

ПРИМЕНЕНИЕ ВИДЕОКАПИЛЛЯРОСКОПИИ ДЛЯ МОНИТОРИНГА МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ В КОЖЕ ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

А.В. Гурылева¹, А.С. Мачихин¹, Т.Г. Гришачева², Н.Н. Петрищев²

¹Научно-технологический центр уникального приборостроения Российской академии наук, Москва, Россия

²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Предложено аппаратно-программное и методическое обеспечение для оценки микроциркуляции, отличающееся неинвазивностью, информативностью, а главное – возможностью проводить исследование в ходе фотоактивации. Это делает возможным его применение в качестве дополнительного метода к существующим диагностическим методам при решении исследовательских задач и в клинической практике. Выявленные с помощью разработанного подхода функциональные принципы реакции сосудистой сети на фотодинамическое воздействие представляются полезными для повышения эффективности и безопасности фотодинамической терапии. Разработанная установка позволяет одновременно проводить фотодинамическое воздействие и исследование параметров микроциркуляции методами видеокапилляроскопии и фотоплетизмографии. Фотодинамическое воздействие осуществляют через 3 ч после внутривенного введения фотосенсибилизатора на основе хлорина е6 (5 мг/кг) лазерным излучением с длиной волны 662 нм и плотностью мощности 15 мВт/см² в непрерывном и импульсном режимах. Визуализирующая система установки состоит из микроскопа с большим рабочим расстоянием, цифровой высокоскоростной камеры и оптического фильтра, отсекающего отраженное от исследуемой поверхности излучение фотоактивации. Осветительная система представлена диодным источником излучения с центральной длиной волны 532 нм. Зарегистрированные установкой изображения исследуемого участка кожи обрабатываются в разработанном авторами программном обеспечении для получения морфометрических и гемодинамических данных о микроциркуляции. Для сравнения предложенного подхода с существующими методами параметры кровотока регистрировали также лазерным доплеровским флоуметром. В ходе апробации разработанной установки на инъецированных фотосенсибилизатором крысах получены наборы карт действующих сосудов, фотоплетизмограмм и значений плотности сосудов кожи до, во время и после фотоактивации в двух режимах генерации. Проведен совместный анализ данных видеокапилляроскопии, фотоплетизмографии и лазерной доплеровской флоуметрии. Показано, что предложенный подход позволяет выявить различия в механизмах реакции микроциркуляции на фотодинамическое воздействие с малой плотностью мощности в различных режимах, в частности, несовпадение времени от начала экспозиции до остановки кровотока и начала восстановительного периода.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, микроциркуляция, фотоплетизмография, видеокапилляроскопия, лазерная доплеровская флоуметрия

Контакты: Гришачева Т.Г., e-mail: tgrishacheva@gmail.com

Ссылка для цитирования: Гурылева А.В., Мачихин А.С., Гришачева Т.Г., Петрищев Н.Н. Применение видеокапилляроскопии для мониторинга микроциркуляции в коже при фотодинамической терапии // Biomedical Photonics. – 2023. – Т. 12, № 2. – С. 16–23. doi: 10.24931/2413-9432-2023-12-2-16-23.

VIDEOCAPILLAROSCOPIC MONITORING OF MICROCIRCULATION IN RATS DURING PHOTODYNAMIC THERAPY

Guryleva A.V.¹, Machikhin A.S.¹, Grishacheva T.G.², Petrishchev N.N.²

¹Scientific and Technological Center for Unique Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²First St. Petersburg State Medical University named after Academician I.P. Pavlova, St. Petersburg, Russia

Abstract

The proposed approach to microcirculation assessment is non-invasive, informative, and can be implemented during photoactivation, and thus is perspective both for research tasks and clinical practice. The functional principles of the vasculature response to photodynamic exposure, identified using this technique, also foster the efficiency and safety of photodynamic therapy. The developed setup allows simultaneous photodynamic exposure and studying the microcirculation parameters by videocapillaroscopy and photoplethysmography techniques. Photodynamic action is carried out by 662 nm laser radiation with a power density of 15 mW/cm² in continuous and pulsed modes. The imaging system of the setup consists of a large working distance microscope, an optical filter, and a monochrome camera. The illumination system is based on LED with a central wavelength of 532 nm. The acquired images were processed in order to obtain morphometric and hemodynamic microcirculation data in the inspected skin area. To compare the proposed approach with existing methods, we measured blood flow parameters by a Laser Doppler flowmeter. We tested the developed setup on rats injected with a photosensitizer

and obtained active vessel maps, photoplethysmograms, and skin vessel density values before, during, and after photoactivation in both generation modes. The proposed approach allows to reveal differences in the microcirculation response to photodynamic effects of low power densities in different modes, in particular, the discrepancy between the time from the start of exposure to the cessation of blood flow and the start of the recovery period.

Key words: photodynamic therapy, microcirculation, photoplethysmography, videocapillaroscopy, laser Doppler flowmetry.

Contacts: Grishacheva T.G., e-mail: tgrishacheva@gmail.com

For citation: Guryleva A.V., Machikhin A.S., Grishacheva T.G., Petrishchev N.N. Videocapillaroscopic monitoring of microcirculation in rats during photodynamic therapy, Biomedical Photonics, 2023, vol. 12, no. 2, pp. 16–23. doi: 10.24931/2413–9432–2023–12-2-16–23.

Введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ) представляет собой метод лечения, основанный на сочетании светочувствительного фармакологического препарата – фотосенсибилизатора (ФС) и воздействия электромагнитным излучением определенной длины волны. Фотоактивация ФС инициирует фотохимические реакции, которые сопровождаются образованием активных форм кислорода (АФК), оказывающих цитотоксическое действие на клетки обрабатываемых тканей. ФДТ применяется для лечения ряда дерматологических заболеваний кожи, в том числе акне, псориаза, дерматозов, а также при некоторых формах рака кожи, таких как базальноклеточная и плоскоклеточная карциномы [1, 2]. Влияние ФДТ на микроциркуляцию (МЦ) в коже имеет большое значение для достижения лечебного эффекта.

Исследование МЦ в верхних слоях кожи во время фотоактивации (ФА) позволяет получить информацию о ее функциональном ответе на ФА, необходимую для повышения эффективности последней и безопасности лечения, а также для изучения механизмов действия ФДТ. Среди существующих методов исследования МЦ в коже для выявления особенностей сосудистого ответа при повреждении опухолей после ФА наиболее распространен метод лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ). Он обеспечивает регистрацию изменения перфузии тканей интегрально с некоторого участка кожи на основе эффекта Доплера [3–5].

Лазерная спектроскопия также применяется для анализа МЦ и изучения механизмов фотодинамического действия. Она основана на использовании спектрального анализа отраженного от кожи излучения для определения в режиме реального времени содержания оксигенированного гемоглобина и дезоксигенированного гемоглобина в капиллярах, являющегося одним из ключевых показателей эффективности ФДТ [6]. Известны способы оценки динамики кровотока с помощью флуоресцентных контрастных веществ, в том числе с применением конфокальной микроскопии [7, 8], которая позволяет визуализировать сосудистую сеть *in vivo* с высоким разрешением и оценивать ответы на ФДТ как на уровне эндотелиальных клеток сосудов, так и на уровне отдельного сосуда. Оптическая когерентная томография позво-

ляет визуализировать капиллярную сеть и оценивать окклюзию сосудов после ФДТ в опухоли и в окружающих здоровых тканях [9].

Большинство существующих методов диагностики МЦ при ФДТ хотя и отличаются неинвазивностью и возможностью проведения измерений *in vivo*, но не позволяют осуществлять мониторинг непосредственно во время ФА. Кроме того, методы обладают рядом недостатков: зависимостью от ориентации датчиков и опыта оператора, необходимостью применения подкрашивающих веществ, сложностью и высокой стоимостью аппаратуры.

Одним из перспективных методов прижизненной оценки морфофункциональных характеристик капиллярного русла кожи является видеокапилляроскопия (ВКС) [10, 11]. Она основана на регистрации последовательности изображений кожи и их последующего пространственно-частотного анализа. Результатом видеокапилляроскопических исследований являются карта активных сосудов с действующим кровотоком и гемодинамические характеристики, включая карту скорости движения эритроцитов. ВКС отличается тем, что не требует использования подкрашивающих веществ, обеспечивает получение пространственного распределения исследуемых параметров, проста и доступна в технической реализации, позволяет получить комплексную информацию о морфометрических и гемодинамических параметрах микроциркуляторного русла. В ряде работ ВКС применяется для оценки эффективности ФДТ, определения оптимальных доз ФС и параметров излучения [12].

Аппаратура для ВКС позволяет количественно оценивать перфузию тканей с помощью регистрации и анализа фотоплетизмограмм (ФПГ). Количество отраженного от кожи излучения изменяется вместе с оптической плотностью исследуемых тканей, которая в свою очередь зависит от кровенаполнения [13]. ФПГ представляет собой временной периодический сигнал, пропорциональный интенсивности отраженного от кожи излучения, характеризующий перфузию тканей и используемый для оценки МЦ при решении многих биомедицинских задач [14–16].

Важным свойством методов ВКС и фотоплетизмографии является бесконтактность измерений, что важно для проведения мониторинга во время ФА, однако насколько известно авторам, до настоящего

времени не приведено описание реализации такого исследования. В настоящей работе рассматривается возможность применения ВКС и фотоплетизмографии для изучения ранних изменений МЦ при ФА в зависимости от режима генерации лазерного излучения.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

Исследование проведено на базе ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России. Работа выполнена на крысах-самцах стока Wistar весом 250 ± 25 г, полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово»» ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»», в соответствии с директивой ЕС (The European Council Directive (86/609/EEC)) по соблюдению этических принципов в работе с лабораторными животными. Животных содержали на неограниченном потреблении корма (стандартный рацион для лабораторных крыс K-120 (Информкорм, Россия)) и воды при стандартном двенадцатичасовом режиме (12 ч свет, 12 ч темнота). Температуру поддерживали в пределах $22-25^\circ\text{C}$, относительную влажность – 50–70%. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляла не менее 14 дней.

Перед началом эксперимента животных наркотизировали путем внутривенного введения препаратов Золетил 100 (VIRBAC, Франция) и Ксила (De Adelaar B.V., Нидерланды) в равных объемах в дозе 0,5 мл/кг массы тела. Затем крысу помещали на термостатируемый столик TCAT-2 (Physitemp, США) с постоянным поддержанием ректальной температуры в пределах $37-37,5^\circ\text{C}$. Кожу спины очищали от шерсти механическим путем. Крысы были поделены на 2 группы: для первой проводили ФА в непрерывном режиме генерации, для второй – в импульсном режиме. В качестве контроля использовали интактных крыс. Исследование МЦ в коже проводили через 3 ч после введения в хвостовую вену ФС на основе хлорина е6 радахлорин (РАДА-ФАРМА, Россия) в дозе 5 мг/кг массы тела.

Оборудование

Для оценки МЦ при проведении ФДТ мы разработали и апробировали установку, содержащую лазерный источник ФДТ и систему ВКС, представленную на рис. 1. Система ВКС включает в себя светодиодный источник излучения с центральной длиной волны 520 нм и шириной полосы пропускания 30 нм (LED); микроскоп (М) с большим рабочим расстоянием и увеличением $\times 1,5$; монохромную камеру (К) (Allied Vision Procolica GT2000, Германия) с разрешением 2048×1088 пикселей, размером пикселя $5,5 \times 5,5$ мкм, частотой кадров до 54 Гц, интерфейсом GigE и 12-битным аналого-цифровым преобразователем (АЦП); компьютер (ПК). Выбранная длина волны подсветки позволяет увеличить контрастность капилляров на фоне окружающих тканей. Микроскоп и камера обеспечивают регистрацию изображения кожи крысы с высоким разрешением, увеличением и частотой кадров. Для обеспечения резкого изображения во всем поле зрения исследуемую область накрывали тонкой стеклянной пластиной (СП). Для получения изображений в одинаковых условиях до, во время и после ФДТ перед микроскопом помещали оптический фильтр (Ф), отсекающий излучение в спектральном диапазоне выше 570 нм. Оптическое волокно (ОВ) с микролинзой, передающее лазерное излучение ФА от лазерного аппарата (Л) АЛОД (Алком Медика, Россия) с длиной волны 662 нм и плотностью мощности 15 мВт/см^2 , было зафиксировано в положении, обеспечивающем диаметр лазерного пятна на исследуемой ткани размером 3 мм.

Измерение кровотока проводили как с помощью установки ВКС, так и с использованием лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) (Transonic Systems Inc., BLF21). Мощность диодного источника излучения ЛДФ с длиной волны 780 нм не превышала 2 мВт. Флоуметр позволяет регистрировать тканевую перфузию от 0 до 100 мл/мин на 100 г ткани. Результаты оценивали в перфузионных единицах (пф. ед.). Объем исследуемой с помощью лазерного датчика зоны не превышал 1 мм^3 , глубина зондирования микрогемодинамики составляла до 1 мм.

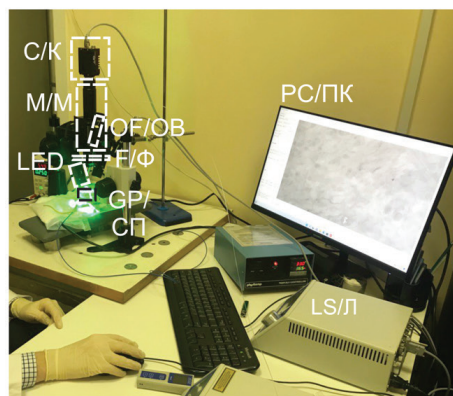
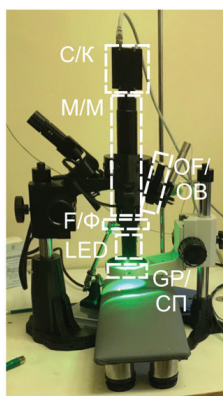
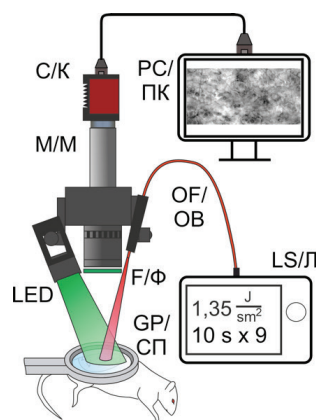


Рис. 1. Схема установки: К – камера, М – микроскоп, ПК – персональный компьютер, ОВ – оптическое волокно, Л – лазерный аппарат, Ф – оптический фильтр, СП – стеклянная пластина.

Fig. 1. Assembled setup: C – Camera, M – Microscope, PC – personal computer, OF – optical fiber, LS – laser, F – optical filter, GP – glass plate.

Протокол эксперимента

Схема проведения эксперимента представлена на рис. 2. Оценку параметров МЦ осуществляли для двух режимов ФА. Экспозиция в непрерывном режиме составила 1,5 мин, экспозиция в импульсном режиме – 3 мин, при этом длительность импульса и интервал между импульсами был 10 с. Плотность энергии в обеих группах соответствовала 1,35 Дж/см².

ВКС проводили за 1,5 мин, до, во время и в течение 20 мин после ФА. До и после ФА регистрировали последовательности изображений из 1000 12-битных кадров с частотой кадров 43 Гц. Для детального анализа изменений МЦ во время экспозиции съемка проводилась с той же частотой кадров, но в течение времени, равного длительности импульса времени ФДТ, то есть 10 с.

Фиксацию параметров кровотока во время ФА с помощью ЛДФ не проводили ввиду контактного характера метода, поэтому данные были зарегистрированы до и после ФА. Для уменьшения влияния помех, информацию считывали в течение 1 мин трижды и за-

писывали наименьшее значение. Показатель МЦ (ПМЦ) регистрировали до ФА в течение 1 мин и сразу после выключения лазерного излучения в течение 20 мин. Для исключения влияния излучения ЛДФ на МЦ в коже крыс с введенным ФС проводили измерения у intactных крыс без ФС в качестве контроля ПМЦ.

Алгоритм цифровой обработки данных ВКС

Полученные методом ВКС последовательности изображений обрабатывали с помощью алгоритма, реализованного в MATLAB и подробно описанного [17]. Основные этапы алгоритма приведены на рис. 3. Предварительная обработка данных служит для улучшения изображений, в частности расширения динамического диапазона, устранения неравномерности освещенности, компенсации смещения образца и пр.

Улучшенные изображения состоят из относящихся к сосудам и к окружающим их тканям пикселям. В пределах каждой последовательности в пикселях, относящихся к сосудам, происходит периодическое

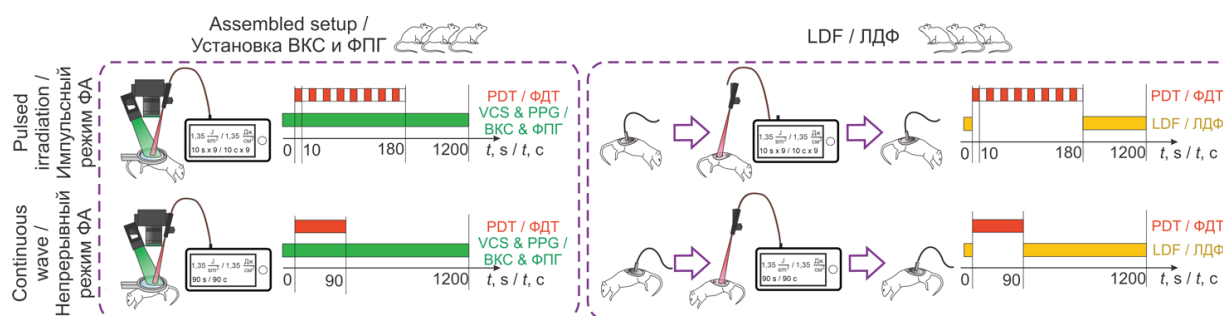


Рис. 2. Протокол эксперимента: ВКС – видеокапилляроскопия, ФПГ – фотоплетизмография, ЛДФ – лазерная доплеровская флоуметрия, ФДТ – фотодинамическая терапия, ФА – фотоактивация.

Fig. 2. Experimental design: VCS – videocapillaroscopy, PPG – photoplethysmography, PDT – photodynamic therapy, LDF – laser Doppler flowmetry.

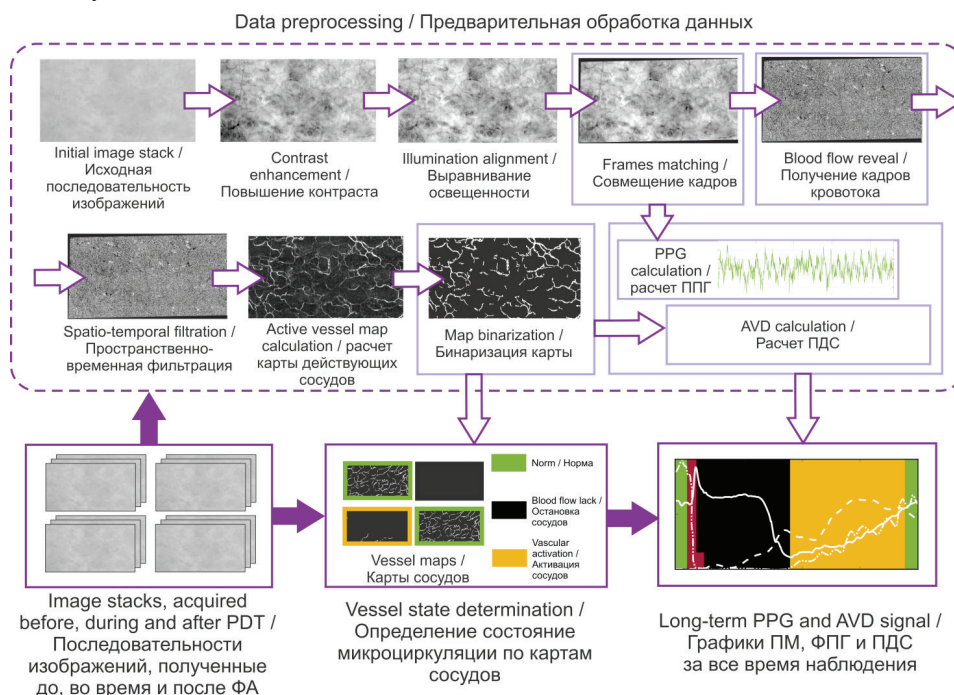


Рис. 3. Алгоритм цифровой обработки данных видеокапилляроскопии и фотоплетизмограмм. ППГ – фотоплетизмография, ПДС – плотность действующих сосудов, ПМЦ – показатель микроциркуляции, ФА – фотоактивация.

Fig. 3. Data processing pipeline. PPG – photoplethysmography, AVD – active vessel density, PDT – photodynamic therapy.

изменение интенсивности, связанное с движением эритроцитов. Интенсивности пикселей окружающих сосудов тканей имеют практически неизменные значения. С помощью пространственно-частотного анализа вычисляются карты сосудов для каждой последовательности изображений. Для каждой такой карты может быть рассчитана измеряемая в процентах плотность действующих сосудов (ПДС), как отношение пикселей, принадлежащих активной капиллярной сети, к общему количеству пикселей изображения. Временные точки, связанные с началом выключения сосудов, полной остановкой кровотока и активацией сосудов, определялись с помощью визуального анализа полученной карты, на основании чего далее была проведена разметка графика.

Снижение или увеличение оптической плотности области исследования, модулированное сердечным ритмом и кровенаполнением, приводит к соответствующему изменению интенсивности пикселей изображений от кадра к кадру. Усреднение интенсивности пикселей каждого изображения всех зарегистрированных последовательностей позволяет получить равный количеству кадров набор точек. Такие точки формируют ФПГ, описывающую перфузию во время эксперимента и измеряющуюся в относительных единицах (отн. ед.). Далее из сигнала ФПГ удаляется низкочастотная составляющая и проводится анализ только амплитуды локальных периодических изменений сигнала, связанных с сердечным ритмом. Однако в настоящей работе для продолжительного анализа перфузии низкочастотная составляющая также является полезным сигналом. Сигнал ФПГ подвергался лишь сглаживанию методом скользящего окна для устранения шумовой составляющей.

Результаты

Данные о состоянии МЦ в коже при ФДТ с помощью разработанной установки ВКС и ЛДФ приведены на рис. 4. Карты сосудов, ФПГ, кривые изменения плотности сосудов, скорости кровотока и ПМЦ приведены на одном графике для двух режимов ФА. Графики размечены цветами в соответствии с состоянием сосудов на основании анализа карт и плотности сосудов.

По данным ЛДФ ПМЦ в коже до начала воздействия колебался от 2,3 до 6,5 пф. ед., среднее значение составило $4,7 \pm 0,5$ пф. ед. Сразу после ФА в непрерывном режиме генерации лазера наблюдалось снижение ПМЦ до $0,4 \pm 0,4$ пф. ед. В течение первых 7 мин происходило постепенное увеличение ПМЦ, к 8 мин этот показатель составлял $3,7 \pm 0,3$ пф. ед. При последующей регистрации кровотока в течение 10 мин происходило значительное увеличение ПМЦ в коже до $9,9 \pm 0,7$ пф. ед. На 20 мин регистрации ПМЦ составлял $7,2 \pm 0,4$ пф. ед.

В группе крыс, подвергнутых воздействию в импульсном режиме, сразу после ФА зарегистрировано снижение ПМЦ до $0,6 \pm 0,4$ пф. ед. К 4 мин наблюдения за МЦР в коже ПМЦ составил $4,7 \pm 0,3$ пф. ед. Далее происходило повышение ПМЦ до $14,5 \pm 0,8$ пф. ед. К концу времени наблюдения за кровотоком ПМЦ составлял $7,4 \pm 0,4$ пф. ед.

До ФА исходные величины ФПГ и ПДС составляли, соответственно, от 0,4 до 0,8 отн. ед. и от 7,1% до 11,9%. Во время лазерной экспозиции наблюдалось снижение ПДС и увеличение амплитуды ФПГ. Снижение ПДС в группе с непрерывной ФА происходило в среднем на 39 с лазерной экспозиции, что соответствовало $0,585 \text{ Дж/см}^2$. В группе с импульсной генерацией снижение тех же величин зарегистрировано в среднем на 44 с, то есть при достижении плотности энергии $0,33 \text{ Дж/см}^2$. При этом полное отсутствие кровотока в группе непрерывного облучения зафиксировано в среднем на 96 с, то есть через 6 с после прекращения лазерного воздействия. В группе с импульсным режимом полное отсутствие кровотока зарегистрировано на 128 с, то есть во время ФА.

Восстановительный период, сопровождающийся появлением кровотока, в группе животных с непрерывным режимом воздействия начинался в среднем через 8 мин после начала лазерной экспозиции, что совпадало с моментом начала повышения значений ФПГ. Регистрация восстановления кровотока у крыс с воздействием в импульсном режиме происходила через 4,7 мин после окончания лазерной экспозиции, однако увеличение значений ФПГ наступало позже, в среднем через 7,5 мин.

Обсуждение

ФДТ зарекомендовала себя как эффективный метод лечения злокачественных новообразований и ряда заболеваний неопухоловой природы [18, 19]. При ФА происходит поглощение энергии лазерного излучения и ее передача в сопряженную систему молекулы ФС. Взаимодействие фотоактивированной молекулы ФС с молекулой кислорода приводит к переносу энергии электронного возбуждения на молекулярный кислород среды с последующим его переводом в более реакционноспособное состояние и образованием АФК, вызывая перекисное окисление липидов и белков в мембранах клеток, обуславливающее их повреждение и гибель. Кроме того, в механизме биологического действия при ФДТ имеет значение нарушение МЦР, а также локальный ответ на иммунные реакции. Состояние МЦР обеспечивает определенное содержание кислорода, необходимого для образования его активных форм в зоне ФА, а также доставку иммунокомпетентных клеток.

Одним из параметров, влияющих на результат фотодинамического воздействия, является режим гене-

рации излучения. На практике, как правило, используется непрерывный режим генерации излучения, заключающийся в облучении участка кожи в течение всего времени экспозиции излучением с постоянными характеристиками и приводящий к интенсивному истощению АФК в результате фотохимических реакций [20, 21]. Импульсный режим, характеризующийся последовательными периодами включения и выключения лазерного источника за время экспозиции, позволяет снизить этот эффект [23, 24]. Оценка влияния разных режимов на МЦ остается актуальной, позволяющей повысить эффективность терапии. В работе проведен многопараметрический анализ МЦ кровотока различными методами.

Отражательная способность кожи в значительной степени определяется наполняющей ткани кровью и ее оксигенацией. При увеличении кровенаполнения и оксигенации происходит повышение поглощательной и снижение отражательной способности ткани. Увеличение ФПГ соответствует большему количеству падающего на сенсор видеокамеры, а значит и отраженного от исследуемой поверхности, излучения. Нарастание величины ФПГ в первые минуты ФА (рис. 4, красная зона) может свидетельствовать о снижении в измеряемом участке кожи количества крови совместно со степенью ее оксигенации. Доза лазерной ФА была незначительная, поэтому в течение некоторого времени после окончания ФА запускался меха-

низм ауторегуляции. Снижение значения ФПГ в период полной остановки кровотока (рис. 4, черная зона) обусловлено включением регуляторных механизмов и изменением МЦ в более глубоких слоях кожи, вызывающих прилив оксигенированной крови к месту воздействия. Этим же процессам соответствует увеличение значений ПМЦ, регистрируемых ЛДФ. Результатом регулятивных процессов после прекращения ФА является восстановление кровотока в доступных для визуализации методом ВКС сосудах (рис. 4, желтая зона) и последующее возвращение к равновесному состоянию с повышением ФПГ и уменьшением ПМЦ до значений, близких к исходным (рис. 4, зеленая зона).

Как в непрерывном, так и в импульсном режимах ФА привела к остановке движения эритроцитов по сосудам и к изменению значений ФПГ, ПМЦ и ПДС, которые через 15 мин после начала ФА вернулись к исходным или близким к ним значениям. Однако характер реакции микрососудов кожи крыс на малые дозы ФА оказался разным для двух режимов. В подвергшейся ФА в импульсном режиме группе животных начало восстановительного периода (рис. 4, желтая зона), то есть возвращение к исходным значениям величин ФПГ, ПМЦ и ПДС, наблюдалось раньше, чем в группе с непрерывной ФА. Кроме того, в восстановительном периоде в группе крыс с воздействием импульсной ФА наблюдалось локальное повышение ПМЦ более

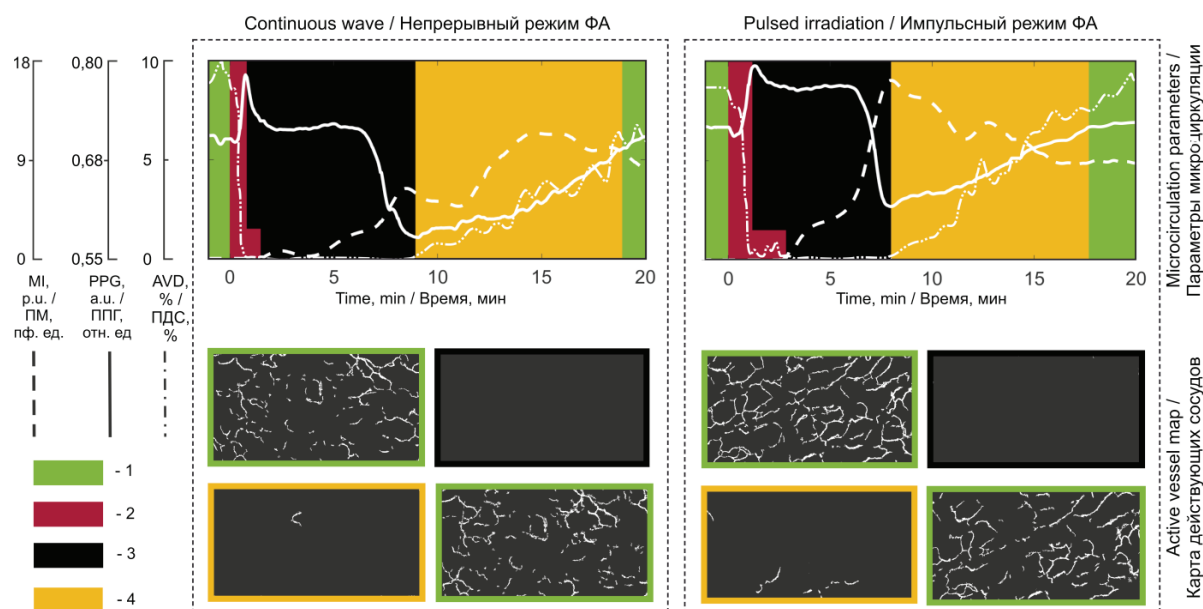


Рис. 4. Динамика морфометрических и гемодинамических параметров микроциркуляции, полученных методами видеокапилляроскопии, фотоплетизмографии и лазерной доплеровской флоуметрии. Периоды исследования: 1 - нормальное состояние сосудов относительно значений ФПГ, 2 - фотоактивации, 3 - остановка кровотока, 4 -восстановительный период. Параметры: ПМЦ – показатель микроциркуляции, ППГ – фотоплетизмография, ПДС – плотность действующих сосудов, ФА – фотоактивация.

Fig. 4. Morphometric and hemodynamic microcirculation parameters acquired by means of videocapillaroscopy, photoplethysmography and laser doppler flowmetry: 1 - normal vessel functioning, 2 - photodynamic activation, 3 - cessation of blood flow, 4 - vascular activation. MI – microcirculation index, PPG – photoplethysmography, AVD - active vessel density.

чем в 3 раза относительно нормы с последующим снижением до нормальных значений.

Полученные данные, показывающие возвращение ФПГ и ПДС в восстановительном периоде к исходным значениям, коррелируют с соответствующим увеличением ПМЦ, полученным с помощью ЛДФ. При этом в период полной остановки кровотока в поверхностных сосудах и нулевых значениях ПДС ПМЦ имел отличные от нуля значения. Такие различия могут свидетельствовать о регистрации параметров МЦ с различной глубины относительно поверхности кожи разными методами. Так, с помощью ЛДФ параметры кровотока в коже исследуются на глубине до 1 мм, то есть в капиллярах и поверхностном артериоловеноулярном сплетении [20]. При этом с помощью ВКС обеспечивается визуализация сосудов, залегающих на глубине до 0,5–1 мм [25, 26].

Заключение

Результаты данного исследования показали принципиальную возможность применения разработанной установки и методики мониторинга МЦ кожи при ФДТ, в том числе непосредственно во время ФА.

Полученные данные коррелируют с современными представлениями о механизмах реакции МЦ на ФА и с результатами, получаемыми распространёнными на практике методами [27, 28].

Разработаны и апробированы методический подход и аппаратно-программное обеспечение новой технологии, направленной на неинвазивное получение карт сосудов, графиков ФПГ и ПДС до, после, а главное, во время ФА. Проведено исследование механизмов реакции кожи в разных режимах генерации фотодинамического воздействия при малых дозах ФА с использованием предложенного подхода. Для двух режимов генерации показано отличие во временных отрезках между началом ФА, остановкой кровотока в сосудах, началом и продолжительностью восстановительного периода. Описанный метод многопараметрической оценки сосудистой сети может служить ценным дополнением к существующим методам анализа МЦ, применяемым в исследованиях и в клинической практике.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания НТЦ УП РАН (проект FFNS-2022-0010).

ЛИТЕРАТУРА

1. Dougherty T.J. et al. Photodynamic Therapy JNCI: Journal of the National Cancer Institute // Oxford Academic. – 1998. – Vol. 90(12). – P. 889-905.
2. Li X. et al. Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer // Nature Publishing Group. – 2020. – Vol. 17(11). – P. 657-674.
3. Korbely M. et al. Nitric oxide production by tumour tissue: impact on the response to photodynamic therapy // Br J Cancer. Nature Publishing Group. – 2000. – Vol. 82(11). – P. 1835.
4. Souza C.S. et al. Long-term follow-up of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy diode laser single session for non-melanoma skin cancer // Photodiagnosis Photodyn Ther. – 2009. – Vol. 6 (3-4). – P. 207-213.
5. Chen D. et al. Intraoperative monitoring of blood perfusion in port wine stains by laser Doppler imaging during vascular targeted photodynamic therapy: A preliminary study // Photodiagnosis Photodyn Ther. Elsevier. – 2016. – Vol. 14. – P. 142-151.
6. Orlova A. et al. Diffuse Optical Spectroscopy Monitoring of Experimental Tumor Oxygenation after Red and Blue Light Photodynamic Therapy // Multidisciplinary Digital Publishing Institute. – 2021. – Vol. 9(1). – P. 19.
7. Khurana M. et al. Intravital high-resolution optical imaging of individual vessel response to photodynamic treatment // J Biomed Opt. J Biomed Opt. – 2008. – Vol. 13(4). – P. 1.
8. Grishacheva T.G. et al. Digital Analysis of Colposcopic Images Before and After Photodynamic Therapy with Open Source Software ImageJ and Fluorescence diagnostics // Optica Publishing Group. – 2020. – P. JW3A.2.
9. Christou E.E. et al. Evaluation of the choriocapillaris after photodynamic therapy for chronic central serous chorioretinopathy. A review of optical coherence tomography angiography (OCT-A) studies // Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. – 2022. – Vol. 260(6). – P. 1823-1835.
10. Gallucci F. et al. Indications and results of videocapillaroscopy in clinical practice // Advances in medical sciences. – 2008. – Vol. 53(2). – P. 149-157.

REFERENCES

1. Dougherty T.J. et al. Photodynamic Therapy JNCI: Journal of the National Cancer Institute. Oxford Academic, 1998. Vol. 90(12), pp. 889-905.
2. Li X. et al. Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer. Nature Publishing Group, 2020, Vol. 17(11), pp. 657-674.
3. Korbely M. et al. Nitric oxide production by tumour tissue: impact on the response to photodynamic therapy. Br J Cancer. Nature Publishing Group, 2000, Vol. 82(11), p. 1835.
4. Souza C.S. et al. Long-term follow-up of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy diode laser single session for non-melanoma skin cancer. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2009, Vol. 6 (3-4), pp. 207-213.
5. Chen D. et al. Intraoperative monitoring of blood perfusion in port wine stains by laser Doppler imaging during vascular targeted photodynamic therapy: A preliminary study. Photodiagnosis Photodyn Ther. Elsevier, 2016, Vol. 14, pp. 142-151.
6. Orlova A. et al. Diffuse Optical Spectroscopy Monitoring of Experimental Tumor Oxygenation after Red and Blue Light Photodynamic Therapy. Photonics 2022, Vol. 9, p. 19. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021. Vol. 9(1), p. 19.
7. Khurana M. et al. Intravital high-resolution optical imaging of individual vessel response to photodynamic treatment. J Biomed Opt, 2008, Vol. 13(4), p. 1.
8. Grishacheva T.G. et al. Digital Analysis of Colposcopic Images Before and After Photodynamic Therapy with Open Source Software ImageJ and Fluorescence diagnostics. Optica Publishing Group, 2020, p. JW3A.2.
9. Christou E.E. et al. Evaluation of the choriocapillaris after photodynamic therapy for chronic central serous chorioretinopathy. A review of optical coherence tomography angiography (OCT-A) studies. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2022, Vol. 260(6), pp. 1823-1835.
10. Gallucci F. et al. Indications and results of videocapillaroscopy in clinical practice. Advances in medical sciences, 2008, Vol. 53(2), pp. 149-157.

11. Machikhin A.S. et al. Exoscope-based videocapillaroscopy system for in vivo skin microcirculation imaging of various body areas. *Optica Publishing Group*. – 2021. – Vol. 12(8). – P. 4627-4636.
12. Da Silva F.A.M., Newman E.L. Dynamic capillaroscopy: a minimally invasive technique for assessing photodynamic effects *in vivo* // *Photochem Photobiol. John Wiley & Sons, Ltd.* – 1993. – P. Vol. 58(6). – P. 884-889.
13. Kamshilin A.A. et al. A new look at the essence of the imaging photoplethysmography. *Scientific Reports. Nature Publishing Group*. – 2015. – Vol. 5(1). – P. 1-9.
14. Kumar M. et al. PulseCam: a camera-based, motion-robust and highly sensitive blood perfusion imaging modality // *Nature Publishing Group*. – 2020. – Vol. 10(1). – P. 1-17.
15. Park J. et al. Photoplethysmogram Analysis and Applications: An Integrative Review // *Front Physiol. Frontiers Media S.A.* – 2022. – Vol. 12. – P. 2511.
16. Allen J. Photoplethysmography and its application in clinical physiological measurement // *Physiol Meas. Physiol Meas.* – 2007. – Vol. 28(3). – C. R1
17. Guryleva A.V. et al. Feasibility of videocapillaroscopy for characterization of microvascular patterns in skin lesions // *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*. – 2022. – Vol. 12147.
18. Dolmans D.E.J.G.J., Fukumura D., Jain R.K. Photodynamic therapy for cancer // *Nature Publishing Group*. – 2003. – Vol. 3(5). – P. 380-387.
19. Gunaydin G., Gedik M.E., Ayan S. Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches // *Front Chem. Frontiers Media S.A.* – 2021. – Vol. 9. – P. 400.
20. Foster T., et al. Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy // *Radiat. Res.* – 1991. – Vol. 126. – P. 296-303.
21. Henderson B., et al. Oseroff, Photofrin photodynamic therapy can significantly deplete or preserve oxygenation in human basal cell carcinomas during treatment, depending on fluence rate // *Cancer Res.* – 2000. – Vol. 60. – P. 525-529.
22. Klimenko V.V., et al. Pulse mode of laser photodynamic treatment induced cell apoptosis // *Photodiagnosis Photodyn Ther.* – 2016. – Vol. 13. – P. 101-107.
23. Wilson B.C., Patterson M.S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy // *Phys Med Biol.* – 2008. – Vol. 53(9). – P. 61-109.
24. Abbot N.C. et al. Laser Doppler Perfusion Imaging of Skin Blood Flow Using Red and Near-Infrared Sources // *Journal of Investigative Dermatology Elsevier*. – 1996. – Vol. 107(6). – P. 882-886.
25. Moço A., Verkruysse W. Pulse oximetry based on photoplethysmography imaging with red and green light: Calibratability and challenges. *J Clin Monit Comput* // *Springer Science and Business Media B.V.* – 2021. – Vol. 35(1). – P. 123-133.
26. Han S. et al. Design of Multi-Wavelength Optical Sensor Module for Depth-Dependent Photoplethysmography // *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*. – 2019. – Vol. 19(24). – P. 5441.
27. Volkov M. V et al. Evaluation of blood microcirculation parameters by combined use of laser // Doppler flowmetry and videocapillaroscopy methods. – 2017.
28. Dremine V. et al. Dynamic evaluation of blood flow microcirculation by combined use of the laser Doppler flowmetry and high-speed videocapillaroscopy methods // *Journal of biophotonics*. – 2019. – T. 12. – №. 6. – C. e201800317.
11. Machikhin A.S. et al. Exoscope-based videocapillaroscopy system for in vivo skin microcirculation imaging of various body areas. *Biomedical Optics Express*, 2021, Vol. 12(8), pp. 4627-4636. *Optica Publishing Group*, 2021, Vol. 12(8), pp. 4627-4636.
12. Da Silva F.A.M., Newman E.L. Dynamic capillaroscopy: a minimally invasive technique for assessing photodynamic effects *in vivo*. *Photochem Photobiol. John Wiley & Sons, Ltd*, 1993, Vol. 58(6), pp. 884-889.
13. Kamshilin A.A. et al. A new look at the essence of the imaging photoplethysmography. *Scientific Reports. Nature Publishing Group*, 2015. Vol. 5(1), pp. 1-9.
14. Kumar M. et al. PulseCam: a camera-based, motion-robust and highly sensitive blood perfusion imaging modality. *Scientific Reports*, 2020, Vol. 10(1), Nature Publishing Group, 2020. Vol. 10(1), pp. 1-17.
15. Park J. et al. Photoplethysmogram Analysis and Applications: An Integrative Review. *Front Physiol. Frontiers Media S.A.*, 2022, Vol. 12, p. 2511.
16. Allen J. Photoplethysmography and its application in clinical physiological measurement. *Physiol Meas*, 2007. Vol. 28(3).
17. Guryleva A.V. et al. Feasibility of videocapillaroscopy for characterization of microvascular patterns in skin lesions. *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, 2022, Vol. 12147.
18. Dolmans D.E.J.G.J., Fukumura D., Jain R.K. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2003, Vol. 3(5). *Nature Publishing Group*, 2003, Vol. 3(5), pp. 380-387.
19. Gunaydin G., Gedik M.E., Ayan S. Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches. *Front Chem. Frontiers Media S.A.*, 2021. Vol. 9. P. 400.
20. Foster T., et al. Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy. *Radiat. Res*, 1991, Vol. 126, pp. 296-303.
21. Henderson B., et al. Oseroff, Photofrin photodynamic therapy can significantly deplete or preserve oxygenation in human basal cell carcinomas during treatment, depending on fluence rate. *Cancer Res*, 2000, Vol. 60, pp. 525-529.
22. Klimenko V.V., et al. Pulse mode of laser photodynamic treatment induced cell apoptosis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2016, Vol. 13, pp. 101-107.
23. Wilson B.C., Patterson M.S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol*, 2008, Vol. 53(9), pp. 61-109.
24. Abbot N.C. et al. Laser Doppler Perfusion Imaging of Skin Blood Flow Using Red and Near-Infrared Sources. *Journal of Investigative Dermatology Elsevier*, 1996, Vol. 107(6), pp. 882-886.
25. Moço A., Verkruysse W. Pulse oximetry based on photoplethysmography imaging with red and green light: Calibratability and challenges. *J Clin Monit Comput. Springer Science and Business Media B.V.*, 2021, Vol. 35(1), pp. 123-133.
26. Han S. et al. Design of Multi-Wavelength Optical Sensor Module for Depth-Dependent Photoplethysmography. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2019. Vol. 19(24), p. 5441.
27. Volkov M. V et al. Evaluation of blood microcirculation parameters by combined use of laser. *Doppler flowmetry and videocapillaroscopy methods*, 2017.
28. Dremine V. et al. Dynamic evaluation of blood flow microcirculation by combined use of the laser Doppler flowmetry and high-speed videocapillaroscopy methods. *J Biophotonics*, 2019, Vol. 12(6).