

Оригинальные статьи

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017
УДК 618.13-002-006-085-092.9

Александров М.Т.¹, Зуев В.М.¹, Пиманчева Ю.И.¹, Пашков Е.П.¹, Баграмова Г.Э.²

ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ОБЪЁМНОЙ АКТИВИРОВАННОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ПРОЦЕССОВ МИКРОБНОЙ И НЕОПЛАСТИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ В КЛИНИЧЕСКОЙ ГИНЕКОЛОГИИ

¹ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, г. Москва;

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, г. Москва

Для корреспонденции: Зуев Владимир Михайлович, д-р мед. наук, проф., проф. кафедры акушерства и гинекологии № 1 лечебного факультета ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), e-mail: vlzuev@bk.ru

Проведены экспериментальные исследования на тест-объектах микробной (золотистый стафилококк и синегнойная палочка) и неопластической природы (in vitro — взвесь клеток линии хронической миелогенной лейкемии K562 в объеме 60 мкл и в количестве $60 \pm 1 \times 10^3$, in vivo — мыши, заражённые карциномой Эрлиха) по обоснованию применения хлорофиллсодержащих препаратов, активированных для фотодинамической терапии (ФДТ) вне биологического объекта. Дополнительную ФДТ-активацию препарата не проводили. Обоснована высокая бактерицидная (на тест-объектах микробов) и противоопухолевая ФДТ-эффективность хлорофиллсодержащих препаратов, активированных вне организма, при последующем их введении per os и накоплении практически во всех органах и тканях организма. Разработанная лечебно-диагностическая технология при её клиническом применении подтвердила свою эффективность у женщин с воспалительными и/или неопластическими процессами органов малого таза. Используемая аппаратура и препарат разрешены к клиническому применению.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия; флуоресцентная диагностика; хлорофиллсодержащие препараты; воспалительные процессы; неопластические процессы.

Для цитирования: Александров М.Т., Зуев В.М., Пиманчева Ю.И., Пашков Е.П., Баграмова Г.Э. Обоснование применения метода объёмной активированной фотодинамической терапии заболеваний и процессов микробной и неопластической природы в клинической гинекологии. *Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирёва*. 2017; 4(4): 194—200. DOI <http://dx.doi.org/10.18821/2313-8726-2017-4-4-194-200>

Aleksandrov M.T.¹, Zuev V.M.¹, Pimancheva Yu.I.¹, Pashkov E.P.¹, Bagramova G.E.²

JUSTIFICATION OF THE APPLICATION OF THE METHOD OF THREE-DIMENSIONAL PHOTODYNAMIC THERAPY OF DISEASES AND PROCESSES OF MICROBIAL AND NEOPLASTIC NATURE IN CLINICAL GYNECOLOGY

¹I.M.Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991, Russian Federation;

²Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 117198, Russian Federation

There were executed experimental studies on test subjects of microbial (Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa) and neoplastic nature (in vitro — suspension of cells of the line of chronic myelogenous leukemia K562 in a volume of 60 µl and in an amount of $60 \pm 1 \times 10^3$, in vivo — mice infected with Ehrlich carcinoma) on the substantiation the use of chlorophyll-containing drugs activated for photodynamic therapy (PDT) outside the biological object. No additional PDT activation of the drug was performed. The high bactericidal (on the test objects of microbes) and anti-tumor PDT efficacy of chlorophyll-containing preparations activated outside the organism was substantiated, with their subsequent administration per os and accumulation in practically all organs and tissues of the body was validated. The developed medical diagnostic technology in its clinical application has proved its effectiveness in women with inflammatory and/or neoplastic processes of the pelvic organs. The used equipment and preparation are approved for clinical use.

Keywords: photodynamic therapy; fluorescent diagnostics; chlorophyll-containing preparations; inflammatory processes; neoplastic processes.

For citation: Aleksandrov M.T., Zuev V.M., Pimancheva Yu.I., Pashkov E.P., Bagramova G.E. Justification of the application of the method of three-dimensional photodynamic therapy of diseases and processes of microbial and neoplastic nature in clinical gynecology. *V.F. Snegirev Archives of Obstetrics and Gynecology, Russian journal*. 2017; 4(4): 194—200. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/2313-8726-2017-4-4-194-200>

For correspondence: Vladimir M. Zuev, MD, PhD, DSci., professor, professor of the Department of Obstetrics and Gynecology No. 1 of the Faculty of Medicine of the I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991, Russian Federation; e-mail: vlzuev@bk.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Введение

В литературе приведены способы лечения заболеваний (микробной и неопластической природы) при помощи фотодинамической терапии (ФДТ) [1—16], которые основаны на сочетании фототоксического и/или фотомодифицирующего эффекта лекарственного препарата (токсического и/или модифицирующего действия) на клетку и ткань при его взаимодействии со светом с накоплением препарата (аналогов порфиринов) преимущественно в патологически изменённой клетке или ткани [14, 17]. При фототоксическом действии происходит разрушение клеток и некроз ткани вследствие непосредственного контакта фотосенсибилизатора, кислорода и света с клетками тканей и сосудов (локальное действие с радиусом около 20 нм для фотофрина II — ФП) [6, 18]. При фотомодифицирующем действии в результате фотохемомодификации клеточных маркеров патологической ткани активируются антигенпрезентирующие клетки и клетки с опухолеспецифической памятью и формируется *иммунный ответ*. Активный *противоопухолевый иммунный ответ* разрушает опухоли, обнаруженные иммунной системой вдали от первичного очага совместного действия фотосенсибилизатора, кислорода и света [6, 7, 17—20]. При проведении ФДТ могут осуществляться оба механизма одновременно [6, 14].

Однако указанный способ лечения требует однократного, а часто и многократного введения относительно токсичного и аллергенного фотосенсибилизатора, облучения светом очага заболевания (например, опухоли) или крови. При этом к патологическому очагу необходимо подвести свет. Для этого, во-первых, нужны точное знание места нахождения очага заболевания, что затруднительно даже при высокоразвитой диагностике, и сложная аппаратура (одновременно используют УЗИ, компьютерную и ЯМР-томографию, выполняют анализы крови и биопсию). Поэтому в современной онкологии остро стоит проблема выявления первичной опухоли у пациента. Во-вторых, для подведения света (за исключением случаев, когда очаг заболевания расположен поверхностно — на коже и видимых слизистых) необходимо использование оптических систем (световодная техника, эндоскопы) для воздействия лазерного излучения на патологический очаг (то есть внутритканевых или внутрисосудистых инвазивных медицинских технологий), что связано с дополнительным дорогостоящим оборудованием, медицинским хирургическим стационаром и неудобствами для пациента.

Известен также способ применения фотосенсибилизатора (мероцианин 540), фотопротектора (нафталимид), которые активируют светом вне пробирки (*ex vitro*), затем добавляют преактивированный фотосенсибилизатор (ФС) к культуре вирусов герпеса или иммунодефицита человека, либо раковых клеток различных линий. Это ведет к инактивации вирусов и ингибированию пролиферативной активности раковых клеток на 70—90%, в то время как 85% нормальных лейкоцитов крови человека выживают [18]. Роль в по-

вреждающем действии отводится опухолеспецифическим метастабильным продуктам деградации этих ФС наряду с продуктами окисления других молекул, которые образуются под действием света, причём для проявления биологической активности ФС дальнейшая световая экспозиция уже не требуется.

Недостатками указанной медицинской технологии являются её лабораторный характер, практическое отсутствие её объективного экспериментального обоснования, отработки дозы и времени облучения биологического объекта и его пробоподготовки, зависимости выявленного эффекта активации фотосенсибилизатора от длины волны облучения биологического объекта, его длительности и кратности и особенностей накопления препарата в различных органах и тканях в норме и при патологии. Именно поэтому вплоть до настоящего времени отсутствует объективно обоснованная клиническая методика для его применения у людей [18]. При этом при традиционной технологии не все очаги заболеваний, например опухоли, могут быть подвергнуты диагностике и лечению методами лазерной флуоресцентной диагностики (ЛФД) и ФДТ из-за распространённости процесса или недоступности для лазерного воздействия (например, множественные метастазы или метастазы в лимфатические узлы средостения или брюшной полости). Вместе с тем у некоторых пациентов по различным причинам нельзя применить классические методы лечения — лучевой, хирургический или химио- и антибиотикотерапию, что обосновывает необходимость разработки новых направлений развития ФДТ-технологий [13, 21, 22].

В связи с вышеизложенным в своей работе мы исходим из того, что как диагностика, так и лечение заболеваний микробной и неопластической природы могут быть, по-видимому, основаны на определении такого референтного показателя локального метаболизма, как порфирины и их производные [1, 14, 16, 23]. Однако из-за недостаточной изученности приведённых положений о сходстве микробных и неопластических процессов с позиции общих метаболических признаков, а значит, общих точек приложения в их диагностике, терапии и аппаратно-программном обеспечении требуется провести дополнительные экспериментально-теоретические исследования и клинические наблюдения.

В связи с этим авторами предлагается концепция комплексного применения раман-флуоресцентной спектроскопии для одномоментной диагностики и пробоподготовки ФС для ФДТ, предварительно или одномоментно с введением подвергнутого воздействию волновой энергии в присутствии кислорода (и/или кислородсодержащих препаратов или оксида азота). При этом в качестве фотосенсибилизатора используют производные природного субстрата — хлорофилла (хлорофиллсодержащие препараты). Активация их ингибирующего локального воздействия на патологический очаг (микроб, воспаление, опухоль) может быть реализована как экстра-, так и интракорпоральным способом.

Цель исследования — экспериментально-теоретическое обоснование метода ФДТ при активации хлоро-

филлсодержащего фотосенсибилизатора вне организма и его клиническая апробация.

Материал и методы

Исследование проводили в несколько этапов:

1. Обоснование технологии выбора, регистрации и активации хлорофиллсодержащего препарата (ХСП).
2. Моделирование объёмной ФДТ в пробирке.
3. Исследование накопления ХСП в тканях и органах.
4. Исследование эффекта воздействия объёмной активированной ФДТ на микробы и опухолевые клетки (культуральный материал) *in vitro*.
5. Моделирование эффекта объёмной активированной ФДТ на животных (карцинома Эрлиха).
6. Клиническая апробация разработанной медицинской технологии.

Во всех исследованиях и клинических наблюдениях использовали сертифицированный аппаратно-программный комплекс раман-флуоресцентной диагностики — ИнСпектр М (рис. 1).

Для исследований (1-й и 2-й этап) использовали неактивированный или активированный ХСП.

Для выявления накопления хлорофиллсодержащего препарата (3-й этап) в органах и тканях лабораторных животных (лабораторные беспородные мыши в возрасте 2 мес и массой 70—80 г) разделили на 4 группы, по 15 мышей в каждой: 1-я группа получала стандартный корм и чистую воду; 2-я группа — аналогичный корм и в качестве питья — ХСП в концентрации 0,07%; 3-я группа — аналогичный корм и ХСП в концентрации 0,007%; 4-я группа — аналогичный корм и ХСП в концентрации 0,0007%. Через 1 мес животных усыпляли, и исследовали методом лазерной флуоресцентной диагностики (ЛФД) на аппарате ИнСпектр М накопление флуоресцирующего ХСП в различных органах и тканях животных. Результаты — нормированные показатели флуоресценции тканей (по отношению к контролю) представлены в виде графиков.

В качестве модельного объекта (3-й этап) использовали культуру микробов *Ps. aeruginosa* и *S. aureus* — 20 тест-образцов (из них 5 — контрольная группа).

В качестве основы для эксперимента был взят дисконфузионный метод, основанный на диффузии антибиотиков из носителя в плотную питательную среду и ингибции роста исследуемой культуры в той зоне, где

концентрация антибиотика превосходит минимальную подавляющую концентрация (МПК). Из чистых суточных культур *Ps. aeruginosa* и *S. aureus*, выращенных на неселективной плотной питательной среде, с помощью дистиллированной воды готовили инокулят (стандарт 0,5 по МакФарланду), что соответствует концентрации $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Полученный инокулят наносили на МХ-агар.

Затем помещали диски, пропитанные ХСП, предварительно активированным кислородсодержащим препаратом и лазерным излучением с длиной волны 0,63 нм; 0,514 нм; 0,405 нм в дозе 0,2—20 дж/мл, в концентрации 0,7; 0,07; 0,007% на питательную среду.

В качестве контроля использовали стерильные диски, диски с неактивированным препаратом (в тех же концентрациях), диски с препаратом после воздействия на него кислородсодержащего водного раствора, диски с кислородсодержащим водным раствором (перекись водорода 3%).

В другом варианте эксперимента готовили инокулят из чистой суточной культуры *Ps. aeruginosa*, выращенной на неселективной плотной питательной среде, разводили её с помощью дистиллированной воды до стандарта мутности 0,5 по МакФарланду, что соответствует концентрации $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Добавляли в него ХСП исходной концентрации 0,7% с добавлением 3% раствора перекиси водорода, активировали лазерным излучением. Далее проводили измерение спектров на приборе ИнСпектр М и делали высев на плотную питательную среду. Исследование проводилось в следующих временных интервалах: сразу; через 30 мин; через 1 ч; через 1 ч 30 мин; через 2 ч; через 2 ч 30 мин. Результаты проиллюстрированы на рисунках.

Дополнительно исследование эффекта воздействия объёмной активированной ФДТ на опухолевые клетки *in vitro* проводили на клетках линии хронической миелогенной лейкемии K562.

Изучали воздействие ФДТ на миграцию опухолевых клеток с использованием камеры Бойдена 96 — Well Filtration Plate Multiscreen TM — MIC с размером пор 8 мкм (фирма «Millipore»). В верхний отсек камеры помещали взвесь клеток линии хронической миелогенной лейкемии K562 в объёме 60 мкл и количестве $60 \pm 1 \times 10^3$. В нижний отсек камеры вносили хемоаттрактант/лиганд в объёме 175 мкл в концентрации 5 мкг/мл (DNA_lig) и в концентрации 200 нг/мл (CXCL12). Исследование хемотаксиса проводили в динамике через 10 и 60 мин и через сутки с использованием вышеперечисленных лигандов. Перед проведением эксперимента пробирки с концентрациями ХСП 0,7; 0,07; 0,007% в присутствии 3% перекиси водорода (или без таковой — в контроле) освещивали лазерным излучением с длиной волны 0,514 нм в дозе 0,2—20 дж/мл, после чего в пробирки помещали клетки и исследовали их мигрирующую способность.

В исследовании *in vivo* культуру клеток карциномы Эрлиха (4-й этап) использовали в качестве субстрата для заражения ею лабораторных мышей (вводили



Рис. 1. Аппаратно-программный комплекс ИнСпектр.

внутрибрюшинно по 0,1 мл) в возрасте 2 мес с массой 70—80 г (45 тест-образцов и 15 — контрольная группа). Результаты учитывали по срокам гибели мышей на фоне асцита, вызванного карциномой Эрлиха. Мышей контрольной группы не заражали.

Клинические наблюдения (6-й этап) с использованием разработанной методики проводили в условиях поликлинического приёма.

Пациенты

Проведено обследование и лечение 68 пациенток в возрасте 30—47 лет с первичным и вторичным бесплодием, различными формами гиперплазии эндометрия и в сочетании с хроническим эндометритом. Все женщины проходили плановое обследование перед программой экстракорпорального оплодотворения и переноса эмбрионов (ЭКО и ПЭ). Группу сравнения составили 20 здоровых женщин, которые готовились к проведению вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) и не имевшие беременностей по социальным причинам.

Критерии включения в исследование: 1) возраст пациенток в пределах 30—47 лет; 2) морфологически подтверждённый диагноз — полипы эндометрия, простая гиперплазия без атипии или с атипией; 3) сложная гиперплазия эндометрия без атипии или с атипией, сочетание гиперплазии эндометрия с хроническим эндометритом, бесплодие и участие в программах ВРТ.

Критерии исключения из исследования: рак эндометрия; наружный генитальный эндометриоз; опухоли яичников; острый эндометрит.

Сформированы 3 группы пациенток:

- 1-я группа — гиперплазия эндометрия ($n = 43$);
- 2-я группа — гиперплазия эндометрия и хронический эндометрит ($n = 25$);
- 3-я группа — здоровые при отсутствии патологии эндометрия ($n = 20$).

В результате патоморфологического исследования выявлено, что у 51 (75%) женщины имел место морфологически верифицированный диагноз хронического эндометрита, у 17 (25%) — признаки гормональной дисфункции и один из вариантов гиперплазии эндометрия. Среди морфологических признаков воспаления отмечены умеренно выраженная и выраженная лимфо- и лейкоцитарная инфильтрация эпителия и стромы, отёк стромы, некроз и фиброз стромы эндометрия. Одновременно были верифицированы: железистые полипы эндометрия — у 21 (30,88%) женщины, железисто-фиброзные полипы эндометрия — у 6 (8,82%), простая гиперплазия эндометрия без атипии — у 9 (13,23%) пациенток, сложная гиперплазия эндометрия без атипии — у 4 (4,41%) и сложная атипическая гиперплазия эндометрия — у 3 пациенток (последние из указанных состояний рассматривали как облигатный предрак).

Результаты

1-й этап — пробоподготовка фотосенсибилизатора (хлорофиллсодержащий препарат, содержит магнийпорфирин, аналогичный по составу железопорфирину, входящему в состав гемоглобина) включал в

себя выбор препарата с наибольшим квантовым выходом люминесценции при его резонансном облучении. На рис. 2 (см. на 2-й полосе обложки) показаны различные формы хлорофилла с разной степенью очистки препарата.

Препараты 1, 3, 4, 5, 6 имели относительно слабую люминесценцию (см. рис. 2, а) и поэтому исключены из исследования. Препараты 2 и 7 имели наиболее выраженную интенсивность флуоресценции — не менее 1500—2000 ОЕ (относительных единиц) (см. рис. 2, б) и были использованы в нашем исследовании.

Для применения с целью диагностики указанных ХСП и контроля их поступления в ткани предварительно были выбраны оптимальные параметры времени и мощности излучения лазера, при которых не наблюдается эффект выгорания. Это исключало несистематические ошибки измерения. Оптимальные показатели составили: мощность 2,5 мВт и время экспозиции 50 мс для лазера с длиной волны 405 нм, при которых эффект выгорания не более 5%; мощность 170 мкВт и время экспозиции 100 мс для лазера с длиной волны 532 нм, при которых эффект выгорания составил не более 5% (рис. 3, а; см. на 2-й полосе обложки); аналогичные параметры (мощность и время экспозиции) для лазера с длиной волны 637 нм, при которых эффект выгорания не более 6% (рис. 3, б; см. на 2-й полосе обложки).

Были испробованы различные схемы возбуждения препарата, основанные на спектре поглощения (рис. 4). Показано, что наиболее эффективными длинами волн возбуждения оказались 405 и 637 нм.

Далее провели проверку суждения о том, что влияние кислорода без присутствия лазерного облучения не приводит к изменению интенсивности люминесцентного свечения препарата, содержащего хлорофилл, т. е. не вызывает (не активирует) ФДТ-реакцию (рис. 5, а; см. на 2-й полосе обложки), и наоборот (рис. 5, б; см. на 2-й полосе обложки).

Приведенный алгоритм активации хлорофиллсодержащего препарата использовали во всех последующих исследованиях и клинических наблюдениях.

2-й этап. Моделирование объёмной ФДТ в пробирке. Далее в эксперименте подбирали оптимальные параметры облучения для получения наибольшего амплитудного контраста между облучённым и необлучённым препаратом. Изучали временную кинетическую зависимость эффекта восстановления флуоресценции активированного препарата при отсутствии зондирующего излучения. Определяли время восстановления флуоресценции. Рассматривали различные варианты использования кислородсодержащих препаратов (3% перекись водорода, газообразный кислород, оксид азота и др.) *in vitro* при активации фотосенсибилизатора — ХСП.

Показана принципиальная возможность активации ХСП *in vitro* при предварительном его лазерном облучении (670 нм) в течение 6 мин при мощности 6 мВт (поглощённая раствором энергия 2,2 Дж/мл). Отмечено уменьшение интенсивности флуоресценции в 7 раз и последующее её восстановление (без лазерного облучения) (рис. 6; см. на 3-й полосе обложки).

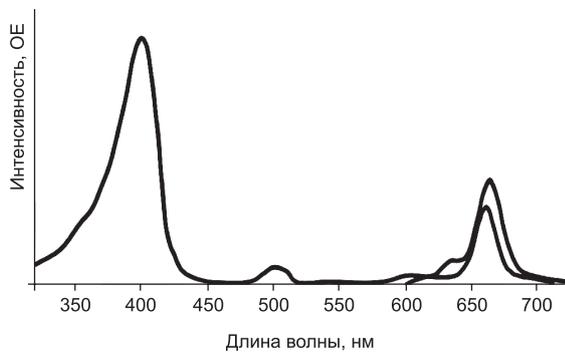


Рис. 4. Спектр поглощения раствора хлорофилла в этиловом спирте с концентрацией субстанции 0,37 мг/мл (справа пик флуоресценции с максимумом при 668 нм, слева — при 405 нм).

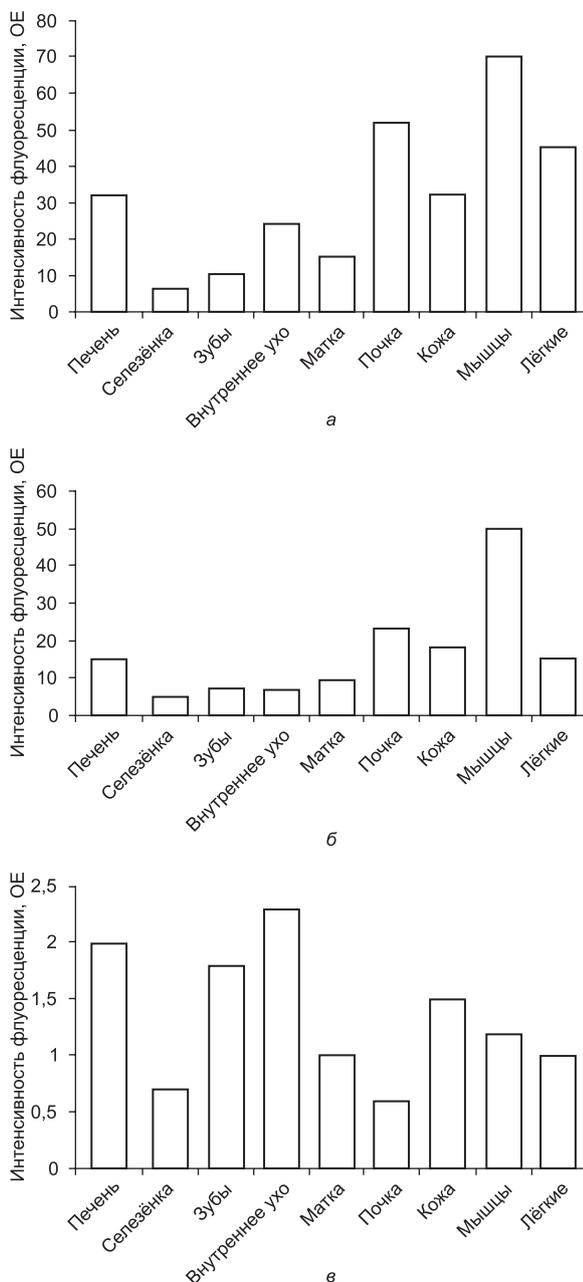


Рис. 7. Накопление активированного хлорофиллсодержащего препарата в различных органах и тканях при различных его концентрациях в питьевой воде: 0,07% (а); 0,007% (б) и 0,0007% (в).

3 этап. Эффект накопления препарата. Усреднённые по группе мышей показатели интегральной интенсивности люминесценции тканей, нормированные на усреднённые по контрольной группе мышей (не принимающих препарат) показатели интегральной интенсивности люминесценции тех же тканей, представлены на рис. 7.

В результате исследования установлено, что увеличение концентрации препарата приводит к увеличению его накопления в различных органах и тканях.

4-й этап. Исследование *in vitro* действия объёмной активированной ФДТ на культуру микробов и опухолевых клеток. При использовании активированного хлорофиллсодержащего препарата наблюдалось подавление зоны роста микроорганизма через 24 ч (рис. 8—10; см. на 3-й полосе обложки), при этом неактивированный препарат с *Ps. aeruginosa* не давал задержки зоны роста, а у *S. aureus* наблюдалось минимальное подавление зоны роста. При добавлении к неактивированному ХСП кислородсодержащего водного раствора у *Ps. aeruginosa* также не наблюдалось увеличения задержки зоны роста, а у *S. aureus* даже произошло уменьшение задержки зоны роста.

Показана высокая бактерицидная эффективность активированного вне бактериального субстрата ХСП и после этого добавленного в него. Наибольшая зона задержки роста выявлена при концентрации препарата 0,7% + 3% H_2O_2 и дозе лазерного облучения 20 Дж. Полученный эффект сравним с бактерицидным действием антибиотика цефепима (как объект сравнения цефепим 30 мг — диск на 12 ч на всех чашках Петри).

Интересный результат получен при использовании антибиотикоустойчивого клинического штамма *Staphylococcus aureus* (рис. 11, внизу на 18 ч; см. на 3-й полосе обложки) и выраженном бактерицидном эффекте при использовании активированного ХСП при различных концентрациях: 0,7; 0,07 и 0,007% (см. рис. 11, на 9, 11 и 13 ч соответственно, на 15—16 ч — антимикробный эффект 3% H_2O_2).

Таким образом, способность фотосенсибилизатора накапливаться в изменённых тканях, микробных клетках с реализацией эффекта летальной фотосенсибилизации бактерий может быть использована, по-видимому, при лечении заболеваний и процессов микробной природы, в том числе при выявлении антибиотикорезистентных штаммов патогенных микроорганизмов.

Результаты воздействия объёмной активированной ФДТ на опухолевые клетки (*in vitro*). Исследовалась миграция опухолевых клеток под воздействием хемокина CXCL12 и без него при инкубации клеток с разными концентрациями ХСП (0,7; 0,07 и 0,007%) и при разной длительности воздействия лазера (0, 10 и 100 с) с использованием 3% перекиси водорода.

На графике (см. рис. 12) видно, что в контрольном образце клеток происходит активация хемотаксиса в 1,4 раза через сутки после воздействия хемокина. Под действием активированного препарата при облучении в течение 100 с значительно снижается миграция опухолевых клеток (в 2,5—4 раза в зависимости от време-

ни) по сравнению с контрольными образцами как при индуцированном, так и при спонтанном хемотаксисе.

Таким образом, можно сказать, что ФДТ снижает миграционную активность опухолевых клеток, что потенциально может быть использовано для блокировки процесса метастазирования у онкологических больных.

5 этап. Апробация методики объёмной активированной ФДТ при лечении опухолей (карцинома Эрлиха у мышей). Установлено, что мыши в группе с чистым контролем были активны и живы в течение всего исследования (1 год). Мыши со вторым чистым контролем быстро увеличивались в размерах (асцит) и погибали на 4—6-й день. Мыши, принимавшие неактивированный ХСП или раствор H_2O_2 3% 1:10, погибали на 6—12-й день. Мыши, принимавшие активированный препарат в разведении 1:10, жили 21—24 дня, а при его разведении 1:1000 погибали в пределах 10 дней.

Таким образом убедительно показан вероятный противоопухолевый эффект ХСП, активированного вне организма.

6 этап. Применение методики в клинике. Разработанную методику (аппаратура и ХСП сертифицированы для медицинского применения) впервые применили у женщин с хроническим эндометритом, гиперплазией эндометрия и бесплодием. Всем женщинам была проведена объёмная ФДТ под контролем лазерной люминесцентной спектроскопии в течение 4—6 нед. Контрольная верификация проведена по клиническим и морфологическим данным. Анализ клинических данных после проведённой ФДТ показал, что у большинства (59, или 86,76%) пациенток изменился характер менструаций — удлинился их период от 2 до 3,5—4 дней, увеличился объём менструальной кровопотери (при прежней скудной), изменилась цветовая менограмма, свидетельствующая в пользу физиологической (обеспечивая физиологическую ишемию, сепарацию и десквамацию эндометрия).

В результате морфологического исследования признаки гиперплазии эндометрия не выявлены ни у одной пациентки. В I фазе цикла признаки ранней и средней пролиферации без лимфоцитарной инфильтрации отмечены у 62 (91,18%) женщин, у остальных имелись нерезко выраженные признаки хронического воспаления — преимущественно слабо выраженная очаговая лимфоцитарная инфильтрация стромы.

Клинический пример. Пациентка 38 лет наблюдалась в клинике репродуктивного здоровья по поводу первичного бесплодия и готовилась вступить в программу ЭКО. В процессе комплексного обследования диагностирована гиперплазия эндометрия. Произведены гистероскопия и раздельное диагностическое выскабливание эндометрия и эндоцервикса. Гистологическое заключение: *сложная атипическая гиперплазия*. Женщина отправилась в Германию на лечение. Немецкие врачи назначили гормональное лечение (гестагены): утрожестан в дозе 600 мг в непрерывном режиме в течение 3 мес. Через 3 мес они же выполнили гистероскопию и биопсию эндометрия

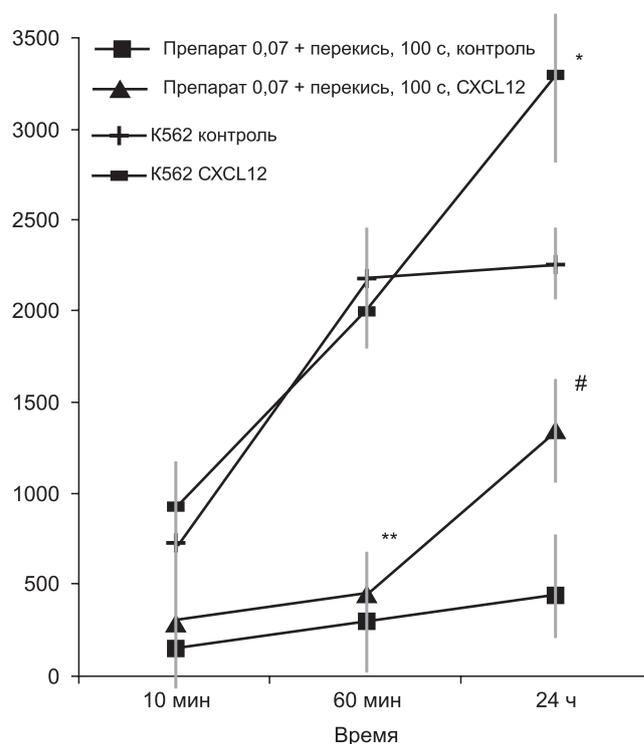


Рис. 12. Миграционная активность клеток K562 под действием хлорофиллсодержащего препарата в концентрации 0,07 и 0,007%.

Примечание. * — показатель достоверно отличается от такового в интактных клетках; ** — показатель достоверно отличается от такового в клетках без препарата под действием хемокина; # — показатель достоверно отличается от такового в клетках под действием препарата и без хемокина.

из 4 разных точек стенок полости матки. Гистологический диагноз был тот же: атипическая гиперплазия эндометрия без малигнизации. Лечение было продолжено с увеличением дозы утрожестана до 800 мг/сут. Через 3 мес проведена повторная гистероскопия и биопсия эндометрия из 6 точек, диагноз остался прежним: атипическая гиперплазия эндометрия без малигнизации. На этом этапе женщина пришла к нам. Обсуждался вопрос о радикальном лечении (удаление матки) в связи с неэффективностью консервативной терапии. Пациентка отказалась. Тогда было предложено провести курс лечения с использованием ХСП с предварительной эстракорпоральной активацией лазерным излучением с длиной волны 0,63 мкм (объёмная фотодинамическая терапия), что и было сделано в течение 6 нед. После этого произведена гистероскопия с тотальным выскабливанием эндометрия, учитывая прошлый диагноз. Гистологическое заключение: эндометрий с признаками атрофии. Атипических клеток не обнаружено.

Таким образом, использование объёмной ФДТ позволило восстановить морфофункциональное состояние эндометрия.

Заключение

Результаты исследования показали антимикробный и противоопухолевый эффекты ХСП, активированного вне организма, который зависит от концентрации

вводимого активированного препарата, длины волны и дозы его лазерной активации.

Разработаны и предлагаются для внедрения адекватные методы лечения заболеваний микробной и неопластической природы, основанные на новых принципах активированной объемной фотодинамической терапии, область применения которых может быть значительно расширена: акушерство и гинекология, стоматология, общая хирургия, онкология, дерматология, инфекционные болезни и др.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

(п.п. 9—17, 19—22 см. REFERENCES)

1. Александров М.Т. *Лазерная клиническая биофотометрия (теория, эксперимент, практика)*. М.: Техносфера; 2008.
2. Аполихина И.А., Денисова Е.Д., Булгакова Н.Н. Фотодинамическая терапия у женщин с папилломавирусной инфекцией. В кн.: *Материалы Всероссийского конгресса «Амбулаторно-поликлиническая практика — новые горизонты*. М.; 2010: 19—20.
3. Белый Ю.А., Терещенко А.В. Лечение хориоидальной неоваскуляризации методом фотодинамической терапии. *Лазерная медицина*. 2011; 15(2): 60.
4. Васильев Н.Е., Огиренко А.П. Антимикробная фотодинамическая терапия. *Лазерная медицина*. 2002; 6(1): 32—8.
5. Васильев Н.Е., Даниленко Е.Д., Сысоева Г.М. Иммунологические аспекты фотодинамической терапии. *Медицинская иммунология*. 2003; 5(5—6): 507—18.
6. Красновский А.А. Фотодинамическое действие и синглетный кислород. *Биофизика*. 2004; 49(2): 305—22.
7. Романов В.П., Терещенко Т.А., Назарикова Н.Н. Фотоинaktivация микроорганизмов в *in vitro* в присутствии фотосенсибилизаторов. *Сибирский медицинский журнал*. 2001; 1: 33—5.
8. Странадко Е.Ф., Кулешов И.Ю., Караханов Т.И. Фотодинамическое действие на патогенетические микроорганизмы (современный взгляд на проблемы антимикробной фотодинамической терапии). *Лазерная медицина*. 2010; 14(2): 52—6.
18. Патент № 2345803, Российская Федерация. Васильев Н.Е., Решетников А.В., Залевский И.Д., Гончаров С.Е. *Способ фототерапии фотосенсибилизатором, активируемым волновой энергией вне организма человека*. Заявлено 30.11.2006; Опубликовано 10.02.2009.
23. Александров М.Т., Афанасьев Р.А., Гапоненко О.Г., Козьма С.Ю., Кузьмин Г.П., Лизунова И.А., Пашков У.П., Смирнова В.В., Шабашева И.Ф. *Лазерная флюоресцентная диагностика в медицине и биологии: теория и возможности применения*. М.: Спектрлюкс; 2007.

REFERENCES

1. Aleksandrov M.T. *Laser Clinical Biophotometry (Theory, Experiment, Practice)*. [Lazernaya klinicheskaya biofotometriya (teoriya, eksperiment, praktika)]. Moscow: Tekhnosfera; 2008. (in Russian)
2. Apolikhina I.A., Denisova E.D., Bulgakova N.N. Photodynamic Therapy in Women with Papillomavirus Infection. In: *Materials of the All-Russian Congress «Out-Patient-Polyclinic Practice — New Horizons»*. [Fotodinamicheskaya terapiya u zhenshchin s papillomavirusnoy infektsiyey. V kn.: Materialy Vserossiyskogo kongressa

- «Ambulatorno-poliklinicheskaya praktika — novyye gorizonty»]. Moscow; 2010: 19—20. (in Russian)
3. Belyy Yu.A., Tereshchenko A.V. Treatment of choroidal neovascularization by photodynamic therapy. *Lazernaya meditsina*. 2011; 15(2): 60. (in Russian)
4. Vasil'yev N.E., Ogirenko A.P. Antimicrobial photodynamic therapy. *Lazernaya meditsina*. 2002; 6 (1): 32—8. (in Russian)
5. Vasil'yev N.E., Danilenko E.D., Sysoyeva G.M. Immunological aspects of photodynamic therapy. *Meditsinskaya immunologiya*. 2003; 5(5—6): 507—18. (in Russian)
6. Krasnovskiy A.A. Photodynamic action and singlet oxygen. *Biofizika*. 2004; 49(2): 305—22. (in Russian)
7. Romanov V.P., Tereshchenko T.A., Nazarikova N.N. Photoinactivation of microorganisms *in vitro* in the presence of photosensitizers. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2001; (1): 33—5. (in Russian)
8. Stranadko E.F., Kuleshov I.Yu., Karakhanov T.I. Photodynamic effect on pathogenetic microorganisms (modern view on the problems of antimicrobial photodynamic therapy). *Lazernaya meditsina*. 2010; 14(2): 52—6. (in Russian)
9. Questionable methods of cancer management: electronic devices. *CA Cancer J. Clin.* 1994; 44(2): 115—27.
10. Castano A.P., Gad F., Zahra T., Hamblin M.R. Specific anti-tumor immune response with photodynamic therapy mediated by benzoporphyrin derivative and chlorin (e6). *Proc. SPIE*. 2003; 4961: 1—9.
11. Lynes B., Cran J. *The Cancer Cure That Worked, Fifty Years of Suppression*. Ontario, Canada: Marcus Books; 1987.
12. Kashiwabuchi R.T., Khan Y., Carvalho F.R. et al. Antimicrobial susceptibility of photodynamic therapy (UVA/ riboflavin) against *Staphylococcus aureus*. *Arg. Bras. Oftalmol.* 2012; 75(6): 423—6.
13. Gelfond M.L., Vassiliev D.L. Photoditazine mediated chemosensitized blood photomodification. vanced tumors treatment preliminary results. *Proc. SPIE*. 2005; 5973: OX-1-7.
14. Loschenov V.B., Konov V.I., Prokhorov A.M. Photodynamic therapy and fluorescence diagnostics. *Laser Physics*. 2000; 10(6): 1188—207.
15. Tao J.N., Duan S.M., Li J. Experimental studies on treatment of HSV infections with Photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid. *Zhoughua Shi Yan Helin Chang Bing Xueza Zhi*. 2007; 21(1): 79—82.
16. Weishaupt K.R., Dougherty T.O., Potter W.R. Purified hematoporphyrine derivative for diagnosis and treatment of tumors, and method. PCT, WO 84/01382. 1984: 1—25.
17. Moan J. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1990; 6(3): 343—4.
18. Patent № 2345803, Rossiiskaya Federatsiya. Vasil'ev N.E., Reshetnikov A.V., Zalevskii I.D., Goncharov S.E. *The Method of Photoimmunotherapy with a Photosensitizer Activated by Wave Energy Outside the Human Body [Sposob fotoimmunoterapii fotsensibilizatorom, aktiviruyemym volnovoy energiyey vne organizma cheloveka]* Zayavleno 30.11.2006; Opublikovano 10.02.2009. (in Russian)
19. Dysart J.S., Patterson M.S. Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells *in vitro*. *J. Photochem. Photobiol., Phys. Med. Biol.* 2005; 50(11): 2597—616. doi: 10.1088/0031-9155/50/11/011.
20. Pervaiz S. Reactive oxygen-dependent production of novel phototherapeutic agents. *FASEB J.* 2001; 15(3): 612—7. doi: 10.1096/fj.00-0555rev.
21. Cataldo F., Da Ros T., eds. *Medicinal chemistry and pharmacological potential of fullerenes and carbon nanotubes*. Springer; 2008: 107—21.
22. Gulliya K.S., Chanh T., Newman J., Pervaiz S., Matthews J.L. Preactivation — a novel antitumor and antiviral approach. *Eur. J. Cancer*. 1990; 26(5): 551—3.
23. Aleksandrov M.T., Afanas'yev R.A., Gaponenko O.G. et al. *Laser Fluorescent Diagnostics in Medicine and Biology: Theory and Applications [Lazernaya fyuoresstentnaya diagnostika v meditsine i biologii: teoriya i vozmozhnosti primeneniya]*. Moscow: Spektrolyuks; 2007. (in Russian)



К статье М.Т. Александрова и соавт.

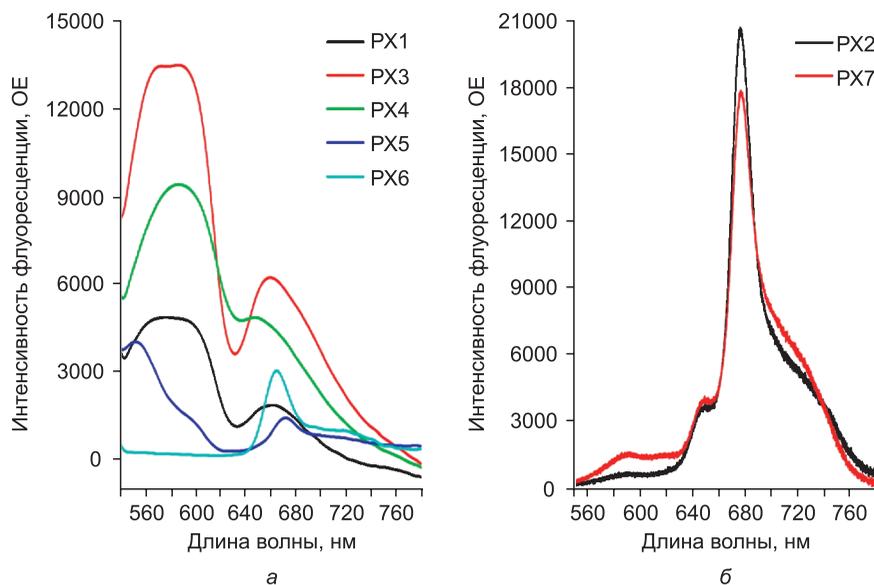


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции различных хлорофиллсодержащих препаратов.

а — лазер 532 нм, мощность 1 мВт, время экспозиции 1 с; б — лазер 532 нм, мощность 200 мкВт, время экспозиции 100 мс.

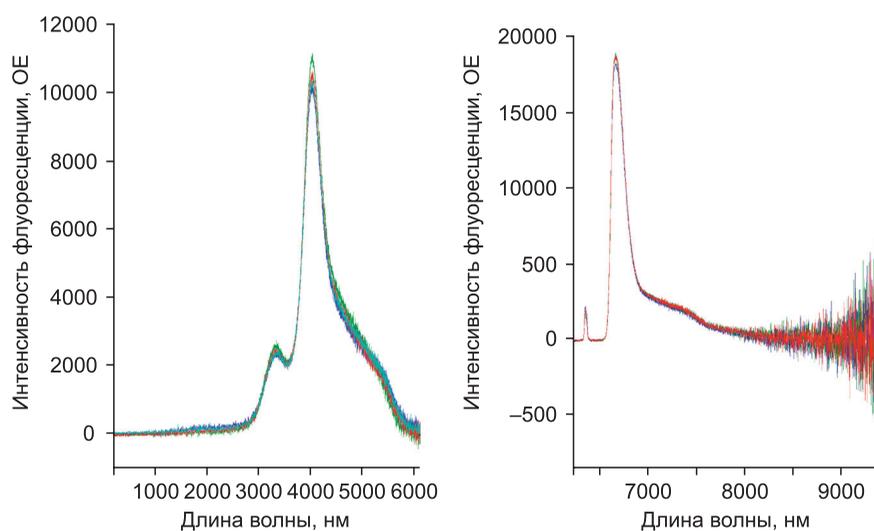


Рис. 3. Подобраны оптимальные невозмущающие параметры регистрации сигнала флуоресценции.

а — лазер с длиной волны 532 нм, мощность 170 мкВт и время экспозиции 100 мс; б — лазер с длиной волны 637 нм, мощность 170 мкВт и время экспозиции 100 мс.

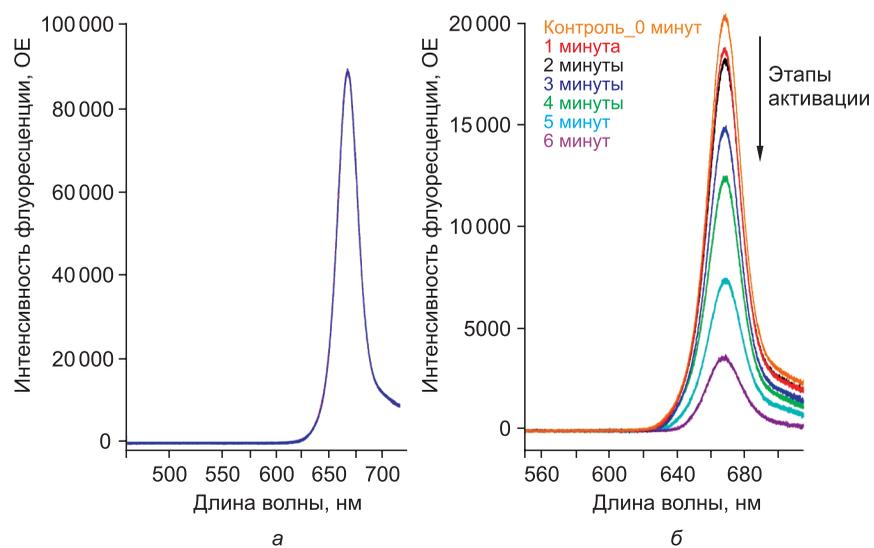
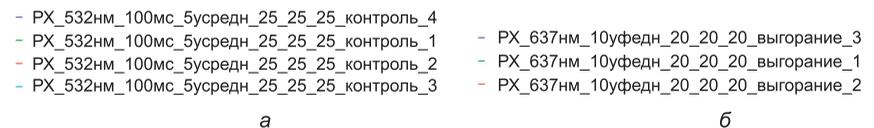


Рис. 5. Активация препарата лазерным излучением в присутствии кислородсодержащего препарата.

а — продувание кислорода через ХСП (в течение 1, 2, 5, 10 мин) не приводит к изменению интенсивности сигнала (фотодинамический процесс не наблюдается); б — продувание кислорода через ХСП в присутствии лазерного облучения.



К статье М.Т. Александрова и соавт.

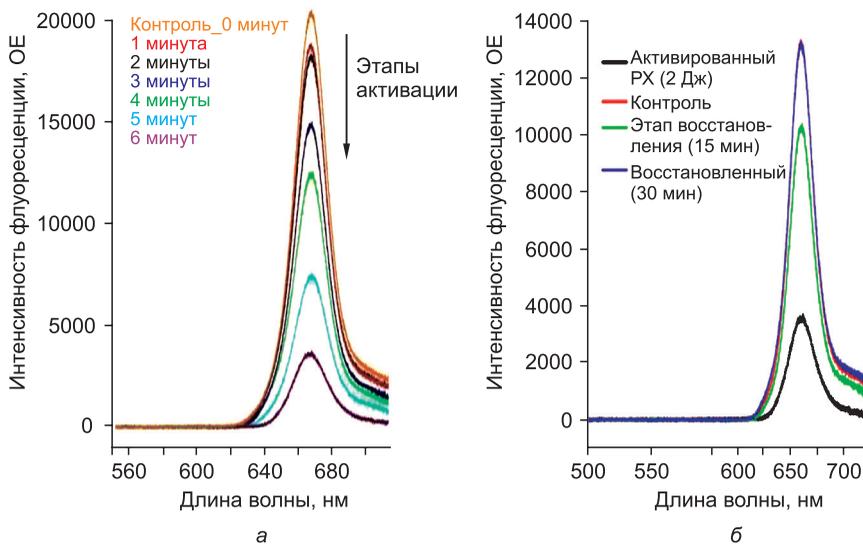


Рис. 6. Активация хлорофиллсодержащего препарата лазерным излучением.

Отмечается уменьшение интенсивности флуоресценции практически в 7 раз (а) и её аутовосстановление (б) через 15–30 мин (увеличение в 3,5–4 раза с последующей ундуляцией процесса до 6–7 дней).



Рис. 8. *Ps. aeruginosa* и хлорофиллсодержащий препарат с добавлением 3% H_2O_2 , активированный 20 Дж — роста нет.

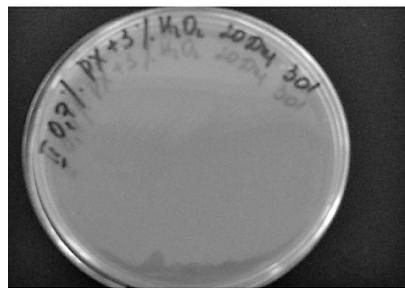


Рис. 9. *Ps. aeruginosa* и хлорофиллсодержащий препарат с добавлением 3% H_2O_2 , активированный 20 Дж (добавлен через 30 мин после активации) — роста нет.

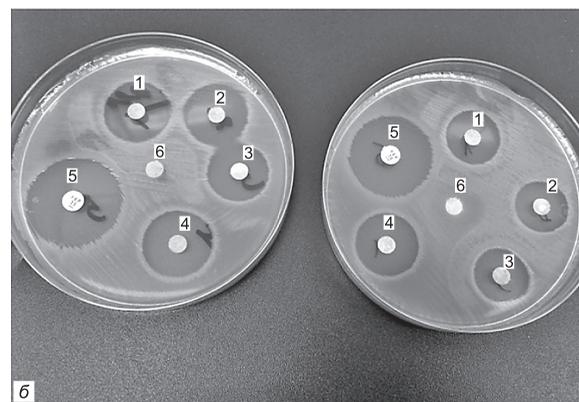
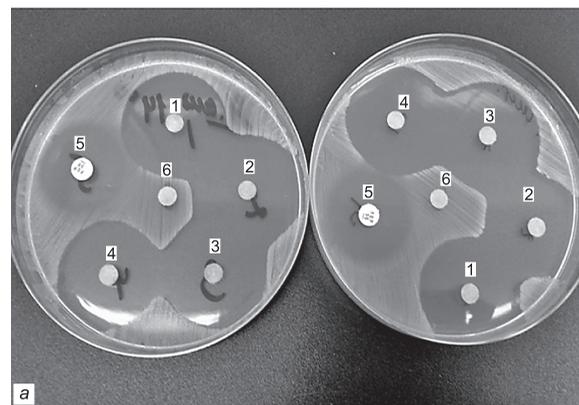


Рис. 10. *Ps. aeruginosa* (а) и *Staphylococcus aureus* (б) — рост в присутствии активированного хлорофиллсодержащего препарата, добавленного сразу (чашка Петри слева на обоих фото) и через 40 мин (аналогично — справа).

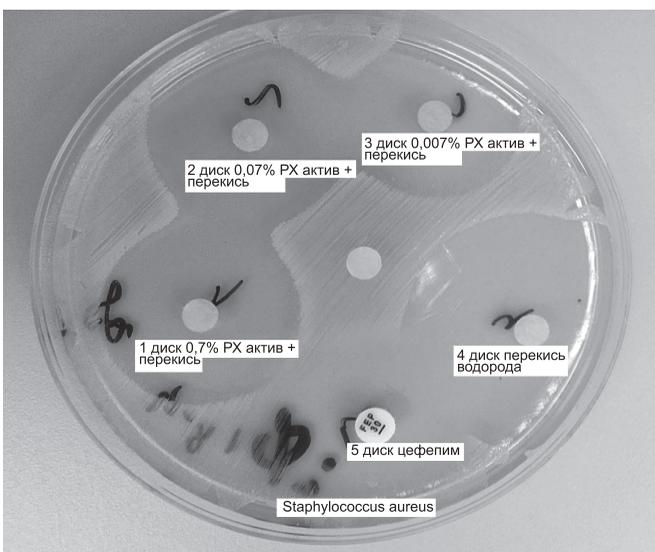


Рис. 11. Бактерицидная эффективность активированного препарата в различных концентрациях.