



УДК 577.344.3:616-006.484.599.323.4

**К.В. ЕРМАКОВА, З.С. СМИРНОВА, И.Ю. КУБАСОВА, Л.М. БОРИСОВА, М.П. КИСЕЛЕВА,
Н.А. ОБОРотова, И.Г. МЕЕРОВИЧ, Г.А. МЕЕРОВИЧ, Е.А. КОГАН, Е.В. СТЕПАНОВА, Е.А. ЛУКЬЯНЕЦ**
РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН
ФГУП «ГНЦ «НИОПИК»
ЦЕНИ ИОФ им. А.М.Прохорова РАН
Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова

Значение фотодинамической терапии при комбинированном лечении глиом крыс

В настоящей работе представлены данные об эффективности фотодинамической терапии с «Тиосенсом» при комбинированном лечении глиомы С6 крыс по критерию увеличения продолжительности жизни опытных животных, патоморфозу опухоли и иммуногистохимическому исследованию. Наиболее эффективным является комбинированное лечение, включающее удаление опухоли, интраоперационную фотодинамическую терапию и последующую химиотерапию с лизомустином.

Ключевые слова: глиома, лечение, фотодинамическая терапия.

**K.V. ERMAKOVA, Z.S. SMIRNOVA, I.Y. KUBASOVA, L.M. BORISOVA, M.P. KISELYOVA,
N.A. OBOROTOVA, I.G. MEEROVICH, G.A. MEEROVICH, E.A. KOGAN, E.V. STEPANOVA, E.A. LUKYANETS**

Value of photodynamic therapy at combined treatment glioma of rats

In the present work data about efficiency of photodynamic therapy with «Thiosens» at the combined treatment gliomae C6 rats by criterion of increase in life expectancy of skilled animals, pathomorphosis are presented of tumour and immunohistochemical to research. The most effective is the combined treatment including removal of tumour, intraoperational photodynamic therapy and the subsequent chemotherapy with lysomustine.

Keywords: glioma, treatment, photodynamic therapy.

ВВЕДЕНИЕ

Первичные злокачественные опухоли головного мозга составляют около 1,5-2% от всех новообразований человека и характеризуются способностью к быстрой пролиферации, ангиогенезу и инвазивному росту. Глиомы составляют 77% первичных злокачественных опухолей мозга и включают астроцитому, анапластическую астроцитому, мультиформную глиобластому, олигодендроглиомы, эпендиомы и смешанные глиомы [1]. Лечение злокачественных глиом комбинированное и включает в себя хирургическое удаление опухоли, лучевую и химиотерапию. Основным ограничением нейрохирургии является плохая визуализация границ опухоли и особенности ее локализации. Радикальная резекция опухоли в большинстве случаев невозможна, так как иссечение здоровой ткани

мозга с инфильтрирующими ее опухолевыми клетками может привести к развитию тяжелых неврологических осложнений. Поэтому мультиформные глиобластомы (глиомы IV степени злокачественности — классификация ВОЗ) рецидивируют в 100% случаев, чаще всего в пределах 2 см от места резекции первичной опухоли [3]. Лучевая и химиотерапия применяются в основном в послеоперационном периоде с целью профилактики возникновения рецидивов. Прогноз для больных со злокачественными глиомами остается крайне неблагоприятным. Так, медиана выживаемости больных с мультиформной глиобластомой (МГ) после частичной резекции опухоли составляет 8,8 мес., при радикальной резекции — 11 мес. После лучевой терапии медиана выживаемости не превышает 12 мес., при сочетании лучевой и химиотера-

Таблица.

Эффективность комбинированного лечения глиомы С6 с использованием ФДТ с Тиосенсом в дозе 3 мг/кг.

Лечение	Доза облучения, Дж/5 мм ²	Медиана выживаемости, дни	Увеличение продолжительности жизни, %
Краниотомия +ФДТ	120	33	54
Частичная резекция опухоли +ФДТ	60	34	68
ФДТ+химиотерапия	120	34	78
Частичная резекция+ФДТ +химиотерапия	60	35	84
Химиотерапия с лизомустином	-	33	68
ФДТ в монотерапии	120	28	42
Без лечения	-	21	-

пии с темодалом — 15 мес. Недостаточная эффективность традиционных методов привела к поиску новых. Одним из них является фотодинамическая терапия (ФДТ). Эффективность фотодинамического повреждения сенсibilизированной клетки определяется внутриклеточной концентрацией сенсibilизатора, его локализацией в клетке и его фотохимической активностью, а также световой дозой лазерного облучения. Кроме прямого цитотоксического действия ФДТ на опухолевые клетки, важную роль в деструкции злокачественного новообразования играют: нарушение кровоснабжения за счет повреждения эндотелия кровеносных сосудов опухолевой ткани, цитокиновые реакции, продукция фактора некроза опухоли, и иммунологическая реакция, приводящая к активации макрофагов, лейкоцитов и лимфоцитов [5].

В ряде экспериментов *in vitro* и *in vivo*, а также в клинических исследованиях, была подтверждена эффективность фотодинамической терапии опухолей головного мозга с использованием в качестве фотосенсibilизаторов фотолон, аласенса, фотофрина, гематопорфирина, фоскана и некоторых других. При использовании интра- и послеоперационной ФДТ медиана выживаемости больных с МГ достигает 21 мес. [8].

ФДТ имеет преимущества перед лучевой и химиотерапией при комбинированном лечении опухолей головного мозга. Во-первых, это локальная форма терапии, которая обладает низкой системной токсичностью. Во-вторых, до сих пор не получено данных о возможности развития устойчивости при повторном использовании ФДТ, что очень важно, так как для достижения высокого терапевтического эффекта необходимо длительное или многократное лазерное облучение инфильтрирующих опухолевых клеток не удаленных во время хирургического лечения.

Одним из важных направлений повышения эффективности фотодинамической терапии является поиск фотосенсibilизаторов (ФС) с поглощением в спектральном диапазоне 700-800 нм, в котором собственное поглощение биологических тканей минимально. Использование таких ФС позволяет минимизировать потери на собственное поглощение ткани, увеличить глубину проникновения возбуждающего света

и повысить терапевтическую эффективность [7].

Целью исследования является оценка эффективности ФДТ с использованием отечественного фотосенсibilизатора «Тиосенс» при комбинированном лечении глиомы С6 крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на половозрелых крысах породы Wistar массой 200-220 г. В работе использовали глиому С6, полученную у крыс породы Wistar путем повторного введения нитрозометилмочевины в течение 8 мес. По гистологическому строению глиома классифицирована как анапластическая астроцитома, которая имеет сходство с глиомой человека. Глиому С6 перевивали интракраниально по $400 \cdot 10^3$ опухолевых клеток. «Тиосенс», представляющий собой тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия, нерастворимый

в воде, синтезирован во ФГУП «ГНЦ «НИОПИК». Липосомальную лекарственную форму «Тиосенса», разработанную в лаборатории лекарственных форм РОНЦ, вводили в/в в дозе 3 мг/кг через 6 дней после перевивки опухоли и за 24 часа до проведения ФДТ. Электронный спектр поглощения раствора вещества в хлороформе разбавленным этиловым спиртом в соотношении 1:24 содержит максимумы поглощения 717 ± 4 нм, 648 ± 4 нм, 450 ± 3 нм, 342 ± 3 нм. Уровень накопления «Тиосенса» оценивали спектрально-флуоресцентным методом с использованием спектроанализатора «ЛЭСА-01-БИОСПЕК». Возбуждение флуоресценции «Тиосенса» осуществляли лазером «ЛФД-730-01-БИОСПЕК» с длиной волны 720 нм. Лазерное облучение проводили в дозах 120 Дж/5 мм² и 60 Дж/5 мм².

Лизомустин вводили в/в однократно в дозе 80 мг/кг через 3 часа после лазерного облучения.

Проницаемость кровеносных микрососудов опухолей после ФДТ с «Тиосенсом» оценивали с использованием красителя «Эванс голубой», который при повышении проницаемости сосудов проникает в межклеточное пространство и там накапливается.

Патоморфологическое исследование проводили по стандартной методике. В качестве красителей использовали гематоксилин и эозин. Иммуногистохимическое исследование заключалось в подсчете количества микрососудов в ткани глиомы после окраски парафиновых срезов антителами к антигену эндотелиальных клеток CD34 и гематоксилин-эозином.

Критериями противоопухолевого эффекта служило увеличение продолжительности жизни опытных крыс по сравнению с контрольными животными (УПЖ%), иммуногистохимическое и патоморфологическое исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При использовании в монотерапии ФДТ с «Тиосенсом» в дозе 3 мг/кг через трепанационное отверстие в оптимальном режиме лазерного облучения: 100 мВт/5мм² и времени облучения 20 мин (120 Дж/5мм²) показано, что УПЖ со-



ставляет 42% (табл.). При патоморфологическом исследовании опухолевой ткани после ФДТ с Тиосенсом выявлен некроз и апоптоз, разрушение сосудов с кровоизлияниями и тромбоз сосудов в результате деструктивного васкулита (рис.1). В окружающей ткани отмечался некроз, отек, полиморфноядерно-лейкоцитарная инфильтрация, а также пролиферация глиальных элементов и эндотелиоцитов, острая воспалительная реакция и репаративные изменения в нервной ткани.

Оценка антиангиогенной активности ФДТ с «Тиосенсом» в дозе 3 мг/кг показала, что количество микрососудов в опухоли достоверно уменьшается через 3 дня после лечения по сравнению с количеством микрососудов в ткани глиомы С6 контрольной группы (рис.2). Среднее количество сосудов в ткани опухоли контрольной группы составило 7,7 сосуда в поле зрения, а в группе после проведения ФДТ с «Тиосенсом» — 4,1 ($p < 0,05$). Кроме того, в ткани опухоли опытной группы наблюдается много геморрагий, свидетельствующих о разрушении микрососудов.

С целью повышения эффективности лечения глиомы С6 с использованием ФДТ с «Тиосенсом», следующим этапом было изучение интраоперационной ФДТ при краниотомии и частичном удалении опухоли. Установлено, что при лазерном облучении в дозе 120 Дж/5мм² через краниотомическое отверстие размером 3x4 мм глиомы С6 эффективность ФДТ с использованием «Тиосенса» действительно повышается и составляет 54% УПЖ (табл.). При проведении комбинированного лечения глиомы С6: хирургическое удаление опухоли в сочетании с ФДТ показана более высокая эффективность равная 68% УПЖ (табл.). При этом доза лазерного облучения была уменьшена до 60 Дж/5мм² (плотность мощности 100 мВт/5мм², время облучения 10 минут) с целью снижения повреждающего действия ФДТ на здоровую ткань мозга.

Тем не менее, даже после применения хирургической резекции опухоли и интраоперационной ФДТ, рецидивы все же возникают, в основном вследствие сохранения жизнеспособных опухолевых клеток в глубине мозговых извилин, вероятно, вследствие особенностей роста глиомы С6 по оболочкам головного мозга. Так, на 6 день после лечения рецидивы возникают в 66% случаев, а на 9 день у всех крыс. Эти данные свидетельствуют, что однократной интраоперационной ФДТ недостаточно для уничтожения всех опухолевых клеток, инфильтрирующих окружающую ткань мозга. В связи с небольшим объемом черепа крысы и опасностью развития отека головного мозга при повторной ФДТ, который может привести к гибели животного, на следующем этапе оценки эффективности ФДТ с «Тиосенсом» при лечении глиомы С6 крыс было изучение комбинированной терапии с использованием отечественного противоопухолевого препарата лизомустина, ранее проявившего терапевтический эффект при лечении мультиформной глиобластомы крыс.

Сначала, с целью определения оптимальных сроков введения химиотерапевтического препарата, мы оценивали динамическое изменение проницаемости кровеносных микрососудов в ткани глиомы С6 после интраоперационной ФДТ с «Тиосенсом». Проницаемость сосудов оценивали с помощью красителя Эванс голубой, который быстро связывается с сывороточным альбумином и при повышенной проницаемости сосудов накапливается в ткани опухоли. Исследование показало, что наблюдается увеличение проницаемости микрососудов в опухоли опытной группы по сравнению с контрольной группой. Уже через 15 минут после проведения ФДТ наблюдается увеличение абсорбции красителя в ткани опухоли с 0,6 ед. до 0,86 ед., что свидетельствует о повреждении кровеносных сосудов в опухоли. Через 3 часа после

проведения ФДТ проницаемость сосудов еще больше увеличивается, и абсорбция составляет уже 1,23 ед., то есть повреждение сосудов в опухоли имеет временную зависимость. Таким образом, оптимальным сроком введения химиотерапевтического препарата является 3 часа после проведения ФДТ, так как выше было описано, что на более поздние сроки количество микрососудов в опухоли уменьшается.

В результате проведенных исследований установлено, что «Лизомустин» в монотерапии в дозе 80 мг/кг вызывает увеличение продолжительности жизни крыс с глиомой С6 на 68% по сравнению с контрольными животными (табл.). Комбинированное лечение глиомы С6, как было показано, более эффективно. Так, ФДТ проведенное через трепанационное отверстие с последующим внутривенным введением «Лизомустина» вызывает увеличение продолжительности жизни крыс с глиомой С6 на 78%, а интраоперационное ФДТ, проведенное через краниотомическое отверстие после частичного удаления опухоли с последующим внутривенным введением «Лизомустина» вызывает увеличение продолжительности жизни крыс с опухолью на 84% по сравнению с контрольными животными (табл.).

ОБСУЖДЕНИЕ

В связи с высоким процентом рецидивирования злокачественных опухолей головного мозга после комбинированного лечения, включающего хирургическое удаление, лучевую и химиотерапию, проводится поиск новых методов лечения, направленных на профилактику возникновения рецидивов или увеличения продолжительности безрецидивного периода у больных с МГ. ФДТ является принципиально новым методом лечения злокачественных глиом, однако, в монотерапии является недостаточно эффективным.

В двух больших клинических исследованиях, проведенных в Мелборне и Торонто, было показано увеличение продолжительности жизни больных с глиомами при использовании ФДТ в качестве дополнительной терапии опухолей головного мозга (Stylli SS, 2005). Так, при использовании интраоперационной ФДТ с производными гематопорфирина медиана выживаемости составляла 76,5 мес. у больных с анапластической астроцитомой и 14,3 с МГ. В большинстве случаев ФДТ используют после максимального хирургического удаления опухолевого узла.

Эффективность ФДТ зависит от ряда факторов, включающих уровень оксигенации в опухоли, дозу облучения, глубину проникновения лазерного облучения, концентрацию и локализацию фотосенсибилизатора в опухолевой клетке. Используя в качестве модели глиому С6 крыс, а в качестве фотосенсибилизатора — «Тиосенс», мы установили оптимальные сроки проведения ФДТ (на седьмой день после перевивки опухоли и через 24 часа после внутривенного введения «Тиосенса»), дозу вводимого сенсбилизатора (3 мг/кг) и параметры лазерного облучения (100 мВт/5мм² в течение 20 мин).

Существует три основных пути воздействия ФДТ на опухоль: прямое цитотоксическое воздействие, поражение сосудов, васкуляризирующих новообразование и иммуноопосредованное воздействие. При патоморфологическом исследовании нами показано, что ФДТ с «Тиосенсом» вызывает некроз и апоптоз в ткани опухоли, разрушение сосудов с кровоизлияниями и тромбоз сосудов в результате деструктивного васкулита. С использованием красителя Эванса голубого удалось показать динамическое влияние ФДТ с «Тиосенсом» на проницаемость сосудов опухоли. Н. Hirschberg и соавт. (2008) было показано, что после ФДТ с АЛК проницаемость сосудов опухоли значительно увеличивается практически сразу после

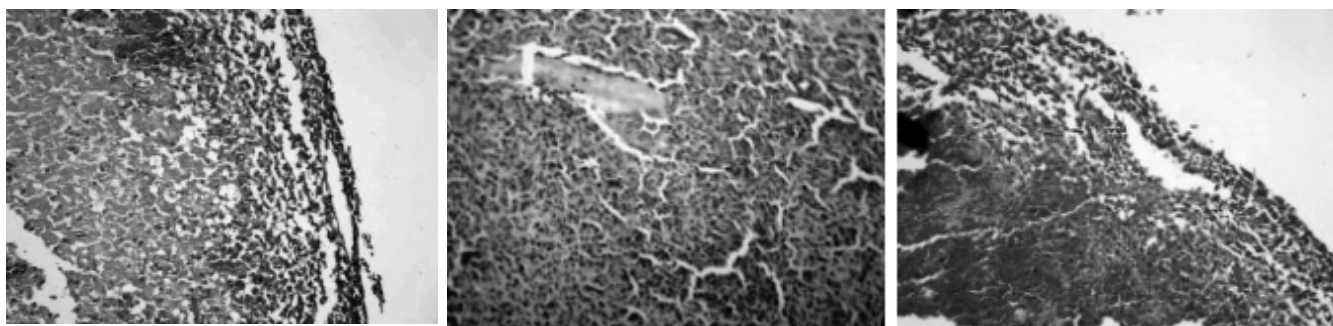


Рис.1

Патоморфологическая картина глиомы С6 через 24 часа после ФДТ с Тиосенсом (некроз, апоптоз, кровоизлияние). Гематоксилин-эозин. X 150.

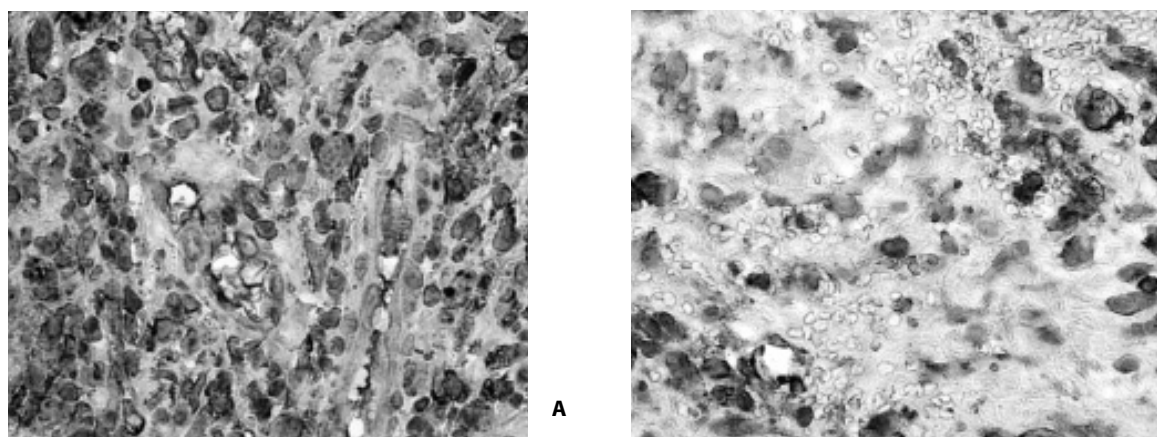


Рис.2

Уменьшение количества сосудов в глиоме С6 через 3 дня после ФДТ с Тиосенсом (Б), по сравнению с контролем (А). Антитела к CD34. X 400.

лазерного облучения и остается на высоком уровне в течение 72 часов. Нами были получены аналогичные данные.

При анализе выживаемости крыс с Глиомой С6 показано, что комбинированное лечение является более эффективным, чем применение различных методов в монотерапии. Х. Zhang и соавт. (2006) [6] на 9L глиосаркоме также показали, что интраоперационная ФДТ с «Фотофрином» после хирургического удаления значительно снижает объем опухоли и увеличивает апоптоз злокачественных клеток. Кроме того, было показано, что в отличие от монотерапии, комбинированная терапия не стимулирует экспрессию VEGF, являющегося белком, который стимулирует ангиогенез и васкуляризацию опухоли.

Таким образом, в ходе исследования нами была показана высокая эффективность комбинированного лечения глиомы С6 крыс с использованием интраоперационной ФДТ с «Тиосенсом». Полученные данные позволяют рекомендовать ФДТ с «Тиосенсом» для клинического испытания в комбинированном лечении глиом.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Eljamel M.S. Brain photodiagnosis (PD), fluorescence guided resection (FGR) and photodynamic therapy (PDT): past, present and future. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2008; 5(1): 29-35.

2. Hirschberg H., Uzal F.A., Chighvinadze D., Zhang M.J., Peng Q., Madsen S.J. Disruption of the blood-brain barrier following ALA-mediated photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 2008; 40(8): 535-42.

3. Muller P.J., Wilson B.C. Photodynamic therapy of brain tumors--a work in progress. *Lasers Surg Med.* 2006; 38(5): 384-9.

4. Stylli S.S., Kaye A.H., Macgregor L., Howes M., Rajendra P. Photodynamic therapy of high grade glioma - long term survival. *J Clin Neurosci.* 2005; 12(4): 389-98.

5. Stylli SS, Kaye AH. Photodynamic therapy of cerebral glioma--a review Part I--a biological basis. *J Clin Neurosci.* 2006; 13(6): 615-25.

6. Zhang X., Jiang F., Kalkanis S.N., Yang H., Zhang Z., Katakowski M., Hong X., Zheng X., Chopp M. Combination of surgical resection and photodynamic therapy of 9L gliosarcoma in the nude rat. *Photochem Photobiol.* 2006; 82(6): 1704-11.

7. Zhu T.C., Finlay J.C., Hahn S.M. Determination of the distribution of light, optical properties, drug concentration, and tissue oxygenation in-vivo in human prostate during motexafin lutetium-mediated photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2005; 79: 231-41.

8. Zimmermann A., Ritsch-Marte M., Kostron H. mTHPC-mediated photodynamic diagnosis of malignant brain tumors. *Photochem Photobiol.* 2001 Oct; 74(4): 611-6.