

Л.В. Жорина, Г.Н. Змиевской, И.П. Семчук, В.В. Филатов

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВРЕМЕННЫХ ПАРАМЕТРОВ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ХАРАКТЕРИСТИКИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Аннотация

Проведены исследования дозовых характеристик фотосенсибилизатора Радахлорин при использовании как непрерывного, так и импульсного режимов лазерного облучения (лазер типа «Лахта-Милон») при наблюдении фотодинамического эффекта на взвеси эритроцитов в физрастворе при различных концентрациях. Сопоставлены результаты эксперимента и модельного расчета. Показано, что максимальная скорость гибели сенсibilизированных клеток имеет место при непрерывном режиме облучения; получено качественное соответствие результатов расчета и эксперимента. Обнаружено, что при определенных параметрах импульсного облучения пороговая доза отсутствует.

Метод фотодинамического воздействия (ФДВ) достаточно распространен в клинической практике. Однако в рекомендациях для медиков по применению фотосенсибилизаторов (ФС) и режиму облучения часто даются, на наш взгляд, избыточные дозы лекарств и дозы облучения. Первое, вероятно, связано с тем, что уровень накопления ФС *in vivo* изучен недостаточно, а второе – с тем, что в распоряжении медиков оказываются различные типы облучателей – от широкополосных до монохроматических и от работающих в непрерывном режиме до импульсных. Таким образом, назначение избыточных доз может быть обусловлено как стремлением врачей с гарантией уничтожить патологические образования, так и отсутствием обоснованных рекомендаций к выбору доз облучения. Следствием такой методики зачастую оказывается необходимость длительного реабилитационного периода, когда пациента лечат уже не от основного заболевания, а от последствий самого лечения.

Клиническое применение ФДВ с использованием импульсных лазеров расширяется, однако цитотоксическое действие такого режима облучения еще недостаточно выяснено. Так, авторы работы [1] использовали фотосенсибилизатор второго поколения PAD-S31 и сравнили последствия облучения клеток карциномы почек мышей непрерывным излучением лазерного диода и наносекундного лазера Nd:YAG на третьей гармонике. Из этих наблюдений был сделан вывод, что эффективность ФДВ при использовании импульсного лазера существенно зависит от плотности мощности и частоты повторения импульсов.

В экспериментах с тем же ФС и на тех же клетках [2] показано, что при одной и той же дозе облучения на длине волны 670 нм цитотоксический эффект ФДВ при использовании импульсного режима с частотой 30 Гц значительно меньше, чем при непрерывном облучении, причем результат ФДВ существенно зависит от частоты повторения импульсов [3], [4]. Целью нашей работы явилось исследование последствий различных режимов лазерного облучения при ФДВ как в модельном представлении, так и экспериментально.

Расчетная модель

Механизм повреждения клеток при ФДВ в настоящее время однозначно не установлен. По-видимому, главным «поражающим агентом» является синглетный кислород, появление которого после оптического воздействия на фотосенсибилизированные клетки установлено экспериментально. Повреждающий эффект во всех случаях аналогичен: происходит окисление некоторого существенного для функционирования клетки субстрата. Поэтому в основе модели поражения клеток при ФДВ [5] лежит предположение о том, что скорость повреждения клеток пропорциональна доле окисленного синглетным кислородом субстрата. С другой стороны, можно предположить, что скорость репараций повреждений пропорциональна доле неокисленного субстрата. При этом существует достаточно высокая вероятность необратимой гибели поврежденных клеток.

Блок-схема расчетной модели представлена на рис. 1, где буквами α , β , γ обозначены удельные скорости переходов клеток из соответствующих состояний [5].

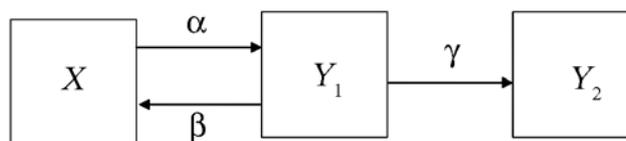


Рис. 1. Блок-схема взаимных переходов клеток из блоков: неповрежденных X , поврежденных Y_1 и необратимо погибших Y_2 ; α , β , γ – удельные скорости перехода

Пусть вначале биообъект имел X_0 клеток, а поврежденные клетки отсутствовали. Количество живых клеток уменьшается в связи с повреждением при ФДВ и увеличивается в результате работы системы репарации. Количество поврежденных клеток Y_1 прирастает за счет ФДВ и уменьшается, восстанавливаясь или погибая. Количество необратимо погибших клеток Y_2 возрастает от нуля за счет поврежденных. Система динамических уравнений для количества выживших X , поврежденных Y_1 и погибших Y_2 клеток будет тогда иметь вид [5]

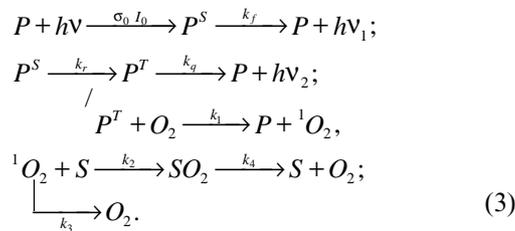
$$\begin{cases} \frac{dX}{dt} = -\alpha X + \beta Y_1, & X(0) = X_0; \\ \frac{dY_1}{dt} = \alpha X - (\beta + \gamma) Y_1, & Y_1(0) = 0; \\ \frac{dY_2}{dt} = \gamma Y_1, & Y_2(0) = 0. \end{cases} \quad (1)$$

Если обозначить долю неокисленного субстрата через z , то согласно высказанным гипотезам имеем

$$\alpha = \alpha_0 (1 - z); \quad \beta = \beta_0 z. \quad (2)$$

Зависимость z от параметров ФДВ (интенсивности излучения, концентрации накопленного клеткой ФС и др.) можно найти, рассмотрев последовательность событий, происходящих в сенсibilизированной клетке после оптического воздействия.

Упрощенную схему фотохимических процессов в сенсibilизированной клетке после поглощения кванта $h\nu$ можно представить следующим образом [5]:



Здесь P , P^S и P^T – соответственно невозбужденное, синглетное и триплетное возбужденные состояния ФС; O_2 и 1O_2 – основное и синглетное возбужденные состояния молекулы кислорода; σ_0 – эффективное сечение поглощения кванта $h\nu$; I_0 – интенсивность падающего излучения; k_f и k_q – константы люминесцентного тушения синглетного и триплетного состояний ФС; k_r – константа скорости интерконверсии. На схеме представлены также реакции образования синглетного кислорода 1O_2 (константа образования k_1) и дезактивация его путем окисления субстрата S (со скоростью k_2) или другими путями (со скоростью k_3). Учтен также возможный механизм восстановления окисленного субстрата со скоростью k_4 . Значения всех констант, принципиально важные для описания процесса ФДВ, берутся частично из эксперимента, частично из литературных данных [5], [6].

Схеме (3) будет соответствовать система кинетических уравнений для молярных концентраций соответствующих веществ:

$$\begin{cases} \frac{d[P^S]}{dt} = \sigma_0 I_0 [P] - (k_f + k_r) [P^S]; \\ \frac{d[P^T]}{dt} = k_r [P^S] - [P^T] (k_q + k_1 [O_2]); \\ \frac{d[{}^1O_2]}{dt} = k_1 [P^T] [O_2] - [{}^1O_2] (k_3 + k_2 [S]); \\ \frac{d[S]}{dt} = -k_2 [{}^1O_2] [S] + k_4 [SO_2]. \end{cases} \quad (4)$$

Первые три уравнения, по оценке Н.В. Степановой [5], являются быстрыми по сравнению с последним. Тогда, при использовании квазистационарного приближения, а также условия отсутствия кислородного голодания ($k_1 [O_2] \gg k_q$), получаем выражение для концентрации синглетного кислорода

$$[{}^1O_2] = \frac{\sigma_0 I_0 \Phi [P]}{k_3 + k_2 [S]}, \quad (5)$$

где $\Phi = k_r / (k_r + k_q)$ – квантовый выход интерконверсии ФС.

Обозначив суммарную концентрацию субстрата $[S_0] = [S] + [SO_2]$ и введя безразмерные величины и параметры

$$z = \frac{[S]}{[S_0]}; \quad G = \frac{\sigma_0 I_0 \Phi [P]}{k_4}; \quad K = \frac{k_3}{k_4 [S_0]}, \quad (6)$$

получим уравнение динамики доли неокисленного субстрата z

$$\frac{dz}{dt} = -k_4 \left[G \frac{z}{K+z} - (1-z) \right]. \quad (7)$$

Уравнение (7) вместе с системой (1) образуют замкнутую динамическую модель поражения клеток при ФДВ. Заметим, что константа G пропорциональна, согласно определению (6), концентрации ФС в клетке $[P]$ и интенсивности излучения I_0 . Очевидно, что G будет отлично от нуля только на время экспозиции T_0 , т. е. мы должны положить $G = 0$ при $t > T_0$.

Введем безразмерные переменные и параметры для системы уравнений (1), а также уравнений (2), (7):

$$\begin{aligned} x &= \frac{X}{X_0}; \quad y_1 = \frac{Y_1}{X_0}; \quad y_2 = \frac{Y_2}{X_0}; \quad A = \frac{\alpha_0}{k_4}; \\ B &= \frac{\beta_0}{k_4}; \quad C = \frac{\gamma}{k_4}; \quad \tau = tk_4; \quad \tau_0 = T_0 k_4. \end{aligned} \quad (8)$$

Окончательно модель фотодинамического поражения клеток выражается системой трех дифференциальных уравнений [последнее уравнение в системе (1) заменяем условием сохранения числа клеток $X + Y_1 + Y_2 = X_0$]

$$\begin{cases} \frac{dz}{d\tau} = -\frac{Gz}{K+z} [1 - \theta(\tau - \tau_0)] + (1-z); \\ \theta(\tau - \tau_0) = \begin{cases} 0, & \tau \leq \tau_0; \\ 1, & \tau \geq \tau_0; \end{cases} \\ \frac{dx}{d\tau} = -A(1-z)x + Bzy_1; \\ \frac{dy_1}{d\tau} = A(1-z)x - (Bz + C)y_1, \quad y_2 = 1 - x - y_1; \\ z(0) = x(0) = 1, \quad y_1(0) = y_2(0) = 0. \end{cases} \quad (9)$$

Для расчета динамики гибели клеток использована система уравнений (9), значения констант в которой установлены из экспериментальных дан-

ных [5], [7] для ФС Радахлорин [8]: $A = 0,45$; $B = 0,1$; $C = 0,1$; $K = 1$; $k_4 = 2,22 \cdot 10^{-3}$; $P = 4,228 \cdot 10^{-3}$ – в 20 мг Радахлорина $\sigma_0 = 2$ и $\varphi = 0,96$.

В качестве исследуемых параметров рассматривались различные режимы лазерного воздействия (моно- или многоимпульсный режим облучения) и формы импульсов при постоянной дозе облучения (прямоугольный, треугольный с крутым передним фронтом, треугольный с крутым задним фронтом, гауссов импульс). Моноимпульсный режим интерпретировался нами как режим непрерывного облучения. Программирование различной формы импульсов проводилось при соблюдении главного критерия – сохранении одинаковой суммарной экспозиционной дозы.

В результате расчета были получены показатели эффективности лазерного воздействия на объект, представленные в графической форме на рис. 2, 3.

Выводы из расчетов

Результаты расчета, проведенного согласно представленной математической модели на основе введенных нами констант, позволяют утверждать следующее:

- 1) с подачей светового импульса доля неокисленного субстрата (кривая z на рис. 2) резко падает до постоянного значения (около 0,275 от общего количества субстрата), а доля окисленного субстрата, готового к реакции, соответственно резко возрастает независимо от характера лазерного воздействия;
- 2) моноимпульс вызывает максимальную скорость гибели клеток (рис. 2, кривая y_2), примерно в 1,4 раза большую по сравнению с 2-импульсной схемой

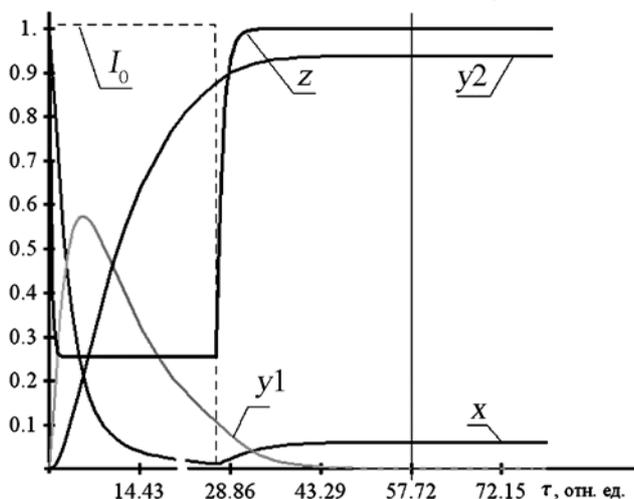


Рис. 2. Показатели эффективности действия лазерного излучения при моноимпульсном режиме облучения, соответствующем работе лазера в непрерывном режиме: x – относительное количество выживших клеток; y_1 – относительное количество поврежденных клеток; y_2 – относительное количество погибших клеток; z – доля неокисленного субстрата; I_0 – интенсивность облучения; τ – время в относительных единицах

- 3) увеличение частоты импульсов (рис. 3) при сохранении величины дозы облучения приводит к повышению уровня относительного количества погибших клеток, но увеличивает длительность процесса. Так, при переходе от моноимпульсной схемы ФДВ к 8-импульсной наблюдается увеличение относительного количества погибших клеток примерно на 5 %. Длительность же процесса увеличивается почти вдвое;
- 4) по окончании ФДВ количество поврежденных клеток асимптотически стремится к нулю независимо от частоты импульсов.

Из результатов исследования влияния формы лазерного импульса на эффективность воздействия на биообъект следует, что:

- 1) прямоугольный моноимпульс характеризуется достаточно высокой скоростью протекания процесса и эффективностью поражения патологических клеток на уровне 94...95 %;
- 2) с переходом от прямоугольной к треугольной форме импульсов эффективность ФДВ повышается на 3,5 % и достигает значения 98 %, но при этом происходит увеличение продолжительности процедуры почти вдвое, что в практических условиях может быть признано недопустимым;
- 3) при использовании треугольного импульса с крутым передним фронтом скорость поражения клеток выше, чем при использовании треугольного импульса с крутым задним фронтом, при этом эффективность и время воздействия одинаковы;
- 4) при использовании гауссовых импульсов эффективность фотодинамического лечения мини-

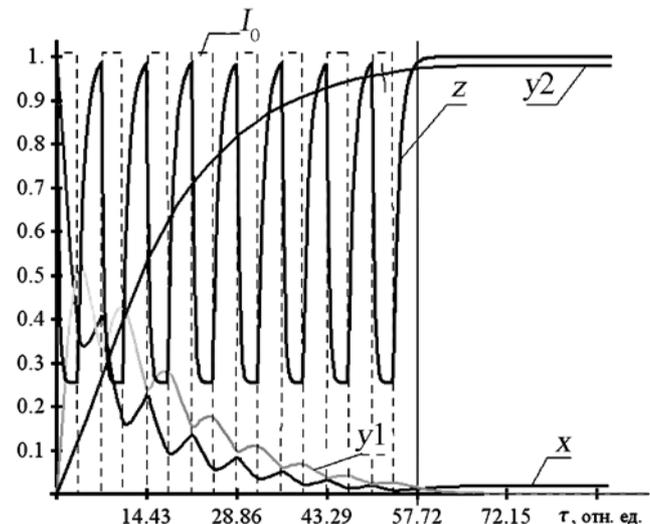


Рис. 3. Показатели эффективности действия лазерного излучения при многоимпульсном режиме облучения: x – относительное количество выживших клеток; y_1 – относительное количество поврежденных клеток; y_2 – относительное количество погибших клеток; z – доля неокисленного субстрата; I_0 – интенсивность облучения; τ – время в относительных единицах

мальна, и для практического применения этот случай не может быть рекомендован;

- 5) с увеличением количества импульсов их форма имеет все меньшее значение для эффективности проводимого лечения, а влияние их формы на эффективность ФДВ становится неочевидным.

Эксперимент

Результаты, полученные на основе исследования математической модели (9), сравнивали с результатами экспериментов по выявлению зависимостей выживаемости эритроцитов при различных типах облучения от дозы.

Материалы и методы

Для экспериментов использовали ФС Радахлорин® (модифицированная природная смесь хлоринов из микроводоросли рода *Spirulina*, около 70...90 % которых составляет хлорин е6), предоставленный компанией ООО «Рада-Фарма» (Россия). Первоначально его разводили согласно инструкции компании «Рада-Фарма» [8] в 0,9%-ном растворе натрия хлорида (физрастворе), затем полученный раствор разводили в 2000 раз в смеси крови и физраствора с пропусканием около 20 %. Использовали образец крови с добавлением гепарин-натрия для стабилизации свойств взвеси эритроцитов в ходе проводимой серии экспериментов (каждая серия измерений проводилась в течение одного рабочего дня в аналогичных условиях).

Кровь можно рассматривать как суспензию (взвесь) эритроцитов в практически прозрачной среде [9]. Изменение формы эритроцита приводит к изменению оптических характеристик суспензии. Суммарная экстинкция оказывается минимальной при полной сферуляции эритроцитов. Полная же гемолизация крови приводит к резкому падению оптической плотности. То, что в результате ФДВ кровь из классической мутной среды превращается в раствор, близкий к коллоидному, взято за основу экспериментальной методики. Экстинкцию суспензии эритроцитов измеряли на фотоколориметре

КФК-2. Прибор имеет шкалу для определения пропускания T , которое связано с экстинкцией и оптической плотностью D по формуле $-\lg T = D = c\epsilon L$, где c – концентрация поглощающего вещества; ϵ – коэффициент молярной экстинкции; L – толщина образца. Согласно сказанному выше, увеличение пропускания раствора эритроцитов будет означать увеличение количества погибших клеток.

При проведении эксперимента использовали несколько проб: контрольную (помещенную в темноту) и облучаемую пробы ФС + эритроциты. Процедуру накопления ФС в клетках не проводили. Облучение проб происходило в течение некоторого отрезка времени, затем кратковременно измеряли пропускание пробы, снова проводили облучение этой же пробы и вновь измеряли пропускание и т. д.

В качестве источника света использовали диодный лазер с длиной волны излучения (662 ± 5) %, выходной мощностью от 100 мВт до 1 Вт, способный работать как в непрерывном, так и в импульсном режимах облучения с прямоугольной формой импульса [10]. При расчете дозы облучения W (в джоулях) учитывали мощность излучателя I , время облучения t , площадь засветки S , потери мощности на границе стекло-воздух $R \approx 4$ %, пропускание T образца в момент облучения. Окончательная расчетная формула для W в соответствии с конфигурацией экспериментальной установки (см. рис. 4) имеет вид $W = ItS(1 - R)(1 - T)[1 - T(1 - R)^2]$. Визуальный контроль состояния эритроцитов проводили с помощью поляризационно-интерференционного микроскопа типа «BIOLAR», позволяющего наблюдать культуру эритроцитов в условиях, максимально приближенных к естественным.

Результаты измерений и их обсуждение

Контроль пропускания образца крови с Радахлорином, помещенного в темноту, не показал значимых изменений в течение 3,5 ч. Аналогичный контроль состояния образца крови проводился через микроскоп, при этом гемолиза в контрольном

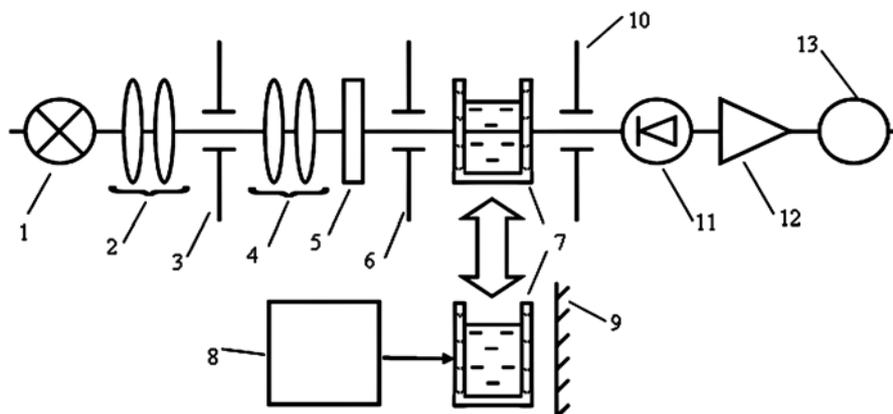


Рис. 4. Схема экспериментальной установки для наблюдения ФДЭ на взвеси эритроцитов: 1 – источник света (лампа накаливания); 2 – конденсор; 3, 6, 10 – диафрагмы; 4 – коллиматор; 5 – интерференционный фильтр; 7 – кювета с исследуемым жидким образцом (сенсibilизированная взвесь эритроцитов); 8 – источник света для получения ФДЭ (лазер или фотоматричный облучатель); 9 – зеркало; 11 – фотоприемное устройство; 12 – усилитель постоянного тока; 13 – измерительный прибор

(темновом) образце также не наблюдалось. Это означает, что присутствие ФС в темновых условиях не влияет на осмотическое давление внутри эритроцита, т. е. на его мембранный транспорт.

Для сравнения эффективности ФДВ проводилась серия экспериментов при воздействии непрерывного и импульсного излучения.

Дозовая кривая для Радахлорина при облучении лазерным аппаратом в режиме непрерывного излучения на уровне мощности 13,3 мВт представлена на рис. 5 и имеет пороговое значение дозы облучения для начала фотодинамического эффекта (ФДЭ) около 23 Дж, значение дозы достижения полной гибели клеток – около 43 Дж.

В импульсном режиме при уровне мощности 80 мВт сравнивали два типа с различной скважностью: с длительностью импульса 900 мс и интервалом между импульсами 100 мс и с длительностью импульса 100 мс и интервалом между импульсами 900 мс. При первом режиме облучения существует пороговая доза начала ФДЭ, а при втором – пороговая доза начала ФДЭ отсутствует. При этом в первом режиме пороговая доза имеет значение около 60 Дж, значение дозы достижения полной гибели клеток – около 100 Дж. Значение дозы достижения полной гибели клеток во втором режиме – около 28 Дж.

Выводы

Согласно расчетам по математической модели, непрерывный режим облучения вызывает максимальную скорость гибели клеток. Импульсный режим приводит к повышению относительного количества погибших клеток, но существенно увеличивает длительность процесса.

Присутствие Радахлорина в суспензии эритроцитов в темновых условиях не вызывает их разрушения.

Экспериментальные результаты применения импульсного режима облучения для ФДВ существенно отличаются от результатов ФДВ в непрерывном режиме. Дозовая кривая для Радахлорина при облучении в режиме непрерывного излучения имеет пороговое значение дозы облучения для начала ФДЭ около 23 Дж, значение дозы достижения полной гибели клеток – около 43 Дж. В режиме облучения с длительностью импульса 900 мс и интервалом между импульсами 100 мс пороговая доза имеет значение около 60 Дж, значение дозы достижения полной гибели клеток – около 100 Дж. Увеличение дозы достижения полной гибели клеток при ФДВ в этом импульсном режиме качественно совпадает с результатами расчетов математической модели.

Обнаружены также различия в проявлении ФДЭ для различных режимов импульсного облучения. В режиме облучения с длительностью импульса 100 мс и интервалом между импульсами 900 мс пороговая доза начала ФДЭ отсутствовала.

Список литературы:

1. Seguchi K., Kawauchi S., Morimoto Y. et al. Critical parameters in the cytotoxicity of photodynamic therapy using a pulsed laser // *Lasers Med. Sci.* 2002. Vol. 17 (4). PP. 265-271.
2. Kawauchi S., Morimoto Y., Sato S. et al. Differences between cytotoxicity in photodynamic therapy using a pulsed laser and a continuous wave laser: Study of oxygen consumption and photobleaching // *Lasers Med. Sci.* 2004. Vol. 18. № 4. PP. 179-183.
3. Kawauchi S., Sato S., Morimoto Y. et al. Intracellular kinetics of ATX-S10Na(II) and its correlation with photochemical reaction dynamics during a pulsed photosensitization process: Effect of pulse repetition rate // *J. Biomed Opt.* 2006. Vol. 11 (1). P. 14005.
4. Kawauchi S., Sato S., Morimoto Y. et al. Correlation between oxygen consumption and photobleaching during in vitro photodynamic treatment with ATX-S10.Na(II) using pulsed light excitation: Dependence of pulse repetition rate and irradiation time // *Photochem Photobiol.* 2004. Vol. 80 (2). PP. 216-223.
5. Черняева Е.Б., Степанова Н.В., Литинская Л.Л. Механизмы взаимодействия фотосенсибилизаторов с клетками (вклад лазерных и оптических методов исследования). В кн.: *Итоги науки и техники.* – М.: ВИНТИ, 1990. С. 136-224.
6. Волькенштейн М.В. Молекулярная биофизика. Сер. «Физика жизненных процессов». – М.: Наука, 1975. 616 с.
7. Решетников А.В. Фотосенсибилизаторы в современной клинической практике (обзор) / Материалы научно-практической конференции оториноларингологов ЦФО РФ «Лазерные технологии в оториноларингологии». Под ред. В.Г. Зенгера и А.Н. Наседкина. Тула, 26-28 сентября, 2007 г. / <http://www.qualitech.org/index.phtml?tid=194>.
8. Сайт компании ООО «РАДА-ФАРМА®» / <http://www.radapharma.ru>.
9. Современные методы биофизических исследований: практикум по биофизике / Под ред. А.Б. Рубина. – М.: Высшая школа, 1988. 358 с.
10. Аппарат лазерный «Милон Лахта», модель 662-1. Техническое описание и инструкция по эксплуатации ТУ 9444-003-57906795-2003, регистрационное удостоверение ФС по надзору в сфере ЗисР № ФС 02262003/2932-06.

Лариса Валерьевна Жорина,
канд. физ.-мат. наук, доцент,
Григорий Николаевич Змиевской,
канд. физ.-мат. наук, доцент,
Иван Павлович Семчук,
студент,
Вадим Викторович Филатов,
студент,
МГТУ им. Н.Э. Баумана,
г. Москва,
e-mail: larisa7777@li.ru