ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 616-006.3.04-092.4:615.831.035

<u>Д.А. Церковский</u>, Е.Н. Александрова, В.Н. Чалов, Ю.П. Истомин СОНО-ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ С ФОТОЛОНОМ САРКОМЫ М-1 КРЫС Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, п. Лесной, Минская область, Республика Беларусь

Контактная информация

Истомин Юрий Петрович, доктор медицинских наук, заведующий отделом комплексной терапии с экспериментальной группой и группой химиотерапии адрес: 223040, п. Лесной, Республика Беларусь, тел. +(37517)265-35-31. e-mail: tzerkovsky@mail.ru

Статья поступила 30.09.2012, принята к печати 31.10.2012.

Резюме

Основной целью данного исследования было изучение противоопухолевой эффективности комбинированного использования низкоинтенсивного ультразвукового излучения и фотодинамической терапии с Фотолоном в лечении экспериментальной опухоли крыс саркома М-1. Показано, что совместное фотооблучение опухоли в экспозиционной дозе 100 Дж/см² и воздействие ультразвуком с интенсивностью 0,7 Вт/см² и частотой 880 кГц позволяет добиться 100 % некроза опухолевой ткани и существенно увеличить глубину ее повреждения.

Ключевые слова: соно-фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, Фотолон, саркома М-1.

<u>D.A. Tzerkovsky</u>, E.N. Alexandrova, V.N. Chalau, Y.P. Istomin **SONOPHOTODYNAMIC THERAPY FOR SARCOMA M-1 IN RATS** N.N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus

Abstract

Objective of this study was to investigate the combination of low-intensity sonication and photodynamic therapy with Photolon for the ablation of experimental sarcoma M-1 tumor in rats. Maximal antitumour effect (100 %) was achieved after Photolon-mediated photodynamic therapy with total exposed light 100 J/cm² and sonodynamic therapy at ultrasound intensity 0,7 W/cm² andfrequency of 0,88 MHz.

Key words: sonophotodynamic therapy, photosensitizer, Photolon, sarcoma M-1.

Введение

Недостаточная эффективность используемых методов терапии злокачественных новообразований обусловливает необходимость поиска новых путей решения этой проблемы. Одним из них, показавшим свою перспективность в последние годы, является ФДТ, основанная на использовании эффекта селективной лазерной фотодеструкции предварительно сенсибилизированной опухолевой ткани. Основной мишенью для фотодинамического воздействия являются эндотелиоциты кровеносных сосудов и система макрофагальных клеток, фотооблучение которых приводит к выработке медиаторов воспаления и цитокинов (лимфокины, тромбоксаны, простогландины и др.), играющих весомую роль в сосудистом компоненте деструкции стромы опухоли [1; 4]. Действие ФДТ включает прямое цитотоксическое действие на опухоль, приводящее к некрозу и апоптозу опухолевой клетки, повреждение микрососудистого русла опухоли вследствие развивающегося сосудистого стаза, тромбоза и кровоизлияний, приводящих к ее гипоксии и последующей гибели [7]. На современном этапе ФДТ используется для радикального лечения предраковых состояний и злокачественных опухолей на начальных стадиях, в частности, при раке кожи (особенно локализованном на лице, ушных раковинах), раке пищевода, мочевого пузыря, молочной же-

лезы, легкого, эзофагите Баррета, дисплазиях шейки матки, опухолях головного мозга. Основным ограничением существующего метода ФДТ является относительно небольшая глубина проникновения лазерного излучения и повреждения опухолей. Так, для гематопорфирина, фотофрина I и II она составляет 2-3 мм [12], порфиценов – 1–3 мм [15], эфиров 5-амино-левулиновой кислоты – 1–2 мм [17], талапорфина – 5– 7 мм [10], фотосенса – 6-8 мм [16], бензохлоринов – 9-11 мм [11]. Применение таких фотосенсибилизаторов (ФС), как фталоцианин цинка, тексафиринов (antrin, lutrin), тукада (производное бактериохлорофилла а), фоскана позволяет увеличить глубину повреждения до 12–16 мм [5; 8; 13]. Вместе с тем, использование данных ФС связано с длительным периодом накопления и выведения из организма, кожной фототоксичностью, недостаточной избирательностью накопления в опухолевой ткани, высоким риском возникновения выраженного болевого синдрома и высокой стоимостью. В последние годы отмечается повышенный интерес к использованию ультразвука в лечении злокачественных новообразований. Ряд авторов показали, что при локальном ультразвуковом воздействии частотой 0,5-3,0 МГц и интенсивностью 0,5-5,0 Вт/см² потенцируется цитотоксичность многих химиопрепаратов и фотосенсибилизаторов, что связывают с увеличением проницаемости клеточных мембран [6; 14; 20]. Вещества, приобретающие кан-

№ 4/том 11/2012

РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

29

30 ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

СОНО-ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ...

цероцидные свойства под влиянием ультразвука, называют соносенсибилизаторами [2], а это направление в онкологии – сонодинамической терапией (СДТ). Эффективность СДТ подтверждена данными ряда экспериментальных исследований, одновременно изучаются возможности усиления противоопухолевой эффективности ФДТ при ее комбинированном использовании с СДТ [3; 18; 19]. О значительном увеличении медианы жизни 115 больных Ш–IV стадиями РШМ, рака мочевого пузыря, РМЖ, рака пищевода, РПЖ, леченных методом соно-ФДТ, сообщили J.N. Kenyon et al. [9].

Цель исследования – изучить в эксперименте на животных с перевивной опухолью саркомой М-1 возможности повышения противоопухолевого эффекта фотодинамической терапии с ФС Фотолон сонодинамическим воздействием.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования проведены на 55 белых беспородных крысах, массой 170±20 г, разведения вивария РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова.

Показатели площали и раубищи цекрозов в саркоме М.1

Животные были распределены на 11 групп по 5 особей в каждой (см. табл.).

В качестве экспериментальной опухолевой модели использовали штамм саркомы М-1 (Са М-1), полученный из Банка опухолевых штаммов ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН.

Опухоли перевивали подкожно в левую паховую область путем введения 0,5 мл 20%-ной опухолевой суспензии в растворе Хенкса.

Исследования проводили через 11–13 суток после перевивки, когда диаметр опухолей достигал 1,5–2,0 см.

Фотосенсибилизатор Фотолон (РУП «Белмедпрепараты», Минск, Республика Беларусь) вводили внутривенно, однократно, в дозе 2,5 мг/кг.

Перед началом воздействий крыс вводили в состояние нейролептанальгезии (0,25 %-ный раствор дроперидола и 0,005 %-ный раствор фентанила в соотношении 2:1 по 0,3 мл на 100 г массы животного, внутримышечно).

Шерстяной покров в зоне роста опухолевого очага депилировали и для уменьшения светорассеяния кожу смазывали вазелиновым маслом.

Таблица

| показатели площади и глубины некрозов в саркоме то-т | | | | | |
|--|---|----------------------------------|----------------------------|----------------|----------------------|
| № | Воздействие | Площадь опухоли, см ² | Площадн см ² | ынекрозов % | Глубина некрозов, мм |
| 1 | Интактный контроль | 2,39±0,17 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | V30,4 BT/cm ² | 3,43±0,13 | 1,09±0,06 | 31,71±2,39 | 6,63±1,12 |
| 3 | $V30,7 BT/cm^{2}$ | 4,13±0,16 | $1,44\pm0,11$ | 34,92±3,11 | 9,46±1,61 |
| 4 | УЗ 1,0 Вт/см ² | 3,16±0,11 | 1,25±0,09 | 39,61±2,97 | 9,87±1,52 |
| 5 | Φ отолон + УЗ 0,4 Вт/см ² | 3,16±0,21 | 1,71±0,17 | 54,16±4,17 | 10,02±1,38 |
| 6 | Φ отолон + УЗ 0,7 Bт/см ² | 3,54±0,19 | 2,47±0,13 | 67,96±3,99 | 12,98±0,97 |
| 7 | Φ отолон + УЗ 1,0 Bт/см ² | 4,26±0,22 | 3,16±0,17 | 74,25±4,73 | 14,96±2,14 |
| 8 | Фотолон + УЗ 0,4 Вт/см ² + фотооблучение 50 Дж/см ² | 3,56±0,23 | 2,3±0,22 | 64,55±8,46 | 13,87±2,11 |
| 9 | Фотолон + УЗ 0,7 Вт/см ² + фотооблучение 50 Дж/см ² | 3,00±0,14 | 2,57±0,18 | 85,64±5,33 | 17,29±2,01 |
| 10 | Фотолон + УЗ 1,0 Вт/см ² + фотооблучение 50 Дж/см ² | 4,11±0,25 | 3,27±0,19 | 79,56±7,77 | 16,55±3,12 |
| 11 | Фотолон + УЗ 0,7 Вт/см ² + фотооблучение 100 Дж/см ² | 3,73±0,16 | 3,73±0 | 100 | 19,15±1,88 |
| n < 0.05 | | | | | |

Источником лазерного излучения служил полупроводниковый лазерный аппарат «IMAF AXICON» (УП «Аксикон», Республика Беларусь) с длиной волны излучения 661 нм.

Для ультразвукового воздействия использовали аппарат «УЗТ 1.04–У» («Эмма», Россия) с частотой излучения 880 кГц и максимальной интенсивностью 1,0 Вт/см². Сеансы ФДТ, СДТ и комбинированную терапию осуществляли через 2,5 часа после введения ФС.

Эффективность воздействий оценивали по площади и глубине некрозов в опухолевой ткани путем прижизненного окрашивания.

Для этого через 24 часа после проведенного лечения крысам вводили внутривенно 0,6%-ный раствор синьки Эванса из расчета 1 мл на 100 г массы тела. Через 2 часа животных умерщвляли хлороформом, опухоль иссекали и фиксировали в течение одного часа в 10%-ном формалине.

После фиксации делали поперечные срезы опухолевого узла по наибольшему диаметру и регистрировали фотокамерой, сопряженной с компьютером. Результаты экспериментов были обработаны в программах ImageJ (NIH, Bethesda, USA),

№ 4/том 11/2012

OriginPro 7.0 с определением средних значений и ошибки средней. Статистически значимыми считали различия при p<0,05.

Результаты и обсуждение

Действие только ультразвука (УЗ) с частотой 880 кГц и интенсивностью излучения 0,4; 0,7 и 1,0 Вт/см² оказывало незначительное противоопухолевое действие на Са М-1 крыс – процент площадей некрозов в опухоли спустя сутки составил 31,71±2,39 %; 34,92±3,11 % и 39,61±2,97 %, соответственно, а максимальная глубина повреждения опухоли при воздействии 1,0 Вт/см² в течение 10 минут – 9,87±1,52 мм (рис. 1; см. вклейку и табл.).

Сонодинамическое воздействие в виде озвучивания Са М-1 крыс интенсивностью 0,4; 0,7 и 1,0 Вт/см² в течение 10 минут спустя 2,5 ч после внутривенного введения Фотолона существенно увеличивало площадь некрозов в гистотопографических срезах опухолей до 54,16±4,17 %, 67,96±3,99 % и 74,25±4,73 % и глубину повреждения до 14,96±2,14 мм (рис. 2 и таблица). Соно-фотодинамическое воздействие, включающее в себя озвучивание Са М-1

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

крыс с интенсивностью ультразвуковых колебаний 0,4; 0,7 и 1,0 Вт/см² спустя 10 мин после введения Фотолона с последующим через 2,5 часа фотооблучением в экспозиционных дозах 50 (рис. 3) и 100 Дж/см² (рис. 4) приводило к увеличению площадей некрозов в опухоли по сравнению УЗ и СДТ, а также значительному увеличению глубины проникновения лазерного излучения.

Из результатов, представленных в таблице видно, что при использовании комбинированной терапии опухоли (ФДТ 50 Дж/см² + СДТ 0,4; 0,7 и 1,0 Вт/см²) отмечается повышение противоопухолевой эффективности лечения, что выражается в увеличении площади развившихся некрозов и глубине проникновения лазерного излучения по сравнению с УЗ, СДТ и ФДТ в монорежимах.

Литература

Максимальная противоопухолевая эффективность достигалась при увеличении экспозиционной дозы света до 100 Дж/см² при использовании УЗ колебаний средней интенсивности (0,7 Bт/см²).

Выводы

Предложенный метод комбинированной сонодинамической и ФДТ саркомы М-1 крыс продемонстрировал высокую противоопухолевую эффективность при внутривенном введении Фотолона в дозе 2,5 мг/кг с последующим воздействием УЗ с частотой 880 кГц и интенсивностью 0,7 Вт/см² и фотооблучением в экспозиционной световой дозе 50 (площадь некрозов – 85,64 %) и 100 Дж/см² (площадь некрозов – 100 %).

- Гельфонд М.Л. Возможности фотодинамической терапии в онкологической практике // Физическая 1 Медицина. – 2005. – Т.15., № 2. – С. 33–7. Николаев А.Л., Раевский П.М. Сонодинамическая терапия злокачественных опухолей // Рос. хим.
- 2. журн. - 1998. - Вып. 5. - С. 105-10.
- Bakhshixadeh M., Sazgarnia A., Rajabi O. et al. Effects of combined sonodynamic and photodynamic 3. therapies on a colon carcinoma tumor model // Iranian J. Basic Med. Sci. - 2011. - 14(3). - P. 205-12.
- Chen B. Vascular and Cellular targeting for PDT // Crit. Rev. Eukaryot. Gene Exp. 2006. 16(4). P. 4 279-305
- 5 Chen Z., Zhou S., Chen J. et al. Pentalysine beta-carbonylphthalocyanine zinc: an effective tumor-targeting photosensitizer for photodynamic therapy // Chem. Med. Chem. – 2010. – 5(6). – P. 890–8.
- El Maalouf J., Bera J.C., Alberti L. In vitro sonodynamic cytotoxicity in regulated cavitation conditions // 6. Ultrasonics. -- 2009. - 49. - P. 238-43.
- Fingar V.H. Vascular effects of photodynamic therapy // J. Clin. Laser Med. Surg. 1996. 14(5). P. 7. 323 - 8
- Garrier J., Bressenot A., Gräfe S. et al. Compartmental targeting for mTHPC-based in vivo: correlation of 8. efficiency, pharmacokinetics and regional distribution of apoptosis // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. – 2010. – 78(2). – P. 563–71.
- 9 Kenyon J.N., Fulle R.J., Lewis T.J. et al. Activated cancer therapy using light and ultrasound – a case series of sonophotodynamic therapy in 115 patients over a 4 year period // Current Drug Therapy – 2009. – 4. – P. 179-93
- Kessel D. Talaporfin: LS 11, LS11, ME 2906, Mono-L-Aspartyl Chlorin e6, NP e6, NPE 6, Taporfin So-dium // Drugs in R&D. 2003. 4(1). P. 69–71.
- Morgan A.R. Metallopurpurins and light: effect on transplantable rat bladder tumors and murine skin // 11 Photochem. Photobiol. - 1990. - 51. - P. 589-92.
- 12. O'Connor A.E., Gallagher W.M., Byrne A.T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy // Photochem. Photobiol. 2009. 85(5). P. 1053-74.
- 13. Savary J.F., Monnier P., Fontolliet C. Photodynamic therapy for early squamous cell carcinomas of the esophagus, bronchi and mouth with m-tetra (hydroxyphenyl) chlorine // Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. - 1997. - 123. - P. 162-8.
- 14. Song W., Cui H., Zhang R. et al. Apoptosis of SAS cells induced by sonodynamic therapy using 5aminolevulinic acid sonosensitizer // Anticancer Res. - 2011. - 31(1). - P. 39-45.
- 15. Stockert J.C., Cañete M., Juarranz A. et al. Porphycenes: facts and prospects in photodynamic therapy of cancer // Curr. Med. Chem. - 2007. - 14(9). - P. 997-1026.
- 16. Stranadko E.F. Photodynamic therapy of cancer: five year clinical experience // Proc. SPIE. 1997. 3191. P. 253-62
- 17. Surrenti T., De Angelis L., Di Cesare A. Efficacy of photodynamic therapy with methyl aminolevulinate in the treatment of superficial and nodular basal cell carcinoma: an open-label trial // Eur. J. Dermatol. - 2007. - 17(5). – P. 412–5.
- 18. Wang X., Lewis TJ., Mitchell D. et al. The tumoricidal effect on sonodynamic therapy (SDT) on S-180 sarcoma in mice // Integr. Cancer Ther. - 2008. - 7(2). - P. 96-102.
- 19. Wang X., Wang Y., Wang P. et al. Sonodynamically induced antitumor effect with protoporfirin IX on hepatoma-22 solid tumor // Ultrasonics – 2011. – 51(5). – P. 536–46.
- 20. Yumita N., Han O.S., Kitazumi I. et al. Sonodynamically induced cell damage and membrane lipid peroxidation by novel porphyrin derivate DCPH-P-Na(I) // Anticancer Res. - 2008. -30(6). - P. 2241-6.

31

Рисунки к статье Д.А. Церковского и соавт. СОНО-ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ С ФОТЛОНОМ САРКОМЫ М-1 КРЫС



Рис. 1. Гистотопографические срезы Са М-1 крыс после воздействия ультразвуком с частотой 880 кГц, интенсивностью:

- А. 0,4; Б. 0,7
- B. $1,0 \text{ BT/cm}^2$ в течение 10 минут.



Рис. 2. Гистотопографические срезы Са М-1 крыс после СДТ с Фотолоном (интенсивность ультразвука):

- A. 0,4 (A);
- Б. 0,7;
- B. $1,0 \text{ Bt/cm}^2$.



Рис. 3. Гистотопографические срезы Са М-1 крыс после соно-ФДТ:УЗ 0,4 (А); 0,7 (Б) и 1,0 Вт/см² (В)+ фотооблучение в экспозиционной дозе 50 Дж/см²



Рис. 4. Гистотопографические срезы Са М-1 крыс после соно- Φ ДТ УЗ: 0,7 Вт/см² + фотооблучение в экспозиционной дозе 100 Дж/см².