

12. Ellis IO, Humphreys S, Michell M, et al. Best Practice No. 179. Guidelines for breast needle core biopsy handling and reporting in breast screening assessment /J Clin Pathol. – 2004. – V. 57. – P. 897 – 902.
13. Kopans DB. Sonography should not be used for breast cancer screening until its efficacy has been proven scientifically /AJR Am J Roentgenol. – 2004. – V. 182. – P. 489 – 491.
14. American College of Radiology. Breast Imaging Reporting and Data System® (BI-RADS®) – ultrasound. 4th ed. Reston: American College of Radiology; 2003.
15. Hall TJ. AAPM/RSNA physics tutorial for residents: topics in US: beyond the basics: elasticity imaging with US. Radiographics. – 2003. – V.23. – P. 1657 – 1671.
16. Moy L, Slanetz PJ, Moore R, et al. Specificity of mammography and US in the evaluation of a palpable abnormality: retrospective review /Radiology. – 2002. – V.225. – P. 176 – 181.

Надійшла до редакції
26 квітня 2013 року

© Францевич К.А., 2013

УДК 617.55-089-78

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ДИНАМІКИ ВМІСТУ ФОТОСЕНСИБІЛІЗАТОРА В ПУХЛИННІЙ ТКАНИНІ ЗА ДОПОМОГОЮ СПЕКТРОМЕТРИЧНОЇ ТЕХНІКИ

¹Холін В.В., ¹Чепурна О.М., ²Єрмак П.В., ²Завадська Т.С., ³Войцехович В.С.

¹ПМВП «Фотоніка Плюс», м. Черкаси, Україна, ²Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України м. Київ, Україна,

³Інститут фізики НАН України м. Київ, Україна

Предметом дослідження, представленого в цій статті, є аналіз рівню вмісту фотосенсибілізатора у пухлинній тканині в процесі проведення фотодинамічної терапії (ФДТ) та контроль за рівнем його флюоресценції при накопиченні і вивільненні. У процесі дослідження для реєстрації сигналу флюоресценції були обрані спектрометри на базі приладів із зарядовим зв'язком (ПЗЗ). Вони дозволяють отримувати та обробляти сигнал в одній структурі ПЗЗ та в широкому діапазоні довжин хвиль.

У результаті аналізу ПЗЗ-спектрометрів після низки проведених експериментів був обраний спектрометр Ocean Optics USB4000 (США), який є найбільш чутливим, компактним, має широкий спектр вимірювання та зручне програмне забезпечення. На основі цього спектрометра було створено систему для реєстрації рівня флюоресценції в пухлинній тканині та проведено ряд досліджень на мишах з прищепленою карциномою легені Льюїс.

Ключові слова: фотодинамічна терапія, флюоресцентна діагностика, фотосенсибілізатор, спектрометр, прилад із зарядовим зв'язком, реєстрація сигналу.

Вступ

Фотодинамічна терапія – метод лікування, який можна застосовувати в онкології як альтернативний або в поєднанні із традиційними методами лікування онкозахворювань. До переваг ФДТ, порівняно із класичними підходами, можна віднести: неінвазивність або малоінвазивність, вибірковість ураження пухлинних тканин, можливість проведення повторних процедур із мінімальною шкодою для організму, поєднання діагностики та лікування в межах однієї процедури.

Проведення ФДТ складається із декількох етапів [1]. Перший етап – введення фотосенсибілізатора, переважно внутрішньовенно. Наступний етап полягає в накопиченні фотосенсибілізатора у пухлинній тканині. На даному етапі за рівнем флюоресценції фотосенсибілізатора можна оцінити розмір пухлини та її розташування. На останньому етапі уражену ділянку опромінюють світлом (найчастіше лазерним) із певною довжиною хвилі, яка відповідає максимуму поглинання фотосенсибілізатора.

При ФДТ важливим є також вибір ФС та визначення його максимальних піків поглинання для підбору оптимальної довжини хвилі лазерного випромінювання. Для того, щоб ефективно поєднати ФДТ і діагностику, використовують фотосенсибілізатор із декількома піками поглинання на різних довжинах хвиль [2]. Отже, збуджуючи світлом у короткохвильовій області, можна отримати флюоресценцію в довгохвильовій області спектру. Це дозволяє поєднати та проводити діагностику і терапію в межах однієї процедури із використанням одного препарату.

Постановка задачі

Лікувально-діагностична система, яка б поєднувала в собі комплекс для проведення ФДТ, візуальної діагностики та моніторингу вмісту ФС у пухлинній тканині може мати практичне застосування в клінічній практиці. Для її розробки нами були вивчені технічні вимоги та проведені експерименти.

Необхідним при проведенні ФДТ є визначення оптимальної дози, часу впливу лазерного випромінювання і досягнення потрібного клінічного ефекту, але, разом з тим, уникнення термодеструкції та пошкодження здорових тканин [3]. За допомогою рівня флюоресценції пухлинної тканини можна контролювати за процесом проведення ФДТ, визначати час припинення процедури та дозу лазерного опромінення.

Важливими задачами при проведенні діагностики є визначення розташування пухлини та контроль за рівнем фотосенсибілізатора у ній в процесі проведення ФДТ [4]. Однак рівень сигналу флюоресценції ФС в пухлині досить низький, що значно ускладнює його реєстрацію.

Після порівняння різноманітних засобів для реєстрації сигналу нами був обраний спектрометр на базі ПЗЗ-елементів. Перевагою таких спектрометрів є отримання, обробка та передача сигналу в одній структурі ПЗЗ. Порівняно із монохроматором, прилад дає миттєву відповідь у всьому спектральному діапазоні, тому відпадає потреба сканувати спектр для вимірювання інтенсивності на окремих довжинах хвиль [5].

До переваг ПЗЗ спектрометрів можна віднести:

- вимірювання інтенсивності сигналу одночасно в широкому діапазоні хвиль;
- процес отримання та аналого-цифрова обробка сигналу відбувається в одній структурі ПЗЗ;
- зручне програмне забезпечення та висока роздільна здатність допомагає в подальшому ефективно обробити отримані результати;
- універсальний волоконно-оптичний роз'єм SMA-905.

Можливості спектрометричної техніки на базі ПЗЗ-елементів дозволяють нам реєструвати динаміку накопичення ФС та слідкувати за рівнем його флюоресценції.

Матеріали та методи

Для порівняння даних та вибору оптимального варіанту були використані ПЗЗ спектрометри Solar S-100 (Білорусь), Ophir WaveStar-V (Ізраїль) та Ocean Optics USB4000 (США). Для передачі лазерного випромінювання в зону пухлини використовувався магістральний світловод MC2 (моноволокно). Було виявлено, що зміна кута приймального та опромінюючого світловоду суттєво не впливає на отриманий сигнал флюоресценції. Однак постійна зміна розташування та відстані відносно пухлини може впливати на результати дослідження.

Для передачі сигналу флюоресценції до спектрометра використовувались наступні світловоди із роз'ємом SMA-905:

- поєднаний світловод із кварцовою жилою в центрі (для опромінення) та полімерними волокнами по всьому діаметру роз'єму (для прийому сигналу);
- кварцові моноволокна із діаметром світлопропускаючої жили 400 та 600 мкм;
- полімерний джгут із збільшеною приймальною площею ($1,57 \text{ мм}^2$) внаслідок максимального заповнення трубки волокном;
- поєднання двох окремих полімерних жил для опромінення і приймання сигналу.

Застосування моноволокна дозволяє значно спростити технологію виготовлення світловодів для проведення ФДТ та уніфікувати їх виконання.

Як джерело випромінювання використовувався лазер із довжиною хвилі 405 нм та потужністю 20 мВт.

Досліди проводились на мишах лінії C₅₇Bl/6 з перещепленою в подушечку лапки карциномою легені Льюїс. Фотосенсибілізатор «Фотолон» був введений тваринам внутрішньосудинно у концентрації 25 мг/кг маси тіла. На рис. 1 показано загальний вигляд експерименту із зафіксованою мишею та підведеною до неї системою для опромінення та приймання сигналу флюоресценції.

Під час проведення експериментів важливими є також: фіксація тварин у статичному положенні, створення робочого місця із мінімальним світловим шумом, використання чутливої спектрометричної техніки для реєстрації сигналу флюоресценції.

Результати та обговорення

Мінімальна потужність сигналу, що можуть реєструвати ПЗС-спектрометри рідко вказана їх виробниками. Для розуміння рівня мінімального сигналу, що може приймати ПЗС-спектрометр нами був використаний вимірювач потужності OM3-65. Одночасно ми подавали випромінювання на спектрометр та чутливу головку вимірювача, в яку встановлений фотодіод.

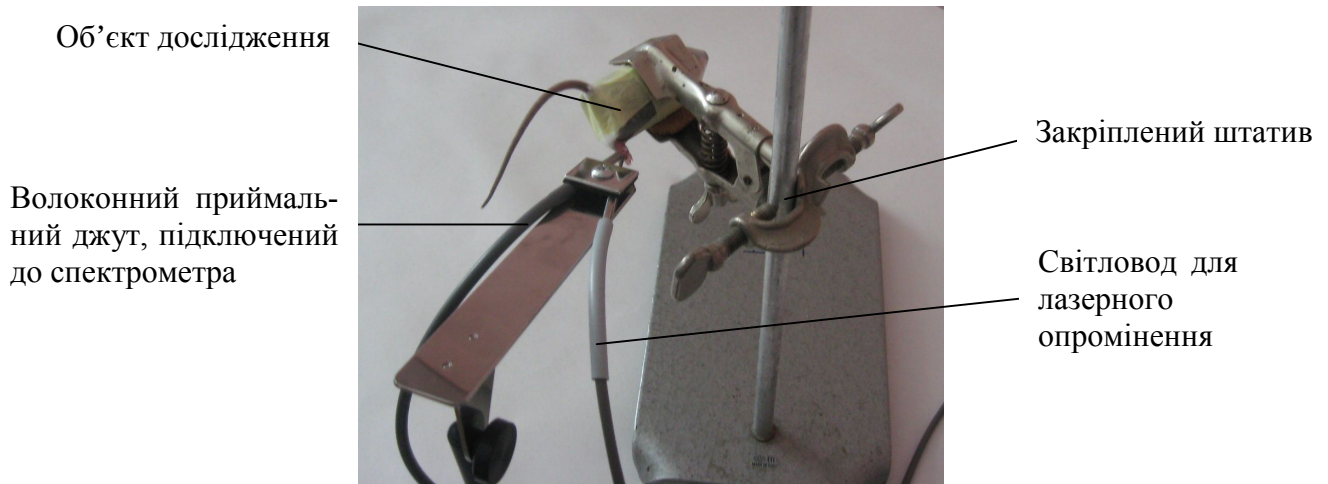


Рис. 1. Загальний вигляд експерименту

Із отриманих результатів можна зробити висновок, що спектрометр можна використовувати для реєстрації сигналу флуоресценції починаючи з 10 нВт.

Для порівняння даних флуоресценції нами були проведені дослідження із використанням всіх трьох спектрометрів. На графіках зображені спектри флуоресценції пухлинної тканини через 1 годину після введення Фотолону, отримані за допомогою спектрометрів Ophir WaveStar-V (рис. 2), Solar S-100 (рис. 3) та Ocean Optics USB4000 (рис. 4).

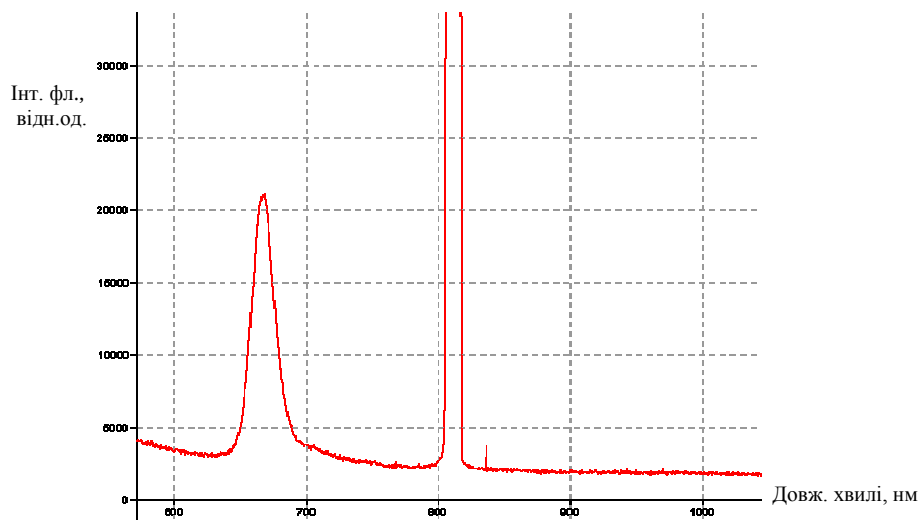


Рис. 2. Пік флуоресценції пухлини, зареєстрований спектрометром Ocean Optics USB4000

Після порівняння характеристик обраних спектрометрів і низки проведених досліджень для подальших дослідів нами досліджень був вибраний Ocean Optics USB4000. До його переваг можна віднести: чутливість, зручне програмне забезпечення, високу роздільну здатність та компактність.

ФС «Фотолон» має два піки поглинання в короткохвильовій (402 ± 5 нм) та довгохвильовій (660 ± 5 нм) [6]. Згідно даних, отриманих нами за допомогою спектрометричної техніки, пік флюоресценції ФС знаходиться в межах 660 – 665 нм, що відповідає максимуму флюоресценції хлорину еб та ФС «Фотолон» [7, 8].

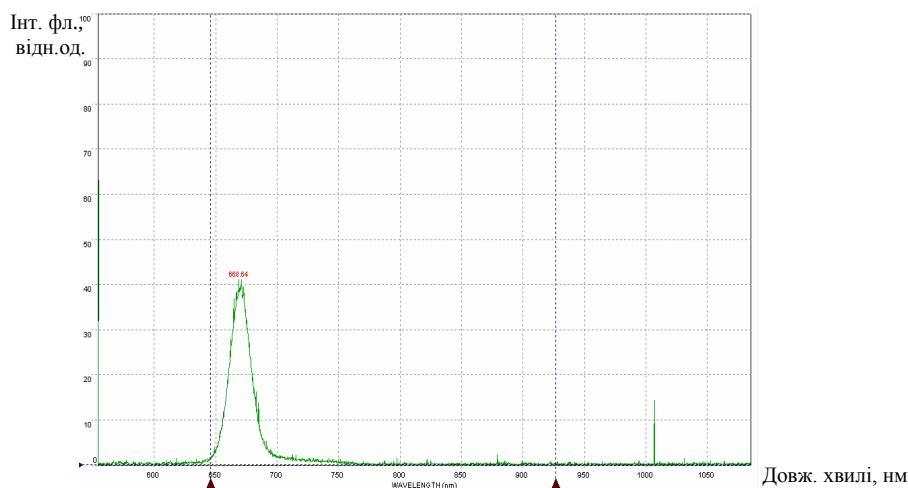


Рис. 3. Пік флюоресценції пухлини, зареєстрований спектрометром Ophir WaveStarV

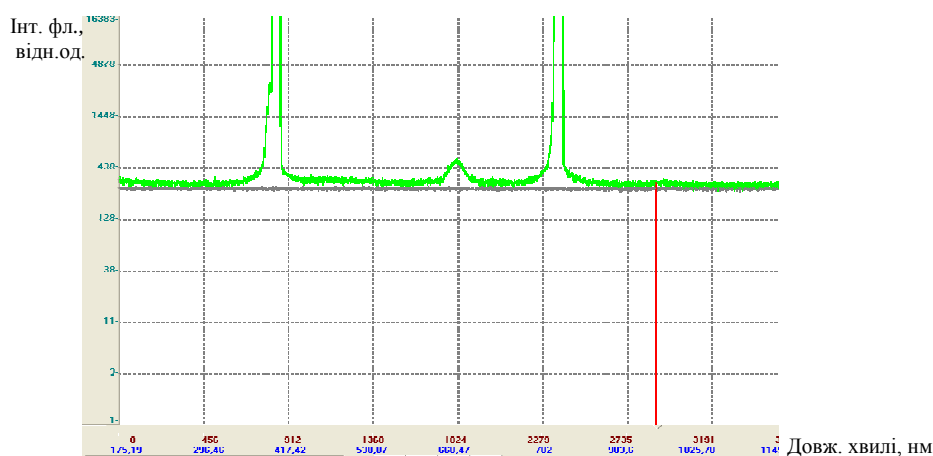


Рис. 4. Пік флюоресценції пухлини, зареєстрований спектрометром Solar S-100

Використовуючи спектрометр Ocean Optics USB4000, ми можемо спостерігати за зміною сигналу флюоресценції після введення ФС, накопичення та вивільнення. На рис. 5 показано порівняння сигналу флюоресценції пухлини протягом 2,5 години кожні 30 хв, де 1 - флюоресценція пухлини через 30хв, 2- флюоресценція пухлини через 1 год., 3 - флюоресценція пухлини через 1,5 год, 4 - максимум флюоресценції через 2год, 5 - вихід ФС із пухлини через 2,5год .

При проведенні ФДТ важливим є визначення часу максимального накопичення ФС в пухлині та контроль за його рівнем у здорових тканинах. Нами бу-

ли проведені дослідження щодо контролю динаміки накопичення за допомогою спектрометричної техніки.

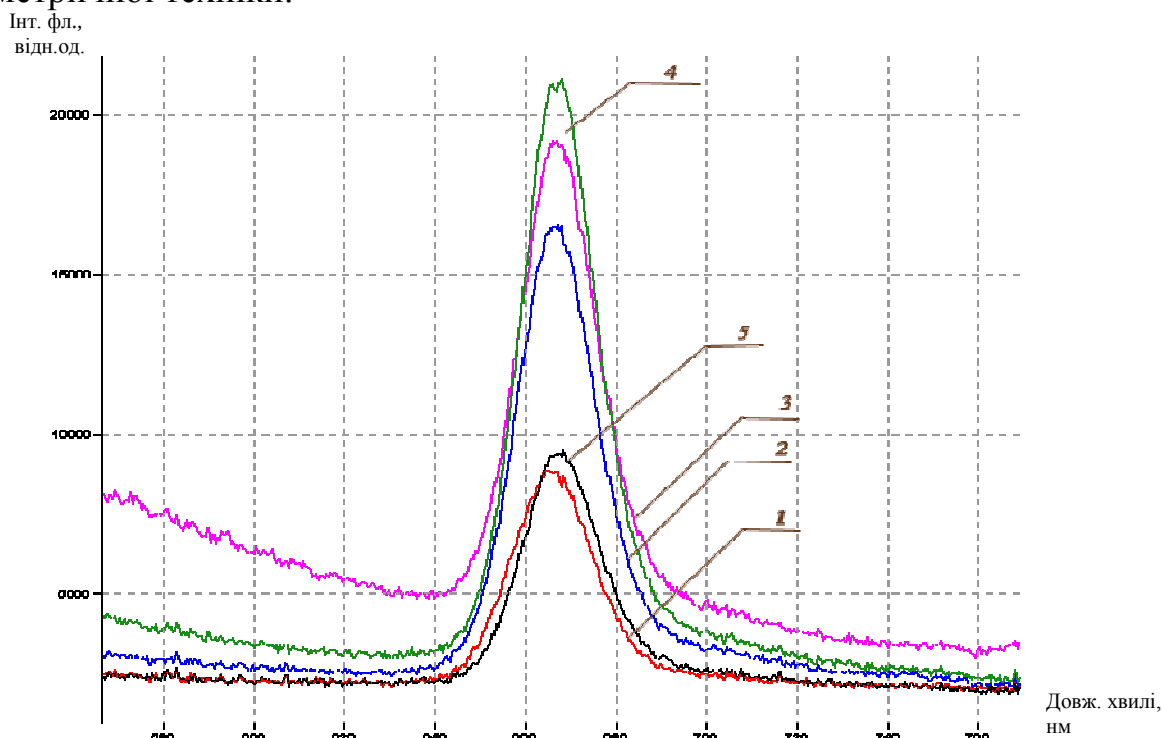


Рис. 5. Рівень флюоресценції пухлини зареєстрований спектрометром Ocean Optics USB4000 протягом 2,5 години

На рис. 6 показана динаміка вивільнення ФС «Фотолон» та рівень його флюоресценції протягом 3 годин із максимумом на 45-60 хв.

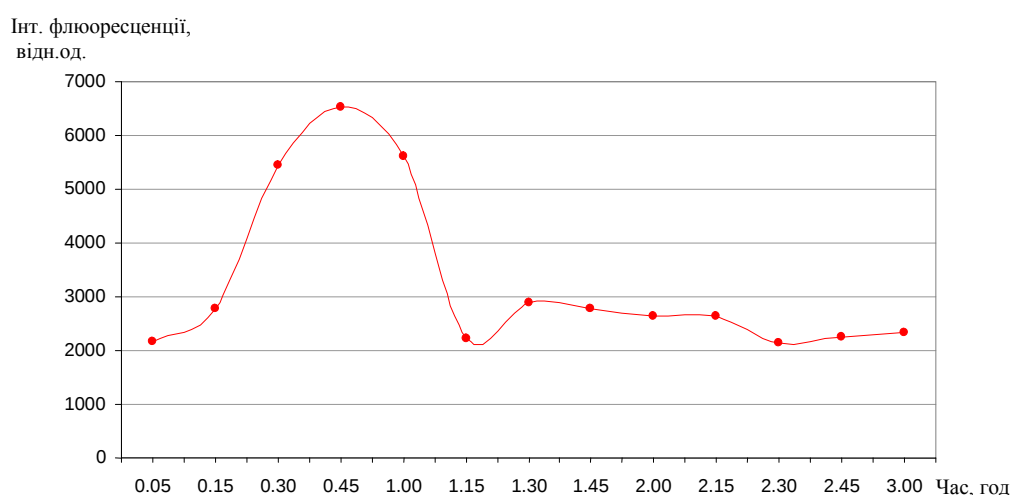


Рис. 6. Динаміка вивільнення ФС в пухлині дослідної тварини

Було проведено низку експериментів щодо зміни кута приймального світловоду спектрометра і світловоду, який іде від лазера. Кут 45° дає кращі результати, однак вони не дозволяють зробити висновок про переваги такого виконання. Також це значно ускладнює систему конструктивно при інвазивному проведенні ФДТ. Також дослідивши конструкцію ПЗС спектрометра, а саме - розмір щілини, через яку проходить світло, ми дійшли висновку про недоцільність використання джгута як приймального волокна. Адже розміри щілини в спектрометрі сталі, тому сигнал, отриманий при збільшенні приймальної площі світловоду урізається розмірами щілини.

Тому останні досліді були проведені на кварцовому моноволокні 400 мкм з роз'ємом SMA 905. Також були проведені досліді на полімерному дуплексі, коли одне волокно іде від спектрометра, інше - від лазера. Обидва дистальні кінці вклеєні в металеві трубочки і з'єднані разом. Отримані результати на моноволокні дозволяють говорити про можливість використання моноволокон для флюоресцентної діагностики.

У подальшому необхідно удосконалити систему реєстрації сигналу флюоресценції, використовуючи отримані результати та знання про будову ПЗС-спектрометрів. Використовуючи ці дані, можна розробити систему на базі ПЗС-елементів, спростивши її конструктивно. Система буде виконувати основні функції для отримання та обробки сигналу флюоресценції пухлини, матиме уніфікований волоконно-оптичний роз'єм та зможе відобразити сигнал в широкому діапазоні довжин хвиль. При цьому, якщо ми використаємо ПЗС-елемент для створення портативної систему реєстрації, ми зможемо отримувати слабкі сигнали флюоресценції, не використовуючи набір світлофільтрів. Однак для створення такої системи необхідно також враховувати власну флюоресценцію тканин та різні види світлового шуму, які можуть значно впливати на отримані дані. Нам необхідно також підібрати оптимальне виконання приймального світловоду із роз'ємом SMA-905 та світловоду для опромінення МС-2, використовуючи результати досліджень.

Висновки

Використовуючи дані проведених нами експериментів, можна зробити висновки про можливість реєстрації сигналу флюоресценції ФС у пухлині за допомогою спектрометричної техніки. Розроблену систему може бути застосовано для контролю рівня накопичення фотосенсибілізатора в пухлинній тканині та визначення часових меж дії лазерного випромінювання на пухлину. Однак потрібно удосконалювати спосіб передачі сигналу реєстрації та опромінення пухлини конструктивно та розробляти систему для реєстрації флюоресценції, використовуючи принцип побудови ПЗС-спектрометрів.

Отримані результати важливі для визначення дози лазерного випромінювання, визначення оптимального часу для дії лазера без пошкодження здорових тканин. Даний метод також можна використати як малоінвазивний

метод дозиметрії при лазерному опроміненні біологічних тканин у процесі фотодинамічної терапії.

Література

1. Куценко В.В. Фотодинамическая терапия злокачественных опухолей / В.В. Куценко, Н.Ф. Гамалея // Онкология – 2003. – Т.5, №1 – С. 69 – 72.
2. Васильченко И.Л. Оптимизация флюоресцентной диагностики при использовании в качестве метаболического предшественника порфиринов 5-аминолевулиновой кислоты / И.Л. Васильченко, С.П. Селиванов, С.Н. Исаева // Медицина в Кузбассе. – 2006. – № 1. – С. 35-38.
3. Корндорф С.Ф. Метод и средство контроля поглощенной дозы при низкоинтенсивной лазерной терапии/ С.Ф. Корндорф, К.В. Подмастерьев, А.В. Дунаев // Контроль. Диагностика. – 2002. – № 10. – С. 18 – 21.
4. Линьков К.Г. Применение лазерной и спектральной аппаратуры для фотодинамической терапии и флюоресцентной диагностики с препаратами. Фотосенс и Аласенс / К.Г.Линьков, А.А. Катышев, С.С.Харнас //Лазерная медицина. – 2002. – Т.6, №1. – С. 48 – 52.
5. Линьков К.Г. Аппаратура для флюоресцентной диагностики и фотодинамической терапии. / К.Г. Линьков, А.Н.Березин, В.Б. Лощенов // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, №4. – С. 114 – 119.
6. Чан Тхи Хай Иен. Фотосенсибилизаторы хлоринового ряда в ФДТ опухолей / Чан Тхи Хай Иен, Г.В. Раменская, Н.А. Оборотова // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т.8 №4. – С. 99 – 104.
7. Гираев К. М. Оптические исследования биотканей: определение коэффициентов поглощения и рассеяния / К. М. Гираев, Н. А. Ашурбеков, О. В. Кобзев // Письма в ЖТФ. – 2003. – Т. 29, № 21. – С. 48 – 54.
8. Гираев К.М. Стационарная спектроскопия биотканей in vivo: флуоресцентные исследования некоторых патологических состояний / К. М. Гираев, Н. А. Ашурбеков, Р. Т. Меджидов // Оптика и спектроскопия. – 2003. – Т.95, №5. – С. 874 – 879.

*Надійшла до редакції
14 червня 2013 року*

© Холін В. В., Чепурна О. М., Єрмак П. В., Завадська Т. С., Войцехович В. С., 2013