УДК: 13058

ВЛИЯНИЕ ФДТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРЕПАРАТА ХЛОРИНА-Е₆ (Х-Е₆) НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

В.П. ЛАПТЕВ¹,
М.И. КИСЕЛЕВСКИЙ²,
А.Е. ОВЧИННИКОВ,
Н.Г. ПАНФЁРОВА¹

¹ ООО «Эдис Мед Ко»

² ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

Данная экспериментальная работа наглядно демонстрирует общесорганное воздействие фотодинамической терапии через клеточный иммунитет на злокачественный процесс. У интактных мышей и с перевитой внутримышечно эмбриокарциномой проведены исследования функционального состояния Т-лимфоцитарного звена клеток костного мозга и селезенки по индексу спонтанной и стимулированной митогеном (ФГА) пролиферации. У интактных животных и у мышей с введенным препаратом Хлорина-е₆ и последующим содержанием в темноте, показатели индексов соответствовали 0%. У животных с лазерной и светодиодной активацией после введения препарата, индекс спонтанной пролиферации также оставался на нулевых отметках, тогда как показатели митогенной стимуляции (ФГА) соответствовали 25%. У животных с эмбриокарциномой после ФДТ с использованием Х-е₆ с глюкозамином или без него получен выраженный иммуностимулирующий эффект.

Ключевые слова: ФДТ, фотодинамическая терапия, Хлорин-е₆.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

а. эксперименты проведены на сингенных мышках линии Balb/c, весом 20–21 г,

б. в качестве модели опухолевого роста использован штамм эмбриокарциномы, метастазирующей лимфогенно и перевитой внутримышечно в левую заднюю лапу в дозе 100 тыс. живых опухолевых клеток на особь,

в. масса опухолей в момент проведения ФДТ соответствовала 1–1,2 грамма.

г. препарат Х-е₆ вводили внутривентрально в дозе

EFFECT OF FDT WITH CHLORINE E₆ (X-E₆) ON VIABILITY AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD'S LYMPHOCYTES

V.P. LAPTEV, M.I. KISELEVSKY,
A.E. OVCHINNIKOV, N.G. PANFYOROVA

¹ «EDIS MED» Co LLC

² FSBI «NATIONAL MEDICAL RESEARCH
CENTER OF ONCOLOGY THEM. N.N. BLOKHIN,
THE MINISTRY OF HEALTH OF RUSSIA

We expiemented with mice inoculated with intramuscularly embryocarcinoma and registered functional condition of T-lymphocytic link of cells of bone brain and spleen to the index of spontaneous and stimulated by mitogen (PHA) proliferation. Intact animals and the ones which we introduced with Chlorine e6 and keep in dark conditions have revealed the zero level of the indexes. But the animals being introduced with Chlorine e6 and activated with laser and light-emitting diode radiation have been notable for the index of mitogen (PHA) stimulation. It was established to 25% with the index of spontaneous proliferation remained on zero mark. Animals with embryocarcinoma after FDT with X-e₆ with or without glycosamine show immunostimulating effect.

KEY WORDS: PDT photodynamic therapy, Chlorin-e6.

DOI : 10.52531/1682-1696-2021-21-1-39-41

10 мг/кг веса однократно. Пероральное введение проводилось по следующей схеме: в 1-е сутки однократно внутривентрально через жесткий зонд в дозе 10 мг/кг веса, 2–4-е сутки через поилку с водой и за 3 часа до лазерной активации через зонд второе насильственное кормление препаратом в дозе 10 мг/кг веса.

д. лазерному облучению подвергались внутримышечные опухоли, а у интактных животных область грудины и живота с использованием терапевтического полупроводникового лазера «Ламеда» (662 нм) в дозе 70 Дж/см².

е. оценку жизнеспособности и функциональной активности лимфоцитов проводили морфологическим методом, традиционным способом – реакцией бласттрансформации лимфоцитов – РБТА (Самойлина Н.А., 1970 г.).

Для выявления неспецифической функциональной активности лимфоцитов был использован митоген фитомагглютинин (ФГА) в концентрации 10,0 мкг/мл (лаборатория Потока). РБТА проводили в стерильных условиях, используя ламинарный бокс с горизонтальным потоком воздуха (Хуан VFS 906). Мононуклеары выделяли по методу А. Воуи (1968). Взвесь клеток селезенки мышей, разведенная фосфатно-солевым буфером, в объеме 6 мл осторожно наслаивали в пробирках на 3 мл среды для выделения лимфоцитов плотностью 1,077 г/см³ (Lymphoprep, Pharmacia Прекрасный Chem.) Центрифугировали при 400 g в течение 45 минут. Опалесцирующие кольца, содержащие мононуклеары, переносили в стерильные пробирки, клетки отмывали ФСБР, и концентрацию клеток доводили до $1,5 \times 10^6$ кл./мл питательной средой. В качестве питательной среды использовали RPMI-1640 (Сигма) с добавлением 10%-ой инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сыворотки (НИИМЭ им. Гамалеи или Сигма), 25 нМ буфера Нерес (Сигма), 2 мМ L-глутамина и 0,1 мг/мл гентамицина сульфата (Сигма). Среду с клеточной взвесью вносили в лунки 24-луночного культурального плоскодонного планшета (Costar) по 1 мл на лунку, затем добавляли раствор митогена. Планшеты помещали в CO₂-инкубатор (37°C, 5% CO₂).

По окончании 72 часов часть клеточной суспензии собирали в пробирки, осаждали центрифугированием (200 g, 10 минут), отмывали 10% уксусной кислотой и снова центрифугировали. Осадок ресуспендировали в 20 мкл метанола и переносили на предметные стекла. Препараты высушивали и окрашивали по Романовскому-Гимза. Учет результатов проводили в световом микроскопе JENAMED-2 путем подсчета процента бластных клеток при просмотривании 300–500 клеток в поле зрения. Результат выражали как Индекс стимуляции (ИС), представляющий собой отношение про-

В.П. ЛАПТЕВ, М.И. КИСЕЛЕВСКИЙ,
А.Е. ОВЧИННИКОВ, Н.Г. ПАНФЁРОВА
ВЛИЯНИЕ ФДТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ПРЕПАРАТА ХЛОРИНА-Е₆ (Х-е₆)
НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ
АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ
КРОВИ

цента бластных клеток в стимулированной митогеном культуре лимфоцитов к проценту спонтанных бластных форм в контрольной культуре без добавки митогена.

У контрольных интактных животных без опухолей индексы спонтанной и активированной пролиферации Т-лимфоцитов составляли 0%.

Аналогичная картина наблюдается в группе интактных мышей с однократным внутрибрюшинным введением препарата Х-е₆ и трехсуточным темновым содержанием – 0%.

В группе интактных мышей с пероральным введением препарата и лазерным облучением, спонтанная пролиферация Т-лимфоцитов костного мозга и селезенки – 0%, стимулированная митогеном ФГА – 25%, что можно трактовать, как иммуномодулирующий эффект от проведения ФДТ с использованием Х-е₆.

В группе животных с опухолью и ФДТ при однократном внутрибрюшинном введении препарата Х-е₆ без глюкозамина у двух особей через сутки после облучения наблюдалась выраженная фотохимическая реакция в опухоли (изменение розового цвета на серо-синий) при нормальной неповрежденной коже в зоне облучения.

Индекс спонтанной пролиферации Т-лимфоцитов в этой группе соответствует – 80%, ФГА активированной пролиферации – 100%.

В группе животных с опухолью и ФДТ при однократном внутрибрюшинном введении препарата Х-е₆ с глюкозамином фотохимическая реакция в опухолях была аналогична по степени выражена, в сравнении с предыдущей группой (черно-синяя окраска). Кожа в зоне облучения без признаков мацерации и воспаления, обычной окраски.

Индекс спонтанной пролиферации – 75%, ФГА активированная пролиферация – 100%.

Выводы: у интактных животных пероральное введение препарата Х-е₆ с последующим лазерным облучением сопровождается слабым иммуномодулирующим эффектом активации Т-лимфоцитарного звена.

У животных с опухолями при введении препарата Х-е₆, как с глюкозамином, так и без него, наблюдается

ТАБЛИЦА.

Результаты исследования

контроль		Опыт 1		Опыт 2		Опыт 3		Опыт 4	
интактные мыши без опухоли и ФДТ		Интактные мыши с в/б препаратом и темновым содерж.		Интактные с perlos препаратом Ц-Хе ₆ и ФДТ		Мыши с опухолью, в/б препаратом Ц-Хе ₆ и ФДТ		Мыши с опухолью, в/б препаратом Ц-Хе ₆ -глютамин ФД	
Спонтан. прилф. %	ФГА актив. %	Спонтан. прилф %	ФГА актив. %	Спонтан. прилф %	ФГА актив. %	Спонтан. прилф %	ФГА актив. %	Спонтан. прилф %	ФГА актив %
0	1	0	0	0	25	80	100	75	100

Рис. 1.

Эмбриокарцинома с X-e₆ без лазерного облучения

Рис. 2.

Опухоль через 56 часов после введения X-e₆ и облучения.

выраженная иммуностимулирующая реакция, которая способна привести к истощению пула клеточных элементов органов кроветворения.

Таким образом, экспериментально показано, что кроме прямого фотохимического окисления опухолевых клеток, присутствует выраженная иммуномодулирующая реакция на фотодинамическое воздействие на организм с использованием препарата Хлорин-е₆ у интактных и опухолевых животных.

В.П. ЛАПТЕВ, М.И. КИСЕЛЕВСКИЙ,
А.Е. ОВЧИННИКОВ, Н.Г. ПАНФЁРОВА
ВЛИЯНИЕ ФДТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ПРЕПАРАТА ХЛОРИНА-е₆ (X-e₆)
НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ
АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ
КРОВИ

Рис. 3.

Опухоль через 96 часов после ФДТ с Хлорином-е₆

ЛИТЕРАТУРА

1. АБАКАМОВА О.Ю., БАУМ Р.Ф., ЭРМАКОВА Н.П., ГРАДЮШКО А.Т., ГУСЕВА-ДОНСКАЯ Т.Н. и др. Новая форма препарата(наркотика) chlorigin e6. Лазерное Использование в Онкологии II. Слушания SPIE, 2000. 4059. С. 130–138.
2. РЕШЕТНИКОВ А.В., ИВАНОВ А.В., АБАКУМОВА О.Ю., ГРАДЮШКО А.Т., ЗАЛЕВСКИЙ И.Д. и др. Оценка биологических свойств новых фотосенсибилизаторов хлоринового ряда. В сб. «Использование лазеров для диагностики и лечения заболеваний. Научно-информационный сборник» (приложение к бюллетеню «Лазер-информ»). 2001. Вып. 3. С. 34–40.
3. РЕШЕТНИКОВ А.В., БАРЫШНИКОВ А.Ю., ИВАНОВ А.В., ОБОРотова Н.А., КАРМЕНЯН А.В. и др. Основные результаты доклинического изучения нового фотосенсибилизатора. «Радахлорина» // Российский биотерапевтический журнал. 2002. №2. Т. 1. С.141.

Лаптев Владимир Петрович,
д.м.н., глав. врач ООО «Эдис Мед Ко»

☎ 117149 Москва, ул. Азовская, д. 9, корп. 2,
117149 Moscow, st. Azovskaya, 9, building 2,
тел.: +7 495 185-56-94

Киселевский Михаил Валентинович,
д.м.н., зав. лаб «Клеточного иммунитета» НИИ ЭДиТо
РОНЦ РАМН

☎ 115478, г. Москва, Каширское шоссе 23
115478, Moscow, Kashirskoe highway 23
тел.: +7 (499) 324-24-24

Овчинников Александр Владимирович,
представитель «Грин Грас»

Панфёрова Нателла Георгиевна,
генеральный директор «Эдис Мед Ко»

☎ 117149 Москва, ул. Азовская, д. 9, корп. 2,
117149 Moscow, st. Azovskaya, 9, building 2,
тел.: +7 495 185-56-94