

ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ФОТОДИНАМІЧНОЇ ТЕРАПІЇ ШЛЯХОМ ВИБІРКОВОГО ЛАЗЕРНОГО СКАНУВАННЯ ПУХЛИНИ, ЗАЛЕЖНО ВІД НАЯВНОСТІ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ

¹Чепурна О.М., ²Штонь І.О., ³Павлов С.В., ³Тужанський С.Є., ⁴Утрерас А.,
⁵Войцехович В.С., ⁶Попов В.Д., ¹Каптановський Є.В., ¹Холін В.В., ²Гамалія М.Ф.

¹ПМВП «Фотоніка Плюс», м. Черкаси, вул. Одеська, 8
тел. (0472) 32-49-63, e-mail: info@fotonikaplus.com.ua

²Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
імені Р.Є.Кавецького НАН України, м. Київ, Україна

³Вінницький національний технічний університет, м. Вінниця, Україна

⁴Escuela Politécnica Nacional, Кіто, Еквадор

⁵Інститут фізики НАН України, м. Київ, Україна;

⁶Державний науково-дослідний інститут фізичної культури і спорту, м. Київ, Україна

Здійснено порівняння загальноприйнятої методики проведення фотодинамічної терапії шляхом опромінення пухлини в неперервному режимі та розробленого авторами методу вибіркового лазерного сканування. Запропонований метод полягає в опроміненні пухлини променем малої потужності та малого поперечного перерізу, який переміщується по обраній зоні з визначеною затримкою у кожній точці, при чому сканування ділянок пухлини відбувається лише за умов виявлення в них флуоресценції у процесі опромінення. Проведеними експериментами продемонстровано перспективність розробленого варіанту фотодинамічної терапії із використанням скануючого лазерного пристрою для вибіркового флуоресцентно корегованого опромінення пухлини, який забезпечує пригнічення росту пухлин на рівні з традиційним методом, але при значно меншій дозі опромінення.

Ключові слова: фотодинамічна терапія, лазерне сканування, флуоресцентна діагностика.

Вступ

Однією з головних особливостей методу фотодинамічної терапії (ФДТ) є можливість поєднання діагностики та лікування онкологічних захворювань в межах однієї процедури [5, 6, 7]. Збудження молекули більшості фотосенсибілізаторів (ФС) світлом із довжиною хвилі близько 405 нм (смуга Соре) викликає її флуоресценцію в червоній області спектру, що, враховуючи тропність порфіринових ФС до пухлини, дає змогу визначити границі малігнізованої тканини та час, необхідний для максимального накопичення ФС в пухлині [10]. З іншого боку, енергія збудженого ФС в клітині може бути перенесена на молекули кисню з утворенням синглетного кисню чи передаватись органічним сполукам, призводячи до формування вільних радикалів [11, 15]. Продукція цих активних форм кисню є основою руйнування пухлинних клітин при ФДТ [14]. При терапії пухлин зазвичай використовують червоне лазерне світло, так як воно максимально проникає вглиб тканини і потрапляє в полосу погли-

нання ФС. Традиційний метод проведення ФДТ передбачає застосування неперервного лазерного опромінення пухлини протягом орієнтовно визначеного часу, що може призвести до неконтрольованого вигорання ФС та вичерпання молекулярного кисню, який також є необхідною складовою здійснення ФДТ [8, 9, 12].

Раніше нами був розроблений спосіб опромінення пухлини шляхом лазерного сканування, принцип якого полягає в покроковому переміщенні променя малої потужності та малого поперечного перерізу по обраній зоні з визначеною затримкою у кожній точці [2]. Після проходження всіх точок пухлини промінь повертається в початкову позицію, і відбувається повторне покрокове проходження зони. Експериментальна перевірка цієї розробки *in vivo* на моделі карциноми мишей показала, що за ефективністю гальмування пухлинного росту запропонований метод поступався звичайному неперервному методу опромінення лише на 20%, тоді як застосована доза опромінення була меншою в 400 разів [3]. До основних пе-

реваг використання методу лазерного сканування для фотодинамічної терапії можна віднести:

- зменшення дози опромінення без зменшення робочої щільності потужності;
- зниження необхідної вихідної потужності лазерного випромінювання;
- більш раціональне використання ФС і тканьового кисню, концентрація котрих за скануючого режиму встигає відновитись.

В запропонованому нами раніше варіанті ФДТ лазерний промінь сканує пухлину у вигляді певних геометричних фігур (наприклад, прямокутника) визначених розмірів, таким чином, щоб максимально зіставити площу сканування із площею вибраної пухлини. Метод не враховує нерівності границь пухлини і, при скануванні у вигляді прямокутника, лазерне випромінювання, що потрапляє поза пухлину, використовується неефективно. Такий варіант проведення ФДТ також не приймає до уваги перепади концентрації ФС у різних ділянках пухлини та в різні моменти опромінення.

У даній статті описано застосування вдосконаленої нами системи сканування пухлин, яка забезпечувала флуоресцентне визначення наявності ФС у тканині в ході проведення процедури опромінення.

Основна частина

Наявність в зоні опромінення ФС є обов'язковою умовою проведення ФДТ, тому аналіз рівня флуоресценції ФС у пухлинній тканині може бути використаний з метою підвищення ефективності процедури. Виходячи з цього, нами була розроблена на базі лазерного скануючого

пристрою лікувально-діагностична установка, здатна забезпечити вибіркове опромінення окремих ділянок пухлини із врахуванням рівня їх флуоресценції. В якості ФС у цих дослідженнях було обрано препарат «Фотолон», дозволений в Україні (реєстраційний № UA/11770/01/02 від 21.10.2011 до 21.10.2016, наказ № 685(1) від 21.10.2011), виробництва РУП «Белмедпрепарати», Республіка Білорусь. Цей ФС, виготовлений на основі хлорину еб, характеризується наявністю двох максимумів поглинання у видимій області спектра: 402 ± 4 нм та 660 ± 5 нм.

Опромінення пухлини методом вибіркового сканування, враховуючи спектральні характеристики обраного ФС, здійснюється основним лазерним випромінюванням із довжиною хвилі 660 нм. Промінь малої потужності та малого поперечного перерізу поточно сканує пухлину, захоплюючи тільки ділянки, де попередньо була виявлена флуоресценція. Для збудження флуоресценції ФС застосовується допоміжне розфокусоване лазерне випромінювання з довжиною хвилі 405 нм, потужністю 50 мВт. Для реєстрації флуоресценції використовується камера на базі ПЗЗ-матриці. Програмне забезпечення лікувально-діагностичної установки (обробка зображення, визначення зон опромінення та інше) реалізується у вигляді розробленого програмного пакету «ControlS», який інсталується на персональний комп'ютер і працює в операційному середовищі Windows. Макет створеної лікувально-діагностичної установки наведено на рис. 1.

Процедура проведення ФДТ методом лазерного сканування із використанням лікувально-діа-

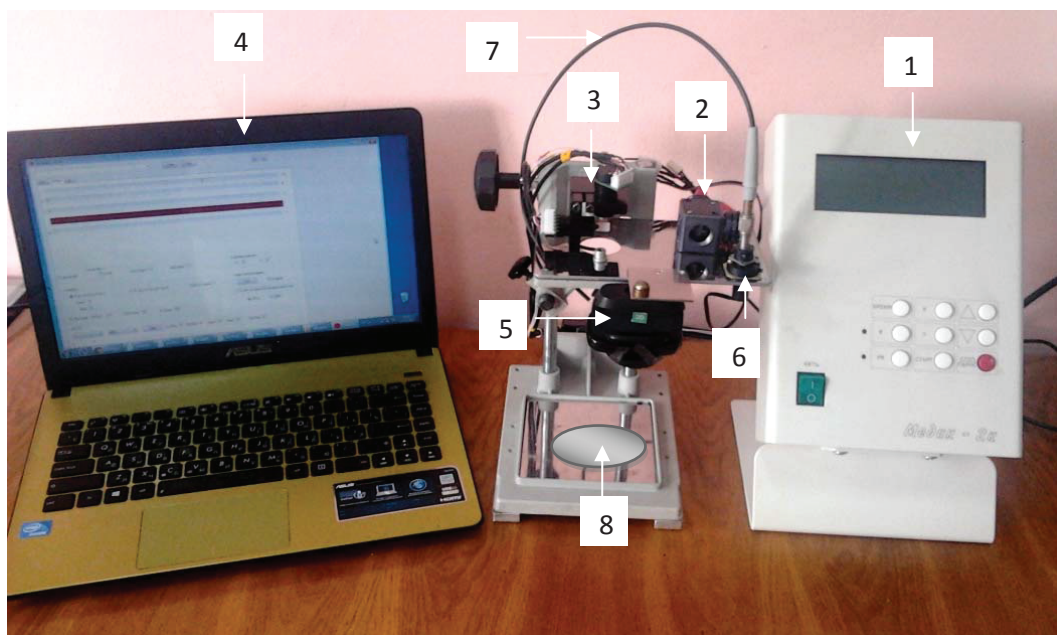


Рис. 1. Загальний вигляд діагностично-лікувальної установки

гностичної установки полягає в наступному. При ввімкненні блоку управління сканера (1), лазерне випромінювання від модуля (2) (довжина хвилі – 660 нм) потрапляє на дефлектор (3), який запрограмований окреслювати зону сканування у вигляді квадрату. За допомогою блоку управління вибираються необхідні параметри сканування: час опромінення (від 1 до 99 хв.), потужність лазерного випромінювання (від 10 до 50 мВт) та тривалість затримки лазера в одній точці (від 10 до 50 мс). Після запуску програми «ControLS.exe» на комп'ютері (4), камера (5) передає на монітор відеопотік в реальному режимі часу (без запису на ПК).

В ручному режимі оператор підлаштовує рамку програми під зону обстеження, яка включає пухлину. Реперними точками є чотири кути цієї зони. Після натиснення кнопки «Process» вмикається лазер, який генерує випромінювання з довжиною хвилі 405 нм потужністю 50 мВт (6) і через світловод (7) опромінює розфокусованим променем пухлину експериментальної тварини, що розміщена на предметному столику (8). Камера в цей час фотографує зону флуоресценції. Фотографія записується для обробки, та одночасно відправляється команда на вимкнення лазера. Додатково проводиться обробка зображення фільтрами, якщо вони введені оператором в налаштування програми. Після обробки програма формує команду для контролера з номерами точок, які необхідно сканувати, і відправляє її через СОМ-порт на блок управління основного лазера. Кнопкою «Start red» запускається основне лазерне випромінювання (660 нм), яке за допомогою дефлектора сканує пухлину по визначених програмою точках сфокусованим променем, що має діаметр близько 1 мм.

Через певний проміжок часу (2-5 хв) оператор зупиняє основний лазер та запускає визначення зони флуоресценції пухлини: ввімкнення допоміжного лазера 405 нм, фіксація зображення та визначення точок опромінення. Далі оператор знову запускає основний лазер для сканування пухлини в зоні флуоресценції. При цьому, загальний час ввімкнення діагностичного лазера, фотографування, вимкнення лазера, обробка зображення фільтрами та передача даних на контролер займає від 300 до 500 мс.

Для більш чіткого виділення зони флуоресценції пухлини та збільшення чутливості методу нами передбачена можливість програмної обробки фотографій з фільтрами «Special filter» та «Special filter 2» по градаціях RGB (0-255). Крім того, на ка-

меру встановлено оптичний фільтр для відсікання короткохвильового випромінювання та підвищення контрасту флуоресценції пухлини. Оброблені та оригінальні (без обробки програмою) зображення зберігаються на комп'ютер для подальшого використання. На рис. 2 показано приклад реєстрації флуоресценції пухлинної тканини за допомогою програми «ControLS» та визначення точок для подальшого опромінення лазером 660нм.

Нами було проведено серію експериментів для порівняння антибластомної ефективності фо-

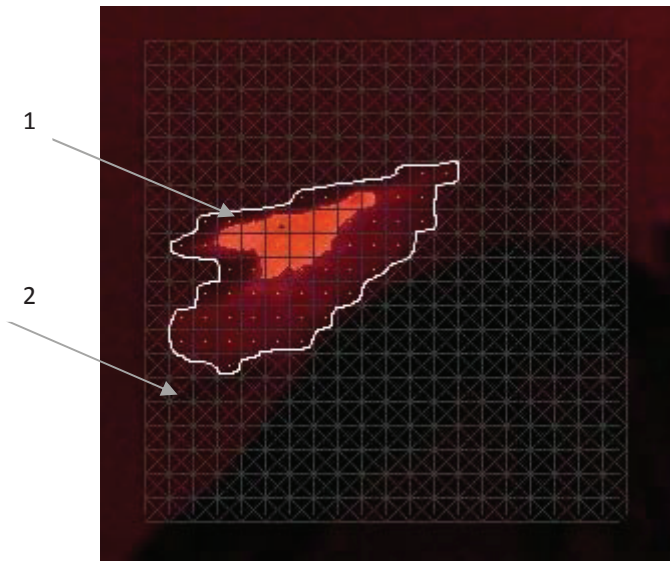


Рис. 2. Реєстрація флуоресценції пухлини, перещепленої у стопу задньої кінцівки миші, за допомогою програми «ControLS»
1 – виділена зона флуоресценції для подальшого сканування лазером; 2 – зона без флуоресценції.

тодинамічної терапії при опроміненні пухлини традиційним методом та за допомогою створеної лікувально-діагностичної установки методом лазерного сканування. При цьому для проведення ФДТ звичайним методом був використаний лазерний прилад «Ліка-хірург М» виробництва ПМВП «Фотоніка Плюс». В якості модельного об'єкта в експериментах використовували мишей лінії С57В1/6, вагою 18-22 г, з прищепленою у подушечку задньої кінцівки карциномою легень Льюїс. Діаметр пухлин до початку терапії коливався в межах 3,2-3,7 мм. За годину до лазерного опромінення мишам вводили внутрішньосудинно фотосенсибілізатор «Фотолон» в дозі 5 мг/кг. У двох порівнюваних групах тварин пухлини опромінювали у скануючому або безперервному режимах. Обидва режими були зрівняні за довжиною хвилі ($\lambda=660$ нм), щільністю потужності ($P_{\text{щ}}=45$ мВт/см²) та часом опромінення ($t_{\text{зат.}}=30$ хв). За скануючого режиму діаметр променя складав 1 мм, час затримки в кожній точці - 50 мсек, нові

зони флуоресценції визначались кожні 10 хв опромінення. Доза опромінення, отримана пухлиною за неперервного режиму, становила 90 Дж/см²; за скануючого режиму середня сумарна доза склала 2 Дж/см². У кожному окремому випадку застосування скануючого режиму доза опромінення залежала від загальної кількості точок сканування і коливалась від 0,7 до 3,2 Дж/см².

Як видно з рис. 3, обидва апробовані режими опромінення (скануючий та безперервний) призводили до певного, дуже подібного інгібування росту експериментальних пухлин. Вже на сьому добу після терапії розмір всіх опромінених пух-

та їх об'єм у групі тварин, якій проводили традиційну ФДТ статистично не відрізнялись від контрольної групи. Натомість, кількість метастазів та їх об'єм у мишей, пухлини котрих опромінювали у скануючому режимі виявились неоднорідними всередині групи (кількість метастазів та їх об'єм у частини мишей співпадали із такими у групі з неперервним режимом, а в деяких тварин ці значення були значно меншими). Так як доза, отримана тваринами в групі зі скануючим режимом опромінення, коливалась у широких межах, це може свідчити про вплив даного параметру на рівень метастазування при цьому варіанті про-

ведення терапії, імовірно за рахунок активації протипухлинного імунітету [13].

Висновки

Таким чином, створено лазерний скануючий пристрій, принцип роботи якого полягає в переміщенні лазерного променя малого поперечного перерізу по вибраній області із визначеною затримкою у кожній точці.

Пристрій удосконалено системою збудження та реєстрації флуоресценції фотосенсибілізатора в тканині, розроблено програму для обробки флуоресцентного зображення та його використання в якості матриці для програмно-керованого скану-

вання пухлини. Дана система дозволяє знизити потужність лазерного випромінювання, необхідного для проведення процедури, та оптимізувати витрати фотосенсибілізатора.

Експериментальна перевірка системи шляхом фотодинамічної терапії карциноми мишей показала, що за ефективністю гальмування пухлинного росту така терапія не поступалась традиційній з використанням безперервного лазерного опромінення, тоді як застосована доза опромінення була меншою в 45 разів.

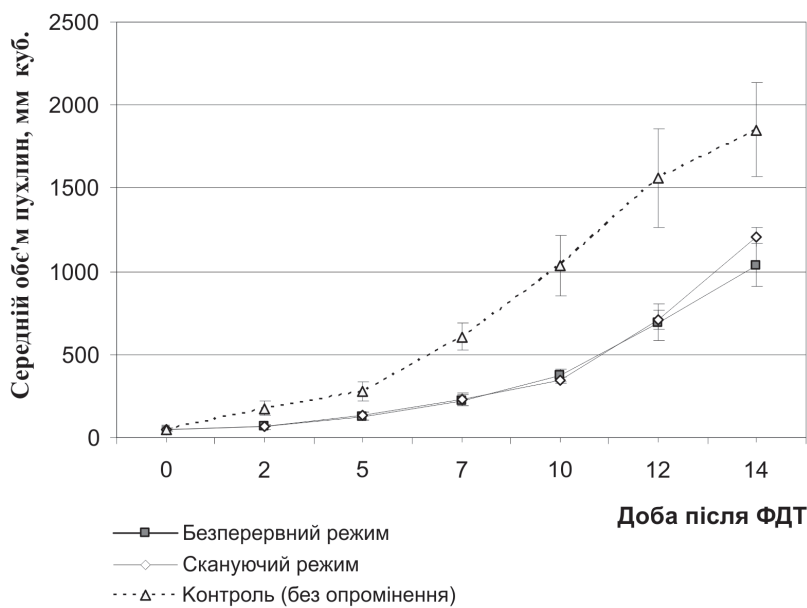


Рис. 3. Динаміка росту карциноми мишей після фотодинамічної терапії за різних режимів опромінення

лин починав статистично достовірно відрізнятись від контрольних [1, 4]. На 11-ту добу гальмування росту пухлин у групі, опроміненій в скануючому режимі, складало 54%, а для безперервного режиму цей показник дорівнював 55%. Отже, отримані результати практично не відрізнялись, хоча доза опромінення за скануючого режиму була в 45 разів меншою.

На 14-ту добу після проведення ФДТ було визначено рівень метастатичного ураження легень експериментальних тварин. Кількість метастазів

Література

1. Біомедичні оптико-електронні інформаційні системи і апарати. Ч.3 – Лазерні біомедичні системи / В.П.Кожем'яко, З.Ю.Готра, С.В.Павлов, З.М.Микитюк, О.З.Готра – Вінниця: ВДТУ, 2000.- 143 с.
2. Пат. 89226 Україна, МПК7 А61N5/06. Спосіб опромінення пухлини методом лазерного сканування в фотодинамічній терапії / Холін В.В., Попов В.Д., Войцехович В.С., Гамалія М.Ф., Чепурна О.М.; заявник та патентовласник Холін В.В. – № U 2013 13795; заявл. 27.11.2013; опубл. 10.04.2014, Бюл. № 7.
3. Чепурна О. М. Розробка і апробація нового варіанту методу фотодинамічної терапії пухлин із застосуванням лазерного скануючого пристрою / О. М. Чепурна, І. О. Штонь, В. С. Войцехович, В. В. Холін, Рональд У. Ровіра, О. С. Камінський, М. Ф. Гамалія // Оптико-електронні інформаційно-енергетичні технології. - 2014. - № 1. - С. 128-131.
4. Фізичні основи біомедичної оптики: монографія / [Павлов С. В., Кожем'яко В. П., Козловська Т. І.]. – Вінниця : ВНТУ, 2010. – 152 с. – ISBN 978-966-641-383-6.
5. Agostinis P. Photodynamic therapy of cancer: an update / P. Agostinis, K. Berg, K.A. Cengel, T.H. Foster, A.W. Girotti et al.// CA Cancer J Clin – 2011 - Vol. 61, №4 - P. 250–281.
6. Allison R.R. Oncologic photodynamic therapy: clinical strategies that modulate mechanisms of action / R.R. Allison, K. Moghissi // Photodiagnosis Photodyn. Ther. – 2006. – Vol. 10, № 4. – P. 331-341.
7. Allison R.R. Photodynamic therapy: oncologic horizons / R.R. Allison // Future Oncol. – 2014 - Vol. 210, №1. – P.123 – 142.
8. Dolmans D.E. Photodynamic therapy for cancer/ D.E. Dolmans, D. Fukumura, R.K. Jain // Nat Rev Cancer. – 2003. - №3.- P.380 – 387.
9. Foster T.H. Analysis of photochemical oxygen consumption effects in photodynamic therapy / T.H.Foster, S.L.Gibson, L. Gao, R.Hilf // Proc. SPIE - 1992 - Vol.1645. – P.104 – 114.
10. Henderson W. Fluence rate as a modulator of PDT mechanisms / W.Henderson, T.M.Bush, J.W.Snyder // Lasers Surg. Med. – 2006 - Vol.38 - P.489 – 493.
11. Krasnovskyj A.A. Photodynamic action and singlet oxygen. // Biophysics – 2004 - Vol. 49, №2. - P. 305 – 321.
12. Lisenko S. A. Method for estimating optimal spectral and energy parameters of laser irradiation in photodynamic therapy of biological tissue / S. A. Lisenko, M. M. Kugeiko // Quantum Electron – 2015 - Vol. 45, №4 - P.358 – 365.
13. Mroz P. Photodynamic Therapy of Tumors Can Lead to Development of Systemic Antigen-Specific Immune Response / A. Szokalska; M. X. Wu; M. R. Hamblin // Plos One – 2010 – Vol.5, №12 – e15194
14. Rkein A.M. Photodynamic therapy / A.M. Rkein, D.M. Ozog // Dermatol Clin. – 2014 - Vol. 32, №3 - P. 415 – 425.
15. Yoon I. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy / I.Yoon, J.Z. Li, Y.K.Shim // Clin Endosc. – 2013 – Vol.46, №1 – P. 7 – 23.

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ПУТЕМ ИЗБИРАТЕЛЬНОГО СКАНИРОВАНИЯ ОПУХОЛИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

¹Чепурна О.Н., ²Штонь И.А., ³Павлов С.В., ³Тужанский С.Е., ⁴Утрерас А., ⁵Войцехович В.С.,
⁶Попов В.Д., ¹Каптановский Е.В., ¹Холін В.В., ²Гамалія Н.Ф.

¹ЧМПП «Фотоника Плюс», Черкассы, Украина

²Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии
имени Р.Е.Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина

³Винницкий национальный технический университет, Винница, Украина
⁴Escuela Politécnica Nacional, Кито, Эквадор

⁵Институт физики НАН Украины, Киев, Украина

⁶Государственный научно-исследовательский институт физической культуры и спорта, Киев,
Украина

В работе сравнивается проведение фотодинамической терапии с использованием традиционного непрерывного облучения опухоли и применения разработанного авторами метода избирательного лазерного сканирования. Предложенный метод заключается в облучении опухоли лучом малой мощности и малого поперечного сечения, который перемещается по выбранной зоне с определенной задержкой в каждой точке, причем сканирование участков опухоли происходит лишь при условии наличия в них флуоресценции.

В результате проведенных экспериментов продемонстрирована перспективность разработанного варианта фотодинамической терапии с использованием сканирующего лазера для выборочного флуоресцентно корректированного облучения опухоли, который обеспечивает подавление роста опухолей на уровне с традиционным методом, но при значительно меньшей дозе облучения.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, лазерное сканирование, флуоресцентная диагностика

***IMPROVING THE EFFICIENCY OF PHOTODYNAMIC THERAPY BY SELECTIVE TUMOR
SCANNING, GUIDED BY TISSUE FLUORESCENCE***

¹*Chepurna O.M.,* ²*Shton I.O.,* ³*Pavlov S.V.,* ³*Tuzansky S.E.,* ⁴*Utreras A.,* ⁵*Voytsehovich V.S.,* ⁶*Popov V.D.,*
¹*Kaptanovsky E.V.,* ¹*Holin V.V.,* ²*Gamaleia N.F.*

¹*PSME «Fotonika Plus», Cherkassy*

²*Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of NAS of Ukraine, Kyiv*

³*Vinnitsia National Technical University*

⁴*Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador*

⁵*Institute of Physics of NAS of Ukraine, Kyiv*

⁶*State Scientific Research Institute of Physical Culture and Sports, Kyiv, Ukraine*

In this work we compare the effectiveness of photodynamic therapy with the use of conventional continuous laser irradiation of tumors and newly developed selective laser-scanning method. The proposed method consists in tumor irradiation with a beam of low power and small cross section, which moves through the selected area with a certain delay at each point. The scanning is performed only in the tumor zones with detected fluorescence.

Comparison of the developed PDT version with the traditional method in experiments on photodynamic treatment of mice with lung carcinomas showed that the proposed method is capable to produce an equal tumor-inhibiting effect under much lower doses of laser irradiation.

Keywords: *photodynamic therapy, laser scanning, fluorescent diagnostics*