

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU CLUJ-NAPOCA

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Locul radiofrecvenței în tratamentul leziunilor hepatice maligne secundare cancerului colorectal

Doctorand **Precup Călin Gheorghe**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Ciuce Constantin**

CLUJ-NAPOCA 2014



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Cuvinte cheie

Radiofrecvență, metastaze hepatice, cancer colorectal, lipozomi, laser doppler, microcirculație, profil citokine

Introducere

Cancerul colorectal este una dintre cele mai frecvente malignități în ultimele două decade. Aproximativ 25-44% dintre pacienții cu cancer colorectal au metastaze ganglionare la momentul diagnosticului și aproximativ 50% dintre aceștia vor prezenta recidive în primii 5 ani de la tratamentul tumorii primare, metastazele hepatice reprezentând 40-80% din totalul acestor recurențe.

Rezecția metastazelor hepatice a fost considerată, până de curând, singura metodă eficientă de tratament. Totuși, limitările ale acestui tip de tratament: au determinat apariției tehnicilor de ablație locală. Astăzi, ablația prin radiofrecvență este cea mai răspândită metodă pentru destrucția in situ a metastazelor hepatice de CRC ce nu pot fi rezecate. Totuși, 40% dintre pacienții tratați cu radiofrecvență prezintă recurențe ale bolii în primul an după terapie, iar 12% dintre aceștia sunt la locul de tratament al primei leziuni, rata de recurență, fiind proporțională cu dimensiunea inițială a tumorii.

Lucrarea de față încearcă să stabilească rolul ablației prin radiofrecvență în tratamentul metastazelor hepatice de cancer colorectal analizând prin studii experimentale asocierea chimioterapiei condiționate lipozomal cu tratamentul cu radiofrecvență, standardizarea metodei experimentale, analiza vascularizației tumorale înainte și după tratament, morfologia modificărilor induse de tratament și factorii imunologici implicați.

Studiile cuprinse în teză au fost finanțate prin Ministerul Educației și Cercetării, Cercetare și Inovație PNII, nr Contract 195/2007: "Administrarea intratumorală, asociată cu radiofrecvența, a chimioterapiei hipertermice condiționată nanotehnologic: efect și risc de recidivă. Model experimental".

Stadiul actual al cunoașterii

Rezecțiile hepatice pentru leziuni maligne hepatice reprezintă terapia preferată pentru viza radicală a intervenției. Criteriile de contraindicație a intervenției chirurgicale au constituit subiectul a numeroase teme de cercetare.

Imagistica preoperatorie este folosită pentru a determina numărul și dimensiunea metastazelor hepatice, distribuția lor segmentară și lobară, precum și identificarea bolii extrahepatice, incluzând limfoganglionii, metastazele peritoneale, recidiva locală sau regională a bolii primare și prezența metastazelor pulmonare, cerebrale sau osoase.

Rezecția hepatică este standardul de aur în tratamentul tumorilor hepatice rezecabile dar nu este posibilă sau adecvată pentru până la 80% din pacienți, fie datorită volumului hepatic restant prea mic, comorbiditățile asociate sau aspecte tehnice legate de numărul sau dimensiunea metastazelor

Radiofrecvența singură sau în asociere cu rezecția hepatică poate să constituie mijlocul de tratament la pacienții la care rezecția este contraindicată sau nu poate singură să asigure o excizie RO. Ablatia tumorală folosind radiofrecvența nu trebuie privită ca un înlocuitor al rezecției, ci mai mult un supliment sau o extensie a terapiei localizate pentru pacienții nerezecabili.

Ablația prin radiofrecvență s-a impus în fața celorlalte tehnici ablativ datorită faptului că este o metodă de tratament ușor de realizat dar mai ales datorită ratei scăzute de morbiditate și mortalitate.

Cel mai important dezavantaj al metodei este creșterea locală a tumorii la locul de tratament inițial. Ratele de recurență variază mult, între 2,3% și 40% depinzând de tipul de tratament asociat,

diametrul tumorii inițiale, timpul de urmărire, tipul de intervenție (percutanat/deschis) și nu în ultimul rând de modul cum a fost definită recurența locală.

În ultimii ani au fost făcute progrese importante în ceea ce privește tratamentul metastazelor hepatice de cancer colorectal, prin creșterea acurateții imagisticii, îmbunătățirea tehnicilor chirurgicale, a opțiunilor terapeutice locoregionale și prin disponibilitatea unor agenți chimioterapeutici mai eficienți

Pentru o chimioterapie adjuvantă de succes substanța activă și concentrația bioactivă trebuie eliberată în așa fel, încât, să ajungă la organul afectat fără expunerea țesuturilor sănătoase. Noile sisteme de eliberare ale medicamentelor cresc și mențin concentrația substanței în vecinătatea locului țintă, astfel sunt minimizezate efectele secundare asupra țesuturilor normale. Dintre moleculele folosite ca și transportori, lipozomii sunt cei mai studiați pentru aplicabilitatea lor de transport.

Contribuția personală

Ipoteza de lucru și obiective

Cercetarea și-a propus studiere eficienței tratamentului metastazelor hepatice nerezecabile de cancer colorectal prin asocierea radiofrecvenței cu chimioterapia intratumorală hipertermică pe modele experimentale.

Din punct de vedere farmacologic obiectivul cercetării a fost de a ameliora calitățile farmacocinetice și dinamice ale citostaticele având ca obiectiv creșterea eficienței lor la nivelul celulelor tumorale.

Din perspectiva experimentală s-a urmărit definirea modelului animal de utilizare a radiofrecvenței, s-a urmărit stabilirea modelului de implantare tumorală intrahepatică și rata de creștere tumorală.

Au fost, de asemenea, evaluați factorii stimulează angiogeneza (PDGF- factorii de creștere derivați din plachete, VEGF-factorul de creștere endotelială, TNF-factorul de necroză tumorală).

Nu în ultimul rând au fost studiate eficiența terapeutică a radiofrecvenței, a chimioterapiei intratumorale asociate cu hipertermia pentru a aprecia fiecare metodă terapeutică în parte, în final urmărindu-se rezultatele terapeutice ale asocierii celor două tratamente.

Metodologie generală

Studiile experimentale au utilizat o linie celulară de adenocarcinom colonic CC531s dezvoltată specific pe șobolanii Wag/Rij folosită pentru inducerea tumorilor la nivel hepatic la șobolani singenici.

Medicamentul folosit pentru încărcarea lipozomilor a fost doxorubicina. Lipozomii au fost produși din fosfolipide (lecitina), folosind metoda Bangham pentru a obține lipozomi unilamelari mici (SUV).

Ablația cu radiofrecvență s-a realizat folosind un electrod cu vârfuri expandabile (Starburst™ SDE, AngyoDynamics, USA) conectat la un generator RITA (RITA® Model1500xRF, AngioDynamics, USA).

Vascularizația tumorii a fost evaluată folosind sistemul Laser Doppler microvascular – Periflux System 5000, Perimed AB, Suedia.

Probe de țesut au fost recoltate pentru analiza histologică și imunohistochimie.

Analiza imunohistochimică pentru aceleași probe de țesut a avut scopul de a evidenția prezența VEGF-ului la nivelul tumorii, țesuturile renal și hepatic normal au constituit controlul pozitiv, respectiv negativ al metodei de colorare.

Concentrațiile plasmatiche ale factorilor de creștere au fost măsurate din lizatele celulare ale probelor folosind sistemul Luminex 200 (Luminex Corp, TX, USA). Datele obținute au fost colectate

sub formă de nivel de fluorescență în funcție de o scală standard pentru fiecare compus și exprimate în concentrații (pg/ml sau ng/ml).

Studiu 1. Protocol experimental de ablație in situ prin radiofrecvență a metastazelor hepatice de cancer colorectal la șobolani folosind electrozi cu vârf expandabil

Introducere

Radiofrecvența (RF) a devenit în ultimii ani o alternativă la rezecția chirurgicală a tumorilor hepatice. Asocierea ei cu chirurgia sau chimioterapia precum și diversificarea dispozitivelor de RF impun dezvoltarea unor modele experimentale pentru a contura noi posibilități și condiții de utilizare a acestei terapii.

Ipoteza de lucru

Studiu își propune stabilirea unor parametrii optimali de utilizare a RF care să permită distrucția in situ a metastazelor hepatice induse la șobolani, cu minime efecte secundare.

Material și metodă

Au fost utilizați șobolani rasa Wag/Raj cu o greutate medie de 260 g, cu metastaze hepatice induse (linia tumorală CC531s). RF a fost practică cu dispozitivul RITA 1500X (Angiodynamics, USA) și sonda Starbust SDE (Angiodynamics, USA), care prezintă vârfuri expandabile pentru a realiza o distribuire cât mai uniformă a RF. Aceste vârfuri prezintă posibilitatea de înregistrare a temperaturii la periferia leziunii.

Modificând doar puterea eliberată de dispozitiv (90W, 20W 10W) am urmărit leziunile induse de RF asupra formațiunilor tumorale aflate în ziua 21 (diametrul acestora fiind de 1.22 +/- 0.24 cm) de la inocularea liniei celulare tumorale la nivelul capsulei ficatului, folosind o temperatură țintă la periferia ariei de distrucție tisulară de 62°C, precum și rata de supraviețuire a animalelor.

Rezultate

Supraviețuirea a fost semnificativ statistic influențată negativ pentru grupul de animale la care puterea administrată a fost de 90 watt, doar un singur animal supraviețuind 7 zile de la aplicarea RF. De asemenea, între grupurile studiate au fost observate diferențe ale leziunilor morfologice în parenchimul hepatic și în organele învecinate, fără a înregistra o diferență semnificativă sub raport terapeutic.

Nu s-au înregistrat diferențe semnificativ statistice între grupul cu 90 Watt și grupul cu 20 Watt, precum și între grupul cu 10 Watt și cel cu 20 Watt (Log Rank $p=0.061$, Breslow $p=0.137$ și Tarone – Ware $p=0.094$ pentru grupurile 90W/20W, și Log Rank $p=0.274$, Breslow $p=0.187$ și Tarone – Ware $p=0.224$ pentru grupurile 20W/10W). Evaluarea indicatorilor calitativi au arătat că în grupul animalelor tratate cu 10 Watt indicatorii modificărilor morfologice ale organelor interne sunt mai buni și rata de supraviețuire este mai mare decât pentru animalele din grupul tratat cu 20 Watt și 90 Watt.

Colorațiile pentru VEGF nu au produs diferențe semnificative între loturile studiate, rezultatele negative fiind influențate în realitate de numărul mic de animale care au supraviețuit la sfârșitul perioadei luate în calcul, practic aceste diferențe fiind imposibil de calculat.

Concluzii

Creșterea puterii eliberate în timpul ablației cu radiofrecvență a metastazelor hepatice la animalele mici poate duce la leziuni importante ale țesutului hepatic înconjurător, normal și la nivelul organelor învecinate. Aceasta rezultând în o rată de supraviețuire mică, chiar comparativ cu evoluția naturală a bolii. Studiul nostru sugerează că setarea generatorului de radiofrecvență la o putere de 10 watt pentru a asigura creșterea temperaturii țesuturilor la 62°C și menținerea temperaturii pentru 1 minut sunt suficiente pentru a obține o ablație completă a leziunii cu un risc foarte scăzut de apariție a efectelor adverse. Totuși, sunt necesare studii viitoare pentru a investiga rata de recurență locală în legătură cu puterea eliberată țesuturilor în timpul procedurii de ablație.

Utilizarea experimentală a RF folosind o putere administrată prea mare, determină scăderea ratei de supraviețuire prin leziuni proporțional extinse ale organelor abdominale, fără a ameliora semnificativ efectul său terapeutic.

Studiul 2. Lipozomi termosensibili conținând doxorubicină. Preparare și evaluare in vitro.

Introducere

Lipozomii au fost raportați că modulează stabilitatea și îmbunătățesc proprietățile farmacocinetice ale medicamentelor încapsulate, reducând efectele adverse și îmbunătățind activitatea in vitro și in vivo. Un țel major al ultimilor ani a fost dezvoltarea unor lipozomi care să poată fi activați să-și elibereze conținutul doar la nivelul locului țintă. Astfel, a fost necesară realizarea unor transportatori lipozomali mai buni astfel încât să poată fi declanșați să elibereze conținutul.

Doxorubicina (DOX) este primul antibiotic de tip antraciclină care a intrat în uzul clinic ca și anticanceros. Folosirea hipertermiei a fost activ investigată datorita multiplelor avantaje: hipertermia poate crește fluxul sanguin tumoral și permeabilitatea microvasculară și extravazarea și acumularea lipozomilor la nivel local, în tumora încălzită. Hipertermia a fost folosită ca și tratament adjuvant al chirurgiei, iradierii sau chimioterapiei. Un efect citotoxic adăugat poate fi obținut când hipertermia este folosită împreună cu diverși agenți chimioterapici ce pot fi eliberați din lipozomi.

Ipoteza de lucru

Scopul acestei lucrări a fost prepararea și evaluarea proprietăților lipozomilor termosensibili încărcăți cu doxorubicina în ceea ce privește încărcarea cu medicament, eficiența încărcării, dimensiunile lipozomilor, morfologia și eliberarea in vitro a doxorubicinei.

Material si metode

Lipozomii au fost preparați prin hidratarea pe film a lipidelor și metoda extudării. Lipidele folosite au fost: dipalmitoilfosfatidilcolină (DPFC), distearoilfosfatidilcolină (DSFC), 1-palmitoil-2-hidroxi-3-glicero-fosfatidilcolină (PGFC), L- α -fosfatidilcolină (FC), colesterol (COL). Acești liposomi au fost încărcăți cu doxorubicina.

În tabelul de mai jos este prezentata compozitia initiala a lipozomilor.

Tabel 1. Compoziția inițială a preparării lipozomilor

TIPUL LIPOZOMILOR	LIPIDE	RAȚIA MOLARĂ A LIPIDELOR ($\mu\text{mol/mL}$)	DOX Ci ($\mu\text{g/mL}$)	RAȚIA MOLARĂ INIȚIALĂ DOX/FL ($\mu\text{molDOX}/\mu\text{molPL}$)
LNTS	FC:COL	30:6	500	$28,73 \times 10^{-3}$
LTS	DPFC:DSFC:COL	26:4:6	500	$28,73 \times 10^{-3}$
LLTS	PGFC:DPFC:DSFC:COL	2:26:4:6	500	$28,73 \times 10^{-3}$

LNTS: lipozomi nontermosensibili; LTS: lipozomi termosensibili; LLTS: lipozomi lizo-termosensibili; FC: L- α -fosfatidilcolină; DPFC: dipalmitoilfosfatidilcolină; DSFC: distearoilfosfatidilcolină; PGFC: 1-palmitoil-2-hidroxi-3-glicero-fosfatidilcolină; COL: colesterol; FL: fosfolipide; DOX Ci: concentrația inițială de doxorubicină

Concentrația doxorubicinei în probele lipozomale a fost măsurată cu un spectrofotometru Hitachi U-2000 la $\lambda=480$ nm în probe obținute prin dizolvarea lipozomilor în metanol. Conținutul lipozomilor a fost exprimat în DOX/FL, rație molară. Conținutul de DOX a fost calculat ca și dispersie $\mu\text{g/mL}$. Eficiența încapsulării (EE) a fost calculată procentul $EE(\%)=(C_f \times 100)/C_i$ unde C_i și C_f au fost concentrația inițială respectiv finală de doxorubicină. Forma și dimensiunea lipozomilor a fost determinată prin microscopie electronică.

Eliberarea doxorubicinei din lipozomi termosensibili a fost realizată în două etape succesive, care s-au desfășurat la temperaturi diferite de 37°C și 42°C , concentrațiile în soluția receptoare a doxorubicinei fiind măsurate prin spectrofotometrie.

Rezultate

Au fost preparați LTS din FC, LTS din DPFC și DSFC și LLTS din DPFC, DSFC și PGFC. În toate formulele concentrație fosfolipidelor a fost de $30\mu\text{mol/mL}$ și concentrația de colesterol

de 6µmol/mL. Concentrațiile de fosfolipide, rația molară DOX/FL, încărcarea cu doxorubicină și eficiența încărcării sunt prezentate în tabelul II.

Tabel II. Caracteristicile preparării lipozomilor

TIPUL LIPOZOMILOR	FOSOLIPIDE (µmol FL) ±SD	DOX/FL rația molară finală (µmol DOX/ µmol FL)	DOX Cf (µg/mL) ±SD	EE (%)
LNTS	28,85 ± 1,64	5,16 x 10 ⁻³	86,45 ± 8,41	17,29
LTS	29,02 ± 0,95	1,76 x 10 ⁻³	29,02 ± 3,26	5,8
LLTS	28,98 ± 1,73	1,65 x 10 ⁻³	28,08 ± 3,17	5,6

Eficiența încapsulării (EE) a fost mică, în special pentru LTS și LLTS (5,8 și 5,6%) datorită controlului dificil al temperaturii la care se face încărcarea cu doxorubicină a lipozomilor dar crește pentru LNTS (17,29%) unde controlul temperaturii este mai eficient.

La microscopia electronică, lipozomii termosensibili încărcăți cu doxorubicină apar sferici, polidispersați și neagregați. Diametrul mediu al lipozomilor a fost de 246 nm ± 109 deviația standard și indexul de polidispersie de 44,3%.

Studiul in vitro de eliberare a doxorubicinei a fost realizat folosind metoda dializei, arătând că cele trei tipuri de lipozomi au comportamente diferite în funcție de temperatură. În timpul menținerii la 42°C a lipozomilor, lipidele bilaminare a LTS și LLTS devine permeabilă și doxorubicina trece în mediul extern. Teoretic, acest proces a fost mai rapid și cantitatea de doxorubicină a fost mai mare pentru LLTS. Permeabilitatea a fost redusă pentru lipozomii netermosensibili, nu a fost influențată de temperatură, rata de eliberare a DOX a fost aceeași la 37 sau 42°C. La sfârșitul a 15 minute la 42°C, pentru cele trei tipuri de lipozomi, cantitatea de doxorubicină liberă a fost diferită (LLTS>LTS>>LNTS), determinând în procesul de dializă rate diferite de difuziune și cantități diferite de doxorubicină difuzată.

Concluzii

Rezultatele sugerează că hidratarea filmului lipidic și metoda extruderii sunt metode potrivite pentru prepararea de lipozomi încărcăți cu doxorubicină dar trebuie optimizate din punct de vedere al eficienței încapsulării. LTS sunt polidispersați cu un diametru mediu de 246 nm. Proprietățile termice ale LTS și LLTS determinate la 42°C, în special pentru LLTS, demonstrează că aceste tipuri de lipozomi pot fi utili în tratamentul cancerului asociat cu hipertermia controlată.

Studiul 3. Determinarea prin laser Doppler a perfuziei tumorale periferice după tratamentul cu radiofrecvență a metastazelor hepatice colorectale – studiu experimental

Introducere

Astăzi, ablația prin radiofrecvență este cea mai răspândită metodă pentru distrucția in situ a metastazelor hepatice de CRC ce nu pot fi rezecate. Totuși, 40% dintre pacienții tratați cu radiofrecvență prezintă recurențe ale bolii în primul an după terapie, iar 12% dintre acești sunt la locul de tratament al primei leziuni, rata de recurență, fiind proporțională cu dimensiunea inițială a tumorii. Rata de recurență locală în cazul tumorilor cu diametru mai mare de 3 cm este cauzată de variabilitatea înaltă și reproductibilitatea scăzută a metodei de ablație cu radiofrecvență.

Eficiența ablației prin radiofrecvență este dependentă de distanța până la sonda de radiofrecvență și mai mult de tipul de vascularizație a țesutului. Curentul sanguin poate prelua și disipa căldura și prin aceasta, la marginea ariei de coagulare prin radiofrecvență pot persista celule tumorale viabile și chiar vase tumorale.

Laser Doppler-ul (LDF) s-a demonstrat a fi o metodă simplă și bine stabilită de monitorizare a fluxului sanguin microcirculator în diferite organe. Avantajele LDF înaintea altor tehnici sunt: ușurința în folosire, neinterferența cu fluxul sanguin propriu-zis și măsurarea continuă și în timp real cu un grad înalt de rezoluție în timp.

Ipoteza de lucru

Scopurile studiului au fost să evalueze microcirculația folosind laser doppler-ul la nivelul țesutului hepatic și la periferia tumorii după aplicarea radiofrecvenței și influența creșterii temperaturii la 42°C asupra perfuziei tisulare locale în același loc.

Materiale si metode

Au fost folosiți 15 șobolani masculi, rasa Wag/Rij (Charles River, Germania), cântărind între 250-300 g și s-a fost folosit linia celulară CC531s de adenocarcinom pentru inocularea tumorii. Tumora este moderat diferențiată și este singenică cu șobolanii Wag/Rij. Celulele tumorale au fost inoculate la nivelul ficatului în două puncte, la nivelul capsulei acestuia.

Când tumora a ajuns la 1 cm diametru, la 21 de zile după inocularea tumorală, tumora din dreapta a fost distrusă folosind radiofrecvența (Generator RITA® și electrod SDE Starbust, AngioDynamics® INC, USA). Electrocul de radiofrecvență a fost introdus 1 cm în tumoră și a fost aplicat curentul pentru 2 minute la 80°C la o putere de 20 W. Tumora stânga a lobului hepatic stâng a fost lăsată netratată ca și control negativ.

Perfuzia a fost măsurată pe ficat normal și la nivel tumoral înainte și după aplicarea tratamentului cu radiofrecvență. Perfuzia a fost înregistrată 2 minute inițial, 2 minute după încălzirea la 42°C și 2 minute după ce temperatura inițială a fost atinsă din nou.

Rezultate

Leziunile de la nivelul ficatului au avut un diametru mediu de 1,22 cm (SD=0,26). Perfuzia periferică la nivelul țesutului hepatic (M=110,1256, SE=5,91) a fost mai mică decât perfuzia periferică a țesutului hepatic încălzit la 42°C (M=116,2567, SE=5,8, t(8)= 2,821, p=,022). Atunci când perfuzia periferică a tumorii (M=163,45, SE=41,06) a fost comparată cu perfuzia în același loc încălzit la 42°C (M=152,04, SE=33,94) nu a existat nici o diferență statistică (r(8)=1,19, p=,268) cu scăderea perfuziei la locul de măsurare după încălzire.

După tratamentul cu RF, perfuzia marginilor tumorii (M=19,2, SE=4,5) a fost mai mică decât perfuzia periferică a țesutului hepatic normal tratat (M=105, SE=6,76, t(5)=9,96, p=,000). Perfuzia periferică a tumorii (M=164,25, SE=52,8) a fost mai mare decât perfuzia țesutului normal (M=107,25, SE=6,19) dar fără semnificație statistică (t(6)=-1,176, p=,284).

Perfuzia periferică a țesutului hepatic încălzit la 42°C (M=112,9, SE=6,82) a fost mai mare decât perfuzia periferică a tumorii după RF încălzită la 42°C (M=16,8, SE=3,83, t(5)=12,18, p=,000). Dacă perfuzia bazală a ficatului după încălzire (M=99,77, SE=11,56) a fost comparată cu perfuzia bazală a tumorii după RF și după încălzire (M=16,06, SE=4,06) a arătat semnificație statistică (t(5)=6,25, p=,002) cu o scădere evidentă a perfuziei tisulare.

S-a înregistrat o scădere a perfuziei marginale a tumorii după radiofrecvență (M=19,39, SE=3,75) atunci când a fost comparată cu perfuzia tumorală după radiofrecvență la 42°C (M=18,36, SE=3,63, t(6)=3,8, p=,009). După tratamentul cu radiofrecvență perfuzia periferică bazală a tumorii (M=19,94, SE=4,43) a fost mai mică decât perfuzia periferică bazală a tumorii după încălzire (M=132,55, SE=32,1, t(6)=3,41, p=,014).

Concluzii

În studiul nostru, după ablația prin radiofrecvență, transductorul laser Doppler a înregistrat prezența fluxului sanguin la marginea necrozei de coagulare, chiar dacă vascularizația a fost semnificativ redusă atunci când s-a comparat cu țesutul hepatic normal înconjurător.

Hipertermia moderată (42°C) a fost urmată de o îmbunătățire semnificativă a fluxului sanguin în țesutul hepatic normal comparativ cu tumora, în timp ce fluxul sanguin la periferia zonei de radiofrecvență a fost semnificativ încetinit decât cel înregistrat la nivelul țesutului tumoral hipertermic sau în parenchimul hepatic normal.

Studiul 4. Evaluarea riscului de recidivă tumorală după tratamentul cu radiofrecvență asociat chimioterapiei locale hipertermice condiționată lipozomal prin analiza histologică, imunohistochimică și a profilului citokinelor

Introducere

Ablația cu radiofrecvență s-a impus în fața celorlalte tehnici ablativ locale datorită unei morbidități și mortalități scăzute și a unei supraviețuiri satisfăcătoare, între 25-50%. Cel mai important dezavantaj al metodei este recurența locală care variază între 2,3% și 40% depinzând de tipul de intervenție, tratamentul asociat, diametrul tumorii inițiale, timpul de urmărire dar și de modul cum a fost definită recurența locală.

Efectul radiofrecvenței asupra celulelor tumorale restante sunt contradictorii. Unii autori au sugerat că efectul este unul de inhibare a creșterii printr-o creștere a activității antitumorale a celulelor T datorat unei prezentări mai bune a antigenului tumoral de către celulele prezentatoare de antigen (APC). Alți autori au considerat că această rată crescută a recidivelor, chiar la locul de aplicare al radiofrecvenței s-ar datora eliberării locale, consecutive distrucției celulare, a unor factori de creștere tisulari, cum ar fi factorul de creștere al endoteliului vascular (VEGF) care ar favoriza dezvoltarea micrometastazelor din imediata periferie a tumorii distruse.

Ipoteza de lucru

Obiectivele studiului au fost (i) de a identifica dintr-o serie de citokine, pe acelea care se regăsesc în zona de necroză după radiofrecvență și (ii) de a identifica dacă sunt influențate de tipul de tratament aplicat, (iii) de a identifica prezența VEGF-ului la periferia tumorală, iar în corelație cu tipul de tratament aplicat (iv) de a defini rolul acestuia în apariția recidivei locale și (v) de a evalua histologic riscul de recidivă după asocierea la ablația cu radiofrecvență a chimioterapiei locale condiționate lipozomal. În scopul reducerii incidenței recidivei locale după radiofrecvență s-a propus asocierea acestei modalități de ablație tumorală cu administrarea de citostatice care să ducă la distrugerea grupurilor celulare viabile restante după radiofrecvență. Administrarea medicamentelor sub formă lipozomală are ca si avantaje creșterea concentrației locale, biocompatibilitatea și toxicitatea scăzută

Materiale si metode

Au fost folosiți optzeci de șobolani masculi, rasa Wag/Rij, cu greutatea medie 237 g (250-300 g). A fost folosită linia celulară CC531s de adenocarcinom colonic. Această tumoră este moderat diferențiată și este singenică cu șobolanii Wag/Rij. Pentru inocularea la nivel hepatic s-au folosit 0.1 ml din suspensia celulară care a fost injectată în două puncte, subcapsular în lobul hepatic stâng.

Medicamentul folosit pentru încărcarea lipozomilor a fost doxorubicina. Lipozomii au fost produși din fosfolipide (lecitina), folosind metoda Bangham pentru a obține lipozomi unilamelari mici (SUV).

La douăzeci și unu de zile de la inocularea tumorală șobolanii au fost repartizați aleator în unul din grupurile de studiu (descrise mai jos), fiecare grup conținând 10 șobolani. Studiul anterior care a stabilit rata de creștere tumorală, a arătat că la 21 de zile de la inoculare diametrul tumorilor este de aproximativ 1.22 cm cu o deviație standard de +/-0.24 cm.

Grupul 1 a fost supus ablației prin radiofrecvență a tumorii drepte din lobul stâng hepatic folosind un generator de radiofrecvență RITA (RITA® Model 1500X RF, AngioDynamics, USA) și un electrod monopolar cu vârfuri expandabile (Starburst™ SDE, AngioDynamics, USA). Proba de radiofrecvență a fost introdusă 1 cm în tumoră, au fost expandate vârfurile la 1 cm și radiofrecvența a fost aplicată pentru 2 minute la 62°C cu o putere setată la 20 watt. Tumora stângă a fost păstrată netratată ca și control negativ.

Șobolanii din grupul 2 au fost tratați prin radiofrecvență așa cum a fost descris pentru grupul 1 și la sfârșitul procedurii lipozomii termosensibili au fost administrați intrahepatic folosind electrodul Starburst SDE. Hipertermia a fost obținută prin conectarea electrodului la generatorul de radiofrecvență cu temperatura setată la 42°C, puterea la 0 watt și timpul total la 20 de minute.

Animalele din grupul 3 au fost tratați doar prin chimioterapie intrahepatică hipertermică cu lipozomi termosensibili.

În grupul 4 tratamentul a constat în ablație cu radiofrecvență combinat cu chimioterapie intrahepatică cu doxorubicină sub formă standard.

Pentru animalele din lotul 5 s-a administrat intravenos doxorubicină ca preparat standard.
În grupul 6 animalelor le-a fost administrată doxorubicina standard, intrahepatic asociat hipertermie ca și control negativ al efectului hipertermiei (control al grupului 3).

Șobolanii din grupul 7 au fost lăsați netratați ca și control pozitiv.

Grupul 8 a constat în controlul negativ și a constat în probe de ficat sănătos, netumoral, fără tratament anterior.

Citokinele (IL-2, IL-4, IL-18, ICAM, TNF α , IFN- γ și VEGF) au fost măsurate folosind sistemul Luminex 200.

Rezultate

Recidiva tumorală a fost evaluată histologic, fiind identificate prezența de țesut tumoral la marginea ariei de necroză. Recidiva a fost de 20% pentru lotul la care s-a aplicat doar radiofrecvență, 50% la cei la care s-a asociat chimioterapia intrahepatică condiționată lipozomal, 57% în lotul cu tratament local cu lipozomi, 40% pentru lotul la care s-a asociat radiofrecvenței chimioterapia intrahepatică standard, 60% pentru șobolanii cărora le-a fost administrată doxorubicina standard iv și 100% pentru șobolanii la care s-a administrat doxorubicina intrahepatic, local. Semnificație statistică $p < .05$ a fost identificată la compararea loturilor cu lotul de chimioterapie intrahepatică.

Inflamația a fost semnificativ statistic mai mică pentru lotul tratat doar cu radiofrecvență 1.53 ($\pm .43$) ($p=.014$), pentru lotul tratat cu radiofrecvență asociat chimioterapiei intrahepatice condiționată lipozomal 1.13 ($\pm .61$) ($p=.01$) și pentru șobolanii tratați doar cu chimioterapie intrahepatică lipozomală 1.33 ($\pm .11$) ($p=.0003$) comparativ cu lotul control 2.16 ($\pm .16$).

Chimioterapia intrahepatică condiționată lipozomal determină o fibroză semnificativ statistic mai mare decât în lotul control ($p=.033$).

Concentrația de VEGF a variat între 176 pg/ml pentru țesutul hepatic normal și 3571 pg/ml în țesutul tumoral netratat, cu diferențe semnificativ statistic între lotul tratat prin chimioterapie standard intravenoasă cu lotul netratat (646 pg/ml vs. 3571 pg/ml, $p=.043$).

ICAM-1 a fost dozat din lizatele tisulare hepatice pentru toți șobolanii care au supraviețuit. Compararea animalelor la care s-a asociat radiofrecvenței chimioterapia cu doxorubicină standard intrahepatic (8354 pg/ml \pm 3734) cu cei din lotul tratat cu radiofrecvență singură (14275 pg/ml \pm 2890) a arătat o valoare semnificativ statistic mai mică ($p=.046$).

Concentrația IL-18 (5955 pg/ml \pm SE=1784) la animalele tratate cu radiofrecvență a fost mai mare decât în grupul de chimioterapie iv (1336 pg/ml \pm SE=79) și grupul control (1229 pg/ml \pm SE=97) ($p=.019$ respectiv $p=.030$). Valori crescute ale IL-18 comparativ cu lotul chimioterapie iv sau control s-au înregistrat și pentru lotul RF și lipozomi intrahepatic (4117 pg/ml \pm SE=2294) ($p=.044$ respectiv $p=.065$), lotul tratat prin chimioterapie condiționată lipozomal intrahepatic (5748 pg/ml \pm SE=2080) ($p=.015$ respectiv $p=.025$), lotul la care s-a administrat intrahepatic doxorubicină asociat radiofrecvenței (4073 pg/ml \pm SE=1175) ($p=.030$ respectiv $p=.042$) și lotul la care s-a administrat doar doxorubicină standard intrahepatic (4684 pg/ml \pm SE=1149) ($p=.017$ respectiv $p=.025$).

Concluzii

Ablația cu radiofrecvență a leziunilor hepatice duce la o creștere a nivelului factorului de creștere a fibroblaștilor-2 (FGF-2) la 12 ore de la ablație și revine la normal la 5 zile după tratament. Datele noastre sugerează că la 14 zile de la tratament fibroza este deja formată, o fibroză mai accentuată fiind indusă de tratamentul cu lipozomi termosensibili intrahepatic. FGF-2 are, alături de VEGF, rol angiogenic, creșterea concentrației FGF-2 putând constitui una din căile colaterale de dezvoltare a angiogenezei.

IL-18 este o citokina cu rol proinflamator și alături de IL-12 joacă un rol important în imunitatea mediată celular, iar prin legarea IL18 de celulele natural killer eliberează IFN- γ , interferon ce activează macrofagele³⁶. Valorile crescute determinate de noi în toate grupurile de studiu la care terapia a implicat ficatul este legată de inflamația locală determinată de tratament.

Tratamentul prin radiofrecvență asociat cu chimioterapia intratumorală condiționată lipozomal nu determină modificări semnificative nici în ceea ce privește supraviețuirea, rata de

recidivă sau modificările histologice de la nivel local, comparativ cu aplicarea ablației cu radiofrecvență singure. Studii viitoare trebuie realizate cu scopul de a stabili rolul interleukinei 18, citokină ce, în studiul prezentat, prezintă valori crescute la loturile tratate cu radiofrecvență cu sau fără chimioterapie condiționată lipozomală. De asemenea, este de interes evaluarea rolului și efectelor altor chimioterapice în formă de prezentare lipozomală, precum și eficiența asocierii lor cu terapiile ablativ locale.

Concluzii generale

Radiofrecvența este o tehnică ușor de însușit de către chirurg sau radiolog, fiind o metodă cu rate de morbiditate și mortalitate acceptabile.

Modelul experimental de implantare a tumorilor la nivel hepatic este unul viabil, relativ ieftin de realizat, cu rate de apariție a metastazelor hepatice mari și cu morbiditate și mortalitate scăzute.

Pentru a evita leziunile termice ale organelor învecinate și ale țesutului hepatic normal, setarea generatorului de radiofrecvență la o putere de 10 watt pentru a asigura creșterea temperaturii țesuturilor la 62°C și menținerea temperaturii pentru 1 minut sunt suficiente pentru a obține o ablație completă a leziunii cu un risc foarte scăzut de apariție a efectelor adverse.

Chimioterapia țintită folosind lipozomi prezintă avantajul de a crește concentrația la nivel local și de a scădea toxicitatea medicamentoasă.

Proprietățile termice ale lipozomilor termosensibili și ale lipozomilor lizo+termosensibili determinate la 42°C demonstrează că aceste tipuri de lipozomi pot fi utili în tratamentul cancerului asociat cu hipertermia controlată.

Hipertermia moderată local poate crește efectele citotoxice ale chimioterapicelor și ulterior poate îmbunătăți controlul local al tumorii. Asocierea radiofrecvenței cu administrarea de doxorubicină condiționată lipozomală a arătat o creștere a concentrației de doxorubicină în tumoră.

Originalitatea tezei

Este primul studiu care încearcă să evalueze efectele sporirii hipertermiei asupra fluxului sanguin în țesutul hepatic normal sau la nivelul metastazelor hepatice înainte și după tratamentul prin radiofrecvență și evaluarea microcirculației la acest nivel folosind laser-doppler-ul (Periflux 5000, Perimed AB, Suedia, cu o probă termostatică de laser Doppler - PF457).

UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY
IULIU HAȚIEGANU CLUJ-NAPOCA

ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

Locul radiofrecvenței în tratamentul leziunilor hepatice maligne secundare cancerului colorectal

PhD Candidate **Precup Călin Gheorghe**, MD

Scientific coordinator Professor. **Dr. Ciuce Constantin**, MD, PhD

CLUJ-NAPOCA 2014



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Keywords

Radiofrequency, liver metastasis, colorectal cancer, liposomes, laser Doppler, microcirculation, cytokines

Introduction

Colorectal cancer is one of the most frequent malignant diseases in the last two decades. Roughly 25-44% of patients with colorectal cancer have ganglionic metastasis when diagnosed and 50% from them will develop recurrence in the next 5 years. Liver metastasis will represent 40-80% from those recurrences.

Surgical resection of metastatic disease of liver was the only efficient method of treatment. This technique is not without risks and because of that new ways of treatment were developed. Today, radiofrequency ablation is the most wide spread method for destruction of liver local metastatic tumor without surgical indication. Studies reveals that 40% of the patients treated with RF will develop a recurrence in the first year after the treatment, and 12% are situated at the site of the initial lesion and it is proportional with the initial size of tumor.

This paper tries to establish the role of RF ablation in liver metastatic disease of colorectal cancer by associating the liposomal chemotherapy with RF treatment. In the present study we will try to standardize an experimental method for the study of this association, we will study the vascularization of the tumor before and after the treatment, morphological changes induced by treatment and the immunology of the process.

The studies were financed by Ministry of Education and Research, program Research and Innovation PN II, Contract No 195/2007.

Premises

Hepatic resection for metastatic lesion is the principal method of treatment with the intention of curing the disease. This method has rigorous sets of rules and those rules were the subject for many studies.

Imagistic investigations are used to determine the number, dimensions and lobar distributions of metastatic liver disease and the presence of the disease beyond the liver borders including here: lymphatic ganglia, peritoneal metastatic disease, local or regional recurrence and presence of the disease in lungs, bones or brain.

Hepatic resection is gold standard in treatment of hepatic tumor that are prone to resection but it cannot be performed in 80% of the cases from multiple reasons: low volume of remnant liver tissue after resection, concomitant diseases, or mal position and number of metastasis.

RF alone or in combination with hepatic resection can be the answer for the patients with contraindication of liver resection or when the resection cannot insure a R0 excision of the tumor. RF ablation it is not a replacement of resection, but more an extension or a supplement for the patient with no resectable tumor.

RF treatment has the upper hand comparing with the other ablative techniques because it is a method easy to apply with a low rate of morbidity and mortality.

The most important drawback of this method is the local growth of the tumor at the original treatment site. Recurrence rates vary widely between 2.3% and 40% depending on the type of therapy, initial tumor diameter, time tracking, type of intervention (percutaneous vs open) and not the least, the way it was defined local recurrence.

In recent year significant progress has been made in the treatment of colorectal cancer liver metastases by increasing the accuracy of imaging, improved surgical techniques, locoregional therapeutic options and the availability of more effective chemotherapeutic agents.

For successful adjuvant chemotherapy, the bioactive substance and the bioactive concentration of must be released in such a way as to reach the organ without exposing healthy tissue. New drug delivery systems increase and maintain the concentration of the substance in the vicinity of the target site, thus minimized side effects on normal tissues. Among the molecules used as carriers, liposomes are the most studied for their applicability transport.

Personal contribution

Premises and objectives

The research is aimed to study the effectiveness of treatment of unresectable liver metastases from colorectal cancer using the combination of radiofrequency with hyperthermic intratumoral chemotherapy in experimental models.

From a pharmacological point of view the research objective was to improve the pharmacokinetic and dynamic qualities of cytostatic aimed at increasing their efficiency in the tumor cells.

From animal model perspective the research will specify the proper use of RF and will describe the experimental model for liver metastasis and rate of tumoral growth rate.

There were also evaluated angiogenesis stimulating factors (PDGF platelet-derived growth factor, endothelial growth factor VEGF, TNF, tumor necrosis factor). Finally we studied the therapeutic efficacy of radiofrequency hyperthermia associated with intratumoral chemotherapy to assess each therapeutic method in part, ultimately aiming at the therapeutic results of the association of the two treatments.

General methodology

Experimental studies have used cell line of colon adenocarcinoma in rats CC531s specifically developed Wag/Rij used for the induction of tumors in syngeneic rat liver. The drug used was doxorubicin for loading the liposomes. Liposomes have been made from phospholipids (lecithin), using the method of Bangham to obtain small unilamellar liposomes (SUV). Radiofrequency ablation was performed using an expandable electrode tips (SDE Starburst™, AngyoDynamics, USA) connected to a generator RITA (RITA® Model1500xRF, AngioDynamics, USA). Tumor vasculature was measured using Laser Doppler microvascular system - System Periflux 5000, Perimed AB, Sweden. Samples of tissue were harvested for histological and immunohistochemical analysis. Immunohistochemical analysis of the same tissue samples was meant to highlight the presence of VEGF-uli in the tumor. Normal tissues of liver and kidney were used as negative and positive control for the staining method.

Plasma concentrations of growth factors were measured in cell lysates of samples using Luminex 200 system (Luminex Corp., TX, USA).

Study No 1. Experimental protocol for in situ ablation of colorectal liver metastases in rats by radiofrequency, using expandable tip electrodes- toward a standard procedure

Introduction

Radiofrequency (RF) ablation became an alternative to surgical resection for focal liver tumors treatment. The use of RF ablation in combination with surgery or chemotherapy and the large panel of RF tools need new experimental models in order to develop new opportunities for this kind of therapy.

Aim

The aim of this study was to identify the optimal RF parameters that will allow in situ destruction of liver metastases with minimal secondary effects.

Materials and method

Wag / Rij breed rats with an average weight of 260 g with induced liver metastases (tumor line CC531s) were used. RF was applied with RITA 1500X (AngioDynamics, USA) device using a Starburst probe SDE (AngioDynamics, USA). The probe has expandable tips to achieve a uniform distribution of RF. These tips have the possibility to monitor the temperature of the periphery of the lesion.

Changing the power (90W, 20W 10W) that is administered , we watched the induced RF lesions on 21 days old liver tumor(tumor diameter 1.22 +/- 0.24 cm) from the inoculation of tumor cell line in the liver capsule, using a target temperature at the periphery area of tissue destruction of 62 ° C, and the survival rate of the animals.

Results

Survival was significantly lower in the group of animals who receive 90 watts of power, only one animal survived 7 days after RF application. Also, differences were observed in morphological

changes of liver tissue and the organs in vicinity between study groups, but with no statistical significance.

There were no statistically significant differences between the group with 90 Watt and 20 Watt group and between group 10 Watt and 20 Watt (log rank p = 0.061, Breslow p = 0.137 and Tarone - Ware p = 0.094 for groups 90W/20W, and log rank p = 0.274, Breslow p = 0.187 and Tarone - Ware p = 0.224 for groups 20W / 10W). Evaluation of quality indicators and morphological changes of internal organs indicators are better in the group of animals treated with 10 watts and higher survival rate than in the groups treated with 20 Watt and 90 Watt.

Stained for VEGF produced no significant differences between the groups studied, negative results being influenced in reality by the small number of animals that survived at the end of the experiment.

Conclusions

An increased power delivered to the liver metastases during the RF tumor ablation in small animals may cause important damages to the surrounding normal liver tissue and to the adjacent organs. This results in a low survival rate, even when compared with natural evolution of the tumor. Our study suggest that setting the RF generator to deliver only a power of 10 watt, in order to insure the increase of the tissue temperature at 62 °C and maintained it for 1 minute, is sufficient to acquire a complete lesion ablation with a very low risk of adverse effects. However further tests are needed to investigate the recurrence rate of the tumour related with the power delivered to the tissue.

Study No 2. Thermosensitive liposomes containing doxorubicin. Preparation and in vitro evaluation

Introduction

Liposomes have been reported to modulate the stability and to improve the pharmacokinetic properties of the encapsulated drug reducing side effects and improving its in vitro and in vivo activity. A major goal for many years has been the development of liposomes that can be activated to release their contents only at the targeted site. Thus, it was necessary to design better liposomal carriers, such that the liposomes can be triggered to release encapsulated contents.

Doxorubicin (DOX) is the first anthracycline antibiotic that was used clinically to fight cancer.

The use of hyperthermia has been actively pursued due to several advantages: hyperthermia can increase tumor blood flow and microvascular permeability and the extravasation and accumulation of liposomes in the locally heated tumor. Hyperthermia has been used as an adjuvant therapy in surgery, radiation and chemotherapy. Supra-additive cytotoxic effects may be achieved when hyperthermia is used in combination with several chemotherapeutic agents which can be delivered via liposome encapsulation.

Aim

The aim of this work was to prepare and to evaluate DOX-loaded thermosensitive liposomes (TSL) properties, regarding drug loading, entrapment efficiency, size, morphology and in vitro DOX release.

Materials and method

The liposomes were prepared by lipid film hydration and extrusion method and filled with doxorubicin. The lipids used for making the liposomes are: dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), distearoylphosphatidylcholine (DSPC), 1-palmitoyl-2-lyso-glycero-3-phosphocholine (P-lyso-PC), L- α -phosphatidylcholine (PC), cholesterol (CHOL).

Table I. Initial composition of liposomes.

TYPE	LIPIDS	MOLAR		DOX	DOX / PL	
		RATIO	RATIO		INITIAL	MOLAR
NTSL	PC : CHOL	30 : 6	500	28.73 X 10 ⁻³		
TSL	DPPC: DSPC: CHOL	26 : 4 : 6	500	28.73 X 10 ⁻³		

LTSL	P-LYSO-PC :	2 : 24 :	500	28.73 X 10 ⁻³
	DPPC·DSPC·CHOL	4·6		

NTSL, non-thermosensitive liposomes; TSL, thermosensitive liposomes; LTSL, lyso-thermosensitive liposomes; PC, L- α -phosphatidylcholine; DPPC, dipalmitoylphosphatidylcholine; DSPC, distearoylphosphatidylcholine; P-lyso-PC, 1-palmitoyl-2-lyso-glycero-3-phosphocholine; CHOL cholesterol; PL phospholipids. Ci=initial DOX concentration

DOX concentration of the liposomal samples was measured on a Hitachi U-2000 spectrophotometer at $\lambda=480$ nm in samples obtained by dissolving the liposomes in methanol.

Content of liposomes was expressed as DOX/PL molar ratio. DOX content was calculated as $\mu\text{g}/\text{mL}$ dispersion. Entrapment efficiency (EE) was calculated as: $EE (\%) = (C_f \times 100)/C_i$ where C_i and C_f are the initial and final DOX concentration, respectively. DOX-loaded TSL were observed by transmission electron microscopy (TEM).

In this study we prepared NTSL based on PC, TSL based on DPPC and DSPC, and LTSL based on DPPC, DSPC and P-lyso-PC. In all formulations the PL concentration was 30 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ and for CHOL, 6 $\mu\text{mol}/\text{mL}$. PL concentrations, DOX/PL molar ratio, DOX loading and EE of obtained liposomes are presented in Table II.

Table II. Characteristics of liposomal preparations

E LIPOSOMES	TYP OF PL	PL(μMOL PL) \pm SD	DOX / PL FINAL MOLAR RATIO ($\mu\text{MOLS DOX} / \mu\text{MOL PL}$)	DOX CF($\mu\text{G}/\text{ML}$) \pm SD	E (%)
	L	NTS	28.85 \pm 1.64	5.16 $\times 10^{-3}$	86.45 \pm 8.41
L	TSL	29.02 \pm 0.95	1.76 $\times 10^{-3}$	29.02 \pm 3.26	.8
L	LTS	28.08 \pm 1.73	1.65 $\times 10^{-3}$	28.08 \pm 3.17	.6

EE was small, especially for TSL and LTSL (5.8 and 5.6 %) because it was difficult to control the temperature but was relative high for NTSL (17.29 %) because the control of this temperature was more effective.

The DOX-loaded TSL appear spherical, polydispersed and not aggregated. Liposome size was measured (246 nm \pm 109), and mean diameter and particle size distribution (polydispersity index) were calculated (44,3%).

The in vitro DOX release study, done by a dialysis method, showed that the three liposomes types had different thermal behavior.

During the liposomes maintenance of 42°C, lipid bilayer of TSL and LTSL became permeable and DOX passed to external medium. Theoretically, this process was more rapid and the amount of released DOX higher for the LTSL. The permeability rate of DOX was reduced for NTSL. It was not influenced by temperature (the release rate of DOX is the same at 37 or 42°C). At the end of 15 min at 42°C, for the three types of liposomes, the amount of free DOX was different (LTS>TSL>>NTSL), determining different diffusion rates and different amounts of DOX to be diffused.

Conclusion

Our results suggest that the lipid film hydration and extrusion method is suitable for DOX-loaded liposomes preparation but it must be optimized concerning entrapment efficiency. TSL are polydispersed with a mean diameter of 246 nm. Thermal properties of TSL and LSTL determine at 42°C an important DOX in vitro release, especially for the LTSL, demonstrating that these types of liposomes may be advantageous in the cancer treatment associated with controlled hyperthermia.

Study No 3. Assessment by laser Doppler of the peripheral tumor perfusion after radiofrequency of colorectal liver metastasis – experimental study

Introduction

Nowadays, radiofrequency is the most widely used therapeutically method for in situ destruction of the CCR hepatic metastases which cannot be resected. However, up to 40% of patients display recurrences of the lesions and 12 % of these are on the same spot of the treatment in the first year following therapy, recurrence rate being proportional with the size of the lesion.

The high rate of local recurrences in tumours with a diameter of more than 3 cm is caused by the high variability and poor reproducibility of the ablation area.

The RF ablation efficiency is dependent on distance up to the radiofrequency probe and moreover is dependent on the tissue vascularization type. The blood flow can undertake and dissipate the heat and hereby on the edge of radiofrequency coagulation area can persist viable tumor cells and even tumoral vessels.

Laser-Doppler flowmeter (LDF) has proved to be a simple and well established technique for monitoring the microcirculatory blood flow in different organs. The LDF advantages over other techniques are: the ease to use, noninterference with blood flow, and continuous and real-time measurements with a high degree of spatial resolution.

Aim

The aims of the study was to evaluate microcirculatory blood flow using Laser Doppler for hepatic tissue and peripheral tumour perfusion after radiofrequency and the influence of temperature increasing at 42°C on local tissue perfusion in the same spots.

Materials and method

Fifteen male Wag/Rij rats weighing 250-300 g were used (Charle River, Germany). The colon adenocarcinoma cell line CC531s was used for tumor inoculation. The tumour is moderately differentiated and synergic to Wag/Rij rats. For liver tumour induction the cells were injected in two sites subcapsularly in the liver left lobe.

When the tumour was 1 cm in diameter, 21 days after tumour inoculation, the right tumour was destroyed using radiofrequency. The RF probe was inserted 1 cm in to the tumour and the radiofrequency was applied for 2 minutes at 80°C with the set-up power at 20W. The tumour in the left lobe was kept untreated as a negative control.

Perfusion was measured in normal liver, on the tumour before and after radiofrequency treatment. Perfusion was recorded for 2 min initial, 2 min after the tissue was heated at 42°C and 2 min after the initial temperature was reached again.

Results

The diameter of liver lesions were in average diameter of 1,22 cm (SD=0,26).

Peripheral perfusion of the liver tissue (M=110,1256, SE=5,91) was smaller than peripheral perfusion of normal liver tissue heated at 42°C (M=116,2567, SE=5,8, t(8)= 2,821, p=,022).

When the peripheral perfusion of tumour (M=163,45, SE=41,06) was compared with the perfusion in the same spot but heated at 42°C (M=152,04, SE=33,94) there was no statistical differences (t(8)=1,19, p=,268) with a decrease of perfusion after heating at the measurement site.

After RF treatment the perfusion of the tumour margins (M=19,2, SE=4,5) was lower than peripheral perfusion of the liver (M=105, SE=6,76, t(5)=9,96, p=,000). The peripheral perfusion of the tumor (M=164,25 SE=52,8) was higher than the perfusion of normal liver (M=107,25, SE=6,19) but with no statistical significance (t(6)=-1,176, p=,284).

The peripheral perfusion of the liver heated at 42°C (M=112,9, SE=6,82) was higher than the peripheral perfusion of the tumor after RF heated at 42°C (M=16,8, SE=3,83, t(5)=12,18, p=,000). If the basal peripheral perfusion of the liver after heating (M=99,77, SE=11,56) was compared with the basal peripheral perfusion of the tumor post RF and after heating (M=16,06, SE=4,06) it showed statistical significance (t(5)=6,25, p=,002) with a clear drop of tissue perfusion.

There was a marginal decrease in perfusion of the tumor after radiofrequency (M = 19.39, SE = 3.75) when it was compared with tumor perfusion at 42 ° C after radiofrequency (M = 18.36, SE = 3.63, T (6) = 3.8, p =, 009). Following treatment with radiofrequency peripheral base of the tumor perfusion (M = 19.94, SE = 4.43) was lower than the peripheral base of the tumor perfusion after heating (M = 132.55, SE = 32.1, t (6) = 3.41, p =, 014).

Conclusion

In our study moderate hyperthermia (42°C) was followed by a significant improvement in the normal liver blood flow when compared to the tumour, while the blood flow at the edge of the RF zone was significantly slower than that recorded in the hyperthermic tumour tissue or in the normal liver parenchyma.

Study No 4. Risk assessment of tumor recurrence after treatment with radiofrequency associated with local hyperthermic chemotherapy liposomal conditioned by histology and immunohistochemical profile of cytokines.

Introduction

Radiofrequency ablation has defeated other local ablative techniques with her low morbidity and mortality and a satisfactory survival between 25-50%. The most important disadvantage of the method is local recurrence between 2.3% 11 and 40% depending on the type of action, combination therapy, initial tumor diameter, outcome and how local recurrence was defined.

Radiofrequency effect on restant tumor cells is contradictory. Some authors have suggested that the effect is inhibition of growth by increasing T-cell anti-tumor activity due to a better presentation of tumor antigen by the antigen presenting cells (APC). Other authors have found that the high rate of recurrence, even at the application site of the radiofrequency, to be due to local release, as a result of cell damage, of tissue growth factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), which would encourage the growth of micrometastases in the immediate periphery of the tumor destroyed.

Hypothesis

The objectives of the study were (i) to identify a number of cytokines, those that are found in the area of necrosis after the radio frequency and (ii) to identify whether they are influenced by the type of treatment (iii) to identify VEGF's presence at the tumor periphery and in correlation with the type of treatment applied (iv) to define its role in the occurrence of local recurrence and (v) to evaluate the histologic recurrence after radiofrequency ablation association of local conditional liposomal chemotherapy. In order to reduce the incidence of local recurrence after radiofrequency the association between tumor ablation and the administration of chemotherapy was proposed, leading to the destruction of the viable groups cell, restant after radiofrequency. Drugs administration as liposomal form has the advantages of increased local concentration, biocompatibility and low toxicity.

Materials and methods

Were used eighty male rats race Wag / Rij, average weight 237 g (250-300 g). It was used colonic adenocarcinoma cell line CC531s. This tumor is moderately differentiated and is syngenic with Wag / Rij rats. For liver inoculation were used 0.1 ml of the cell suspension, injected in 2 points: under the liver capsula and in the left lobe.

The drug used for the liposomes was doxorubicin. Liposomes have been made from phospholipids (lecithin), using the method of Bangham to obtain small unilamellar liposomes (SUV).

Twenty-one days after tumor inoculation the rats were randomly assigned to one of the groups of the study (described below), each group containing 10 rats. The previous study who determined the rate of tumor growth, showed that at 21 days after tumor inoculation diameter is about 1.22 cm with a standard deviation of +/- 0.24 cm.

Group 1 was subjected to radiofrequency ablation of the right tumor in the left lobe of the liver using a RITA Radio frequency generator (RITA® Model 1500X RF AngioDynamics, USA) and a monopolar electrode with expandable peaks (Starburst™ EDS, AngioDynamics, USA). RF sample was placed 1 cm in the tumor, the peaks were expanded to 1 cm and applied for 2 minutes at 62 ° C with a power set at 20 watts. The left tumor was preserved untreated as a negative control.

The rats in group 2 were treated by RF as was described for group 1 and at the end of the procedure heat-sensitive liposomes have been administered in the liver using Starburst electrode

EDS. Hyperthermia has been achieved by connecting the electrode to the RF generator, having the temperature set at 42 °C, the power at 0 watts and time at 20 minutes total time.

Animals in group 3 were treated only with intrahepatic hyperthermic chemotherapy with thermosensitive liposomes.

In Group 4 the treatment consisted in radiofrequency ablation combined with intrahepatic chemotherapy with doxorubicin as standard treatment.

For animals in group 5 doxorubicin was administered intravenously as a standard treatment.

In Group 6 animals have been given standard doxorubicin, intrahepatic, associated hyperthermia as a negative control of hyperthermia effect (as a control of group 3).

The rats in group 7 were left untreated as a positive control.

Group 8 was the negative control samples, consisting in healthy liver, non-tumorigenic, without prior treatment.

Cytokines (IL-2, IL-4, IL-18, ICAM, TNF, IFN- γ and VEGF) were measured by Luminex 200 system.

Results

Tumor recurrence was evaluated histologically and the presence of tumoral tissue at the edge of the necrosis area was identified. Relapse was 20% for the group in which only radio frequency was applied, 50% in those adding intrahepatic chemotherapy who is conditioned by liposome, 57% in the group with local treatment with liposomes, 40% for the group to which standard intrahepatic chemotherapy was associated with radiofrequency, 60% for rats with standard doxorubicin and 100% for rats who received local intrahepatic doxorubicin. Statistical significance $p < 0,05$ was identified when comparing lots with intrahepatic chemotherapy group.

Inflammation was significantly lower in the group treated only with RF $1.53 (\pm .43)$ ($p = .014$) for the group treated with liposomal conditional intrahepatic chemotherapy associated with RF $1.13 (\pm .61)$ ($p = .01$) and rats treated with liposomal intrahepatic chemotherapy $1.33 (\pm .11)$ ($p = .0003$) compared with the control group $2.16 (\pm .16)$.

Chemotherapy causes liposomal conditioned intrahepatic fibrosis significantly higher than in the control group ($p = .033$).

VEGF concentration ranged from 176 pg / ml for normal liver tissue to 3571 pg / ml in untreated tumor tissue, with statistically significant differences between the group treated with standard intravenous chemotherapy with control (646 pg / ml vs. 3571 pg / ml, $p = .043$).

ICAM-1 was dosed in the liver tissue from lysates for all surviving rats. Comparing animals receiving standard doxorubicin chemotherapy associated with intrahepatic radiofrequency ($8354 \text{ pg / ml} \pm 3734$) with those in the group treated with RF alone ($14275 \text{ pg / ml} \pm 2890$) showed a significantly lower value ($p = .046$).

The IL-18 ($5955 \text{ pg / ml} \pm \text{SE} = 1784$) in the animals treated radio frequency was higher than in the iv chemotherapy group ($1336 \text{ pg / ml} \pm \text{SE} = 79$) and control group ($1229 \text{ pg / ml} \pm \text{SE} = 97$) ($p = .019$ $p = .030$). Elevated IL-18 compared with iv chemotherapy or control group were recorded also for RF group and intrahepatic liposome ($4117 \text{ pg / ml} \pm \text{SE} = 2294$) ($p = .044$ $p = .065$), the group treated with intrahepatic chemotherapy liposomal conditioned ($5748 \text{ pg / ml} \pm \text{SE} = 2080$) ($p = .015$ $p = .025$), group who received intrahepatic doxorubicin associated with radiofrequency ($4073 \text{ pg / ml} \pm \text{SE} = 1175$) ($p = .030$, respectively $p = .042$) and the group that received only standard intrahepatic doxorubicin ($4684 \text{ pg / ml} \pm \text{SE} = 1149$) ($p = .017$ $p = .025$).

Conclusions

Radiofrequency ablation of liver injury leads to an increase in the level of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) at 12 hours after the ablation and return to normal at 5 days after treatment. Our data suggest that at 14 days after treatment fibrosis is already formed, a more pronounced fibrosis being induced by treatment with intrahepatic heat-sensitive liposomes. FGF-2 has, together with VEGF, angiogenic role. The increase in the concentration of FGF-2 may be one way of developing collateral angiogenesis.

IL-18 is a cytokine with pro-inflammatory role and together with IL-12 plays an important role in cell-mediated immunity and by binding IL-18 to natural killer cells, releases IFN- γ , interferon operating macrophage³⁶. Elevated levels determined by us in all study groups in which therapy involved liver is linked to local inflammation caused by the treatment.

Radiofrequency treatment associated with intratumoral chemotherapy liposomal conditioned is not generating any significant changes in terms of survival, relapse rate or local histological changes versus application of radiofrequency ablation alone. Future studies should be conducted in order to establish the role of interleukin 18 cytokine that this study showed elevated in the groups treated with radiofrequency with or without conditional liposomal chemotherapy. It is also of interest to evaluate the role and effects of other chemotherapeutic agents in the form of liposomal presentation, and the efficiency of their association with local ablative therapies.

General conclusions

Radiofrequency is a technique easily to acquire by the surgeon or radiologist, being a method with acceptable morbidity and mortality rates.

The experimental model of liver tumor implantation is a viable one, relatively inexpensive to achieve, with large rates of liver metastasis occurrence and low morbidity and mortality.

To avoid thermal damages of neighboring organs and normal liver tissue, setting the RF generator to a power of 10 watt, to ensure increasing the tissue temperature at 62 ° C and maintaining the temperature for 1 minute, is sufficient to achieve complete ablation of the lesion with a very low risk of developing side effects.

Targeted chemotherapy using liposomes has the advantage of increasing the local concentration and decrease drug toxicity.

The thermal properties of the heat-sensitive liposomes and lyso + thermosensitive liposomes determined at 42 ° C, demonstrates that these types of liposomes may be useful in the treatment of cancers associated with controlled hyperthermia.

Moderate local hyperthermia can increase the cytotoxic effects of chemotherapy and perhaps improve local control of the tumor. Associating radiofrequency with doxorubicin liposomal conditioned, showed an increase of the concentration of doxorubicin in the tumor.

Originality of the thesis

It is the first study to evaluate the effects of increasing hyperthermia trying on blood flow in normal liver tissue or in the liver metastases before and after radiofrequency treatment and evaluation at this level microcirculation using laser-Doppler (Periflux 5000, Perimed AB, Sweden, with a laser Doppler probe thermostatic - PF457).