

УДК 616.3:577.3

АНТИМИКРОБНАЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ: ВОЗДЕЙСТВИЕ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА СЛИЗИСТУЮ ТКАНЬ, СОДЕРЖАЩУЮ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОР МЕТИЛЕНОВЫЙ СИНИЙ

© 2012 г. Л. Г. Астафьева, Г. А. Залеская, В. Ю. Плавский

*Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси, 220072 Минск, Беларусь**E-mail: astafev@dragon.bas-net.by*

Поступила в редакцию 06.09.2011 г.

В окончательной редакции 18.10.2011 г.

Рассчитано пространственное распределение поглощенной световой энергии внутри слоев слизистой ткани, содержащей фотосенсибилизатор метиленовый синий. При режимах облучения, типичных для антимикробной фотодинамической терапии (лазерное излучение с длиной волны 670 нм, плотность мощности 150–300 мВт/см², дозы 9–18 Дж/см²), проанализированы условия, необходимые для проникновения света и доставки метиленового синего к очагу инфекции на слизистой ткани. Проведено компьютерное моделирование тепловых полей, оценены максимальные температуры нагрева, рассмотрена степень влияния нагрева на прохождение света через окрашенную ткань.

ВВЕДЕНИЕ

Антимикробная фотодинамическая терапия (АФДТ) предполагает фотохимическую деструкцию патогенных организмов при сочѳтанном применении местного введения фотосенсибилизатора (ФС) с антимикробными свойствами (например, в виде поверхностной аппликации на очаг инфекции) и последующего облучения низкоинтенсивным световым излучением, которое должно в наибольшей мере поглощаться ФС, накопившимся в ткани. Воздействие светового излучения может инициировать как типичное для фотодинамической терапии образование высокореакционного синглетного кислорода, оказывающего антимикробное действие в зоне очага воспаления, так и менее исследованные термические эффекты, вызванные разогревом биотканей, плотивших световое излучение: усиление микроциркуляции крови, термические повреждения тканей, активацию некоторых метаболических процессов. В последние годы сфера терапевтического применения АФДТ стремительно расширяется. Для эффективного использования метода требуются разработка моделей, описывающих транспорт ФС в облучаемые ткани, а также детальные исследования возможных механизмов взаимодействия оптического излучения с компонентами биотканей, окрашенных ФС. Распределение световых полей в слизистых тканях, содержащих ФС, и внутреннее тепловыделение в облучаемой области ранее не анализировались в достаточной мере.

Цель настоящей работы – моделирование пространственного распределения поглощенной энергии и тепловых полей в окрашенной ФС сли-

зистой ткани при воздействии излучения полупроводникового лазера с длиной волны 670 нм.

В качестве модельного ФС при АФДТ слизистых тканей нами выбран краситель метиленовый синий (МС), который широко используется в настоящее время в качестве антимикробного ФС для лечения ряда заболеваний, в том числе локальных поражений слизистых тканей [1–6]. Отметим, что еще в середине прошлого века фотоактивированный МС успешно применялся не только для лечения поверхностных воспалений, но и для дезинфекции крови и ее продуктов. Как катионный краситель МС обладает способностью связываться с карбоксилатными или сульфатными группами органических молекул и легко проникать в клетки микробов [1–3].

В длинноволновой области спектра поглощения водных растворов МС имеется два максимума – на 609 и 664 нм (15000 см⁻¹), обусловленные поглощением димерной и мономерной форм. Световое излучение с длиной волны 670 нм находится вблизи максимума полосы поглощения мономеров МС. Из-за способности к димеризации спектры поглощения МС в этой области зависят от концентрации красителя и природы растворителя. При концентрации раствора МС 0.1% в спектре преобладает поглощение мономерной формы. Квантовый выход флуоресценции водных растворов низок (~0.04). Важным преимуществом МС является высокая поглощательная способность в “терапевтическом окне”. Коэффициент молярного поглощения в максимуме полосы 664 нм равен 85000 л моль⁻¹ см⁻¹, что составляет 14 см⁻¹ при используемой концентрации МС 55 мкг/мл (1.72 × 10⁻⁴ моль/л).

Оптические и термические характеристики слизистой ткани

Ткань	λ , нм	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	g	ρ , г/см ³	c , Дж/(г град)	k , Вт/(м град)	d , мкм
Эпителий	670	1.0	14.0	0.9	0.96	3.56	0.55	500
Подэпителиальный слой	670	1.0	14.0	0.9	0.96	3.56	0.55	500
Мышечная ткань	670	2.0	300	0.9	1.0	4.58	0.31	1000

Метиленовый синий обладает достаточно высокой фотосенсибилизирующей активностью благодаря своим фотофизическим свойствам [7]. Так, после поглощения излучения с $\lambda = 670$ нм часть синглетновозбужденных молекул МС в процессе эффективной интеркомбинационной конверсии $S \rightarrow T$ переходит в долгоживущее триплетное состояние T_1 (квантовый выход $\phi_T = 0.52$). Положение триплетного уровня T_1 МС ($E_T = 11000$ см⁻¹), расположенного выше первого синглетного уровня кислорода $^1\Delta_g$ ($E_\Delta = 7882$ см⁻¹), и низкий потенциал окисления МС, равный 0.52 В, способствуют эффективному тушению триплетных молекул МС кислородом с образованием синглетного кислорода (квантовый выход $\phi_\Delta = 0.50$), оказывающего разрушающее фотодинамическое воздействие на патогенные микроорганизмы. Как известно, при фотодинамической терапии возможно также разрушение патогенных микроорганизмов реакционно-способными радикалами биологических субстратов, образующимися в результате переноса электрона или атома водорода от триплетных молекул ФС. Для МС могут реализоваться оба механизма фотодинамического действия [7]. Наряду с фотодинамической эффективностью важными качествами МС, способствующими широкому применению в АФДТ, являются дешевизна и безопасность препарата.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Моделирование светового воздействия выполнялось для лазерного излучения с длиной волны $\lambda = 670$ нм, которое широко используется в терапевтической практике как обеспечивающее проникновение в глубину ткани. Для терапевтических применений излучения $\lambda = 670$ нм имеется широкий ассортимент разнообразного промышленно выпускаемого оборудования как с лазерными, так и со светодиодными источниками. Так, в Республике Беларусь производятся терапевтические аппараты “Айболит”, “Родник-1” и “Ромашка”. При расчетах использовались типичные режимы светового облучения (плотность мощности 150–300 мВт/см², экспозиция на одно поле до 60 с, доза 2.7–5.4 Дж/см²), экспериментально подобранные в [4–6] при лечении заболеваний слизистых тканей методом АФДТ с применением МС.

При световом облучении поверхности слизистых оболочек в общем случае можно рассматривать прохождение излучения через три основных слоя. Это верхние слои эпителия слизистой ткани, толщина которых в зависимости от типа слизистой в норме изменяется от 30 до 500 мкм, но значительно возрастает при патологиях; слой подслизистой ткани толщиной ~500–1000 мкм, содержащий капилляры; слой ткани основы (толщина от 0.5 до 3 мм), состоящей в основном из мышечной ткани. Оптические и теплофизические характеристики эпителия и подслизистой ткани, согласно литературным данным [8, 9], подобны. Наиболее важным хромофором на длине волны 670 нм является гемоглобин крови, содержащийся в мышечной ткани. Для оптических характеристик мышечной ткани, расположенной под слизистой оболочкой, использовались значения, характерные для мышечной ткани желудка и толстого кишечника [10]. Предполагалось, что при поверхностном облучении слизистой ткани отражается около 30% падающего излучения.

Для теплофизических характеристик тканей определяющим является содержание воды, доля которой в мышечной ткани достигает 70% и в слизистой ~95%. Отметим, что структура слизистых тканей несколько отличается для различных внутренних органов, поэтому для конкретных органов возможны отличия в пространственных распределениях поглощенной энергии и тепловых полей. Использованные в работе толщины слоев, оптические характеристики МС и слизистых тканей на $\lambda = 670$ нм, полученные в [8], а также термические характеристики тканей, взятые из литературы [9], приведены в таблице.

Моделирование пространственного распределения поглощенной энергии и тепловых полей

Процесс нагрева и распределение температуры внутри многослойной слизистой оболочки под действием падающего на поверхность лазерного излучения с длиной волны 670 нм можно описать уравнением теплопроводности с соответствующими граничными и начальными условиями для плоской среды [11], на внешнюю границу которой падает излучение:

$$\rho c \partial T / \partial t = \kappa \nabla^2 T + Q(z), \quad (1)$$

$$-\kappa_1 \frac{\partial T}{\partial z} \Big|_{z=0} = \alpha_{1m} (T - T_m), \quad (2)$$

$$-\kappa_i \frac{\partial T_i}{\partial z} \Big|_{z=z_i} = -\kappa_{i+1} \frac{\partial T_{i+1}}{\partial z} \Big|_{z=z_{i+1}}, \quad (3)$$

$$(T_i - T_{i+1}) \Big|_{z=z_i} = 0, \quad (4)$$

$$T \Big|_{l=0} = T_0, \quad T \Big|_{z=Z_3} = T_3, \quad (5)$$

где T , ρ , c , κ – соответственно температура, плотность, удельная теплоемкость и теплопроводность соответствующего слоя, κ_1 – теплопроводность внешнего слоя слизистой оболочки, t – время, α_{1m} – коэффициент теплообмена внешнего слоя слизистой оболочки с окружающей средой (воздухом), T_m – температура окружающей среды, T_0 – начальная температура, T_3 – температура нижней границы нижнего слоя слизистой оболочки, z_i – толщина соответствующего слоя слизистой оболочки ($i = 1, 2, 3$), ∇^2 – дифференциальный оператор Лапласа, $Q(z)$ – функция источников тепла в слоях слизистой оболочки, записываемая следующим образом:

$$Q(z) = \mu_{a_i} I_0 \prod_{i=1}^3 \exp(-z\mu_{efi}), \quad (6)$$

где I_0 – интенсивность падающего лазерного излучения, μ_{a_i} – коэффициенты поглощения соответствующего слоя, μ_{efi} – эффективные коэффициенты ослабления подкожных слоев, которые определяются из теории диффузии [12] при использовании бесконечного освещающего пучка по уравнению

$$\mu_{efi} = \sqrt{3\mu_{a_i}(\mu_{a_i} + \mu_{s_i})}, \quad i = 1, 2, 3, \quad (7)$$

$$\mu_{s_i} = (1 - g)\mu_{s_i},$$

где μ_{a_i} и μ_{s_i} обозначают коэффициент поглощения соответствующего слоя и редуцированный (или транспортный) коэффициент рассеяния соответственно, μ_{s_i} – коэффициент рассеяния, g – средний косинус угла рассеяния (параметр анизотропии рассеяния). Решение системы уравнений (1)–(5) с учетом выражений (6) и (7) позволит получить изменение температур вдоль направления распространения лазерного излучения (ось Z). Распределение температуры в перпендикулярном направлении предполагается постоянным.

Для решения системы уравнений (1)–(5) строится локально одномерная неявная итерационная схема на пространственно-временной сетке. Полученная система дифференциальных уравнений на каждой итерации решается методом прогонки. Решения описанных граничных задач су-

ществуют и единственны. Решение полученной системы разностных уравнений проводилось численными методами с использованием программ, созданных для расчета световых и температурных полей в многослойной биоткани [11]. Оптические и теплофизические характеристики слоев слизистых оболочек предполагаются постоянными при малых вариациях температур, индуцируемых низкоинтенсивным лазерным излучением. В результате решения краевой задачи (1)–(5) получаем пространственные и временные зависимости температуры.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клиническая эффективность АФДТ определяется используемыми дозами облучения, оптическими свойствами облучаемой ткани и ФС на выбранной длине волны для облучения, а также зависит от концентраций ФС, накопившегося в тканях. Необходимыми условиями для успешной реализации метода являются достаточная глубина проникновения излучения и достаточные концентрации ФС, проникающего в пораженную ткань после поверхностного нанесения.

Достаточная проникающая способность ФС в облучаемую ткань, необходимая для его клинических применений, зависит от физико-химических свойств ФС. Для таких красителей как МС, который относится к гидрофильным соединениям, пассивный транспорт через слизистую оболочку преимущественно определяется диффузией. Поэтому концентрация МС в ткани будет зависеть от скорости его диффузии в ткань и времени t , прошедшего с момента окрашивания. Хотя для многих известных ФС коэффициенты диффузии (D) в биоткани продолжают оставаться неизвестными, для МС имеются необходимые литературные данные для D в слизистые оболочки при температуре 37°C ($D \cong 5 \times 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$) [13]. Это позволило оценить усредненную по объему концентрацию красителя во внутритканевой жидкости $C(t)$ через время t после окрашивания по приближенной зависимости [13]

$$C(t) \approx C_0 \left[1 - \exp(-t\pi D/l^2) \right], \quad (8)$$

где C_0 – концентрация красителя на поверхности слизистой ткани в начальный момент времени $t = 0$, l – толщина биоткани. Скорость диффузии полагалась постоянной во всех точках внутри образца. Вычисленная по уравнению (8) концентрация МС в слизистой ткани толщиной 500 мкм составит через 10 и 30 мин после окрашивания 0.32 и 0.67 соответственно от начальной концентрации $C_0 = 55 \text{ мкг/мл}$. При расчетах не учитывалась возможность фотоиндуцированного ускорения диффузии, отмеченная в [14], а также небольшое

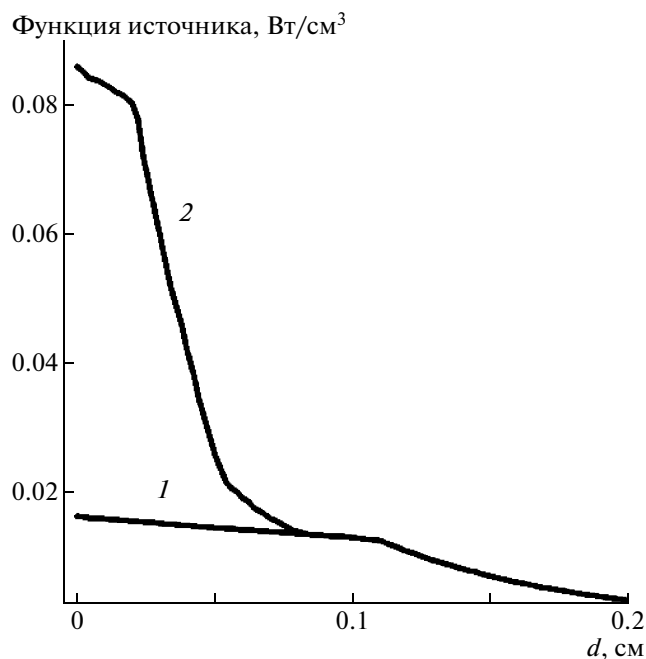


Рис. 1. Распределение поглощенной энергии в слоях слизистой ткани в направлении падающего излучения $I = 0.09 \text{ Вт/см}^2$: 1 – без красителя, 2 – при толщине окрашенного слоя 50 мкм и концентрации МС 18 мкг/мл.

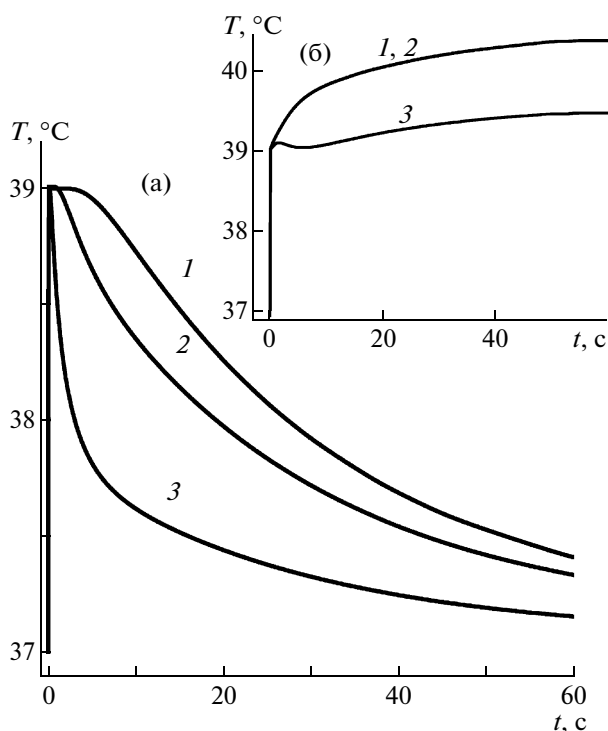


Рис. 2. Зависимость температуры от времени при интенсивностях лазерного излучения 0.09 (а) и $0.9 \text{ Вт/см}^2 \text{ (б)}$: 1 – на поверхности слизистой эпителия, 2 – на нижней границе слизистой эпителия, 3 – в мышечном слое.

увеличение коэффициента диффузии при росте температуры ткани на нескольких градусах.

Для двухкомпонентной среды краситель-слизистая ткань суммарный коэффициент поглощения на длине волны $\lambda = 670 \text{ нм}$ будет определяться как коэффициентами поглощения компонент: ФС и слизистой ткани, так и долей f (содержанием) каждой из них в облучаемой ткани. При указанной достаточно высокой концентрации ФС ($f_{\text{ph}} \geq 0.3$) в облучаемой ткани суммарный коэффициент поглощения μ_a на рассматриваемой длине волны может быть представлен как

$$\mu_a = f\mu_{\text{aph}} + (1-f)\mu_{\text{amm}}. \quad (9)$$

где $\mu_{\text{aph}} = 14 \text{ см}^{-1}$ – коэффициент поглощения МС при начальной концентрации $C_0 = 55 \text{ мкг/мл}$, $f\mu_{\text{aph}} = 4.2 \text{ см}^{-1}$ – коэффициент поглощения МС в ткани через 10 мин после нанесения на поверхность, μ_{amm} – коэффициент поглощения слизистой ткани. В соответствии с данными работы [13] полагалось, что рассеяние света тканью практически не изменяется после диффузии МС во внутритканевую жидкость слизистой оболочки.

В качестве примера на рис. 1 сопоставлены распределения поглощенной энергии в чистой и окрашенной МС слизистой ткани, рассчитанные с использованием оптических характеристик тканей, МС и параметров лазерного излучения. Ослабление излучения усиливается после диффузии МС в ткань. При воздействии излучения $\lambda = 670 \text{ нм}$ максимальное поглощение лазерной энергии происходит вблизи окрашенной поверхности слизистой ткани, поглощение уменьшается с ростом глубины проникновения в слой ткани и сильно отличается для отдельных слоев. Из-за отличий в коэффициентах поглощения окрашенных и неокрашенных слоев слизистой ткани поглощенная энергия не является простой экспоненциальной функцией расстояния от поверхности ткани. Средняя глубина проникновения излучения в окрашенную ткань σ , зависящая от μ_a – суммарного коэффициента поглощения ткани и ФС и от редуцированного (или транспортного) коэффициента рассеяния слизистой ткани μ_s' (7), уменьшается до $\sigma = 0.09 \text{ см}$ по сравнению с глубиной проникновения в чистую ткань ($\sigma_0 \approx 0.20 \text{ см}$). В то же время глубина проникновения диффундирующего в ткань МС за время $t = 10 \text{ мин}$, прошедшее после нанесения красителя, достигнет лишь $\sigma' \sim 4 \times 10^{-3} \text{ см}$, если принять коэффициент проницаемости МС в слизистые ткани равным $(6-8) \times 10^{-6} \text{ см/с}$ [13]. Сопоставление глубин проникновения излучения и МС в слизистую ткань показывает, что при выбранных параметрах излучение проникает через полную толщину окрашенной слизистой ткани. При увеличении концентрации ФС распределение поглощенной энергии по глубине ткани

имеет другой профиль из-за преобладающего поглощения ФС, коэффициент поглощения которого μ_{aph} больше коэффициента поглощения слизистой ткани ($\mu_{\text{aph}} > \mu_{\text{amm}}$).

Результаты моделирования нагрева ткани поглощенным излучением представлены на рис. 2 и рис. 3. На рис. 2 продемонстрированы изменения температуры окрашенной слизистой ткани в зависимости от времени облучения при заданных характеристиках оптического излучения. Из приведенной зависимости следует, что уже на начальном этапе облучения происходит нагрев всех слоев ткани. Характерное время выравнивания температуры по засвечиваемой толщине, зависящее от коэффициента теплопроводности и глубины проникновения излучения в ткань, не превышает ~2–3 с. Стационарные температуры нагрева, сохраняющиеся дольше всего на верхней поверхности эпителия (~10 с), сменяются последующим снижением температур до исходной температуры ткани (37°C) (рис. 2а). Полученное уменьшение температуры со временем может быть следствием превышения оттока тепла вглубь среды за счет теплопроводности над притоком внешней энергии, поступающей при поглощении низкоинтенсивного лазерного излучения. Как следует из зависимостей $T(t)$, представленных на рис. 2б, другой тип зависимостей с характерным ростом температуры в течение всего времени облучения реализуется при увеличении интенсивностей используемого излучения. Так, при десятикратном увеличении интенсивности лазерного излучения отток тепла не обеспечивает даже компенсации притока внешней энергии, необходимой для установления стационарного режима.

По результатам моделирования разогрев ткани ΔT окрашенной ФС не превышает 2°C. Такой рост температуры не вызовет модификации МС или термические изменения биотканей, для коагуляции или термического разрушения которых требуются более высокие температуры. Рисунок 3 демонстрирует распределение температуры нагрева по глубине ткани после прекращения облучения. Во всех случаях в толще ткани перепады температур между поверхностным слоем и нижележащими слоями невелики и находятся в пределах 0.25–0.5°C. Окрашенный слой эпителия нагревается равномерно, некоторое снижение температуры начинается на расстояниях d , превышающих 500 мкм. На глубине 2 мм нагрев ткани отсутствует, температура сохраняется нормальной для обоих используемых режимов облучения и концентраций красителя. Таким образом, при исследуемых режимах АФДТ нагрев окрашенных тканей не должен приводить к изменениям их оптических характеристик, препятствующим проникновению света в глубину ткани.

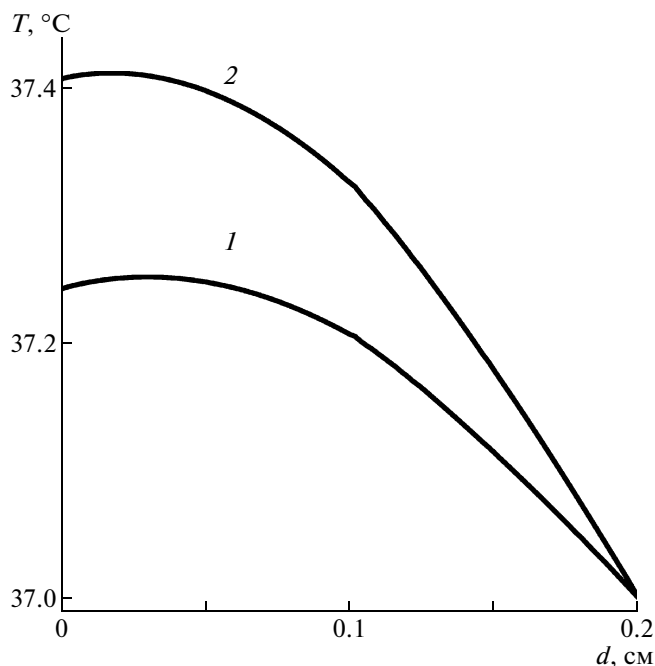


Рис. 3. Распределение температуры по сечению слоев слизистой ткани при концентрации МС 0.18 мкг/мл после облучения лазерным излучением с интенсивностями 0.045 (1), 0.09 Вт/см² (2).

Приведенные результаты позволяют сделать вывод, что при использованных условиях облучения терапевтические эффекты АФДТ имеют нетепловую природу. Световое излучение проникает в окрашенный МС очаг поражения на необходимую глубину. Этому могут способствовать не только правильно подобранные дозы, но и молекулярные характеристики фотосенсибилизатора. В результате обеспечивается его проникновение в ткань, накопление в концентрациях, необходимых для селективного устранения ряда типичных инфекций слизистых тканей излучением $\lambda = 670$ нм при дозах 2.7–5.4 Дж/см².

ВЫВОДЫ

Построена модель распространения излучения в слизистой ткани, содержащей фотосенсибилизатор МС, при типичных для АФДТ характеристиках низкоинтенсивного излучения. Показано, что эмпирически подобранные режимы облучения лазерным излучением с длиной волны 670 нм обеспечивают необходимую глубину проникновения излучения и МС в слизистые ткани, а температуры нагрева окрашенной ткани при использованных концентрациях МС не превышают 2°C. Вследствие этого ожидаемые терапевтические эффекты не будут осложняться термическими изменениями биотканей. Представленные ре-

зультаты могут быть использованы для дальнейшей разработки и оптимизации режимов АФДТ: определения концентраций ФС в очаге поражения, оценки глубины проникновения светового излучения в слизистую ткань и температур разогрева ткани при АФДТ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wainwright M.* // J. of Antimicrobial Chemotherapy. 1998. V. 42. № 1. P. 13.
2. *Wainwright M.* // Photosensitisers in Biomedicine. N.Y.: John Wiley & Sons, 2009. P. 237.
3. *Jori G., Fabris C., Soncin M., Ferro S., Coppellotti O., Dei D., Fantetti L., Chiti G., Roncucci G.* // Lasers in Surgery and Medicine. 2006. V. 38. № 5. P. 468.
4. *Заблодский А.Н., Плавский В.Ю., Третьякова А.И., Заблодский И.А., Зуева Л.Н.* // Охрана материнства и детства. 2004–2005. № 4–5. С. 63.
5. *Плавский В.Ю., Плавская Л.Г., Третьякова А.И., Пархотц М.В., Джагаров Б.М., Курочкина А.Ю., Юдина Н.А.* // Материалы VIII междунар. конф. “Лазерная физика и оптические технологии”. Минск, 2010. Т. 1. С. 225.
6. *Русакевич П.С., Гришанович Р.В., Плавский В.Ю.* // Онкологический журн. 2010. Т.4. № 1. С. 47.
7. *Tardivo J.P., Del Giglio A., Santos de Olivera C., Gabrielli D.S., Junqueira H.C., Tada D.B., Severino D., de Fatima Turchiello R., Baptista M.S.* // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2005. V. 2. № 3. P. 175.
8. *Башкатов А.Н., Генина Э.А., Кочубей В.И., Тучин В.В., Чикина Е.Э., Князев А.Б., Мареев О.В.* // Опт. и спектр. 2004. Т. 97. № 6. С. 1043.
9. *Giering K., Minet O., Lamprecht I., Müller G.* // Laser Induced Interstitial Thermotherapy. Bellingham, Washington: SPIE Press, 1995. V. PM25. P. 45.
10. *Mobley J., Vo-Dinh T.* // Biomedical Photonics Handbook. Boca Raton, London, N.Y., Washington, 2003. Ch. 2/1.
11. *Королевич А.Н., Астафьева Л.Г., Дубина Н.С., Вечеринский С.И., Белсли М.С.* // Опт. и спектр. 2004. Т. 96. № 3. С. 508.
12. *Star W.M.* // Optical-Thermal Response of Laser Irradiated Tissue. N.Y.: Plenum Press, 1995. P. 145.
13. *Генина Э.А., Башкатов А.Н., Чикина Е.Э., Тучин В.В.* // Биофизика. 2007. Т. 52. № 6. С. 1104.
14. *Прикулс В.Ф., Александров М.Т., Васильев Е.Н., Богданов В.Ю., Шаманаева Г.М., Геворков Г.Л.* // Стоматология. 2009. № 1. С. 28.