

УДК 616-006.81-092.9:615.849.015.1

Z. S. Smirnova¹, I. Yu. Kubasova¹, L. M. Borisova¹, A. S. Kchalansky², G. A. Meerovich³,
A. Yu. Baryshnikov¹, E. A. Kogan⁵, E. A. Lukyanetz⁴, G. N. Vorozhtsov⁴

PHOTODYNAMIC THERAPY OF RAT BRAIN TUMORS USING A PHOTSENSITIZER PHOTOSENS

¹ N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

² Institute of Human Morphology RAMS, Moscow

³ Natural Sciences Center of A. M. Prokhorov General Physics Institute RAS, Moscow

⁴ State Research Center «NIOPIK», Moscow

⁵ I. M. Setchenov Moscow Medical Academy

ABSTRACT

Photosens (PS) is a sulfur-containing aluminium phthalocyanin, which can be used as a photosensitizing component of photodynamic therapy (PDT). Feasibility of such PS application was studied in an experimental model of rat brain tumor. 9 days after C6 glioma inoculation to rats PS was administered at a dose of 3.5 mg/kg, and laser irradiation (90 J) was carried out 24 hours later, at the time of the highest PS accumulation in brain (8 arbitrary units of fluorescence), and the largest selectivity index (equal to 4.6). PS-enhanced PDT produced therapeutic effect, resulted in disturbance of tumor blood supply, and appeared as necrosis and apoptosis of tumor cells.

Key words: sensitizer, Photosense, photodynamic therapy, glioma C6, laser.

З. С. Смирнова¹, И. Ю. Кубасова¹, Л. М. Борисова¹, А. С. Халанский², Г. А. Меерович³,
А. Ю. Барышников¹, Е. А. Коган⁵, Е. А. Лукьянец⁴, Г. Н. Ворожцов⁴

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕЙ МОЗГА КРЫС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОТОСЕНСА

¹ ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

² НИИ Морфологии человека РАМН, Москва

³ ЦНИИ ИОФ им. А. М. Прохорова РАН, Москва

⁴ ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Москва

⁵ ММА им. И. М. Сеченова, Москва

РЕЗЮМЕ

Данная работа посвящена фотодинамической терапии (ФДТ) опухолей мозга крыс с использованием фотосенсибилизатора Фотосенс (ФС), являющегося смесью натриевых солей сульфированного фталоцианина алюминия. Эффективность ФДТ с использованием Фотосенса изучена на глиоме С6 крыс на 9-й день опыта. ФС вводили в дозе 3,5 мг/кг.

Лазерное облучение при плотности дозы 90 Дж проводили через 24 ч после введения Фотосенса, когда концентрация препарата в опухоли высока (интенсивность флуоресценции составляет 8 усл. ед.) и индекс селективности максимальный — 4,6. При изучении патоморфоза глиомы С6 показано, что терапевтическое действие ФДТ с использованием Фотосенса проявляется в виде нарушения кровотока в сосудистой системе опухоли, а также некроза и апоптоза опухолевых клеток.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, Фотосенс, фотодинамическая терапия, глиома С6, лазер.

ВВЕДЕНИЕ

Первичные злокачественные опухоли головного мозга составляют около 2–3 % всех новообразований у человека и занимают 3-е место среди наиболее частых причин смерти от рака в возрастной группе от 15 до 35 лет [3]. Но, несмотря на успехи в лечении злока-

чественных опухолей, прогноз остается неблагоприятным (средняя продолжительность жизни больных с мультиформной глиобластомой составляет 15 мес) [9]. Что касается инвазивных форм мультиформной глиобластомы и других глиальных опухолей, обнаружение и полное удаление опухолевой ткани крайне за-

труднено в связи с особенностями их локализации. В многочисленных доклинических и клинических исследованиях установлено, что фотодинамическая терапия (ФДТ) и флюоресцентная диагностика с использованием 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) улучшают отдаленные результаты лечения и увеличивают среднюю продолжительность жизни больных.

Лечение опухолей мозга комбинированное и включает в себя хирургическое вмешательство, лучевую и химиотерапию. Полное хирургическое удаление опухоли мозга возможно только при таких новообразованиях, как менингиома, опухоли эпифиза, у которых границы опухоли хорошо определимы. Несмотря на то, что край нормальной ткани можно иссекать во время удаления опухолей других локализаций, например печени, легкого и т. д., иссечение здоровой ткани мозга недопустимо в связи с тяжелыми неврологическими осложнениями.

Лучевая и химиотерапия применяются в основном для послеоперационного лечения. Ряд рандомизированных контролируемых исследований подтверждают положительный эффект послеоперационной лучевой терапии, однако средняя продолжительность жизни увеличивается при этом всего на 1–2 мес. [1, 10, 22, 23].

Химиотерапевтические препараты используются для лечения опухолей мозга, однако результаты их применения неутешительны. Это связано с трудностями доставки и избирательности действия лекарств. Так, при внутривенном введении лишь небольшая часть вещества попадает в опухолевую ткань [5].

Несостоятельность обычных методов лечения привела к поиску нового. Фотодинамическая терапия основана на совместном воздействии света, фотосенсибилизаторов и физиологически содержащегося в биологических тканях молекулярного кислорода, приводящих к цитотоксическому поражению неопластической ткани [4]. ФДТ оказывает многофакторное повреждающее действие на опухоль, включающее прямые механизмы разрушения опухолевых клеток через некроз и апоптоз, нарушение кровоснабжения опухоли из-за тромбоза и/или разрушения сосудов (вплоть до геморагий) и последующий ишемический некроз опухолевой ткани, а также вызывает воспалительную и иммунную реакции. Для лечения опухолей мозга были использованы порфирины, такие, как Гематопорфирин и Фотофрин [16, 18, 19].

Хотя селективные фотосенсибилизаторы изучались при всех степенях злокачественности глиомы, отношение распределения их в опухолевой и нормальной тканях мозга колеблется в широких пределах: от 2:1 [13] до 50:1 [17]. Прослеживается прямая зависимость накопления фотосенсибилизатора в опухолевой ткани от гистологического строения глиомы. При этом более высокозлокачественная глиома накапливает большее количество порфирина [6]. Механизм избирательности, вероятно, основан на явлении пассивной диффузии. Несмотря на то, что размер молекул Гематопорфирина и Фотофрина ограничивает их прохождение через интактный гематоэнцефалический барьер

(ГЭБ), значительные концентрации этих фотосенсибилизаторов тем не менее обнаруживаются в опухоли и в опухолевых клетках, расположенных рядом с первичным узлом [8, 24]. Вместе с тем остается открытым вопрос, можно ли достичь достаточной концентрации препарата в опухоли путем пассивной диффузии и смогут ли потом неопластические клетки, оставшиеся после ФДТ, привести к рецидиву опухоли.

Хотя многими клиническими исследованиями доказано увеличение продолжительности жизни пациентов при проведении ФДТ с Фотофрином [13, 15], к сожалению, у этого фотосенсибилизатора имеется ряд недостатков [11, 12, 21], которые ограничивают его применение. Главным из них является длительное удержание порфиринов в коже (4–6 нед), наблюдаемое после системного введения, а также неоптимальный спектр поглощения, неопределенный химический состав и недостаточная опухолетропность. В настоящее время для проведения ФДТ при глиомах оцениваются другие фотосенсибилизаторы, а именно АЛК [11, 12, 14] и ее эфиры [7, 20].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Оценивали ФДТ с использованием Фотосенса на глиоме С6 крыс Wistar. Эта модель опухоли головного мозга крыс наиболее часто используется для оценки эффективности различных методов лечения, включая химио-, радио-, иммуно- и фотодинамическую терапию. Глиома С6 была получена Benda, Schmidek и соавт. в Sweet's лаборатории у крыс Wistar путем повторного введения нитрозометилмочевины в течение 8 мес [2]. Затем эта опухоль была выделена и переведена в клеточную культуру. Опухоль по гистологическому строению классифицирована как астроцитомы, которая имеет сходство с глиомой человека.

Глиома С6 поддерживалась *in vitro* как клеточная культура. В экспериментах использовали крыс-самки породы Wistar с массой тела 200–220 г. Перевивка глиомы С6 осуществлялась интракраниально разным количеством опухолевых клеток. В черепе крысы, находящейся под нембуталовым наркозом, отступив 2 мм от сагиттального шва, в правой теменной кости черепа круглым зубо-врачебным бором (диаметр 2 мм) проделывали трепанационное отверстие. Опухолевые клетки в 10 мкл среды RPMI-1640 вводили в мозг на глубину 2–3 мм шприцем Hamilton с ограничителем на конце иглы.

Фотосенс, синтезированный в ФГУП «ГНЦ НИОПИК», использовали в виде раствора для инъекций — 50,0 мл 0,2%, партия № 04122001. Препарат вводили однократно в дозе 3,5 и 10 мг/кг.

Уровень накопления Фотосенса в нормальной ткани мозга и опухоли определяли спектрально-флюоресцентным методом по интенсивности флюоресценции (усл. ед.) препарата с использованием спектроанализатора ЛЭСА-01—«БИОСПЕК». Возбуждение флюоресценции осуществлялось He-Ne-лазером с длиной волны 632,8 нм. Уровень накопления Фотосенса оценивали через 10 дней после фиксации головного мозга с опухо-

лью в формалине. Селективность накопления Фотосенса рассчитывали как соотношение между значениями интенсивности флюоресценции препарата в опухоли и в здоровой ткани мозга (другом полушарии).

Для проведения ФДТ глиомы С6 Фотосенс вводили крысам в дозе 3,5 мг/кг на 9-й день опыта. Облучение проводили через 24 ч после введения препарата лазером ЛФТ-630/670-01-«БИОСПЕК» с длиной волны 675 нм через трепанационное отверстие. Мощность терапевтического излучения составляла 100 мВт, длительность облучения — 15 мин.

Эффективность ФДТ оценивали по патоморфозу глиомы С6 после проведенного лечения в сравнении с опухолями контрольных животных. Для патоморфологического исследования крысы были усыплены через 72 ч и через 7 дней после проведения ФДТ. Головной мозг с опухолью помещен в 10% нейтральный формалин. Через 10 дней фиксации мозга в формалине его разрезали параллельно стволу и перпендикулярно к лобной части мозга через видимую часть опухоли. Для макро- и микроскопической оценки опухоли ее вырезали вместе со здоровой тканью мозга, делали проводку, заливали в парафин и получали срезы толщиной 6–8 мкм по общепринятой методике. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по методу Фишера—Стьюдента. Разницу считали достоверной при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе исследования были изучены зависимость продолжительности жизни крыс с глиомой С6 от количества инокулированных интракраниально опухолевых клеток и темпы роста этой опухоли (табл. 1).

Таблица 1

Продолжительность жизни крыс Wistar с глиомой С6 в зависимости от количества инокулированных интракраниально опухолевых клеток

Количество клеток	Прививаемость, %	СПЖ*, дни
100·10 ³	100	28,8±2,4
200·10 ³	»	25,4±1,9
400·10 ³	»	18,5±1,4
600·10 ³	»	17,5±1,1

* СПЖ — средняя продолжительность жизни крыс

При перевивке от 100·10³ до 600·10³ опухолевых клеток продолжительность жизни крыс с глиомой С6 уменьшается с 29 до 18 дней при 100% прививаемости опухоли (см. табл. 1). Интракраниальная перевивка глиомы С6 опухолевыми клетками в количестве 200·10³ приводит к достаточно быстрому росту опухоли в течение первых 12 дней, при этом объем опухоли достигает 140 мм³ (рис. 1).

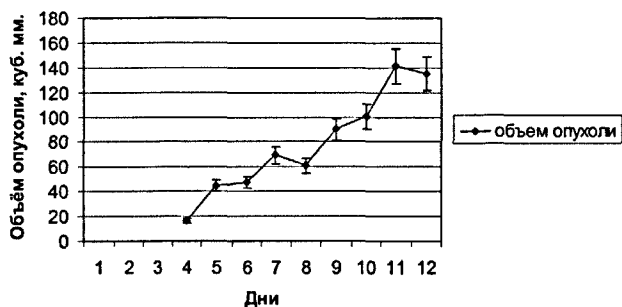


Рис. 1. Динамика изменения объема глиомы С6 в процессе ее роста при перевивке 200·10³ опухолевых клеток

На втором этапе исследований с целью оценки времени начала проведения ФДТ после введения Фотосенса изучали динамику его накопления (концентрации) в опухолевой и здоровой ткани головного мозга на 8-й день опыта. Исследование проводили после введения Фотосенса в дозе 3,5 и 10 мг/кг через 2, 4, 6, 12 и 24 ч (рис. 2 и 3). Было показано, что концентрация препарата в глиоме С6 достигает максимальных значений через 4 ч после внутривенного его введения в дозе 10 мг/кг (12,6 усл. ед.), а затем снижается в течение суток до 8,4 усл. ед. При введении Фотосенса в дозе 3,5 мг/кг интенсивность флюоресценции препарата в опухоли практически не меняется и составляет в среднем 8 усл. ед. В здоровой ткани головного мозга крыс концентрация препарата в первые часы после введения Фотосенса высокая и мало различается в зависимости от введенной дозы (см. рис. 3). Так, через 2 ч после введения Фотосенса в дозе 3,5 и 10 мг/кг интенсивность флюоресценции составляет в среднем 4,5 усл. ед., а далее она медленно снижается до 1,8 и 2,5 усл. ед. соответственно.

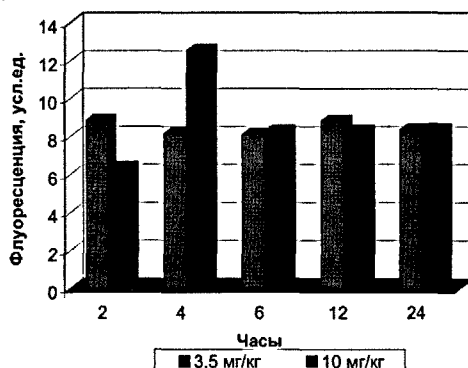


Рис. 2. Динамика интенсивности флюоресценции Фотосенса в опухоли С6 после его введения в дозе 3,5 и 10 мг/кг

При оценке селективности накопления Фотосенса в опухолевой ткани показано, что индекс селективности растет в течение суток в основном за счет выведения препарата из нормальной ткани головного мозга (рис. 4). При введении препарата в дозе 3,5 мг/кг индекс селективности увеличивается с 2 до 4,6, а после его введения в дозе 10 мг/кг — с 2,5 до 3,4.

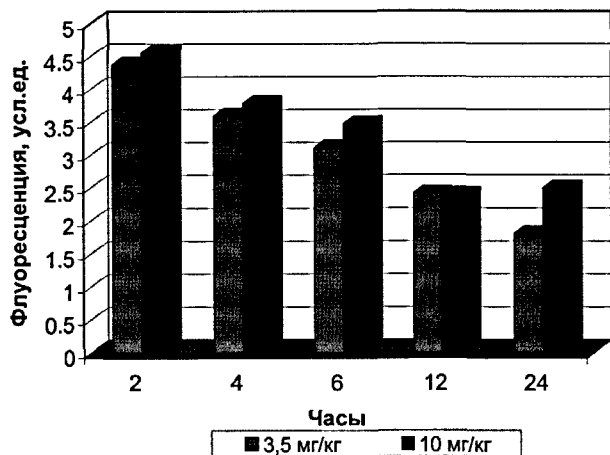


Рис. 3. Динамика интенсивности флюоресценции Фотосенса в здоровой ткани мозга после его введения в дозе 3,5 и 10 мг/кг

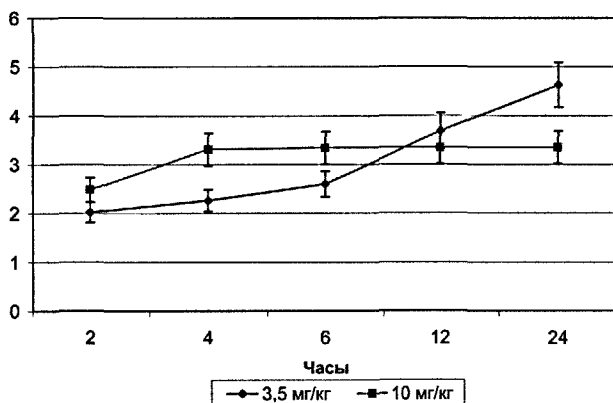


Рис. 4. Индекс селективности накопления Фотосенса в глиоме С6 после его введения в дозе 3,5 и 10 мг/кг

Таким образом, показано, что ФДТ глиомы С6 следует проводить через 24 ч после введения Фотосенса.

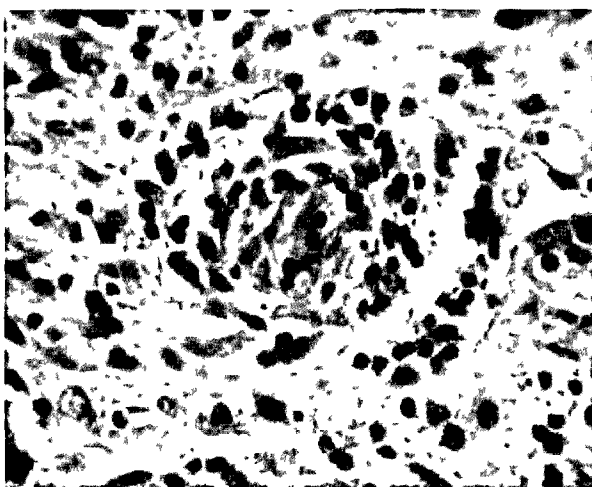
В первой серии экспериментов по изучению эффективности ФДТ глиомы С6 Фотосенс вводили в дозе 3,5 мг/кг на 9-й день, а лазерное облучение проводили на 10-й день после перевивки опухоли. Опухоли облучали He-Ne-лазером при плотности мощности 100 мВт в течение 15 мин. Патоморфоз глиомы С6 оценивали через 72 ч (13-й день опыта) и 7 дней (17-й день опыта) после проведения ФДТ.

Макро- и микроскопическая картина глиомы С6 у контрольных крыс на 13-й день опыта

Глиома С6 растет в субарахноидальном пространстве, прорастая поверхностные отделы коркового вещества, и четко отграничена от мозговой ткани. Опухоль построена из мелких клеток веретеновидной и округлой формы. Митозов в ткани опухоли не обнаруживается. Строма опухоли представлена тонкостенными сосудами капиллярного типа с пролиферацией эндотелия и перицитов (рис. 5, а). В опухоли выявляются очаги спонтанного коагуляционного некроза (в среднем до 10 %), окруженные валом радиально расположенных опухолевых клеток, а также единичные фигуры апоптоза. В прилежащей ткани мозга отмечаются выраженные явления отека, сосуды с явлениями продуктивного васкулита с лимфоидной инфильтрацией стенок (рис. 5, б).

Макро- и микроскопическая картина глиомы С6 у опытных крыс на 13-й день опыта

Опухоль растет в субарахноидальном пространстве, прорастая поверхностные отделы коркового вещества, и четко отграничена от мозговой ткани. Опухоль имеет обширные поля некроза, вокруг которых располагаются апоптозные тельца, а также очаги кровоизлияний, преимущественно в центральных отделах. Опухоль построена из клеток веретеновидной



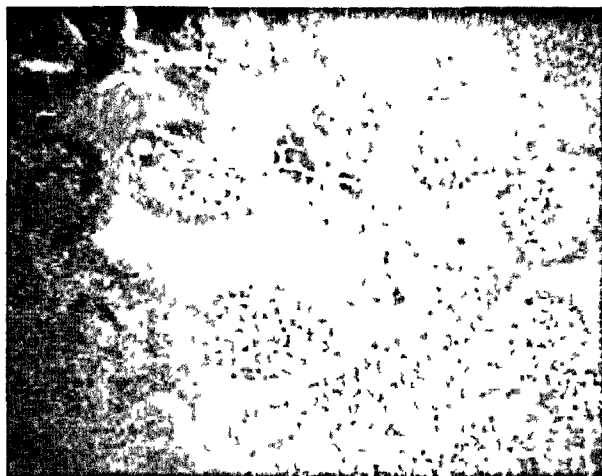
а



б

Рис. 5. Глиома С6. Контрольная группа. 13-й день опыта:

а — сосуды в опухоли с периваскулярными скоплениями опухолевых клеток. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 200$; б — выраженные явления отека в прилежащей к опухоли ткани мозга. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 100$



а



б

Рис. 6. Глиома С6. Опытная группа. 13-й день опыта (через 72 ч после ФДТ):

а — некроз и кровоизлияния в центре опухоли. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 100$, б — некроз и кровоизлияния под капсулой опухоли. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 200$

и округлой формы, митозы в ней не определяются. Содержит многочисленные тонкостенные сосуды капиллярного типа с разрушенной базальной мембраной, сладжированием эритроцитов, тромбозом и диапедозом эритроцитов, а также формированием более крупных кровоизлияний (рис. 6, а). Встречаются множественные псевдопалисады. Относительная площадь некроза суммарно составляет 55 % площади опухоли. В зоне инвазии опухоли в прилежащую ткань мозга видны обширные поля некроза, кровоизлияний и выраженные явления отека (рис. 6, б).

К 17-му дню опыта в опухолях контрольной группы в связи с прогрессией глиомы С6 увеличивается относительная зона некроза до 30 % и повышается выраженность апоптоза. В отличие от опухолей контрольной группы, к 17-му дню в глиомах опытной группы уменьшается зона некроза до 20 % и снижается выраженность апоптоза, вероятно, за счет усиления репаративных процессов.

ВЫВОДЫ

Оценку эффективности ФДТ с использованием Фотосенса проводили на глиоме С6 крыс Wistar. Эта модель опухоли головного мозга по гистологической структуре имеет близкое сходство с глиомой (астроцитомой) человека.

Для проведения ФДТ на глиоме С6 использован Фотосенс в дозе 3,5 мг/кг, после введения которого через 24 ч выявляется высокий уровень накопления препарата в опухоли — 8 усл. ед. и максимальный индекс селективности — 4,6.

При оценке патоморфоза глиомы С6 после ФДТ выявлено:

площадь некроза и выраженность апоптоза в относительных единицах выше в опухолях опытной группы. В опухолях контрольной группы спонтанный некроз нарастает к 17-му дню эксперимента в связи с прогрессией глиомы С6;

митозы в опухолях опытной группы не обнаруживаются;

разрушение сосудов с кровоизлияниями наблюдается только в опухолях опытной группы, и оно значительно больше через 72 ч после ФДТ;

в опухолях опытной группы выявлен тромбоз сосудов в результате деструктивного васкулита;

повреждения прилежащей к опухоли ткани мозга также более выражены в опытной группе.

Полученные экспериментальные данные по фотодинамической терапии опухолей головного мозга — глиомы С6 свидетельствуют о необходимости продолжения исследований по оптимизации дозы Фотосенса, условий проведения лечения и режима лазерного облучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Anderson A P. Postoperative irradiation for glioblastomas. Results of a randomized series // *Acta Radiol.* — 1978. — Vol. 17. — P. 474–484.
2. Barth R F. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: The 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas // *J. Neuro-Oncol.* — 1998. — Vol. 36. — P. 91–102.
3. Black P M. Brain tumors, part 1 // *N. Engl. J. Med.* — 1991. — Vol. 324. — P. 1471–1476.
4. Dougherty J, Gomer C J, Henderson B W. et al. Review: photodynamic therapy // *J. Natl. Cancer Inst.* — 1998. — Vol. 90. — P. 889–905.
5. Groothuis D R. The blood-brain and blood-tumor barriers: a review of strategies for increasing drug delivery // *Neurooncology.* — 2000. — Vol. 2. — P. 45–59.
6. Hill J S, Kaye A H, Sawyer W. H. et al. Selective uptake of hematoporphyrin derivative into human cerebral

glioma // Neurosurgery. — 1990. — Vol. 26. — P. 248–254.

7. Hill J. S., Kahl S. B., Kaye A. H. et al. Selective tumor uptake of a boronated porphyrin in an animal model of cerebral glioma // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1992. — Vol. 89. — P. 1785–1789.

8. Kaye A., Morstyn G., Ashcroft R. G. Uptake and retention of hematoporphyrin derivative in an *in vivo/in vitro* model of cerebral glioma // Neurosurgery. — 1985. — Vol. 17 — P. 883–890.

9. Kostron H., Obwegeser A., Jakober R. Photodynamic therapy in neurosurgery // J. Photochem. Photobiol. — 1996. — Vol. 36. — P. 157–168.

10. Kristiansen K., Hagen S., Kollevold T. et al. Combined modality therapy of operated astrocytomas grade III and IV. Confirmation of the value of post-operative irradiation and lack of potentiation of bleomycin on survival time // Cancer. — 1981. — Vol. 47. — P. 649–652.

11. Lilge L., Olivo M. C., Schatz S. W. et al. The sensitivity of normal brain and intracranially implanted VX2 tumour to interstitial photodynamic therapy // Br. J. Cancer. — 1996. — Vol. 73. — P. 332–343.

12. Lilge L., Wilson B. C. Photodynamic therapy of intracranial tissues: a preclinical comparative study of four different photosensitizers // J. Clin. Laser. Med. Surg. — 1998. — Vol. 16. — P. 81–92.

13. Little F. M., Gomer C. J., Hyman S. et al. Observations in studies of quantitative kinetics of tritium-labelled hematoporphyrin derivatives (HpDI and HpDII) in the normal and neoplastic rat brain model // J. Neurooncol. — 1984. — Vol. 2. — P. 361–370.

14. Madsen S. J., Sun C. H., Tromberg B. J. et al. Photodynamic therapy of human glioma spheroids using 5-aminolevulinic acid // Photochem. Photobiol. — 2000. — Vol. 72. — P. 128–134.

15. Muller P. J., Wilson B. C. Photodynamic therapy of malignant primary brain tumors: clinical effects, post-

operative ICP, and light penetration of the brain // Photochem. Photobiol. — 1987. — Vol. 46. — P. 929–935.

16. Muller P. J., Wilson B. C. Photodynamic therapy for recurrent supratentorial gliomas // Semin. Surg. Oncol. — 1995. — Vol. 11. — P. 346–354.

17. Muller P. J., Wilson B. C. Photodynamic therapy for malignant newly diagnosed supratentorial gliomas // J. Clin. Lasers Med. Surg. — 1996. — Vol. 14. — P. 263–270.

18. Popovic E. A., Kaye A. H., Hill J. S. Photodynamic therapy of brain tumor // J. Clin. Laser. Med. Surg. — 1996. — Vol. 14. — P. 251–261.

19. Sandeman D. R. Photodynamic therapy in the management of malignant gliomas: a review // Lasers Med. Sci. — 1986. — Vol. 1. — P. 163–174.

20. Schmidt M. H., Reichert K. W., Ozker K. et al. Preclinical evaluation of enzoporphyrin derivative combined with a lightemitting diode array for photodynamic therapy of brain tumors // Pediatr. Neurosurg. — 1999. — Vol. 30. — P. 225–231.

21. Stummer W. S., Stocker A., Novotny A. et al. In vitro and in vivo porphyrin accumulation by C6 glioma cells after exposure to 5-aminolevulinic acid // J. Photochem. Photobiol. — 1998. — Vol. 45. — P. 160–169.

22. Walker M. D., Alexander E. Jr., Hunt W. E. et al. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas // J. Neurosurg. — 1978. — Vol. 49. — P. 333–343.

23. Walker M. D., Green S. B., Byar D. P. et al. Randomized comparison of radiotherapy and nitrosureas for treatment of malignant glioma after surgery // N. Engl. J. Med. — 1980. — Vol. 303. — P. 1323–1329.

24. Ji Y., Walstad D. L., Brown J. T., Powers S. K. Relation between porphyrin distribution and blood brain barrier changes in the rat glioma model // Lasers Surg. Med. — 1992. — Vol. 12. — P. 174–179.