

Streszczenie

Hipoksja (niewystarczający poziom utlenowania tkanek) występuje w wielu chorobach cywilizacyjnych i jest jedną z cech charakterystycznych nowotworów. Wykazano, że hipoksja nie tylko koreluje z większą inwazyjnością komórek nowotworowych, ale także zmniejsza ich czułość na terapie przeciwnowotworowe. Na przestrzeni lat podjęto wiele prób zwiększania utlenowania guzów nowotworowych, szczególnie w kontekście radioterapii, jednak w większości okazały się one nieskuteczne. Mikropęcherzyki tlenu dają nowe możliwości rozwiązania tego problemu dostarczając tlen lokalnie do guza dzięki ich czułości na impuls ultradźwiękowy prowadzący do ich kawitacji. Celem niniejszej pracy było zbadanie skuteczności lipidowych mikropęcherzyków tlenu (ang. *oxygen microbubbles*, OMB) czułych na ultradźwięki w dostarczaniu tlenu do guzów nowotworowych i ich wpływu na efektywność radioterapii.

Pierwszym etapem prezentowanych badań było sprawdzenie stabilności, wrażliwości na impuls ultradźwięki i uwalniania tlenu z mikropęcherzyków tlenu w roztworze. Uzyskane wyniki pokazały, że badane mikropęcherzyki są stabilne w roztworze przez około 30 min, ich rozmiar nie przekracza 10 μm , a impuls ultradźwiękowy prowadzi do ich rozbicia. Uwalnianie tlenu zbadane zostało z wykorzystaniem tlenometrii techniką elektronowego rezonansu paramagnetycznego. Wyniki pokazały, że roztwór OMB jest w stanie podnieść ciśnienie parcjale tlenu roztworu do 160 mmHg. Na efekt ten składał się zarówno tlen niesiony w nośniku jak i ten zamknięty w środku mikropęcherzyków.

Kolejne etapy badań przeprowadzane były *in vivo* w mysim modelu zaawansowanego nowotworu piersi 4T1 rosnącego w pakiecie mlecznym myszy Balb/c.

Wykorzystanie mikropęcherzyków tlenu w walce z hipoksją nowotworową wymaga w pierwszej kolejności sprawdzenia ich potencjalnej toksyczności w tkankach prawidłowych. Przeprowadzone analizy wykazały, że dożylna iniekcja mikropęcherzyków tlenu i ich połączenie z impulsem ultradźwięków nie prowadzi do oksydacyjnych uszkodzeń serca, nerek i wątroby.

Głównym celem prezentowanej pracy było sprawdzenie, czy mikropęcherzyki tlenu są w stanie podnieść ciśnienie parcjale tlenu w guzie nowotworowym. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem zarówno spektroskopii jak i obrazowania tlenometrycznego techniką elektronowego rezonansu paramagnetycznego. Zanalizowano zarówno dożylnie jak i doguzowe podanie mikropęcherzyków tlenu oraz mikropęcherzyków azotu jako kontroli procesu

kawitacji. Najwyższy wzrost utlenowania zauważono w grupach traktowanych zarówno mikropęcherzykami tlenu jak i impulsem ultradźwięków, ale istotny wzrost występował również po podaniu samych mikropęcherzyków tlenu i połączeniu mikropęcherzyków azotu i impulsu ultradźwięków. Efekt ten był zlokalizowany w okolicach naczyń nowotworowych po podaniu dożylnym i bardziej równomiernie rozmieszczony w obrębie guza po podaniu doguzowym. Co więcej, trwał on między 12 a 20 minut, co daje wystarczająco dużo czasu, aby wykorzystać go do wzmocnienia efektywności radioterapii. Dodatkowo przeprowadzono również pomiary saturacji hemoglobiny tlenem z wykorzystaniem obrazowania fotoakustycznego, które pokazały, że w zwiększeniu ciśnienia parcjalnego tlenu pod wpływem badanych mikropęcherzyków tlenu hemoglobina bierze udział w niewielkim stopniu. Utlenowanie guzów zbadano również na poziomie białek i genów związanych z unaczynieniem i hipoksją. Wyniki pokazały istotne zmniejszenie poziomu VEGF-A i HIF-1 α 24 h po terapii mikropęcherzykami tlenu.

Biorąc pod uwagę wykorzystanie kawitacji mikropęcherzyków do zwiększania przepuszczalności błony komórkowej, naczyń i procesu wspomagającego dostarczanie leków zbadano wpływ terapii mikropęcherzykami tlenu na perfuzję i mikrounaczynienie guza nowotworowego. Zaobserwowano zwiększoną penetrację barwnika Hoechst w grupach traktowanych zarówno mikropęcherzykami tlenu/azotu jak i impulsem ultradźwięków. Terapia prowadziła także do zmniejszenia opłaszczenia naczyń przez perycyty przy jednoczesnym zachowaniu niezmięnionej gęstości mikronaczyń.

Ostatecznym sprawdzianem efektywności tej drogi dostarczania tlenu, najsilniejszego znanego radiouczulacza, było zbadanie wpływu mikropęcherzyków tlenu na skuteczność radioterapii. Istotne spowolnienie wzrostu guza o ok 50 % po radioterapii widoczne było we wszystkich badanych grupach. Niestety nie udało się wykazać wpływu terapii mikropęcherzykami tlenu na przeżycie zwierząt ze względu na wysokie przerzutowanie badanego modelu. Co więcej, ilość makroskopowych przerzutów w płucach istotnie zwiększyła się po podaniu dożylnym mikropęcherzyków tlenu/azotu i aplikacji impulsu ultradźwięków.

Prezentowana praca pokazała, że mikropęcherzyki tlenu są skutecznym sposobem dostarczania tlenu do guza nowotworowego i prowadzą do zwiększenia skuteczności radioterapii. Efekty kawitacyjne w rejonie naczyń nowotworowych prowadzą jednak do większego rozsiewu komórek nowotworowych, co uniemożliwia ich wykorzystanie kliniczne. Dalsze badania mające na celu optymalizację protokołu terapeutycznego są konieczne, aby zminimalizować te szkodliwe efekty uboczne.

Martyna Elias

Dr inż. Agnieszka