

ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG ỨC CHẾ TẠO MẠCH CỦA LIỆU PHÁP QUANG ĐỘNG TRÊN SARCOM 180

Nguyễn Văn Ba*; Trần Ngọc Anh*

TÓM TẮT

Liệu pháp quang động (PDT), hoạt động dựa trên phản ứng quang hóa giữa chất nhạy quang tại mô u với ánh sáng có bước sóng thích hợp, đã được ứng dụng điều trị hiệu quả trên một số u rắn. Bên cạnh tác dụng tiêu diệt tế bào u, PDT còn làm tắc mạch dẫn đến ức chế mạch máu tân tạo trong mô u. Nghiên cứu này tiến hành nhằm mục tiêu đánh giá tác dụng hiệu quả ức chế tạo mạch của PDT. Sử dụng PDT với thuốc nhạy quang radachlorin và nguồn sáng laser diode 662 nm để đánh giá hiệu quả ức chế tạo mạch trên mô hình ung thư thực nghiệm sarcom 180 trên chuột BALB/c. Mật độ mạch máu tân tạo được đánh giá trên tiêu bản hóa mô miễn dịch với các kháng thể thứ nhất là CD31 và CD34. Kết quả nghiên cứu cho thấy PDT có tác dụng ức chế tạo mạch khối u. PDT giai đoạn sớm có tác dụng ức chế tạo mạch nhiều và ổn định, PDT giai đoạn muộn ức chế tạo mạch không nhiều và không ổn định.

* Từ khóa: Liệu pháp quang động; Mạch máu tân tạo; Ung thư; Sarcoma 180; Hóa mô miễn dịch.

ASSESSMENT OF ANTI-ANGIOGENESIS EFFECT OF PHOTODYNAMIC THERAPY ON SARCOM 180 TUMOR BEARING MICE

SUMMARY

Photodynamic therapy (PDT), the activation of a photosensitive drug in tumor tissue with light of specific wavelength, has been used effectively to treat certain solid tumors. Though therapeutic responses are encouraging, PDT-mediated oxidative stress can act as an angiogenic switch that ultimately leads to neovascularization. The aim of this study is to investigate the effect of PDT on the tumor angiogenesis. The effect of PDT with a photosensitizer radachlorin on tumor angiogenesis was studied on the model sarcom 180 in BALB/c mice. Neovascularization within the tumors were determined by immunohistochemistry method, using monoclonal antibodies specific to CD31 and CD34 as primary antibodies. The results showed that: PDT using photosensitive drugs Radachlorin and 662 nm diode laser light source can inhibit angiogenesis in tumor. To perform PDT at an early stage of tumor can be inhibit tumor angiogenesis stability. To perform PDT at the late stage inhibits angiogenesis unstable.

** Key words: Photodynamic therapy; Tumor angiogenesis; Cancer; Sarcoma 180; Photodynamic therapy immunohistochemistry.*

* Học viện Quân y

Phản biện khoa học: PGS. TS. Hoàng Văn Lông

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tân tạo mạch có vai trò quan trọng trong quá trình chuyển dạng, tiến triển và di căn ung thư. Bicknell R và Giampietro Gasparini (1997) đã tổng kết 18 công trình nghiên cứu định lượng mạch u đối chiếu lâm sàng tiến hành trên 2.700 bệnh nhân (BN) ung thư đặc ở vú, buồng trứng, đầu cổ, melanoma... cho thấy mối liên quan chặt chẽ giữa hoạt tính tạo mạch u tiên phát với phát triển u tại chỗ và di căn xa [2]. Chính quá trình tạo mạch đã cung cấp chất dinh dưỡng và oxy cho các tế bào u. Mật độ mạch máu trong u có liên quan chặt chẽ với tiến triển của ung thư, đến tỷ lệ đáp ứng và thời gian sống thêm sau điều trị.

Liệu pháp quang động (Photodynamic therapy - PDT) là phương pháp mới trong trị liệu ung thư. Dougherty T.J và CS ứng dụng điều trị ung thư lâm sàng tại Hoa Kỳ lần đầu tiên năm 1978, cho đến nay, trị liệu này đã trải qua nhiều giai đoạn thử nghiệm lâm sàng và được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) cho phép điều trị nhiều loại ung thư trên người như: ung thư cổ tử cung, carcinoma đường mật, ung thư da Kaposi, ung thư tiền liệt tuyến... với kết quả khả quan [5, 7, 8, 9].

Ở Việt Nam, vấn đề nghiên cứu tác dụng ức chế tạo mạch tại u của liệu pháp quang động chưa được nghiên cứu nhiều và hệ thống. Để bổ sung thêm cơ sở khoa học cho việc triển khai và đánh giá khả năng ứng dụng của PDT trong điều trị BN ung thư ở Việt Nam, chúng tôi thực hiện đề tài nhằm mục tiêu: *Đánh giá hiệu quả ức chế tạo mạch của liệu pháp quang động trong điều trị ung thư thực nghiệm.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu.

- 160 chuột nhất dòng BALB/c 6 - 8 tuần tuổi, trọng lượng 20 - 25g, chia thành các nhóm nghiên cứu. Dòng tế bào ung thư sarcom 180 nhận từ Viện Nghiên cứu Ung thư Thực nghiệm, Trường Đại học Y khoa Semmel-Weis, Hungary.

- Thiết bị laser diode MILON- 662 (Nga) phát liên tục, bước sóng 662 nm, công suất 0,38 W. Thuốc radarchlorin (Nga) có 95% Chlorin e₆, thuộc nhóm chlorin-thuốc nhạy quang thế hệ 2, tương tự m-THPC (meso-tetrahydroxyphenyl chlorin) đã được phép sử dụng trong lâm sàng ở châu Âu và Mỹ.

2. Phương pháp nghiên cứu.

Gây u thực nghiệm theo phương pháp của Lapis K, Trần Văn Hanh (1979) [3] và Nguyễn Đình Tảo (1994) [1] bằng cách tiêm vào điểm giữa mặt ngoài khối cơ đùi mỗi chuột nhất thuần chủng 5×10^6 tế bào sarcoma 180. Điều trị PDT *in vivo* dùng radarchlorin 20 mg/kg tiêm tĩnh mạch, sau 6 giờ chiếu laser 662 nm với mật độ năng lượng 150 - 400 J/cm², mật độ công suất 0,20 - 0,35 W/cm², thời gian chiếu 15 - 40 phút

Đánh giá hiệu quả ức chế tạo mạch của liệu pháp quang động trên tiêu bản u đùi chuột nhuộm miễn dịch men gián tiếp phức hợp avidin-biotin-peroxidase (ABC) với kháng thể thứ nhất là kháng thể đơn dòng CD31 và CD34 (Hãng BP Pharmigen, Hoa Kỳ).

Phương pháp định lượng mạch máu tân tạo tại khối u: áp dụng phương pháp của Weidner và CS. Soi tiêu bản nhuộm hóa mô miễn dịch đầu tiên ở độ phóng đại thấp (x40) để xác định điểm nóng tạo sau đưa lên độ phóng đại cao hơn (x400) để đếm mạch trong các điểm nóng tạo mạch này. Xác định mạch máu trên tiêu bản gồm: tế bào nội mô riêng biệt, cụm tế bào nội mô liền kề, cụm tế bào nội mô có chứa tế bào

ung thư ở trong. Định lượng mật độ mao mạch trung bình (MVD: meal microvessel profile density) trên tiêu bản nhuộm hóa mô miễn dịch trong khối u và vùng cơ lạnh cạnh u trên 1 đơn vị $0,74 \text{ mm}^2$ bằng cách

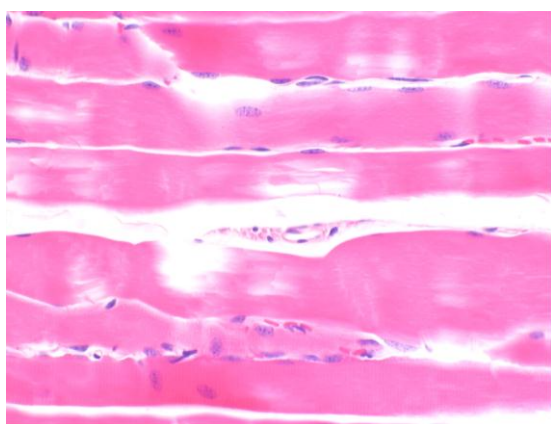
đếm số lượng mạch máu tại ba điểm nóng trên lát cắt của tiêu bản và lấy giá trị trung bình.

Xử lý số liệu nghiên cứu bằng phần mềm SPSS 15.0.

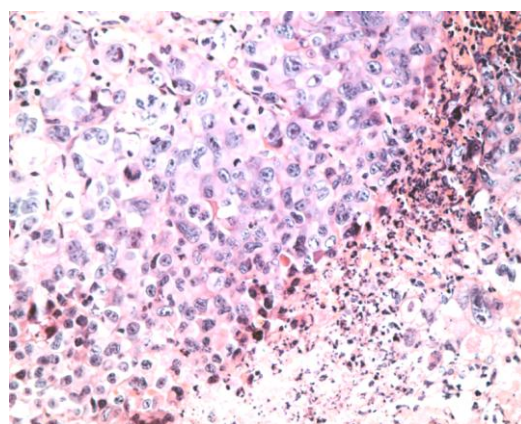
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Kết quả tạo mô hình u đuôi sarcom 180 trên chuột.

Kết quả tạo mô hình thực nghiệm cho thấy, toàn bộ chuột nhắt trắng BALB/c sau khi được tiêm 5×10^6 tế bào sarcom 180 vào cơ đùi đều thấy xuất hiện những khối ung thư phát triển trong cơ đùi.



Hình 1: Đùi chuột bình thường.
Nhuộm HEx200.



Hình 2: U đùi 28 ngày sau gây u.
Nhuộm HEx200.

2. Hiệu quả ức chế tạo mạch tại khối u của PDT.

Bảng 1: Mật độ mạch máu u đùi 14 ngày sau gây u.

NHÓM NGHIÊN CỨU (n = 20)	MVD TRÊN TIÊU BẢN NHUỘM CD31		MVD TRÊN TIÊU BẢN NHUỘM CD34	
	Trong u	Cạnh u	Trong u	Cạnh u
Gây u không điều trị	$34,5 \pm 13,2$	$54,2 \pm 23,1$	$30,7 \pm 14,2$	$52,4 \pm 25,5$
PDT 7 ngày	$22,1 \pm 6,8$	$37,5 \pm 13,7$	$23,6 \pm 8,4$	$39,1 \pm 14,3$

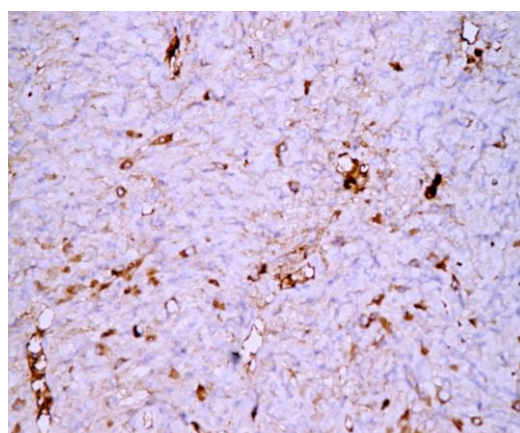
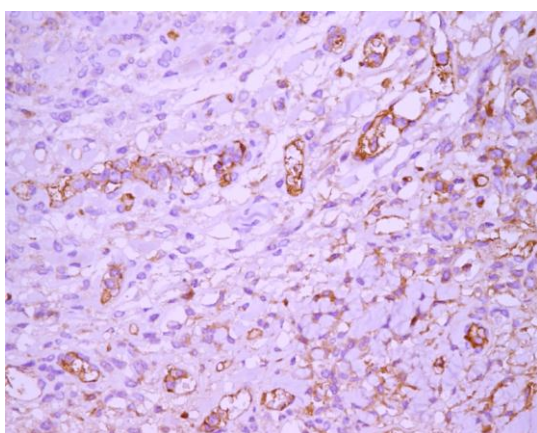
Vào ngày 14 sau gây u, mật độ mạch máu trên một đơn vị diện tích trên tiêu bản nhuộm hóa mô miễn dịch với kháng thể CD31 và CD34, ở tiêu bản giảm rõ rệt giữa nhóm PDT 7 ngày so với nhóm chứng không điều trị ($p < 0,01$). Sự khác biệt này thấy cả ở vùng u và mô lành cạnh u.

Bảng 2: Mật độ mạch máu u đùi 21 ngày sau gây u.

NHÓM NGHIÊN CỨU	MVD TRÊN TIÊU BẢN NHUỘM CD31	MVD TRÊN TIÊU BẢN NHUỘM CD34
-----------------	------------------------------	------------------------------

(n = 20)	Trong u	Cạnh u	Trong u	Cạnh u
Gây u không điều trị	58,2 ± 31,1	89,4 ± 42,3	53,9 ± 32,5	85,6 ± 37,5
PDT 7 ngày	24,9 ± 8,2	37,3 ± 11,1	23,7 ± 9,3	36,2 ± 13,3
PDT 14 ngày	32,5 ± 16,4	52,6 ± 23,9	30,3 ± 15,4	51,7 ± 31,2

Vào ngày 21 sau gây u, mật độ mạch máu trên một đơn vị diện tích ở tiêu bản nhuộm hóa mô miễn dịch với kháng thể CD31 và CD34 giảm rõ rệt giữa nhóm PDT 7 ngày so với nhóm chứng không điều trị ($p < 0,01$). Tuy nhiên, PDT ngày 14 sau gây u, định lượng tân mạch lại tăng lên so với nhóm PDT 7 ngày. Sự khác biệt nhận thấy cả ở vùng u và mô lành cạnh u.

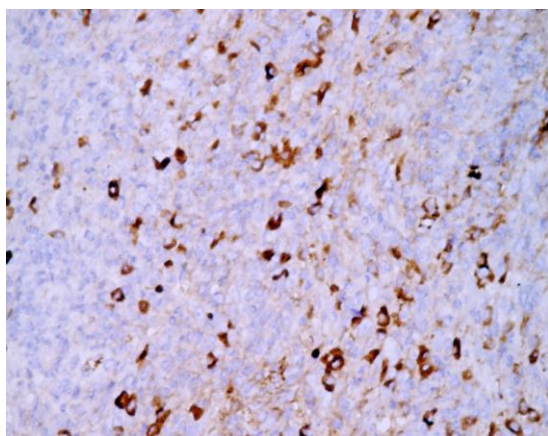


Hình 3: U đùi 14 ngày sau gây u nhóm PDT 7 ngày. Nhuộm hóa mô miễn dịch D31 x 200. *Hình 4:* U đùi 21 ngày sau gây u nhóm PDT 14 ngày. Nhuộm hóa mô miễn dịch CD34 x 200.

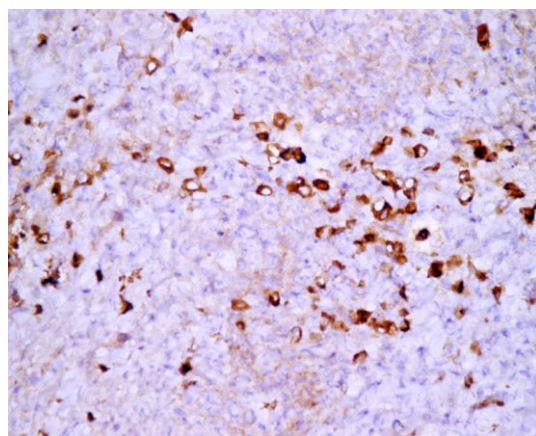
Bảng 3: Mật độ mạch máu u đùi 28 ngày sau gây u.

NHÓM NGHIÊN CỨU (n = 20)	MVD TRÊN TIÊU BẢN NHUỘM CD31		MVD TRÊN TIÊU BẢN NHUỘM CD34	
	Trong u	Cạnh u	Trong u	Cạnh u
Gây u không điều trị	49,6 ± 27,6	72,5 ± 49,3	46,4 ± 28,5	73,3 ± 47,8
PDT 7 ngày	23,6 ± 11,3	35,7 ± 19,5	21,9 ± 10,6	36,5 ± 18,4
PDT 14 ngày	47,9 ± 23,7	83,4 ± 37,4	46,2 ± 28,8	84,6 ± 39,1

Vào ngày 28 sau gây u, mật độ mạch máu trên một đơn vị diện tích trên tiêu bản nhuộm hóa mô miễn dịch với kháng thể CD31 và CD34, ở tiêu bản giảm rõ rệt giữa nhóm PDT 7 ngày, sau gây u so với nhóm chứng không điều trị ($p < 0,01$). Tương tự, PDT 14 ngày, định lượng tân mạch lại tăng lên so với nhóm PDT 7 ngày. Sự khác biệt này thấy cả ở vùng u và mô lành cạnh u. Tuy nhiên, định lượng tân mạch giảm nhất vào giai đoạn PDT 7 ngày.



Hình 5: U đùi 28 ngày sau gây u nhóm PDT 7 ngày. Nhuộm hóa mô miễn dịch CD34 x 200.



Hình 6: U đùi 28 ngày sau gây u nhóm PDT 14 ngày. Nhuộm hóa mô miễn dịch CD31 x 200.

BÀN LUẬN

Sau 7 và 14 ngày PDT một lần duy nhất trên các nhóm động vật mang u, tiến hành định lượng mạch máu tân tạo tại khối u. Kết quả cho thấy: u đùi các nhóm được PDT đều giảm mạnh số lượng mạch máu. Đặc biệt, nhóm chuột PDT sau gây u 7 ngày đạt hiệu quả ức chế tạo mạch trong u mạnh và ổn định trong các giai đoạn sau gây u 14 ngày ($22,1 \pm 6,8$ trên CD31 và $23,6 \pm 8,4$ trên CD34), sau gây u 21 ngày ($24,9 \pm 8,2$ trên CD31 và $23,7 \pm 9,3$ trên CD34) và sau gây u 28 ngày ($23,6 \pm 11,3$ trên CD31 và $21,9 \pm 10,6$ trên CD34). Tuy nhiên, kết quả định lượng tân tạo mạch với nhóm PDT 14 ngày cho kết quả ức chế tạo mạch không ổn định, giai đoạn 21 ngày sau gây u, mật độ mạch máu tân tạo giảm so với nhóm chứng không điều trị ($32,5 \pm 16,4$ trên CD31 và $30,3 \pm 15,4$ trên CD34), nhưng lại có xu hướng tăng lên giai đoạn muộn 28 ngày sau gây u ($47,9 \pm 23,7$ trên CD31 và $46,2 \pm 28,8$ trên CD34). Kết quả này chứng tỏ PDT giai đoạn sớm (7 ngày sau gây u) có hiệu quả ức chế tạo mạch tại u mạnh và ổn định hơn so với giai đoạn muộn hơn (14 ngày sau gây u). Theo chúng tôi, khối u vào giai đoạn muộn thường lớn, nằm ở sâu, xâm lấn xung quanh rộng, vùng trung tâm hoại tử nhuyễn hóa rất khó cho thuốc nhạy quang ngấm vào, đồng thời PDT có hiệu quả chủ yếu trên khối u nông, chỉ có hiệu quả tốt ức chế tạo mạch ở giai đoạn sớm. Như vậy, PDT giai đoạn sớm có hiệu quả ức chế tạo mạch rõ rệt.

Kết quả nghiên cứu thực nghiệm cho thấy: tế bào u bị huỷ hoại rất mạnh, tùy thuộc vào độ xuyên sâu của ánh sáng điều trị, nhưng tổn thương mạch máu trong u chỉ rõ ở khối u giàu mạch máu tân sinh và ít thấy ở vùng u bị hoại tử do tự bản thân tế bào ung thư phát triển quá mức. Tổn thương mạch máu trong u sau PDT còn phụ thuộc vào độ thanh thải và vị trí phân bố của từng loại thuốc nhạy cảm quang, liều dùng và thời gian sau dùng thuốc đến khi chiếu laser điều trị.

Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nhiều tác giả khác khi xác định hiệu quả ức chế tạo mạch của PDT, mật độ mạch máu trong khối u có liên quan chặt chẽ với tỷ lệ đáp ứng và thời gian động vật mang u sống thêm sau điều trị. Do vậy, định lượng mạch máu trong khối u được dùng để đánh giá hiệu quả của PDT. Tuy nhiên, đa phần nghiên cứu tổn thương thành mạch mới chỉ theo dõi trong thời gian ngắn, khoảng 1 - 3 ngày sau PDT. Chaudhuri K.(1987) nhận thấy có hiện tượng gia tăng thương tổn thành mạch máu sau PDT, chủ yếu là nhân tế bào nội mô của đoạn tiểu động mạch và mao mạch, đặc biệt các vi tơ collagen (microfibrin) trong lớp đệm dưới nội mô thành mạch khối u bị phá huỷ, dẫn đến xuất huyết rải rác trong u sau PDT từ 4 - 8 giờ. Đến giờ thứ 15 sau PDT, lớp tế bào nội mô bị biến đổi rõ rệt, trong bào tương xuất hiện rất nhiều không bào lớn và màng tế bào có thể bị đứt vỡ [4]. Bicknell R (1997) thấy sau PDT 24 giờ với thuốc nhạy quang sulphonat phthalocyanin nhôm (AlS_2Pc) trên chuột mang ung thư sarcom 180 đã có tổn thương tế bào nội mô, chủ yếu là ty thể bị trương phồng và giảm số lượng. Nhưng chỉ sau PDT 3 - 7 ngày đã thấy có mạch máu tân tạo trong khu vực liền kề với vùng u hoại tử do điều trị [2].

Cơ chế tổn thương mạch máu sau PDT cũng đã được Robertson C.A (2009) và Osaki T (2009) chứng minh là do thuốc nhạy quang phân bố chọn lọc vào hệ mạch mới tân tạo, từ đó thuốc này di chuyển dễ dàng sang các tế bào u bên cạnh, điều này chỉ rõ vai trò của hệ mạch máu trong tiến trình PDT là đưa thuốc nhạy quang vào tế bào u để trực tiếp phá huỷ chúng khi chiếu sáng và tổn thương tế bào nội mô, gây tắc mạch sau điều trị [10]. Một số nghiên cứu khác sử dụng phương pháp chụp mạch miễn dịch tìm kháng nguyên đặc hiệu với tế bào nội mô trong khối u sau PDT đã xác nhận tính đúng đắn của quan điểm này.

Nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy cơ chế tác dụng của PDT không chỉ làm tổn thương hệ mạch, mà còn tác động đến đường dẫn truyền tín hiệu của yếu tố kích thích tạo mạch như VEGF, MMP và cytokinase khác, do đó có tác dụng làm cân bằng tạo mạch nghiêng về phía ức chế tạo mạch. Nghiên cứu của Ferrario A (2000), PDT sử dụng thuốc nhạy quang photofrin có tác dụng làm giảm yếu tố gây thiếu oxy tổ chức -1 alpha (HIF-1 alpha), do đó làm tăng nồng độ gen HIF-1 trong bào tương, đây là yếu tố tác động đến VEGF, vì vậy, gián tiếp làm giảm mạch trong khối u carcinoma trên chuột. Ferrario A và CS (2004) cũng nhận thấy PDT sử dụng thuốc nhạy quang photofrin và hypericin có tác

dụng ức chế MMP, vì vậy, sẽ ngăn chặn tế bào u hoặc tế bào nội mô di cư và xâm lấn, kết quả là ức chế quá trình tạo mạch trong u [6].

KẾT LUẬN

Liệu pháp quang động sử dụng thuốc nhạy quang radachlorin và nguồn sáng laser diode 662 nm có tác dụng ức chế tân tạo mạch tại u.

Thực hiện PDT ở giai đoạn sớm của khối u (sau gây u 7 ngày) có tác dụng ức chế tạo mạch trong u mạnh và ổn định, từ thời điểm sau gây u 14 ngày (mật độ mạch máu tân tạo là $22,1 \pm 6,8$ trên CD31 và $23,6 \pm 8,4$ trên CD34), cho đến sau gây u 28 ngày ($23,6 \pm 11,3$ trên CD31 và $21,9 \pm 10,6$ trên CD34).

Thực hiện PDT ở giai đoạn muộn (sau gây u 14 ngày) ức chế tạo mạch không nhiều và không ổn định. Thời điểm 21 ngày sau gây u, mật độ mạch máu tân tạo có giảm so với nhóm chứng không điều trị ($32,5 \pm 16,4$ trên CD31 và $30,3 \pm 15,4$ trên CD34), nhưng lại có xu hướng tăng lên vào thời điểm 28 ngày sau gây u ($47,9 \pm 23,7$ trên CD31 và $46,2 \pm 28,8$ trên CD34).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Đình Tảo. Nghiên cứu tác dụng của phylamin tới thay đổi hình thái, cấu trúc và chức năng đại thực bào trong ung thư thực nghiệm sarcom 180. Luận án Phó Tiến sỹ Y học. Học viện Quân y. Hà Nội. 1994.
2. Bicknell R, Lewis C.E, Gasparini G. et al. Tumor angiogenesis: prognostic and predictive value of intratumoral microvessel density in human solid tumors. Oxford University Press Inc, New York. 1997, pp.29-44.
3. Carmeliet P. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature Reviews Cancer. 2000, 407, pp.249-257.
4. Chaudhuri K., Keck R. W., Selman S. H. Morphological changes of tumor microvasculature following hematoporphyrin derivative sensitized photodynamic therapy. Photochem Photobiol. 1987, 46 (5), pp.823-827.
5. Dougherty T.J, Kaufman J.E, Goldfarb A., et al. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. Cancer Res. 1978, 38, pp.2628-2635.
6. Ferrario A, Chantrain C.F, von Tiehl K, Buckley S, Rucker N, Shalinsky D.R, Shimada H, DeClerck Y.A, Gomer C.J. The matrix metalloproteinase inhibitor prinomastat enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse tumor model. Cancer Res. 2004, 64 (7), pp.2328-2332.
7. Gao F, Bai Y., Ma S.R, Liu F, Li Z.S. Systematic review: photodynamic therapy for unresectable cholangiocarcinoma. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2010, 17 (2), pp.125-131.
8. Haayat M.A. Principles and technique of electron microscopy. 3rd Macmillan Press, New York. 1989, pp.208-326.
9. Moore C. M., Pendse D, Emberton M. Photodynamic therapy for prostate cancer--a review of current status and future promise. Nat Clin Pract Urol. 2009, 6 (1), pp.18-30.
10. Osaki T, Takagi S, Hoshino Y, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T. Efficacy of antivasular photodynamic therapy using benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD-MA) in 14 dogs with oral and nasal tumors. J Vet Med Sci. 2009, 71 (2), pp.125-132.