

Исследование эффективности фотодинамического воздействия на живые клетки при различных режимах светового облучения

77-48211/441991

07, июль 2012

Змиевской Г. Н., Филатов В. В.

УДК 577.344.3

Россия, МГТУ им. Н.Э. Баумана

ingener-vadim@mail.ru

Введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ) — относительно новый метод лечения онкологических заболеваний, отличающийся минимальной инвазивностью и потенциально высокой эффективностью, связанной с избирательностью воздействия на патологию.

Механизм ФДТ еще не изучен до уровня повседневных методических рекомендаций, поэтому каждый медицинский центр, где используется ФДТ, является одновременно и научным центром. Главным «поражающим агентом» принято считать синглетный кислород (возбужденное состояние молекулы кислорода), появление которого при воздействии лазерного излучения на сенсibilизированные клетки установлено экспериментально. Синглетный кислород, являясь сильным окислителем, вступает во взаимодействие с липидами и белками клеток, вызывая разрушение структуры мембран и функциональные нарушения в различных клеточных органеллах.

Моделирование фотодинамического воздействия (ФДВ) [1-3] приводит к выводу о том, что переход от непрерывного к импульсному режиму облучения при сохранении экспозиционной дозы может дать существенный выигрыш в эффективности лечения (рис. 1), причем этот выигрыш зависит от формы импульса.

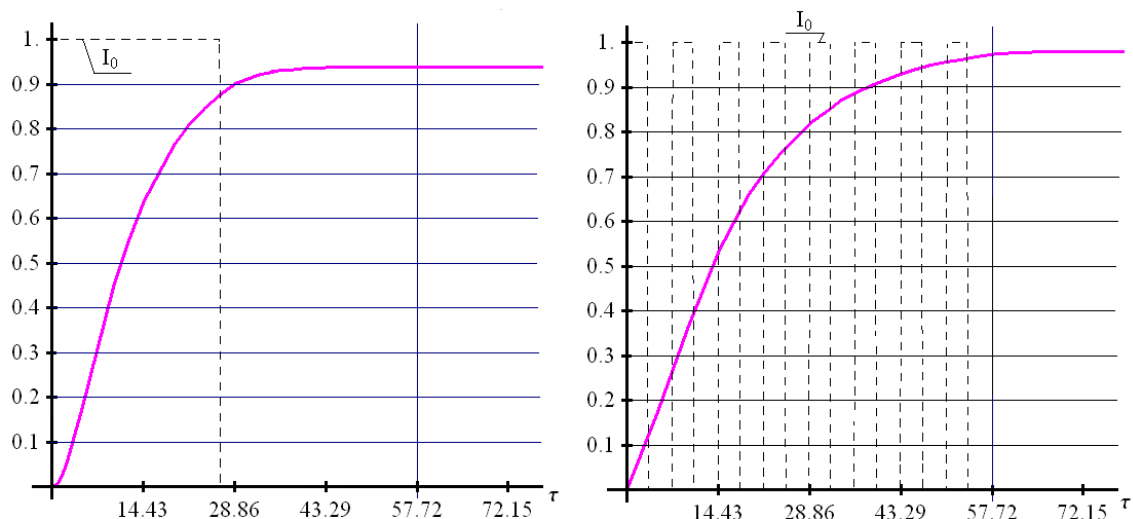


Рис. 1. Изменение числа погибших клеток при непрерывном и импульсном режимах облучения. I_0 -интенсивность засветки, τ - безразмерное время

Несмотря на то, что изучению факторов, влияющих на эффективность ФДТ посвящено большое количество работ, в настоящее время нет однозначного ответа на вопрос о преимуществах непрерывного или импульсного режимов светового воздействия при проведении сеанса фотодинамического лечения. В данной работе мы попытаемся восполнить этот пробел.

Целью работы является подбор опытным путем оптимальных (по критерию максимального уровня погибших клеток) параметров светового воздействия при фотодинамическом лечении.

Задача работы состоит в экспериментальной проверке результатов моделирования ФДВ, а именно в сравнении эффективностей непрерывного и импульсного облучения клеток при ФДТ.

Объект исследований

Проверка гипотезы о большей эффективности импульсного режима облучения клеток по сравнению с непрерывным при ФДВ проводилась на культуре эритроцитов. Параметром, характеризующим степень протекания процесса, был выбран коэффициент пропускания (прозрачность) жидкого образца, поскольку при гемолизе эритроцитов, ввиду их количественного доминирования над другими форменными элементами крови, следует ожидать радикального изменения оптических свойств.

Методика проведения эксперимента

Нативная кровь разводилась в 0,9 % физиологическом растворе NaCl в соотношении 1:600. Фотосенсибилизатор (ФС) "Радахлорин" разводился по той же технологии. Затем разведенная кровь и разведенный ФС смешивались в соотношении 1:1. Полученная смесь помещалась в прямоугольную кювету и подвергалась облучению светодиодной матрицей (кювета помещалась в фокусе светодиодной матрицы сферической формы, длина волны излучения матрицы $\lambda = 650$ нм).

Режим фотовоздействия задавался с персонального компьютера через модулятор. Контроль пропускания смеси проводился на фотоколориметре КФК-2.

Схема экспериментальной установки приведена на рис. 2.

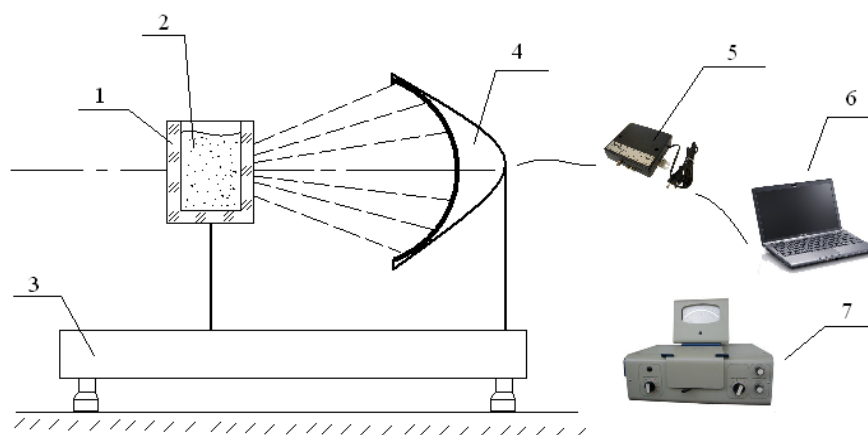


Рис. 2. Схема экспериментальной установки: 1 — кювета; 2 — исследуемый образец; 3 — оптическая скамья; 4 — светодиодная матрица; 5 — модулятор; 6 — ПК; 7 — фотоколориметр

На первом этапе эксперимента определялась пороговая доза светового воздействия, достаточная для начала протекания фотодинамического эффекта (ФДЭ). Для этого каждые 30 секунд кювета снималась с облучения и помещалась в фотоколориметр для проведения контроля пропускания смеси. Эта процедура повторялась до тех пор, пока показания фотоколориметра не выходили на «плато», т.е. достигали предельного значения и не менялись при дальнейшем повторении измерений (рис. 3).

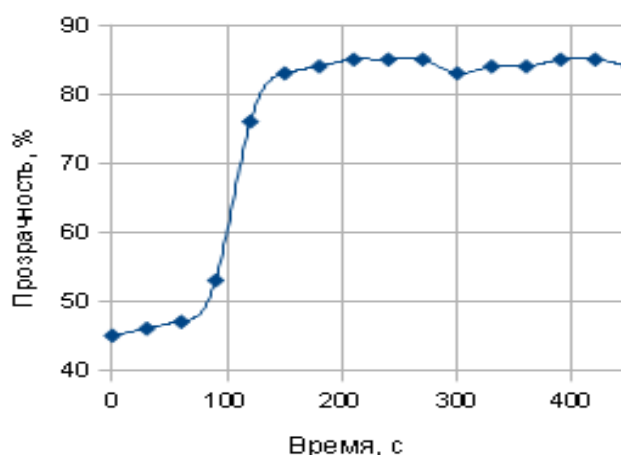


Рис. 3. Результаты первого этапа эксперимента. Определение дозы светового воздействия, достаточной для начала протекания (ФДЭ)

На втором этапе исходная смесь облучалась в непрерывном режиме в течение времени, соответствующего порогу ФДЭ (это время было определено на первом этапе). После окончания экспозиции, контроль пропускания смеси проводился каждую минуту до того момента, пока показания прибора не переставали изменяться (достигали предельного значения) (рис. 4).

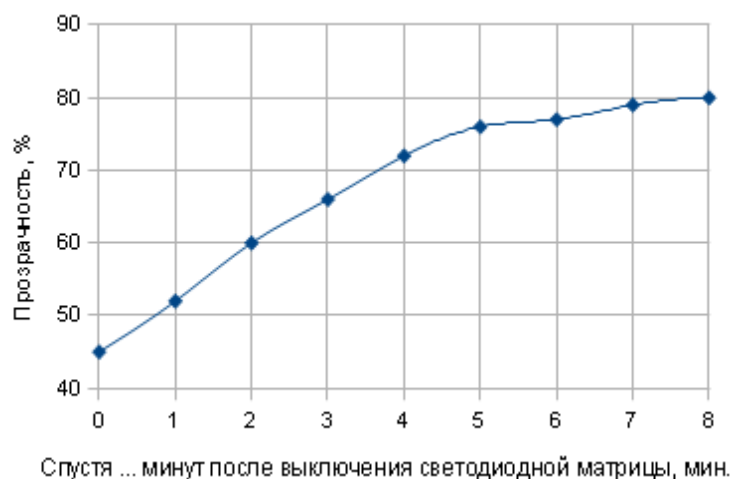


Рис. 4. Результаты второго этапа эксперимента. Образец после непрерывной засветки

На третьем этапе исходная смесь облучалась светодиодной матрицей, работающей в импульсном режиме. Суммарное время облучения было таким же, как на втором этапе. Варьировались параметры импульсного воздействия: частота и скважность. Эксперименты проводились на частотах 1, 2, 5, 10, 24, 50, 100 Гц при скважности 50 и 75 %. По окончании экспозиции проводился контроль пропускания смеси по методике второго этапа (рис. 5).

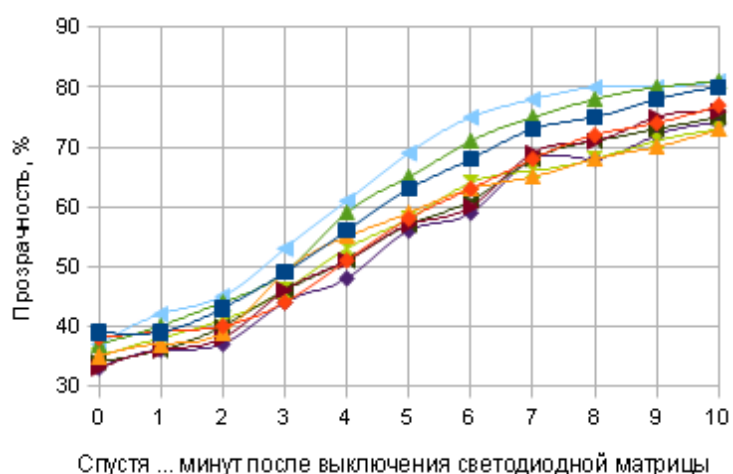


Рис. 5. Результаты третьего этапа эксперимента. Образец после импульсной засветки

Обсуждение результатов

1) Обнаружен эффект "задержки" процесса при импульсном режиме облучения (в непрерывном режиме облучения данный эффект также присутствует, но он менее выражен). Этот эффект проявляется в том, что коэффициенты пропускания образца до и сразу после светового воздействия примерно одинаковы (в пределах 5 %). Существенный рост начинается спустя определенное время после прекращения облучения.

2) Зависимость предельного процента погибших клеток от параметров импульсного воздействия (частоты и скважности) не обнаружена.

Совпадение числа погибших клеток на всех этапах эксперимента наводит на мысль о том, что выбранная доза светового воздействия достаточна для полного уничтожения эритроцитов. Для проверки этой гипотезы был поставлен контрольный эксперимент, в котором гемолиз эритроцитов осуществлялся иным физическим путем. Для этого нативная кровь разводилась в концентрации 1:1200 в дистиллированной воде. При этом наблюдался осмотический гемолиз эритроцитов. Затем проводилось измерение коэффициента пропускания образца, и отмечалось совпадение с тем, что наблюдалось при фотодинамическом гемолизе эритроцитов (как при непрерывном, так и при импульсном облучении).

Заключение

Несмотря на то, что максимальный процент погибших клеток такой же, как и при непрерывном облучении (что не совпадает с результатами моделирования [2]), можно считать подтвержденной гипотезу о предпочтительности использования импульсного режима облучения при проведении ФДТ. Дело в том, что при непрерывном режиме облучения в качестве побочного действия зачастую наблюдается отек ткани, связанный с разогревом зоны облучения. При импульсном режиме отека не должно происходить, поскольку в периоды между импульсами происходит "остывание" биообъекта.

Литература

1. Жорина Л.В., Залевская Л.И., Залевская О.И., Змиевской Г.Н., Семчук И.П., Филатов В.В. Дозовые характеристики препарата "Радахлорин" при моделировании фотодинамического эффекта на клеточном уровне // Измерительная техника. 2011. №12. С. 48-53.
2. Змиевской Г.Н., Филатов В.В. Исследование эффективности лазерного фотодинамического воздействия на клеточные структуры при различных режимах работы лазера // Сборник материалов XI всероссийской научно - технической конференции "Состояние и проблемы измерений", МГТУ им. Н.Э. Баумана, 26-28 апреля 2011г. М.: Издательство МГТУ им. Н. Э. Баумана, 2011. С. 219-224.
3. Филатов В.В. Исследование эффективности различных режимов лазерного излучения на живые клетки при фотодинамическом воздействии. // Наука и образование. МГТУ им. Н.Э. Баумана. Электрон. журн. 2011. № 10. Режим доступа: <http://technomag.edu.ru/doc/229632.html> (дата обращения 21.07.2012).

4. Галкин М.А., Змиевской Г.Н., Ларюшин А.И., Хизбуллин Р.Н. Локальный разогрев облучаемой области как дозозависимый соотносимый параметр отклика организма на фототерапевтическое воздействие. // Инженерно-физические проблемы новой техники: Сб. материалов 9-го Всероссийского совещания-семинара: М.: МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2010, С. 66.