	2,1–2,3
C26		5,7–6,9	3,2–3,9
Ca755		7,2–8,5	1,9–3,0
PC3		8,4–10,4	2,2–3,3
LLC	6,25	10,6–12,2	2,7–3,9
S37		7,7–9,5	2,5–3,1
C26		7,2–9,0	2,6–4,5
Ca755		8,0–10,6	2,7–2,9
PC3		9,3–13,0	2,6–3,4

Примечание. Данные представлены с учетом фоновых значений нормированной флуоресценции в опухоли.

размера ($400 \pm 40 \text{ мм}^3$). Результаты исследований представлены в табл. 4, 5.

Через 2 ч после проведенного облучения у животных в зоне роста опухоли начинал развиваться отек, который сохранялся от 3 до 7 сут в зависимости от использованных режимов проведения ФДТ.

Фотоиндуцированная противоопухолевая активность «Бактериосенса» при облучении через 30 мин после его введения и фиксированной плотности энергии 150 Дж/см^2 с увеличением дозы от 0,5 до 7,5 мг/кг возрастала; ТРО составляло 13–66 % (0,5 мг/кг), 69–97 % (1,0 мг/кг) и 100 % (2,5; 5,0 и 7,5 мг/кг).



Нормированная флуоресценция в опухолевой ткани (□), в коже (○) и флуоресцентная контрастность $\text{ФК} = \text{ФН}_{\text{опухоль}} / \text{ФН}_{\text{кожа}}$ (Δ) «Бактериосенса» в терапевтической дозе 2,5 мг/кг у мышей с опухолями различного генеза: S37 (а), LLC (б), C26 (в), Ca755 (г), PC3 (д)

Таблица 4. Фотоиндуцированная противоопухолевая активность «Бактериосенса» у мышей с саркомой S37 малого размера в зависимости от интервала между введением препарата и облучением, дозы препарата и плотности энергии

Режим фотодинамической терапии			Торможение роста опухоли, %, после фотодинамической терапии, сут					Увеличение продолжительности жизни*, %	Критерий излеченности*, %	Гибель от фототоксичности**, %
Доза, мг/кг	Интервал Δt	Плотность энергии, Дж/см ²	9	12	14	16	19			
0,5	30 мин	150	66	21	19	13	23	6	0	0
1,0			97	77	73	69	73	63	50	0
2,5			100	100	100	100	100	>100	75	25
5,0			100	100	100	100	100	>100	63	37
7,5			100	100	100	100	100	>100	25	75
2,5	5 мин		Гибель от фототоксичности					0	0	100
	30 мин		100	100	100	100	100	>100	75	25
	2 ч		100	100	100	100	100	>100	100	0
	4 ч		62	53	49	56	41	34	0	0
	24 ч		31	24	21	19	15	13	0	0
	30 мин	60	91	87	84	83	80	52	63	0
		90	100	98	92	91	84	59	63	0
		120	100	100	100	100	100	>100	100	0
		150	100	100	100	99	99	61	75	0
		180	92	80	77	76	74	62	50	0

Примечание. Светодиодный источник оптического излучения 752 ± 14 нм. *Оценены в течение 75 сут после фотодинамической терапии; **В течение 1–3 сут после фотодинамической терапии.

Таблица 5. Фотоиндуцированная противоопухолевая активность бактериосенса в терапевтической дозе 2,5 мг/кг у мышей с саркомой S37 большого размера в зависимости от количества полей облучения

Режим фотодинамической терапии			Торможение роста опухоли, %, после фотодинамической терапии, сут					Увеличение продолжительности жизни*, %	Критерий излеченности*, %
суммарная плотность энергии, Дж/см ²	количество полей облучения	интервал Δt	9	12	14	16	19		
270	3	15 мин	100	100	99	97	96	64	38
		30 мин	100	100	100	100	100	43	38
		1 ч	97	88	87	87	77	43	25
	1	30 мин	100	100	99	99	99	47	25

Примечание. Светодиодный источник оптического излучения 752 ± 14 нм. *Оценены в течение 75 сут после фотодинамической терапии.

Наиболее высокий процент излеченных животных регистрировался при использовании дозы 2,5 мг/кг, однако при использовании высоких доз препарата (2,5–7,5 мг/кг) наблюдалась гибель части животных от фототоксического шока в течение 2 сут после сеанса ФДТ.

Увеличение интервала времени между введением «Бактериосенса» (2,5 мг/кг) и облучением (150 Дж/см²) до 2 ч приводило к 100 % излеченности животных группы при отсутствии гибели от фототоксичности на ранних сроках после лечения. Дальнейшее увеличе-

ние интервала до 4 и 24 ч приводило к резкому снижению эффективности: ТРО составляло 41–62 и 15–31 % соответственно; УПЖ мышей не достигало биологически значимого уровня, излеченность животных составляла 0 %.

Оценка противоопухолевой активности с учетом доз света показала, что при всех используемых значениях плотности энергии (60–180 Дж/см²) выявлена высокая противоопухолевая эффективность фотодинамического воздействия: ТРО составило 74–100 %, УПЖ – от 52 % до >100 %, излеченность

Таблица 6. Сравнительная оценка противоопухолевой эффективности препарата «Бактериосенс» у мышей с опухолями большого размера различного генеза при использовании оптимальных режимов проведения фотодинамической терапии

Опухолевая модель	Размеры опухоли, мм ³	Оптимальный режим проведения фотодинамической терапии			Противоопухолевая эффективность при оптимальных режимах проведения фотодинамической терапии		
		доза, мг/кг	интервал между введением и облучением, мин	плотность энергии, Дж/см ² (доза света)	торможение роста опухоли, %	увеличение продолжительности жизни, %	критерий излеченности, %
S37	344 ± 78	2,5	30	90 × 3 = 270	100	78	38*
LLC	414 ± 68	2,5	30	90 × 3 = 270	99–100	51	25*
C26	398 ± 40	2,5	30	90 × 3 = 270	100	54	0*
Ca755	430 ± 67	2,5	30	90 × 3 = 270	90–100	88	38*
PC3	223 ± 35	1,0	30	90 × 3 = 270	100	–	100*

Примечание. Источник излучения – светодиод с $\lambda_{max} = 752 \pm 14$ нм. Плотность мощности 135 мВт/см². *Срок наблюдения за животными 75 сут.

составила 50–100 %. Наиболее высокий противоопухолевый эффект был получен при использовании световых доз 120 и 150 Дж/см².

Таким образом, терапевтическими режимами проведения ФДТ с препаратом «Бактериосенс» при лечении опухолей малого размера являются: дозы препарата 1,0–2,5 мг/кг, интервалы после введения 0,5–2 ч и дозы света 120–150 Дж/см².

При лечении опухолей большого размера облучение проводили полипозиционно 3 перекрывающимися полями. Световая доза каждого поля облучения составляла 90 Дж/см², суммарная – 270 Дж/см². «Бактериосенс» вводили в дозе 2,5 мг/кг (табл. 5).

При облучении через все исследованные интервалы времени после введения препарата выявлен высокий противоопухолевый эффект: ТРО составило 77–100 %, УПЖ – 43–64 %, КИ – 25–38 %, однако при использовании наиболее короткого интервала (15 мин) у 75 % животных наблюдался обширный некроз мышечной ткани, находящейся в зоне облучения.

Таким образом, оптимальными терапевтическими режимами проведения ФДТ с препаратом «Бактериосенс» при лечении опухолей большого размера являются: доза препарата 2,5 мг/кг, интервалы после введения 0,5–1 ч и доза света одного поля облучения 90 Дж/см², суммарная – 270 Дж/см².

Определение спектра фотоиндуцированной противоопухолевой активности «Бактериосенса» при проведении фотодинамической терапии у мышей с опухолями различного гистогенеза. Спектр противоопухолевой активности ФДТ с «Бактериосенсом» оценен при оптимальных режимах проведения ФДТ: доза препарата 2,5 мг/кг, интервал после его введения – 30 мин, плотность энергии 270 Дж/см² при трехпозиционном режиме облучения по 90 Дж/см². Исследования проводили на перевивных моделях опухолей большого размера у иммунокомпетентных мышей с LLC, C26,

Ca755 и у иммунодефицитных мышей линии BALB/c Nude с ксенографтами опухоли предстательной железы PC3. Результаты исследований представлены в табл. 6.

В течение 2 ч после сеанса ФДТ у животных начинал развиваться отек, который к 24 ч достигал максимальных размеров и сохранялся до 5 сут. После облучения мыши не погибали.

При лечении опухолей большого размера наиболее высокий противоопухолевый эффект выявлен у мышей с аденокарциномой предстательной железы PC3, наименее выраженный – у мышей с аденокарциномой толстой кишки C26, в 100 % метастазирующей в легкие. Следует отметить, что у иммунодефицитных мышей с опухолью PC3 ФДТ можно проводить в более щадящем режиме путем уменьшения дозы препарата и плотности энергии, сохраняя при этом высокий противоопухолевый эффект. Противоопухолевая эффективность ФДТ увеличивается в ряду моделей C26 < LLC < S37 ≤ Ca755 < PC3.

Заключение

Препарат «Бактериосенс» проявлял высокую фотоиндуцированную активность относительно опухолевых клеток человека эпителиального происхождения (PC3, LnCap4, A549, Hep2, BT-474, MCF-7, SK-BV-3, EJ, HT-29) и мыши различного генеза (S37, C26, LLC), характеризовался отсутствием темновой токсичности и эффективным проникновением в клетки. Величина ИК₅₀ при оптимальном времени инкубации варьировала от 0,08 до 1,21 мкМ.

Препарат в максимальной терапевтической дозе 2,5 мг/кг быстро (в течение 30 мин) поступал, накапливался в опухолевой ткани S37, Colo26, LLC, PC3 и сохранялся на высоком уровне (5,4–10,4 у. е.) до 4 ч. Максимальная флуоресцентная контрастность относительно кожи регистрировалась через 5–60 мин после введения и составляла 1,9–3,9 у. е.

Определены терапевтические режимы проведения ФДТ с «Бактериосенсом»: доза 1,0–2,5 мг/кг, интервал между введением и облучением 0,5–2 ч, плотность энергии 120–150 Дж/см² при лечении опухолей малого размера и $90 \times 3 = 270$ Дж/см² при трехпозиционном облучении опухолей большого размера.

Использование оптимальных режимов проведения ФДТ с «Бактериосенсом» позволило добиться 100 % ТРО большого и малого размера; 100 и 38 % излеченности иммунокомпетентных мышей с опухолями малого и большого размеров соответственно.

У иммунодефицитных мышей с ксенографтами карциномы предстательной железы РС3, ФДТ с «Бактериосенсом» можно проводить в более щадящем режиме: доза препарата 1,0 мг/кг, плотность энергии 90 Дж/см² при сохранении высокого противоопухолевого эффекта – 100 % излеченности животных.

«Бактериосенс» является перспективным препаратом для ФДТ опухолей как малого, так и большого размера и может успешно использоваться в качестве альтернативного, органосохраняющего малоинвазивного метода лечения РПЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. 250 с. [Malignant neoplasms in Russia in 2016 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – Branch of the National Medical Research Center of Radiology, Ministry of Health of Russia, 2018, 250 p. (In Russ.)].
2. Моисеенко Т.Н., Говоров А.В., Прокопович М.А., Пушкарь Д.Ю. Современные представления о радикальном лечении локализованного рака простаты с использованием робот-ассистированной хирургии. Туберкулез и социально значимые заболевания 2014;3:66–71. [Moiseenko T.N., Govorov A.V., Prokopovich M.A., Pushkar D.Y. Modern aspects of the radical treatment of the prostate cancer using robotic surgery. Tuberkulez i sotsial'no znachimye zabolvaniya = Tuberculosis and socially significant diseases 2014;3:66–71 (In Russ.)].
3. Мартов А.Г., Пархонин Д.И. Лапароскопическая тазовая лимфаденэктомия при локализованном раке простаты. Российский онкологический журнал 2010;6:39–41. [Martov A.G., Parkhonin D.I. Laparoscopic pelvic lymphadenectomy for located prostate cancer. Rossiysky Onkologichesky Zhurnal = Russian journal of oncology 2010;6:39–41 (In Russ.)].
4. Хмелевский Е.В., Паньшин Г.А., Канчели И.Н., Хорошков В.С. Варианты гипофракционирования протонного буста при местнораспространенном раке простаты. Вопросы онкологии 2012;58(6):787–94. [Khmelevsky E.V., Panshin G.A., Kancheli I.N., Khoroshkov V.S. Options of hypofractionation of proton boost in locally advanced prostate cancer. Voprosy onkologii = Problems in oncology 2012;58(6):787–94 (In Russ.)].
5. Singh A., Cheedella N.K. S., Shakil S.A. et al. Liver Metastases in Prostate Carcinoma Represent a Relatively Aggressive Subtype Refractory to Hormonal Therapy and Short-Duration Response to Docetaxel Monotherapy. World J. Oncol. 2015;6(1):265–9. DOI: 10.14740/wjon903w. PMID: 29147414.
6. Фомкин Р.Н., Попков В.М., Шатылко Т.В. Альтернативный вариант комбинированного лечения локализованного рака простаты. Бюллетень медицинских Интернет-конференций 2016;6(2):296–300. [Fomkin R.N., Popkov V.M., Shatyлко T.V. Alternative variant of the combined treatment of a localized cancer of a prostate. Byulleten' meditsinskikh Internet-konferentsiy = Bulletin of Medical Internet Conferences 2016;6(2):296–300 (In Russ.)].
7. Аль-Шукри С.Х., Боровец С.Ю., Рыбалов М.А., Саидов Р.Б. Современные методы локальной терапии рака предстательной железы. Нефрология 2009;13(3):153–8. [Al-Shukri S.Kh., Borovets S.Yu., Rybalov M.A., Saidov R.B. Current methods for local treatment of prostate cancer. Nephrology 2009;13(3):153–8 (In Russ.)].
8. Фомкин Р.Н., Попков В.М., Маслякова Г.Н. и др. Роботизированная высокоинтенсивная сфокусированная ультразвуковая абляция в лечении локализованного рака простаты: 7 лет опыта. Бюллетень медицинских Интернет-конференций 2017;7(2):529–34. [Fomkin R.N., Popkov V.M., Maslyakova G.N. et al. Robotized high-intensive focused ultrasonic ablation in treatment of a localized cancer of a prostate: 7 years of experience. Byulleten' meditsinskikh Internet-konferentsiy = Bulletin of Medical Internet Conferences 2017;7(2):529–34 (In Russ.)].
9. Gheewala T., Skwor T., Munirathinam G. Photosensitizers in prostate cancer therapy. Oncotarget 2017;8(18):30524–38. DOI: 10.18632/oncotarget.15496. PMID: 8430624.
10. Кашенко В.А., Распереза Д.В., Творогов Д.А., Добрун М.В. Фотодинамическая терапия: от фундаментальных исследований к практике. Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta = Вестник Санкт-Петербургского университета 2015;11(1):5–12. [Kashchenko V.A., Raspereza D.V., Tvorogov D.A., Dobrun M.V. Photodynamic therapy: from fundamental research to Practice. The bulletin of the St. Petersburg university 2015;11(1):5–12 (In Russ.)].
11. Zhu T.C., Kim M.M., Liang X. et al. In-vivo singlet oxygen threshold doses for PDT. Photonics Lasers Med. 2015;4(1):59–71. DOI: 10.1515/plm-2014–0037. PMID: 25927018.
12. Agostinis P., Berg K., Cengel K.A. et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. CA Cancer J. Clin. 2011;61(4):250–81. DOI: 10.3322/caac.20114. PMID: 21617154.
13. Barrett T., Davidson S.R., Wilson B.C. et al. Dynamic contrast enhanced MRI as a predictor of vascular-targeted

- photodynamic focal ablation therapy outcome in prostate cancer post-failed external beam radiation therapy. *Can Urol Assoc J.* 2014;8(9–10):708–14. DOI: 10.5489/суа. 2176. PMID: 25408811.
14. Shafirstein G., Bellnier D., Oakley E. et al. Interstitial Photodynamic Therapy – A Focused Review. *Cancers (Basel)* 2017;9(2):E12. DOI: 10.3390/cancers9020012. PMID: 28125024.
15. Chilakamarthi U., Giribabu L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. *Chem. Rec.* 2017;17(8):775–802. DOI: 10.1002/tcr.201600121. PMID: 28042681.
16. Миронов А.Ф., Грин М.А. Сенситизаторы бактериохлоринового ряда: перспективы использования в фотодинамической терапии. *Вестник МИТХТ* 2006;(4):5–28. [Mironov A.F., Grin M.A. Bacteriochlorin sensitizers: prospects of use in photodynamic therapy. *Vestnik MITHT = Bulletin of Moscow state University of Fine Chemical Technologies* 2006;(4):5–28 (In Russ.)].
17. Krzykawska-Serda M., Dąbrowski J.M., Arnaut L.G. et al. The role of strong hypoxia in tumors after treatment in the outcome of bacteriochlorin-based photodynamic therapy. *Free Radic. Biol. Med.* 2014;73:239–51. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.003. PMID: 24835769.
18. Патент РФ на изобретение № 2549953/10.05.2015, Бюл. № 13. Макарова Е.А., Якубовская Р.И., Ворожцов Г.Н. и др. Фотосенсибилизатор для фотодинамической терапии [Электронный ресурс]. [Patent RU № 2549953/10.05.2015, Bul. № 13. Makarova E.A., Jakubovskaja R.I., Vorozhtsov G.N., et al. Photosensitizers for photodynamic therapy (In Russ.)] URL: http://www1.fips.ru/fips_serv1/fips_servlet
19. American Type Culture Collection (ATCC) [Электронный ресурс]. URL: https://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=ru
20. Институт цитологии РАН. Коллекция культур клеток позвоночных [Электронный ресурс]. URL: http://www.cytspb.rssi.ru/rkkk/rkkk_ru.htm. [Institute of Cytology RAS – collection of cell cultures of vertebrates (In Russ.)].
21. Якубовская Р.И., Казачкина Н.И., Кармакова Т.А. и др. Методические рекомендации по изучению фотоиндуцированных противоопухолевых свойств лекарственных средств. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова и др. М.: Гриф и К, 2012:657–71.* [Yakubovskaya R.I., Kazachkina N.I., Karmakova T.A. et al. Methodical recommendations on the study of photoinduced antitumor properties of drugs. In: *Guide to conducting preclinical studies of medicines.* Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K, 2012:657–71 (In Russ.)].

ORCID авторов / ORCID of authors

Н.Б. Морозова / N.B. Morozova: <https://orcid.org/0000-0002-7159-805X>
 А.Д. Плютинская / A.D. Plyutinskaya: <https://orcid.org/0000-0002-6898-2931>
 М.С. Воронцова / M.S. Vorontsova: <https://orcid.org/0000-0002-9320-1746>
 А.А. Панкратов / A.A. Pankratov: <https://orcid.org/0000-0001-7291-9743>
 Р.И. Якубовская / R.I. Yakubovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9799-7622>
 Е.А. Макарова / E.A. Makarova: <https://orcid.org/0000-0003-4144-6159>
 Е.А. Лукьянец / E.A. Lukyanets: <https://orcid.org/0000-0002-8853-6912>
 А.Д. Каприн / A.D. Kaprin: <https://orcid.org/0000-0001-8784-8415>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 14. N08.12.0049).

Financing. The study was performed with financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (government contract No. 14. N08.12.0049).