

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
ОНКОЛОГИИ И МЕДИЦИНСКОЙ РАДИОЛОГИИ
ИМ. Н.Н. АЛЕКСАНДРОВА»

УДК 616.831 – 006.6:615.83]:615.03 (043.3) (476)

ЦЕРКОВСКИЙ
Дмитрий Александрович

**СОНО-ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ С ФОТОЛОНОМ
ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА**
(экспериментальное исследование)

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук
по специальности 14.01.12 – онкология

Минск, 2015

Научная работа выполнена в Государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

Научный руководитель	Истомин Юрий Петрович, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией фотодинамической терапии и гипертермии с группой химиотерапии Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»
Официальные оппоненты:	Демидчик Юрий Евгеньевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси, заведующий кафедрой онкологии Государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»
	Филоненко Елена Вячеславовна, доктор медицинских наук, профессор, руководитель Центра лазерной и фотодинамической диагностики и терапии опухолей Федерального государственного бюджетного учреждения «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена»
Оппонирующая организация:	Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Защита состоится «3» февраля 2016 г. в 14 ч. на заседании совета по защите диссертаций Д 03.12.01 при Государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» (223040, Минский р-н, агр. Лесной, E-mail: NArtemova@omr.med.by, тел. +375172879561).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова».

Автореферат разослан «__» декабря 2015 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций
доктор медицинских наук, доцент

Н.А. Артемова

ВВЕДЕНИЕ

Как свидетельствуют результаты эпидемиологических исследований, в течение последнего десятилетия отмечается неуклонный рост заболеваемости злокачественными опухолями головного мозга (ЗОГМ), которые составляют в среднем 2–3% от всех новообразований, выявляемых у человека [Wolbers J. G., 2014]. Наиболее часто встречаются нейроэпителиальные опухоли – глиомы (58%) и менингиомы (28%). При этом именно глиомы являются основной причиной смерти при опухолях центральной нервной системы.

Базовыми методами лечения ЗОГМ являются хирургическое вмешательство с адъювантной химиолучевой терапией. Вместе с тем, медиана выживаемости не превышает 15 месяцев в зависимости от используемых схем лечения и хирургической тактики [Thomas A. A., 2014; Woernle C. M., 2015]. Высокая летальность данной категории пациентов связана с возникновением рецидивов в зоне роста опухоли либо перитуморальной ткани головного мозга.

В настоящее время активно ведется поиск методов лечения ЗОГМ, основанных на принципиально новых механизмах воздействия на опухоль. Одним из таких направлений является фотодинамическая терапия (ФДТ). Основное ее преимущество – способность фотосенсибилизаторов (ФС) проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), избирательно накапливаться в опухолевой ткани и под воздействием лазерного излучения определенной длины волны вызывать фотохимические реакции, приводящие к гибели опухолевых клеток, при минимальном повреждении окружающих нормальных тканей. Недостатком ФДТ является незначительная глубина повреждения опухолевой ткани (3–7 мм) [Kostron H., 2009].

С целью модификации метода и повышения глубины повреждения опухолей при лечении ряда злокачественных новообразований используют комбинацию ультразвука (УЗ) и лазерного излучения, взаимоусиливающих действие друг друга [Sadanala K. S., 2014; Wang P., 2015]. Данное направление в онкологии получило название соно-фотодинамической терапии (СФДТ).

Вместе с тем, проблема использования СФДТ остается недостаточно изученной. На сегодня нет данных о возможностях применения отечественного ФС фотолон в комбинации с УЗ при лечении ЗОГМ, неизвестны оптимальные параметры воздействия, дозы лазерного и УЗ излучения, противоопухолевая эффективность. Настоящее исследование посвящено разработке в эксперименте метода интраоперационной СФДТ с фотолоном ЗОГМ с целью эффективного воздействия на остаточные опухолевые клетки после хирургического вмешательства, что позволит улучшить результаты лечения пациентов с данной патологией: увеличить показатели выживаемости и улучшить их качество жизни.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами

Диссертация выполнена в рамках НИР: «Разработать в эксперименте метод фотодинамической терапии глиальных опухолей головного мозга с препаратом «Фотолон» (договор с Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований № Б10М–025 от 01.05.2010 г., № государственной регистрации 20101628, сроки выполнения 01.05.2010–31.03.2012 гг.).

Исследование соответствует плану научных работ ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова».

Тема диссертационной работы соответствует пункту 4.2 перечня приоритетных направлений фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2011–2015 годы «Новые технологии профилактики, диагностики, лечения и реабилитации сердечно-сосудистых, онкологических и других социально значимых заболеваний» (Постановление Совета Министров Республики Беларусь от 19 апреля 2010 г. № 585).

Цель и задачи исследования

Цель исследования – повысить эффективность лечения глиальных опухолей головного мозга путем комбинированного применения сонодинамической и фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором фотолон в эксперименте.

Задачи исследования:

1. Изучить сонодинамическую активность фотолона на культуре клеток глиомы С6 путем оценки количества жизнеспособных опухолевых клеток в камере Горяева.

2. Изучить биологические характеристики роста ортотопической модели глиомы С6 у крыс.

3. Изучить особенности накопления фотолон в нормальных и опухолевых тканях головного мозга у крыс с ортотопической глиомой С6 с помощью флуоресцентной спектроскопии.

4. Определить оптимальные терапевтические дозы лазерного и ультразвукового воздействий при соно-фотодинамической терапии с фотолоном на крысах с подкожно перевитой глиомой С6 путем оценки процента площадей некрозов в опухолевой ткани.

5. Разработать на крысах с ортотопической моделью глиомы С6 комбинированный метод лечения, включающий оперативное вмешательство, сонодинамическую и фотодинамическую терапию с фотолоном, и оценить его противоопухолевую эффективность.

Научная новизна

1. Впервые на культуре клеток глиомы С6 подтверждена сонодинамическая активность фотолонна при использовании ультразвукового излучения с частотой 0,88 МГц и интенсивностью 0,4 и 0,7 Вт/см².

2. Создана адекватная для доклинического исследования противоопухолевых воздействий ортотопическая модель глиомы С6 у крыс, и изучены биологические характеристики ее роста.

3. Доказана тропность фотолонна к опухолевой ткани ортотопической глиомы С6, и определено время достижения его максимальной концентрации в опухоли.

4. Определены оптимальные терапевтические дозы лазерного и ультразвукового воздействий при соно-фотодинамической терапии глиомы С6 с фотолоном путем оценки средней продолжительности жизни, медианы выживаемости крыс и процента площадей некрозов в опухоли.

5. Разработан комбинированный метод лечения глиомы С6, включающий оперативное вмешательство, сонодинамическую и фотодинамическую терапию с фотолоном, и подтверждена его противоопухолевая эффективность.

Положения, выносимые на защиту

1. Фотолон обладает соносенсибилизирующим действием на клетки глиомы С6, усиливая цитотоксический эффект ультразвукового излучения с частотой импульсов 0,88 МГц и интенсивностями 0,4 и 0,7 Вт/см² в суспензии и монослойной культуре по сравнению с действием одного ультразвука.

2. Ортотопическая модель глиомы С6 у крыс характеризуется коротким латентным периодом, абсолютной перевиваемостью опухоли, характерной для глиальных опухолей микро- и макроскопической картиной и достижением максимального сигнала флуоресценции фотолонна в опухолевых тканях через 30 минут после его внутривенного введения, превышающего аналогичный показатель в нормальных тканях головного мозга, и по своим биологическим характеристикам является адекватной для доклинического исследования противоопухолевых воздействий.

3. Внутривенное введение фотолонна в дозе 2,5 мг/кг и последующее через 2,5 часа ультразвуковое воздействие с частотой импульсов 0,88 МГц и интенсивностью 0,7 Вт/см² позволяет повысить эффективность фотооблучения за счет увеличения площадей некрозов в подкожно перевитых опухолях. Наиболее эффективной является комбинация ультразвука с частотой импульсов 0,88 МГц, интенсивностью 0,7 Вт/см² и длительностью 10 минут с последующим фотооблучением в экспозиционной дозе света 100 Дж/см², позволяющая достигнуть максимальной площади некрозов в опухолевой ткани.

4. Интраоперационная соно-фотодинамическая терапия ортотопической глиомы С6 с внутривенным введением фотолонна в дозе 2,5 мг/кг и последующим через 30 минут воздействием ультразвуком с частотой импульсов 0,88 МГц, интенсивностью 0,7 Вт/см² и фотооблучением ложа удаленной опухоли в экспозиционной дозе света 50 Дж/5мм² приводит к увеличению средней продолжительности жизни крыс с 17,8±2,6 до 39,4±4,5 дней и медианы выживаемости с 18 до 38 суток в сравнении с группой хирургического лечения.

Личный вклад соискателя ученой степени

Личное участие автора в выполнении диссертационной работы состояло в изучении отечественной и зарубежной литературы, обосновании актуальности темы исследования; постановке целей, задач и формулировке выводов совместно с научным руководителем д.м.н. Истоминым Ю.П.; проведении экспериментальных исследований на культуре опухолевых клеток (совместно с ведущим научным сотрудником к.б.н. Александровой Е.Н.) и лабораторных животных-опухоленосителях; обработке документации и создании компьютерной базы данных, статистической обработке, анализе и интерпретации полученных результатов; оформлении и подаче заявок на изобретения, подготовке публикаций по теме исследования; изложении полученных результатов в виде диссертационной работы. Автором в соавторстве разработаны новые способы лечения экспериментальной глиомы: «Способ комплексного лечения глиомы С6 у крысы» (патент № 19288) [20] и «Способ соно-фотодинамической терапии перевитой подкожно глиомы С6 у крысы» (патент № 19417) [21].

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов

Основные результаты исследования были доложены и обсуждены на:

1. I Молодежном инновационном форуме «ИНТРИ» – 2010, г. Минск, 29–30 ноября 2010 г.;
2. IV съезде онкологов Республики Беларусь, г. Минск, 3–5 ноября 2011 г.;
3. Laser Helsinki 2012 International Congress, Хельсинки, Финляндия, 24–29 августа 2012 г.;
4. World Laserology Congress «Light for diagnosis and treatment», Вильнюс, Литва, 19–21 сентября 2013 г.;
5. II Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные вопросы Фотодинамической терапии и Фотодиагностики», г. Москва, 17–18 октября 2013 г.;
6. Международной научной конференции «Молодежь в науке – 2014», г. Минск, 18–21 ноября 2014 г.

Опубликование результатов диссертации

Результаты диссертационного исследования опубликованы в 21 научной работе: 7 статей в журналах (из них 4 статьи в зарубежных журналах), соответствующих пункту 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, 12 – в материалах и тезисах докладов научных конференций, 2 патента на изобретения.

Общее количество авторских листов опубликованных статей – 4,1.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 84 страницах машинописного текста, содержит 25 иллюстраций, 19 таблиц и 3 формулы, включает введение, общую характеристику работы, обзор литературы, 4 главы собственных исследований, заключение, библиографический список, содержащий 257 литературных источников (из них – 20 русскоязычных, 216 – англоязычных, 21 – собственная публикация), 2 приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Исследования in vitro проведены на культуре клеток крысиной глиомы С6 (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, г. Минск).

Культуру клеток выращивали в питательной среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной сыворотки.

Для экспериментов использовали культуру клеток в экспоненциальной стадии роста в виде монослоя или суспензии клеток. Суспензию получали путем обработки монослоя клеток раствором версена.

Суспензию клеток обрабатывали УЗ спустя 5–10 мин после добавления в питательную среду фотолон в конечной концентрации 1 мкг/мл. Монослой клеток перед обработкой УЗ инкубировали с фотолоном в течение 2 ч с целью максимального накопления в клетках.

Воздействие на клетки УЗ интенсивностью 0,2; 0,4 и 0,7 Вт/см² проводили при комнатной температуре в течение 60 секунд, используя аппарат для ультразвуковой терапии УЗТ-1.040 (880 кГц, «Эмма», г. Москва, Россия) в режиме непрерывного генерирования ультразвуковых колебаний.

Исследования in vivo выполнены в 4 сериях экспериментов на 128 белых беспородных крысах обоих полов с массой тела 160±20 граммов разводки вивария РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова.

Экспериментальную модель глиомы С6 у крыс создавали путем подкожной и интракраниальной перевивки.

Подкожная перевивка включала трансплантацию под кожу левой паховой области 0,5 мл 10% взвеси опухолевых клеток в растворе Хенкса.

Интракраниальная перевивка включала введение животных в состояние нейролептаналгезии, создание трепанационного отверстия в левой теменной области черепной коробки крыс и интракраниальную трансплантацию опухолевых клеток в 25 мкл среды DMEM на глубину 3–4 мм посредством шприца с ограничителем на конце иглы.

В I серии на 25 крысах создавали *ортотопическую модель глиомы С6* путем введения опухолевой суспензии с различной концентрацией клеток ($100\text{--}500 \times 10^3$) и изучали биологические характеристики ее роста.

Во II серии на 10 крысах исследовались особенности накопления фотолон в нормальных тканях головного мозга и *ортотопической модели глиомы С6* методом флуоресцентной спектроскопии.

В III серии на 55 крысах с *подкожно перевитой глиомой С6* осуществлялось исследование чувствительности опухоли к УЗ, сонодинамической терапии (СДТ), фотооблучению (ФО) и их комбинации путем оценки площадей индуцированных в опухолевой ткани некрозов (таблица 1).

Таблица 1. – Группы лабораторных животных в III серии эксперимента

Количество животных в группе, n	Исследуемые группы
5	контрольная группа
5	УЗ 0,88 МГц; 0,4 Вт/см ² ; 10 мин.
5	УЗ 0,88 МГц; 0,7 Вт/см ² ; 10 мин.
5	УЗ 0,88 МГц; 1,0 Вт/см ² ; 10 мин.
5	фотолон 2,5 мг/кг + УЗ 0,88 МГц; 0,4 Вт/см ² ; 10 мин.
5	фотолон 2,5 мг/кг + УЗ 0,88 МГц; 0,7 Вт/см ² ; 10 мин.
5	фотолон 2,5 мг/кг + УЗ 0,88 МГц; 1,0 Вт/см ² ; 10 мин.
5	фотолон 2,5 мг/кг + ФО 50 Дж/см ²
5	фотолон 2,5 мг/кг + ФО 100 Дж/см ²
5	фотолон 2,5 мг/кг + УЗ 0,88 МГц; 0,7 Вт/см ² ; 10 мин. + ФО 50 Дж/см ²
5	фотолон 2,5 мг/кг + УЗ 0,88 МГц; 0,7 Вт/см ² ; 10 мин. + ФО 100 Дж/см ²

В IV серии на 38 крысах с *ортотопической моделью глиомы С6* оценивалась противоопухолевая эффективность разработанного метода комбинированного лечения по критерию выживаемости. Контрольной была группа крыс, получавших лечение хирургическим методом (резекция опухоли, РО) (таблица 2).

Таблица 2. – Группы лабораторных животных в IV серии эксперимента

Количество животных в группе, n	Исследуемые группы
10	интактные крысы-опухоленосители (ИКО)
7	РО
7	РО + фотолон 2,5 мг/кг + УЗ 0,88 МГц; 0,7 Вт/см ² ; 10 мин.
7	РО + фотолон 2,5 мг/кг + ФО 50 Дж/ 5мм ²
7	РО + фотолон 2,5 мг/кг + УЗ 0,88 МГц; 0,7 Вт/см ² ; 10 мин. + ФО 50 Дж/5мм ²

В качестве фотосенсибилизатора использовали инъекционную форму фотолон в дозе 2,5 мг/кг (РУП «Белмедпрепараты», г. Минск, Республика Беларусь), регистрационный номер 09/05/886.

Контроль за динамикой накопления фотосенсибилизатора осуществляли методом прижизненной компьютеризированной флуоресцентной спектроскопии на лазерно-волоконном спектроанализаторе «ЛЭСА-6» с гелий-неоновым диагностическим лазером «ЛГН 633-25» (БИОСПЕК, г. Москва, РФ, $\lambda=632,8$ нм) с помощью многоканального Y-образного оптоволоконного зонда.

Резекцию интракраниальных опухолей выполняли на 14-е сутки после перевивки глиомы С6 крысам с клиническими симптомами опухолевого роста.

После введения в состояние нейролептаналгезии, осуществлялась краниотомия размером 5 × 5 мм и при помощи бинокулярного микроскопа (увел. × 9) производилась резекция опухоли. Зона костного дефекта в черепной коробке закрывалась лоскутом musculus temporalis, рана ушивалась.

Фотодинамическую терапию подкожно перевитых опухолей осуществляли на лазерной медицинской установке «ФДТ-Лазер» (Бел ОМО, г. Минск, $\lambda=660\pm 5$ нм) через 2,5 часа после внутривенного введения фотолон в дозе 2,5 мг/кг. Параметры ФО: экспозиционная доза света – 50 и 100 Дж/см², плотность мощности – 0,17 Вт/см², выходная мощность – 0,28 Вт, диаметр светового пятна – 2 см, время воздействия – 10 минут.

Фотооблучение интракраниальных опухолей производили после их резекции через 0,5 часа после внутривенного введения фотолон в дозе 2,5 мг/кг. Параметры ФО ложа удаленной опухоли: экспозиционная доза – 50 Дж/5мм². Плотность мощности составила 0,51 Вт/см², выходная мощность излучения – 0,1 Вт, диаметр светового пятна – 0,5 см, время воздействия – 2 минуты.

Для контроля мощности лазерного излучения на выходе световода использовали измеритель мощности с интегрирующей сферой.

Сонодинамическая терапия подкожно перевитых и интракраниальных опухолей выполнялась на аппарате для ультразвуковой терапии «BTL Sono 5710» (BTL Industries Ltd., GB) через 2,5 часа после внутривенного введения фотолонна в дозе 2,5 мг/кг. Параметры УЗ: частота импульсов – 0,88 МГц, интенсивность излучения – 0,4; 0,7 и 1,0 Вт/см², длительность воздействия – 10 минут.

Противоопухолевая эффективность воздействий оценивалась по общепринятым в экспериментальной онкологии показателям: определению количества жизнеспособных опухолевых клеток в камере Горяева и увеличению средней продолжительности жизни (СПЖ) павших животных.

У лабораторных животных с подкожно перевитой глиомой С6 осуществлялось количественное определение площадей некрозов, образовавшихся в опухолях после прижизненного окрашивания кровеносного русла 0,6% раствором синьки Эванса через 24 часа после воздействий.

Схема соно-фотодинамической терапии ортотопической глиомы С6 представлена на рисунке 1.

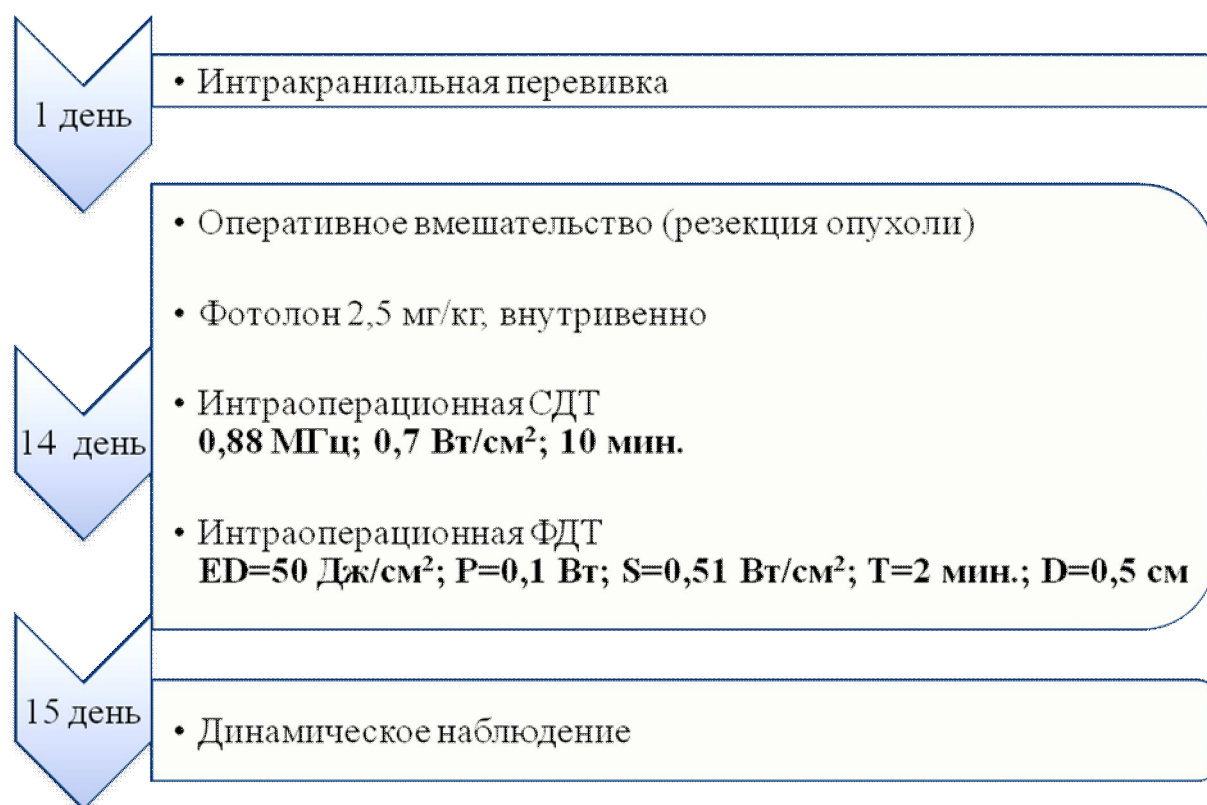


Рисунок 1. – Схема комбинированного лечения глиомы С6 у крыс

Статистическая обработка и графическое представление результатов проводилось с использованием пакета прикладных программ Origin Pro 7.0 и STATISTICA 8.0.

Для выбора критерия оценки значимости различий проверяли соответствие формы распределения нормальному с помощью теста Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения значений изучаемых показателей для оценки статистической значимости различий использовали t-критерий Стьюдента. При распределении данных, отличных от нормального, сравнение проводилось с помощью U-критерия Манна-Уитни для независимых выборок. В случае зависимых совокупностей использовали W-критерий Уилкоксона.

Кривые выживаемости строились с использованием метода *Kaplan-Meier*. Сравнительный анализ данных выживаемости проводился с помощью непараметрического *log-rank* теста. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ IN VITRO

Сонодинамическая активность фотолонa in vitro

Непосредственный эффект УЗ на клетки глиомы С6 оценивали по числу жизнеспособных клеток через 5–10 минут после воздействий.

Для этого использовали суспензию клеток в концентрации 785 ± 35 тысяч клеток/мл, которую разливали во флаконы и осуществляли воздействие УЗ с различными интенсивностями.

Присутствие в питательной среде фотолонa в дозе 1 мкг/мл усиливало повреждающее действие УЗ с интенсивностью 0,4 и 0,7 Вт/см² на клетки глиомы С6 (таблицы 3, 4).

Таблица 3. – Соотношение жизнеспособных клеток глиомы С6 при ультразвуковом воздействии в сочетании с фотолоном (1 мкг/мл) в суспензии

Тип воздействия	Исследуемые показатели		p
	количество жизнеспособных клеток, тыс.	соотношение жизнеспособных клеток в группах сравнения, %	
УЗ 0,2 Вт/см ²	650±60	88,5	0,53
УЗ 0,2 Вт/см ² + фотолон 1 мкг/мл	575±95		
УЗ 0,4 Вт/см ²	530±80	48,1	0,02
УЗ 0,4 Вт/см ² + фотолон 1 мкг/мл	255±45		
УЗ 0,7 Вт/см ²	205±25	29,3	0,018
УЗ 0,7 Вт/см ² + фотолон 1 мкг/мл	60±40		

Таблица 4. – Соотношение жизнеспособных клеток глиомы С6 при ультразвуковом воздействии в сочетании с фотолоном (1 мкг/мл) в монослое

Тип воздействия	Исследуемые показатели		р
	количество жизнеспособных клеток, тыс.	соотношение жизнеспособных клеток в группах сравнения, %	
УЗ 0,2 Вт/см ²	624±50	82,1	0,11
УЗ 0,2 Вт/см ² + фотолон 1 мкг/мл	512±34		
УЗ 0,4 Вт/см ²	426±9	53,3	<0,0001
УЗ 0,4 Вт/см ² + фотолон 1 мкг/мл	227±13		
УЗ 0,7 Вт/см ²	330±19	43,0	0,003
УЗ 0,7 Вт/см ² + фотолон 1 мкг/мл	142±38		

Таким образом, добавление фотолона в дозе 1 мкг/мл в питательную среду (суспензия и монослойная культура) с последующим воздействием УЗ с частотой 0,88 МГц и интенсивностями 0,4 и 0,7 Вт/см² позволяло статистически значимо сократить количество жизнеспособных опухолевых клеток.

Изучение основных биологических характеристик роста ортотопической модели глиомы С6 у крыс

Интракраниальная перевивка клеток глиомы С6 сопровождалась образованием через 11–14 суток (латентный период) первичной опухоли в области левого бокового желудочка головного мозга.

При макроскопическом исследовании глиома С6 выглядела следующим образом: опухоль растет в субарахноидальном пространстве, инфильтрируя поверхностные отделы коркового вещества головного мозга (рисунок 2).



А – краниотомия у крысы;

Б – головной мозг крысы с ортотопической глиомой С6 (увел. × 5);

В – фронтальный срез головного мозга крысы с ортотопической глиомой С6 (увел. × 10)

Рисунок 2. – Ортотопическая модель глиомы С6 у крыс

Перевиваемость штамма глиома С6 составила 40–100% при $100\text{--}500 \times 10^3$ клеток. Оптимальные сроки для осуществления сеансов СФДТ – 14–17 дней после перевивки. Гибель животных наступала спустя 14–37 дней, латентный период составил 14–26 дней.

Микроскопическая картина глиомы С6 на 14-е сутки опыта: опухоль характеризовалась значительной инвазией в нормальную ткань головного мозга, формированием псевдопапиллярных структур, некрозами и кровоизлияниями в опухолевую ткань. В паратуморальной области был отмечен отек, выраженная сосудистая сеть с явлениями лимфоидной инфильтрации стенок.

На основании полученных данных о биологических свойствах глиомы С6 крыс можно сделать вывод, что разработанная модель опухоли *in vivo* полностью соответствует всем требованиям, предъявляемым ортотопическим моделям ЗОГМ.

Результаты исследования особенностей накопления фотолон в нормальных тканях головного мозга и ортотопической глиоме С6 у крыс

В исследование включено 10 крыс с ортотопической моделью глиомы С6. Измерение сигналов флуоресценции осуществлялось в опухоли и нормальных тканях головного мозга в контралатеральном полушарии. Максимальное значение сигнала флуоресценции фотолон в тканях глиомы С6 ($7152,8 \pm 73,6$ ОЕ) достигалось через 30 минут после его внутривенного введения и превышало аналогичный показатель в нормальных тканях ($2524,4 \pm 80,9$ ОЕ, $p < 0,0001$). Индекс контрастности варьировал от 1,8:1 до 4,1:1 (таблица 5).

Таблица 5. – Динамика интенсивности флуоресценции фотолон в нормальных тканях головного мозга крыс и ортотопической глиоме С6

Временной интервал, часы	Интенсивность флуоресценции, ОЕ			Р
	нормальная ткань, М±SD	глиома С6, М±SD	индекс контрастности	
0	232,3±16,9	424,4±15,8	1,8	0,12
0,5	2524,4±80,9	7152,8±73,6	2,8	<0,0001
1	1936,3±108,8	6441,9±65,9	3,3	<0,0001
1,5	1716,3±167,3	6118,8±274,1	3,6	<0,0001
2	1463,7±175,2	5590±123,8	3,8	<0,0001
2,5	1275,7±175,4	5067,6±231,9	4,0	<0,0001
3	1215,1±40,2	4957±153,4	4,1	<0,0001
3,5	1129,3±173,9	3733,5±123,8	3,3	<0,0001
4	1006,9±151,7	2484,8±208,4	2,5	<0,0001
4,5	872,5±106,6	1814,5±290,7	2,1	<0,0001
5	705,6±122,1	1683,5±263,1	2,4	<0,0001
24	212,3±83,5	468,5±138,7	2,2	>0,05

Оценка ранних посттерапевтических изменений в подкожной глиоме С6

Крысы были распределены на 10 групп (по 5 особей в каждой) на 11–14 сутки после подкожной перевивки глиомы С6.

Выведение животных из эксперимента и определение площадей некрозов осуществлялось через 24 часа после проведенных воздействий.

Предварительное введение фотолон в дозе 2,5 мг/кг повышало противоопухолевый эффект УЗ (сонодинамическое воздействие), результатом чего являлось увеличение площадей некрозов (таблица 6).

Таблица 6. – Показатели площадей некрозов при воздействии УЗ и в комбинации УЗ с фотолоном в дозе 2,5 мг/кг

Группы исследования	Исследуемые показатели		p
	количество срезов в группе, n	площадь некрозов, %	
УЗ 0,4 Вт/см ²	12	44,6±10,2	0,177
Фотолон 2,5 мг/кг + УЗ 0,4 Вт/см ²	14	61,1±4,8	
УЗ 0,7 Вт/см ²	12	53,5±5,2	0,0007
Фотолон 2,5 мг/кг + УЗ 0,7 Вт/см ²	11	82,7±2,4	
УЗ 1,0 Вт/см ²	12	66,3±6,7	0,136
Фотолон 2,5 мг/кг + УЗ 1,0 Вт/см ²	13	79,7±4,7	

При эскалации экспозиционной дозы фотооблучения (ФО) опухолей исследуемые показатели площадей некрозов составили при 50 Дж/см² – 61,4±2,6%; при 100 Дж/см² – 85,5±3,8%, соответственно (p=0,01).

В таблице 7 представлены результаты, свидетельствующие о том, что дополнительное УЗ воздействие с интенсивностью 0,7 Вт/см² позволяет увеличить процент площадей некрозов в опухоли по сравнению с группами крыс с подкожной глиомой С6, подвергнутой ФО в экспозиционных дозах 50 и 100 Дж/см².

Таблица 7. – Показатели площадей некрозов в подкожной глиоме С6 при комбинированном лечении

Группы исследования	Исследуемые показатели		p
	количество срезов в группе, n	площадь некрозов, %	
Фотолон 2,5 мг/кг + ФО 50 Дж/см ²	10	61,4±2,6	0,03
Фотолон 2,5 мг/кг + ФО 50 Дж/см ² + УЗ 0,7 Вт/см ²	10	85,6±5,3	
Фотолон 2,5 мг/кг + ФО 100 Дж/см ²	12	85,5±3,8	0,04
Фотолон 2,5 мг/кг + ФО 100 Дж/см ² + УЗ 0,7 Вт/см ²	12	100	

Таким образом, наиболее эффективной оказалась комбинация СДТ при использовании УЗ с интенсивностью $0,7 \text{ Вт/см}^2$ и частотой импульсов $0,88 \text{ МГц}$ в течение 10 минут и ФДТ в экспозиционной дозе света 100 Дж/см^2 .

Выживаемость крыс с ортотопической моделью глиомы С6 после комбинированного лечения

Показатель СПЖ в группе хирургического лечения (резекция опухоли, РО), РО + ФДТ, РО + СДТ и РО + СФДТ, был выше по сравнению с группой интактных крыс-опухоленосителей (ИКО) (ИКО и РО $p=0,01$; ИКО и РО + СДТ $p=0,0001$; ИКО и РО + ФДТ $p=0,0001$; ИКО и РО + СДТ + ФДТ $p=0,0001$). При комбинации РО с СДТ ($p=0,001$), РО с ФДТ ($p=0,001$) и РО с СФДТ ($p=0,0001$) отмечено увеличение показателей выживаемости по сравнению с группой РО.

Использование схемы комбинированного лечения глиомы С6 (РО + СФДТ) приводило к увеличению продолжительности жизни (УПЖ) животных на 194% по отношению к группе ИКО. Применение каждого из компонентов увеличивало данный показатель, и составило 88,1% – для группы РО + СДТ и 122,4% – для группы РО + ФДТ ($p=0,001$). Медиана общей выживаемости в группе РО + СФДТ – 38 суток, для группы РО (контрольная группа) – 18 суток (таблица 8).

Таблица 8. – Оценка эффективности противоопухолевых воздействий по медиане выживаемости и показателю УПЖ

Группа	Вид воздействия	Количество животных в группе, n	Параметры эффективности		
			СПЖ, сутки, $M \pm m$	УПЖ, %	медиана общей выживаемости, сутки, (min-max)
1	ИКО	10	$13,4 \pm 2,7$	–	14 (10–18)
2	РО	7	$17,8 \pm 2,6$	32,8	18 (14–21)
3	РО + СДТ	7	$25,2 \pm 3,7$	88,1	25 (19–28)
4	РО + ФДТ	7	$29,8 \pm 4,2$	122,4	30 (24–34)
5	РО + СДТ + ФДТ	7	$39,4 \pm 4,5$	194,1	38 (33–45)

Апробация метода интраоперационной соно-фотодинамической терапии в клинике у пациентов с рецидивными формами глиобластомы Grade IV

На основании полученных в эксперименте результатов был разработан научный протокол: «I фаза клинического исследования переносимости и безопасности интраоперационной соно-фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором «Фотолон» у пациентов с рецидивными формами мультиформной глиобластомы Grade IV» (решение Ученого совета РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова от 05.02.2014 г., протокол № 2) и начата апробация метода в клинике. Токсичность противоопухолевой терапии оценивали на основании

учета частоты и выраженности побочных реакций и осложнений в соответствии с критериями Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE), Version 4.0.

В исследование включено 10 пациентов, соответствующих критериям включения и не имеющих противопоказаний к лечению (таблица 9).

Таблица 9. – Информация о пациентах, включенных в протокол

Паци- ент	Данные о пациентах						
	пол	возраст, лет	№ амб.к.	дата СФДТ	данные МРТ через 3 месяца	данные МРТ через 6 месяцев	срок наблюдения
К.	м	51	4066/13	07.05.14	прогрессирование	прогрессирование	9 мес., умер
Р.	м	57	1858/14	25.06.14	стабилизация	стабилизация	12 мес., жив
П.	м	37	8221/12	30.06.14	прогрессирование	прогрессирование	5,5 мес., умер
С.	ж	62	2853/97	02.07.14	прогрессирование	прогрессирование	6,5 мес., умер
Х.	м	57	5328/12	10.07.14	стабилизация	стабилизация	11 мес., умер
К.	ж	54	5558/14	15.07.14	стабилизация	стабилизация	8 мес., жив
И.	м	45	3707/14	02.09.14	стабилизация	регресс	9 мес., умер
Ч.	м	41	165/09	23.04.15	стабилизация	–	4 мес., жив
Я.	м	54	699/13	27.04.15	стабилизация	регресс	6 мес., жив
Г.	ж	30	399/12	27.05.15	стабилизация	–	4 мес., жив

Проведенное пилотное исследование продемонстрировало безопасность и хорошую переносимость предложенного метода лечения. Выявленные побочные реакции и осложнения не превышали I–II степени по критериям CTCAE, Version 4.0., легко купировались и не влияли на сроки проведения дальнейшего лечения.

Таким образом, разработанная в эксперименте схема комбинированного лечения является перспективной и для оценки ее противоопухолевой эффективности в клинике планируется проведение рандомизированных исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Фотолон относится к лекарственным средствам, обладающим соносенсибилизирующей активностью. Сочетанное применение фотолон и ультразвука с частотой импульсов 0,88 МГц усиливает цитотоксический эффект: в суспензии при интенсивностях излучения 0,4 и 0,7 Вт/см² количество жизнеспособных опухолевых клеток сокращается с $530 \pm 80 \times 10^3$ до $255 \pm 45 \times 10^3$ ($p=0,02$) и с $205 \pm 25 \times 10^3$ до $60 \pm 40 \times 10^3$ ($p=0,018$) по сравнению с действием одного ультразвука; в монослойной культуре – с $426 \pm 9 \times 10^3$ до $227 \pm 13 \times 10^3$ ($p < 0,0001$) и с $330 \pm 19 \times 10^3$ до $142 \pm 38 \times 10^3$ ($p=0,003$), соответственно [1, 2, 9, 13, 17, 18, 19].

2. В ортотопической модели глиомы С6 у крыс, отличающейся коротким латентным периодом (14,5±2,7 дня), абсолютной перевиваемостью опухоли (100%), характерной для глиальных опухолей микро- и макроскопической картиной, максимальное значение сигнала флуоресценции фотолон в опухолевых тканях (7265,2±73,6 ОЕ) достигается через 30 минут после его

внутривенного введения и превышает аналогичный показатель в нормальных тканях головного мозга ($2764,4 \pm 80,9$ ОЕ) ($p < 0,0001$) [1, 4, 8, 12, 14, 15].

3. Внутривенное введение фотолонна приводит к увеличению площадей некрозов в гистотопографических срезах подкожно перевитой глиомы С6 при ультразвуковом воздействии с частотой импульсов 0,88 МГц, интенсивностью $0,7 \text{ Вт/см}^2$ и длительностью 10 минут через 2,5 часа после его внутривенного введения с $53,5 \pm 5,2$ до $82,7 \pm 2,4\%$ ($p = 0,0007$). При фотооблучении опухолей в экспозиционных дозах света 50 и 100 Дж/см² этот показатель составляет $61,4 \pm 2,6$ и $85,5 \pm 3,8\%$ ($p < 0,05$), соответственно [3, 4, 5, 9, 10, 13].

4. Наиболее выраженный противоопухолевый эффект, выражающийся в виде максимального некроза опухоли, достигается через 2,5 часа после внутривенного введения фотолонна при ультразвуковом воздействии с частотой импульсов 0,88 МГц и интенсивностью $0,7 \text{ Вт/см}^2$ в течение 10 минут с последующим фотооблучением в экспозиционной дозе света 100 Дж/см², превышая данный показатель для каждого из компонентов в отдельности ($p < 0,0001$ и $p = 0,04$) [3, 4, 5, 6, 9, 10, 13, 17].

5. Интраоперационная соно-фотодинамическая терапия ортотопической глиомы С6 с внутривенным введением фотолонна в дозе 2,5 мг/кг и последующим через 30 минут воздействием ультразвуком с частотой импульсов 0,88 МГц, интенсивностью $0,7 \text{ Вт/см}^2$ и фотооблучением ложа удаленной опухоли в экспозиционной дозе света 50 Дж/5мм² приводит к увеличению средней продолжительности жизни животных с $17,8 \pm 2,6$ до $39,4 \pm 4,5$ дней ($p = 0,0001$) и медианы выживаемости с 18 до 38 суток ($p = 0,001$) в сравнении с группой хирургического лечения [4, 5, 7, 11, 16, 18, 19].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Разработанный в эксперименте метод СФДТ с фотолоном апробирован на 10 пациентах с рецидивными формами глиобластомы Grade IV. Схема лечения включает следующие этапы: по окончании резекции опухоли пациенту осуществляют внутривенное капельное введение фотолонна в дозе 2,5 мг/кг в течение 30 мин; через 15 минут от начала инфузии фотолонна операционная полость заполняется физиологическим раствором, и производится ультразвуковое облучение с помощью аппарата с частотой импульсов 0,88 МГц, интенсивностью $0,7 \text{ Вт/см}^2$ в течение 10 мин на одно поле воздействия; далее с помощью лазерных установок с длиной волны излучения 660 ± 5 нм выполняется фотооблучение в экспозиционных дозах света 50–100 Дж/см² на каждое поле. Лазерному воздействию должны подвергаться дно и стенки послеоперационной полости.

Для внедрения метода в клиническую практику необходимо проведение проспективного исследования его противоопухолевой эффективности.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ**Статьи в журналах**

1. Церковский, Д. А. Фотодинамическая терапия злокачественных опухолей головного мозга: современное состояние проблемы / Д. А. Церковский // Онколог. журн. – 2010. – Т. 4, № 4; 2011. – Т. 5, № 1. – С. 129–138.
2. Tserkovsky, D. A. Photolon enhancement of ultrasound cytotoxicity / D. A. Tserkovsky, E. N. Alexandrova, Yu. P. Istomin // Exp. Oncol. – 2011. – Vol. 33, № 2. – P. 107–109.
3. Effects of combined sonodynamic and photodynamic therapies with photolon on a glioma C6 tumor model / D. A. Tserkovsky, E. N. Alexandrova, V. N. Chalau, Yu. P. Istomin // Exp. Oncol. – 2012. – Vol. 34, № 4. – P. 332–335.
4. Fluorescent diagnosis and photodynamic therapy for C6 glioma in combination with antiangiogenic therapy in subcutaneous and intracranial tumor models / D. A. Tzerkovsky, V. V. Osharin, Y. P. Istomin, E. N. Alexandrova, M. A. Vozmitel // Exp. Oncol. – 2014. – Vol. 36, № 2. – P. 85–89.
5. Сонодинамическая и соно-фотодинамическая терапия злокачественных опухолей с использованием фотосенсибилизаторов / Ю. П. Истомин, Т. П. Артемьева, Е. Н. Александрова, Д. А. Церковский // Рос. биотер. журн. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 119–126.
6. Влияние соно-фотодинамического воздействия на реологические свойства крови и плазмы лабораторных животных-опухоленосителей / Ю. П. Истомин, С. В. Виланская, В. Н. Чалов, Д. А. Церковский // Известия Национальной Академии Наук Беларуси. Серия медицинских наук. – 2015. – № 1. – С. 84–89.
7. Церковский, Д. А. Соно-фотодинамическая терапия – новое направление в лечении злокачественных опухолей головного мозга / Д. А. Церковский // Онколог. журн. – 2015. – Т. 9, № 1. – С. 94–106.

Статьи в сборниках научных трудов, материалов конференций и съездов

8. Церковский, Д. А. Использование лазер-индуцированной флуоресцентной спектроскопии *in vivo* для изучения динамики накопления фотосенсибилизатора фотолон в тканях головного мозга крыс / Д. А. Церковский, В. Н. Чалов, Ю. П. Истомин // Экспериментальная и клиническая фармакология : материалы 3-й междунар. науч. конф., Минск, 23–24 июня 2009 г. / Гос. учрежд. Научн.-произв. центр «И-т фармакол. и биохим. НАН Беларуси»; редкол.: П. Т. Петров [и др.]. – Минск, 2009. – С. 122–124.

9. Метрономная сонофотодинамическая терапия с фотолоном злокачественных опухолей головного мозга в эксперименте / Ю. П. Истомин, Е. Н. Александрова, В. Н. Чалов, Д. А. Церковский // Молодежный инновационный форум «ИНТРИ» – 2010 : материалы секц. засед., Минск, 29–30 ноября 2010 г. / ГУ «Бел. и-т сист. анализа и информ. обесп. научн.-техн. сферы» ; под общ. ред. И. В. Войтова. – Минск : ГУ «БелИСА», 2010. – С. 163–164.

10. Соно-фотодинамическая терапия глиомы С6 крыс с фотосенсибилизатором фотолон / Д. А. Церковский, Е. Н. Александрова, В. Н. Чалов, Н. А. Попова, Ю. П. Истомин // Онколог. журн. – 2011. – Т. 5, № 3. – С. 158–159.

11. Tzerkovsky, D. Sonodynamic therapy with photolon for intracranial glioma C6 in rats / D. Tzerkovsky // Photodiagnosis Photodyn. Ther. – 2012. – Vol. 9, Suppl. 1. – P. S14.

12. Реологические свойства крови и плазмы лабораторных животных (опухоленосителей) после соно-фотодинамического воздействия при 37 °С / С. А. Губарев, С. В. Виланская, Ю. П. Истомин, В. Н. Чалов, Д. А. Церковский // XIV Минский международный форум по тепло- и массообмену : тезисы докл. и сообщ., Минск, 10–13 сентября 2012 г. : в 2 т. / И-т тепло- и массообм. им. А. В. Лыкова ; редкол.: О. Г. Пенязьков [и др.]. – Минск, 2012. – Т. 2, Ч. 2. – С. 614–619.

13. Tzerkovsky, D. A. In vitro/in vivo study of Photolon-mediated sonophotodynamic therapy (SPDT) on C6 glioma tumor after blood-brain barrier disruption / D. A. Tzerkovsky, E. N. Alexandrova // World Laserology Congress «Light for diagnosis and treatment» : final program and abstract book, Vilnius, 19–21 September 2013 / IPTA, ISLSM, WFLSLS, WFLD. – Vilnius, 2013. – P. 12.

14. Церковский, Д. А. Изучение особенностей сонодинамического и фотодинамического воздействия на нормальные ткани головного мозга крыс / Д. А. Церковский, Е. Н. Александрова, Ю. П. Истомин // Онколог. журн. : материалы респ. научн.-практ. конф. с междунар. уч. «Актуальные вопросы диагностики и лечения онкологических заболеваний», Минск, 20 декабря 2013 г. – 2013. – Т. 7, № 4 (приложение). – С. 58.

15. Церковский, Д. А. Фармакокинетика фотосенсибилизатора фотолон в нормальных и опухолевых тканях головного мозга крыс после предварительного сонодинамического воздействия / Д. А. Церковский, Е. Н. Александрова, Ю. П. Истомин // Онколог. журн. : материалы респ. научн.-практ. конф. с междунар. уч. «Актуальные вопросы диагностики и лечения онкологических заболеваний», Минск, 20 декабря 2013 г. – 2013. – Т. 7, № 4 (приложение). – С. 59.

16. Фотодинамическая и антиангиогенная терапия глиомы С6 крыс / Д. А. Церковский, В. В. Ошарин, Е. Н. Александрова, Ю. П. Истомин // Онколог. журн. : материалы респ. научн.-практ. конф. с междунар. уч. «Актуальные вопросы диагностики и лечения онкологических заболеваний», Минск, 20 декабря 2013 г. – 2013. – Т. 7, № 4 (приложение). – С. 60.

17. Церковский, Д. А. Комбинированная соно-фотодинамическая терапия глиомы С6 с фотосенсибилизатором фотолон: экспериментальное исследование *in vitro* и *in vivo* / Д. А. Церковский // Минский консилиум – 2014 : сб. материалов респ. научн.-практ. конф. молодых ученых с междунар. участием, Минск, 10–11 июня 2014 г. / БелМАПО ; редкол.: Ю. Е. Демидчик [и др.]. – Минск : БелМАПО, 2014. – С. 256–257.

18. Церковский, Д. А. Соно-фотодинамическая терапия глиомы С6 с фотосенсибилизатором хлоринового ряда: экспериментальное исследование *in vitro* и *in vivo* / Д. А. Церковский // Евраз. онкол. журн. : тезисы VIII съезда онкол. и радиол. СНГ и Евразии, Казань, 16–18 сентября 2014 г. – 2014. – Т. 1, № 3. – С. 127.

19. Церковский, Д. А. Соно-фотодинамическая терапия экспериментальной глиомы С6 с фотосенсибилизатором фотолон / Д. А. Церковский // Молодежь в науке – 2014 : материалы XI Междунар. научн. конф., Минск, 18–21 ноября 2014 г. / НАН Беларуси. – Минск, 2014. – С. 207.

Патенты

20. Способ комплексного лечения глиомы С6 у крысы : пат. 19288 Респ. Беларусь : МПК А 61N 5/067, А61К 31/409, А61К 39/395 (2006.01) / Д. А. Церковский, В. В. Ошарин, Ю. П. Истомин ; дата публ.: 30.06.2015.

21. Способ соно-фотодинамической терапии перевитой подкожно глиомы С6 у крысы : пат. 19417 Респ. Беларусь : МПК, А61N 5/067, А61N 7/00 (2006.01) / Ю. П. Истомин, Е. Н. Александрова, В. Н. Чалов, Д. А. Церковский ; дата публ.: 30.08.2015.

РЭЗІЮМЭ

Царкоўскі Дзмітрый Аляксандравіч

Сона-фотадынамічная тэрапія з фаталонам

гліяльных пухлін галаўнога мозгу (эксперыментальнае даследванне)

Ключавыя словы: сонна-фотадынамічная тэрапія (СФДТ), фотасэнсібілізатар, фаталон, артатапічная мадэль, гліёма С6.

Мэта даследвання: павысіць эфектыўнасць лячэння злаякасных гліяльных пухлін галаўнога мозгу пры дапамозе камбінаванага падыходу з выкарыстаннем соннадынамічнай ды фотадынамічнай тэрапій з фотасэнсібілізатарам фаталон у эксперыменце.

Матэрыял і метады даследвання: культура клетак, падскурная і артатапічная мадэлі гліёмы С6 у пацукоў, пралечаныя з выкарыстаннем соннадынамічнай, фотадынамічнай тэрапій ды іх камбінацыі.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: камбініраванае выкарыстанне фаталону і ультрагуку (УГ) з частатой імпульсаў 0,88 МГц узмацняе цытотоксічнай эфект: пры інтэнсіўнасцях 0,4 ды 0,7 Вт/см² колькасць жыццяздольных клетак пухліны скарачаецца з $530 \pm 80 \times 10^3$ да $255 \pm 45 \times 10^3$ ($p=0,02$) ды з $205 \pm 25 \times 10^3$ да $60 \pm 40 \times 10^3$ ($p=0,018$) у параўнанні з дзеяннем аднаго УГ; у монослойнай культуры – з $426 \pm 9 \times 10^3$ да $227 \pm 13 \times 10^3$ ($p < 0,0001$) ды з $330 \pm 19 \times 10^3$ да $142 \pm 38 \times 10^3$, адпаведна ($p=0,003$). У артатапічнай мадэлі гліёмы С6 у пацукоў, адрознай кароткім латэнтным перыядам ($14,5 \pm 2,7$ дня), абсалютнай перавіваемасцю пухліны (100%), характэрнай для гліяльных пухлін мікра- і макраскапічнай карцінай, максімальнае значэнне сігнала флуарэсэнцыі фаталону у пухліны ($7265,2 \pm 73,6$ ОЕ) дасягаецца праз 30 хвілін пасля яго унутрывеннага увядзення і перавышае аналагічны паказчык у нармальных тканінах галаўнога мозгу ($2764,4 \pm 80,9$ ОЕ) ($p < 0,0001$). Максімальны супрацьпухлінны эфект, які выяўляецца у выглядзе поўнага некрозу падскурна перавітых пухлін, дасягаецца праз 2,5 гадзіны пасля унутрывеннага увядзення фаталону пры дзеянні УГ з частатой 0,88 МГц і інтэнсіўнасцю 0,7 Вт/см² на працягу 10 хвілін з наступным фотааблучэннем у экспазіцыйнай дозе святла 100 Дж/см² ($p=0,04$). Інтраоперацыйная СФДТ артатапічнай гліёмы С6 з унутравенным увядзеннем фаталону у дозе 2,5 мг/кг і наступным праз 30 хвілін уздзеяннем УГ з частатой імпульсаў 0,88 МГц, інтэнсіўнасцю 0,7 Вт/см² і фотооблучением ложа выдаленай пухліны у экспазіцыйнай дозе святла 50 Дж/5мм² прыводзіць да павелічэння сярэдняй працягласці жыцця жывёл з $17,8 \pm 2,6$ да $39,4 \pm 4,5$ дзён ($p=0,0001$) і медыяны выжывальнасці з 18 да 38 сутак ($p=0,001$) у параўнанні з групай хірургічнага лячэння.

Ступень выкарыстання: матэрыялы ляглі у аснову пратакола пілотнага даследвання эфектыўнасці інтраоперацыйнай СФДТ у пацыентаў з рэцыдыўнымі формамі мультыформнай гліябластомы Grade IV, які праводзіцца у РНПЦ АМР ім. М.М. Аляксандрава.

Вобласць ужывання: эксперыментальная анкалогія, нейраанкалогія.

РЕЗЮМЕ**Церковский Дмитрий Александрович
Соно-фотодинамическая терапия с фотолоном
глиальных опухолей головного мозга
(экспериментальное исследование)**

Ключевые слова: соно-фотодинамическая терапия (СФДТ), фотосенсибилизатор, фотолон, ортотопическая модель, глиома С6.

Цель исследования: повысить эффективность лечения глиальных опухолей головного мозга путем комбинированного применения сонодинамической и фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором фотолон в эксперименте.

Материалы и методы исследования: культура клеток, подкожная и ортотопическая модели глиомы С6 у крыс, пролеченные с использованием сонодинамической, фотодинамической терапии и их комбинации.

Результаты исследования и их новизна: сочетанное применение фотолона и ультразвука (УЗ) с частотой импульсов 0,88 МГц усиливает цитотоксический эффект: в суспензии при интенсивностях 0,4 и 0,7 Вт/см² количество жизнеспособных опухолевых клеток сокращается с $530 \pm 80 \times 10^3$ до $255 \pm 45 \times 10^3$ ($p=0,02$) и с $205 \pm 25 \times 10^3$ до $60 \pm 40 \times 10^3$ ($p=0,018$) по сравнению с действием одного ультразвука; в монослойной культуре – с $426 \pm 9 \times 10^3$ до $227 \pm 13 \times 10^3$ ($p < 0,0001$) и с $330 \pm 19 \times 10^3$ до $142 \pm 38 \times 10^3$ ($p=0,003$) соответственно. В ортотопической модели глиомы С6 у крыс, отличающейся коротким латентным периодом ($14,5 \pm 2,7$ дня), абсолютной перевиваемостью опухоли (100%), характерной для глиальных опухолей микро- и макроскопической картиной, максимальное значение сигнала флуоресценции фотолона в опухоли ($7265,2 \pm 73,6$ ОЕ) достигается через 30 минут после его внутривенного введения и превышает аналогичный показатель в нормальных тканях головного мозга ($2764,4 \pm 80,9$ ОЕ) ($p < 0,0001$). Максимальный противоопухолевый эффект, выражающийся в виде полного некроза подкожно перевитой опухоли, достигается через 2,5 часа после внутривенного введения фотолона при действии УЗ с частотой 0,88 МГц и интенсивностью 0,7 Вт/см² в течение 10 минут с последующим фотооблучением в экспозиционной дозе света 100 Дж/см² ($p=0,04$). Интраоперационная СФДТ ортотопической глиомы С6 с внутривенным введением фотолона в дозе 2,5 мг/кг и последующим через 30 минут воздействием УЗ с частотой импульсов 0,88 МГц, интенсивностью 0,7 Вт/см² и фотооблучением ложа удаленной опухоли в экспозиционной дозе света 50 Дж/5мм² приводит к увеличению средней продолжительности жизни животных с $17,8 \pm 2,6$ до $39,4 \pm 4,5$ дней ($p=0,0001$) и медианы выживаемости с 18 до 38 суток ($p=0,001$) в сравнении с группой хирургического лечения.

Степень использования: материалы легли в основу протокола клинического исследования эффективности интраоперационной СФДТ у пациентов с рецидивными формами мультиформной глиобластомы Grade IV, проводимого в РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова.

Область применения: экспериментальная онкология, нейроонкология.

SUMMARY**Tzerkovsky Dzmitry Alexandrovich
Sono-photodynamic therapy of glial brain tumors with photolon
(experimental study)**

Key words: sono-photodynamic therapy (SPDT), photosensitizer, photolon, orthotopic model, glioma C6.

Objective: improving the antitumor efficacy of treatment of malignant glial brain tumors with combined employing sonodynamic and photodynamic therapies with photosensitizer photolon in an experimental models.

Material and methods: glioma C6 cell culture, subcutaneous and orthotopic rats glioma C6 tumor models, treated with sonodynamic, photodynamic and combined SPDT with photolon.

The results obtained and their novelty: combined use photolon and ultrasound (US) with a pulse frequency of 0.88 MHz enhances the cytotoxic effect: in suspension at intensities of 0.4 and 0.7 W/cm², the number of viable tumor cells is reduced from 530±80×10³ to 255±45×10³ (p=0.02) and 205±25×10³ to 60±40×10³ (p=0.018) in comparison with the action of US; in monolayer culture – from 426±9×10³ to 227±13×10³ (p<0.0001) and from 330±19×10³ to 142±38×10³ (p=0.003) respectively. In an orthotopic model of C6 glioma in rats differing short latent period (14.5±2.7 days), absolute tumor growth (100%), characteristic of glial tumors micro- and macroscopic picture of the maximum value of the fluorescence signal in the tumor photolon (7265.2±73.6 OE) is attained 30 minutes after intravenous administration, and higher than in normal brain tissue (2764.4±80.9 OE) (p<0.0001). The maximal antitumor effect manifests itself as a complete necrosis of the tumor transplanted subcutaneously achieved in 2.5 hours after intravenous photolon under the action of ultrasonic pulses with a frequency of 0.88 MHz and an intensity of 0.7 W/cm² for 10 minutes followed by exposure to photoirradiation light dose of 100 J/cm² (p=0.04). Intraoperative SPDT of orthotopic C6 glioma with photolon intravenous administration at a dose of 2.5 mg/kg followed 30 minutes after exposure to US with a frequency of 0.88 MHz and an intensity of 0.7 W/cm² and photoirradiation resected tumor bed in the light exposure dose of 50 J/5mm² increases the life expectancy of animals with up from 17.8±2.6 to 39.4 ± 4.5 days (p=0.0001) and the median survival of 18 to 38 days (p=0.001) in comparison with the group of surgical treatment.

The extent of adoption in practice: The materials of experimental study provided a basis of a pilot clinical trial of efficacy of intraoperative SPDT for patients with recurrent form of glioblastoma multiforme Grade IV which was conducted at N.N. Alexandrov National Cancer Centre.

Field of application: experimental oncology, neurooncology.