

WOJSKOWY INSTYTUT HIGIENY I EPIDEMIOLOGII
IM. KAROLA KACZKOWSKIEGO

Krzysztof Bilmin

**Badanie wpływu fal ultradźwiękowych oraz efektu
sonodynamicznego na żywotność komórek
szczurzych linii glejaków *in vitro***

Rozprawa doktorska

wykonana w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im M. Mossakowskiego PAN

Promotor

Prof. dr hab. Paweł Grieb

Zakład Farmakologii Doświadczalnej,

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN

Drugi Promotor

Dr hab. inż. Tamara Kujawska, prof. IPPT PAN

Zakład Ultradźwięków,

Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN

Warszawa 2017 r.

Streszczenie

Złośliwe guzy glejopochodne są drugą, po udarach mózgu, przyczyną zgonów powodowanych schorzeniami ośrodkowego układu nerwowego. Obecnie stosowane metody leczenia - zwykle jest to kombinacja interwencji chirurgicznej, radioterapii i chemioterapii - nie dają zadowalających efektów. Bez względu na stosowane rutynowo leczenie średni czas przeżycia pacjentów z najczęściej występującym i najbardziej złośliwym glejakiem wielopostaciowym (*Glioblastoma multiforme*) wynosi 1-1.5 roku od rozpoznania. W związku z tym niezbędne jest poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych. Jedną z nich może stać się terapia sonodynamiczna, polegająca na wykorzystaniu fal ultradźwiękowych i leku (sonouczulacza) do eliminacji komórek glejaka. Sposób działania terapii sonodynamicznej jest podobny do mechanizmu szerzej znanej terapii fotodynamicznej, z tą różnicą, że do aktywacji uczulacza używane są fale ultradźwiękowe, a nie świetlne. Badania dotyczące przeciwglejakowej aktywności efektu sonodynamicznego są w początkowej fazie i jest niewiele doniesień na ten temat. W szczególności mało wiadomo na temat kluczowego zagadnienia jakim jest wpływ parametrów akustycznych fal ultradźwiękowych na wystąpienie efektu sonodynamicznego. W związku z powyższym potrzebne są badania *in vitro* mające na celu ustalenie optymalnych właściwości fal ultradźwiękowych i potwierdzenie efektu sonodynamicznego na różnych liniach komórkowych glejaków. Wyniki uzyskane w takich eksperymentach mogłyby być przydatne w planowaniu badań *in vivo*, a w dalszej perspektywie również badań klinicznych, w szczególności dla projektowania głowic generujących fale ultradźwiękowe o optymalnych parametrach akustycznych.

Celem badań, których wyniki stanowią podstawę niniejszej rozprawy, była ocena wpływu fal ultradźwiękowych oraz wywołanego nimi (za pośrednictwem kwasu 5-aminolewulinowego jako sonouczulacza) efektu sonodynamicznego na żywotność komórek szczurzych linii glejaków *in vitro*.

W badaniach do **publikacji 1** została wykorzystana najczęściej używana w neuroonkologii eksperymentalnej linia komórkowa – szczurzy glejak C6 – i standardowy układ nadźwiękawiania komórek od góry, czyli FF (ang.: *Free Field*), eliminujący falę stojącą i wielokrotne odbicia. Potwierdzono, że efekty termiczne indukowane przez ultradźwięki są głównym mechanizmem uszkadzającym komórki i stwierdzono, że w temperaturze poniżej 43°C, komórki tylko nieznacznie (<10%) giną pod wpływem samych ultradźwięków. Ponadto uzyskane wyniki pozwoliły, dla każdej zastosowanej intensywności ultradźwięków, wyznaczyć maksymalny czas ekspozycji, który nie powoduje śmierci komórek w wyniku toksycznej hipertermii, jak również natężenie progowe ultradźwięków powodujące śmierć komórek po 3 min ekspozycji wskutek oddziaływań termicznych. W eksperymentach do **publikacji 2** użyte zostały te same komórki (C6), ale porównano układ nadźwiękawiania FF z układem, w którym głowica ultradźwiękowa była umieszczona pod dnem płytki co prowadziło do powstawania fali stojącej i wielokrotnych odbić - warunki SWMR (ang.: *Standing Wave and Multiple Reflections*). Wyniki eksperymentów potwierdziły, że w warunkach SWMR wystarczy dużo mniejsza intensywność ultradźwięków, aby uzyskać podobny efekt cytotoksyczny wobec komórek. W testach z użyciem 12-studzienkowych płytek w warunkach SWMR lokalna intensywność wiązki $I_{SATA} = 0.32 \text{ W/cm}^2$ była wystarczająca do uzyskania 50% śmiertelności komórek,

natomiast w warunkach FF natężenie potrzebne do uzyskania 50% śmiertelności komórek musiało wzrosnąć do 5.89 W/cm². W eksperymentach z użyciem 96-dołkowych płytek natężenie wiązki potrzebne do uzyskania 50% śmiertelności komórek wyniosło 0.80 W/cm² dla warunków SWMR i 2.86 W/cm² dla warunków FF. **Publikacja 3** przedstawia wyniki badań wpływu ultradźwięków w warunkach SWMR nie wywołujących efektów termicznych i z użyciem sonouczulacza- kwasu 5-aminolewulinowego dodanego do hodowli komórkowej (efekt sonodynamiczny). W eksperymentach użyto innej linii komórkowej – szczurzego glejaka RG2, który w warunkach *in vivo* bardziej przypomina ludzkiego glejaka wielopostaciowego, niż komórki C6. Żywotność komórek glejaka RG2, jak również zachodzące w nich zmiany morfologiczne i apoptozę oceniono dla każdej stosowanej mocy/natężenia ultradźwięków (2 W, 4 W, 6 W). Największy efekt cytotoksyczny zaobserwowano dla największej użytej mocy ultradźwięków (6 W).

Summary

Gliomas are the second to strokes cause of mortality among the diseases of the central nervous system. Current methods of treatment, such as surgery, radiotherapy and chemotherapy, do not produce satisfactory results. Regardless of the treatment applied, the average survival time of patients with the most common and most malignant glioblastoma multiforme is 1-1.5 years from diagnosis. Therefore, it is necessary to develop new therapeutic strategies. One of such new strategies could be sonodynamic therapy, which involves the use of ultrasonic waves and a chemical (sonosensitizer) for the treatment of glioma. Mode of action of sonodynamic therapy is similar to that used in photodynamic therapy, except that ultrasonic waves are used instead of light for the activation of the sensitizer. Research on the anti-glioma activity of the sonodynamic effect is in the early stage and there is a limited number of research in this field. In particular, little is known about the main matter namely the influence of acoustic ultrasonic waves on the occurrence of a sonodynamic effect. Therefore, further *in vitro* studies are needed to determine the optimal properties of ultrasonic waves, and to confirm the sonodynamic effect on different glioma cell lines. The results obtained in such experiments could be valuable for planning *in vivo* studies, and, in the future, also clinical trials, especially for the design of ultrasound transducers, which will be able to produce ultrasounds with optimal acoustic parameters.

The aim of this study, the results of which are the basis of this thesis, was to evaluate the effect of ultrasound waves and 5-ALA-mediated sonodynamic effect on viability of rat glioma cell lines *in vitro*.

In **publication 1** rat C6 cell line was used, which is the most commonly utilized cell line in experimental neurooncology, along with the standard sonification mode - FF, which eliminates standing waves and multiple reflections. It has been confirmed that ultrasound-induced thermal effects are the main mechanism of cell damage, and so the temperature below 43 °C, causes only slight cells damage (<10%). Moreover, the obtained results allowed to determine the maximum exposure time, that does not cause the increase in temperature above 43 °C for each intensity used, and the intensity threshold, which causes cell death after 3 minutes of exposure to ultrasound, due to thermal effects. In the experiments for **publication 2**, in which the same cell line (C6) was used, we compared FF ultrasound conditions with conditions in which the ultrasound transducer was placed under the bottom of the plate, leading to creation of standing wave and multiple reflections (SWMR). Results of these experiments confirmed, that under SWMR conditions, much less intense ultrasound is needed to achieve a similar cytotoxic effect on cells. In experiments with 12-well plates under SW conditions, the intensity I_{SATA} equal to 0.32 W/cm² was sufficient to achieve 50% cell mortality, while under FF conditions the intensity of 5.89 W/cm² was required to achieve the same cell mortality. In experiments using 96-well plates the ultrasound intensity required to obtain 50% mortality of cells amounted to 0.80 W/cm² for the SW conditions and 2.86 W/cm² for FF conditions. The measurements of temperature showed that the increase to 43 °C was induced by ultrasound with intensity equal to 2.65 W/cm² under free field conditions, and intensity of 0.55 W/cm² under standing wave conditions. **Publication 3** describes the impact of ultrasounds (SWMR conditions) that do not induce thermal effects, with 5-aminolevulinic acid as a

sonosensitizer (sonodynamic effect) added to the cell culture. In these experiments, a different cell line was used - rat RG2 glioma, which better resembles human glioblastoma than C6 cells in *in vivo* model. Viability of rat RG2 glioma cells, as well as their morphological changes and apoptosis, were assessed for each acoustic beam power/intensity used (2W, 4W, 6W). The largest cytotoxic effect was observed for the highest power of ultrasound (6 W).