

Лазерно-спектроскопический комплекс для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии заболеваний сетчатой и сосудистой оболочек глаза

Г.А.Меерович*, С.А.Шевчик*, М.В.Лощенов*,
М.В.Будзинская**, Н.А.Ермакова**, С.С.Харнас***

Разработан лазерно-спектроскопический комплекс для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии патологических изменений глазного дна с использованием препарата Фотосенс. Проведена апробация комплекса на экспериментальных животных (мышьях и кроликах).

Ключевые слова: флуоресцентная диагностика, фотодинамическая терапия, щелевая лампа, лазер, субретинальная неоваскулярная мембрана.

Известно, что заболевания сетчатой и сосудистой оболочек глаза являются основными причинами слабо-видения и слепоты. Появление субретинальной неоваскулярной мембраны (СНМ) в центральной зоне глазного дна вследствие врастания новообразованных сосудов из хориокапиллярного слоя (сосудистая оболочка на глазном дне) под пигментный эпителий или сетчатку осложняет течение различных воспалительных и дистрофических процессов, приводя к значительному и стойкому снижению остроты зрения, и является причиной инвалидности более чем в 80 % случаев [1].

До настоящего времени для диагностики СНМ использовали телевизионно-оптическую ангиографию глазного дна с флюоресцеином натрия [2] либо флуоресцентную ангиографию с индоцианином зеленым [3–7], а для лечения – лазерную коагуляцию [8] или хирургическое вмешательство [9, 10]. Однако данные методы не всегда эффективны и сопряжены с опасностью развития осложнений.

В связи с этим в последнее время изучается новый метод терапии СНМ, использующий фотодинамический эффект [11]. В основе этого метода лежит фотодинамическая окклюзия новообразованных сосудов с сохранением окружающих тканей (сетчатка, пигментный эпителий, хориокапилляры). Этот метод позволяет воздействовать с определенной избирательностью только на патологические участки, что повышает эффективность лечения, одновременно улучшая прогноз по зрению. Для реализации данного метода в CIBA Vision (США) создан фотосенсибилизатор Визудин, представляющий собой производную порфирина – вертепорфин (бензопорфирин дериват моноацид). Визудин не флуоресцирует, в

связи с чем он не может быть использован для диагностики СНМ, поэтому с целью подтверждения СНМ большим необходимо проводить ангиографическое исследование с введением флуоресцеина натрия или индоцианина зеленого. Таким образом, процедура диагностики и фотодинамической терапии разбивается на два разделенных во времени этапа. Проведение же самой фотодинамической терапии также осложняется ввиду отсутствия того же эффекта флуоресценции, и врач, используя микроскоп и цветную видеокамеру, должен ориентироваться по клиническим признакам, что в значительной мере может снизить эффект терапии.

В связи с этим нами прорабатывалась возможность использования отечественного фотосенсибилизатора Фотосенс [12] (ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Москва), отличающегося высокой эффективностью как фотодинамического действия, так и флуоресценции при возбуждении в спектральном диапазоне 665–680 нм. Этот фотосенсибилизатор разрешен к применению в России для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии новообразований, а в настоящее время исследуется возможность его применения и для неонкологических патологий.

При исследовании фармакокинетики Фотосенса в сосудах глазного дна кроликов с использованием лазерного спектрально-флуоресцентного анализатора ЛЭСА-01-БИОСПЕК («Биоспек», Москва) [13] было показано (рис.1), что за 8 дней Фотосенс практически полностью выводится из здоровых сосудов глаза. В то же время в патологическом очаге СНМ создается депо Фотосенса вследствие его просачивания через стенки сосудов, и концентрация препарата со временем практически не снижается, поскольку фотосенсибилизатор выходит за пределы сосудистой системы. Это, а также прорастание новообразованных сосудов через пигментный эпителий, имеющий значительное поглощение в спектральном диапазоне 650–700 нм, обеспечивает высокий контраст патологического очага по сравнению с непораженными участками глазного дна и дает возможность достаточно точно определить границы патологии по картине флуоресценции Фотосенса, а при лазерном терапевтическом облуче-

* Центр естественно-научных исследований Института общей физики РАН им. А.М.Прохорова, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 38

** МНИИ глазных болезней им. Гельмгольца, Россия, 103064 Москва, ул. Садовая-Черногрозская, 14/19

*** Московская медицинская академия им. И.М.Сеченова, Россия, 119992 Москва, ул. Большая Пироговская, 2/6

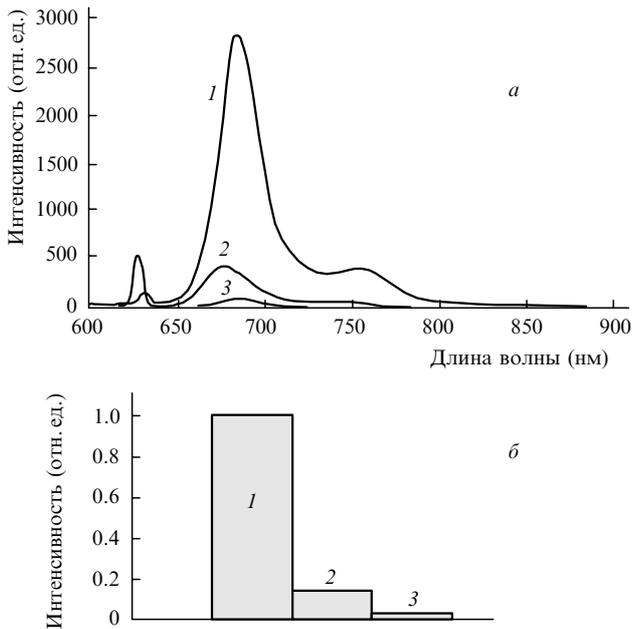


Рис.1. Спектры (а) и интегральная интенсивность (б) флуоресценции препарата Фотосенс в сосудах глазного дна кролика через один час (1), три дня (2) и восемь дней (3).

нии дополнительно способствует повышению избирательности фотодинамического воздействия и сохранности прилегающих тканей.

Целью настоящей работы явилось создание лазерно-спектроскопического комплекса для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии патологических изменений глазного дна с использованием Фотосенса и апробация этих методов на экспериментальных моделях патологий глаз животных (мышей и кроликов).

Лазерно-спектроскопический комплекс был разработан нами на базе традиционного офтальмологического прибора – щелевой лампы ЩЛ-ГЗ (ОАО «ЗОМЗ»). Было необходимо, используя в качестве базовых традиционные для офтальмологов приемы работы, одновременно реализовать ряд новых функций, которые обеспечили бы возможность изучения распределения концентрации Фотосенса в сосудах сетчатки и окружающих тканях, а также локальное фотодинамическое воздействие на патологические очаги. Это требует решения ряда задач, в том числе:

- наблюдения слабой флуоресцентной картины при ограниченной плотности возбуждающей мощности лазера (чтобы не инициировать во время диагностики фотодинамический процесс) в условиях интенсивной засветки исследуемой зоны глазного дна белым светом;
- наблюдения цветной картины глазного дна (с использованием традиционного для таких приборов щелевого освещения, облучающего глазное дно белым светом) в условиях интенсивной засветки исследуемой зоны глазного дна лазерным излучением.

При создании комплекса щелевая лампа ЩЛ-ГЗ была оснащена видеоканалом, включающим цветную и высокочувствительную черно-белую видеокамеры и персональный компьютер для обработки и отображения видеoinформации, а также лазером и оптическим адаптером, фокусирующим (с помощью дополнительной линзы Гольдмана) излучение лазера на глазное дно (рис.2). Ди-

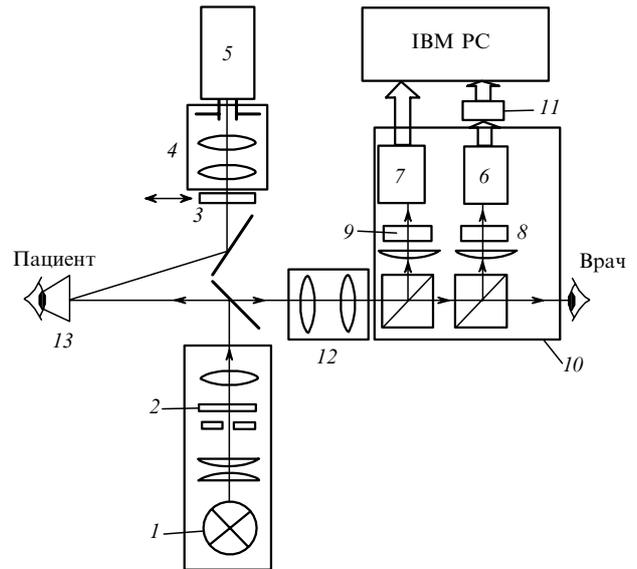


Рис.2. Схема лазерно-спектроскопического комплекса для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии патологий глазного дна:

1 – осветитель щелевой лампы; 2 – фильтр осветителя; 3 – рассеивающая линза; 4 – оптический адаптер; 5 – лазер; 6 – высокочувствительная видеокамера; 7 – цветная видеокамера; 8 – фильтр высокочувствительной видеокамеры; 9 – фильтр цветной видеокамеры; 10 – видеоканал; 11 – система шумоподавления высокочувствительной видеокамеры; 12 – микроскоп; 13 – линза Гольдмана.

аметр пятна сфокусированного излучения можно было регулировать в пределах 0.1 – 1 мм.

Поскольку соотношение интенсивностей возбуждающего излучения и флуоресценции составляет примерно 3–4 порядка (в зависимости от концентрации Фотосенса), для эффективной работы комплекса в диагностическом режиме его оптическая система должна была обеспечивать максимальное прохождение флуоресценции на высокочувствительную видеокамеру и при этом практически полностью предотвращать попадание на нее рассеянного лазерного излучения. Для этого при выборе компонентов оптической системы мы приняли во внимание то, что спектр наиболее эффективного возбуждения фотодинамического воздействия и флуоресценции Фотосенса в сосудистой системе глазного дна представляет собой довольно узкую (663–675 нм) полосу, в то время как основная флуоресценция лежит в пределах 665–740 нм.

Исходя из этого был создан специальный набор поглощающих и интерференционных фильтров, обеспечивающих пропускание на высокочувствительную камеру только флуоресцентного изображения в диапазоне 690–740 нм и полностью отсекающих как коротковолновую область, в которую входит рассеянное от тканей глаза лазерное излучение, так и длинноволновую (более 740 нм), где интенсивность флуоресценции близка к нулю, а основную долю сигнала составляет внешняя засветка (рис.3). Кроме того, мы включили в осветитель щелевой лампы дополнительный фильтр, отсекающий излучение с длиной волны свыше 640 нм (поскольку оно все равно не участвует в формировании изображения цветной телекамерой). В результате этого была обеспечена защита высокочувствительной видеокамеры от попадания на нее длинноволновой компоненты излучения осветителя. Аналогичный фильтр был включен также и в оптическую систему цветной телекамеры, что позволило существенно снизить влия-

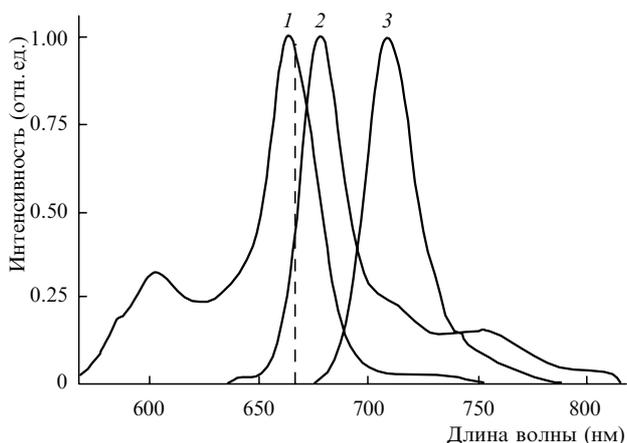


Рис.3. Формы спектральных контуров полосы возбуждения Фотосенса (1) и его флуоресценции (2), а также пропускание системы фильтров высокочувствительной видеокамеры (3); штриховой линией отмечена длина волны полупроводникового лазера, используемого для возбуждения Фотосенса.

ние рассеянного лазерного излучения на яркость и цветопередачу формируемого ею цветного изображения.

Разработанный для комплекса лазер с волоконным выходом обеспечивал мощность излучения до 90 мВт в световоде диаметром 200 мкм с числовой апертурой 0.22. Для достижения максимальной чувствительности системы длина волны излучения лазера выбиралась в пределах 667–671 нм (на коротковолновом крыле полосы поглощения). С учетом светопропускания оптического адаптера, фокусирующего излучение лазера на глазное дно (рис.4), и потерь на линзе Гольдмана мощность воздействующего на патологию излучения могла достигать нескольких милливатт. Это позволило во всем диапазоне регулирования диаметра светового пучка (100–1000 мкм) обеспечить достижение плотности мощности по крайней мере до 3 Вт/см², а за время облучения, не превышающее 90 с (максимальное время, допустимое для проведения подобных офтальмологических процедур), – плотности дозы до 300 Дж/см², что при использовании Фотосенса вполне достаточно для фотодинамического воздействия на сосуды, вызывающего их окклюзию.

Поскольку в диагностическом режиме используется минимальная плотность мощности лазерного излучения (во избежание фотодинамического повреждения здоровых сосудов глазного дна), интенсивность флуоресценции оказывается невысокой. Из-за этого для контрастного наблюдения флуоресцирующего объекта, особенно малого размера, при работе камеры со слабыми све-

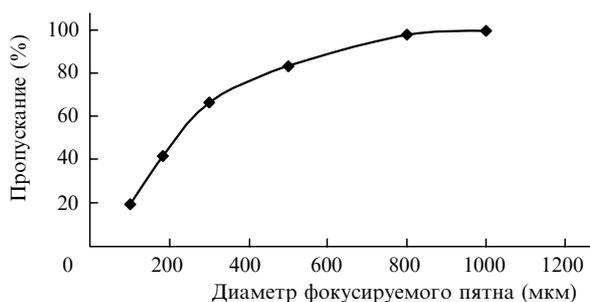


Рис.4. Светопропускание оптического адаптера лазерно-спектроскопического комплекса; излучение вводится световодом диаметром 200 мкм с числовой апертурой 0.22.

товыми потоками необходимо принимать меры для подавления белого шума (случайной низкоинтенсивной высокочастотной составляющей видеопотока камеры), имеющего вид «снега». Для этого, как правило, используют принцип накопления кадров, что дает возможность улучшить отношение сигнал/шум в $n^{1/2}$ при усреднении сигнала по n кадрам. Например, при усреднении по 25 кадрам (инерционность изображения в этом случае составит 1 с) отношение сигнал/шум может улучшиться в 5 раз. Однако такой метод требует очень больших ресурсов компьютера. В связи с этим в качестве оптимального варианта системы многокадрового накопления, позволяющей минимизировать необходимые для шумоподавления ресурсы персонального компьютера, мы предложили систему, в которой каждый поступающий кадр (ПК) видеопотока не замещает собой предыдущий кадр, а изменяет текущее изображение (ТИ), прибавляясь к нему с некоторым коэффициентом (т. е. новое изображение получается путем попиксельного сложения ПК и ТИ, и при этом коэффициенты при ТИ и ПК подбираются такими, чтобы их сумма была равна единице). Полученное результирующее изображение отображается на мониторе и является ТИ для следующего ПК. Такая система позволяет существенно подавить белый шум видеопотока в режиме реального времени.

Для оценки чувствительности и пространственной разрешающей способности комплекса необходимо было создать флуоресцирующий тест-объект с периодической структурой. Поскольку Фотосенс в сухом виде не флуоресцирует, такой тест-объект был изготовлен на основе сетчатого полотна из капрона, обработанного раствором Фотосенса. Характерные размеры элементов полотна примерно соответствовали типичным размерам очагов патологии: размер ячеек полотна составлял 250–500 мкм, жгутов волокон – 0.1 мм, отдельных волокон – примерно 20 мкм. После обработки и высушивания в поверхностных слоях капроновых волокон образовывался стабильный твердый раствор сульфогфталоцианина алюминия в капроне, имеющий с Фотосенсом близкие по спектру и интенсивности характеристики флуоресценции. На рис.5,а приведены спектральные характеристики этого твердого раствора, а на рис.5,б – флуоресцентное изображение тест-объекта, полученное в разработанном комплексе.

Для оценки безопасности использования Фотосенса и разработанного комплекса для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии были проведены исследования на экспериментальных животных.

В первой группе животных изучалось влияние Фотосенса на ткани глаза при облучении в спектральном диапазоне поглощения препарата. Препарат вводился внутривенно в дозе 0.01, 0.1, 0.3 и 0.5 мг/кг. Контроль его концентрации в сосудах глазного дна проводился в течение последующих двух недель с помощью спектрально-флуоресцентного анализатора ЛЭСА-01-БИОСПЕК.

Во второй группе животных лазерное воздействие (плотность облучения 500 мВт/см² при экспозиции 100 с) производилось без предварительного введения Фотосенса.

В третьей группе животных оценивалось влияние лазерного воздействия на сосуды и ткани глаз в диагностическом режиме (10 мВт/см² в течение 10 мин) при тех же дозах препарата – 0.01, 0.1, 0.3 и 0.5 мг/кг. На рис.6 приведено флуоресцентное изображение сосудов глазного дна кролика, полученное при дозе введения Фотосенса

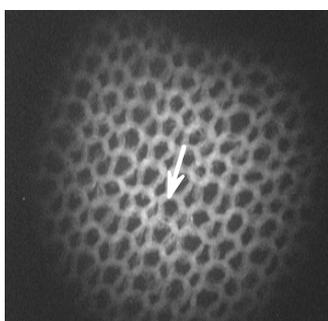
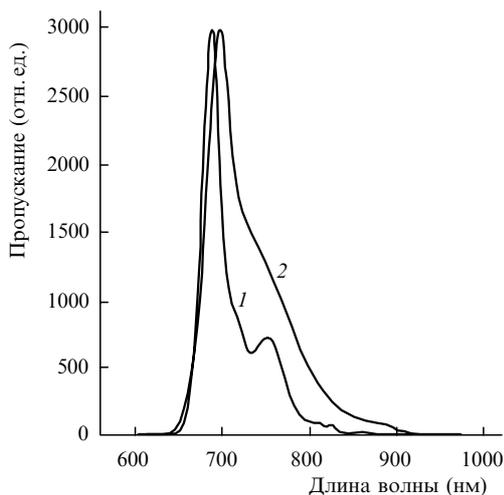


Рис.5. Спектр флуоресценции раствора Фотосенса с концентрацией 10 мг/л (1) и тест-объекта (2), обработанного этим раствором (а), а также флуоресцентное изображение тест-объекта; стрелка указывает на отдельное волокно диаметром 20 мкм (б).

менее 0.1 мг/кг. Такие дозы являются весьма низкими и используются только для диагностических целей.

В четвертой группе проводилось терапевтическое облучение лазером (500 мВт/см² при экспозиции 90 с) после внутривенного введения Фотосенса в дозах 0.01, 0.1, 0.3 и 0.5 мг/кг.

Во всех группах животные подвергались эвтаназии непосредственно после эксперимента, через неделю и через две недели; глаза извлекались для морфологического изучения. Гистологические исследования, проведенные методами световой и электронной микроскопии, не выявили каких-либо изменений глаз в первых трех группах животных. В четвертой группе поражение сосудов заднего отрезка глаза возникало только в зоне сфокусированного лазерного воздействия, причем степень этого воздействия зависела от дозы введенного препарата и времени облучения.

Проведенный эксперимент позволил сделать вывод о том, что как сам по себе Фотосенс (без облучения), так и изолированное лазерное воздействие без сенсibilизации не оказывают вредного влияния на ткани глаза. Безопасным является и облучение глаза в диагностическом

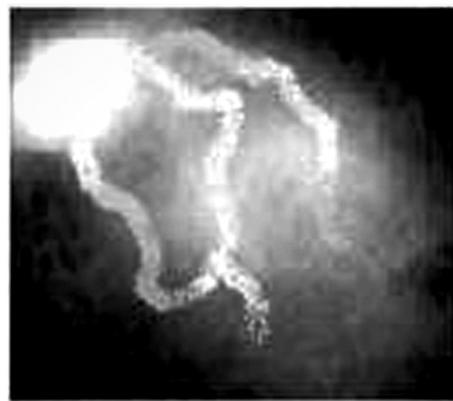


Рис.6. Флуоресцентное изображение сосудов глазного дна кролика.

режиме после введения Фотосенса в дозе 0.01, 0.1, 0.3 и 0.5 мг/кг. Поражение сосудов заднего отрезка глаза при терапевтическом режиме возникает только в зоне сфокусированного лазерного воздействия после предварительного введения фотосенсибилизатора, причем степень этого поражения зависит от дозы препарата и времени облучения.

Таким образом, прецизионность и чувствительность созданной установки позволяют увидеть флуоресценцию исследуемых глазных патологий при концентрациях препарата, на порядок ниже используемых при онкологических заболеваниях. Размеры патологий достигают 100–200 мкм, что не хуже размеров, которые разрешают система визуализации и система доставки лазерного излучения. Это позволяет надеяться на успешное применение настоящей установки и препарата Фотосенс для лечения таких сложных заболеваний, как СНМ, глаукома и другие, и на быстрое распространение оборудования и метода в широкой клинической практике, учитывая и то, что стоимость оборудования и препарата в десять раз меньше, чем их западных аналогов. Начало клинических испытаний метода запланировано на конец текущего года.

1. Macular Photocoagulation Study Group. *Arch. Ophthalmol.*, **109**, № 9, 1242 (1991).
2. Lafaut B.A., Bartz-Schmidt K.U., Vanden Broeck C., Aisenbrey S., De Laey J.J., Heimann K. *Br. J. Ophthalmol.*, **84**, 239 (2000).
3. Patz A., Flower R.W., Klein M.L., et al. *Docum. Ophthalmol. Proc. Ser.*, **9**, 245 (1976).
4. Hart P.M., Chakravarthy U., MacKenzie G., Archer D.B., Houston R.F. *Br. J. Ophthalmol.*, **80**, 1046 (1996).
5. Bischoff P.M., Flower R.W. *Arch. Ophthalmol.*, **58**, 528 (1980).
6. Hayashi K., DeLaey J.J. *Ophthalmologica*, **190**, 30 (1985).
7. Hayashi K., Hasegawa Y., Tokoro T., DeLaey J.J. *Japanese J. Ophthalmol.*, **42**, 827 (1988).
8. Macular Photocoagulation Study Group. *Arch. Ophthalmol.*, **100**, 912 (1982).
9. Blinder K.J., Peyman G.A., Paris C.L., et al. *Int. Ophthalmol. Clin.*, **15**, 215 (1991).
10. Ruiz-Moreno Jose M. *Br. J. Ophthalmol.*, **85**, 1041 (2001).
11. Photodynamic Therapy Study Group. *Arch. Ophthalmology*, **117**, 1329 (1999).
12. Лукьянец Е.А. *Российский химический эс.*, **XLII**, № 5, 9 (1998).
13. Лошенов В.Б., Стратонников А.А., Волкова А.И., Прохоров А.М. *Российский химический эс.*, **XLII**, № 5, 50 (1998).