

УДК 616.37-002-08-035:615.276

ЗАВИСИМОСТЬ НАКОПЛЕНИЯ И РАСПРОСТРАНЕНИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА «ФОТОЛОН» В ТКАНИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЖИРОВОЙ КЛЕТЧАТКЕ ОТ СПОСОБА И МЕСТА ВВЕДЕНИЯ

А.Л. Ушкевич¹; К.Н. Жандаров¹, д.м.н., профессор; С.В. Шляхтин²;Н.И. Прокопчик¹, к.м.н., доцент

1 - Кафедра хирургических болезней № 1

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

2 - РУП «Белмедпрепараты»

В эксперименте на 15 животных (кроликах) было изучено распространение и накопление в тканях препарата для фотодинамической терапии «Фотолон» при введении его в ткани поджелудочной железы и забрюшинную клетчатку. Выделены три группы. В первой группе «Фотолон» вводился местно в стерильных условиях в ткань поджелудочной железы и клетчатку забрюшинного пространства. Во второй группе моделировалось гнойное воспаление в поджелудочной железе и жировой клетчатке забрюшинного пространства, куда и вводился «Фотолон». Внутривенное введение раствора «Фотолона» проводилось в третьей группе. В процессе проведения эксперимента исследовались общий и биохимический анализы крови. Проводилось микроскопическое и флуориметрическое изучение ткани поджелудочной железы и жировой клетчатки забрюшинного пространства. Животные выводились из эксперимента введением летальных доз тиопентала натрия в разные сроки с момента введения фотосенсибилизатора. При местном введении фотосенсибилизатора в ткани поджелудочной железы и забрюшинную клетчатку, в сравнении с внутривенным введением, создается более высокая концентрация фотосенсибилизатора в очагах воспаления и в местах, где необходимо проведение ФДТ.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, эксперимент, «Фотолон», местное введение фотосенсибилизатора.

The spread and accumulation of the preparation photolon used for photodynamic therapy in tissues have been studied in experiment on 15 animals (rabbits). The agent was injected into pancreatic tissues and retroperitoneal tissues. Three groups of animals have been identified. In group I photolon was injected locally into pancreatic tissues and retroperitoneal tissues in sterile conditions. In group II suppurative inflammation was modeled in pancreas and retroperitoneal fatty tissue where photolon was injected. Group III received intravenous photolon. Complete blood count and biochemical blood analysis were made during the experiment. Microscopic and fluorimetric studies of the pancreatic tissue and retroperitoneal fatty tissue were performed. The animals were taken out of the experiment by injecting fatal doses of sodium thiopental at different terms from the moment of the photosensitizer administration. Local administration of the photosensitizer into pancreatic tissues and retroperitoneal fatty tissues as compared to intravenous administration results in higher concentration of the photosensitizer in foci of inflammation as well as at the sites where photodynamic therapy is required.

Key words: photodynamic therapy, experiment, photolon, local administration of photosensitizer.

Введение

В настоящее время во всем мире интенсивно развивается новая медицинская технология – фотодинамическая терапия (ФДТ). Суть метода состоит в том, что многие биологические объекты – раковые клетки, воспаленные ткани, микробы и вирусы могут накапливать определенные красители – фотосенсибилизаторы, обладающие повышенной чувствительностью к возбуждающему действию света соответствующей длины волны. Под действием энергии светового излучения в клетках микробов или тканей, захвативших краситель, развивается фотохимическая реакция с выделением синглетного (атомарного) кислорода и свободных радикалов – высокоактивных биологических окислителей, которые являются цитотоксичными для большинства биологических объектов и приводят к гибели и разрушению опухолевых клеток, микроорганизмов. Большую роль в действии ФДТ играет и само лазерное излучение, которое в этом методе является достаточно интенсивным и к тому же влияет на сенсибилизированные ткани. На сегодняшний день ФДТ широко применяется при лечении злокачественных опухолей, в гнойной хирургии, офтальмологии, оториноларингологии, гинекологии [3, 7].

Наиболее распространённым способом введения фотосенсибилизатора (ФС) является внутривенное введение. Также применяется местное введение фотосен-

сбилизирующих препаратов в виде растворов, гелей, наносимых на поражённые области, через определённое время проводится облучение зоны нанесения фотосенсибилизатора [5]. Разрабатываются фотодинамические методы введения фотосенсибилизаторов, которые могут обеспечить направленное местное введение препарата в концентрации, достаточной для проведения ФДТ [6]. В литературе имеются данные о локальном инъекционном введении фотосенсибилизатора, создании при этом большой концентрации препарата в патологическом очаге, что устраняет явление кожной фоточувствительности, которое встречается при внутривенном введении и является следствием системного накопления следовых концентраций фотосенсибилизатора [1, 2]. Реже применяется пероральное введение фотосенсибилизатора [4].

На распределение и накопление фотосенсибилизатора в тканях влияет множество факторов: способ введения сенсибилизатора, доза фотосенсибилизатора, время, прошедшее с момента введения, и, самое главное, химические свойства вещества, его структура, масса и заряд молекулы, гидрофильность (склонность растворяться в воде) или лиофильность (склонность растворяться в жирах, липидах). Гидрофильные препараты можно использовать для приготовления водных растворов для внутривенного введения. Они связываются с альбуминами и

другими белками сыворотки крови и накапливаются преимущественно в межклеточном пространстве и стромах сосудов опухолевой ткани. Липофильные сенсибилизаторы лучше проникают в опухолевую клетку, накапливаясь в мембранах клетки, ядрах, лизосомах и митохондриях. Механизм повреждающего действия этих сенсибилизаторов несколько разный. Липофильные препараты атакуют опухолевую клетку изнутри, а растворимые в воде сенсибилизаторы способствуют гибели быстрорастущих клеток косвенно, повреждая кровеносные сосуды и прекращая снабжение опухоли кислородом и другими питательными веществами [8, 9].

В Республике Беларусь, на РУП «Белмедпрепараты» был разработан и внедрен в производство фотосенсибилизатор на основе хлорина E_6 – препарат «Фотолон», который и был выбран нами в работе в качестве фотосенсибилизатора. Целью исследования являлось определение параметров распространения фотосенсибилизатора в различных тканях при внутривенном и местном введениях.

Материал и методы

Экспериментальные исследования проводились на кроликах обоих полов, массой $3,2 \pm 0,3$ кг. ($M \pm \sigma$). Работу проводили с соблюдением этических норм обращения с животными, а также требованиями мирового сообщества правил, предусмотренных Европейской комиссией по надзору за проведением лабораторных и других опытов, с участием экспериментальных животных разных видов. Животных вводили в наркоз, взвешивали, фиксировали к операционному столу и выполняли операции в стерильных условиях. Выводили из эксперимента введение летальных доз тиопентала натрия.

Все животные были разделены на три группы: в первой группе изучалось распространение и накопление тканями препарата «Фотолон» при местном введении (в клетчатку забрюшинного пространства и поджелудочную железу без признаков воспаления). Вторую группу составили животные, у которых изучали распространение и накопление тканями препарата «Фотолон» в условиях гнойного некротического воспаления в поджелудочной железе и жировой клетчатке забрюшинного пространства. В третьей группе ФС вводили внутривенно медленно и в разные сроки изучали распространение и накопление его тканями поджелудочной железы и клетчатки забрюшинного пространства без признаков воспаления.

В первой группе экспериментальное исследование осуществлялось следующим образом: у 5 кроликов выполнялась срединная лапаротомия. С помощью инсулинового шприца в ткань поджелудочной железы вводилось по 1 мг 0,1% раствора препарата «Фотолон» в 4-х разных точках. Временной интервал введения составлял 6, 3, 2, и 1 час. Аналогично и в забрюшинную клетчатку с помощью инсулинового шприца вводилось по 1 мг 0,1% раствора препарата «Фотолон» с интервалом введения 6, 3, 2 часа, 1 час 30 минут, 1 час, 30 минут. Точки введения в поджелудочной железе и клетчатке забрюшинного пространства выбирались таким образом, чтобы при введении препарат «Фотолон» из одной точки не распространялся на другие области введения. В процессе введения было отмечено хорошее распространение препарата «Фотолон» в клетчатке забрюшинного пространства на площадь $3,1 \pm 0,8 \text{ см}^2$ ($M \pm \sigma$), тогда как в железе при одинаковом объеме введения ФС (мл.) распространение охватывало меньшую площадь $1,2 \pm 0,4 \text{ см}^2$ ($M \pm \sigma$). В жировой ткани распространение ФС имело характер инфильтра-

ции в стороны от центра введения сразу же после введения. В процессе проведения эксперимента исследовались общий и биохимический анализы крови до введения препарата «Фотолон» и перед выводом лабораторного животного из эксперимента. Животные выводились из эксперимента передозировкой тиопентала натрия. Изучались ткани поджелудочной железы и забрюшинной клетчатки из мест введения препарата «Фотолон» при флуориметрическом и гистологическом исследованиях.

Во второй группе 5 кроликам в асептических условиях производилась срединная лапаротомия. Выделялась в брюшной полости поджелудочная железа, в неё в 4-х разных точках, удалённых друг от друга, вводилось по 0,2 мл микробной взвеси (гнойное отделяемое, взятое из дренажей, стоящих в забрюшинном пространстве у больных с острым деструктивным панкреатитом, осложнённым гнойным парапанкреатитом, посев на микрофлору выявил $E. Coli++++$, 10^5 КОЕ), и в клетчатку забрюшинного пространства в шести точках, удалённых друг от друга, вводилось по 0,5 мл микробной взвеси. Брюшную полость послойно ушивали наглухо. Животные пробуждались от наркоза в течение 2-4 часов после операции. Помещались в отдельную клетку в условиях вивария. Через 24 часа состояние кроликов ухудшалось, это проявлялось адинамией, отказом от пищи и воды, слабой реакцией на прикосновение. Производилась повторная лапаротомия. В брюшной полости имел место мутный, бурый выпот, поджелудочная железа была отёчна, багрового цвета с кровоизлияниями. В корне брыжейки тонкой кишки единичные бляшки стеатонекроза. Клетчатка забрюшинного пространства в местах введения микробной взвеси отёчна, инфильтрирована, бледная. При микроскопическом исследовании в поджелудочной железе и жировой клетчатке забрюшинного пространства определялось резко выраженное полнокровие, массивная лейкоцитарная инфильтрация с образованием микроабсцессов. Данные изменения свидетельствовали о развитии гнойно-некротических изменений в поджелудочной железе и в клетчатке забрюшинного пространства. Это подтверждалось и изменениями в общем анализе крови (лейкоцитоз до $12-14 \times 10^9/\text{л}$, при исходном в $5,0-7,0 \times 10^9/\text{л}$; палочко-ядерный сдвиг до 12-15% при исходном 3-4%; СОЭ до 15-18 мм при исходном 1-2 мм) и биохимическом анализе крови (увеличение амилазы до 2137 Ед/л при исходном 400-600 Ед/л). С целью изучения накопления препарата «Фотолон» инсулиновым шприцом в клетчатку забрюшинного пространства вводилось по 1 мг 0,1% раствора фотолон в 6-ти разных точках через разные промежутки времени: 6, 3, 2, 1 час 30 минут, 1 час, 30 минут. Точки введения ФС соответствовали областям введения микробной взвеси, т.е. в места, где имелось максимальное воспаление, при этом ФС не распространялся на соседние области введения. В поджелудочную железу также вводилось по 1 мл 0,1% раствора препарата «Фотолон» в места гнойного воспаления в 4-х точках, временные промежутки введения составили 6, 3, 2, 1 час. Животные выводились из эксперимента передозировкой тиопентала натрия. Изучались ткани поджелудочной железы и забрюшинной клетчатки из мест введения ФС при флуориметрическом и гистологическом исследованиях.

В третьей группе у 5 кроликов проводили в/венное введение препарата «Фотолон». Производили разрез кожи в проекции бедренной вены, катетеризировали её мягким катетером и внутривенно медленно вводили 1 мг/кг (что соответствовало 3 мг препарата во всех случаях) ФС, разведённого в 50 мл 0.9% раствора хлорида натрия. Интервал времени составлял 6, 3, 1 час. Через дан-

ные промежутки времени, после внутривенного введения препарата «Фотолон», лабораторные животные вывелись из эксперимента передозировкой тиопентала натрия. В процессе проведения эксперимента исследовались общий и биохимический анализы крови до введения препарата «Фотолон» и перед выводом лабораторных животных из эксперимента в разные сроки (6, 3, 2, 1 час). Производилось гистологическое исследование и флуоресцентный анализ следующих тканей: поджелудочная железа, жировая клетчатка брюшинного пространства, кровь, сердце, легкие, печень, почки, селезенка.

Результаты и обсуждение

Детектирование уровня флуоресценции ткани осуществляли на лазерно-волоконном флуоресцентном спектроанализаторе «ЛЭСА 6» (БИОСПЕК, Россия) с гелий-неоновым диагностическим лазером ($\lambda_{возб.} = 630$ нм, $\lambda_{дет.} = 670$ нм). Средняя мощность возбуждающего излучения была 2 мВт, плотность энергии лазерного излучения в процессе одного обследования составляла не более 1 Дж/см². Регистрацию флуоресценции проводили под прямым углом к объекту, при легком касании ткани торцом оптоволоконного световода. Для каждого образца ткани проводили не менее 5 повторных измерений уровня флуоресценции. В дальнейшем полученные цифровые величины обрабатывались общепринятыми методами описательной статистики. Данные представлялись в виде $M \pm SEM$ (где M – среднее значение по 5 измерениям, SEM – стандартная ошибка среднего).

В первой группе изучали уровень накопления и распространения препарата «Фотолон» в тканях в «чистых» условиях. Уровень накопления препарата «Фотолон» жировой клетчаткой брюшинного пространства через 30 минут после введения составил $2696 \pm 1205,68$ усл.ед. В дальнейшем через час после введения он достиг $4443,8 \pm 1987,32$ усл.ед. При исследовании в клетчатке брюшинного пространства почти одинаковый уровень сохранялся в течение 30 минут и к полутора часам составил $4471 \pm 1999,5$ усл.ед. При определении уровня флуоресценции жировой клетчатки, через два часа после местного введения, отмечено снижение уровня флуоресценции $2300 \pm 1028,6$ усл.ед.; через три часа – $3848 \pm 1720,8$ усл.ед.; через 6 часов – $3796 \pm 1697,62$ усл.ед. При определении интенсивности флуоресценции ткани поджелудочной железы отмечено, что через 1 час после введения фотолон она составила $1158 \pm 517,87$ усл.ед. В дальнейшем отмечалось увеличение уровня флуоресценции через 2 часа $1903,6 \pm 851,32$ усл.ед. с постепенным снижением через 3 часа $1846 \pm 843,4$ усл.ед. и через 6 часов $1290 \pm 576,91$ усл.ед. (рис. 1).

Таким образом, из данных, полученных при флуоресцентном анализе, время максимального накопления

препарата «Фотолон» в ткани поджелудочной железы приходится через 2 часа с момента введения. А время максимального накопления в жировой клетчатке брюшинного пространства через 1 час 30 минут с момента введения. В дальнейшем отмечается постепенное снижение уровня накопления препарата «Фотолон» в исследуемых тканях. Изменений в общем и биохимическом анализе крови, которые исследовались перед введением ФС и перед выведением животного из эксперимента (1, 2, 3, 6 часов), не отмечено. При микроскопическом исследовании ткани поджелудочной железы и клетчатки брюшинного пространства из мест введения ФС структурных изменений не обнаружено.

Во второй группе изучали распространение и накопление препарата «Фотолон» в условиях гнойного воспаления в поджелудочной железе и жировой клетчатке брюшинного пространства. При лабораторных исследованиях, после формирования гнойно-некротического парапанкреатита, в общем анализе крови было отмечено: лейкоцитоз, палочкоядерный сдвиг нейтрофилов, увеличение СОЭ. В биохимическом анализе четырёхкратное увеличение амилазы. Данные изменения говорят о развитии воспаления в местах введения гнойно-некротической взвеси, в поджелудочной железе и жировой клетчатке брюшинного пространства. Полученные данные при флуориметрическом исследовании несколько отличаются по времени от распространения ФС в чистых условиях. В жировой клетчатке брюшинного пространства через 30 минут после местного введения уровень флуоресценции составлял $3716 \pm 1661,8$ усл.ед. Через час после местного введения он достигал $4680,8 \pm 2093,3$ усл.ед. При исследовании к полутора часам уровень ФС в жировой ткани снижался до $976,6 \pm 436,7$ усл.ед. В дальнейшем отмечено его повышение, уровень флуоресценции к двум часам составлял $2074 \pm 927,5$ усл.ед.; к трём часам $3464 \pm 1549,1$ усл.ед. Определение флуоресценции жировой клетчатки через 6 часов показало постепенное снижение уровня ФС в ней и составило $3280 \pm 1466,9$ усл.ед. В ткани поджелудочной железы интенсивность флуоресценции через час после местного введения составляла $1886 \pm 843,4$ усл.ед. Через 2 часа отмечалось снижение накопления ФС и составило $1100 \pm 491,9$ усл.ед. В дальнейшем при определении уровня флуоресценции препарата «Фотолон» в ткани поджелудочной железы характерен постоянный рост. К трём часам он составил $2284 \pm 1021,4$ усл.ед. и к шести часам $3440 \pm 1538,4$ усл.ед. (рис. 2). Поджелудочная железа была отёчна с очагами кровоизлияний багрового цвета; жировая клетчатка отёчна, бледного цвета, инфильтрирована тёмно-зеленым веществом (препарат «Фотолон»). В брюшной полости мутный, бурый выпот, единичные бляшки стеато-

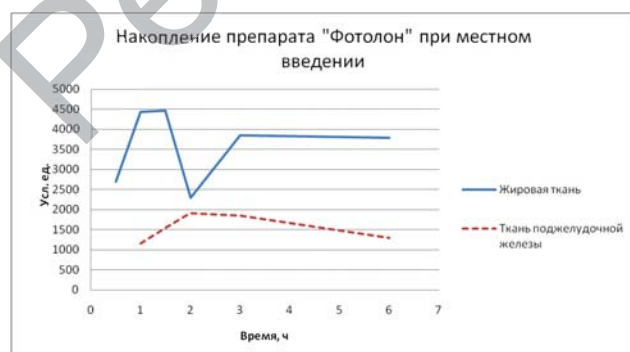


Рисунок 1 – Динамика накопления препарата «Фотолон» в жировой клетчатке и ткани поджелудочной железы в «чистых» условиях при местном введении

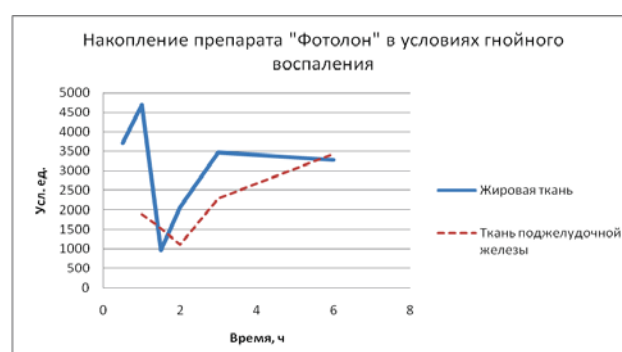


Рисунок 2 – Динамика накопления препарата «Фотолон» в жировой клетчатке и в ткани поджелудочной железы в условиях гнойного воспаления при местном введении

некроза. При микроскопическом исследовании определялись в поджелудочной железе и жировой клетчатке признаки воспаления: резко выраженное полнокровие сосудов, кровоизлияния; резко выраженная лейкоцитарная инфильтрация; отмечалась инфильтрация тканей веществом голубого цвета (вероятнее всего, этим веществом является препарат «Фотолон»).

В третьей группе ФС вводился внутривенно. Определение уровня флуоресценции жировой клетчатки забрюшинного пространства через час после внутривенного введения ФС показало результат в $171,6 \pm 8,33$ усл.ед. Через три часа он достигал максимальных значений $186,8 \pm 8,87$ усл.ед. С дальнейшей тенденцией к снижению до $159 \pm 8,96$ усл.ед. к шести часам после введения препарата «Фотолон». При изучении времени максимального накопления ФС в ткани поджелудочной железы при внутривенном введении отмечено, что в первые три часа после внутривенного введения ФС уровень флуоресценции определяли одинаковым $260,2 \pm 5,54$ усл.ед. В дальнейшем отмечено его постепенное снижение, и к шести часам он достигает уровня $160,2 \pm 8,13$ усл.ед. (рис. 3). В общем и биохимическом анализе крови патологических изменений зафиксировано не было. Исследование анализов осуществляли перед введением препарата «Фотолон» и перед выведением животного из эксперимента.

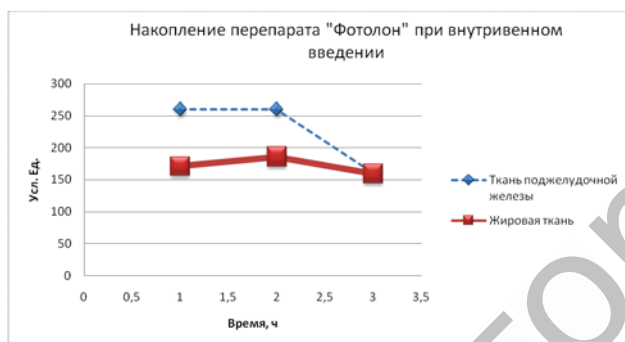


Рисунок 3 – Динамика накопления препарата «Фотолон» в жировой клетчатке и в ткани поджелудочной железы при внутривенном введении

При микроскопическом исследовании структурных изменений со стороны поджелудочной железы, клетчатки забрюшинного пространства, сердца, легкого, печени, селезенки, почек не выявлено. При сравнении различных способов введения фотосенсибилизатора в поджелудочную железу и жировую клетчатку забрюшинного пространства отмечается более интенсивное накопление препарата «Фотолон» при местном его введении в сравнении с внутривенным введением. Максимальное накопление ФС после местного введения прослеживается при исследовании в стерильных условиях и в условиях гнойного воспаления как в тканях поджелудочной железы, так и в жировой клетчатке забрюшинного пространства. Время максимального накопления ФС при гнойном воспалении в поджелудочной железе носит «волнообразный» характер: через час после введения подъём до $1886 \pm 843,4$ усл.ед. и дальнейшее снижение, через три часа подъём с дальнейшим ростом, к шести часам после введения уровень флуоресценции составляет

$3440 \pm 1538,4$ усл.ед. В клетчатке забрюшинного пространства максимальные значения препарата «Фотолон» определялись через час после введения и составляли $4680,8 \pm 2093,3$ усл.ед., с дальнейшим снижением и к трём часам интенсивность накопления составляла $3280 \pm 1466,9$ усл.ед.

При лабораторном исследовании, включавшем в себя общий и биохимический анализы крови, в первой и третьей группе изменений выявлено не было. Во второй группе изменения (лейкоцитоз, палочкоядерный сдвиг, увеличение амилазы) в общем и биохимическом анализе крови указывали на наличие гнойного воспаления в поджелудочной железе и клетчатке забрюшинного пространства. При микроскопическом исследовании тканей поджелудочной железы и клетчатки забрюшинного пространства, сердца, легкого, печени, селезенки, почек структурных изменений не выявлено. В участках введения препарата «Фотолон» определялись включения голубого цвета с нормальным строением тканей.

Выводы

Таким образом, в результате проведенных исследований при локальном введении ФС создаётся максимальная концентрация его в очаге воспаления, в десятки раз выше в сравнении с внутривенным введением. При проведении фотодинамической терапии с препаратом «Фотолон» при воспалительных заболеваниях поджелудочной железы и забрюшинной клетчатки целесообразно применять местное введение ФС, а облучение НИЛИ проводить через один час после введения фотосенсибилизатора.

Литература

1. Михайловская А. А./ Сочетанное воздействие электрохимического лизиса и фотодинамической терапии. / А. А. Михайловская, Н. В. Бурмистрова, М. А. Каплан. // Отечественные противоопухолевые препараты: Материалы VI Всероссийской научно-практической конференции. Москва 21-23 марта 2007г. / Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т.6, – №1. – С. – 22.
2. Разработки новой технологии фотодинамического разрушения новообразований сосудов роговицы, основанной на локальном введении фотосенсибилизаторов. / Ю.В. Андреев [и др.] // Вестник офтальмологии. – 2005. – №5. – С. 21-25.
3. Современный взгляд на антимикробную фотодинамическую терапию. / В.Т. Пальчун [и др.] // Вестник отоларингологии. – 2007. – №3. – С. 4-6.
4. Спектрологическое исследование фармакокинетики эндогенного фотосенсибилизатора пропорфирина IX в тканях самок мышей. / Л.А. Беляева [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т2, – №4. – С. 36-39.
5. Фотодинамическая терапия в лечении заболеваний перидонто. / С.А. Наумович [и др.] // Медицинский журнал. – 2007. – №1. – С. 71-75.
6. Фотодинамическая терапия – подходы к повышению эффективности. / Попова Н.А. [и др.] // Медицина. – 2007. – № 4. – С. 8-12
7. Фотодинамическая терапия при гнойных заболеваниях мягких тканей. / Странадко, Е.Ф. [и др.] // Хирургия. – 2000. – №9. – С. 67-70.
8. Lipid accumulation: the common feature of photosensitizer-retaining normal and malignant tissues (news) / I. Freitas // J. Photochem. Photobiol. B. – 1990. – Vol. 7, – № 2. – P. 359-361.
9. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis / D. Kessel, [et al.] // J. Photochem. Photobiol. B. – 1998. – Vol. 42, – № 2. – P. 89-95.

Поступила 02.04.10