

На правах рукописи

ЕРЕМЕЕВ ДМИТРИЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ В СТЕРЕОТАКСИЧЕСКОМ
ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ГЛУБИННО
РАСПОЛОЖЕННЫХ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО
МОЗГА**

(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

14.00.27 – хирургия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Екатеринбург – 2008

Работа выполнена в Областном государственном учреждении здравоохранения Центре организации специализированной медицинской помощи «Челябинский государственный институт лазерной хирургии» и в Южно-Уральском научном центре Российской академии медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Исмагилова Светлана Тагировна

доктор медицинских наук, профессор

Гиниатуллин Равиль Усманович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Киршина Ольга Владимировна

доктор медицинских наук, профессор

Казачков Евгений Леонидович

Ведущее учреждение: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Омская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» г. Омск

Защита состоится «24» декабря 2008 г. в 10.00 часов на заседании совета по защите докторских диссертаций Д 208.102.01, созданного при Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Уральская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», по адресу: 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, д.3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО УГМА Росздрава по адресу: 620028, г. Екатеринбург, ул. Ключевская, д.17, а с авторефератом на сайте академии www.usma.ru

Автореферат разослан «21» ноября 2008г.

Ученый секретарь совета
по защите докторских диссертаций,
доктор медицинских наук,
профессор

Руднов В.А

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Нейроонкология на сегодняшний день является одной из самых обширных областей нейрохирургии. Это связано с неуклонным ростом нейроонкологической заболеваемости в стране и за рубежом. По гистогенетической классификации опухолей головного мозга среди взрослых 40 – 45% всех первичных опухолей головного мозга составляют нейроэктодермальные (глиомы), в то же время среди детей глиомы составляют около 75% (Ярцев В.В., 1997). В настоящее время имеются четыре основных метода лечения опухолей головного мозга: хирургический, лучевой, химиотерапевтический и комбинированный (Садырин А.В., 2007). Несмотря на применение новых операционных технологий процент рецидивов глиальных опухолей головного мозга после применения этих методов лечения по данным разных авторов составлял 90 - 98 % (Kondziolka D., 2003), постоперационная летальность при глубинных опухолях составляла до 45% (Олюшин В.Е., 2004).

В последние годы успешно развивается метод фотодинамического терапевтического воздействия (ФДТ) на опухоли головного мозга, но ввиду недостаточно отработанных режимов лазерного облучения часть опухолей рецидивирует (Ступак В.В., 2007). Для точной доставки разрушающего опухоль субстрата во всем мире используется метод стереотаксиса и стереотаксической нейронавигации (Pirrotte B., 2004). Мы впервые применили стереотаксическую методику для подведения лазерного излучения при фотодинамическом воздействии к центру внутримозговой глиальной опухоли. В отечественной и зарубежной литературе на настоящее время не было данных о режимах ФДТ при глубинных новообразованиях головного мозга. Это вызвало необходимость экспериментального подбора таких доз лазерного излучения, которые бы минимально повреждали головной мозг, окружающий опухоль. Таким образом, для снижения постоперационной летальности, количества рецидивов и увеличения безрецидивного периода после оперативного лечения, уменьшения

неврологических нарушений после операций нами предложен метод фотодинамического воздействия на глубинно расположенные глиальные опухоли, осуществляемый посредством стереотаксиса.

Цель исследования - разработать в эксперименте на крысах метод ФДТ глубинно расположенных глиальных опухолей головного мозга с помощью стереотаксического доступа.

Задачи исследования

1. Воспроизвести на крысах злокачественные глиальные опухоли головного мозга путем трансплантации их от человека.
2. Изучить характер морфологических изменений в мозге крыс после воспроизведения у них опухолей.
3. Подобрать адекватные режимы лазерного излучения при стереотаксической фотодинамической терапии опухолей головного мозга.
4. Изучить динамику морфологических изменений в тканях головного мозга животных после ФДТ глиальных опухолей.

Научная новизна работы

1. Впервые с помощью стереотаксического доступа воспроизведены у крыс злокачественные глиальные опухоли головного мозга путем трансплантации их от человека.
2. Исследованы температурные режимы в области лазерного излучения глубинных опухолей головного мозга у животных.
3. Изучена динамика морфологических изменений в тканях головного мозга крыс после проведения стереотаксической ФДТ глубинных глиальных опухолей головного мозга. Показано, что ФДТ вызывала в ранние сроки наблюдения некроз опухоли в головном мозге и формирование через 1-4 месяца мелкоочагового рубца в зоне лазерного облучения. Это сопровождалось регрессом неврологических нарушений у животных.
4. На основании полученных результатов в эксперименте разработан способ стереотаксической ФДТ глубинных глиальных опухолей головного мозга с помощью стереотаксического доступа. По результатам экспертизы ФИПС

получено положительное решение о выдаче патента на изобретение от 1 июля 2008 г. по заявке № 2007136084/14 (039468) «Способ лечения глиальных опухолей головного мозга».

Практическая значимость

Разработанный в эксперименте метод стереотаксической ФДТ глубинных глиальных опухолей головного мозга может служить основой для апробации его в клинике.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Злокачественные глиальные опухоли головного мозга человека, трансплантированные в мозг крыс, растут инфильтративно, вызывая неврологические расстройства и сходны по морфологическому строению.
2. Фотодинамическая терапия глубинных глиальных опухолей головного мозга у крыс в отработанных режимах с применением стереотаксического доступа вызывает некроз опухолевой ткани и формирование рубца в зоне лазерного излучения. При этом в динамике наблюдений отмечается регресс и исчезновение неврологических нарушений.

Апробация диссертации

Основные положения работы доложены и обсуждены на научной Российской конференции: “Комбинированное лечение опухолей головного мозга” (Екатеринбург, 2004г.); на совместном заседании сотрудников ЧГИЛХ, кафедры патологической анатомии и факультетской хирургии ЧГМА, кафедры хирургии УГМАДО (2007г.)

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, три из которых в журналах, рекомендованных ВАК РФ, две в материалах научно – практических конференций.

Внедрение результатов исследования

Результаты работы используются: в научно-исследовательской деятельности ЧГИЛХ; в практической работе нейрохирургического отделения №2 ЧГКБ №3 при лечении больных с глиальными опухолями головного мозга; в учебном процессе на курсе нейрохирургии УГМАДО.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 137 страницах машинописного текста, состоит из введения, описания материалов и методов исследования, главы собственных исследований, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Она включает 137 отечественных и 113 зарубежных источников. Работа содержит 34 рисунка, 5 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В соответствии с целью и задачами исследования нами проведен эксперимент на 344 беспородных половозрелых разнополых крысах массой 150-200г.

Всем 344 животным проводилась трансплантация в головной мозг опухолевого трансплантата, взятого во время операции в нейрохирургической клинике ЧГИЛХ у больных с глиальными опухолями головного мозга. Все манипуляции на экспериментальных животных проводили в соответствии с требованиями Этического комитета СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, разработанной на основе Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

231 животному проведена трансплантация глиобластомы (III-IV степени злокачественности) от 27 больных, 113 крысам – анапластической (злокачественной) астроцитомы от 16 больных.

Пациенты “доноры” были в возрасте от 28 до 79 лет (мужчин – 17, женщин – 26). Диагноз опухоли, удаленной у больного, подтверждался гистологически в патологоанатомическом отделении МУЗ ГКБ №3.

Ткань опухоли пересаживалась после оперативного ее удаления у человека не позднее 1 часа после анализа данных экспресс биопсии.

Для подавления иммунитета у животных нами использовалось внутримышечное введение преднизолона по 3,0 мг в течение 10 дней с момента трансплантации опухолей (Яблоновская Л.Я., 1967).

Гомогенат опухолевой ткани для трансплантации готовился нами в собственной модификации (в отличие от методики Л.Я. Яблоновской (1967), при которой трансплантировались кусочки опухолевой ткани) в стерильной стеклянной колбе. Разобшение клеток производилось механически. Для определения степени разобшения клеток в гомогенате брались мазки. Объем вводимого гомогената составлял 1 мм³.

Оперативное вмешательство проводилось под внутрибрюшинным введением раствора кетамина – 0,2 – 0,4 мл.

По окончании вмешательства животные выводились из наркоза и помещались в клетки с последующим уходом.

С момента трансплантации опухоли у всех животных оценивалось общее состояние и неврологическая симптоматика: 1. наличие общемозговой симптоматики, выразившейся в виде заторможенности, сонливости, отказа от принятия пищи, 2. наличия очаговой неврологической симптоматики – появления моно и гемипарезов, 3. появление эпилептических приступов по типу джексоновской эпилепсии или генерализованных.

140 животных погибли после операции трансплантации опухоли в раннем послеоперационном периоде (1 – 15 суток) в результате кровотечения из сосудов мозга (136) и менингоэнцефалита (4). Через 1, 5 месяца две крысы погибли от абсцесса головного мозга. В эксперименте осталось 202 крысы (табл.1).

Через 1,5-2 мес. после трансплантации у животных с помощью стереотаксического аппарата брались биоптаты из головного мозга с целью подтверждения приживления опухоли и ее гистологической верификации.

У 177 крыс приживления опухолей (глиобластомы у 126, астроцитомы у 51) не регистрировалось, их выводили из эксперимента на 10-12 сутки после взятия биоптата.

2 животных с верифицированной опухолью погибли в результате прогрессирования опухоли.

Таблица 1. Распределение животных по сериям эксперимента

Серии опытов	Число животных
1-я серия эксперимента (воспроизведение опухолей головного мозга): – находилось в опыте – опухоль прижилась – погибло от осложнений – опухоль рассосалась	344 25 (в т.ч. 2 погибло от прогрессирующего роста опухоли) 142 177
2-я серия эксперимента (отработка режимов лазерного воздействия на опухоль головного мозга): – находилось в опыте – введение фотолонна + лазерное облучение – лазерное облучение без введения фотолонна (группа сравнения)	6 (с привитой опухолью, полученной в 1-й серии опытов) 3 3
3-я серия эксперимента (ФДТ опухолей головного мозга): – находилось в опыте – выведено из опыта через 1 месяц – выведено из опыта через 4 месяца	17 (с привитой опухолью, полученной в 1-й серии опытов) 12 5

20 животным с воспроизведенными опухолями вводился фотосенсибилизатор; они были разделены на 2 группы:

1-ая – 3 животных, на которых отрабатывались параметры лазерного излучения под контролем термометрии в очаге воздействия;

2-ая – 17 животных, на которых проводилась фотодинамическая терапия с динамическим наблюдением.

Кроме того, при обработке параметров лазерного излучения для сравнения гистологических результатов, проведено лазерное облучение 3 животным с воспроизведенными опухолями без введения фотосенсибилизатора. Для проведения фотодинамической терапии использовали фотосенсибилизатор Фотолон. Для лазерного воздействия использовался переносный диодный лазерный аппарат «Милон» с длиной волны 660 нм. Лазерное излучение подводилось через моноволоконный кварцевый световод диаметром 600 мкм.

Накопление фотосенсибилизатора в опухолевой ткани определялось у 3 животных с воспроизведенными опухолями перед обработкой режимов лазерного излучения. Для этого измерялась люминесценция опухолевой ткани с помощью системы “Камин – видео -3” (фирмы “Biospec”, Москва).

Оперативный доступ осуществлялся с помощью изготовленного нами стереотаксического аппарата.

Термометрия осуществлялась термодатчиками. В качестве термодатчиков использовались стандартные калиброванные термопары из сплавов хромель – алюмель размером 0,5 мм X 5 мм. Термопары заизолированными проводами подключались через микросхему к цифровому осциллографу, на котором регистрировались и записывались кривые температуры головного мозга.

Животных 1-ой группы и 3 животных группы сравнения выводили из эксперимента в конце 7-х суток после оперативного вмешательства, 2-ой через 30 (12 животных) и 120 (5 животных) суток путем внутрисердечного введения 0,5 мл 7,5% раствора хлористого калия.

У трупов животных вскрывалась полость черепа, головной мозг извлекался полностью. Выборка материалов осуществлялась с тщательным осмотром препаратов, проводился дополнительный контроль соответствия трепанационного отверстия в черепе относительно левой теменной доли головного мозга, регистрировались изменения окраски, консистенции головного мозга, размеров его и очагов лазерного воздействия. Препараты тщательно маркировались и фиксировались в 10% растворе формалина.

При макроскопическом исследовании делались параллельные фронтальные срезы головного мозга, включая левую теменную долю, с последующей заливкой в парафин. С парафиновых блоков приготавливались серийные срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином для обзорной микроскопии. Для выявления коллагеновых волокон использовалась окраска пикрофуксином по методу ван Гизона.

Исследования проводились на микроскопе «Leica DMRXA» (Германия). Морфометрическое исследование - с помощью компьютерной программы анализа изображений «ДиаМорф Сито – W», Россия, Москва.

Для объективизации параметров морфологических изменений, кроме описательных, использовали следующие счетные признаки: размеры опухолей и рубцов (в мкм с пересчетом в мм); площадь очага в зоне лазерного воздействия (в мм²); количество фибробластов и фуксинофильных волокон в рубцах на условной единице площади; число кровеносных сосудов в рубцах на условной единице площади.

Статистическая обработка цифровых данных проводилась методом вариационной статистики с определением среднеквадратичного отклонения σ , средней ошибки сравниваемых величин M_1 , M_2 , коэффициента достоверности t и доверительной вероятности p с помощью программы Excel 8.0 из пакета Microsoft Office 97. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клинические и морфологические результаты трансплантации глиальной опухоли человека в мозг крыс

В 142 животных погибло от осложнений трансплантации опухолей, 2 крысы погибли от абсцесса головного мозга через 1,5 месяца после трансплантации.

У 25 животных в сроки от 1,5 до 2 месяцев клинически отмечено появление сочетания общемозговой симптоматики в виде заторможенности, сонливости, отказе от пищи наряду с парезами и эпилептическими приступами. У 202 животных брались биоптаты из головного мозга с целью подтверждения приживления опухолей и их гистологической верификации.

Результаты исследования показали, что у 25 (12,3%) из 202 животных отмечено приживление опухолей: у 19 (9,3%) – глиобластомы, у 6 (2,9%) крыс – анапластической астроцитомы (таб. 2).

Таблица 2. Распределение животных по гистологической характеристике привитой опухоли

Гистологическая характеристика	Количество животных	
	Абсолютные цифры	Проценты
1. Глиобластомы	19	(9,3%)
2. Анапластические астроцитомы	6	(2,9%)
	Всего: 25	Всего: (12,3%).

Два животных погибло через 2 месяца после трансплантации в результате прогрессирующего роста опухоли. Макроскопическое исследование головного мозга 2 погибших крыс показало, что опухоли (глиобластомы) локализовались в левой теменной доле, границы их были довольно четкими. Размеры опухоли были 0,5 x 0,3 см у одного и 0,6 x 0,4 – у другого животного. На разрезе опухолевая ткань была

серовато желтого цвета. Прилежащее мозговое вещество белесовато – серого цвета, отечное. Микроскопически опухоли были представлены полиморфными клетками, в которых отмечались патологические митозы. Регистрировался инфильтрирующий рост опухоли, в том числе по периваскулярным пространствам. Выявлялись очажки некроза, окруженные темными вытянутыми клетками. Встречались также сосудистые клубочки, сформированные в результате пролиферации эндотелиальных и адвентициальных клеток. Воспалительная реакция вокруг опухолей была слабо выраженной. Сходные микроскопические изменения отмечались также и в биопсийном материале, полученном от 17 выживших животных.

При сопоставлении результатов гистологического исследования опухолей, удаленных у больных людей и обнаруженных в биопсийном и аутопсийном материалах у крыс установлено их сходство.

В биопсийном материале, полученном от 6 крыс с воспроизведенными анапластическими (злокачественными) астроцитомами, при микроскопическом исследовании отмечались следующие особенности: повышение плотности расположения клеток, умеренно выраженный полиморфизм, патологические митозы. В ткани мозга, окружающей опухоль, воспалительная реакция была незначительной, а иногда отсутствовала. Сходные морфологические изменения обнаруживались и в операционном материале у больных, от которых трансплантировались опухоли в мозг данным животным.

У оставшихся 177 из 202 животных не было зарегистрировано появления эпилептических приступов и парезов конечностей. По данным гистологического исследования биопсийного материала в этой группе животных, взятого через 1,5 – 2 месяца после пересадки опухоли, приживления опухолей не регистрировалось. Животные выводились из опыта на 10-12 сутки после взятия биопсии. Результаты морфологического исследования показали, что трансплантированные

опухоли рассосались. При этом у 145 крыс на месте трансплантата определялся тканевой дефект в виде кистовидной полости, проникающей через кору, белое вещество до левого бокового желудочка или в стволовые структуры мозга с наличием в просвете зернистых шаров, содержащих кровяной пигмент. У остальных 32 животных на месте трансплантата сформировался глиомезенхимальный рубец, пронизанный сосудами.

Обоснование параметров лазерного воздействия на опухоли головного мозга крыс

Отработка параметров лазерного воздействия основывалась на данных термометрии в зоне воздействия и морфологическом исследовании мозга после ФДТ. Руководствовались необходимостью выбора режима лазерного воздействия, достаточного для достижения эффекта некроза опухоли и не вызывающего термического повреждения мозга.

При использовании мощности излучения 50 мВт на двух крысах с введением и без введения фотосенсибилизатора графики термометрии практически не отличались друг от друга. До начала лазерного воздействия температура мозга регистрировалась на обоих датчиках в 40,3 °С. При воздействии в течение 5 мин. 20 секунд (плотность энергии = 7,11 Дж/мм², плотность мощности = 22,22 мВт/ мм²) на расстоянии 2 мм от зоны воздействия (1-ая термопара) подъем температуры начался через 50 сек и она плавно повысилась до 42,7°С в течение 160 сек. Далее температура не повышалась несмотря на продолжающееся лазерное воздействие, даже несколько снизилась в течение последующих 140 секунд – на 0,7°С, до 42°С. После прекращения лазерного воздействия на 320 секунде с начала лазерного облучения температура понизилась до исходной за 40 секунд. На термопаре, находящейся в тканях головного мозга на расстоянии 5 мм от зоны облучения (2-ая

термопара), отмечался подъем температуры с 50 сек до 40,6°C. Далее температура также не повышалась и к 300 секунде эксперимента снизилась до исходной. После прекращения лазерного воздействия температура была такой же, как до эксперимента.

Графики термометрии при использовании мощности излучения 100 мВт у крысы с введением фотосенсибилизатора и без него отличались незначительно. Начальная температура на обеих термопарах регистрировалась в 41,5°C (рис. 1).

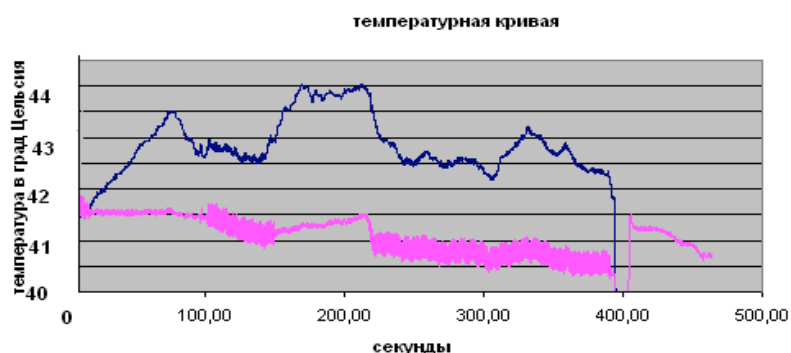


Рис. 1. Температурные изменения в тканях головного мозга при использовании излучения мощностью 100 мВт.

При воздействии в течение 6 минут (плотность энергии = 16 Дж/мм², плотность мощности = 44,44 мВт/ мм²) на термопаре, находящейся в тканях головного мозга на расстоянии 2 мм от зоны облучения (1-ая термопара), отмечался плавный подъем температуры за 180 секунд с момента начала облучения с 41,5°C до 44°C. Далее температура не повышалась несмотря на продолжающееся лазерное воздействие, даже несколько снизилась в течение последующих 150 секунд – на 1°C, до 43°C. После прекращения лазерного воздействия на 330 секунде температура пришла к исходной за 30 секунд. На термопаре, находящейся на расстоянии 5 мм от источника лазерного излучения, температура, несмотря на применение лазерного излучения, не повышалась и оставалась прежней до конца эксперимента (360 сек).

При использовании мощности излучения 300 мВт отмечено видимое горение тканей с образованием дыма. При использовании излучения мощностью 300 мВт и экспозиции 6 мин. 40 сек. (плотность энергии = $53,33 \text{ Дж/мм}^2$, плотность мощности = $133,33 \text{ мВт/мм}^2$) графики термометрии у двух крыс также отличались незначительно. На термопаре, находящейся в тканях головного мозга на расстоянии 2 мм от зоны облучения, сразу с начала лазерного воздействия отмечен подъем температуры и за 120 секунд температура поднялась с $41,0^\circ\text{C}$ до $44,8^\circ\text{C}$. Далее температура не повышалась несмотря на продолжающееся лазерное воздействие, даже несколько снизилась в течение последующих 260 секунд – на $0,1^\circ\text{C}$, до $44,7^\circ\text{C}$. После прекращения лазерного воздействия на 400 секунде с начала лазерного облучения температура снизилась до $44,4^\circ\text{C}$, но до начальной не снизилась и осталась повышенной еще в течении 120 сек. На термопаре, находящейся в тканях головного мозга на расстоянии 5 мм от зоны облучения, отмечался плавный подъем температуры за 150 секунд с момента начала облучения с $41,0^\circ\text{C}$ до $42,4^\circ\text{C}$. Далее температура не повышалась несмотря на продолжающееся лазерное воздействие. После прекращения лазерного воздействия на 400 секунде температура в норму не пришла и осталась повышенной до $42,2^\circ\text{C}$ еще в течении 120 сек.

Следует отметить, что, несмотря на сходные данные термометрии, зафиксированные на термопарах с введением и без введения фотосенсибилизатора на каждом из трех режимов, результаты морфологического исследования были различны. Они показали, что введение фотолонна с последующим лазерным облучением мощностью 300 мВт при экспозиции 6 минут 40 секунд приводило к обугливанию и обширным некротическим изменениям как в опухоли, так и в окружающих тканях головного мозга. На 7 – е сутки после операции общая площадь очага повреждения в тканях головного мозга составляла $5,8 \pm 0,2 \text{ мм}^2$. В то же время после применения лазерного излучения

указанной мощности и экспозиции без предварительного введения фотолонна характеризовалось в зоне воздействия выраженным венозным и капиллярным полнокровием и дистрофическими изменениями без признаков некроза тканей опухоли и головного мозга.

При использовании фотолонна в сочетании с лазерным облучением мощностью 50 мВт в течение 5 мин. 20 сек. некротические изменения отмечались не во всех клеточных элементах опухоли и окружающих тканях мозга. На 7-е сутки после операции общая площадь очага повреждения в мозге составляла $3,9 \pm 0,5$ мм² и была достоверно меньше, чем при использовании мощности 300 мВт ($p < 0,05$). На этом же сроке после применения лазерного излучения мощностью 50 мВт без введения фотолонна сопровождалось лишь слабо выраженными явлениями венозного полнокровия в зоне воздействия.

Введение фотолонна с последующим применением лазерного излучения мощностью 100 мВт в течение 6 мин. (плотность энергии = 16 Дж/мм², плотность мощности = 44,44 мВт/ мм²) приводило к локальным некротическим изменениям в зоне воздействия без явлений обугливания тканей опухоли и головного мозга. К концу 7-х суток после операции общая площадь очага повреждения в головном мозге составляла $4,5 \pm 0,1$ мм², что было достоверно больше, чем при использовании мощности 50 мВт, но значительно меньше ($p < 0,01$) аналогичного показателя при применении мощности излучения 300 мВт ($p < 0,01$).

В то же время при использовании лазерного излучения мощностью 100 мВт без введения фотолонна характеризовалось только умеренно выраженным венозным полнокровием в зоне воздействия.

Таким образом, при использовании мощности излучения 50 мВт и экспозиции 5 минут подъем температуры составлял 1,3°C - 2,4°C и даже вблизи источника лазерного излучения температура не

повышалась выше $42,6^{\circ}\text{C}$, а морфологически доказан частичный некроз опухолевых клеток.

При использовании мощности излучения 300 мВт и экспозиции 6 мин. 40 сек подъем температуры составлял $3,8^{\circ}\text{C} - 9,0^{\circ}\text{C}$. Вблизи источника лазерного излучения температура повышалась до 50°C , а визуально и морфологически отмечалось горение и обугливание тканей опухоли и прилежащих тканей мозга.

При использовании мощности излучения 100 мВт подъем температуры составлял $2,8^{\circ}\text{C} - 3,5^{\circ}\text{C}$ и даже вблизи источника лазерного излучения температура не повышалась выше 44°C , а морфологически отмечен равномерный некроз опухолевых клеток без признаков обугливания тканей опухоли и мозга. Таким образом применение непрерывного излучения диодного лазера “Милон” мощностью 100 мВт было выбрано как оптимальное для проведения ФДТ опухолей головного мозга.

Результаты исследования накопления фотосенсибилизатора в тканях опухоли

У трех животных с верифицированной на экспресс биопсии глиальной опухолью головного мозга получены результаты накопления фотосенсибилизатора в опухолевой ткани. Через 20 минут после введения фотосенсибилизатора у всех крыс на мониторе обнаружено яркое люминесцентное свечение в тканях опухоли, у двух крыс сочетание гранулярного и диффузного свечения, у одной – диффузное.

После проведения ФДТ у всех трех животных отмечено резкое уменьшение свечения: у двух крыс, которым было проведено ФДТ при мощности лазерного облучения 100 и 300 мВт с экспозицией 6 минут обнаружено темное пятно в месте, где до этого было свечение; у одной, после ФДТ при мощности лазерного излучения 50 мВт и экспозиции 6 минут обнаружен остаток свечения по периферии опухоли.

Таким образом, наличие яркого люминесцентного свечения через 20 минут после введения фотосенсибилизатора подтверждало накопление его в опухоли и уменьшение после ФДТ.

Клинические результаты после воздействия ФДТ на глиальные опухоли, воспроизведенные у крыс

У всех 23 крыс, оставшихся в эксперименте, отмечалась общемозговая симптоматика в сочетании с двигательными нарушениями и эпилептическими приступами.

Шесть крыс, оперированных для подбора доз лазерного излучения и оставленных для наблюдения на 7 суток, после выведения из наркоза в течение 1-ых суток оставались вялыми, отказывались от пищи. В последующие 2 –е суток у крыс, которым был проведен сеанс ЛФДТ, отмечено уменьшение общемозговой симптоматики и регресс ее к концу 3-их суток. Эпилептических приступов после сеанса ЛФДТ не было. У трех животных, которым было проведено лазерное облучение без введения фотосенсибилизатора, общемозговая и очаговая неврологическая симптоматика сохранялась до 7 суток.

У второй группы животных (17 крыс, оставленных после ФДТ на 30 – 120 дней) после сеанса ЛФДТ общемозговая симптоматика также разрешилась в течение 3-4 суток. Эпилептические приступы, наблюдающиеся до операции ФДТ, – генерализованные у 14 животных и по типу Джексоновской эпилепсии у 3-х - больше не повторялись. Двигательные нарушения (контралатеральный гемипарез) у 16 крыс разрешились полностью в течение 4 суток после ЛФДТ, у одной крысы они полностью разрешились в течение 11 дней после ЛФДТ.

За период наблюдения – у 13 крыс – 1 месяц, у 4-х крыс - 4 месяца животные были активными, принимали пищу, изменений поведения не отмечалось. Появления неврологической симптоматики вновь не наблюдалось ни в одном случае.

Таким образом, динамика общего состояния животных и неврологической симптоматики подтверждало эффективность ЛФДТ в отношении растущих глиальных опухолей головного мозга крыс.

Динамика морфологических изменений в головном мозге после ФДТ глиальных опухолей, воспроизведенных у крыс

Как отмечалось ранее, на группе животных при подборе режимов лазерного излучения доказано, что использование фотолонна и лазерного излучения в выбранных режимах (мощность 100 мВт, экспозиция 6 мин.) приводило к некрозу опухолей в головном мозге крыс на 7-е сутки после воздействия.

Через 30 суток после ФДТ (12 животных) при визуальном исследовании костей черепа, его полости и головного мозга определялся очаг повреждения белесовато-серого цвета в левой теменной доле и спайки между оболочками мозга и теменной костью в зоне лазерного воздействия, соответствующему трепанационному отверстию в теменной кости.

Очаг повреждения имел четкие границы и не превышал по площади 0,3x0,2 см.

При микроскопическом исследовании в очаге альтерации головного мозга обнаруживались фибробласты, кровеносные сосуды, но в основном преобладали волокнистые структуры, в том числе коллагеновые волокна. При этом, ни в одном наблюдении на данном сроке исследования, ни в рубцовой, ни в окружающей ткани головного мозга признаков опухолевого роста не регистрировалось.

При морфометрическом исследовании рубцовой ткани, сформированной в очаге повреждения, содержание фибробластов составляло $14,5 \pm 0,9$, фуксинофильных волокон – $33,3 \pm 1,7$, кровеносных сосудов – $11,7 \pm 0,8$ на условной единице площади.

Через 120 суток после проведения ФДТ (5 животных) при макроскопическом исследовании костей черепа, его полости и головного мозга выявлен рубцово-спаечный процесс, который был сходным с изменениями, обнаруженными у животных на сроке 1 месяц после ФДТ. Очаг повреждения в головном мозге при визуальном исследовании четко не определялся.

При микроскопическом исследовании препаратов головного мозга в очаге повреждения выявлялся глиомезенхимальный рубец, в составе которого преобладали сосуды различного калибра. Размеры рубца составляли не более 0,2x0,1 см. При этом ни в одном случае не отмечалось признаков опухолевого роста в окружающей ткани мозга.

Морфометрическое исследование показало, что количество сосудов и фибробластов в рубце составляло на условной единице площади $5,1 \pm 0,5$ и $3,7 \pm 0,3$ соответственно и было значительно меньше аналогичных показателей ($p < 0,05$) предыдущего срока наблюдения. В то же время уменьшилось содержание фуксинофильных волокон ($15,1 \pm 0,6$; $p < 0,05$).

Таким образом, применение ФДТ в выбранных режимах вызывало в ранние сроки наблюдения некроз опухолевой ткани в головном мозге и формирование через 1-4 месяца мелкоочагового рубца в зоне лазерного облучения.

Выводы

1. При стереотаксическом доступе с последующей внутримозговой трансплантацией злокачественных глиальных опухолей головного мозга человека в мозг крыс, подвергнутых воздействию преднизолонa, через 1,5-2 месяца рост новообразований был получен в 12,3% наблюдений: глиобластомы в – 9,3%, астроцитомы – в 2,9%.
2. По данным морфологического исследования, трансплантированные в головной мозг крыс глиобластома и астроцитома, имели

инфильтрирующий рост и сходство с аналогичной опухолью головного мозга человека.

3. Инвазивный рост указанных опухолей у животных сопровождался развитием неврологических нарушений в виде периодических судорожных движений, гемипарезов конечностей, тремора.
4. ФДТ экспериментальных злокачественных глиальных опухолей головного мозга у крыс проводилась с помощью стереотаксического доступа, частичного удаления опухоли, введения фотолонга и последующего воздействия непрерывного излучения диодного лазера «Милон» с длиной волны 660нм, мощностью 100 мВт, доставляемого к объекту через моноволоконный световод диаметром 0,6мм. При этом длительность воздействия составляла 6 минут (плотность энергии = 16 Дж/мм², плотность мощности = 44,44 мВт/ мм²).
5. Применение ФДТ в выбранных режимах вызывало в ранние сроки наблюдения некроз опухолевой ткани в головном мозге и формирование через 1-4 месяца мелкоочагового рубца в зоне лазерного воздействия. Это сопровождалось в динамике опытов регрессом и исчезновением у животных неврологических расстройств.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Козель А.И. Новые пути в лечении глиальных опухолей головного мозга /А.И.Козель, С.Т. Исмагилова, Р.У. Гиниатуллин, В.Ю.Шахматов, Л.В.Астахова, Д.В.Еремеев// Комбинированное лечение опухолей головного мозга: Материалы Российской конференции, 17-19 мая 2004 г., Екатеринбург. – С.54 – 56.
2. Исмагилова С.Т. Лазерная хирургия в нейроонкологии / С.Т. Исмагилова, А.И. Козель, Д.В. Еремеев, В.П.Сорвилов, Е.Н.Игнатьева, Л.В.Астахова// Лазерные технологии в медицине: Сб. науч. работ. – Челябинск, 2006.- Вып.5.-С.29 -33.

3. Еремеев Д.В. Злокачественные опухоли головного мозга, полученные у крыс путем трансплантации от человека (экспериментальное исследование) / Д.В.Еремеев// Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2008. - №4. – С.38-39.
4. Гиниатуллин Р.У. Морфологическая характеристика головного мозга крыс после трансплантации им злокачественных опухолей головного мозга человека (экспериментальное исследование) / Р.У. Гиниатуллин, С.Т. Исмагилова, Д.В.Еремеев, Л.В. Астахова // Вестник новых медицинских технологий. – 2008. – Том. XV.- №1. - С. 13 – 14.
5. Гиниатуллин Р.У. Хирургические и морфологические аспекты фотодинамической терапии опухолей головного мозга (экспериментальное исследование) / Р.У. Гиниатуллин, С.Т. Исмагилова, Д.В.Еремеев, Л.В. Астахова, Е.Н.Игнатьева // Актуальные проблемы патологоанатомической службы муниципальных учреждений здравоохранения. Вопросы экологической патологии. Современные методы морфологической диагностики в патологоанатомической практике: Материалы Всероссийской научно-практической патологоанатомической конференции. – 28-31 мая 2008 г.- Челябинск. – С.135 – 137.
6. Козель А.И. Лазеры в нейрохирургии и невропатологии / А.И. Козель, С.Т. Исмагилова, Р.У.Гиниатуллин, Д.В.Еремеев // Клиническая лазерология (практическое руководство для врачей). – Саранск – Калуга. – 2008. – С. 200 – 207.
7. Гиниатуллин Р.У. Морфологическая характеристика изменений в тканях головного мозга после фотодинамической терапии злокачественных опухолей, воспроизведенных у крыс (экспериментальное исследование) / Р.У. Гиниатуллин, С.Т. Исмагилова, Д.В.Еремеев, Л.В. Астахова, Е.Н.Игнатьева// Вестник новых медицинских технологий. – 2008. - №3. - С. 64-65.

