

УДК 616-006.81:577.344.3-08:599.323.4

Каплан М.А., Никитина Р.Г., Мардынская В.П., Сокол Н.И., Малыгина А.И., Дрожжина В.В., Морозова Т.Г.

## Оценка эффективности фотодинамической терапии меланомы $B_{16}$ при двухфазном введении фотосенсибилизатора

Kaplan M.A., Nikitina R.G., Mardynskaja V.P., Sokol N.I., Malygina A.I., Drozhzhina V.V., Morosova T.G.

### Estimation of photodynamic therapy effectiveness for melanoma $B_{16}$ after two-phase injection of the photosensitizer

ГУ «Медицинский радиологический научный центр АМН»

**Цель.** Изучение в эксперименте эффективности фотодинамической терапии (ФДТ) меланомы  $B_{16}$  при облучении лазером с учетом двух фаз максимального накопления фотосенсибилизатора (ФС) в опухоли. **Материалы и методы.** Мыши с перевитой меланомой  $B_{16}$  были разделены на три группы. Группа 1 – с учетом максимального накопления Фотолон одновременно в опухолевых клетках (2/3 дозы за 1,5–2 часа до облучения опухоли лазером) и сосудах (1/3 дозы – непосредственно перед облучением). Группа 2 – в момент максимального накопления Фотолон в клетках опухоли; группа 3 (контроль) – пелеченные мыши-опухоленосители. Доза Фотолон составляла 9,0 мг/кг. Облучение лазером выполняли при плотности энергии 150 Дж/см<sup>2</sup>, плотность мощности – 0,12 Вт/см<sup>2</sup>, диаметр светового пятна – 1 см, время облучения – 21 мин. **Результаты исследований.** В группе 1 увеличивается процент животных с полной регрессией опухоли, снижается коэффициент абсолютного прироста опухоли; снижается частота метастазирования меланомы в легкие. **Выводы.** ФДТ с учетом фазы максимального накопления Фотолон в клетках опухоли и сосудах более эффективна по сравнению с традиционной ФДТ, которая проводится с однократным введением фотосенсибилизатора. **Ключевые слова:** меланома, фотодинамическая терапия, лазер, способ введения Фотолон, метастазирование.

**Purpose.** Experimental study of photodynamic therapy (PDT) effectiveness for melanoma after laser irradiation with two phases of photosensitizer accumulation in the tumor. **Material and methods:** Mice with inoculated melanoma  $B_{16}$  were divided in three groups: Group 1 – with two phases of maximal accumulation of Potholon in cells of the tumor (2/3 volume of total dose injected intraperitoneally 1,5–2 hours before the laser irradiation of the tumor) and in the vessels (1/3 volume is injected intravenously just before irradiation). Group 2 – Potholon was injected once, animals were exposed to laser at the time of maximal accumulation it in tumor cells. Group 3 (control) – untreated mice with tumor. Dose of Photolon was 9,0 mg/kg. Laser irradiation was 150 J/cm<sup>2</sup>, power density – 0,12 W/cm<sup>2</sup>, diameter of light spot – was 1 cm, time of irradiation – 21 min. **Results.** The highest number of animals with full tumor regression was in the group 1; coefficient of absolute tumor growth was lower in the group 1; frequency of metastases in the lungs was lower in that group as well. **Conclusion.** PDT for melanoma performed at maximal accumulation of Photolon in tumor cells and vessels is more effective than traditional PDT after single administration of the sensitizer. **Key words:** melanoma, photodynamic therapy, laser, method of injection of Photolon, metastasis.

#### Введение

Разработка эффективных методов лечения при меланоме продолжает оставаться актуальной проблемой онкологии. Полное хирургическое или иное локальное удаление опухоли не исключает развития отдаленных метастазов [1–4]. К эффективным методам лечения опухолей кожи в настоящее время можно отнести фотодинамическую терапию (ФДТ). Однако и она не предупреждает появление отдаленных метастазов. Это связано с тем, что при локальном воздействии на опухоль повреждаются сосуды только в области лечебного воздействия. Крово- и лимфоток в сосудах, окружающих опухоль, остается при этом практически не нарушенным. В результате клетки опухоли, поступающие в него из опухолевого очага, свободно разносятся по всему организму. Возникает актуальная проблема обеспечения невозможности клеткам мигрировать. ФДТ, на наш взгляд, позволяет реализовать эту задачу или, по крайней мере, минимизировать этот процесс.

Известно, что при внутривенном введении накопление фотосенсибилизатора (ФС) в опухоли имеет две фазы. Первая фаза – сосудистая, когда в сосудах находится максимальная его концентрация. У мышей

это время составляет 1–2 минуты с момента введения. Вторая фаза – это время, в течение которого препарат в максимальном количестве накапливается в клетках самой опухоли. Для Фотолон это время составляет 1,5–2 часа [5]. ФДТ, как правило, проводят при второй фазе накопления ФС в опухоли, т. е. она направлена преимущественно на повреждение клеток опухоли и лишь частично сосудов. По идее, совмещение указанных фаз должно эффективно повреждать одновременно не только опухолевые клетки, но и блокировать сосуды, по которым осуществляются пути элиминации клеток в общий кровоток.

Целью настоящего исследования явилось изучение эффективности ФДТ меланомы  $B_{16}$  при облучении лазером с учетом двух фаз максимального накопления ФС (сосудистой и внутриопухолевой).

#### Материалы и методы

Исследования проведены на 61 мыши-гибриде линии F1 (СВА\*С<sub>57</sub>, BL<sub>6</sub>) массой 20 г. В качестве опухолевой модели использовали меланому  $B_{16}$ . Штамм получен из Банка опухолевых штаммов лаборатории комбинированной терапии опухолей ГУ РОНЦ имени Н.Н. Блохина РАМН. Опухоль приви-

вается в 100% случаев, имеет короткий инкубационный период, метастазирует в легкие. Суспензию опухолевых клеток прививали подкожно в область бедра. В опыт брали животных на 4–5-й день, когда объем опухоли ( $V$ ) достигал 0,027–0,033 см<sup>3</sup>. Шерстный покров на бедре депилировали. Мыши при облучении находились под общим тиопенталовым наркозом (1,25% раствор в объеме 0,05 мл внутривенно). В качестве ФС использовали Фотолон. Источником излучения служил полупроводниковый лазерный аппарат «Ламеда» (производитель – ООО «Электромагнитные медицинские инструменты», Россия) с длиной волны излучения 662 нм. Для доставки излучения использовали кварцевый моноволоконный световод с линзой на конце. Диаметр поля облучения составлял 1 см, плотность энергии падающего излучения – 150 Дж/см<sup>2</sup>, плотность мощности – 0,12 Вт/см<sup>2</sup>, время облучения – 21 мин. Во всех опытах условия облучения были одинаковыми.

Эффективность ФДТ оценивали:

#### 1. По динамике роста опухоли ( $K$ )

Замеры диаметров опухоли производили: до введения препарата, а затем на 3, 7, 10, 14 и 21-е сутки после ФДТ. Объем опухоли вычисляли по формуле:

$$V = \frac{1}{6} \pi \times d_1 \times d_2 \times d_3, \quad (1)$$

где  $d_{1,2,3}$  – три взаимно перпендикулярных диаметра опухоли;  $1/6\pi = 0,52$  – постоянная величина;  $V$  – объем опухоли в см<sup>3</sup>.

Затем рассчитывали коэффициент абсолютного прироста опухоли ( $K$ ) по формуле:

$$K = \frac{V_t - V_0}{V_0}, \quad (2)$$

где  $V_0$  – исходный объем опухоли (до введения препарата);  $V_t$  – объем опухоли на определенный срок наблюдения.

При этом рассматривались три градации  $K$  на каждые сутки:

- $K = -1$ , соответствует полной регрессии опухоли, когда визуально и пальпаторно опухоль не определяется.
- $-1 < K \leq 0$ , соответствует торможению роста опухоли.
- $K > 0$ , указывает на продолженный рост опухоли.

Среди животных, у которых наблюдался продолженный рост опухоли, вычисляли среднегрупповое значение коэффициента  $K$  и сравнивали его с контрольной группой.

#### 2. По количеству павших и выживших животных за период исследования

Для каждой исследуемой группы на все сроки наблюдения рассчитывали число погибших и оставшихся в опыте животных, а также их процент от начального объема группы. Затем среди оставшихся в опыте животных отмечалось абсолютное число и

процент полной регрессии, торможения и продолженного роста опухоли, причем процент вычислялся к количеству выживших на данный срок животных.

#### 3. По частоте метастазирования опухоли в легкие

За частоту метастазирования принимали количество животных с метастазами (Mts) к общему числу животных в группе и выражали в процентах. Интенсивность метастазирования – это средний показатель количества метастазов среди тех животных, у которых они были обнаружены. Для определения Mts животных по окончании сроков наблюдения забивали с помощью хлороформенного наркоза. Извлеченные легкие отмывали от крови, разделяли на доли и под микроскопом МБС-1 при увеличении в 12 раз подсчитывали Mts.

В зависимости от цели исследования животные были разделены на три группы.

**Группа 1** – двухфазное введение Фотолона (общая доза ФС составила 9,0 мг/кг в объеме 0,75 мл). Сначала вводили внутривенно 2/3 общей дозы Фотолона, что составляло 6 мг/кг в объеме 0,5 мл. Через 1,5 часа вводили внутривенно оставшуюся 1/3 дозы – 3 мг/кг в объеме 0,25 мл. Сразу после повторной инъекции Фотолона опухоль облучали лазером.

**Группа 2** – однократное внутривенное введение Фотолона в дозе 9 мг/кг в объеме 0,75 мл. Облучение лазером проводили через 1,5 часа.

**Группа 3** – контроль (нелеченные животные).

Математический анализ проведен с целью выявления опытной группы с наибольшим терапевтическим эффектом проводимого лечения. Результаты обработки данных STATISTICA 5.0. Для оценки различия между группами применяли односторонний непараметрический  $U$ -критерий Манна–Уитни. Рассматривались две гипотезы: нулевая (коэффициенты абсолютного прироста опухоли в исследуемых группах не отличаются от контроля) и альтернативная (данные коэффициенты меньше, чем в контрольной группе). Альтернативную гипотезу принимали, если вероятность нулевой гипотезы  $p_0 \leq 0,05$ .

#### Результаты исследования и их обсуждение

Результаты эксперимента представлены в табл. 1–7.

Исследования показали, что сразу после ФДТ ни у одного животного в группе 1 не было отмечено местной (в области облучения лазером) реакции. На третьи сутки у мышей отмечался резкий отек всей лапки. При пальпации мышечная ткань плотная. На месте облучения плотная корка. С этого времени и до 14-х суток опухоль у животных не пальпировалась. На 21-е сутки у половины мышей (50%) была полная регрессия опухоли, у другой половины незначительный продолженный рост. Рост опухоли был достоверно ниже, чем в контроле и при однократном внутривенном введении.

Таблица 1

## Двухфазное введение ФС, группа 1 (n = 6)

Характеристика	3-и сутки	7-е сутки	10-е сутки	14-е сутки	21-е сутки
Гибель – N (%)	–	–	–	–	–
Осталось – N (%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)
<b>К выжившим:</b>					
Полная регрессия	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	3 (50%)
Торможение роста					
Продолженный рост					3 (50%)
K абсолют. прироста	–	–	–	–	5,74 ± 3,46
Сравн. с контролем: Z					2,496
$P_{(двухсторон.)}$					<0,01
Сравн. с группой 2: Z					2,012
$P_{(двухсторон.)}$					<0,025
$V (V_0 = 0,027 \pm 0,003)$	0,00	0,00	0,00	0,00	0,145 ± 0,057

Таблица 2

## Однократное введение ФС, группа 2 (n = 6)

Характеристика	3-и сутки	7-е сутки	10-е сутки	14-е сутки	21-е сутки
Гибель – N (%)	–	–	–	–	–
Осталось – N (%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)
<b>К выжившим:</b>					
Полная регрессия	1 (16,7%)	2 (33,3%)	2 (33,3%)	2 (33,3%)	2 (33,3%)
Торможение роста					
Продолженный рост	5 (83,3%)	4 (66,7%)	4 (66,7%)	4 (66,7%)	4 (66,7%)
K абсолют. прироста	0,55 ± 0,11	2,86 ± 1,10	11,00 ± 2,31	21,37 ± 4,25	73,06 ± 12,66
Сравн. с контролем: Z	2,580	2,481	2,352	1,895	2,006
$P_{(двухсторон.)}$	<0,005	<0,01	<0,01	<0,03	<0,025
$V (V_0 = 0,031 \pm 0,002)$	0,047 ± 0,006	0,111 ± 0,032	0,342 ± 0,052	0,623 ± 0,075	2,075 ± 0,231

Таблица 3

## Контроль, группа 3 (n = 11)

Характеристика	3-и сутки	7-е сутки	10-е сутки	14-е сутки	21-е сутки
Гибель – N (%)	–	–	–	–	2 (18,2%)
Осталось – N (%)	11 (100%)	11 (100%)	11 (100%)	11 (100%)	9 (81,8%)
<b>К выжившим:</b>					
Полная регрессия					
Торможение роста					
Продолженный рост	11 (100%)	11 (100%)	11 (100%)	11 (100%)	9 (100%)
K абсолют. прироста	1,87 ± 0,22	10,36 ± 1,49	24,29 ± 3,700	34,78 ± 3,82	106,81 ± 8,66
$V (V_0 = 0,033 \pm 0,003)$	0,093 ± 0,010	0,380 ± 0,063	0,798 ± 0,076	1,150 ± 0,136	3,159 ± 0,281

Таблица 4

## Двухфазное введение ФС, серия II, группа 1 (n = 13)

Характеристика	3-и сутки	7-е сутки	10-е сутки	14-е сутки	21-е сутки
Гибель – N (%)	–	–	–	–	–
Осталось – N (%)	13 (100%)	13 (100%)	13 (100%)	13 (100%)	13 (100%)
<b>К выжившим:</b>					
Полная регрессия	13 (100%)	13 (100%)	13 (100%)	6 (46,2%)	2 (15,4%)
Торможение роста				2 (15,4%)	
Продолженный рост				5 (38,5%)	11 (84,6%)
K абсолют. прироста	–	–	–	3,03 ± 0,80	12,12 ± 3,16
Сравн. с контролем: Z				2,736	3,217
$P_{(двухсторон.)}$				<0,005	<0,001
Сравн. с группой 2: Z				1,688	2,288
$P_{(двухсторон.)}$				<0,05	<0,02
$V (V_0 = 0,036 \pm 0,003)$	0,00	0,00	0,00	0,126 ± 0,043	0,492 ± 0,127

Однократное введение ФС, серия II, группа 2 (n = 14)

Таблица 5

Характеристика	3-и сутки	7-е сутки	10-е сутки	14-е сутки	21-е сутки
Гибель – N (%)	–	–	–	–	1 (7,1%)
Осталось – N (%)	14 (100%)	14 (100%)	14 (100%)	14 (100%)	13 (92,9%)
<b>К выжившим:</b>					
Полная регрессия	6 (42,9%)	8 (57,1%)	6 (42,9%)		
Торможение роста	2 (14,2%)	1 (7,1%)		2 (14,2%)	
Продолженный рост	6 (42,9%)	5 (35,8%)	8 (57,1%)	13 (92,8%)	13 (100%)
K абсолют. прироста	0,84 ± 0,19	3,62 ± 2,23	4,86 ± 1,90	8,92 ± 1,88	39,49 ± 8,79
Срави. с контролем: Z	1,414	2,200	2,982	2,701	1,308
$P_{\text{гипотезис}}$	<0,1	<0,02	<0,005	<0,005	<0,1
$V(V_0 = 0,046 \pm 0,005)$	0,074 ± 0,012	0,226 ± 0,119	0,316 ± 0,113	0,379 ± 0,093	1,609 ± 0,300

Контроль, группа 3 (n = 11)

Таблица 6

Характеристика	3-и сутки	7-е сутки	10-е сутки	14-е сутки	21-е сутки
Гибель – N (%)	–	–	–	–	2 (22,2%)
Осталось – N (%)	9 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	7 (77,8%)
<b>К выжившим:</b>					
Полная регрессия					
Торможение роста					
Продолженный рост	9 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	7 (100%)
K абсолют. прироста	1,50 ± 0,28	13,19 ± 2,46	20,72 ± 3,43	21,82 ± 4,11	53,87 ± 8,17
$V(V_0 = 0,041 \pm 0,003)$	0,098 ± 0,009	0,556 ± 0,075	0,853 ± 0,099	0,898 ± 0,137	2,311 ± 0,397

Метастазирование меланомы  $V_0$  после ФДТ при различных схемах введения ФС

Таблица 7

Доза препарата	9,0 мг/кг					
	I серия			II серия		
Серия	1	2	3	4	5	6
Группа	1	2	3	4	5	6
Способ введения ФС	2-фазное	Однократное	Контроль	2-фазное	Однократное	Контроль
Частота метастазирования	0/6 (0%)	6/6 (100%)	8/9 (88,9%)	1/13 (7,7%)	7/13 (53,8%)	4/7 (57,1%)
Общее к-во Mts	0	30	42	1	35	23
Интенсивность метастазирования	0	5,0 ± 1,5	5,3 ± 0,9	1	5,0 ± 1,4	5,8 ± 1,9

В данной группе также сразу после ФДТ у животных не было отмечено местной реакции. На третьи сутки у мышей также имелся отек лапки, но мышечная ткань на ощупь довольно мягкая, на месте облучения корочка, т. е. реакция менее выраженная по сравнению с предыдущей группой. Однако у большинства мышей наблюдался продолженный рост опухоли. На 21-е сутки полная регрессия опухоли отмечена у 1/3 группы, у 2/3 наблюдали продолженный рост, причем коэффициент прироста был достоверно ниже, чем в контроле.

В контрольной группе пальпировалась опухоль у всех животных. К 21-м суткам погибли 2 мыши. Среди выживших особей у всех наблюдался продолженный рост опухоли.

По окончании исследования у всех животных проводилась оценка метастазирования меланомы в легкие. При этом среди животных при двухфазном введении ФС метастазы в легких не обнаружены. При однократном введении у всех животных были обнаружены метастазы, а в контроле – у 8 из 9 животных (табл. 7).

Полученные данные показали нам обнадеживающими в плане лечения меланомы, поэтому мы

решили провести II серию опытов на большем количестве животных с целью проверки повторяемости эффектов, полученных в первой серии. Ниже представлены результаты II серии опытов.

При двухфазном введении ФС первичная реакция на облучение отсутствовала, а на 3-и сутки была идентична реакции в I серии опытов. К 21-м суткам также повторилась картина, наблюдавшаяся в I серии: у 2 особей была полная регрессия опухоли, у остальных – незначительный продолженный рост. Рост опухоли также был достоверно ниже, чем в контроле, и при однократном внутрибрюшинном введении.

К 21-м суткам у всей группы с однократным введением имелся продолженный рост опухоли, не отличающийся от контроля.

Так же как и в предыдущей серии, в контрольной группе опухоль пальпировалась у всех животных. К 21-м суткам погибли 2 мыши. Среди выживших особей у всех наблюдался продолженный рост опухоли.

При оценке метастазирования меланомы в легкие среди животных из II серии опытов обнаружено, что при двухфазном введении ФС только в одном слу-

чае имелись метастазы. При однократном введении метастазы были обнаружены у 7 животных из 13, а в контроле у 4 из 7 животных (табл. 7). Вторая серия опытов подтвердила общую картину динамики роста опухоли при различных схемах введения ФС (рис.).

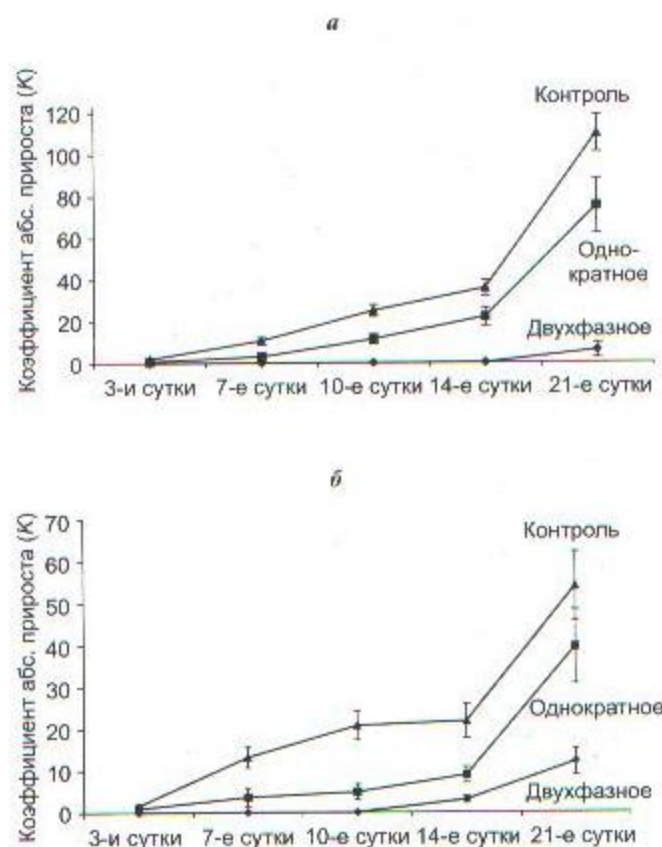


Рис. Динамика коэффициента абсолютного прироста меланомы  $V_{16}$  мышей при различных схемах введения Фотолона в дозе 9,0 мг/кг: а – в первой серии опытов; б – во второй серии опытов

Таким образом, проведенные исследования во второй серии подтвердили результаты первой серии. Исследования показали, что эффективность ФДТ меланомы  $V_{16}$  при введении Фотолона в два этапа значительно выше, чем при традиционном способе ее выполнения, т. е. когда ФС вводится однократно и выжидается время максимального накопления его в опухоли. Положительный эффект такого метода ФДТ проявляется в увеличении частоты полной регрессии опухоли, замедлении темпа ее роста не только по сравнению с нелечеными (контрольными) животными, но и с теми, у которых проводили ФДТ традиционным способом. При этом в обоих случаях условия лазерного облучения были одинаковыми. К 21-м суткам в группе с 2-этапным введением ФС не наблюдалось гибели животных, а главное – практически отсутствует метастазирование, что обусловлено использованной в данной группе методикой проведения ФДТ. При такой методике после первого

введения Фотолона препарат аккумулировался в основном в опухолевых клетках, поскольку с момента его введения проходил определенный промежуток времени. Повторное введение Фотолона и облучение лазером в момент сосудистой фазы накопления его в опухоли способствовали одновременному повреждению как клеток опухоли, так и ее сосудов. Что и приводило, на наш взгляд, к снижению частоты метастазирования. При традиционной ФДТ в сосудах, особенно в окружающих опухоль тканях, задерживается лишь незначительное количество ФС или вовсе отсутствует, поэтому такого тромбоза сосудов не наступает. Что касается продолженного роста опухоли, облучению лазером подвергается видимая часть опухоли с небольшим захватом окружающих тканей. При этом в зону облучения могли не попасть отдельные клетки, которые при инокуляции животному опухолевой эмульсии с током крови или лимфы могли быть занесены в более отдаленные от зоны облучения области и затем дать рост.

## Выводы

1. ФДТ меланомы мышей при введении Фотолона с учетом фаз максимального накопления ФС в опухолевых клетках (2/3 дозы за 1,5–2 часа до облучения опухоли лазером) и сосудах (1/3 – непосредственно перед облучением) способствует достоверному повышению ее эффективности по сравнению с ФДТ, проводимой после однократного введения ФС за 1,5–2 часа до облучения.
2. При методике двухфазного накопления ФС увеличивается процент животных с полной регрессией опухоли; снижается коэффициент абсолютного прироста опухоли, снижается частота метастазирования меланомы в легкие.

## Литература

1. Зяблицкий В.М., Любина Л.В., Михальская Т.Ю. Усиление антиметастатического действия лучевой и химиотерапии ингибиторами системы гемостаза // Мед. радиол. и радиацион. безопасность. 1998. Вып. 5. С. 14–17.
2. Лопатин В.Ф., Мардынский Ю.С., Горбушин Н.Г. Интегративная оценка сопротивляемости организма при термолучевой терапии онкологических больных // Росс. онколог. ж-л. 2007. 4. С. 26–32.
3. Ситдикова С.М., Аманджолов Б.С., Киселевский М.В., Дюпенко Ф.В. Специфичность рецидивирования и метастазирования экспериментальных перевиваемых опухолей карциномы Эрлиха и меланомы  $V_{16}$  // Булл. экп. биол. и мед. 2007. Т. 143. Вып. 1. С. 86–88.
4. Юнкер В.М., Тараскина Н.П. Роль факторов клеточного иммунитета в формировании спонтанных метастазов при реакции опухоли у мышей // Эксп. онкология. 1991. Т. 13. Вып. 5. С. 39–43.
5. Каплан М.А., Мардынская В.П., Сокол Н.И. и соавт. Экспериментальная фотодинамическая терапия меланомы  $V_{16}$  с производными Хлорина  $E_6$  // Физ. мед. 2006. Т. 16. Вып. 2. С. 9–14.

Поступила в редакцию 07.03.08 г.