

Niszczanie komórek nowotworowych glejaka C6 za pomocą fali ultradźwiękowej i kwasu aminolewulinowego (ALA)

W. Secomski¹, K. Bilmin², T. Kujawska¹, A. Nowicki¹, P. Grieb²

¹*Instytut Podstawowych Problemów Techniki, Polska Akademia Nauk, Pawińskiego 5b, 02-106 Warszawa, e-mail: wsecom@ippt.gov.pl*

²*Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, Polska Akademia Nauk, Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa, e-mail: kbilmin@cmdik.pan.pl*

Streszczenie

Nową metodą terapii antynowotworowej glejaków jest sonoterapia polegająca na jednoczesnym podawaniu leku kumulującego się w tkankach nowotworowych i napromieniowanie falą akustyczną. Skuteczność metody została sprawdzona na komórkach glejaka C6, poddanych działaniu kwasu aminolewulinowego (ALA) i fali ultradźwiękowej 1MHz o natężeniu 0.94, 1.88 i 3.77W/cm² przez 3 min. Jednoczesne działanie fali akustycznej i ALA było skuteczniejsze (pozostało 15%-13% żywych komórek) niż samej fali akustycznej (41%-27%) dla natężeń 0.94 i 1.88W/cm². Natężenie 3.77W/cm² było wystarczające do zniszczenia większości komórek niezależnie od obecności ALA. Podczas eksperymentu zaobserwowano powstawanie fali stojącej, zwiększającej natężenie 7x-10x. Otrzymane wyniki wskazują na przydatność nowej techniki sonodynamicznej do terapii nowotworów.

1. Wstęp

Glejaki są grupą złośliwych nowotworów mózgu. Stanowią około 70% wszystkich nowotworów wewnątrzczaszkowych i są główną przyczyną zgonów w tej grupie guzów. Glejaki są usuwane chirurgicznie oraz leczone radioterapią lub chemioterapią. Obecnie poszukiwane są nowe metody leczenia, skuteczniejsze, mniej inwazyjne i ze zmniejszonymi skutkami ubocznymi. Do najnowszych technik leczenia pacjentów z glejakami mózgu należy terapia fotodynamiczna (Photo-Dynamic Therapy, PDT) [1, 2] oraz terapia sonodynamiczna (Sono-Dynamic Therapy, SDT) [3, 4, 5, 6, 7, 8]. W obu przypadkach pacjentowi podaje się lek kumulujący się w komórkach nowotworowych, który następnie jest uaktywniany przez strumień światła (PDT) lub falę ultradźwiękową (SDT), co prowadzi do zniszczenia nowotworu.

Do terapii antynowotworowej glejaków stosuje się kwas 5-aminolewulinowy (ALA), prowadzący do wybiórczej akumulacji protoporfiryny IX (PpIX) w komórkach nowotworowych [9, 10, 11, 12]. Pod wpływem światła fioletowego 380-420 nm, protoporfiryna PpIX ulega wzbudzeniu, generując wolne rodniki prowadzące do zniszczenia komórki nowotworowej. Terapia PDT z wykorzystaniem kwasu ALA jest stosowana z powodzeniem w leczeniu nowotworów skóry, pęcherza moczowego i przełyku [13]. Stosowa-

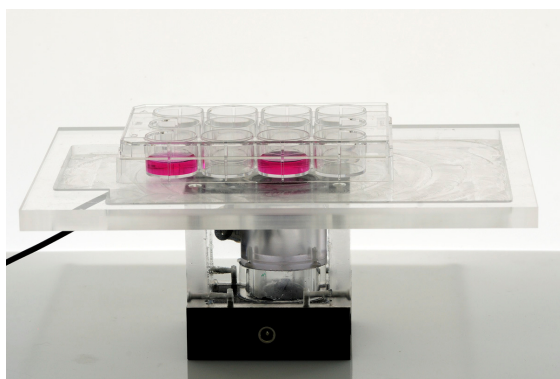
nie terapii PDT do leczenia nowotworów mózgu jest niemożliwe ze względu na znikomą przenikalność światła przez tkanki mózgu i czaszkę. Badania nad zastosowaniem ultradźwięków do celów terapeutycznych wykazały, że fala ultradźwiękowa może pełnić podobną rolę do światła i uaktywniać protoporfirynę PpIX. Szczegółowy mechanizm oddziaływania fali akustycznej na PpIX pozostaje nieznany. Terapia sonodynamiczna SDT stwarza szansę na leczenie nowotworów wewnątrzczaszkowych.

Celem pracy była próba zniszczenia komórek nowotworowych. Badania przeprowadzono w warunkach in-vitro, na komórkach szczurzego glejaka C6. Po podaniu kwasu 5-aminolewulinowego (ALA), komórki nadźwiękowiano falą akustyczną. Po eksperymencie, zliczano żywe komórki, wyznaczając skuteczność terapii. Zakres pracy obejmował wykonanie stanowiska pomiarowego do nadźwiękowania komórek in-vitro, pomiary mocy akustycznej i ciśnienia generowanych przez przetwornik ultradźwiękowy oraz badania skuteczności niszczenia komórek nowotworowych dla trzech mocy fali akustycznej.

2. Materiały i metody

Zbudowany układ pomiarowy do nadźwiękowania komórek jest przedstawiony na rys. 1. Wewnątrz

plexiglasowego naczynia umieszczono przetwornik ultradźwiękowy, wykonany z płaskiego krążka piezoceramiki Pz26 o średnicy 26 mm i częstotliwości rezonansowej 1.0 MHz. W dnie naczynia wbudowano termostat elektroniczny stabilizujący temperaturę 37°C. Naczynie przykryto plexiglasową płytką z wyfrezowanym wgłębieniem w kształcie litery T. Obszar wyfrezowany umożliwia przesuwanie płytki z komórkami nowotworowymi tak, aby wybrany otwór znajdował się nad przetwornikiem ultradźwiękowym z dokładnością 0.1 mm. Wykorzystane płytki z komórkami miały otwory o średnicy wewnętrznej 22.2 mm, co gwarantowało równomierny rozkład fali akustycznej generowanej przez przetwornik o średnicy 26 mm. Płytki z otworami były wykonane z polistyrenu, a grubość denka wynosiła 1.2 mm. Odległość pomiędzy powierzchnią przetwornika, a denkiem płytki wynosiła 6.5 mm. Całkowita odległość pomiędzy przetwornikiem a komórkami nie przekraczała 8 mm, co gwarantowało równomierny rozkład poprzeczny pola akustycznego na poziomie komórek. Naczynie i wyfrezowane wgłębienie było wypełnione odgazowaną wodą destylowaną o temperaturze 37°C, stabilizowanej przez termostat w dnie. Przy przesuwaniu płytki zwracano uwagę, aby nie pojawiły się pęcherzyki powietrza pomiędzy przetwornikiem a płytką. Do pobudzania przetwornika ultradźwiękowego wykorzystano wzmacniacz o mocy 100 W typu 3100LA (ENI, USA), sterowany generatorem 33250A (Agilent, USA). Przetworniki pobudzano paczkami fal zawierających 1000 okresów sinusoidy 1.0 MHz, powtarzanych co 2.5 ms, współczynnik wypełnienia wynosił $t/T = 0.4$.



Rys. 1. Naczynie do nadźwiękowania komórek.

Przed eksperymentem zmierzono moc i ciśnienie akustyczne generowane przez przetwornik. Moc fali akustycznej mierzono na wadze ciśnień UPM-DT-1E (Ohmic Instruments, MD, USA). Amplitudę napięcia sterującego na wyjściu generatora ustawiano tak, aby otrzymać średnią moc akustyczną 5 W, 10 W oraz 20 W. Z pomocą hydrofonu igłowego o średnicy 0.2 mm (Precision Acoustics, UK), zmierzono ciśnienia fali akustycznej w odległości 1 mm od przetwornika oraz 1 mm nad denkiem płytki z komórkami. Otwór

w płytce był wypełniony 1 ml wody do wysokości 2.5 mm tak, jak w eksperymencie z komórkami. Mierzono amplitudę fali bezpośredniej oraz maksymalną amplitudę fali stojącej, spowodowanej odbiciem fali akustycznej od powierzchni wody w otworze. Pomiar ciśnienia wykonano umieszczając hydrofon na osi przetwornika ultradźwiękowego, prostopadle do jego powierzchni. Do rejestracji mierzonych przebiegów wykorzystano oscyloskop 62xi (LeCroy, USA).

Do badania wykorzystano komórki glejaka C6 szczura, uzyskane z American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Komórki wysiano na szalce Petriego po dodaniu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) z dodatkiem 10% fetal bovine serum (FBS) oraz 100 U/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny. Komórki hodowano w temperaturze 37°C w wilgotnej atmosferze zawierającej 5% dwutlenku węgla. Medium DMEM wymieniano co 3-4 dni. Następnie komórki wysiewano w co drugim otworze 12 otworowej płytki 12 Well Cell Culture Plate 665-180 (Greiner, USA). W jednym otworze umieszczano $2 \cdot 10^5$ komórek oraz medium DMEM z dodatkiem 10% serum FBS oraz penicyliny i streptomycyny. Po 24 h inkubacji w temperaturze 37°C, medium DMEM zastępowano nowym bez serum FBS. Do medium o objętości 1ml dodawano 1mM kwasu 5-aminolewulinowego ALA (Chemos, Polska). Po kolejnych 24 h inkubacji, komórki zawierające ALA były poddawane działaniu ultradźwięków o średniej mocy akustycznej 5 W, 10 W i 20 W przez 3 min bez dostępu światła. Po eksperymencie, komórki wracały do inkubatora na kolejne 24 h, a następnie 100 µl roztworu Cell Counting Kit 8 (CCK-8, Sigma, USA) dodawano do każdego otworu płytki z komórkami. Po 3 h inkubacji, płytki z komórkami kładziono na wstrząsarce przez 15 min. Procent żywych komórek określano przez pomiar absorpcji światła 570 nm w spektrofotometrze Epoch Microplate Reader (BioTek, USA).

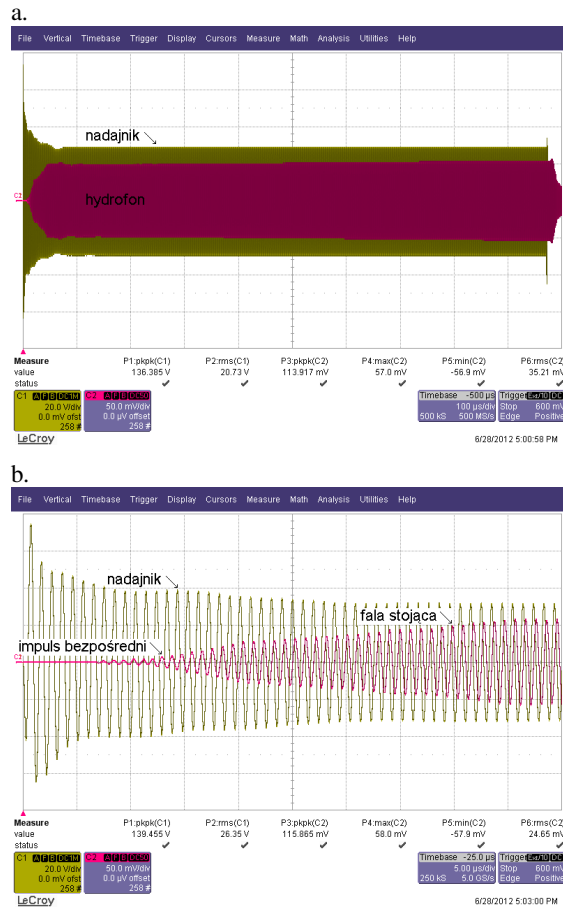
3. Wyniki

Tabela I. Wyniki pomiarów mocy i ciśnienia.

P_{A1}	5 W	10 W	20 W
I_{SPTA1}	0.94 W/cm ²	1.88 W/cm ²	3.77 W/cm ²
p_{A2}	0.50 MPa _{p-p}	0.72 MPa _{p-p}	1.08 MPa _{p-p}
I_{SPTA2}	0.85 W/cm ²	1.74 W/cm ²	3.90 W/cm ²
p_{A3}	0.20 MPa _{p-p}	0.29 MPa _{p-p}	0.43 MPa _{p-p}
I_{SPTA3}	0.13 W/cm ²	0.28 W/cm ²	0.62 W/cm ²
p_{A4}	1.68 MPa _{p-p}	2.01 MPa _{p-p}	2.81 MPa _{p-p}
I_{SPTA4}	9.4 W/cm ²	13.5 W/cm ²	26.4 W/cm ²

Wyniki pomiarów mocy i ciśnienia akustycznego przedstawiono w tabeli I. Moc akustyczną P_{A1} zmierzono na wadze ciśnień, a natężenie I_{SPTA1} (Space Peak Time Average Intensity) obliczono z mocy P_{A1} Podzie-

lonej przez powierzchnię przetwornika 5.31 cm². Ciśnienie p_{A2} i natężenie I_{SPTA2} zmierzono 1 mm od powierzchni przetwornika. Ciśnienie p_{A3} i natężenie I_{SPTA3} zmierzono wewnątrz otworu płytki z komórkami, 1 mm powyżej dna w warunkach bez fali stojącej. Ciśnienie p_{A4} i natężenie I_{SPTA4} zmierzono dla maksymalnej amplitudy fali stojącej wewnątrz otworu płytki z komórkami, 1 mm powyżej dna. Przebiegi napięcia sterującego przetwornik i napięcia z hydrofonu przedstawiono na rys. 2. Hydrofon umieszczono wewnątrz otworu płytki z komórkami, 1 mm powyżej dna. Przedstawiono dwa przebiegi: obejmujący 1000 okresów sygnału pobudzającego i pierwsze 50 okresów pokazujące wzrost amplitudy fali stojącej

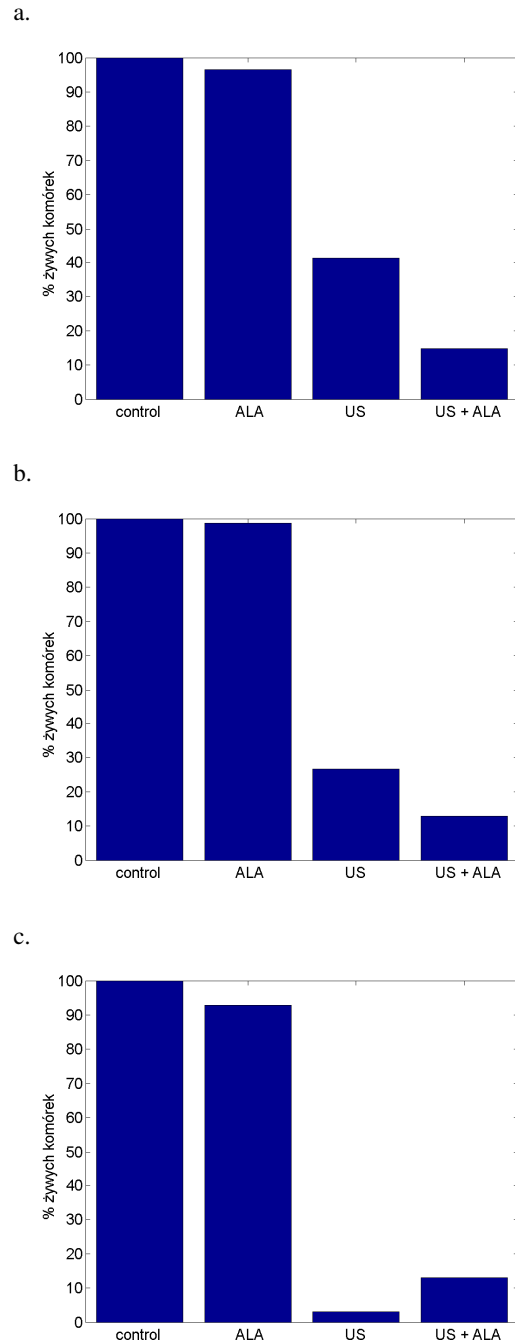


Rys. 2. Przebiegi napięcia na przetworniku i hydrofonie. a. 1000 okresów – 100 μ s/div, b. 50 okresów – 5 μ s/div.

Tabela II. Procent żywych komórek po badaniu

P_{A1}	5 W	10 W	20 W
kontrola	100%	100%	100%
ALA	96.5%	98.7%	92.4%
US	41.3%	26.6%	3.1%
US+ALA	14.8%	12.6%	12.9%

Wyniki skuteczności terapii przedstawiono w tabeli II jako procent żywych komórek. Przyjęto, że w grupie kontrolnej pozostało 100% żywych komórek. Pozostałe wiersze oznaczają komórki z kwasem 5-aminolewulinowym (ALA) niepoddane nadźwiękowianiu, komórki bez kwasu 5-aminolewulinowym, ale poddane nadźwiękowianiu (US) oraz komórki z kwasem 5-aminolewulinowym poddane nadźwiękowianiu (US+ALA).



Rys. 3. Graficzne przedstawienie wyników eksperymentu dla trzech mocy fali ultradźwiękowej: a. 5 W, b. 10 W, c. 20 W.

4. Wnioski

1. Potwierdzono eksperymentalnie skuteczność metody terapii sonodynamicznej do niszczenia komórek nowotworowych glejaka C6 za pomocą fali ultradźwiękowej i kwasu 5-aminolewulinowego (ALA).

2. Uzyskane wyniki zależały od zastosowanej mocy fali ultradźwiękowej. Dla mocy 5 W i 10 W zanotowano zdecydowany wzrost skuteczności niszczenia komórek przy pomocy fali ultradźwiękowej i kwasu 5-aminolewulinowego w porównaniu z falą ultradźwiękową bez ALA. Moc akustyczna 20 W okazała się na tyle duża, aby zniszczyć większość komórek nawet bez dodania kwasu 5-aminolewulinowego.

3. Czynnikiem sprzyjającym niszczeniu komórek było zjawisko fali stojącej, wywołane odbiciem fali na granicy woda-powietrze, które wielokrotnie natężyło fali akustycznej w naczyniu z komórkami.

4. W artykule przedstawiono wstępne wyniki. Praca wymaga kontynuacji z innymi mocami fali akustycznej, czasem nadźwiękowania oraz ilości kwasu 5-aminolewulinowego (ALA) dodawanego do komórek.

Piśmiennictwo

[1] Graczyk A. (1999). Fotodynamiczna metoda rozpoznawania i leczenia nowotworów. *Dom Wydawniczy Bellona*.

[2] Castano A, Demidova T, Hamblin M. (2005). Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2, 1-23.

[3] Umemura S, Yumita N, Okano Y, et al. (1997). Sonodynamically-induced in vitro cell damage enhanced by adriamycin. *Cancer Lett* 121 (2): 195-201.

[4] Yumita N, Umemura S. (2003). Sonodynamic therapy with photofrin II on AH130 solid tumor - Pharmacokinetics, tissue distribution and sonodynamic antitumoral efficacy of photofrin II. *Cancer Chemother Pharm* 51 (2): 174-178.

[5] Yu TH, Wang ZB, Mason TJ. (2004). A review of research into the uses of low level ultrasound in cancer therapy. *Ultrason Sonochem* 11 (2): 95-103.

[6] Hiraoka W, Honda H, Feril LB, et al. (2006). Comparison between sonodynamic effect and photodynamic effect with photo sensitizers on free radical formation and cell killing. *Ultrason Sonochem* 13 (6): 535-542.

[7] Feril LB, Tachibana K, Ogawa K, et al. (2008). Therapeutic potential of low-intensity ultrasound (part 1): thermal and sonomechanical effects. *J Med Ultrason* 35 (4): 153-160.

[8] Feril LB, Tachibana K, Ikeda-Dantsuji Y, et al. (2008). Therapeutic potential of low-intensity ultrasound (part 2): biomolecular effects,

sonotransfection, and sonopermeabilization. *J Med Ultrason* 35 (4): 161-167.

[9] Grieb P. (2004). Kwas 5-aminolewulinowy (ALA) i jego zastosowania w neurochirurgii. *Neurologia i Neurochirurgia Polska* 38 (3),201-207.

[10] Friesen SA, Hjortland GO, Madsen SJ, et al. (2002). 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic detection and therapy of brain tumors (Review). *Int J Oncol* 21 (3): 577-582

[11] Kennedy J, Pottier RH, Pross DC. (1990). Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX. Basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B* 6, 143-148.

[12] Peng Q, Warloe T, Moan J, et al. (2001). Antitumor effect of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy can be enhanced by the use of a low dose of photofrin in human tumor xenografts. *Cancer Res* 61 (15): 5824-5832.

[13] Kalka K, Merk H, Mukhtar H. (2000). Photodynamic therapy in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 42 (3): 389-413.