

**ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОМ
НА ОСНОВЕ ТРИКАРБОЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ
С ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ НА МОДЕЛИ ПЕРЕВИВНЫХ
ОПУХОЛЕЙ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ**

*М.П. Самцов¹, Д.С. Тарасов¹, Л.С. Ляшенко²,
П.Т. Петров³, Е.Н. Александрова⁴, Ю.П. Истомин⁴, Е.С. Воронай²*

¹НИИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ, Минск, 220045 Беларусь;

²Белорусский государственный университет, Минск, 220030 Беларусь e-mail: Voronay@bsu.by

³Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

⁴РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь

Проведены сравнительные исследования эффективности фотодинамической терапии в опытах «in vitro» и «in vivo» при использовании для облучения полупроводникового лазера с длиной волны 740 нм и светодиод с длиной волны в максимуме излучения 780 нм. Установлено, что несмотря на близкие для биоткани по величине значения пропускания на указанных длинах волн глубина некроза для светодиодного источника примерно в 1,5 раза больше.

Введение. Эффективность фотодинамической терапии (ФДТ) злокачественных опухолей в первую очередь определяется использованным фотосенсибилизатором, а также выбранной методикой и характеристиками аппаратных средств для осуществления ФДТ. Как правило, в качестве источника света используются лазеры с длиной волны излучения в области максимума поглощения фотосенсибилизатора. Вместе с тем появились мощные светодиоды, с помощью которых можно обеспечивать сравнимую с лазерами плотность мощности излучения на поверхности опухоли. Для поверхностных локализаций опухолей такие источники света обладают преимуществами по сравнению с лазерами, поскольку имеют значительно более низкую стоимость. Вместе с тем при разработке аппаратуры и регламента для использования в клинике необходимо сопоставление эффективности процесса ФДТ для различных используемых источников.

Объекты и методика эксперимента. В данной работе проведено сравнение результатов двух сеансов фототерапии злокачественных опухолей у подопытных животных при использовании лазерного и светодиодного источников света. В качестве источников излучения использован полупроводниковый лазер с длиной волны 740 нм и максимальной мощностью излучения 1 Вт, и светодиод с длиной волны в максимуме излучения 780 нм и световой мощностью до 1 Вт. В качестве фотосенсибилизатора использован трикарбоцианиновый краситель с полиэтиленгликолем [1, 2]. В экспериментах in vivo эффективность фотохимиотерапевтического действия красителя оценивалась по глубине повреждения солидных опухолей лабораторных животных. При расчете эффективной поглощенной световой дозы, учитывались поглощение красителя в модельных средах, в частности, в клетках HeLa. Для регистрации распределения интенсивности излучения по сечению пучка применялась камера компании ORMINS (Беларусь). Исследования проводили на монослой опухолевых клеток HeLa (плоскоклеточный рак шейки матки человека), который выращен в питательной среде 199 с добавлением 10% сыворотки крови телят и 100 мг/мл канамицина. По завершении фотооблучения флаконы выдерживали 20 часов в термостате при 37 °С в темноте. Затем монослой клеток обрабатывали 0,02%-м раствором Версена и проводили подсчет количества клеток с помощью камеры Горяева. Долю живых клеток в опытных группах определяли по отношению к контролю. На каждую точку использовали по 3 флакона с клетками. В качестве экспериментальных модельных систем in vivo использованы солидные перевиваемые опухоли белых беспородных крыс – саркома М-1 (Са М-1). Исследования проводили спустя 9–10 суток после перевивки Са М-1. В каждой контрольной и опытной группе использовали по не менее 5 крыс. Для оценки глубины некрозов в опухолях через 24 часа после проведения сеанса фотодинамической

терапии крысам внутривенно вводился 0,6% раствор синьки Эванса (1 мл/100 г массы тела животного). Затем через 2 часа животные были выведены из эксперимента с использованием общепринятых методов эвтаназии (хлороформ), опухоли иссечены, фиксированы в 10% растворе формалина в течение 2 часов и заморожены. После этого были сделаны гистотопографические срезы опухолей (2 мм толщиной по диаметру опухоли) с последующей фиксацией их изображений с помощью фотокамеры. Мощность падающего на образцы света определялась с помощью измерителя мощности LM-2. Спектры поглощения регистрировались с помощью спектрофотометра PV 1251A фирмы Solar. Флуоресценция растворов красителей исследована на спектрофлуориметре Fluorolog. Спектры флуоресценции красителя *in vivo* регистрировалась с помощью спектрометрического комплекса, разработанного в НИИ ПФП им. А.Н. Севченко. Подвод возбуждающего излучения ($\lambda=683$ нм) к образцу и сбор света флуоресценции в спектрометрическом комплексе осуществлялся с посредством световода.

Результаты и их обсуждение. Клетки HeLa в спектральном диапазоне 600-900 нм без введения фотосенсибилизатора практически не поглощают, оптическая плотность суспензии содержащей порядка $2 \cdot 10^6$ клеток в 1 см^3 не превышает $D < 0,006$. При этом клеточная культура оказалась средой, в которой отсутствуют различия в пропускании в спектральной области использованных источников света. Для создания одинаковой скорости расхода кислорода и красителя в процессе фотовоздействия для каждой из использованных длин волн излучения выполнены условия, обеспечивающие поглощение фотосенсибилизатором в биологических структурах одинакового количества квантов света в единицу времени. Это достигалось выбором для каждого источника своей плотности мощности падающего на образец света. При этом учитывалось, что количество поглощенных фотосенсибилизатором фотонов пропорционально $(1-T)$, где T – пропускание образца. Соотношение величин плотности мощности определялось из спектра поглощения полиметинового красителя в клетках HeLa на длинах волн 668 нм, 740 нм и 780 нм по значениям $(1-T)$. Основанием для использования такого соотношения *in vivo* является то, что спектры флуоресценции фотосенсибилизатора в клеточной культуре HeLa совпадает по положению и форме со спектром в тканях *in vivo*. Из полученных данных рассчитывалось соответствие плотности мощности падающего излучения для $\lambda=740$ нм и на краю спектра поглощения, которые обеспечивают одинаковое число поглощенных квантов света в единице объема образца в единицу времени. В связи с этим условием, при котором обеспечивается одинаковое число поглощенных фотосенсибилизатором квантов света в единицу времени, для длины волны 668 нм была использована в 2.8 раза, а для 780 нм в 2.3 раза большая плотность мощности излучения, по сравнению с $\lambda=740$ нм (это с учетом различий энергии фотонов для использованных источников света). Для каждого из использованных источников света при таких условиях фотовоздействия при одинаковом интервале времени освещения обеспечивалась одинаковая эффективная экспозиционная доза света. При таких условиях фотовоздействия доля погибших клеток HeLa для всех использованных источников практически одинакова. В процессе проведения сеансов фотохимиотерапии на перевивных опухолях экспериментальных животных использовалось такое же соотношение величин плотности мощности падающего излучения при использовались эти же источники света. Проведено исследование однородности пучка падающего на образец света по сечению пучка, а также влияние на степень и эффективность повреждения опухолевых тканей в результате ФДТ. Для этого анализировалось зарегистрированное с помощью камера компании ORMINS изображение матового экрана помещенного в пучке света на разных расстояниях от лазера. Оказалось, что распределение излучения по сечению светового пучка полупроводникового лазера $\lambda=740$ нм без дополнительных оптических устройств является в значительной степени неоднородным. В различных точках сечения светового пятна полупроводникового лазера освещенность

различается на один – два порядка. Отклонение огибающей от средней по 10 точкам достигает 55%, среднее квадратичное отклонение составляет 18%. Такая высокая неоднородность лазерного пучка может привести к неравномерному фотовоздействию во время сеанса фотодинамической терапии, и как следствие фрагментарному повреждению опухоли. Для повышения однородности на выходе из лазера установлен рассеиватель излучения. Наиболее эффективным оказалось использование в качестве рассеивателя линзового раstra. При этом светораспределение в силу высокой контрастности освещающих пучков имеет вид подобный светораспределению в спектре Фраунгофера дифракционной решетки, сглаженного за счет конечных размеров источника света. Огибающая светораспределения в идеальном случае должна иметь вид трапеции. Использование линзового рассеивателя позволило уменьшить перепады интенсивности соседних тачек в сечении пучка более чем в пять раз, т.е. существенно снизило разброс интенсивности по сечению. Так отношение интенсивности наиболее освещенных областей к интенсивности наименее освещенных не превысило 1,6. Отклонение огибающей от средней не превышает 27%, а среднее квадратичное отклонение уменьшилось до 8 %. При использовании такого рассеивателя результативность сеансов фотохимиотерапевтического воздействия заметно улучшилось. Так в случае использования одинаковой экспозиционной дозы света - 200 Дж/см² при средней плотности мощности - 150 мВт/см² при проведении сеанса ФДТ с использованием лазера с установленным рассеивателем получены некрозы с глубиной повреждения до 2 см, а без рассеивателя только 5 мм. В случае светодиодного источника с линзовым растровым рассеивателем профиль излучения имеет достаточно гладкую колоколообразную форму. В результате проведения сеанса фотохимиотерапии, при использовании такой же как для лазера эффективной экспозиционной дозы света с $\lambda=780$ нм - 200 Дж/см² и средней плотностью мощности 150 мВт/см², по всей площади и глубине засветки опухолевых узлов некрозы тканей были сплошными, площадь некроза опухолей составила 76-89%. Средняя глубина повреждения перевиваемых опухолей Са М-1 крыс при воздействии светом с длиной волны 780 нм в 1,5 раза больше по сравнению с длиной волны 740 нм и в 2 раза больше по сравнению с фотовоздействием с длиной волны 668 нм. То есть, при фотовоздействии в указанном спектральном диапазоне наблюдается рост глубины повреждения опухолевых тканей с увеличением длины волны использованного источника излучения. Коэффициенты поглощения биоткани на длинах волн 780 и 740 нм имеют достаточно близкие значения, вместе с тем наблюдаются существенные, до полутора раз, различия в глубине некроза при фотовоздействии источниками света с длинами волн 780 и 740 нм.

Заключение. На основании проведенных сравнительных исследований эффективности фотодинамической при использовании для облучения полупроводникового лазера с длиной волны 740 нм и светодиода с длиной волны в максимуме излучения 780 нм, установлено, что несмотря на близкие для биоткани по величине пропускания значения на указанных длинах волн глубина некроза для светодиодного источника примерно в 1,5 раза больше. Предполагается, что различия в глубине повреждения опухолей при фотовоздействии источниками с разной длиной волны света определяются не только различием в пропускании тканей, но и возможной различной эффективностью фотодиссоциации гемоглобина в кровеносных сосудах.

Литература

1. Патент на изобретение №17638: «Водорастворимый индотрикарбоцианиновый краситель в качестве фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии злокачественных опухолей» Самцов М.П., Луговский А.П., Воропай Е.С., Петров П.Т., Луговский А.А., Демид Д.И., Истомин Ю.П. // Афіційны бюл. / Нац. центр інтелектуал. уласнасці. – 2013. – № 5. – С. 103.
2. Alexander Lugovski, Michael Samtsov, Kirill Kaplevsky, Petr Petrov, Eugene Voropay, Dmitri Tarasau, Yuri P. Istomin. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics //Journal of Photochemistry and Photobiology A, 2016.V.316, P.31-36.