

*<sup>1</sup>Буравский А. В., <sup>1</sup>Баранов Е. В., <sup>2</sup>Владимирская А. М., <sup>2</sup>Квачева З. Б.*

## **ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ: ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ПРИ ЛОКАЛЬНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА**

*<sup>1</sup> Белорусский государственный медицинский университет*

*<sup>2</sup> Республиканский научно-практический центр эпидемиологии  
и микробиологии, г. Минск*

Фотодинамическая терапия (ФДТ) в последние десятилетия применяется во многих отраслях медицины (онкология, хирургия, стоматология и др.) в качестве как основного, так и вспомогательного методов лечения самой разнообразной патологии [4]. В основе ФДТ заложено, во-первых, использование веществ — фотосенсибилизаторов (ФС), которые при системном введении аккумулируются преимущественно в патологически измененных клетках и тканях (опухолевых и некоторых других), а при локальном использовании у пациентов с гнойными ранами избирательно захватываются патогенными микроорганизмами и клеточными элементами раневого ложа. Вторым неотъемлемым компонентом ФДТ является действие излучения с определенной длиной волны, соответствующей максимуму поглощения ( $\lambda_{\max}$ ) использованного ФС. Излучение с заданными параметрами (лазерное, светодиодное) вызывает активацию ФС и запускает реакции фотоокисления, приводящие к развитию апоптоза и некроза и, в результате, к гибели фотосенсибилизированных клеток и тканей [6].

Использование ФДТ для лечения инфицированных раневых дефектов кожи и мягких тканей предусматривает местное (несистемное) применение ФС и локальное воздействие излучением с определенными физическими

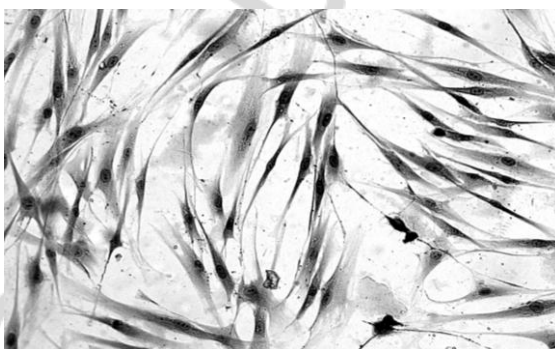
характеристиками. Описанный вариант метода носит название антимикробная фотодинамическая терапия (АФДТ). В клинической практике при проведении локальной АФДТ пациентам с гнойными ранами желательно знать минимальное время, необходимое для накопления ФС элементами раневого ложа в достаточном количестве, что является залогом эффективности ФДТ [1]. В доступной нам русскоязычной литературе недостаточно четко освещены механизмы и особенности накопления ФС клеткой [2–4], также нет и убедительного обоснования необходимого времени экспозиции (длительности действия) ФС при местном использовании.

Ряд зарубежных исследователей в своих работах отмечают отсутствие в большинстве случаев самостоятельной цитотоксичности ФС, подчеркивают большой потенциал метода ФДТ, а также акцентируют внимание на концентрации и экспозиции ФС [7–9].

Целью нашего исследования являлась оценка накопления выбранного фотосенсибилизатора клеточными элементами, а также изучение биологических эффектов фотодинамического воздействия в зависимости от продолжительности контакта клеток с ФС (в эксперименте *in vitro*).

#### **Материалы и методы**

В качестве экспериментальной модели были использованы монослойные культуры фибробластов кожи человека (ФКЧ) 4 пассажа, третьи сутки роста (рис. 1), выращенные на дне чашек Петри (диаметр 60 мм).



*Рис. 1.* Морфология клеток в культуре ФКЧ, пассаж 4, 3-и сутки роста *in vitro*. Окраска ГЭ, ув. об. 20Х

В качестве ФС был выбран Фотолон (РУП «Белмедпрепараты», Беларусь), который представляет собой молекулярный комплекс тринатриевой соли хлорина еб и поливинилпирролидона. Фотолон обладает двумя наиболее интенсивными полосами поглощения с максимумами поглощения ( $\lambda_{\max}$ ) при  $402 \pm 4$  нм (полоса Core,  $\epsilon - 150000 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) и  $660 \pm 5$  нм ( $\epsilon - 45000 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ ), и максимумом флюоресценции в красной области спектра — 668 нм [5]. Для проведения локального фотодинамического воздействия в эксперименте использовали комплекс фототерапевтический «Ромашка» (КФТ) на основе светодиодных излучателей высокой мощности (ГНУ «Институт физики им. Б. И. Степанова» НАН РБ, НПК «Люзар», Бе-

ларусь), который позволяет получить поляризованное светодиодное излучение (ПСИ) с длиной волны  $\lambda = 410 \pm 15$  нм.

В зависимости от времени экспозиции ФС были сформированы 3 группы: контрольная и 2 опытных. В каждой группе было выполнено по 3 однотипных исследования.

Для оценки результатов использовали инвертированный микроскоп Nikon Eclipse TE2000-E (Japan), оснащенный блоком флуоресцентных фильтров и цифровой фотокамерой. Длина волны возбуждения (ДВВ) составляла 380–420 нм (излучение осветителя).

В контрольной группе культуру фибробластов кожи не обрабатывали ФС, фотодинамическое воздействие не проводили. Оценка аутофлуоресценции клеток выполняли при люминесцентной микроскопии (ЛМ) в выбранных режимах просмотра. Данные режимы использовали также и в опытных группах.

В первой опытной группе из чашек Петри удаляли питательную среду, после чего добавляли 1 мл 0,1%-ного водного раствора Фотолон. Через 15 минут отмывали монослой клеток от несвязавшегося ФС фосфатным буферным раствором и проводили ЛМ. Затем воздействовали на монослой фибробластов ПСИ с длиной волны  $\lambda = 410 \pm 15$  нм и плотностью энергии  $10 \text{ Дж/см}^2$ , и вновь учитывали результаты люминесцентной микроскопии. Во второй опытной группе все этапы исследования были аналогичны первой опытной группе, с той лишь разницей, что экспозиция Фотолон составила 30 минут, а плотность энергии светодиодного излучения была увеличена до  $20 \text{ Дж/см}^2$ .

### **Результаты и обсуждение**

Выполненные исследования не выявили значимой аутофлуоресценции ФКЧ в культуре *in vitro* (контрольная группа) при использованных параметрах микроскопии (рис. 2).

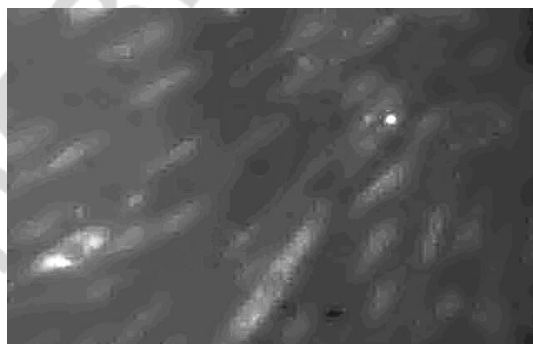


Рис. 2. Отсутствие аутофлуоресценции в культуре ФКЧ. ЛМ, ув. об. 20X, ДВВ 380–420 нм

При изучении результатов эксперимента в первой опытной группе после 15-минутного контакта культуры ФКЧ с 0,1%-ным раствором Фотолон при проведении ЛМ было отмечено равномерное цитоплазматическое накопление ФС клетками монослоя (рис. 3). После облучения фибробластов

ПСИ с  $\lambda = 410 \pm 15$  нм и плотностью энергии  $10 \text{ Дж/см}^2$  выявлялось нарушение целостности монослоя фибробластов и деформация клеток (рис. 4).

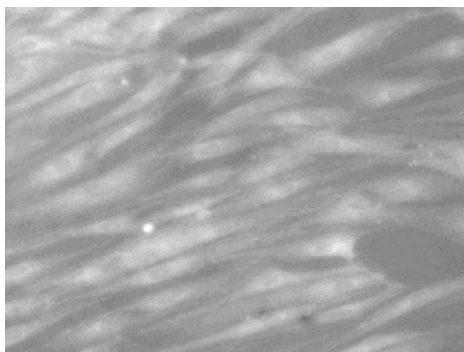


Рис. 3. Экспозиция Фотолонa 15 минут. Цитоплазматическое накопление ФС клетками. ЛМ, ув. об. 20X, ДВВ 380–420 нм



Рис. 4. Нарушение целостности монослоя ФКЧ, деформация клеток после облучения ( $10 \text{ Дж/см}^2$ ). ЛМ, ув. об. 20X, ДВВ 380–420 нм

При исследовании во второй опытной группе (после 30-минутной экспозиции раствора Фотолонa) была зафиксирована более интенсивная флюоресценция (по сравнению с первой опытной группой), что свидетельствовало о большем накоплении ФС в клетках. При выполнении ЛМ в культуре ФКЧ определялась преимущественно перинуклеарная аккумуляция Фотолонa (рис. 5). После облучения монослоя фибробластов второй опытной группы ПСИ с  $\lambda = 410 \pm 15$  нм и плотностью энергии  $20 \text{ Дж/см}^2$  были отмечены: выраженная дезорганизация монослоя ФКЧ, округление и деструкция клеток, а также исчезновение ядер — при ЛМ не дифференцировались (рис. 6).

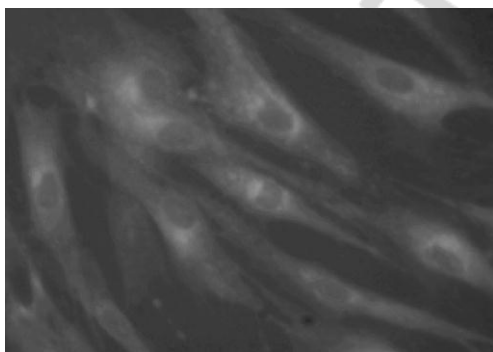


Рис. 5. Экспозиция Фотолонa 30 минут. Перинуклеарное и цитоплазматическое накопление ФС клетками. ЛМ, ув. об. 40X, ДВВ 380 – 420 нм.

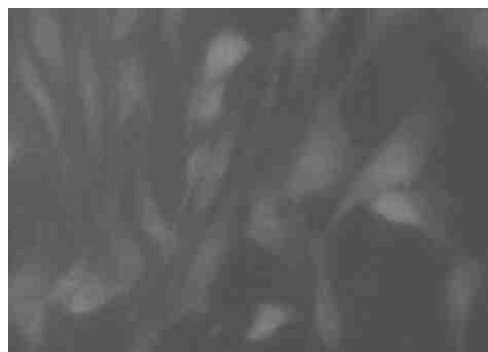


Рис. 6. Нарушение целостности монослоя ФКЧ, округление и деструкция клеток, отсутствие ядер ( $20 \text{ Дж/см}^2$ ). ЛМ, ув. об. 40X, ДВВ 380 – 420 нм.

### Выводы:

1. В исследованиях *in vitro* с использованием монослойной культуры фибробластов кожи человека выявлена прямая зависимость интенсивности накопления Фотолонa клеткой при локальном применении от времени экспозиции ФС.

2. При выбранных параметрах эксперимента максимальная и достаточная (для проведения эффективного фотодинамического воздействия) внутриклеточная аккумуляция Фотолон была отмечена через 30 минут (с преобладанием перинуклеарной локализации ФС).

3. Результаты фотодинамического воздействия (развитие апоптоза и некроза клеток) напрямую зависят от внутриклеточной концентрации Фотолон и плотности энергии светодиодного излучения.

Таким образом, в результате исследований *in vitro* были получены данные об особенностях накопления ФС «Фотолон» клетками монослой культуры ФКЧ в зависимости от сроков экспозиции ФС, а также о биологических эффектах фотодинамического воздействия, что позволяет определить наиболее оптимальное время для проведения ФДТ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дуванский, В. А. Фотодинамическая терапия в комплексном лечении больных с острыми гнойными заболеваниями мягких тканей / В. А. Дуванский // Лазерная медицина. 2003. Т. 7. № 3–4. С. 41–45.

2. Решетников, А. В. Фотосенсибилизаторы в современной клинической практике (обзор) / А. В. Решетников // Лазерные технологии в оториноларингологии : материалы науч.-практ. конф. / под ред. В. Г. Зенгера, А. Н. Наседкина. Тула, 2007.

3. Странадко, Е. Ф. Механизмы действия фотодинамической терапии / Е. Ф. Странадко // Российский онкологический журнал. 2000. № 4. С. 52–56.

4. Странадко, Е. Ф. Исторический очерк развития фотодинамической терапии / Е. Ф. Странадко // Лазерная медицина. 2002. Т. 6. № 1. С. 4–8.

5. Фотолон — новое средство для фотодинамической терапии / Т. В. Трухачева [и др.] // РУП «Белмедпрепараты». Минск, 2009.

6. Современный взгляд на механизм фотодинамической терапии. Фотосенсибилизаторы и их биодоступность / Д. М. Ягудаев [и др.] // Урология. 2006. № 5. С. 94–98.

7. *Effect of polyvinylpyrrolidone on the interaction of chlorin e6 with plasma proteins and its subcellular localization* / W. Wei Lim Chin [et al.] // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2010. № 76. P. 245–252.

8. *Photolon™, a chlorin e6 derivative, triggers ROS production and light-dependent cell death via necrosis* / L. Copley [et al.] // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2008. № 40. P. 227–235.

9. *Study of cytotoxic effect of photodynamically and sonodynamically activated sensitizers in vitro* / K. Tomankova [et al.] // Toxicology in Vitro. 2009. № 23. P. 1465–1471.

**Buravsky A. V., Baranov E. V., Vladimirskaia A. M., Kvacheva Z. B.**

#### **Photodynamic therapy: an experimental study of biological effects with local use of the photosensitizer (in vitro)**

Photodynamic therapy is a promising method for the local treatment of the purulent wounds. In this study, an *in vitro* investigation was performed to explore the features of cell Photolon accumulation and biological effects of photodynamic action. In experiments on monolayer culture of human skin fibroblasts was revealed a direct dependence of the intracellular Photolon accumulation from the time of exposure of this photosensitizer. The results photodynamic

action (development of cell apoptosis and necrosis) had a direct correlation on the intracellular concentration of Photolon and energy density of the LED light.