

УДК 616-006.484:577.61.344.3

*Т. С. Завадська, О. Є. Кузів, І. О. Штонь

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
імені Р. Є. Кавецького НАН України

Тернопільський національний технічний університет імені І. Пулюя

ВПЛИВ ФОТОДИНАМІЧНОЇ МОДИФІКАЦІЇ КРОВІ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ГЛІОМИ ЩУРІВ

ВПЛИВ ФОТОДИНАМІЧНОЇ МОДИФІКАЦІЇ КРОВІ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ГЛІОМИ ЩУРІВ – У роботі представлено результати вивчення ефективності багаторазової фотодинамічної модифікації крові щурів (ФМК) при лікуванні гліоми 101-8 за критерієм збільшення тривалості життя експериментальних тварин та патоморфозу пухлини. Отримані дані дозволяють рекомендувати багаторазову ФМК для клінічного випробування за комбінованої терапії гліом.

ВПЛИВНИЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ КРОВИ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ГЛИОМЫ КРЫС – В работе представлены результаты изучения эффективности многократной фотодинамической модификации крови (ФМК) глиом 101-8 крыс по критерию увеличения продолжительности жизни опытных животных и особенностей патоморфоза опухоли. Полученные данные позволяют рекомендовать многократную ФМК для клинического испытания в комбинированном лечении глиом.

THE EFFECT OF FOTODYNAMIC BLOOD MODIFICATION ON EXPERIMENTAL RAT GLIOMAS – The research presents results of effectiveness of multiple photodynamic rat blood modification (PBM) during the glioma therapy by the criterion of increased life expectancy and experimental animals pathomorphosis tumor. These data allow us to recommend multiple PBM for clinical trials of complex glioma therapy.

Ключові слова: фотодинамічна модифікація крові, фотолон, гліома щурів 101-8, патоморфологічне дослідження.

Ключевые слова: фотодинамическая модификация крови, фотолон, глиома крыс 101-8, патоморфологическое исследование.

Key words: photodynamic blood modification, photolon, rats glioma 101-8, pathomorphological research.

ВСТУП Первинні злоякісні пухлини головного мозку складають до 2 % від усіх новоутворень людини і мають здатність до швидкої проліферації, ангіогенезу та інвазивного росту. Серед них гліоми складають близько 77 % первинних злоякісних пухлин мозку [7]. На сьогодні лікування гліом є комбінованим і включає в себе хірургічне видалення пухлини, променеви, хіміотерапію та імунотерапію. Основним обмеженням нейрохірургічного втручання є погана візуалізація меж пухлини та особливості її локалізації, а тому радикальна резекція пухлини у більшості випадків є неможливою, в результаті чого мультиформні гліобластоми (гліоми IV ступеня злоякісності – класифікація ВООЗ) рецидивують у 100 % випадків [8]. Незважаючи на сучасні досягнення нейроонкології, прогноз для хворих із злоякісними пухлинами мозку залишається вкрай несприятливим.

Недостатня ефективність традиційних способів лікування гліом мозку спонукала до пошуку принципово нових методів терапії. В останнє десятиліття активно розвивається такий напрямок біотерапії як фотодинамічна терапія (ФДТ) [5].

У низці експериментів *in vitro* та *in vivo*, а також у клінічних дослідженнях була підтверджена ефек-

тивність ФДТ пухлин головного мозку з використанням в якості фотосенсибілізатора "Фотолон" (Белмедпрепарати, Білорусь) [4, 7].

У науковій літературі з'явилися дані про ефективний вплив лазерного опромінення крові з внутрішньосудинним введенням фотосенсибілізатора, що дістало назву фотомодифікація крові, яка сенсibiliзована (ФМК), проте механізм її дії мало вивчений [2]. Кров – неоднорідна система, а тому молекули її формених елементів і плазми поглинають фотони з різною довжиною хвиль. Провідними мішенями оптичного випромінювання є амінокислоти, білки, ліпіди, полісахариди плазми та цитолем формених елементів, гемоглобін. ФМК викликає зміни у нервовій та ендокринній системах організму.

ФДТ має низку переваг перед променевою та хіміотерапією за комбінованого лікування пухлин головного мозку. По-перше, це локальна форма терапії з низькою системною токсичністю. По-друге, до сьогодні відсутні дані щодо розвитку стійкості пухлин до повторного використання ФДТ, що дає можливість добитись оптимального терапевтичного ефекту за багаторазового тривалого опромінення інфільтруючих пухлинних клітин, які не були забрані під час резекції.

Метою роботи було оцінити ефективність багаторазової фотомодифікації крові, сенсibiliзованої фотолоном при лікуванні гліоми 101-8 щурів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Дослідження проведено на 36 статевозрілих нелінійних щурах-самках масою 100–150 г. Усі маніпуляції на тваринах проводились відповідно до вимог Етичного комітету, розроблених на основі Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації.

В експерименті використано методику перещеплення гліом 101-8 у мозок щурів, яка за своїми гістобіологічними властивостями близька до злоякісних гліом людини. У гліомі одночасно малігнізація зазнає астроцитарна, олігодендроглія та епендимна глії в різних співвідношеннях. Перещеплення гліоми 101-8 проводили під комбінованим знеболюванням каліпсоветом (кетаміном) внутрішньоперитонеально із розрахунку 50 мг/кг маси тіла тварини у комбінації з ефірним інгаляційним наркозом. Отриману *post mortem*-суспензію клітин гліоми 101-8 вводили з розрахунку 600 тис. клітин/тварину на глибину 4–5 мм внутрішньочерепно в тім'яну частку лівої півкулі головного мозку.

З шостої доби експериментальним тваринам з перещепленою гліомою 101-8 проводили триразову ФМК з інтервалами 2 доби між сеансами. Фотолон із розрахунку 2 мг/кг маси тіла щура вводили внутрішньовенно безпосередньо перед опроміненням крові. Світловод, розміщений в ін'єкційній голці, вводили підшкірно в основу хвоста, паралельно хвостовій вені. Запропонована методика опромінення крові

виключає можливість перекриття світловодом кровоплину по хвостовій вені, а ослаблення інтенсивності світлової енергії вважається несуттєвим через оптичну прозорість стінки вени, зумовленої відсутністю в ній м'язових та еластичних волокон. Вихідна потужність лазерного світла на торці світловода становить 25 мВт, експозиція – 10 хв, щільність дози опромінення – 15 Дж/см². Джерелом випромінювання був апарат "Ліка-Терапевт" (довжина хвилі 658 нм).

Першу дослідну групу (15 тварин) оцінювали за критерієм середньої тривалості життя.

Тварин другої дослідної групи (15 тварин) забивали через добу після третього опромінення, тобто на 14 добу після щеплення.

Контрольні підгрупи у кожному досліді склали 10 нелікованих тварин із перещепленою гліомою 101-8.

Патоморфологічне дослідження проводили за стандартною методикою. В якості барвників використовували гематоксилін та еозин.

Критеріями протипухлинного ефекту ФМК слугували збільшення тривалості життя експериментальних тварин проти контрольних і патоморфологічні дослідження.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

ЗА ПАТОМОРФОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ у контрольних щурів на 14 добу дослідження виявлено, що пухлина росте в глибину мозкової тканини, побудована з низькодиференційованих атипичних клітин із гіперхромними ядрами, великою кількістю мітозів, чисельними тонкостінними судинами капілярного типу. Наявні множинні вогнища спонтанного коагуляційного некрозу, з облямовкою радіально розміщених пухлинних клітин. Має місце інвазія атипичних клітин у суміжну тканину мозку, в якій спостерігається виражений набряк (рис. 1).

У контрольній групі тварин з перещепленою гліомою 101-8 поряд із зростанням мітозів має місце стаз і крововиливи, периваскулярний та перичелюлярний набряк у прилеглий тканині головного мозку (рис. 2), нейтрофільно-лейкоцитарна інфільтрація, проліферація гліальних елементів, ендотеліоцитів і фібропластичних елементів оболонки, тромбоз судин, крововиливи і продуктивні васкуліти.

Гістологічна картина гліоми 101-8 у дослідній групі тварин значно змінюється через добу після завершення ФМК (на 14 добу після перещеплення пухлини).

Необхідно зазначити, що мітози в тканині гліоми практично не виявляються, що приводить до різкого зменшення об'єму пухлини (в десятки разів). Ріст пухлини, яка збереглася, відбувається по оболонці мозку (рис. 3).

Як видно із даних, представлених на рисунку 4, у дослідній групі тварин з гліомою 101-8 під впливом багаторазової фотомодифікації крові з фотолоном встановлено достовірне зростання середньої тривалості їх життя без терапевтичних впливів на 90 % порівняно з контрольною групою щурів.

Аналогічні дані щодо продовження тривалості життя дослідних тварин з гліобластомою 101-8 після ФДТ з Тіосеном отримала і К. В. Єрмакова [3], проте цей результат було досягнуто за прямого опромінення мозку тварин, що було відсутнє у нашому експерименті.



Рис. 1. Гліома 101-8, 14 доба. Низькодиференційовані атипичні клітини з гіперхромними ядрами, чисельні мітози. Вогнища некрозу й апоптозу, крововиливи, периваскулярний набряк. Гематоксилін та еозин. $\times 100$.

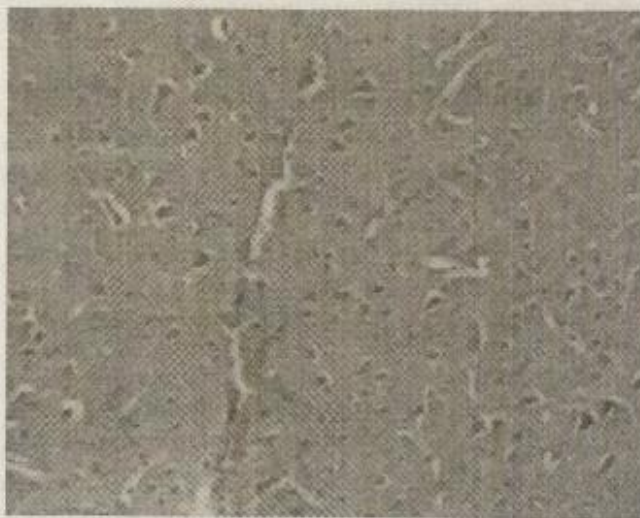


Рис. 2. Гліома 101-8, 14 доба. Периваскулярний і перичелюлярний набряк у прилеглий тканині головного мозку. Гематоксилін та еозин. $\times 100$.

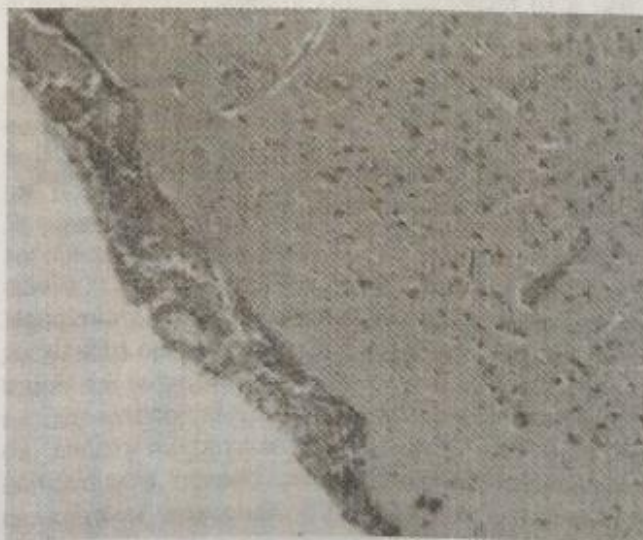


Рис. 3. Гліома 101-8 після ФМК. 14 доба. Вузька смужка клітин гліоми, яка локалізується впритул до прилеглої тканини мозку, явища периваскулярного і перичелюлярного набряку. Гематоксилін та еозин. $\times 100$.

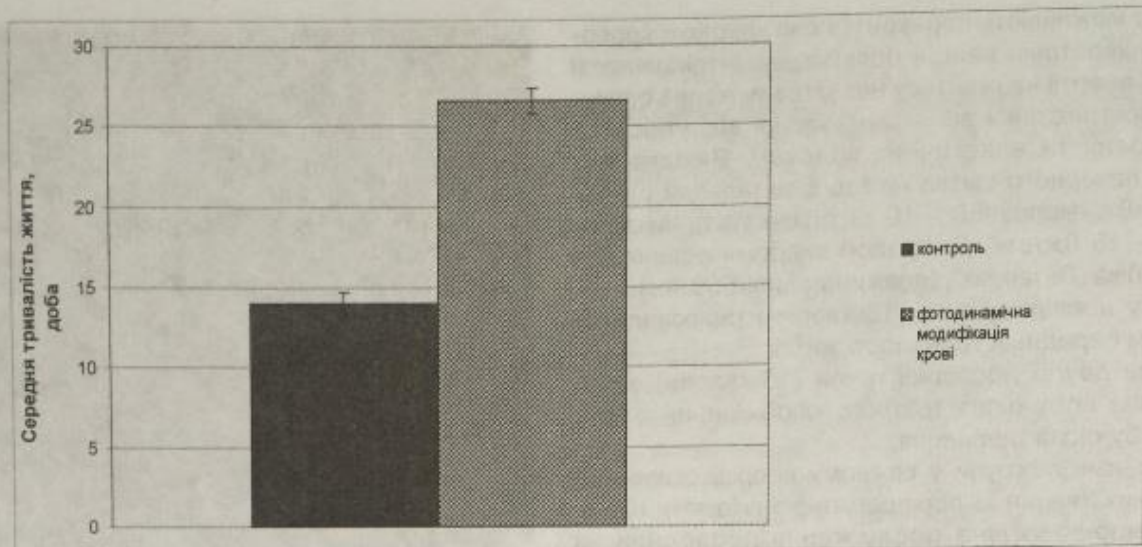


Рис. 4. Середня тривалість життя щурів з гліомою 101-8 за багаторазової фотодинамічної модифікації крові.

Вперше проведені нами патоморфологічні дослідження впливу багаторазової фотодинамічної модифікації крові у щурів з гліомою 101-8 довели пряму її протипухлинну дію. На нашу думку, ФМК має як місцеву, так і системну дію на організм тварин. Місцева дія на гліобластому 101-8 реалізується шляхом ініціації апоптозу, оскільки практично в пухлині відсутні мітози, інфільтративний ріст, обширні вогнища некрозу та крововиливів, а загальна дія проявляється відсутністю гострої запальної реакції, поліморфноядерної інфільтрації та реактивних змін у мозкових оболонках.

М. Л. Гельфонд [2] провів апробацію методу фотомодифікації циркулюючої сенсibilізованої фотодитазином крові у групі волонтерів із злоякісними пухлинами різних органів і отримав позитивний клінічний ефект. Проте механізм загибелі клітин пухлини після внесення в культуру сенсibilізованої цільної крові, опроміненої лазерним світлом, залишається не зрозумілим. Автор висловлює думку, що загибель клітин пухлини, можливо, зумовлена активацією апоптозу.

ВИСНОВКИ На основі результатів дослідження доведено високу ефективність багаторазової фотомодифікації крові, сенсibilізованої фотолоном при терапії гліоми 101-8 щурів за критерієм збільшення тривалості життя дослідних тварин і патоморфозу пухлини.

Отримані експериментальні дані свідчать про перспективність подальшого вивчення багаторазової фотодинамічної модифікації крові та доцільність її клінічної апробації для лікування онкологічних хворих.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гельфонд М. Л. Возможности фотодинамической терапии в онкологической практике / М. Л. Гельфонд // Физ. Мед. – 2005. – Т. 15, № 2. – С. 33–37.
2. Гельфонд М. Л. Предварительные результаты применения фотомодификации крови, сенсibilізованной фотодитазином, в лечении распространенных форм злокачественных новообразований // Журнал физической медицины. – 2005. – Т. 15, № 2. – С. 41–63.
3. Эффективность фотодинамической терапии с фотосенсом гліобластомы крыс 101-8 / К. В. Екрмакова, И. Ю. Кубасова, Л. М. Борисова, М. П. Кисилева // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – № 4. – С. 73–78.
4. Завадська Т. С. Опосередкована фотолоном фотодинамічна терапія експериментальних гліом / Т. С. Завадська, Л. П. Таранець, О. О. Тромпак // Фотобіологія та фотомедицина. – 2013. – № 1, 2. – С. 81–88.
5. Олюшин В. Е. Глиальные опухоли головного мозга: краткий обзор литературы и протокол лечения больных / В. Е. Олюшин // Нейрохирургия. – 2005. – № 4. – С. 41–47.
6. Петров П. Т. Экспериментальные исследования фотолона как средства для фотодинамической диагностики и терапии злокачественных новообразований / П. Т. Петрова: материалы X Росс. Национального конгресса "Человек и лекарство". – М., 2003. – С. 20–25.
7. Eljamel M. S. Brain photodiagnosis (PD), fluorescence guided resection (FGR) and photodynamic therapy (PDT): past, present and future / M. S. Eljamel // Photodiagnosis Photodyn. Ther. – 2008. – Vol. 5, № 1. – P. 29–35.
8. Muller P. J. Photodynamic therapy of brain tumors a work in progress / P. J. Muller, B. C. Wilson // Lasers Surg. Med. – 2006. – Vol. 38, № 5. – P. 384–393.