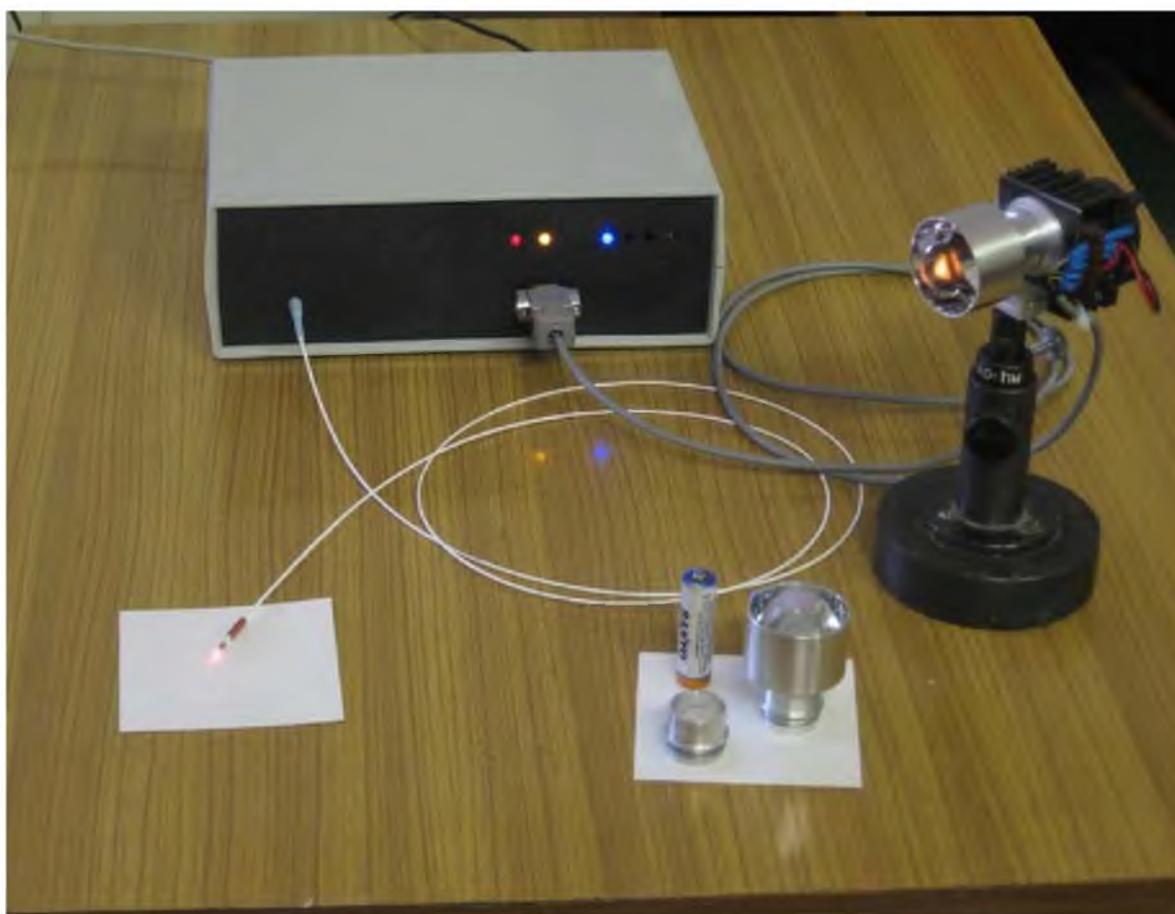


## СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС ДЛЯ ФОТОХИМИОТЕРАПИИ С МОЩНЫМ СВЕТОДИОДОМ

Ф.А.Ермалицкий, А.Е.Радько, К.Н.Каплевский, К.А.Шевченко

НИИ ПФП им. А.Н.Севченко БГУ, г.Минск

Для проведения флуоресцентной диагностики локализации новообразований, помимо эффективного препарата, требуется наличие соответствующего оборудования. Спектрометрическая аппаратура для использования в медицинской практике предполагает простоту эксплуатации, небольшой размер, ограничение уровня рассеянного и отраженного тканью света источника возбуждения, а так же минимизацию влияния свечения содержащихся в организме биологических компонентов.



*Рис. 1.* Спектрометрический комплекс для фотохимиотерапии с мощным светодиодом

При проведении сеансов фотохимиотерапии необходимо решать две задачи: во-первых проводить фотовоздействие на опухолевые узлы светом определенного спектрального состава для достижения эффекта, и во-

вторых следить за течением процесса. В связи с этим в НИИ ПФП им. А.Н. Севченко осуществлена разработка спектрометрического комплекса, позволяющего проводить анализ распределения фотосенсибилизаторов с флуоресценцией в спектральном диапазоне 700 – 950 нм в состоянии *in vivo* и управлять источником излучения (рис. 1).

Источник излучения на основе специального светодиода позволил использовать излучение в полосе поглощения фотосенсибилизатора, находящейся в окне прозрачности биологических тканей [1]. Это увеличило глубину проникновения света и способствовало росту эффективности данного метода лечения. Выбор светодиода позволил получить высокую эффективность при фотовоздействии, оптимизировать потери при поглощении красителя и поглощении в тканях.

Для наблюдения за динамикой накопления фотосенсибилизатора в опухолевых узлах в комплексе реализована возможность регистрации и анализа его спектров флуоресценции. Это осуществляется с помощью спектрометра с оптоволоконным вводом излучения. Один конец световода используется для направления флуоресценции образцов в полихроматор спектрометра. Через второй - осуществляется подвод возбуждающего излучения полупроводникового лазера. Применение световода позволило уменьшить размеры контролируемой области, что в свою очередь, позволяет анализировать распределение красителя в опухолях (и на определенной глубине тканей) [2].

Основные характеристики

Максимальная световая мощность терапевтическая	1 Вт
Длина волны максимума терапевтического излучения	780 нм
Максимальная световая мощность диагностического источника	30 мВт
Длина волны максимума диагностического излучения	683 нм
Анализируемый спектральный диапазон	400-950 нм
Типовой период обновления информации в режиме диагностики	1/5 сек

Комплекс состоит из ПЭВМ и внешнего блока, в котором размещены оптические и электронные компоненты. Связь между блоком и ПЭВМ осуществляется посредством шины USB. В терапевтическом режиме с помощью программы с ПЭВМ задается стабилизированный ток источника излучения и контролируется время экспозиции. В диагностическом режиме, без отключения терапевтического светодиода, осуществляется управление источником возбуждения флуоресценции фотосенсибилизатора, регистрация его спектров, а также накопление, обработка, сравнение и протоколирование результатов. В перспективе, по мере совершенствования методик, предусмотрена возможность полного отказа от

включения ПЭВМ в состав комплекса, так как уже на данном этапе ПЭВМ используется в первую очередь для более комфортного накопления, отображения и обработки экспериментальной информации.

Использование в данном спектрометрическом комплексе источника возбуждения флуоресценции с длиной волны 683 нм позволяет в экспериментах *in vivo* исключить влияние на результаты измерений свечения эндогенных порфиринов присутствующих в биологических тканях. Такая возможность расширяет перспективы использования прибора для оперативного контроля за концентрацией фотосенсибилизатора в опухолевых узлах в ходе сеанса фототерапии, а для фотосенсибилизатора с селективным накоплением в опухоли позволяет его использовать в качестве диагностического средства определения места локализации новообразований.

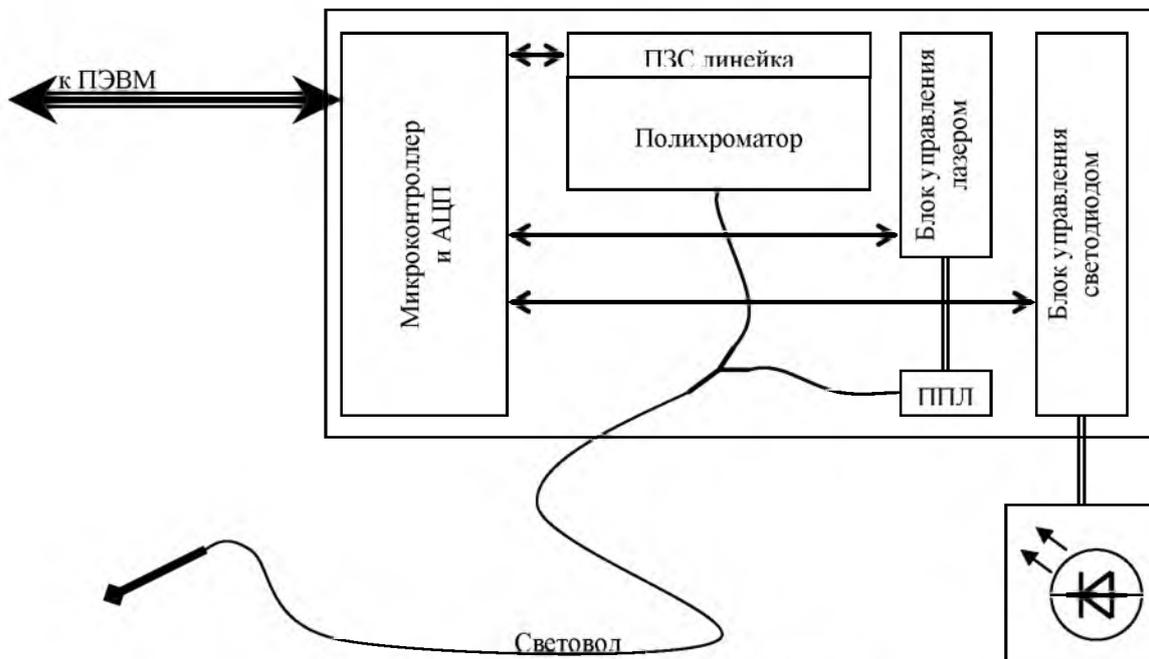


Рис. 2. Структурная схема комплекса.

ПЭВМ – персональная вычислительная машина; АЦП – аналогово-цифровой преобразователь;  
 ППЛ – полупроводниковый лазер.

С помощью разработанного комплекса можно определять не только относительную интенсивность свечения, но и анализировать форму спектров. Коэффициенты коррекции прибора на спектральную чувствительность определялись путем сравнения спектров флуоресценции образцов тканей содержащих краситель зарегистрированных с помощью комплекса и калиброванного по спектральной чувствительности спек-

трофлуориметра Fluorolog. Длина волны возбуждающего излучения в обоих случаях составляла 683 нм.

В результате установлено, что зарегистрированный в тканях спектр красителя, с учётом коэффициентов коррекции, совпадает со спектром флуоресценции красителя в культуре клеток HeLa. Поскольку спектральные характеристики полиметиновых красителей зависят от полярности среды, наблюдаемое соответствие позволяет заключить, что молекулы красителя в ткани и в модельной среде раковых клеток имеют практически одинаковое окружение.

С помощью разработанной аппаратуры, путем регистрации интенсивности флуоресценции красителя *in vivo*, исследована зависимость изменения его концентрации в тканях от времени после введения в организм (фармакокинетика). Полученные данные позволяют определять оптимальное время накопления красителя в опухоли, сравнивать концентрацию красителя для разных животных и учитывать эти обстоятельства для повышения эффективности последующего сеанса фототерапии.

На основании зарегистрированных зависимостей интенсивности флуоресценции красителя в здоровой ткани и в опухоли в зависимости от длительности фотовоздействия излучением можно сделать вывод об уменьшении скорости фотодеструкции красителя *in vivo* при повышении плотности мощности света (наведенная гипоксия). Таким образом на основании информации полученной с помощью разработанного спектрометрического комплекса можно определять не только момент максимального накопления красителя в опухоли и экспозиционную дозу фотовоздействия, но и подобрать оптимальное значение плотности мощности при которой терапевтически эффект будет максимальным при данной световой дозе.

Информация о текущей концентрации фотосенсибилизатора в опухолевом узле дает возможность корректировать как время, так и параметры фотовоздействия непосредственно в ходе сеанса фототерапии.

Новый спектрометрический комплекс позволяет оперативно регистрировать скорректированные спектры флуоресценции полиметиновых красителей *in vivo*, исключая влияние эндогенных порфиринов присутствующих в биологических тканях. Такая возможность предоставляет широкие перспективы для использования прибора для оперативного контроля за концентрацией фотосенсибилизатора в опухолевых узлах в ходе сеанса фототерапии, а также в качестве диагностического средства определения места локализации новообразований.

Очевидно, что на фоне собственного свечения биотканей [1] задача достоверной регистрации флуоресценции при малых концентрациях фо-

тосенсибилизатора становится проблематичной. Поэтому в новом измерительном комплексе в качестве источника света использован полупроводниковый лазер с длиной волны 683 нм. На рисунке 3 приведены спектры испускания опухолевой ткани интактной крысы и флуоресценции фотосенсибилизатора в ткани подопытного животного зарегистрированные при возбуждении на  $\lambda = 632,8$  нм (рисунок 3 а) и  $\lambda = 683$  нм (рис. 3 б).

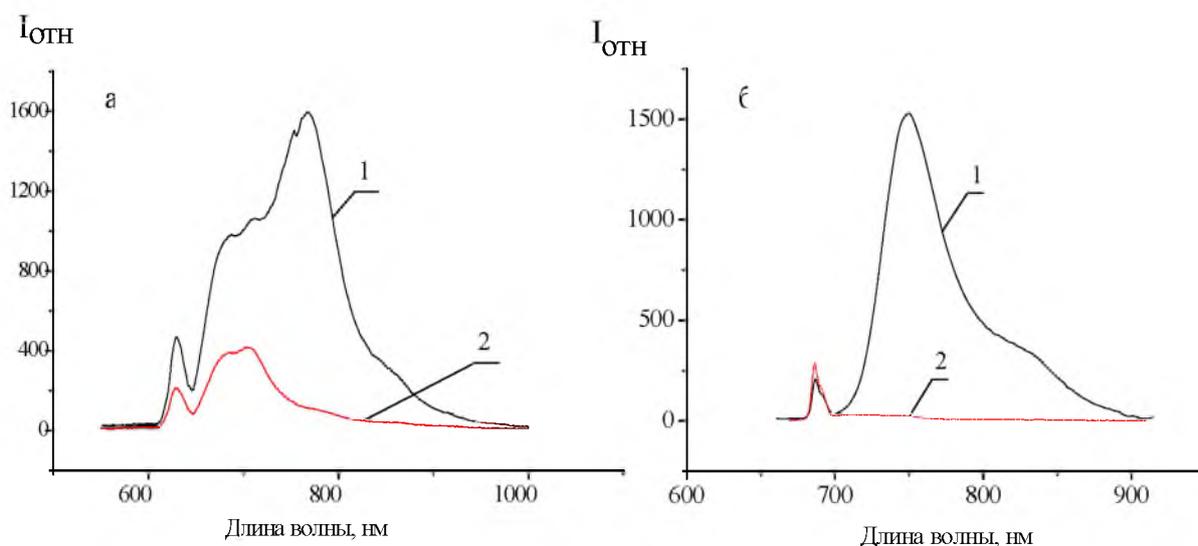


Рис. 3. Спектры флуоресценции ПК *in vivo* (1), и спектры испускания опухолевой ткани интактной крысы (2): а) зарегистрированы при возбуждении на длине волны  $\lambda = 632,8$  нм; б) зарегистрированы при возбуждении на длине волны  $\lambda = 683$  нм с помощью разработанного спектрометрического комплекса.

Форма спектра флуоресценции красителя *in vivo*, при возбуждении на  $\lambda = 632,8$  нм, оказывается в значительной степени искажена люминесценцией биотканей по сравнению со спектром при возбуждении на  $\lambda = 683$  нм. При более коротковолновом возбуждении на краю спектра присутствует плечо с максимумом в области 705 нм, которое не является флуоресценцией полиметинового красителя, а обусловлено собственным испусканием биоткани. Переход к возбуждению на длине волны  $\lambda = 683$  нм приводит практически к полному исчезновению люминесценции опухоли интактной крысы, а спектр флуоресценции фотосенсибилизатора в опухоли приобретает характерную для ПК форму. Небольшой коротковолновый максимум, проявляющийся во всех показанных на рисунке 2.3 спектрах, обусловлен отражением и рассеянием возбуждающего света от лазерного источника с  $\lambda = 632,8$  нм и  $\lambda = 683$  нм.

С помощью разработанного измерительного комплекса можно определять относительную интенсивность свечения от разных участков и анализировать форму спектров.

Для этого коэффициенты коррекции прибора на спектральную чувствительность определялись путем сравнения спектров флуоресценции образцов тканей содержащих краситель зарегистрированных с помощью комплекса и калиброванного по спектральной чувствительности спектрофлуориметра Fluorolog. Длина волны возбуждающего излучения в обоих случаях составляла 683 нм.

Путем регистрации интенсивности флуоресценции полиметинового красителя *in vivo*, исследована зависимость изменения его концентрации в тканях от времени после введения в организм (рисунок 4 а). На рисунке видно, что в течении первых 1,5 часов сигнал растет и в опухолевых, и в здоровых тканях. В дальнейшем по мере распределения сенсibilизатора по тканям сигнал падает (следующие 1,5 часа). После этого наблюдается повышение избирательности накопления красителя в опухолевых тканях – до 2х часов. По прошествии 5ти часов наступает достаточно длительный период, когда сигналы меняются весьма слабо (до 24го часа), после чего концентрация плавно снижается из-за выведения красителя из организма. Полученные данные позволяют определять оптимальное время накопления красителя в опухоли, сравнивать концентрацию красителя для разных животных и учитывать эти обстоятельства для повышения эффективности последующего сеанса фототерапии.

На рисунке 4 б представлены зависимости интенсивности флуоресценции красителя в здоровой ткани и в опухоли от времени фотовоздействия на опухолевый узел излучением с длиной волны 740 нм при плотности мощности  $150 \text{ мВт/см}^2$ . Из рисунка видно, что в процессе фотооблучения падает интенсивность флуоресценции, которая, пропорциональна концентрации красителя.

Уменьшение концентрации красителя связано с его фотодеструкцией под действием лазерного излучения. Из рисунка 4 б видно что, через некоторое время после облучения концентрация красителя в облучаемой опухолевой ткани становится меньше чем в здоровых тканях. Поэтому время фотовоздействия целесообразно ограничить пятнадцатью минутами, когда концентрация красителя ещё достаточно высокая и меньше вероятность повредить здоровые ткани. Таким образом, можно для различных значений плотности мощности, определять оптимальные параметры ФДТ, в частности экспозиционную дозу светового воздействия.

Анализ спектров флуоресценции красителя в опухоли, зарегистрированных в разные моменты времени фотовоздействия, показал сущест-

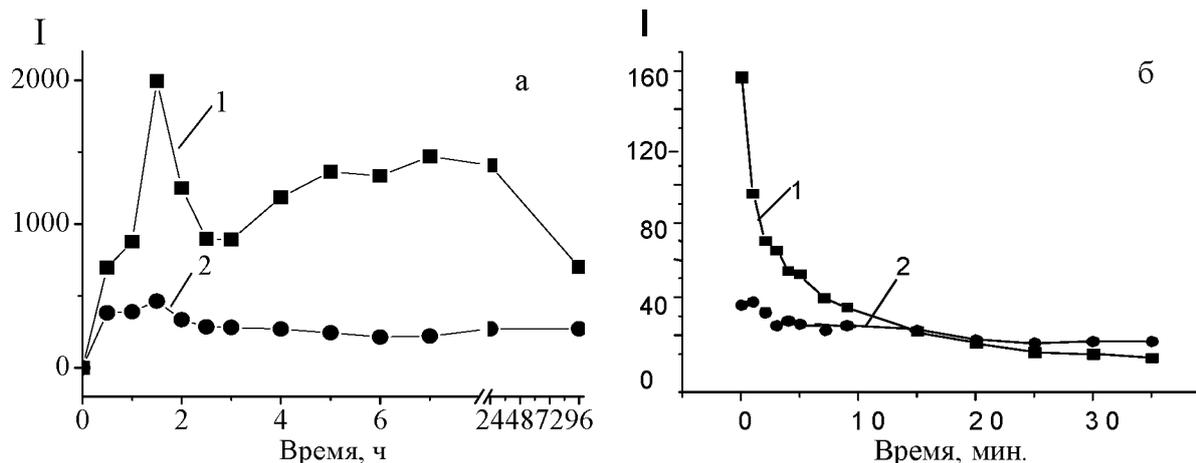


Рис. 4. Зависимости интенсивности люминесценции ПК в здоровой ткани (2) и в опухоли саркома 45 (1) от времени: а) от времени после введения красителя в кровь; б) от времени терапевтического фотовоздействия

венное влияние плотности мощности на кинетику изменения интенсивности флуоресценции. Относительная интенсивность для меньшей плотности мощности претерпевает более значимые изменения со временем, на основании чего можно определять оптимальную плотность фотовоздействия. Известно [2], что для этого класса соединений фотодеструкция в растворах, при воздействии квантами света видимого диапазона, протекает по механизму самосенсибилизированного окисления синглетным кислородом. В свою очередь образование синглетного кислорода является одной из основных причин гибели раковых клеток. Поэтому уменьшение фототоксичности и снижение эффективности фотодеструкции красителя при больших плотностях мощности фотовоздействия указывает на быстрое расходование кислорода в опухоли в процессе фотовоздействия (наведенная гипоксия). Исходя из этого, исследование уровня оксигенации опухолевых клеток представляет большое практическое значение[3].

В работе [4] было показано, что на форму зарегистрированного с поверхности тела спектра флуоресценции ПК *in vivo* оказывает влияние поглощение компонент крови, в частности гемоглобина. Следует учитывать, что в процессе сеанса фотохимиотерапии в опухолевой ткани меняется соотношение концентраций различных форм гемоглобина – уменьшается доля оксигемоглобина [5, 6]. В зависимости от соотношения концентраций различных форм гемоглобина изменяется и степень их влияния на форму полосы флуоресценции красителя. Таким образом, с помощью спектральных данных можно оценивать уровень оксигенации биоткани в процессе ФДТ. Регистрация уровня оксигенации опухоли позволяет оптимизировать условия лечения и, так же, что не менее важно,

определить эффективность проведённой фотодинамической терапии. [4, 5].

Проведено сравнение эффективности фотохимиотерапии при использовании лазерных источников света с длинами волн 668, 740 нм, и мощного светодиода спектрометрического комплекса с длиной волны 780 нм.

Для корректного сравнения доли погибших клеток HeLa при проведении ФДТ с использованием различных источников света с длинами волн излучения 668, 740 и 780 нм выполнены условия по обеспечению одинакового количества поглощенных квантов света в единицу времени на каждой из использованных длин волн фотовоздействия. Для этого по спектру поглощения полиметинового красителя в клетках HeLa определено во сколько раз интенсивность поглощения на длине волны 668 и 780 нм меньше, чем на 740 нм (рисунок 5).

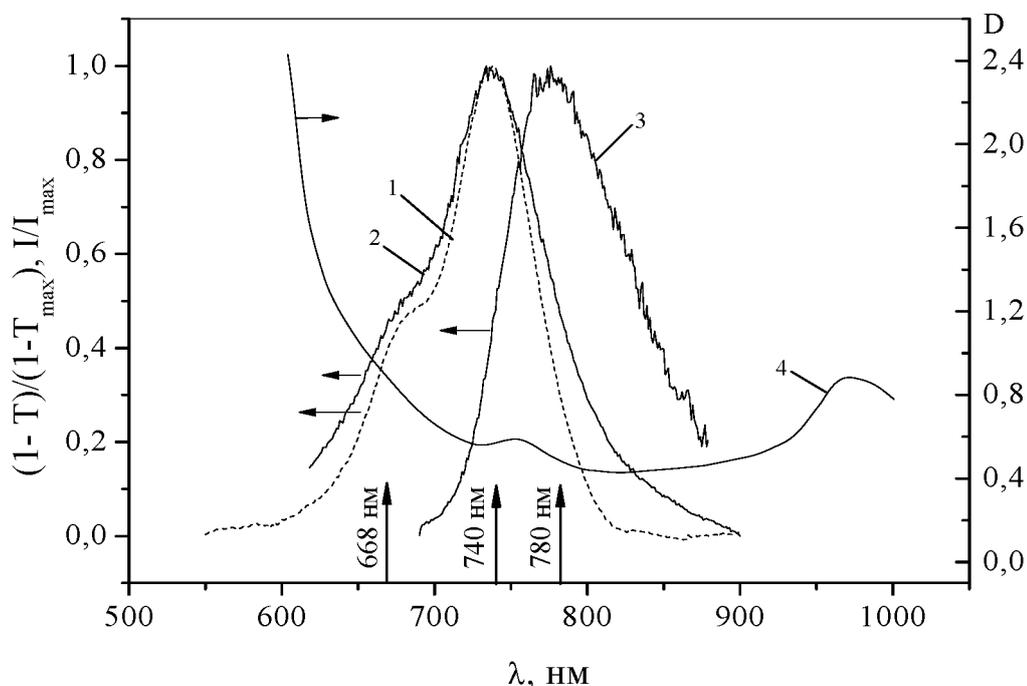


Рис. 5. Спектр поглощения (1, 2, 4) и флуоресценции (3) фотосенсибилизатора в клетках HeLa (1, 3), в образце ткани печени (2), биологической ткани (без учёта рассеяния света тканью) (4) [7]

При фотовоздействии светом с длиной волны 668 нм и 780 нм на образцы направлялось большее число квантов света в единицу времени в соответствии с различиями в  $(1-T)$ , чем для излучения с длиной волны 740 нм. Энергия фотонов соответствующая 668 нм примерно в 1,1 раза

выше, а для 780 меньше в 1,06 раза, чем для 740 нм. В целом с учётом всех перечисленных факторов, чтобы создать условия одинакового числа поглощенных квантов света в единицу времени для лазера на 668 нм была использована в 2,8 раза, а для диода с длиной волны 780 нм использована в 2,3 раза большая плотность мощности излучения, по сравнению с лазером на 740 нм.

При этом была обеспечена одинаковая концентрация сенсibilизатора в клетках и, на основании данных динамики накопления ПК в культуре клеток HeLa при введении препарата в питательную среду, установлен временной интервал 1,5 – 2 часа после введения, в течение которого концентрация ПК *in vitro* стабильна.

Фотооблучение клеток HeLa проводили с плотностью мощности 10 мВт/см<sup>2</sup> на длине волны 740 нм с экспозиционной энергетической световой дозой 10 Дж/см<sup>2</sup>. Для источников с длинами волн 668 и 780 нм плотность мощности составляла 28 и 23 мВт/см<sup>2</sup> соответственно. При различии падающей на образцы плотности мощности света для всех трёх источников фотовоздействие проводилось одинаковое время.

Было установлено, что при таких условиях облучения доля погибших клеток для трёх различных источников света превышает 90 %. Полученные данные свидетельствуют о том, что эффективность фотоактивации гибели раковых клеток при обеспечении одинакового количества поглощенных квантов света в единицу времени на всех трёх длинах волн света одинакова. Следует отметить, что у клеток HeLa не содержащих фотосенсibilизатор оптическая плотность в диапазоне 600 – 900 нм одинакова и поглощение практически отсутствует ( $D < 0,006 \pm 0,002$  для суспензии, содержащей в 1 см<sup>3</sup>  $2 \cdot 10^6$  клеток).

Исходя из заключения полученного в работе [8], о том, что молекулы ПК *in vivo* и *in vitro* имеют одинаковое по полярности окружение, по спектру поглощения ПК в клетках HeLa определено во сколько раз отличается уровень поглощения света для разных длин волн. Соответственно, для обеспечения одинакового количества поглощенных ФС квантов света в единице объема опухоли *in vivo* на длине волны 668 нм использована плотность мощности света в 2,8 раза, а на длине волны 780 нм в 2,3 раза больше, чем на 740 нм. Учитывая это, фотовоздействие для трёх источников света осуществлялось при различных падающих на образцы плотностях мощности света с одинаковым временем экспозиции, тем самым экспозиционная или реальная энергетическая доза (излучение падающее на образец ткани животного) была отлична от эффективной энергетической дозы (излучение поглощенное фотосенсibilизатором).

В результате сравнения эффективности фотовоздействия для трёх источников света с разными длинами волн установлено, что 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 3 раза больше по сравнению с длиной волны 668 нм при выполнении условия поглощения ПК в единичном объеме опухоли одинакового числа квантов света в единицу времени.

In vitro установлено, что при выполнении условия поглощения фотосенсибилизатором одинакового числа квантов света в единицу времени фоточитотоксичность трикарбоцианинового красителя не зависит от длины волны воздействующего излучения. In vivo показано, что средняя глубина повреждения перевиваемых опухолей штамма Са М-1 крыс при ФДТ растёт с увеличением длины волны возбуждающего света. Отличия в глубине повреждения опухоли для источников с различными длинами волн определяются, как различием в пропускании тканей в зависимости от длины волны светового излучения, так различной эффективностью фотодиссоциации комплексов гемоглобина в кровеносных сосудах.

Показана высокая эффективность воздействующего излучения светодиода с максимумом испускания на 780 нм при проведении фотохимиотерапии с трикарбоцианиновым красителем.

1. Ramanujam, N. Fluorescence Spectroscopy In Vivo / N. Ramanujam // Encyclopedia of Analytical Chemistry / R.A. Meyers. – Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2000. – P. 20–56
2. Воропай, Е.С. Механизм фотосенсибилизации кислорода полиметиновыми красителями / Е.С. Воропай, М.П. Самцов // Опт. и спектр.– 1987.– Т. 62, № 1.– С. 64–67.
3. In vivo tumour oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy / B.J. Tromberg [et al.] // Photochem. Photobiol. – 1990. – Vol. 52. –P. 375–385.
4. Monitoring of indotricarbocyanine dye fluorescence during photochemotherapy / M.P. Samtsov [et al.] // SPIE. – 2007. – Vol. 6733. – P. 67331C-1 – 67331C-8.
5. Treatment-Induced Changes in Tumor Oxygenation Predict Photodynamic Therapy Outcome / H. W. Wang [et al.] // Cancer Res. – 2004. – Vol. 64, №20. – P. 7553–7561.
6. Noninvasive monitoring of murine tumor blood flow during and after photodynamic therapy provides early assessment of therapeutic efficacy / G. Yu [et al.] // Clin Cancer Res. – 2005.– Vol. 11, № 9. – P. 3543–3552.
7. Loshenov, V.B. Photodynamic therapy and fluorescence diagnostic / V.B. Loshenov, V. I. Konov, A.M. Prokhorov // Laser Physics. – 2000. – Vol. 10, № 6. – P. 1188 – 1207
8. Monitoring of indotricarbocyanine dye fluorescence during photochemotherapy / M.P. Samtsov [et al.] // SPIE. – 2007. – Vol. 6733. – P. 67331C-1 – 67331C-8.