



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 185 103** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **A 61 B 10/00, G 01 N 33/48**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2000107513/14, 29.03.2000
(24) Дата начала действия патента: 29.03.2000
(46) Дата публикации: 20.07.2002
(56) Ссылки: ЯКУБОВСКАЯ Р.И. и др. Скрининг и медикобиологическое изучение отечественных фотосенсибилизаторов. - Российский химический журнал, т.XIII, с.17-23. RU 2035719 C1, 20.05.1995. SU 934382 A1, 07.06.1982. SU 1665305 A1, 23.07.1991.
(98) Адрес для переписки:
119992, Москва, ул. Б. Пироговская, 2/6, ММА им.И.М.Сеченова, патентная служба

(71) Заявитель:
Московская медицинская академия им.И.М.Сеченова,
Центр естественно научных исследований Института общей физики РАН
(72) Изобретатель: Лощенов В.Б., Харнас С.С., Прохоров А.М., Меерович Г.А., Гладских О.П., Пальцев М.А., Стратонников А.А.
(73) Патентообладатель:
Московская медицинская академия им.И.М.Сеченова,
Центр естественно научных исследований Института общей физики РАН

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ IN VITRO

(57)
Изобретение может быть использовано в медицине для определения фотодинамической активности in vitro. В оптически прозрачный сосуд для фотобиологических исследований помещают биологическую культуральную среду, содержащую культуру опухолевых клеток, вводят фотосенсибилизатор, инкубируют культуру клеток с фотосенсибилизатором, отмывают культуру клеток от фотосенсибилизированной культуральной среды, добавляют чистую культуральную среду, дополнительно в культуральную среду непосредственно перед облучением вводят

эритроциты, полученную среду облучают, во время облучения измеряют спектр поглощения или рассеяния среды в оптическом диапазоне, по соотношению вкладов спектров окси- и дезоксигемоглобина в упомянутый спектр определяют степень оксигенации среды и скорость ее изменения, а именно определяют фотодинамическую активность фотосенсибилизатора по отношению скорости изменения оксигенации среды к плотности мощности облучения. Предпочтительно эритроциты вводят в количестве 0,2-1 об.%. Предлагаемый способ является более достоверным и простым по сравнению с известными. 1 з.п.ф-лы.

RU 2 185 103 C2

RU 2 185 103 C2



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 185 103** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61 B 10/00, G 01 N 33/48**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2000107513/14, 29.03.2000

(24) Effective date for property rights: 29.03.2000

(46) Date of publication: 20.07.2002

(98) Mail address:
119992, Moskva, ul. B. Pirogovskaja, 2/6,
MMA im.I.M.Sechenova, patentnaja sluzhba

(71) Applicant:
Moskovskaja meditsinskaja akademija
im.I.M.Sechenova,
Tsentr estestvenno nauchnykh issledovanij
Instituta obshchej fiziki RAN

(72) Inventor: Loshchenov V.B.,
Kharnas S.S., Prokhorov A.M., Meerovich
G.A., Gladskikh O.P., Pal'tsev
M.A., Stratonnikov A.A.

(73) Proprietor:
Moskovskaja meditsinskaja akademija
im.I.M.Sechenova,
Tsentr estestvenno nauchnykh issledovanij
Instituta obshchej fiziki RAN

(54) **METHOD FOR DETERMINING PHOTODYNAMIC ACTIVITY IN VITRO**

(57) Abstract:

FIELD: medicine. SUBSTANCE: method involves putting biological culturing medium containing tumor cell culture into transparent reservoir for carrying out photobiological studies.

Photosensibilization agent is added. The cell culture is incubated with the photosensibilization agent and then washed out from the photosensibilized culturing medium. Clean culturing medium is added. Erythrocytes are additionally introduced into the culturing medium immediately before irradiation. The so created medium is

irradiated. Medium absorption or scattering spectrum is read during irradiation procedure in optical bandwidth. Medium oxygenation degree and its variation rate are determined from the relation between oxy- and desoxyhemoglobin contributions into the spectrum and photodynamic photosensibilization agent activity is determined in this way with respect to ratio of medium oxygenation variation speed to irradiation power density. Erythrocytes are introduced in the amount of 0.2-1 % by volume. EFFECT: enhanced reliability and simplicity of the method. 2 cl

RU 2 185 103 C2

RU 2 185 103 C2

Настоящее изобретение относится к фотобиологии и медицине, а более конкретно - способам оценки эффективности фотосенсибилизаторов - препаратов, используемых для фотодинамической терапии.

Известен способ определения фотодинамической активности *in vitro*, при котором в оптически прозрачный сосуд для фотобиологических исследований помещают биологическую культуральную среду, содержащую культуру опухолевых клеток, вводят фотосенсибилизатор, инкубируют культуру клеток с фотосенсибилизатором, затем культуру клеток отмывают от фотосенсибилизированной культуральной среды, добавляют чистую культуральную среду, затем этот сосуд облучается светом соответствующей длины волны. В результате фотодинамического воздействия часть клеток гибнет, и по соотношению погибших и выживших клеток определяют фотодинамическую активность фотосенсибилизатора [Р.И. Якубовская и др. "Скрининг и медико-биологическое изучение отечественных фотосенсибилизаторов". Российский химический журнал, том XLII, с. 17-23] /1/.

Недостатком известного способа является его сложность, трудоемкость, неоперативность, необходимость использования сложных микроскопических, радиоактивных или флуоресцентных методов для контроля соотношения погибших и выживших клеток. При этом требуется значительное число проб, но даже при этом условии высока вероятность неудачного завершения исследований (например, из-за контаминации ("зарастания") клеток, вызванной нарушением стерильности и т.д.), что снижает достоверность определения.

В настоящем изобретении решается задача упрощения способа и повышения достоверности определения фотодинамической активности *in vitro*.

Указанная задача решается тем, что в предлагаемом способе определения фотодинамической активности *in vitro*, при котором в оптически прозрачный сосуд для фотобиологических исследований помещают биологическую культуральную среду, содержащую культуру опухолевых клеток, вводят фотосенсибилизатор, инкубируют культуру клеток с фотосенсибилизатором, отмывают культуру клеток от фотосенсибилизированной культуральной среды, добавляют чистую культуральную среду, дополнительно в культуральную среду непосредственно перед облучением вводят эритроциты, полученную среду облучают, во время облучения измеряют спектр поглощения или рассеяния среды в оптическом диапазоне, по соотношению вкладов спектров окси- и дезоксигемоглобина в упомянутый спектр определяют степень оксигенации среды и скорость ее изменения, а именно определяют фотодинамическую активность фотосенсибилизатора по отношению скорости изменения оксигенации среды к плотности мощности облучения.

Предпочтительно введение эритроцитов в количестве 0,2...1 об.%.

Предлагаемый способ определения фотодинамической активности *in vitro* осуществляется следующим образом.

В биологическую культуральную среду, содержащую культуру опухолевых клеток, вводят фотосенсибилизатор, инкубируют культуру клеток с фотосенсибилизатором, отмывают культуру клеток от фотосенсибилизированной культуральной среды, добавляют чистую культуральную среду, добавляют эритроциты. Оптимально эритроциты добавляют в среду в количестве 0,2...1 об.%. Такое количество достаточно для надежной регистрации спектра поглощения окси- и дезоксигемоглобина и не влияет на свойства изучаемой среды. Далее проводится облучение и в автоматическом режиме мониторинга регистрируются спектры поглощения или рассеяния, производится расчет соотношения окси- и дезоксигемоглобина, по динамике изменения которого оценивается скорость изменения оксигенации среды, по которой и определяют фотодинамическую активность фотосенсибилизатора.

Пример конкретной реализации способа. В 24-луночный культуральный планшет помещают культуральную среду RPMI 1640, дополненную 10% FCS, со взвесью клеток мелкоклеточного рака легкого H69 с концентрацией 10^5 клеток/мл, добавляют препарат "Фотосенс" до конечной концентрации 10 мкг/мл, инкубируют в CO_2 -инкубаторе при температуре $37^\circ C$ в течение 24 ч, отмывают культуру клеток от фотосенсибилизированной культуральной среды, добавляют чистую культуральную среду, затем в среду добавляют эритроциты в количестве 1 об.% и в течение 2 мин облучают излучением с длиной волны 670 нм и плотностью мощности 100 мВт/см², используя для облучения лазер ЛД-680-2000 со световодом TF-FC-5m-600-SMA. Для контроля оксигенации эритроцитов используют спектроанализатор ЛЭСА-6-Ох с волоконно-оптическим приемным катетером FOC-R-1-6 и источник белого света LS-H-3 со световодом TF-FC-5m-600-SMA. Значения оксигенации за время облучения уменьшаются от 100% вплоть до 0%. В качестве критерия для оценки фотодинамической активности используют значение скорости дезоксигенации или приведенную величину - коэффициент эффективности ФДТ (КФДТ) - отношение скорости дезоксигенации к плотности мощности облучения. В данном эксперименте время дезоксигенации от уровня 100% до уровня 0% при плотности мощности облучения 300 мВт/см² составляет 90 с, КФДТ соответственно равен 36% см²/Вт, что соответствует высокой фотодинамической активности.

Исследования авторов показали, что поскольку большинство фотосенсибилизаторов являются фотосенсибилизаторами второго рода, и основным цитотоксическим агентом при их фотодинамическом действии является синглетный кислород, то при исследовании фотодинамической активности *in vitro* происходит утилизация растворенного в этой среде молекулярного кислорода, и эта утилизация проходит тем быстрее, чем выше скорость фотодинамической реакции. В свою очередь, это приводит к уменьшению насыщения кислородом гемоглобина в

эритроцитах, которое вычисляется из спектра поглощения или рассеяния среды в оптическом диапазоне (по соотношению вкладов спектров окси- и дезоксигемоглобина в упомянутый спектр). Были получены достаточно точные и повторяемые результаты при широкой вариации параметров облучения, концентрации и состава фотосенсибилизаторов, позволяющие сделать вывод о высокой точности, оперативности и надежности предлагаемого способа для определения фотодинамической активности *in vitro*.

Таким образом, предлагаемый способ является более достоверным и простым по сравнению с известным.

Формула изобретения:

1. Способ исследования фотодинамической активности *in vitro*, включающий помещение в оптически прозрачный сосуд для фотобиологических исследований биологической культуральной среды, содержащей культуру опухолевых

5 клеток, введение фотосенсибилизатора, инкубирование культуры клеток с фотосенсибилизатором, отмывание культуры клеток от фотосенсибилизированной культуральной среды, добавление чистой культуральной среды, облучение сосуда с культурой клеток светом соответствующей длины волны, отличающийся тем, что дополнительно в исследуемую культуральную среду непосредственно перед облучением вводят эритроциты, во время облучения измеряют спектр рассеяния полученной среды в оптическом диапазоне, определяют степень оксигенации среды и скорость ее изменения, а именно определяют по отношению скорости изменения оксигенации среды к плотности мощности облучения, по которой и определяют фотодинамическую активность фотосенсибилизатора.

2. Способ определения фотодинамической активности *in vitro* по п. 1, отличающийся тем, что эритроциты вводят в количестве 0,2-1 об. %.

25

30

35

40

45

50

55

60