

Зиновьев С.В.^{1,2}, Иванов А.В.^{1,3}**Радиотермометрический мониторинг при проведении фототерапии злокачественных опухолей лабораторных животных**

Zinovyev S.V., Ivanov A.V.

Radiothermometric monitoring of malignant tumors in laboratory animals during photodynamic therapy sessions¹ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, г. Москва² ФирЭ им. В.А. Котельникова РАН, г. Фрязино, Московская область³ ФГБУ «ГНЦ лазерной медицины ФМБА России», г. Москва

Цель исследования. Определение динамики температурного статуса первичного узла злокачественных новообразований лабораторных животных методом радиотермометрии в различных условиях проведения фототерапии опухолей. **Материалы и методы.** В исследовании применяли адаптированную технологию контроля флуктуаций температуры в глубине биологических тканей. В экспериментах использовали лабораторных мышей линии C57Bl с развившейся трансплантируемой эпидермоидной карциномой легкого Льюис. В качестве термомодифицирующего агента использовали лазерное излучение 660 и 1270 нм с вариативной дозовой нагрузкой. **Результаты исследования.** Показано, что адаптированная методика радиотермометрии позволяет эффективно определять температурный профиль злокачественных новообразований при проведении фотодинамической и светокислородной терапии. Полученная информация может быть использована для коррекции режима и дозы лазерного воздействия при проведении ФДТ, а также при разработке методов сочетанной термотерапии и ФДТ. **Ключевые слова:** радиотермометрия, фотодинамическая терапия, светокислородная терапия, злокачественные опухоли.

Objective. To determine the dynamics of temperature status of the primary node of malignant neoplasms in laboratory animals by the radiothermometry during photodynamic therapy sessions. **Materials and methods.** The researchers used the adapted technique for controlling temperature fluctuations in the depth of biological tissues. Laboratory mice of C57Bl line with the developed transplantable lung Lewis carcinoma were taken into the experiment. Laser light with wavelengths 660 nm and 1270 nm and variable dose loading was used as a thermomodifying agent. **Results.** It has been shown that the adapted radiothermometric technique allows to effectively determine the temperature profile of malignant neoplasms during photodynamic therapy and light-oxygen therapy. The information obtained may be used for correcting the mode and dosage of laser treatment during PDT as well as for developing combined thermal therapy and PDT. **Key words:** radiothermometry, photodynamic therapy, light-oxygen therapy, malignant tumors.

Введение

Лечение онкологических больных со злокачественными опухолями кожи остается актуальной, нерешенной до конца проблемой, что диктует необходимость дальнейшего научного поиска более эффективных методов терапии данных нозологий. При лечении кожных злокачественных новообразований в ряде публикаций показана эффективность фотодинамической терапии (ФДТ) [19]. В случае реализации классического метода ФДТ глубина прямого действия лазерного излучения ограничена невысокой «прозрачностью» биологических тканей для электромагнитных волн в области 630–675 нм, области терапевтической активности порфириновых фотосенсибилизаторов. Использование ФДТ в сочетании с лазерной гипертермией является перспективным подходом к решению проблемы лечения глубоко расположенных и/или распространенных злокачественных опухолей кожи [16].

Одним из прогрессивных и многообещающих направлений в лазерной медицине является светокислородная терапия, основанная на открытом в конце 80-х – начале 90-х годов прошлого столетия светокислородном эффекте (СКЭ) [8–10], подробно описанном в [11, 12, 24]. Суть СКЭ заключается в прямом фотовозбуждении молекулярного кислорода $^3\text{O}_2$, присутствующего во всех живых системах, в высокореактивное синглетное состояние $^1\text{O}_2$ излучением в его полосах поглощения, прежде всего в его самой эффективной полосе (1265 ± 8) нм, глубоко проникающим в биологические ткани. Во многом аналогичная фотодинамической терапии, беспрепаратная

светокислородная терапия (СКТ) позволяет воздействовать на глубоко расположенные ткани и уже входит в клиническую практику, сочетая в себе фотохимический и термический механизмы воздействия [1, 3, 13, 14, 21, 23].

Гипертермия занимает особое место среди разнообразных модификаторов противоопухолевой терапии. Появление новых технических возможностей как для нагрева опухоли, так и для ее температурного контроля существенно повышает интерес онкологов к гипертермическим технологиям [7]. Эффективность использования локального нагрева опухоли основана на особенностях микрофизиологии злокачественных новообразований (дефектная микроциркуляция, гипоксия, низкое pH и т. д.), что в условиях *in vivo* приводит к селективной гибели опухолевых клеток при температуре 40–44 °C. При создании в зоне опухолевого роста гипертермических условий гибель клеток зависит от значения температуры и времени экспозиции. В клинической практике выявлено также большое значение временного интервала между применением гипертермии и других лечебных факторов.

Разработаны и используются в онкологической клинике методики сочетанной дистанционной пролонгированной ФДТ и лазерной гипертермии у больных со злокачественными опухолями кожи различной морфологии и гистогенеза, а также методики внутритканевой сочетанной ФДТ и лазерной гипертермии [15, 17].

В то же время на экспериментальных моделях некоторыми авторами было показано, что синхронная комбинация ФДТ и селективной дистанционной лазер-

ной гипертермии (ЛГ) не приводит к синергетическому эффекту [4]. Более того, появление некрозов опухолей после интенсивных сеансов ФДТ и гипертермии увеличивает риск генерализации опухолевого процесса. Одним из ключевых моментов при этом, на наш взгляд, является кинетика нагрева и остывания (после прекращения воздействия) области злокачественного новообразования, которую необходимо учитывать при проведении сочетанного воздействия лазерного излучения и других терапевтических агентов.

Цель настоящей работы состоит в определении динамики температурного статуса первичного узла злокачественных новообразований лабораторных животных методом радиотермометрии в различных условиях проведения фототерапии опухолей.

Материалы и методы

В работе использовались самцы линейных мышей C57Bl, полученные из питомника «Столбовая» РАН. К началу экспериментов их возраст составлял 3 месяца, а масса тела около 20–22 г. До и в период экспериментов животные содержались в стандартных условиях вивария ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в соответствии с «Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей».

В качестве модели солидной злокачественной подкожной опухоли была выбрана трансплантируемая эпидермоидная карцинома легкого Льюис (LLC), штамм которой был получен из банка опухолевых штаммов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Трансплантацию солидных опухолей LLC производили гомогенатом опухолевой ткани в стерильном растворе среды 199 [20]. Животных-доноров усыпляли, вырезали кусочки опухоли без некротических участков и измельчали. Полученную массу опухоли разводили средой 199 для культивирования клеток и вводили мышам подкожно в 0,2–0,4 мл среды 199 в паравerteбральную область по стандартным методикам.

Мышей в эксперименты отбирали через 7–10 дней после перевивки, когда размеры опухолевого узла достигали 10–15 мм. Для проведения ФДТ использовали фотосенсибилизатор «Фотодитазин» (производства ООО «БЕТА-ГРАНД», Москва) с максимумом поглощения на 662 нм. Фотосенсибилизатор вводили в хвостовую вену в растворе из расчета 25 мг/кг живого веса в 0,2 мл физраствора. Через 3–4 часа после введения препарата проводили сеанс ФДТ. В качестве источника излучения использовали аппарат АФС-К (производства ООО «Полироник», Москва) с максимумом излучения на 660 нм и мощностью до 500 мВт.

Для проведения сеанса беспрепаратной СКТ использовали экспериментальный образец аппарата с длиной волны излучения 1270 нм и регулируемой мощностью излучения до 3 Вт в непрерывном и импульсно-периодическом режиме генерации (производства ООО «Новые хирургические технологии», Москва). В состав аппарата входят излучатель на основе линейки полупроводниковых диодов ($\lambda = 1268\text{--}1272$ нм, максимальная выходная мощность 3 Вт), совмещенный с оптическими элемен-

тами и световодами вывода излучения, источник питания, блок управления лазером, которые монтируются в едином пластиковом корпусе.

Перед проведением фототерапии у мышей кожный лоскут над зоной роста опухоли эпилировали, и мышей иммобилизовывали на деревянной подложке гипоаллергенным лейкопластырем. Термограмма опухолевого узла регистрировалась до, во время и после воздействия лазерным излучением.

Для микроволновой термографии зоны злокачественного роста использовался специально созданный (по техническому заданию к ООО «Фирма РЭС») многоканальный аппаратно-программный комплекс (МАПК) для неинвазивного выявления температурных аномалий внутренних тканей лабораторных животных на глубине нескольких сантиметров. МАПК производит измерение температуры внутренних тканей путем измерения собственного электромагнитного излучения лабораторных животных в микроволновом диапазоне, рабочий диапазон частот приемного канала от 3150 до 3800 МГц. Мощность излучения, поступающая в антенну, определяется термодинамической температурой, параметрами среды и диаграммой направленности антенны [6]. Аппаратно-программный комплекс оснащен приемными антеннами радиодатчиков, позволяющими использовать МАПК в помещениях без специальной экранировки [5]. Датчики используют цифровые каналы передачи информации, связь с ПЭВМ осуществляется через USB-порт и (или) по интерфейсу RS-232, межпроцессорный интерфейс передачи данных – I²C.

МАПК обеспечивает возможность проведения динамического мониторинга температуры одновременно в нескольких точках тела лабораторных животных, число одновременно функционирующих каналов – не менее двух. Реализована возможность визуализации результатов измерений, хранение, обработка и передача данных о проведенных обследованиях.

Результаты и их обсуждение

Нами был проанализирован температурный профиль злокачественных новообразований при беспрепаратном лазерном воздействии в полосе поглощения молекулярного кислорода 1265 ± 8 нм (СКТ) и при проведении ФДТ с препаратом «Фотодитазин».

Ранее было установлено, что лазерное облучение в полосе поглощения кислорода 1264–1270 нм с плотностью мощности от 1 до 10 Вт/см² и экспозиционной дозой от 40 до 2000 Дж/см² оказывает определенное воздействие на биологические ткани, характеризующееся постепенным нарастанием явлений повреждения в виде специфического воспалительного процесса с последующим быстрым его разрешением [2]. В данной работе методом функциональной микроволновой термографии нами впервые зарегистрирована динамика релаксации гипертермии, индуцированной лазерным излучением с длиной волны 1270 нм. На рис. 1 представлена кинетика охлаждения ткани (термограмма) подкожно привитой опухоли Льюис после воздействия на нее лазерным излучением 1270 нм тепловой мощностью 800 мВт/см² с экспозиционной дозой 720 Дж/см².

В результате 15-минутного воздействия лазерного излучения 1270 нм интегральная температура первичного узла опухоли достигала 43,5–45 °С и затем после прекращения воздействия экспоненциально спадала до базового значения в 37–36 °С в течение 5–6 минут. Как видно из графика, на экспоненциальный тренд накладываются модальные и шумовые компоненты, обусловленные, в первую очередь, хорошо известным фактом нестационарности кровотока в опухолевой ткани.

Необходимо иметь в виду, что температура лабораторных мышей, измеренная *per rectum*, составляет в норме 37–38 °С. Однако для новообразований, локализованных подкожно, она ниже (порядка 34–35 °С), что обусловлено как интенсивным конвективным теплопереносом в среду (воздух), окружающую лабораторное животное, так и недостаточным кровоснабжением подкожных новообразований, особенно их центральной области. Последнее обстоятельство, определяет также и медленную тканевую температурную релаксацию при индуцированной гипертермии зоны злокачественного роста.

Проведено сравнение двух режимов проведения ФДТ. В первом случае использовали высокоинтенсивный режим ФДТ первичного узла опухоли, сенсibilизированной фотодитазин: $\lambda = 660$ нм; плотность мощности 500 мВт/см², время воздействия 600 с, экспозиционная доза 300 Дж/см² (рис. 2). Вследствие воздействия излучения заданных параметров изменение температуры ΔT °С в зоне роста первичного узла опухоли составило 5 °С. После прекращения воздействия излучением фоновые температурные флуктуации в опухолевой ткани становятся низкочастотными и высокоамплитудными (около 1,5 °С), что, скорее всего, свидетельствует о нарушении ее биоэнергетики и микроциркуляции кровотока вследствие деструктивных изменений, вызванных проведенной ФДТ.

Во втором случае был применен щадящий режим ФДТ первичного узла опухоли: $\lambda = 660$ нм, плотность мощности 500 мВт/см², время воздействия 200 с, экспозиционная доза 100 Дж/см² (рис. 3). Вследствие воздействия излучения заданных параметров изменение температуры ΔT °С в зоне роста первичного узла опухоли составила 3,5 °С. После прекращения воздействия излучением изменение амплитудно-частотных характеристик фоновых температурных флуктуаций в опухолевой ткани существенно меньше (например, амплитуда флуктуаций температуры около 0,5 °С), чем в предыдущем случае, что свидетельствует о менее выраженных деструктивных изменениях в ткани опухоли, вызванных проведенной ФДТ.

Нам представляется, что в этих двух случаях задействованы разные физиологические механизмы, что необходимо учитывать при проведении ФДТ в клинике. Для первого случая представляется целесообразным использовать ФДТ в монорежиме, так как особенности термокинетики в первом случае связаны с необратимыми сосудистыми повреждениями в зоне опухолевого роста. Во втором случае сосудистые повреждения транзиторны или вовсе не наблюдаемы, что создает благоприятные условия для сочетанного применения ФДТ и, например, химиопрепаратов.

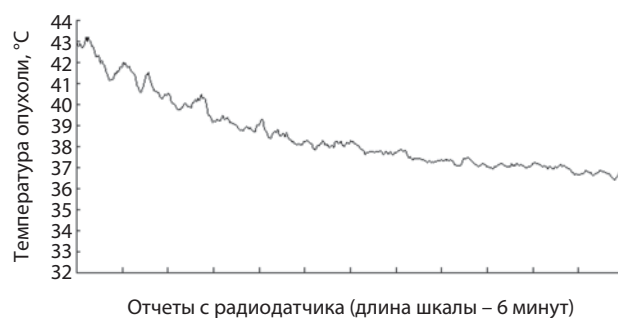


Рис. 1. Термограмма подкожно привитой эпидермоидной карциномы легкого Льюис после воздействия на нее лазерным излучением 1270 нм тепловой мощности 800 мВт/см², 15 минут, экспозиционная доза 720 Дж/см² (светокислородная терапия)

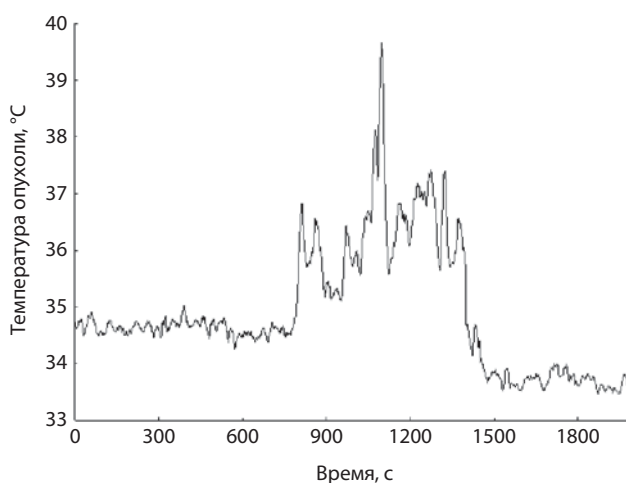


Рис. 2. Фоновая запись термограммы эпидермоидной карциномы легкого Льюис, сенсibilизированной препаратом «Фотодитазин», в течение 12 мин 30 с, затем воздействие излучением 660 нм; 500 мВт/см² в течение 600 с, экспозиционная доза 300 Дж/см²

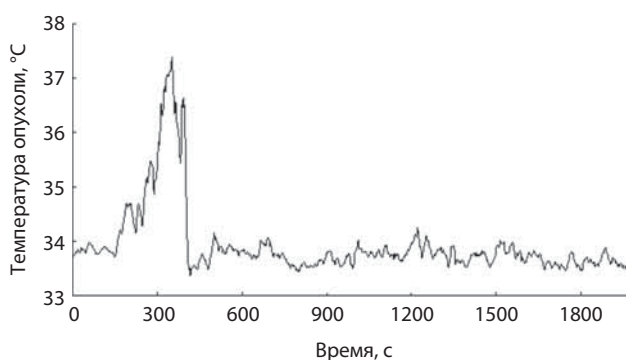


Рис. 3. Фоновая запись термограммы эпидермоидной карциномы легкого Льюис, сенсibilизированной препаратом «Фотодитазин», в течение 3 мин, затем воздействие излучением 660 нм; 500 мВт/см², 200 с, экспозиционная доза 100 Дж/см²

Известно, что повреждение мембранных структур является основой повреждающего действия гипертермических сеансов на клетки экспериментальных (перевиваемых) злокачественных опухолей. Их повреждение приводит к цитотоксическому эффекту, с учетом того, что большинство внутриклеточных ферментов являются мембраносвязанными. Методами электронной микроскопии отмечено повреждение как наружной цитолем-

мы, так и внутрицитоплазматических мембран. Особо выражено повреждение митохондриальных мембран, приводящее к селективному угнетению ферментов аэробного метаболизма [22].

Экспериментально показано, что под влиянием гипертермии происходит значительное усиление противоопухолевого действия химиотерапевтических средств [18]. В ряде случаев препараты, не эффективные в нормотермических условиях, оказались эффективны в условиях гипертермии. Кроме того, локальная термохимиотерапия приводит к значительному повреждению опухоли до операции, что снижает риск интраоперационной диссеминации раковых клеток. Так, у больных раком молочной железы III а, б стадии, которым до операции была проведена термохимиотерапия с последующей экономной резекцией, развитие метастазов отмечено в 5,4% случаев, тогда как в контрольной группе, где операция проводилась без термохимиотерапии, частота развития метастазов составила 16% [17]. Полученные в настоящей работе результаты по сочетанному применению ФДТ и лазероиндуцированной гипертермии необходимо учитывать при разработке методик комбинированного лечения злокачественных новообразований: радиотермотерапии, химиотермотерапии и ФДТ.

Заключение

При применении ФДТ, ЛГ и других методик терапии злокачественных новообразований, локально изменяющих их температуру, целесообразно проводить непрерывный динамический мониторинг глубинной температуры зоны опухолевого роста на протяжении всего времени проведения терапевтического мероприятия.

Использование метода функциональной микроволновой термографии для непрерывного мониторинга температуры зоны опухолевого роста дает возможность определения оптимальной мощности лазерного излучения и длительности экспозиции, а также обеспечивает персонализацию режима локального лазерного воздействия.

Литература

- Алексеев Ю.В., Захаров С.Д., Иванов А.В. Фотодинамический и светокислородный эффекты: общность и различия // Лазерная медицина. – 2012. – Т. 16. – Вып. 4. – С. 40–46.
- Алексеев Ю.В., Иванов А.В., Миславский О.В. и др. Воздействие лазерного излучения с длиной волны 1270 нм на кожу и ткани внутренних органов экспериментальных животных // Медицинская физика. – 2012. – № 1 (53). – С. 40–46.
- Алексеев Ю.В., Иванов А.В., Миславский О.В., Шумилова Н.М. Перспективы применения лазерного излучения с длинами волн 1264–1270 нм (светокислородный эффект) в клинической практике // Актуальные вопросы дерматовенерологии, дерматоонкологии и косметологии. Сборник статей. – М.: МОНИКИ, 2015. – С. 6–9.
- Васильев Д.В., Стуков А.Н., Гельфонд М.Л. Повышение эффективности фотодинамической терапии опухолей с применением фотодитазина // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2. – № 4. – С. 61–66.
- Веснин С.Г. Антенна аппликатор для неинвазивного измерения температуры внутренних тканей биологического объекта // Патент РФ № 2306099 от 31 октября 2005 г.
- Веснин С.Г., Седанкин М.К. Математическое моделирование собственного излучения тканей человека в микроволновом диапазоне // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2010. – № 9. – С. 33–44.
- Гельфонд М.Л., Барчук А.С. Лазерная селективная гипертермия в лечении злокачественных новообразований: метод. рекомендации. – СПб., 2002. – 13 с.
- Данилов В.П., Захаров С.Д., Иванов А.В. и др. Фотодинамическое повреждение клеток в красной и ИК полосах поглощения кислорода // Доклады АН СССР. – 1990. – Т. 311. – № 5. – С. 1255–1258.
- Данилов В.П., Захаров С.Д., Иванов А.В. и др. Спектрально-селективный фотодинамический эффект без экзогенных фотосенсибилизаторов и его возможные применения для фототерапии рака и биостимуляции // Известия АН СССР. Серия Физика. – 1990. – № 8. – С. 1610–1620.
- Захаров С.Д., Еремеев Б.В., Перов С.Н. Сравнение эффектов лазерного воздействия на длинах волн 1,26 и 0,63 мкм на эритроциты // Кратк. сообщ. по физике ФИАН. – 1989. – № 1. – С. 15–16.
- Захаров С.Д., Иванов А.В. Светокислородный эффект в клетках и перспективы его применения в терапии опухолей // Квантовая электроника. – 1999. – Т. 29. – № 3. – С. 192–214.
- Захаров С.Д., Иванов А.В., Вольф Е.Б. и др. Структурные перестройки в водной фазе клеточных суспензий и белковых растворов при светокислородном эффекте // Квантовая электроника. – 2003. – Т. 33. – № 2. – С. 149–162.
- Машалов А.А., Балакирев С.А., Захаров С.Д. и др. Светокислородная лазерная терапия как радиопротектор в комплексном лечении онкологических больных // Медицинская физика. – 2011. – № 4. – С. 50–56.
- Машалов А.А., Балакирев С.А., Иванов А.В. и др. Светокислородная лазерная терапия в профилактике и лечении лучевых реакций и осложнений у онкологических больных // Лазерная медицина. – 2013. – Т. 17. – № 1. – С. 10–14.
- Молочков А.В., Молочков В.А., Казанцева К.В. и др. Использование лазероиндуцированной термотерапии при лечении злокачественных опухолей кожи // Актуальные вопросы дерматовенерологии, дерматоонкологии и косметологии. Сборник статей. – М.: МОНИКИ, 2015. – С. 30–33.
- Молочков А.В., Романко Ю.С., Казанцева К.В. и др. Лазероиндуцированная термотерапия и фотодинамическая терапия в дерматологии: возможности и перспективы // Альм. клин. мед. – 2014. – Т. 34. – С. 30–35.
- Окушко А.Н. Сочетанная фотодинамическая терапия и лазерная гипертермия у больных со злокачественными опухолями кожи: Дисс. ... канд. мед. наук. – М., 2012. – 110 с.
- Осинский С., Ваупель П. Микрофизиология опухолей. – Киев: Наукова думка, 2009. – 256 с.
- Странадко Е.Ф., Иванов А.В. Современное состояние проблемы фотодинамической терапии рака и неопухолевых заболеваний // Биофизика. – 2004. – Т. 49. – № 2. – С. 380–383.
- Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США / Под ред. З.П. Софьиной, А.Б. Сыркина (СССР), А. Голдина, А. Кляйна (США). – М.: Медицина, 1979. – 296 с.
- Юсупов А.С., Захаров С.Д. Лазероиндуцированный светокислородный эффект в онкологической практике // Креативная хирургия и онкология. – 2011. – № 2. – С. 24–32.
- Hildebrandt B., Wust P., Ahlers O. et al. The cellular and molecular basis of hyperthermia // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 2002. – Т. 43. – Р. 33–56.
- Semyachkina-Glushkovskaya O.V., Sokolovski S.G., Goltsov A. et al. Laser-induced generation of singlet oxygen and its role in the cerebrovascular physiology // Progress in Quantum Electronics. – May 2017. DOI: 10.1016/j.pquantelec.2017.05.001.
- Zakharov S.D., Ivanov A.V. Light-oxygen effect as a physical mechanism for activation of biosystems by quasi-monochromatic light (a review) // Biophysics. – 2005. – Vol. 50. – Suppl. 1. – Р. 64–83.

Поступила в редакцию 14.11.2017 г.

Для контактов: Зиновьев Сергей Васильевич
E-mail: svz321@mail.ru