

Изменения сетчатки при интравитреальном введении антипролиферативного препарата Мелфалан в различных концентрациях (экспериментально-морфологическое исследование)

И.П. Хорошилова-Маслова — д-р мед. наук, профессор, начальник отделения патологической анатомии и гистологии

Н.Л. Лепарская — канд. мед. наук, старший научный сотрудник отдела травматологии и реконструктивной хирургии

ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России,
105062, Москва, ул. Садовая-Черногрязская, д. 14/19

Пролиферативная витреоретинопатия — многофакторный патологический процесс образования эпиретинальных мембран на поверхности сетчатки. Основным методом лечения этого заболевания является витреоретинальная хирургия, для повышения эффективности лечения используют интравитреальное введение антипролиферативных препаратов. Цель данной работы — изучение действия препарата Мелфалан в различных концентрациях на сетчатку и ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) при его интравитреальном введении в эксперименте на кроликах. Материал и методы. Проведено экспериментально-морфологическое исследование 28 глаз 14 кроликов породы шиншилла, разделенных на 4 группы в зависимости от концентрации однократно интравитреально введенного мелфалана: 0,02; 0,01; 0,0075 и 0,005 мг. Результаты. Описаны 4 типа морфологических изменений сетчатки и РПЭ в зависимости от введенной дозы препарата. Мишенью накопления мелфалана в сетчатке является РПЭ, что вызывает нарушение метаболизма в наружных слоях сетчатки и появление атрофических очагов. Обсуждается динамика появления этих очагов и их обратимый характер. Заключение. Изучение морфологических изменений сетчатки при интравитреальном введении мелфалана выявило их дозозависимый характер; минимальной ретинотоксичностью характеризуются концентрации препарата 0,0075 и 0,005 мг.

Ключевые слова: мелфалан, сетчатка, ретинальный пигментный эпителий, пролиферативная витреоретинопатия.

Для цитирования: Хорошилова-Маслова И.П., Лепарская Н.Л. Изменения сетчатки при интравитреальном введении антипролиферативного препарата Мелфалан в различных концентрациях (экспериментально-морфологическое исследование). Российский офтальмологический журнал. 2018; 11 (1): 36-40.
doi: 10.21516/2072-0076-2018-11-1-36-40.

Лечение пролиферативной витреоретинопатии (ПВР) сопряжено с большими трудностями и включает применение как хирургического, так и консервативного методов лечения, среди которых большую роль играют антипролиферативные препараты.

В последние годы проведены фундаментальные исследования антипролиферативных препаратов (5-фторурацил, даунорубин, таксол, колхицин, рибозимы, глюкозамин и др.) на экспериментальных моделях ПВР, которые позволили использовать их

в лечении ПВР с учетом способности блокировать клеточные реакции, участвующие в развитии пролиферативного процесса [1]. Однако применение этих препаратов ограничено побочными эффектами, поэтому по-прежнему актуальным остается поиск новых, эффективных и с минимальным побочным действием антипролиферативных медикаментов [2].

В этой связи наше внимание привлек антипролиферативный препарат Мелфалан, используемый в онкологической практике. Мелфалан является производным азотистого иприта, относится к бифункциональным алкилирующим соединениям циклонеспецифического действия; обладает противоопухолевым, алкилирующим, цитостатическим и иммунодепрессивным действием. Мелфалан вызывает повреждение ДНК и нарушает ее полимеризацию и редупликацию, способствует образованию дефектных форм ДНК и РНК и останавливает синтез белка. Цитотоксичность обусловлена блокадой межцепочечных перекрестных обратимых сшивок в молекуле ДНК вследствие ковалентного связывания с гуанином в 7-й позиции и взаимодействия с фосфатными, сульфгидрильными и другими группами нуклеиновых кислот и белков. Тем самым нарушается клеточная репликация. Активен в отношении покоящихся и активно делящихся опухолевых клеток. Наиболее чувствительными фазами митотического цикла являются конец фазы G2 и переход G2-M.

Сначала препарат Мелфалан применяли в офтальмоонкологии при лечении ретинобластомы для внутриартериальной химиотерапии дополнительно к внутривенной химиотерапии, а затем в виде основной терапии. Однако, несмотря на положительный эффект — резорбцию опухоли, появлялись рецидивы в виде отсевов в стекловидном теле. Введение препарата интравитреально позволило добиться полной резорбции отсевов [3, 4]. В настоящее время в американских и многих европейских клиниках интравитреальное введение мелфалана входит в протокол лечения детей с двусторонней ретинобластомой [5, 6]. Авторы отмечают, что системная химиотерапия совместно с интравитреальным введением мелфалана в дозах 20–30 мкг в 0,1 мл позволяет сохранить ребенку не только глаз, но и зрение [7]. Как альтернатива энуклеации единственного глаза, ребенку с ретинобластомой проводилась витреоретинальная операция с постоянной ирригацией мелфалана в ходе вмешательства (алкеран 5 мг/мл) [8].

Однако при интравитреальном введении в дозах 20–30 мкг/мл мелфалан оказывает токсическое влияние, вызывая развитие атрофических процессов в сетчатке [9].

Изучение антипролиферативного действия мелфалана и возможности его интравитреального введения при тяжелой витреоретинальной посттравматической патологии, сопровождающейся развитием ПВР, представляется нам перспективным направлением исследования.

ЦЕЛЬ работы — изучение действия мелфалана в различных концентрациях на сетчатку и ретиальный пигментный эпителий (РПЭ) при его интравитреальном введении в эксперименте на кроликах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом исследования были 14 кроликов породы шиншилла, разделенные на 4 группы. Всем животным интравитреально под местной анестезией Alcaini 0,5 % (Alcon) вводился мелфалан в объеме 0,1 мл в разной дозировке в оба глаза. В 1-ю группу вошли 2 кролика (4 глаза), которым вводился мелфалан в дозе 0,02 мг (20 мкг), т. е. в дозе, которую используют в клинике онкологи. Во 2-й группе — 4 кролика (8 глаз) — мелфалан вводился в оба глаза в дозе 0,01 мг. В 3-й группе — 4 кролика (8 глаз) — мелфалан вводился в дозе 0,0075 мг. В 4-й группе — 4 кролика (8 глаз) — мелфалан вводился в дозе 0,005 мг. Животных наблюдали в течение месяца с использованием биомикроскопии и офтальмоскопии. После выведения животных из эксперимента глаза энуклеировали, фиксировали в 10 % буферированном формалине и подвергали стандартной гистологической обработке. Микроскопическое исследование проводили с помощью системы Leica с встроенной цифровой камерой при увеличении 200–600.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлено, что морфологические изменения сетчатки и РПЭ имели дозозависимый характер.

Морфологические изменения сетчатки при интравитреальном введении мелфалана в дозе 0,02 мг. Закономерным процессом во всех 4 глазах было появление атрофических очагов в сетчатке, имевших распространенный характер. Атрофический процесс распространялся от периферии сетчатки до диска зрительного нерва (ДЗН). Выявлено 3 типа атрофических изменений. Атрофический процесс I типа характеризовался формированием очагов хориоретинальной адгезии, в которых на фоне воспалительной инфильтрации в хориоиде отмечалось разрушение РПЭ с миграцией пигмента в сетчатку (рис. 1). В зонах адгезии отмечалось диффузное поражение всех слоев сетчатки: сетчатка полностью утрачивала свою структуру, замещалась глиальной тканью, в которой были рассеяны воспалительные и глиальные элементы (рис. 2).

Атрофические изменения II типа наблюдались на фоне резкого истончения сетчатки при относительной ее сохранности. Отмечалось исчезновение наружного ядерного и наружного плексиформного слоев, а внутренний ядерный слой редуцировался до одного ряда. Отмечалась гибель ганглиозных клеток и слоя нервных волокон (рис. 3).

Начальные структурные изменения, локализовались преимущественно в наружных отделах, в палочках и колбочках, которые мы расценили как

атрофические очаги III типа. Отмечалось укорочение палочек и колбочек параллельно с редукцией рядов наружного ядерного слоя при сохранении неизменными внутренних слоев сетчатки (рис. 4). Наряду с формированием атрофических очагов в сетчатке, в данной группе отмечались выраженные деструктивные изменения в РПЭ. Отмечалась диссоциация клеток, их округление, выход из пласта и активная миграция (рис. 5, А). Встречались очаги оголения мембраны Бруха, где РПЭ отсутствовал (рис. 5, Б). В прилежащей хориоидее отмечался фиброз стромы, облитерация сосудов, которые плохо визуализировались.

Морфологические изменения сетчатки после интравитреального введения мелфалана в дозе 0,01 мг (8 глаз). Далекое зашедшие атрофические изменения в сетчатке, соответствующие атрофии I типа, в этой группе отсутствовали. Отмечалось появление отдельных изолированных очагов II типа, локализующихся вблизи ДЗН. В морфологической картине этих очагов отчетливо выявлена динамика поражения наружного ядерного слоя с редукцией числа рядов ядер до одного с последующим его исчезновением. Определялись изменения внутренних слоев сетчатки: истончение внутреннего ядерного слоя, исчезновение слоя нервных волокон и появление многочисленных вакуолей, гибель ганглиозных клеток (рис. 6).

В морфологической картине сетчатки наряду с типичными атрофическими процессами обнаружены своеобразные очажки, которые можно расценить как начальные проявления атрофического процесса III типа. В этих очажках структура сетчатки сохранялась, но в ней появлялись небольшие изменения, локализованные преимущественно в слое палочек и колбочек, а также в наружном ядерном слое. Подобные очажки наблюдались во всех глазах. Значительные изменения отмечены в этой группе в слое РПЭ, деструктивные

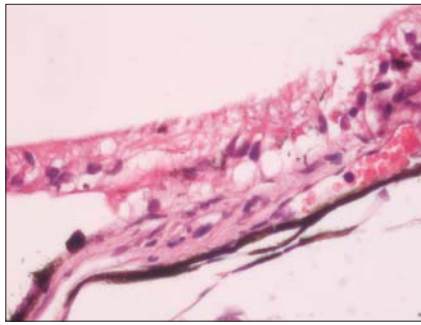


Рис. 1. Атрофический очаг I типа. Зона хориоретиальной адгезии. Разрушение РПЭ. Поражение всех слоев сетчатки. Мелфалан в концентрации 0,02 мг. Окраска — гематоксилин-эозином. $\times 200$.

Fig. 1. Melphalan 0.02 mg. Atrophic focus of I type in the retina. Chorioretinal adhesion and destruction of RPE. The total damage of retinal histological structure. Hem-Eosin. $\times 200$.

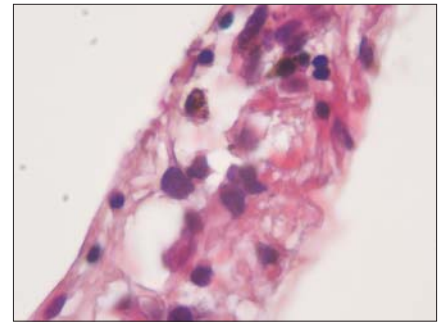


Рис. 2. Атрофический очаг I типа. Глиальное перерождение сетчатки. Концентрация Мелфалана 0,02 мг. Окраска — гематоксилин-эозином. $\times 400$.

Fig. 2. Melphalan 0.02 mg. Atrophic focus of I type in the retina. Glial substitution of the retina. Hem-Eosin. $\times 400$.

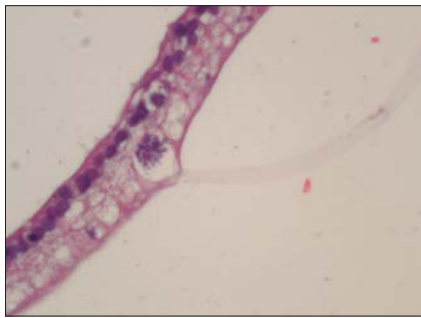


Рис. 3. Атрофический очаг II типа. Атрофия внутреннего ядерного слоя и отсутствие наружного ядерного слоя сетчатки. Апоптоз ганглиозных клеток. Концентрация мелфалана 0,02 мг. Окраска — гематоксилин-эозином. $\times 200$.

Fig. 3. Melphalan 0.02 mg. Atrophic focus of II type in the retina. The absence of the outer nuclear layer and atrophy of inner nuclear layer. Apoptosis of Ganglion cells. Hem-Eosin. $\times 200$.

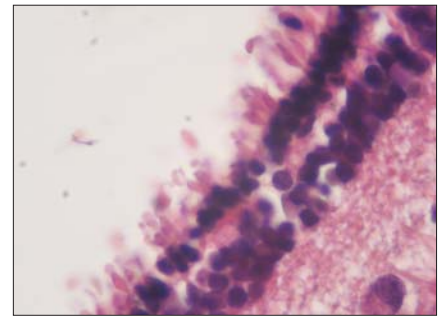


Рис. 4. Атрофический очаг III типа. Укорочение палочек и колбочек. Редукция ядерных слоев наружного ядерного слоя. Концентрация мелфалана 0,02 мг. Окраска — гематоксилин-эозином. $\times 400$.

Fig. 4. Melphalan 0.02 mg. Atrophic focus of III type in the retina. Shortening of the height of the rod and cone and limited reduction of outer nuclear layer. Hem-Eosin. $\times 400$.

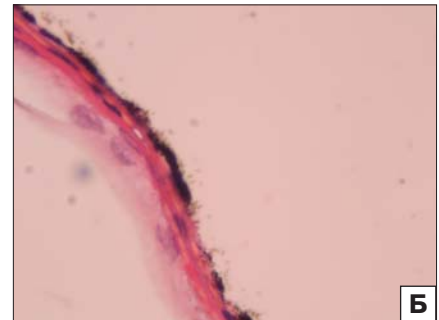
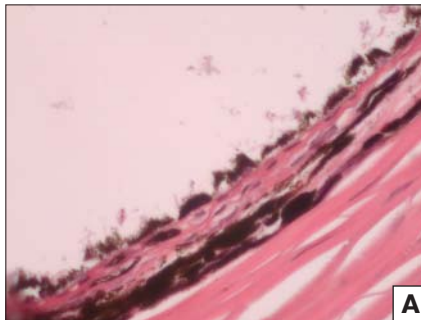


Рис. 5. А — округление клеток РПЭ, их диссоциация с выходом из пласта. Концентрация мелфалана 0,02 мг. Окраска — гематоксилин-эозином. $\times 200$. Б — РПЭ. Оголение мембраны Бруха. Концентрация мелфалана 0,02 мг. Окраска — гематоксилин-эозином. $\times 400$.

Fig. 5. А — Melphalan 0.02 mg. Round-up cells of RPE, their dissociation and migration. Hem-Eosin. $\times 200$. Б — Melphalan 0.02 mg. RPE denuded of Bruch's membrane. Hem-Eosin. $\times 400$.

изменения которого особенно выражены в зоне измененной сетчатки. Внутренние слои сетчатки сохраняли свою нормальную структуру.

Морфологические изменения сетчатки после интравитреального введения мелфалана в дозе 0,0075 мг (8 глаз). Патологические изменения в сетчатке выявлены только у одного животного (2 глаза) этой группы. Наблюдалось формирование ограниченного атрофического очага сетчатки II типа вблизи ДЗН. В морфологической картине этого очага характерной особенностью были значительные изменения в наружном ядерном слое и слое палочек и колбочек. Отмечалась редукция наружного ядерного слоя до полного исчезновения. Внутренний ядерный слой отличался небольшой разрыхленностью за счет отека, во внутренних слоях наблюдалась вакуолизация, слой ганглиозных клеток был сохранен, т. е. морфологические изменения локализовались преимущественно в наружных слоях сетчатки. У остальных животных (3 кролика, 6 глаз) определялись единичные атрофические очажки III типа с ограниченным истончением только наружного ядерного слоя до 2–3 рядов (рис. 7). Сохранились деструктивные изменения в слое РПЭ, где отмечалась диссоциация клеток в пласте и выход отдельных клеток из пласта, формирование участков оголения мембраны Бруха.

Морфологические изменения сетчатки после интравитреального введения мелфалана в дозе 0,005 мг (8 глаз). В этой группе животных изменений в структуре внутренних оболочек глаза не наблюдалось. Передний отдел сохранялся неизменным. Сетчатка прилежала, грубых атрофических очагов в ней не выявлено. Однако в 5 глазах из 8, в зоне, прилежащей к ДЗН, определялись атрофические изменения третьего типа, которые локализовались в наружном ядерном слое, где отмечалось сокращение рядов и укорочение слоя палочек и колбочек (рис. 8). Подобные редукционные процессы в наружном ядерном слое, возможно, обусловлены нарушением метаболических процессов в наружных слоях сетчатки в результате деструктивных изменений РПЭ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Морфологические изменения сетчатки при интравитреальном введении мелфалана в 4 концентрациях: 0,02; 0,01; 0,0075 и 0,005 мг — имели дозозависимый характер. Определялись 3 типа атрофических процессов в сетчатке. Атрофические изменения сетчатки определяются концентрацией вводимого препарата и отражают его токсические свойства. В основе токсического действия лежит поражение преимущественно наружных слоев сетчатки: слоя палочек и колбочек, наружного ядерного и наружного плексиформного слоев, т. е. поражен фоторецепторный слой сетчатки, метаболизм которого тесно связан с функцией РПЭ.

В этой связи большой интерес представляют работы J. Francis [3] и P. Schaiquevich [9]. Как показали фармакокинетические исследования P. Schaiquevich, при системной химиотерапии у свиней была выявлена более высокая концентрация мелфалана в РПЭ, чем в сетчатке, что дало возможность предположить, что мелфалан оказывает большее воздействие на РПЭ. Возможно, эти данные могут объяснить формирование атрофических очагов III типа при интравитреальном введении мелфалана у кроликов, где использовались концентрации 0,0075 и 0,005 мг. Избыточное накопление мелфалана в РПЭ может вызывать нарушение метаболизма в наружных слоях сетчатки и способствовать деструкции всего фоторецепторного звена, начиная с палочек и колбочек. Учитывая способность наружных и внутренних сегментов фоторецепторов к регенерации, можно предположить обратимый характер подобных изменений. Проведенные исследования показали, что дозы мелфалана 0,0075 и 0,005 мг, введенные однократно интравитреально, обладают минимальной ретинотоксичностью и безопасны для введения интравитреально.

Конфликт интересов: отсутствует.

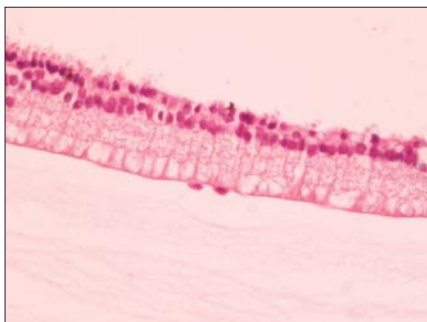


Рис. 6. Атрофический очаг II типа. Атрофия в наружном ядерном и внутреннем ядерном слоях сетчатки. Вакуолизация во внутренних слоях. Концентрация мелфалана 0,01 мг. Окраска — гематоксилин-эозином. $\times 200$.

Fig. 6. Melphalan 0.01 mg. Atrophic focus of II type in the retina. Atrophic focuses on outer and inner nuclear layers of the retina. Vacuolization of the inner layer. Hem-Eosin. $\times 200$.

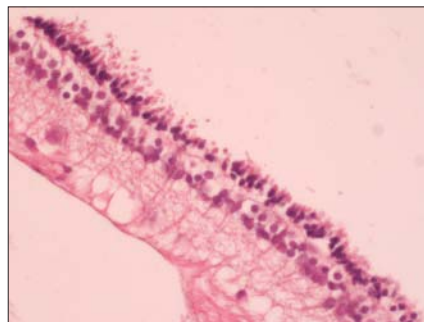


Рис. 7. Атрофический очаг III типа. Редукция ядерных рядов наружного ядерного слоя. Концентрация мелфалана 0,0075 мг. Окраска — гематоксилин-эозином. $\times 200$.

Fig. 7. Melphalan 0.0075 mg. Atrophic focus of III type in the retina. Limited reduction in the nuclear rows of the outer nuclear layer. Hem-Eosin. $\times 200$.

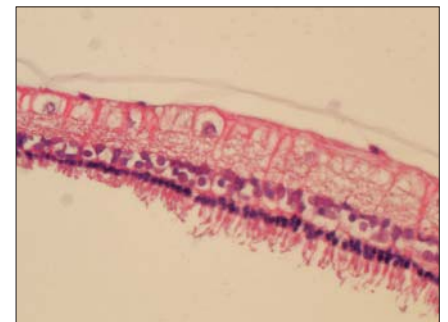


Рис. 8. Атрофический очаг III типа. Укорочение высоты палочек и колбочек. Редукция ядерных рядов наружного ядерного слоя. Концентрация мелфалана 0,005 мг. Окраска — гематоксилин-эозином. $\times 200$.

Fig. 8. Melphalan 0.005 mg. Atrophic focus of III type in the retina. Shortening of the height of rod and cone and limited reduction of nuclear rows of the outer nuclear layer. Hem-Eosin. $\times 200$.

Прозрачность финансовой деятельности: НИКТО из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Литература/References

1. Sadaka A., Giuliani G.P. Proliferative vitreoretinopathy current and emerging treatments. *Clinical ophthalmology*. 2012; 6: 1325–33. doi: 10.2147/OPTH.S27896.
2. Mukai A., Koozauskas A. A novel strategy to develop therapeutic approaches to prevent proliferative vitreoretinopathy. *Am. J. Pathology*. 2011; 179: 2931–40. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.08.043.
3. Francis J., Schaiquevich P., Buitrago E. Local and systemic toxicity of intravitreal melphalan for vitreous seeding in retinoblastoma: a preclinical and clinical study. *Ophthalmology*. 2014; 121 (9): 1810–7. doi: 10.1016/j.ophtha.2014.03.028.
4. Chassemi F., Shields C. Intravitreal melphalan for refractory or recurrent vitreous seeding from retinoblastoma. *Arch. Ophthalmol.* 2012; 130 (10): 1268–71. doi: 10.1001/archophthalmol.2012.1983.
5. Smith S.J., Smith B.D. Evaluating risk extraocular tumour spread following intravitreal injection therapy for retinoblastoma: a systematic review. *Br. J. Ophthalmol.* 2013; 97 (10): 123–6. doi: 10.1136/bjophthalmol-2013-303188.
6. Francis J., Marr B., Brodie S., Abramson D.H. Anterior ocular toxicity of intravitreal melphalan for retinoblastoma. *JAMA Ophthalmol.* 2015; 133(12): 1459–63. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2015.3119.
7. Серик Г.И., Давыдов Д.В., Грачев Н.С. и др. Современные тенденции в лечении ретинобластомы (по материалам образовательных лекций на конгрессе SIOР-2015, Кейптаун, ЮАР, 8–11 октября 2015 г.). *Российский журнал детской гематологии и онкологии*. 2016; 3: 64–6. doi: 10.17650/2311-1267-2016-3-1-64-66.
8. Serik G.I., Davydov D.V., Grachev N.S., et al. Current trends in the treatment of neuroblastoma (Based on educational lectures at the Congress of SIOР-2015, Cape Town, South Africa, 8–11 October 2015). *Russian Journal of Children Hematology and Oncology*. 2016; 3 (1): 64–6. doi: 10.17650/2311-1267-2016-3-1-64-66 (in Russian).
9. Яровой А.А., Горшков И.М., Ушакова Т.Л. Интраокулярная хирургия с ирригацией мелфалана в лечении гемофтальма на единственном глазу у ребенка с ретинобластомой (клинический случай). *Современные технологии лечения витреоретинальной патологии*. 2014; 1: 119–20.
10. Yarovoj A.A., Gorshkov I.M., Ushakova T.L. Intraocular surgery with melphalan irrigation for the hemophthalm treatment of retinoblastoma in monocular child (clinical case). *Modern technologies for vitreoretinal pathology treatment*. 2014; 1: 119–20 (in Russian).
11. Shaiquevich P., Buitrago E., Taich A., et al. Pharmacokinetic analysis of melphalan after superselective ophthalmic artery infusion in preclinic models and retinoblastoma patients. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 2012; 53 (7): 4205–12. doi: 10.1167/iov.12-9501.

Поступила: 14.08.2017

Retinal changes after intravitreal injections of various concentrations of antiproliferative medication Melphalan: an experimental and morphological study

I.P. Khoroshilova-Maslova — Dr. Med. Sci., Professor, head of pathologic anatomy and histology department
N.L. Leparskaya — Cand. Med. Sci., senior researcher, department of ocular trauma and reconstructive surgery

Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, 14/19, Sadovaya-Chernogryazskaya St., Moscow, 105062, Russia
nll19@mail.ru

Proliferative vitreoretinopathy is a multifactorial pathological process of formation of epiretinal membranes on the surface of the retina. The main method of treatment of this disease is vitreoretinal surgery. To increase the effectiveness of treatment, intravitreally administered antiproliferative drugs are used. Purpose: to study the effect of intravitreally administered medication Melphalan in varied concentrations on the retina and retinal pigment epithelium (RPE), in the experiments on rabbits. Materials and Methods. An experimental morphological study was performed on 28 eyes of 14 Chinchilla rabbits, divided into 4 groups depending on the concentration of Melaphan (0.02 mg, 0.01 mg, 0.0075 mg and 0.005 mg) administered intravitreally once. Results. Four types of morphological changes in the retina and RPE are described, depending on the medication dose administered. The target of Melphalan accumulation in the retina is RPE, which brings about metabolism disorders in the outer layers of the retina and the appearance of atrophic foci. The dynamics of these foci and their reversibility is discussed. Conclusion. The study of morphological changes of the retina in cases of introvitreal administration of Melphalan showed that they are dose-dependent. The minimum retinal toxicity is observed when low concentrations of the drug are used: 0.0075 and 0.005 mg.

Keywords: Melphalan, retina, retinal pigment epithelium (RPE), proliferative vitreoretinopathy (PVR).

For citation: Khoroshilova-Maslova I.P., Leparskaya N.L. Retinal changes after intravitreal injections of various concentrations of antiproliferative medication Melphalan: an experimental and morphological study. *Russian ophthalmological journal*. 2018; 11 (1): 36–40. doi: 10.21516/2072-0076-2018-11-1-36-40 (In Russian).

Conflict of interests: there is no conflict of interests.

Financial disclosure: No author has a financial or property interest in any material or method mentioned.

Для контактов: Лепарская Наталья Леонтиновна
E-mail: nll19@mail.ru