

УДК 616-006.81-092.4/9:615.831.011]-07:535.37

*M. V. Budzinskaya¹, S. A. Shevchik², V. G. Likhvantseva³, V. B. Loschenov², M. Taraz²,
S. G. Kuzmin¹, G. N. Vorozhtsov¹*

FLUORESCENT DIAGNOSTICS AND PHOTODYNAMIC THERAPY OF EXPERIMENTAL MELANOMA USING PHOTOSENSE

¹*SUE ISCC "INTERMEDBIOPHISCHIM", Moscow*

²*General Physics Institute, Moscow*

³*Eye Disease Research Institute of Russian Academy of Medical Science, Moscow*

ABSTRACT

The possibilities of using Photosense for the fluorescent diagnostics and photodynamic therapy are discussed. The ability of Photosense to fluoresce (while exciting the photosensitizer at wavelength 675 nm) allows using it for advanced detection of malignancies. The therapeutic dose of Photosense was 0,7 mg/kg, the irradiation time 5min, the power density — 500 mW/cm², the light dose — 150 J/cm².

Key words: photodynamic therapy, Photosense, experimental melanoma.

*М. В. Будзинская¹, С. А. Шевчик², В. Г. Лихванцева³, В. Б. Лощенов², М. Тараз²,
С. Г. Кузьмин¹, Г. Н. Ворожцов¹*

ФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА И ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ С ПРЕПАРАТОМ ФОТОСЕНС ЭПИБУЛЬБАРНОЙ МЕЛАНОМЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

¹*ГУОП МНКЦ "Интермедбиофизхим", Москва*

²*ЦЕНИ ИОФ РАН, Москва*

³*ГУ НИИ глазных болезней РАМН, Москва*

РЕЗЮМЕ

Работа посвящена экспериментальной оценке возможностей флюоресцентной диагностики и фотодинамической терапии (ФДТ) эпibuльбарной меланомы с препаратом Фотосенс. Показано, что особенности флюоресценции Фотосенса при возбуждении светом с длиной волны 675 нм позволяют использовать данный метод при определении истинных размеров и границ эпibuльбарной меланомы, включая зону скрытого роста. Установлено, что оптимальными параметрами для ФДТ эпibuльбарной меланомы в эксперименте являются: расчетная доза Фотосенса 0,7 мг/кг, продолжительность 1 сеанса — 5 мин, мощность лазерного облучения — 500 мВт/см², световая доза — 150 Дж/см².

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, Фотосенс, экспериментальная эпibuльбарная меланома.

ВВЕДЕНИЕ

Наряду с совершенствованием традиционных методов лечения (лучевой терапии химиотерапии, хирургических методов) [4; 5; 7; 9] интенсивно разрабатываются новые подходы к лечению опухолей органа зрения. Арсенал терапевтических средств пополнился широким спектром биологических и генных препаратов, обладающих высокой эффективностью и избирательностью поражения опухолевой ткани. Среди современных технологий флюоресцентная диагностика

(ФД) и фотодинамическая терапия (ФДТ) с применением фотосенсибилизаторов (ФС) признаны одними из перспективных направлений [2; 3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа была выполнена на 30 кроликах породы шиншилла (самцы массой 4–6 кг, экспериментальная модель сформировалась на 18 глазах). Экспериментальную модель эпibuльбарной меланомы создавали методом имплантации взвеси опухолевых клеток мы-

шиной меланомы В16 в субконъюнктивальное пространство. После забоя у мыши BDF1, зараженной меланомой В16, тщательно отсепаровывали опухолевый узел от окружающих тканей и некротизированных участков, если таковые имелись. Из одного подкожного узла у мыши получали до 1–2 г клеток меланомы В16. Затем опухолевые клетки помещали в питательную среду 199 и механически гомогенизировали, добиваясь при этом определенного соотношения опухолевых клеток к единице объема среды 199 (в 0,1 мл среды в среднем содержалось 4–5 млн клеток). Под общей анестезией в субконъюнктивальное пространство глаза кролика канюлей вводили 0,3 мл клеточной взвеси. На конъюнктиву накладывали непрерывный шов. Ежедневно обрабатывали послеоперационную рану 0,25%-м раствором левомицетина.

Зрелость модели определяли по характеру и степени выраженности ангиоархитектоники в опухоли, а также ее объему. ФД и ФДТ проводили в основном в сроки между 7-м и 14-м днями после прививки опухолевых клеток.

В качестве фотосенсибилизатора использовали отечественный препарат Фотосенс (0,2%-й раствор для инъекций производства ФГУП «ГНЦ НИОПИК»).

Флюоресцентную диагностику с препаратом Фотосенс проводили с помощью лазерной электронно-спектральной установки, предназначенной для флюоресцентной диагностики опухолей и контроля фотодинамической терапии ЛЭСА-01-«Биоспек» [1]. Для этого, на 12 часах в зоне эпibuльбарной меланомы, а также симметрично этому участку — на 6 и 9 часах — в зоне здоровых тканей устанавливали волоконно-оптический катетер для регистрации спектров. Спектры анализировали с помощью компьютерной программы LESA-Soft '9 для MS Windows '98-2000, специально разработанной для этой цели.

Ангиографическую картину глазного дна с препаратом Фотосенс изучали с помощью устройства светодиодного видеофлюоресцентного, предназначенного для диагностики и фотодинамической терапии опухолей и участков метастазирования УФФ-630/675-01-«Биоспек» [6; 8].

Для определения коэффициента контрастности производили следующие манипуляции. По оси X откладывали длину волны в нм. Спектр излучения регистрировался в диапазоне от 600 до 900 нм. По оси Y откладывали интенсивность флюоресценции и рассеянного лазерного света в относительных единицах. Пик на длине волны 632,8 нм — рассеянное лазерное излучение, широкий пик в спектре длин волн 650–900 нм — флюоресцентное. Для вычисления относительной интенсивности флюоресценции использовали отношение площади под пиком флюоресценции (650–900 нм) к площади лазерного излучения (628–638 нм). Коэффициент контрастности определялся отношением относительной интенсивности флюоресценции конъюнктивы к относительной интенсивности флюоресценции меланомы. Вычисленные таким образом среднее значение интенсивности

флюоресценции и коэффициент контрастности Фотосенса в тканях глаза были представлены в относительных единицах.

Эта процедура была необходима для учета эффектов геометрии измерений, мощности лазерного излучения, которые могли варьировать от измерения к измерению. Таким образом, мы могли сравнить спектры, полученные от разных животных и от контралатеральных участков склеры, несмотря на то, что измерения проводились при разной мощности лазера или в различающейся по толщине склере, поглощающей как флюоресцирующий свет, так и лазерное излучение.

В 4 экспериментальных группах (18 глаз с экспериментальной моделью эпibuльбарной меланомы) (рис. 1) проводили ФДТ с препаратом Фотосенс, который в 1-й и 2-й группах вводили из расчета 0,1 мг/кг, в 3-й и 4-й группах — 0,7 мг/кг веса. В 1-й и 3-й группе облучали диодным лазером с длиной волны 675 нм с экспозицией 5 мин, плотностью мощности 200 мВт/см² и световой дозой 60 Дж/см²; во 2-й и 4-й группах — с экспозицией 5 мин, плотностью мощности 500 мВт/см² и световой дозой 150 Дж/см². Контролем служили животные, которым вводили Фотосенс в дозе 0,5 мг/кг без ФДТ — К1, и кролики, которых облучали в режиме, используемом во 2-й и 4-й экспериментальных группах, не вводя ФС, — К2.

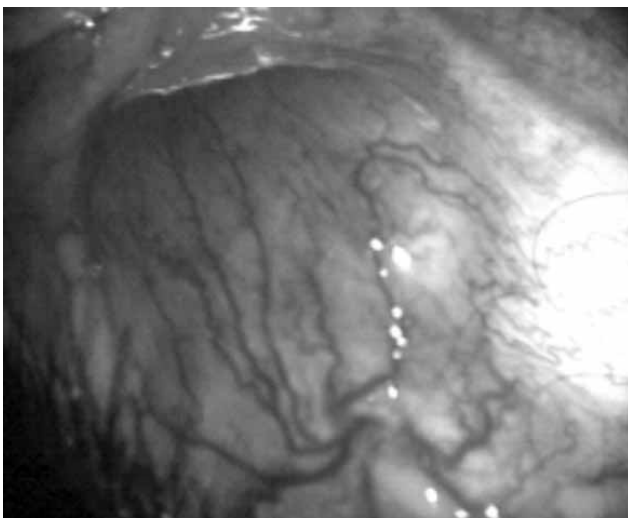


Рис. 1. Экспериментальная модель эпibuльбарной меланомы (офтальмоскопическая картина)

Эффективность ФДТ оценивали по коэффициенту абсолютного прироста (торможения) опухоли, который высчитывали по формулам:

$$K = (V_1 - V_2) / V_2$$

$$V \text{ см}^3 = 1/6 \pi d_1 d_2 d_3,$$

где $d_{1,2,3}$ — три взаимно перпендикулярных сечения опухоли;

V_1 — объем опухоли до воздействия;

V_2 — объем опухоли на момент оценки эффективности ФДТ.

Всем животным в группе контроля проводили электрофизиологическое исследование сетчатки.

Функциональное состояние зрительного анализатора оценивали с помощью компьютерного электрофизиологического комплекса «Нейро МВП-2» (Россия) на базе IBM PC с монитором VGA. При обработке данных использовалась оригинальная программа, написанная в DOS. В работе использовали параметры регистрации ЭРГ и ЗВП, соответствующие рекомендациям международного общества клинической электрофизиологии зрения (ISCEV).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что при внутривенном введении 0,1 и 0,7 мг/кг Фотосенса (1-я и 2-я группы) препарат появлялся в тканях глаза на 10-й секунде, пик концентрации в конъюнктиве и эпibuльбарной меланоме регистрировали через 7–15 мин с момента введения.

Коэффициент контрастности между конъюнктивой и опухолью достигал пикового значения ($2,3 \pm 0,02$) на 3-е сутки. Он формировался за счет экстравазального выхода Фотосенса через стенки патологически измененных сосудов и депонирования препарата в опухоли. Концентрация препарата в течение недели практически не убывала, поскольку он находился за пределами сосудистой системы.

Таким образом, избирательное накопление Фотосенса, имеющего значительное поглощение в спектральном диапазоне 650–700 нм, обеспечивало высокий контраст патологического очага по сравнению со здоровыми окружающими тканями глаза. Это позволяло провести точную маркировку границ опухолевого узла, включая зону скрытого роста, а при лазерном терапевтическом облучении теоретически обеспечивало избирательность фотодинамического эффекта (рис. 2). На 12-е сутки после введения 0,7 мг/кг Фотосенса, его концентрация в опухоли уменьшалась в 14 раз по сравнению с максимальной ($p < 0,05$).

Динамика накопления препарата, вводимого в дозах 0,1 и 0,7 мг/кг, существенно не отличалась, однако спектры флюоресценции, полученные у животных, которым вводили большую концентрацию Фотосенса, имели большую амплитуду (табл. 1). На рис. 3–5 в спектральном окне представлены спектры флюоресценции эпibuльбарной меланомы и конъюнктивы кролика.

Для исключения токсического действия Фотосенса на функционально-активные ткани глаза — сетчатку, мы проводили электрофизиологические исследования (ЭФИ). При анализе функционального состояния зрительно-нервного анализатора группой сопоставления служили здоровые кролики ($n=10$).

Через 1 ч с момента внутривенного введения 1,0 мг/кг Фотосенса здоровым кроликам отмечали снижение на 10 % амплитуды β -волны ЭРГ, которая через 24 ч повышалась, достигая в среднем 95 % исходного уровня. Полное восстановление происходило лишь на 3-и сут. Внутривенное введение того же количества физиологического раствора в группе контроля сопровождалось аналогичными изменениями амплитуды β -волны.

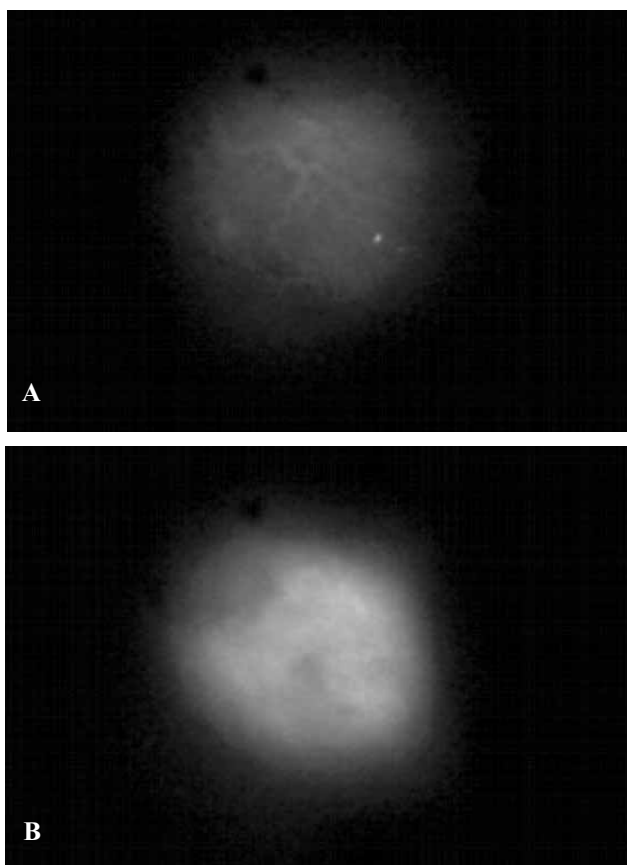


Рис. 2. Ангиографическая картина субконъюнктивальной меланомы:

A — артериовенозная фаза; B — венозная фаза

Таблица 1

Динамика интенсивности флюоресценции препарата Фотосенс в тканях эпibuльбарной меланомы и здоровой конъюнктивы в зависимости от вводимой дозы

Время	Интенсивность флюоресценции Фотосенса в тканях глаза, относительные единицы					
	0,1 мг/кг			0,7 мг/кг		
	опухоль	конъюнктивa	контраст	опухоль	конъюнктивa	контраст
1 с	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
5 с	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
7 с	Нет	Нет	Нет	6,1±0,01	5,7±0,156	1,0±0,134
10 с	Нет	1,2±0,034	Нет	7,6±0,15	5,4±0,14	1,4±0,134
1 мин	3,0±0,245	2,2±0,015	1,36±0,034	13,0±0,24	11,0±0,35	1,18±0,01
3 мин	4,6±0,001	2,09±0,134	1,28±0,05	24,0±0,12	15,2±0,96	1,5±0,134
5 мин	5,3±0,281	3,95±0,134	1,34±0,1	80±0,04	54±0,4	1,5±0,01
7 мин	5,6±0,089	4,06±0,134	1,37±0,078	105±1,4	70±1,79	1,5±0,03
8 мин	7,1±0,267	5,56±0,134	1,28±0,045	100±2,1	70±1,04	1,42±0,01
10 мин	7,9±0,521	5,9±0,461	1,34±0,056	95±0,789	71±1,04	1,3±0,04
15 мин	8,5±0,478	6,86±0,04	1,24±0,202	81±3,45	60±0,967	1,35±0,134
30 мин	8,1±0,06	6,2±0,303	1,3±0,05	70±2,56	65±0,451	1,0±0,19
90 мин	8,1±0,401	5,4±0,015	1,5±0,003	80,6±0,9	60,0±0,341	1,34±0,121
6 ч	7,9±0,012	5,26±0,04	1,5±0,107	80±1,56	60±0,942	1,34±0,121
12 ч	7,5±0,23	4,2±0,09	1,4±0,07	75±0,4	56±0,839	1,3±0,07
24 ч	7,6±0,678	4,0±0,321	1,9±0,001	42,5±0,12	26,0±0,1	1,64±0,3
3 сут	7,4±0,034	3,1±0,056	2,38±0,005	35±0,06	15±0,05	2,3±0,02
6 сут	6,3±0,09	3,5±0,045	1,8±0,005	11,0±0,31	5,8±0,01	1,9±0,001
12 сут	2,1±0,34	1,7±0,05	1,2±0,121	7,2±0,01	6,8±0,134	1±0,03
24 сут	1,2±0,089	0,9±0,01	1,36±0,1	3,2±0,01	2,7±0,01	1,18±0,03

Амплитуда α -волны ЭРГ не изменялась во всех случаях.

Анализ полученных данных показал, что используемые дозы Фотосенса не оказывали токсического

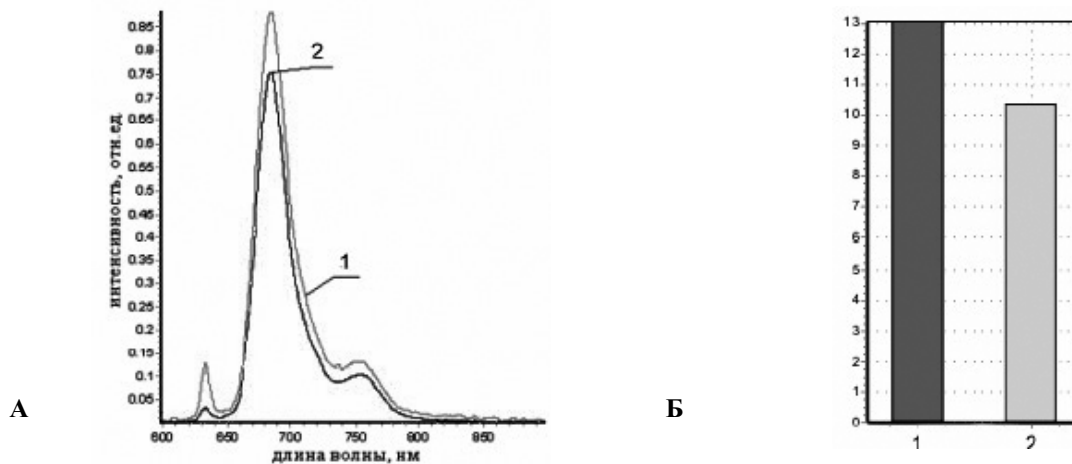


Рис. 3. Спектры флюоресценции эпibuльбарной меланомы (1) и нормальной конъюнктивы (2) кролика в конце 1-й минуты с момента введения 0,7 мг/кг Фотосенса (А) и соответствующие значения интегральной интенсивности флюоресценции (Б)

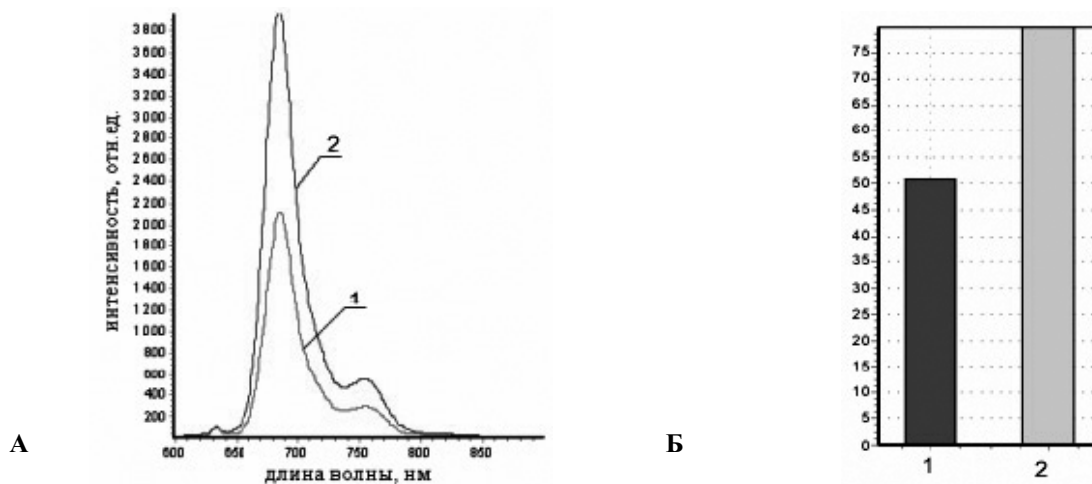


Рис. 4. Спектры флюоресценции эпibuльбарной меланомы (1) и нормальной конъюнктивы (2) кролика на 5-й минуте после введения 0,7 мг/кг Фотосенса (А) и соответствующие значения интегральной интенсивности флюоресценции (Б)

воздействия на функциональное состояние сетчатки. Отклонение β -волны ЭРГ наблюдали при введении как ФС, так и физиологического раствора.

ФДТ эпibuльбарной меланомы

ФДТ с экспозицией 5 мин, плотностью мощности излучения 200 мВт/см² и световой дозой 60 Дж/см², проведенная после введения 0,1 мг/кг Фотосенса, незначительно тормозила рост эпibuльбарной меланомы (1-я группа). Несмотря на облучение, к концу 2-й — началу 3-й недели опухоль прогрессировала, причем ее размеры превосходили контрольные, что свидетельствует о неэффективности используемого режима ФДТ (табл. 2).

Наибольшей регрессии опухоли достигли в 4-й группе при облучении с экспозицией 5 мин, плотностью мощности 500 мВт/см² и световой дозой 150 Дж/см², на фоне введения 0,7 мг/кг Фотосенса. Коэффициент абсолютного торможения был выше, чем во всех других группах и в контроле. Полная редукция меланомы в 4-й группе имела место на 2 глазах.

Таким образом, оптимальный эффект ФДТ эпibuльбарной меланомы развивался при расчетной дозе Фотосенса 0,7 мг/кг, продолжительности сеанса 5 мин, плотности мощности лазерного облучения 500 мВт/см² (световой дозе 250 Дж/см²).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные экспериментальные данные позволяют сделать следующие выводы:

1. Избирательное накопление Фотосенса, введенного в дозе 0,7 мг/кг в ткани эпibuльбарной меланомы, обеспечивало высокий контраст патологического очага по сравнению со здоровыми тканями глаза и позволяло точно определить его границы при ФД, а при ФДТ обеспечивало точность и избирательность фототоксических эффектов лучевого воздействия.

2. Длительная персистенция препарата в патологическом очаге позволяла в случае необходимости (при недостаточном эффекте первого сеанса или больших исходных размерах опухоли) увеличить кратность се-

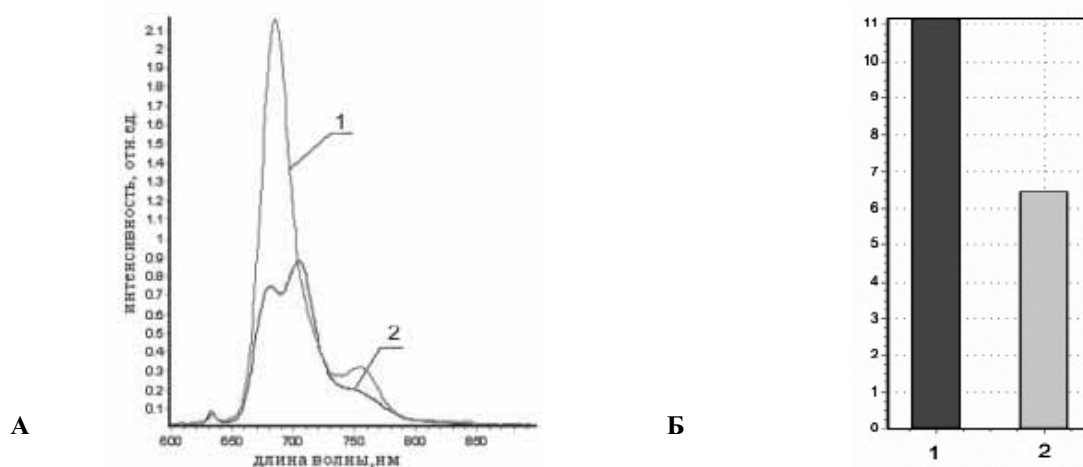


Рис. 5. Спектры флуоресценции эпibuльбарной меланомы (1) и нормальной конъюнктивы (2) кролика на 6-е сутки после введения 0,7 мг/кг Фотосенса (А) и соответствующие значения интегральной интенсивности флуоресценции (Б)

Таблица 2
Изменение коэффициента абсолютного прироста (торможения) в зависимости от дозы лазерного облучения и дозы Фотосенса

Доза излучения, МВт/см ²	Число глаз	Показатель	Сроки наблюдения, сут		
			7	14	21
Доза Фотосенса 0,1 мг/кг					
200	6	КАПО ТРО ПР ИЭ	0,098±0,097* 72,3 % 0 % +	-0,14±0,04 60 % 0 % +	1,4±0,09* 0 % 0 0
500	6	КАПО ТРО ПР ИЭ	0,098±0,097* 69 % 0 +	0,73±0,126* 81 % 0 +++	-0,78±0,041* 70 % 0 +
Доза Фотосенса 0,7 мг/кг					
200	6	КАПО ТРО ПР ИЭ	-0,08±0,012* 46 % 0 % +-	-0,08±0,09* 20 % 0 % +-	-0,09±0,07* 20 % 0 % +-
500	6	КАПО ТРО ПР ИЭ	-0,298±0,12* 96,4 % 50,0 +++	-0,97±0,0* 97,4 % 75,0 +++	-1±0,000* 100 % 100 % ++++
Контроль					
Фотосенс К1	3	КАПО	1,9±0,07	7,67±0,141	14,83±4,74
Лазер К2	3	КАПО	1,2±0,56	3,64±2,1	8,79±3,87

Примечания: КАПО — коэффициент абсолютного прироста опухоли; ТРО — торможение роста опухоли; ПР — прогрессия роста; ИЭ — ингибирующий эффект.

ансов и таким образом не только оптимизировать эффективность метода, но и расширить показания к нему.

3. Оптимальными параметрами для ФДТ эпibuльбарной меланомы являются: расчетная доза Фотосенса — 0,7 мг/кг, экспозиция сеанса — 5 мин, мощность лазерного облучения — 500 мВт/см², световая доза — 150 Дж/см².

Таким образом, проведенные исследования позволяли считать, что ФД с препаратом Фотосенс, введенным в дозе 0,7 мг/кг, не оказывает токсического воздействия на зрительный анализатор на функциональном уровне и может быть рекомендована для

проведения ФД опухолей органа зрения анализируемых локализаций в клинике.

Авторы выражают благодарность Правительству Москвы за финансовую поддержку работы в рамках городской научно-технической программы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лощенов В. Б., Стратонников А. А., Волкова А. И., Прохоров А. М. Портативная спектроскопическая система для флуоресцентной диагностики опухолей и контроля за фотодинамической терапией // Рос. хим. ж. — 1998. — Т. XII, № 5. — С. 50–53.
2. Barbazetto I. A., Schmidt U. E. Photodynamic therapy of choroidal hemangioma: two case reports // Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. — 2000. — Vol. 238. — P. 214–221.
3. Barbazetto I. A., Lee T. C., Rollins I. S. et al. Treatment of choroidal melanoma using photodynamic therapy // Am. J. Ophthalmol. — 2003. — Vol. 135. — P. 898–899.
4. Damato B. E., Foulds W. S. Surgical resection of uveal melanomas / In: Retina. S. Ryan, ed. — St. Louis: Mosby, 1994. — P. 795–807.
5. Gындз K., Shields C. L., Shields K. et al. Plaqueradiotherapy of uveal melanoma with predominant ciliary body involvement // Arch. Ophthalmol. — 1999. — Vol. 117. — P. 170–177.
6. Meerovich G. A., Shevchik S. A., Loschenov M. V. et al. A laser spectroscopy system for fluorescent diagnostics and photodynamic therapy of diseases of eye retina and choroids // Quantum electronics. — 2002. — Vol. 32(11). — P. 959–962.
7. Munzenrider J. E. Uveal melanomas. Conservation treatment // Hematol. Oncol. Clin. North. Am. — 2001. — Vol. 15. — P. 389–402.
8. Shevchik S. A., Meerovich G. A., Budzinskaya M. V. et al. Laser spectroscopic apparatus for photodynamic therapy of eye pathologies and control for its carrying // ILLA 2003. — VIII International conference Laser and laser-information technologies. Fundamental Problems and Application. — Bulgaria, Sept-Oct, 2003.
9. Shields J. A., Shields C. L., Shah P., Sivalingam V. Partial lamellar sclerouvectomy for ciliarybody and choroidal tumors // Ophthalmology. — 1991. — Vol. 98. — P. 971–983.