

УДК 616-006.3.04:616.92.9:615.832.3

М.А. Каплан¹, А.И. Малыгина¹, Г.В. Пономарев², А.А. Михайловская¹,
В.В. Дроzhzhина¹, Л.М. Архипова¹, Ю.С. Осипчук¹

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ САРКОМЫ М-1 КРЫС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА АМИДАМИНХЛОРИНА

¹Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России, Обнинск

²ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Москва

Контактная информация

Михайловская Анастасия Александровна, зав. лабораторией экспериментальной фотодинамической терапии

адрес: 249038 Калужская область, г. Обнинск, ул. Любого, д.11, кв. 83; тел. +7(484)399-70-29

e-mail: an_mikh@mail.ru

Статья поступила 09.07.2014, принята к печати 09.02.2015.

Резюме

В эксперименте на модели опухоли саркома М-1 изучена эффективность внутрибрюшинного введения амидаминхлорина как фотосенсибилизатора при проведении ФДТ. Цель исследования – определить параметры минимально эффективной дозы ФС и лазерного излучения при ФДТ для достижения полной регрессии опухоли. Изучали динамику накопления фотосенсибилизатора в опухоли и здоровой ткани для определения времени проведения ФДТ и противоопухолевую эффективность при разных дозах ФС и различных параметрах лазерного излучения. В результате проведенного исследования был определен оптимальный срок проведения ФДТ и установлена минимально эффективная доза ФС и параметры лазерного излучения.

Ключевые слова: опухоль, фотосенсибилизатор, лазер, динамика накопления.

M.A. Kaplan¹, A.I. Malygina¹, G.V. Ponomarev², A.A. Mikhailovskaya¹,
V.V. Drozhzhina¹, L.M. Arkhipova¹, J.S. Osipchuk¹

PHOTODYNAMIC THERAPY OF RAT SARCOMA M-1 WITH PHOTOSENSITIZER AMIDOAMINCHLORINE

¹A. Cyb Scientific Centre of Radiology of the Hertsen Federal Medical Research Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk

²Institute of biomedical chemistry, Moscow

Abstract

Efficacy of photodynamic therapy with intraperitoneal introduction photosensitizer Amidoaminchlorine on rat sarcoma M1 model was studied.

The aim of this study was to determine minimum effective dose of photosensitizer and parameters of laser radiation for achievement of tumor full regress.

Dynamics of photosensitizer accumulation in tumor and healthy tissues was studied to definite the time of photodynamic therapy. Antitumor efficacy different doses of photosensitizer and various parameters of laser radiation were investigated. As a result, optimal term of photodynamic therapy, photosensitizer minimum effective dose and parameters of laser irradiation were established.

Key words: tumor, photosensitizer, laser, dynamics of accumulation.

Введение

ФДТ – метод лечения злокачественных опухолей, основанный на способности ФС селективно накапливаться в ткани опухоли вследствие особенностей биохимии злокачественной клетки и, при локальном воздействии лазерного облучения определенной длины волны, генерировать образование синглетного кислорода и других активных радикалов, оказывающих цитотоксический эффект на опухолевые клетки [3; 4; 6–10; 12–14]. Кроме прямого цитотоксического воздействия ФДТ на опухолевые клетки важную роль в деструкции новообразования играют: нарушение кровоснабжения за счет повреждения эндотелия кровеносных сосудов опухолевой ткани; цитокиновые реакции, обусловленные стимуляцией продукции фактора некроза опухоли, активацией макрофагов, лейкоцитов и лимфоцитов. Прогресс ФДТ опухолей связан с созданием эффективных ФС, обеспечивающих доста-

точный терапевтический эффект при минимальном повреждении окружающих здоровых тканей и отсутствии общетоксического действия. В настоящее время большой интерес в ФДТ злокачественных новообразований в качестве ФС вызывают производные ряда хлорофилла [15]. Вновь созданный амидаминхлорин является химической модификацией периферических заместителей хлорина е6. Спектральные характеристики амидаминхлорина позволяют использовать его с теми же лазерами, которые используются для других ФС хлоринового ряда, т. е. с максимумом излучения при длине волны 662 нм [1; 5; 16; 17].

Цель работы – определить минимально эффективную дозу ФС и параметров лазерного излучения для достижения полной регрессии опухоли у 100 % животных.

Задачи исследования:

- изучить динамику накопления амидаминхлорина в опухоли и здоровой ткани;

- изучить противоопухолевую эффективность ФДТ саркомы М-1 при разных дозах ФС амидоаминхлорина (внутрибрюшинное введение) и различных параметрах лазерного излучения.

Материалы и методы

Исследования были проведены на 62 беспородных крысах. В качестве экспериментальной модели опухоли использовали саркому М-1 крыс [2]. Опухоль перевивали под кожу в область бедра в виде кусочков опухоли донора. В опыт крыс брали на 7–9 день, когда опухоль достигала 0,7–1,0 см в диаметре, шерстный покров депилировали. В качестве ФС использовали амидоаминхлорин, который вводили внутрибрюшинно в разных дозах.

Изучение динамики накопления ФС в опухоли и здоровой ткани крыс

Для изучения динамики накопления амидоаминхлорин вводили крысам с саркомой М-1 внутрибрюшинно в дозе 2,5 мг/кг.

Уровень накопления ФС оценивали по интенсивности флуоресценции. Измерение уровня накопления ФС в опухолевой и здоровой тканях изучали с помощью спектрофлуоресцентного метода на комплексе «ЛЭСА-01-Биоспек» (Россия). Датчики подводили к коже над опухолью и в трех точках под прямым углом к объекту (центр, периферия 1 и периферия 2). Накопление в здоровой ткани определяли на здоровой ткани бедра с опухолью (контроль 1) и на противоположенном бедре (контроль 2). Перед измерением шерстный покров депилировали. Время экспозиции составляло 1–2 с. В различные сроки времени после введения ФС у каждого животного измеряли спектры опухолевой и здоровой тканей. Первое измерение проводили до введения препарата (0 ч), а затем через 20 мин; 1,0; 1,5; 3,0; 4,0 и 5,5 ч.

Для суждения о селективности накопления ФС в опухоли по отношению к здоровой ткани рассчитывали индекс контрастности (опухоль/здоровая ткань).

Изучение параметров эффективной дозы ФС и лазерного излучения

В опыте было 5 групп животных. ФДТ проводили разными дозами ФС и различными параметрами лазерного излучения:

- 1 группа – доза ФС 1,25 мг/кг, 100 Дж/см², 0,34 Вт/см²;
- 2 группа – доза ФС 1,25 мг/кг, 150 Дж/см², 0,34 Вт/см²;
- 3 группа – доза ФС 1,25 мг/кг, 150 Дж/см², 0,51 Вт/см²;
- 4 группа – доза ФС 2,5 мг/кг, 150 Дж/см², 0,51 Вт/см²;
- 5 группа – доза ФС 2,5 мг/кг, 300 Дж/см², 0,51 Вт/см².

Контроль – крысы-опухоленосители без какого-либо воздействия.

Животные при облучении находились под общим тиопенталовым наркозом (внутрибрюшинно 2,5 % раствор в объеме 0,2 мл/100 г массы животного).

Источником лазерного излучения служил полупроводниковый лазерный аппарат «Аткус-2» производства ЗАО «Полупроводниковые приборы» (Санкт-Петербург) с длиной волны излучения 662±1 нм. Диаметр светового пятна составлял 1,5

см. Объем опухоли измеряли: до проведения ФДТ (V_0), на 3; 7; 10; 14 и 21 сутки после ФДТ. Эффективность ФДТ оценивали по коэффициенту абсолютного прироста опухоли и по эффекту ингибирования роста опухоли (по рекомендации Фармкомитета по предклинической апробации препаратов [11]):

1. По коэффициенту абсолютного прироста опухоли (K). Для этого сначала вычисляли объемы опухолей по формул:

$$V = \frac{1}{6} \pi \times d_1 \times d_2 \times d_3, \text{ где}$$

d_1, d_2, d_3 – три взаимно перпендикулярных диаметра опухоли, V – объем опухоли, см³.

Коэффициент абсолютного прироста опухоли (K) рассчитывали по формуле:

$$K = \frac{V_t - V_0}{V_0}, \text{ где}$$

V_0 – объем опухоли до воздействия,

V_t – объем опухоли на определенный срок наблюдения.

2. По торможению роста опухоли (ТРО, %) показатель вычисляли по формуле:

$$TPO = \frac{V_k - V_o}{V_k} \times 100\%, \text{ где}$$

V_k – средний объем опухоли в контрольной группе,

V_o – средний объем опухоли в опытной группе.

3. По проценту животных с полной регрессии (ПР, %) опухоли ($K = -1,00$). За полную регрессию опухоли мы принимали отсутствие видимой и пальпируемой опухоли.

Статистическую обработку результатов исследований проводили в компьютерной программе «Statistica» непараметрическими методами для независимых групп (описательная статистика, метод U–теста Манна-Уитни).

Результаты и обсуждение

Изучение динамики накопления ФС в опухоли и здоровой ткани

Уровень и селективность накопления ФС в опухоли, а также скорость его выведения из нормальной ткани являются важнейшими характеристиками для ФДТ. Они влияют как на эффективность метода, так и на вероятность снижения побочных эффектов.

Из данных, представленных на рисунке, видно, что в течение 5,5 ч после внутрибрюшинного введения амидоаминхлорина в дозе 2,5 мг/кг происходит постепенное увеличение уровня накопления его как в опухоли, так и в здоровой ткани. Максимальный уровень накопления ФС в опухоли наблюдался через 3,0–5,5 ч после введения ФС. Что касается индекса контрастности, то самый высокий (1,8) мы наблюдали через 3 часа.

Таблица
Динамика роста саркомы М-1 крыс после ФДТ при внутрибрюшинном введении амидоаминхлорина в разных дозах при различной плотности энергии и плотности мощности лазерного излучения

№ гр	Схема проведения ФДТ	1. Объём опухоли, V 2. Коэффициент прироста опухоли, К 3. Торможение роста опухоли, ТРО % 4. Полная регрессия опухоли, ПР %				
		Сроки наблюдений				
		3сутки	7 суток	10 суток	14 суток	21 сутки
1	1,25 мг/кг 100 Дж/см ² 0,34 Вт/см ²	0,266±0,036 0,62±0,20* 57,6 0	0,392±0,150 1,59±1,07* 82,8 44,4	0,533±0,241 2,75±1,70* 86,2 55,6	0,929±0,430 5,62±3,14* 87,5 55,6	4,538±1,904 30,98±13,35 67,1 55,6
2	1,25 мг/кг 150 Дж/см ² 0,34 Вт/см ²	0,023±0,016 -0,85±0,10* 96,3 77,8	0,125±0,076 -0,14±0,52* 94,5 66,7	0,284±0,187 0,70±1,17* 92,6 66,7	1,082±0,685 5,52±4,32* 85,4 66,7	4,695±2,330 28,11±14,34 70,9 55,6
3	1,25 мг/кг 150 Дж/см ² 0,51 Вт/см ²	Полная регрессия опухоли у 100 % животных	0,046±0,035 -0,39±0,45* 98,0 62,5	0,088±0,051 0,16±0,67* 97,7 62,5	0,332±0,182 3,16±2,38* 95,6 50,0	1,035±0,453 11,88±6,07* 92,5 50,0
4	2,5 мг/кг 150 Дж/см ² 0,51 Вт/см ²		Полная регрессия опухоли у 100 % животных		0,006±0,006 -0,80±0,20* 99,8 87,5	0,083±0,039 -0,01±0,50* 98,9 50,0
5	2,5 мг/кг 300 Дж/см ² 0,51 Вт/см ²	Полная регрессия опухоли у 100 % животных				
Контроль (V, К)		0,627±0,055 2,97±0,50	2,287±0,204 14,01±2,05	3,858±0,433 20,73±2,04	7,461±1,014 36,00±3,85	13,787±1,543 65,31±7,70
*p<0,05 статистически достоверно по сравнению с контролем						

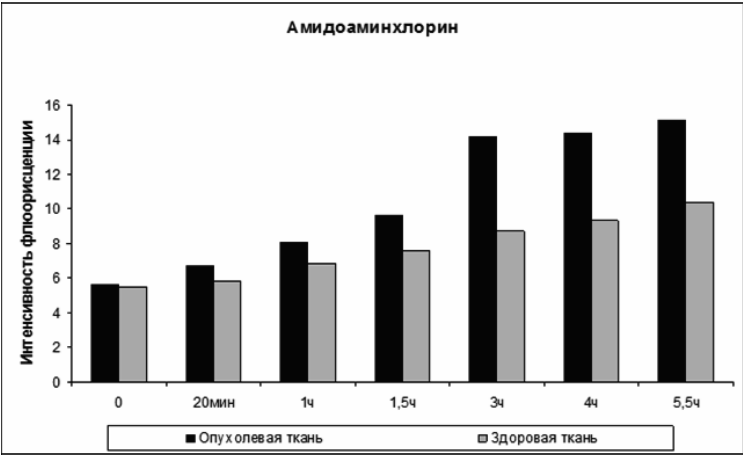


Рис. амидоаминхлорина в опухоли и здоровой ткани крыс с саркомой М -1:
А – уровень накопления;
Б – индекс контрастности.

Таким образом, оптимальное время проведения лазерного облучения после введения ФС наступает через 3 часа – т.е. в это время мы имеем высокое накопление ФС в опухолевой ткани и минимальное содержание его в здоровых тканях.

Изучение параметров
эффективной дозы ФС
и лазерного излучения

Результаты исследований в 1 группе показали, что при дозе ФС 1,25 мг/кг при плотности энергии 100 Дж/см² и плотности мощности 0,34 Вт/см² лазерного излучения на 21 сутки после ФДТ полная регрессия отмечалась у 55,6 % крыс. У животных с ростом опухоли наблюдалось снижение темпа при-

роста новообразования по сравнению с таковым в контроле. И это снижение до 14 суток исследования достоверно значимо (p<0,001). И хотя на 21 сутки наблюдения коэффициент абсолютного прироста опухоли в опытной группе ниже, чем в контроле, и составлял 30,98±13,35, это снижение уже не было значимым по сравнению с таковым в контроле (65,31±7,70; p<0,142). ТРО на 21 сутки после ФДТ составляло 61,7 % (см. таблицу).

Во 2 группе при увеличении плотности энергии до 150 Дж/см², но при той же дозе ФС и плотности мощности лазерного излучения (1,25 мг/кг, 0,34 Вт/см²) мы наблюдали увеличение процента ПР и ТРО до 14 суток исследования. Но на 21 сутки наблюдения процент ПР опухоли и ТРО практически не отличались от данных группы

1. Коэффициент абсолютного прироста опухоли у животных составил на 21 сутки $28,11 \pm 14,13$ и также достоверно незначим по сравнению с таковым контроля ($p < 0,086$).

В 3 группе при увеличении плотности мощности до $0,51 \text{ Вт/см}^2$, но при той же дозе ФС и плотности энергии ($1,25 \text{ мг/кг}$ и 150 Дж/см^2) мы получили хороший ингибирующий эффект. На 21 сутки наблюдения ТРО составляло $92,5\%$ при 50% ПР опухоли. Снижение прироста опухоли на 21 сутки после ФДТ отмечалось по сравнению с группой 2 и достоверно ниже, чем в контроле ($11,88 \pm 6,07$; $p < 0,002$).

В 4 группе при увеличении дозы ФС до $2,5 \text{ мг/кг}$, но при тех же параметрах лазерного облучения как в группе 3 (150 Дж/см^2 и $0,51 \text{ Вт/см}^2$), наблюдалось усиление противоопухолевого воздействия. До 7 суток исследования отмечалась полная регрессия опухоли у всех животных в группе. На 21 сутки исследования ТРО составляло $97,9\%$ при 50% ПР опухоли, коэффициент абсолютного прироста у животных с ростом опухоли ($3,79 \pm 2,68$) отличался от коэффициента в группе 3 и значительно отличался от контроля ($p < 0,001$).

В 5 группе при увеличении плотности энергии в 2 раза (300 Дж/см^2) при той же дозе ФС и плотности мощности ($2,5 \text{ мг/кг}$, $0,51 \text{ Вт/см}^2$) до 21 суток после ФДТ наблюдалась полная регрессия опухоли у всех животных.

Таким образом, противоопухолевый эффект до 21 суток после ФДТ получен при всех исследуемых дозах ФС ($1,25$; $2,5 \text{ мг/кг}$) и параметрах лазерного облучения (100 ; 150 и 300 Дж/см^2 ; $0,34$ и $0,51 \text{ Вт/см}^2$).

Противоопухолевая эффективность ФДТ зависела от дозы ФС, плотности энергии и плотности мощности лазерного излучения. Значительный ингибирующий эффект наблюдался уже при дозе ФС $1,25 \text{ мг/кг}$, при плотности энергии 150 Дж/см^2 и плотности мощности $0,51 \text{ Вт/см}^2$ лазерного излучения. Полная регрессия опухоли у 100% животных до 21 суток после ФДТ отмечалась при использовании амидоаминхлорина в дозе ФС $2,5 \text{ мг/кг}$, при плотности энергии лазерного излучения 300 Дж/см^2 и плотности мощности $0,51 \text{ Вт/см}^2$.

Выводы

1. Оптимальное время проведения лазерного облучения после внутрибрюшинного введения амидоаминхлорина в дозе $2,5 \text{ мг/кг}$ наступает через 3 часа, когда индекс контрастности достигает своего максимального значения.
2. Значительный ингибирующий эффект (ТРО – $92,5\%$ и ПР – 50%) получен уже при внутрибрюшинном введении ФС в дозе $1,25 \text{ мг/кг}$, при плотности энергии 150 Дж/см^2 и плотности мощности $0,51 \text{ Вт/см}^2$ лазерного излучения.
3. Минимально эффективная доза ФС, приводящая к полной регрессии саркомы М-1 у 100% животных на 21 сутки исследования после ФДТ, при внутрибрюшинном введении амидоаминхлорина составляла $2,5 \text{ мг/кг}$ при плотности энергии лазерного излучения 300 Дж/см^2 и плотности мощности $0,51 \text{ Вт/см}^2$.

Литература

1. Бурмистрова Н.В., Каплан М.А., Пономарев Г.В., Малыгина А.И. Изучение фотодинамической активности Амидоаминхлорина // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 2. – С. 30.
2. Гаркуша Н.Ф., Гончарова Н.Ю. Характеристика саркомы М-1 крыс // Науч. докл. высшая школа биол. науки. – 1990. – № 6. – С. 154–60.
3. Гельфонд М.Л. Возможности ФДТ в онкологической практике // Физическая медицина. – 2005. – Т. 15, № 2. – С. 33–7.
4. Каплан М.А., Никитина Р.Г., Малыгина А.И. Экспериментальная разработка путей оптимизации фотодинамической терапии // Лазерная и фотодинамическая терапия. Тез. докл. междунар. конф. – Обнинск, 1999. – С. 17–8.
5. Каширцева И.В., Каплан М.А., Малыгина А.И. Сравнительная оценка противоопухолевой эффективности препарата Хлоринаминамида-1 в различной форме при фотодинамической терапии саркомы М-1 // Материалы I Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы ФД и ФДТ». Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. – № 1. – 2012. – С. 18–9.
6. Корчагина К.С., Гамаюнов С.В., Каров В.А. и др. Прогностическое значение параметров флюоресценции при фотодинамической терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 100.
7. Меерович И.Г., Казачкина Н.И., Савицкий А.П. Изучение проявлений фотоиммунного отклика при фотодинамической терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 110.
8. Меерович И.Г., Меерович Г.А., Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Распределение света по глубине опухолевого очага и эффективность использования терапевтического излучения при фотодинамической терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 3. – С. 93–7.
9. Отдельнова О.Б., Гельфонд М.Л., Хащукоева А.З. и др. Предклиническая оценка фотосенсибилизатора и источника света для оптимизации ФДТ // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 2. – С. 38–9.
10. Романко Ю.С., Цыб А.Ф., Каплан М.А., Попучиев В.В. Зависимость противоопухолевой эффективности фотодинамической терапии от плотности световой энергии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т. 139, № 4. – С. 456–61.
11. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. – М.: Гриф и К, 2012. – Часть 1. – С. 650–69.
12. Странадоко Е.Ф. Основные этапы развития и современное состояние ФДТ в России // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 51.
13. Филоненко Е.Б. Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия в онкологии // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 85.
14. Цыб А.Ф., Каплан М.А., Романко Ю.С., Попучиев В.В. Фотодинамическая терапия. – М.: Мед. информ. агентство, 2009. – 193 с.
15. Чан Тхи Хай Иен, Г.В. Раменская, Н.А. Оборотова. Фотосенсибилизаторы хлоринного ряда в фотодинамической терапии опухолей // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 4. – С. 99–105.
16. Kashirtseva I.V., Kaplan M.A., Ponomarev G.V., Malygina A.I. Comparative evaluation of antitumoral efficiency of preparation chlorine-amineamide-1 in a various forms for photodynamic therapy of sarcoma M-1 // Abstracts of Laser Helsinki 2012 International Congress Helsinki, Finland 24-29 August 2012. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2012. – 9(1). – S11.
17. Kashirtseva I.V., Kaplan M.A., Ponomarev G.V. et al. Comparative evaluation of antitumoral efficiency of various photosensitizers at photodynamic therapy of sarcoma M-1 // Abstracts of Laser Helsinki 2012 International Congress Helsinki, Finland 24-29 August 2012. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2012. – 9(1). – S11–S12.