

BIOMEDICAL PHOTONICS

BIOMEDICAL PHOTONICS –

научно-практический, рецензируемый,
мультидисциплинарный журнал.
Выходит 4 раза в год.
Тираж – 1000 экз., ежеквартально.

Издательство «Агентство МОРЕ».

Адрес издательства: Москва,
Хохловский пер., д. 9

Редакция:

Зав. редакцией	Иванова-Радкевич В.И.
Научный редактор	проф. Мамонтов А.С.
Литературный редактор	Моисеева Р.Н.
Переводчик	Урлова А.Н.
Компьютерный дизайн	Кренева Е.И.
Компьютерная верстка	Ганеева И.Я.

Адрес редакции:

Россия, Москва, 2-й Боткинский пр., д. 3
Тел. 8 (495) 945-86-60
www: PDT-journal.com
E-mail: PDT-journal@mail.ru

Адрес для корреспонденции:

125284, Москва, а/я 13

Свидетельство о регистрации ПИ
№ ФС 77-51995, выдано 29.11.2012
Федеральной службой по надзору
в сфере связи, информационных технологий
и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Индекс по каталогу агентства

«Роспечать» – 70249

Редакция не несет ответственности за
содержание рекламных материалов.

В статьях представлена точка зрения авторов,
которая может не совпадать с мнением
редакции журнала.

К публикации принимаются только статьи,
подготовленные в соответствии с правилами
для авторов, размещенными на сайте журнала.

Полное или частичное воспроизведение
материалов, опубликованных в журнале,
допускается только с письменного
разрешения редакции.

УЧРЕДИТЕЛИ:

Национальная Фотодинамическая Ассоциация
Московский научно-исследовательский онкологический институт
им. П.А. Герцена

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР:

Филоненко Е.В., доктор медицинских наук, профессор, руководитель
Центра лазерной и фотодинамической диагностики и терапии опухолей
Московского научно-исследовательского онкологического института
им. П.А. Герцена (Москва, Россия)

ЗАМ. ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:

Грин М.А., доктор химических наук, профессор, заведующий
кафедрой химии и технологии биологически активных соединений
им. Н.А. Преображенского Московского технологического университета
(Москва, Россия)

Лощенов В.Б., доктор физико-математических наук, профессор,
заведующий лабораторией лазерной биоспектроскопии в Центре
естественно-научных исследований Института общей физики
им. А.М. Прохорова РАН (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Каплан М.А., доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела
фотодинамической диагностики и терапии Медицинского радиологического
научного центра им. А.Ф. Цыба (Обнинск, Россия)

Каприн А.Д., чл.-корр. РАН, доктор медицинских наук, профессор,
генеральный директор Национального медицинского исследовательского
радиологического центра Минздрава России (Москва, Россия)

Лукьянец Е.А., доктор химических наук, профессор, заведующий
лабораторией Государственного научного центра «Научно-
исследовательский институт органических полупроводников и красителей»,
(Москва, Россия)

Миронов А.Ф., доктор химических наук, профессор кафедры химии
и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского
Московского технологического университета (Москва, Россия)

Пономарев Г.В., доктор химических наук, профессор, главный научный
сотрудник Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН
(Москва, Россия)

Романко Ю.С., доктор медицинских наук, профессор, руководитель
научно-организационного отдела Медицинского радиологического научного
центра им. А.Ф. Цыба (Обнинск, Россия)

Странадко Е.Ф., доктор медицинских наук, профессор, руководитель
отделения лазерной онкологии и сосудистой терапии Государственного
научного центра лазерной медицины Минздрава России (Москва, Россия)

Якубовская Р.И., доктор биологических наук, профессор, руководитель
отделения модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии
Московского научно-исследовательского онкологического института
им. П.А. Герцена (Москва, Россия)

Истомин Ю.П., доктор медицинских наук, профессор, заведующий
лабораторией фотодинамической терапии и гипертермии с группой
химиотерапии Республиканского научно-практического центра онкологии
и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова (Минск, Республика
Беларусь)

Bolotine L., профессор научно-исследовательского центра автоматизации
и управления Нанси (Нанси, Франция)

Douplik A., профессор Университета Райерсона (Торонто, Канада)

Steiner R., профессор, почетный директор Института лазерных технологий
в медицине и измерительной технике Университета Ульма (Ульм, Германия)

BIOMEDICAL PHOTONICS

FOUNDERS:

National Photodynamic Association
P.A. Herzen Moscow Cancer Research Institute

EDITOR-IN-CHIEF:

Filonenko E.V., Dr. Sci. (Med.), professor, head of the Centre of laser and photodynamic diagnosis and therapy of tumors in P.A. Herzen Moscow Cancer Research Institute (Moscow, Russia)

DEPUTY CHIEF EDITOR:

Grin M.A., Dr. Sci. (Chem.), professor, chief of department of Chemistry and technology of biological active substances named after Preobragenskiy N.A. in Moscow Technological University (Moscow, Russia)

Loschenov V.B., Dr. Sci. (Phys and Math), professor, chief of laboratory of laser biospectroscopy in the Natural Sciences Center of General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD:

Kaplan M.A., Dr. Sci. (Med.), professor, chief of department of photodynamic diagnosis and therapy in A.F. Tsyb «Medical Radiological Research Center» (Obninsk, Russia)

Kaprin A.D., Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Med.), professor, general director of National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Lukyanets E.A., Dr. Sci. (Chem.), professor, chief of laboratory in State Research Center «Research Institute of Organic Intermediates and Dyes» (Moscow, Russia)

Mironov A.F., Dr. Sci. (Chem.), professor of department of Chemistry and technology of biological active substances named after Preobragenskiy N.A. in Moscow Technological University (Moscow, Russia)

Ponomarev G.V., Dr. Sci. (Chem.), professor, principal researcher in the V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry (IBMC) of RAS (Moscow, Russia)

Romanko Yu.S., Dr. Sci. (Med.), professor, chief of scientific organizational in A.F. Tsyb «Medical Radiological Research Center» (Obninsk, Russia)

Stranadko E.F., Dr. Sci. (Med.), professor, chief of department of laser oncology and vascular therapy in State research centre of laser medicine of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Yakubovskaya R.I., Dr. Sci. (Biol.), professor, chief of department of modifiers and protectors for cancer therapy in P.A. Herzen Moscow Cancer Research Institute (Moscow, Russia)

Istomin Yu.P., Dr. Sci. (Med.), professor, chief of laboratory of photodynamic therapy and hyperthermia with group of chemotherapy in N.N. Aleksandrov Republican Scientific and Practical Centre of Oncology and Radiology» (Minsk, Belarus)

Bolotine L., PhD, professor of Research Center for Automatic Control of Nancy (Nancy, France)

Douplik A., PhD, professor in Ryerson University (Toronto, Canada)

Steiner R., PhD, professor, the honorary director of Institute of Laser Technologies in Medicine and Metrology at Ulm University (Ulm, Germany)

BIOMEDICAL PHOTONICS –

research and practice, peer-reviewed, multidisciplinary journal.

The journal is issued 4 times per year.

The circulation – 1000 copies., on a quarterly basis.

The publisher «Agentstvo MORE».

The Address of Publisher:

Moscow, Khokhlovskiy lane., 9

Editorial staff:

Chief of the editorial staff	Ivanova-Radkevich V.I.
Science editor professor	Mamontov A.S.
Literary editor	Moiseeva R.N.
Translator	Urlova A.N.
Computer design	Kreneva E.I.
Desktop publishing	Ganeeva I.Ya.

The Address of Editorial Office:

Russia, Moscow, 2nd Botkinskiy proezd, 3

Tel. 8 (495) 945-86-60

www: PDT-journal.com

E-mail: PDT-journal@mail.ru

Corresponding to:

125284, Moscow, p/o box 13

Registration certificate ПИ № ФС 77-51995, issued on 29.11.2012 by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology, and Mass Media of Russia

The subscription index

of «Rospechat» agency – 70249

The editorial staff is not responsible for the content of promotional material. Articles represent the authors' point of view, which may be not consistent with view of the journal's editorial board. Editorial Manuscripts are accepted for publication only if they are prepared according to the rules for authors represented on the site of the journal. Whole or partial presentation of the material published in the Journal is acceptable only with written permission of the Editorial board.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Морфофункциональные характеристики саркомы М-1 крыс после фотодинамической терапии с производным бактериохлорофилла а

В.В. Южаков, Н.В. Бурмистрова, Н.К. Фомина, Л.Н. Бандурко, Л.Е. Севаньяева, А.В. Старовойтова, Н.Д. Яковлева, М.Г. Цыганова, И.Э. Ингель, П.В. Островерхов, М.А. Каплан, М.А. Грин, А.Г. Мажуга, А.Ф. Миронов, В.Н. Галкин, Ю.С. Романко 4

Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия в комбинированном лечении холангиоцеллюлярного рака

А.А. Ширяев, Г.Х. Мусаев, М.В. Лощенов, А.В. Бородкин, В.В. Левкин, Н.Л. Охотникова, В.В. Волков, В.И. Макаров, В.Б. Лощенов 15

Исследование внутриклеточного распределения кристаллических наночастиц мезо-тетра(3-пиридил) бактериохлорина

Ю.С. Маклыгина, А.В. Бородкин, А.В. Рябова, Д.В. Поминова, Е.А. Макарова, Е.А. Лукьянец, В.Б. Лощенов 25

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

Методы оценки насыщения кислородом гемоглобина в клинической офтальмологии

С.Ю. Петров, А.А. Антонов, И.А. Новиков, Т.А. Савельева 31

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

Фотодинамическая терапия стойкой кератоакантомы лба

С.Д. Дибирова 44

ЮБИЛЕИ

Профессору Вере Алексеевне Титовой – 75 лет

48

ПРЕСС-РЕЛИЗ

Пресс-релиз V Всероссийской конференции с международным участием «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика»

49

ORIGINAL ARTICLES

Morphofunctional characteristics of rat sarcoma M-1 after photodynamic therapy with the bacteriochlorophyll a derivative

Yuzhakov V.V., Burmistrova N.V., Fomina N.K., Bandurko L.N., Sevanjkaeva L.E., Starovoytova A.V., Yakovleva N.D., Tsyganova M.G., Ingel' I.E., Ostroverkhov P.V., Kaplan M.A., Grin M.A., Mazhuga A.G., Mironov A.F., Galkin V.N., Romanko Yu.S. 4

Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy in combined treatment of cholangiocarcinoma

Shiryayev A.A., Musaev G.Kh., Loshenov M.V., Borodkin A.V., Levkin V.V., Okhotnikova N.L., Volkov V.V., Makarov V.I., Loshenov V.B. 15

Study of subcellular distribution of crystalline meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin nanoparticles

Maklygina Yu. S., Borodkin A.V., Ryabova A.V., Pominova D.V., Makarova E.A., Lukyanets E.A., Loshchenov V.B. 25

REVIEWS OF LITERATURE

Techniques of evaluation of hemoglobin oxygen saturation in clinical ophthalmology

Petrov S.Yu., Antonov A.A., Novikov I.A., Savelieva T.A. 31

CASE REPORTS

Photodynamic therapy for resistant forehead keratoacanthoma

Dibirova S.D. 44

ANNIVERSARIES

Professor Vera Alexeevna Titova – 75 y.o.

48

PRESS RELEASE

Press release about V Russian international conference «Photodynamic therapy and fotodiagnosis»

49

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ САРКОМЫ М-1 КРЫС ПОСЛЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ С ПРОИЗВОДНЫМ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА А

В.В. Южаков¹, Н.В. Бурмистрова¹, Н.К. Фомина¹, Л.Н. Бандурко¹, Л.Е. Севаньякаева¹,
 А.В. Старовойтова¹, Н.Д. Яковлева¹, М.Г. Цыганова¹, И.Э. Ингель¹, П.В. Островерхов²,
 М.А. Каплан¹, М.А. Грин², А.Г. Мажуга^{3,4}, А.Ф. Миронов², В.Н. Галкин¹, Ю.С. Романко¹

¹Национальный медицинский исследовательский радиологический центр Минздрава России, Москва, Россия

²Московский технологический университет МИРЭА, Москва, Россия

³Национальный исследовательский технологический университет МИСиС, Москва, Россия

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Резюме

В работе описаны результаты изучения функциональной морфологии саркомы М-1 крыс после фотодинамической терапии с применением в качестве фотосенсибилизатора дисульфидного производного бактериопурпуринида (дисульфид-БПИ). Методы исследования включали иммуноокрашивание на PCNA и CD31, определение митотической активности и апоптотической гибели опухолевых клеток, а также компьютерный анализ микроскопических изображений. Показано, что фотоиндуцированное противоопухолевое действие обусловлено разрушением сосудистого русла саркомы М-1, быстрым ингибированием пролиферативной активности и девитализацией опухолевых клеток путем апоптоза и некроза. Есть основания полагать, что в ранние сроки после фотодинамической терапии деструкция микроциркуляторного русла и фотоцитостатический шок опухолевых клеток с последующим развитием некроза обусловлены прямым воздействием светового потока на сенсибилизированные клеточные элементы паренхимы и стромы опухолей. Эффективность фотодинамической терапии с новым фотосенсибилизатором определяется последовательностью деструктивных и воспалительных изменений в паренхиме опухолей и окружающих тканях, а также репопуляционным потенциалом выживших после лечения опухолевых клеток.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, бактериохлорофилл а, дисульфидное производное бактериопурпуринида, фотосенсибилизатор, саркома М-1, апоптоз, некроз, иммуногистохимия, PCNA, CD31.

Для цитирования: Южаков В.В., Бурмистрова Н.В., Фомина Н.К., Бандурко Л.Н., Севаньякаева Л.Е., Старовойтова А.В., Яковлева Н.Д., Цыганова М.Г., Ингель И.Э., Островерхов П.В., Каплан М.А., Грин М.А., Мажуга А.Г., Миронов А.Ф., Галкин В.Н., Романко Ю.С. Морфофункциональные характеристики саркомы М-1 крыс после фотодинамической терапии с производным бактериохлорофилла а // Biomedical Photonics. – 2016. – Т. 5, № 4. – С. 4–14.

Контакты: Южаков В.В., e-mail: yuzh_vad@mail.ru

MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF RAT SARCOMA M-1 AFTER PHOTODYNAMIC THERAPY WITH THE BACTERIOCHLOROPHYLL A DERIVATIVE

Yuzhakov V.V.¹, Burmistrova N.V.¹, Fomina N.K.¹, Bandurko L.N.¹, Sevanjkaeva L.E.¹,
 Starovoytova A.V.¹, Yakovleva N.D.¹, Tsyganova M.G.¹, Ingel' I.E.¹, Ostroverkhov P.V.²,
 Kaplan M.A.¹, Grin M.A.², Mazhuga A.G.^{3,4}, Mironov A.F.², Galkin V.N.¹, Romanko Yu.S.¹

¹National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

²Moscow Technological University (MIREA), Moscow, Russia

³National University of Science and Technology MISiS, Moscow, Russia

⁴Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract

The study of the functional morphology of rat sarcoma M-1 after photodynamic therapy using bacteriopurpurinimide disulfide derivative (disulfide-BPI) as a photosensitizer is described. The research methods included immunohistochemistry for PCNA and CD31, evaluation of mitotic activity and apoptosis of tumor cells, as well as computer analysis of microscopic images. Photoinduced antitumor effect was shown to be due to the destruction of sarcoma M-1 vascular bed, the rapid inhibition of proliferative activity and devitalization of tumor cells by apoptosis and necrosis. It is reasonable to suppose that in the early stages after photodynamic therapy destruction of the microvasculature and photocytostatic shock of tumor cells with subsequent development of necrosis are caused by direct influence of the light flux on sensitized cellular elements in parenchyma and stroma of tumors. The efficiency of photodynamic therapy with the novel photosensitizer is determined by the sequence of destructive and inflammatory changes in tumor parenchyma and surrounding tissues, as well as repopulation potential of tumor cells survived after treatment.

Key words: photodynamic therapy, bacteriochlorophyll *a*, bacteriopurpurinimide disulfide derivative, photosensitizer, sarcoma M-1, apoptosis, necrosis, immunohistochemistry, PCNA, CD31.

For citations: Yuzhakov V.V., Burmistrova N.V., Fomina N.K., Bandurko L.N., Sevankaeva L.E., Starovoytova A.V., Yakovleva N.D., Tsyganova M.G., Ingel I.E., Ostroverhov P.V., Kaplan M.A., Grin M.A., Majouga A.G., Mironov A.F., Galkin V.N., Romanko Yu.S. Morphofunctional characteristics of rat sarcoma M-1 after photodynamic therapy with the bacteriochlorophyll *a* derivative, *Biomedical Photonics*, 2016, T. 5, No. 4, pp. 4–14 (in Russian).

Contacts: Yuzhakov V.V., e-mail: yuzh_vad@mail.ru

Введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ) представляет собой перспективный метод лечения целого ряда онкологических и неонкологических заболеваний [1, 2]. В основе механизма ФДТ лежит цитотоксическое действие синглетного кислорода и других высокоактивных биологических окислителей, которые образуются в ходе фотохимических реакций при межмолекулярном переносе энергии от возбужденного светом сенсibilизатора к кислороду ткани [3–5]. В деструкции опухолевых клеток ключевую роль играют три компонента ФДТ: фотосенсибилизатор (ФС), локальное облучение опухоли светом определенной длины волны, соответствующей пику поглощения сенсibilизатора, и кислород [1, 4, 5]. Известно, что на эффективность ФДТ влияют несколько факторов: доза ФС, временной интервал от его введения до светового воздействия, а также мощность дозы, плотность световой энергии и режим облучения [2, 6–8].

Считается, что для избирательного разрушения опухолей или для длительного сдерживания их роста при ФДТ требуется сочетание четырех основных факторов: гибель опухолевых клеток, разрушение сосудов опухолей, воспалительная реакция и иммунный ответ организма [9]. Кроме того, следует учитывать избирательность накопления ФС в паренхиме солидных опухолей в связи с особенностями их васкуляризации и формирования микроциркуляторного русла. Согласно результатам экспериментальных и клинических исследований, рост опухоли полностью зависит от неоваскуляризации, а сосудистые аномалии и формирующееся микроокружение не только способствуют прогрессии солидных неоплазий, но также могут привести к снижению эффективности химиотерапии, лучевой терапии и иммунотерапии [10, 11]. Не исключено, что аномальное кровоснабжение опу-

холи может также препятствовать адекватному накоплению и распределению в опухолях ФС.

При создании новых ФС для лечения крупных, глубокозалегающих опухолей особый интерес представляют производные бактериохлорофилла *a* с интенсивным поглощением в длинноволновой области спектра [12]. Так, в работе [13] показано, что ФДТ с использованием дипропоксибактериопурпуринида в виде наноструктурированной водной дисперсии обеспечивает высокую противоопухолевую активность в системах *in vitro* и *in vivo*.

Целью данного исследования являлось изучение механизма действия ФДТ с применением в качестве ФС конъюгата, содержащего две молекулы дипропоксибактериопурпуринида с остатком цистамина (дисульфид-БПИ), на морфофункциональные характеристики солидной соединительнотканной перевиваемой опухоли, а также анализ эффективности воздействия на деструкцию сосудов, пролиферативную активность и гибель клеток саркомы М-1. Для синтеза целевого соединения был взят О-пропилоксим-N-пропоксибактериопурпуринимид (дипропокси-БПИ), полученный взаимодействием бактериопурпурина с пропоксиамином [14]. Взаимодействием дипропокси-БПИ с цистамином в присутствии конденсирующего агента EEDQ (N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина) был получен дисульфид-БПИ, который был исследован в настоящей работе.

Материал и методы

Работа была выполнена на половозрелых самках белых беспородных крыс с имплантированной подкожно с внешней стороны левого бедра саркомой М-1 от животного-опухоленосителя. Перевивку саркомы и определение объема опухолей осуществляли по ранее описанной нами методике [15].

При достижении объемов опухолей 0,8–1,5 см³ животных методом рандомизации распределяли на две группы – контрольную и опытную (по 15 особей в каждой). Дисульфид-БПИ вводили крысам опытной группы внутривенно из расчета 2,5 мг/кг массы тела. ФДТ проводили в период максимального индекса контрастности опухоль/здоровая ткань – через 2,5–3,0 ч после введения ФС. Для лазерного облучения использовали терапевтический полупроводниковый лазер «Латус» (длина волны излучения 810 нм). Плотность энергии лазерного облучения составляла 300 Дж/см², плотность мощности – 0,51 Вт/см². После проведения ФДТ животных выводили из опыта через 3 ч, 1 и 3 сут по 5 особей на каждый срок для изучения функциональной морфологии саркомы М-1.

Опухоли животных контрольной группы не подвергались воздействиям.

Опухолевые узлы выделяли под тиопенталовым наркозом. Ткань опухоли в виде пластинок, ориентированных вдоль длинной оси, фиксировали в течение 24 ч в кислой жидкости Буэна, обезвоживали и заливали в «Гистомикс». Общую гистологию саркомы М-1 изучали на срезах толщиной 5 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином. Иммуногистохимические (ИГХ) исследования на серийных срезах проводили методом биотин-экстравидин-пероксидазного комплекса с использованием моноклональных мышиных антител к ядерному антигену пролиферирующих клеток – PCNA (клон PC10, «Thermo Fisher scientific», 1:200), конъюгированных с биотином, и поликлональных кроличьих антител к маркеру эндотелия – адгезионной молекулы тромбоцит/эндотелиальной клетки-1 – PECAM-1 (CD31, М-20-R, «Santa Cruz», 1:20).

Эндогенную пероксидазу блокировали в 3%-ом растворе перекиси водорода. В блокирующий буфер добавляли 1% бычьего сывороточного альбумина и 0,1% Тритона X-100. До нанесения антител к PCNA депарафинированные срезы, погруженные в цитратный буфер (рН 6,0), прогревали в микроволновой печи (5 мин, 720 Вт). В растворе первичных антител препараты инкубировали в течение ночи во влажной камере при 4°C с последующей промывкой в буферном растворе. Для визуализации PCNA после нанесения биотинилированных первичных антител и отмывки препаратов в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) на срезы наносили экстравидин-пероксидазный комплекс («Sigma», 1:400). Для ИГХ выявления эндотелия сосудистого русла с антителами к CD31 применяли биотинилированные козы антитела к кроличьим IgG (BA-1000, «Vector Lab», 1:250) и экстравидин-пероксидазный комплекс («Sigma», 1:400). Субстратную пероксидазу проявляли диаминобензидином (Liquid DAB+, «Dako»). Оптимальные условия иммуноокрашивания определяли по соотношению интенсивности иммуноположительной реакции к «фону».

Гистологические препараты изучали в микроскопе Leica DM 1000 с микрофотосъемкой на цифровую камеру Leica ICC50 HD. Интегральные показатели рассчитывали с помощью системы компьютерного анализа микроскопических изображений [16] с применением прикладной лицензионной программы AnalySIS 5.0 (Soft Imaging System GmbH, Германия) согласно основным принципам стереологии в морфометрии.

В работе использовали следующие параметры: объемное содержание паренхимы опухолей ($Vv_{по}$, %) и некроза ($Vv_{НЕКРОЗА}$, %) как отношение суммарных площадей жизнеспособной паренхимы и зон некроза/деструкции ткани, соответственно, при окрашивании срезов гематоксилином и эозином к общей площади среза опухолевого узла; объемное содержание опухолевой ткани с пролиферирующими клетками (Vv_{PCNA} , %) по отношению суммарной площади PCNA-положительной паренхимы к общей площади среза опухолевого узла.

Относительную фракцию пролиферирующих клеток в паренхиме опухоли рассчитывали по формуле:

$$\Phi_{PCNA} (\%) = Vv_{PCNA} / Vv_{по} \times 100$$

Митотический индекс и индекс апоптоза в зонах роста опухолевых узлов определяли по стандартной методике [17] при иммерсионном увеличении микроскопа при подсчете не менее 3000 ядер клеток.

Ангиоархитектуру саркомы М-1 и распределение микрососудов в паренхиме опухолей при иммуноокрашивании на CD31 оценивали согласно принципам, описанным в работах [18, 19]. Качественные характеристики сосудов определяли в перитуморальной области и в так называемых «горячих точках» («hot spots»), представляющих зоны солидного строения паренхимы опухоли, содержащие наибольшее количество капилляров и мелких венул, т.е. участки наиболее интенсивной неоваскуляризации. Перитуморальная область включала периферический край опухолей и окружающую их соединительную ткань.

Для оценки уровня значимости межгрупповых различий полученных показателей использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Статистическую обработку полученных результатов выполняли с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США). Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

У животных контрольной группы паренхима саркомы М-1 имела, в основном, солидный тип строения с оксифильными участками спонтанного некроза в центральных отделах опухолевых узлов (рис. 1а). Иногда разветвленные поля некроза, ограничен-

ные локусами кровоизлияний и плазморрагии, распространялись до кожных покровов с появлением над опухолью щелевидных полостей, заполненных гомогенным эозинофильным содержимым. В зонах солидного строения полиморфные клетки саркомы веретеновидной или неправильной формы были плотно упакованы (рис. 1б). В полях зрения наблюдали относительно многочисленные фигуры митоза и единичные клетки, погибающие путем апоптоза. В зонах роста, расположенных в области подкожной

клетчатки и на границе с подлежащими мышцами, паренхима саркомы М-1 контурировалась за счет иммуноокрашивания ядер опухолевых клеток на PCNA. Был отчетливо выражен градиент снижения интенсивности иммуноокрашивания на ядерный антиген пролиферирующих клеток от периферии к центру опухолевых узлов (рис. 1г). Опухолевые клетки с интенсивной положительной реакцией их ядер на этот циклин концентрировались вокруг сосудов (рис. 1д).

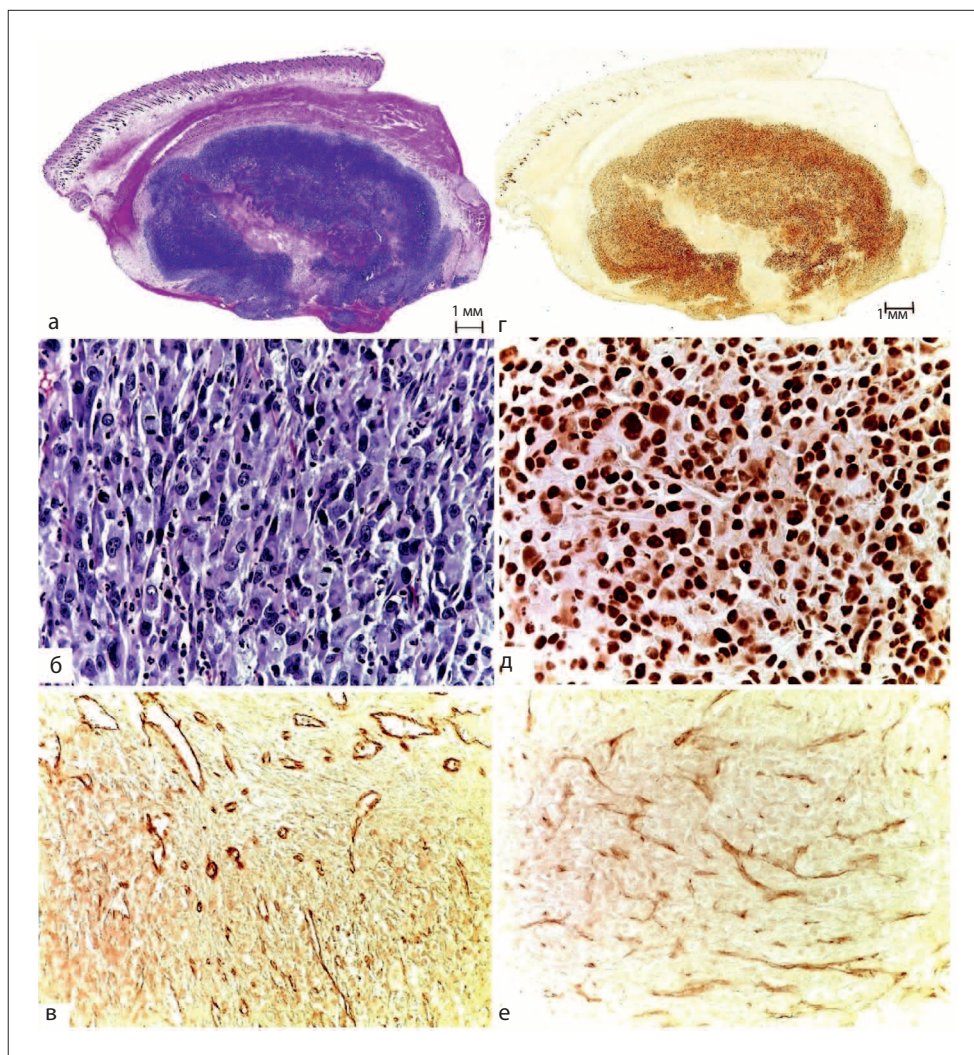


Рис. 1. Гистологический рисунок и функциональная морфология саркомы М-1 в контроле:
 а, б – окрашивание гематоксилином и эозином;
 в – иммуноокрашивание эндотелия сосудов с антителами к CD31 в перитуморальной зоне;
 г, д – иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA;
 е – иммуноокрашивание эндотелия сосудов с антителами к CD31 в «горячей точке» паренхимы
 Увеличение: $\times 125$ (в, е); $\times 250$ (б, д)

Fig. 1. Histological pattern and functional morphology of sarcoma M-1 in the control group:
 а, б – hematoxylin and eosin staining;
 в – vascular endothelial immunostaining with anti-CD31 antibodies in peritumoral area;
 г, д – immunohistochemical reaction of cell nuclei with anti-PCNA antibodies;
 е – vascular endothelial immunostaining with anti-CD31 antibodies in a «hot spot» of parenchyma
 Magnification: $\times 125$ (в, е); $\times 250$ (б, д)

В перитуморальной зоне микроциркуляторное русло состояло из тонкостенных сосудов капиллярного и синусоидного типа. От венул, располагающихся в здоровой ткани, ответвлялись капиллярные петли, врастающие в паренхиму опухоли. Сосуды, врастающие в паренхиму, были местами расширены, выстланы уплощенным эндотелием с реакцией их ядер на PCNA. На срезах, иммуноокрашенных на CD31, отчетливо определялась выраженная неоднородность распределения в перитуморальной области и в паренхиме кровеносных сосудов. Наиболее васкуляризированной выглядела периферия опухолей, прилегающая к подкожной клетчатке (рис. 1в). В немногочисленных «горячих точках» солидного строения паренхимы были видны уплощенные, часто разветвленные микрососуды (рис. 1е). На серийных срезах просматривалось соответствие между зональной «плотностью» капиллярного русла в паренхиме саркомы М-1 и интенсивностью реакции ядер опухолевых клеток на PCNA.

Результаты количественного анализа исследованных параметров саркомы М-1 у животных контрольной группы представлены в табл.

Макроскопически через 3 ч после ФДТ границы опухолей были стерты из-за отека тканей. На поверхности кожи над опухолями появлялась неярко выраженная эритема. На обзорных препаратах под кожей над опухолями был виден массивный экссудативный выпот, а в окружающей их мышечной ткани – обширные полости, заполненные гомогенным эозинофильным содержимым (рис. 2а). Паренхима опухолевой ткани выглядела «разрыхленной» и менее интенсивно окрашенной гематоксилином и эозином с неравномерным снижением иммуноокрашивания на PCNA (рис. 2г). По патоморфологическим критериям значительная часть опухолевых клеток находилась в состоянии цитотоксического шока с характерным уплотнением кардио- и цитоплазмы и появлением межклеточных щелей, так называемый

Таблица

Количественные характеристики исследованных параметров саркомы М-1 в контроле и после ФДТ с дисульфид-БПИ (M±m)

Table

Quantitative characteristics of the studied parameters of sarcoma M-1 in control and after PDT with disulfide-BPI (M±m)

Показатель Index	Группа Group	Время после ФДТ Time after PDT		
		3 ч 3 hour	1 сут 1 day	3 сут 3 days
Объем опухолей, см ³ Tumor's size, cm ³	Контроль Control	0,94±0,09	1,22±0,18	1,60±0,26
	ФДТ PDT	1,14±0,14	1,13±0,18	0,59±0,09*
Объемное содержание паренхимы опухолей, при окрашивании гематоксилином и эозином, % The volume content of tumor parenchyma by hematoxylin and eosin staining, %	Контроль Control	66,1±4,7	68,5±5,5	69,7±3,6
	ФДТ PDT	61,6±9,0	39,3±11,0*	23,4±6,3**
Объемное содержание зон некроза, % The volume content of necrosis areas, %	Контроль Control	33,9±4,7	31,5±5,5	30,3±3,6
	ФДТ PDT	38,4±9,0	60,7±11,0*	76,6±6,3**
Объемное содержание PCNA-положительных клеток в паренхиме опухолей (F _{PCNA}), % The volume content of PCNA-positive cells in tumor parenchyma (F _{PCNA}), %	Контроль Control	78,2±2,0	71,1±2,5	80,7±3,1
	ФДТ PDT	56,9±7,8*	26,1±11,2**	38,0±12,4**
Митотический индекс, % Mitotic index, %	Контроль Control	1,98±0,08	1,90±0,20	1,84±0,04
	ФДТ PDT	1,62±0,04*	1,18±0,23*	1,84±0,11
Индекс апоптоза, % Apoptosis index, %	Контроль Control	0,34±0,02	0,29±0,02	0,31±0,02
	ФДТ PDT	0,58±0,06**	0,39±0,04	0,43±0,01

*p<0,05; ** p<0,01 по сравнению с соответствующим контролем

*p<0,05; ** p<0,01 compared with the corresponding control

«shrink effect» – эффект сжатия опухолевых клеток. При этом цитоплазма опухолевых клеток выглядела конденсированной, а их ядра имели гиперхромный вид (рис. 2б). Опухолевые клетки были диссоциированы друг от друга, либо соединены между собой в небольшие группы, между которыми были видны широкие оптически прозрачные щели. Кроме того, вдоль разрушающихся сосудов появлялись островки клеток в ранней стадии коагуляционного некроза. В отдельных участках опухолей сохраня-

лись фрагменты паренхимы с реакцией ядер клеток на PCNA (рис. 2д).

Гистологические исследования показали, что большинство сосудов в паренхиме опухолей и окружающих их тканях были паретически расширены и заполнены стазируемыми эритроцитами. В стенках кровеносных сосудов определялись набухание, вакуолизация и гибель эндотелия. Соединительная ткань была отечна, пропитана плотными эозинофильными массами и инфильтрирована клетками

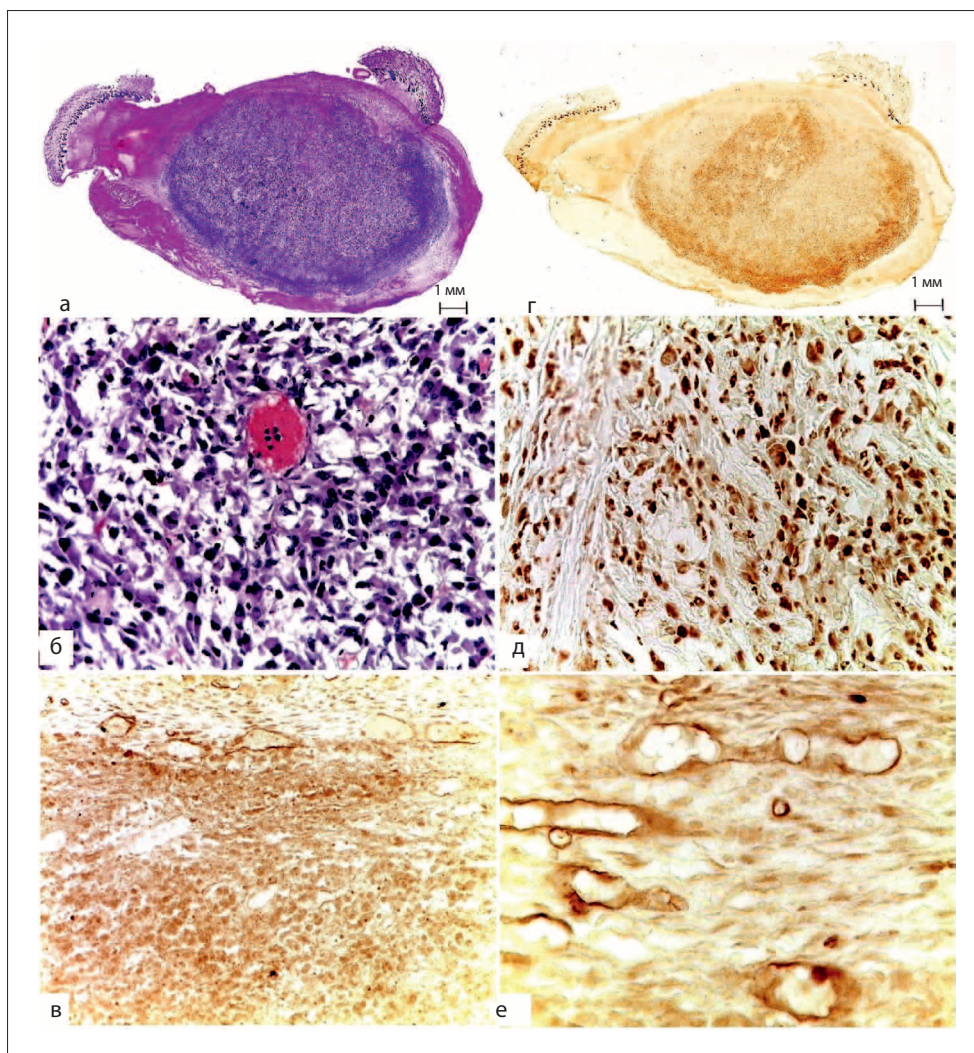


Рис. 2. Функциональная морфология саркомы М-1 через 3 ч после ФДТ с дисульфид-БПИ:
 а, б – окрашивание гематоксилином и эозином;
 в – иммуноокрашивание эндотелия сосудов с антителами к CD31 в перитуморальной зоне;
 г, д – иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA;
 е – иммуноокрашивание эндотелия сосудов с антителами к CD31 в «горячей точке» паренхимы
 Увеличение: $\times 125$ (в); $\times 250$ (б, д, е)

Fig. 2. Functional morphology of sarcoma M-1 3 hours after PDT with disulfide-BPI:
 а, б – hematoxylin and eosin staining;
 в – vascular endothelial immunostaining with anti-CD31 antibodies in peritumoral area;
 г, д – immunohistochemical reaction of cell nuclei with anti-PCNA antibodies;
 е – vascular endothelial immunostaining with anti-CD31 antibodies in a «hot spot» of parenchyma
 Magnification: $\times 125$ (в); $\times 250$ (б, д, е)

воспалительного инфильтрата. Местами видны были кровоизлияния. Эндотелий сосудов в перитуморальной области давал неравномерное «пунктирное» иммуноокрашивание на CD31 (рис. 2в). В солидных участках паренхимы контуры сосудов были расплывчатые, местами не определялись (рис. 2е). И лишь в зоне локализации «выживших» опухолевых клеток капиллярная сеть была изменена мало.

По данным морфометрии, через 3 ч после ФДТ значение Φ_{PCNA} в паренхиме опухолей статистически значимо снизилось в 1,4 раза относительно соответствующего контроля (табл.). В участках паренхимы с пролиферирующими опухолевыми клетками было зарегистрировано уменьшение их митотической активности на 20% и повышение индекса апоптотической гибели в 1,7 раза.

Через 1 сут после ФДТ усиливался отек облученных тканей, а кожа приобретала серовато-синюшный цвет. На обзорных препаратах обширные зоны опухолей были представлены полями дистрофически измененной и некротизированной ткани с кровоизлияниями и очагами плазматического пропитывания (рис. 3а). В некоторых случаях глубина повреждения достигала основания опухолевых узлов. Фрагменты саркомы М-1 с пролиферирующими клетками сохранялись в виде узких полосок на границе с подкожной клетчаткой и небольших разветвленных островков в основании опухолей над подлежащими мышцами (рис. 3г). Значительная часть опухолевой ткани была представлена полями некроза с эозинофильными контурами погибших сосудов (рис. 3б). Однако при ИГХ окрашивании на PCNA было видно, что в отдельных участках выжившие после ФДТ опухолевые клетки сохраняли репопуляционный потенциал (рис. 3д). Результаты иммуноокрашивания на CD31 свидетельствовали, что разрушение тканевых структур саркомы М-1 отчетливо связано с деструкцией стенок сосудистого русла (рис. 3в,е).

Согласно результатам анализа микроскопических изображений, через 1 сут после ФДТ с дисульфид-БПИ статистически значимо относительно контроля снижались содержание жизнеспособной паренхимы, Φ_{PCNA} и митотическая активность опухолевых клеток в 1,7, 2,7 и 1,6 раз, соответственно.

Через 3 сут после ФДТ на облученной коже над опухолями появлялись точечные поверхностные эрозии, покрытые тонкими струпами. Средний объем опухолевых узлов снизился в 2,7 раза относительно соответствующего контроля. В двух случаях наблюдали картину субтотальной деструкции опухолей. В трех опухолевых узлах паренхима саркомы М-1 была сохранена в виде отдельных тяжей и фрагментов, расположенных, в основном, по периферии, чаще над подлежащей мышечной тканью (рис. 4а). Выжившие на этот срок опухолевые клетки с реак-

цией их ядер на PCNA локализовались поблизости от прослоек соединительной ткани (рис. 4г).

При гистологическом исследовании между погибшей тканью и фрагментами сохранившейся паренхимы были видны опухолевые клетки в состоянии выраженной дистрофии. Часть клеток выглядели сжатыми и имели гиперхромный вид, другие подвергались лизису: цитоплазма практически не определялась, кариолема была истончена, а хроматин просматривался в виде мелких гранул или полностью отсутствовал. Однако в периферических зонах опухолей, прилегающих к соединительной ткани, опухолевые клетки не выглядели поврежденными (рис. 4б), а их ядра показывали интенсивное иммуноокрашивание на PCNA (рис. 4д).

Отчетливо визуализировалось начинающееся замещение зон фотодинамического повреждения грануляционной тканью с активным ангиогенезом и пролиферацией фибробластов. В сохранившиеся островки опухолевой ткани из разрастающихся прослоек соединительной ткани в паренхиму саркомы врастали многочисленные микрососуды (рис. 4в). На серийных срезах было видно, что как только капиллярная сеть достигала опухолевых клеток, последние начинали активно пролиферировать.

Через 3 сут после ФДТ содержание паренхимы опухолей снизилось до $23,4 \pm 6,3\%$ ($p < 0,01$ относительно контроля), однако значение Φ_{PCNA} увеличилось в 1,5 раза относительно предыдущего срока – до $38,0 \pm 12,4\%$. Повышение репопуляционной активности опухолевых клеток по PCNA и их митотического индекса свидетельствовали об усилении репаративных процессов, обусловленных, по-видимому, прорастанием капиллярных петель до выживших после ФДТ опухолевых клеток, восстановлением микроциркуляторного русла в ранее поврежденных участках и реоксигенацией паренхимы.

Одним из важных вопросов повышения эффективности ФДТ является выяснение причин выживания опухолевых клеток. По нашим наблюдениям, в ранние сроки после ФДТ в некоторых опухолях выжившие клетки локализуются поблизости от сохранившихся сосудов в перитуморальных пространствах. Есть основания полагать, что на избирательность накопления и достижение максимально эффективных концентраций ФС в опухолевой ткани влияют индивидуальные особенности ангиоархитектоники и физиологии солидных новообразований. Одной из причин, по которой опухолевые клетки могут избегать прямого повреждающего действия ФДТ является неравномерность распределения сенсibilизатора в достаточных концентрациях в отдельных участках быстрорастущих и склонных к спонтанной некротизации опухолей с аномальным кровоснабжением. Возможно, именно по этой при-

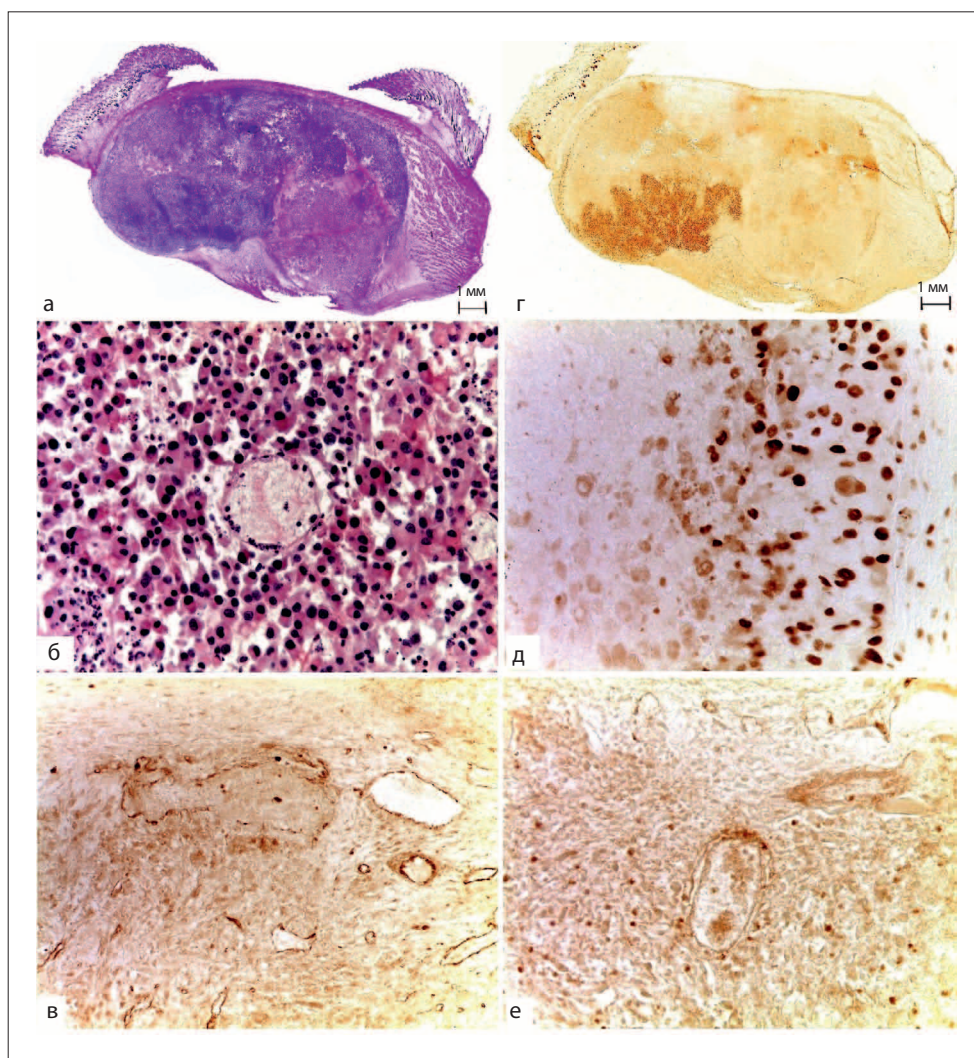


Рис. 3. Функциональная морфология саркомы М-1 через 1 сут после ФДТ с дисульфид-БПИ: а, б – окрашивание гематоксилином и эозином; в – иммуноокрашивание эндотелия сосудов с антителами к CD31 в перитуморальной зоне; г, д – иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA; е – иммуноокрашивание эндотелия сосудов с антителами к CD31 в «горячей точке» паренхимы. Увеличение: $\times 125$ (в); $\times 250$ (б, д, е)

Fig. 3. Functional morphology of sarcoma M-1 1 day after PDT with disulfide-BPI: а, б – hematoxylin and eosin staining; в – vascular endothelial immunostaining with anti-CD31 antibodies in peritumoral area; г, д – immunohistochemical reaction of cell nuclei with anti-PCNA antibodies; е – vascular endothelial immunostaining with anti-CD31 antibodies in a «hot spot» of parenchyma. Magnification: $\times 125$ (в); $\times 250$ (б, д, е)

чине в саркоме М-1, подвергнутой ФДТ, сохраняются выжившие опухолевые клетки, определяющие в последующем ее рецидивирование. В этой связи считаем целесообразным обратить особое внимание на необходимость усиления избирательности подведения используемого фотосенсибилизатора к опухолевым клеткам [20]. Активация гемодинамики в опухолях с неадекватным кровоснабжением до введения сенсибилизатора может дать два дополнительных фактора для усиления эффективности

ФДТ: более равномерное распределение препарата в паренхиме и насыщение опухолевой ткани кислородом, который необходим для фотохимических реакций.

Ранее мы отмечали [5], что характерной особенностью ФДТ является интенсивное развитие воспалительной реакции и быстрая элиминация погибших опухолевых клеток с замещением этих участков соединительной тканью. Этот процесс сопровождается активным неоангиогенезом – образованием развет-

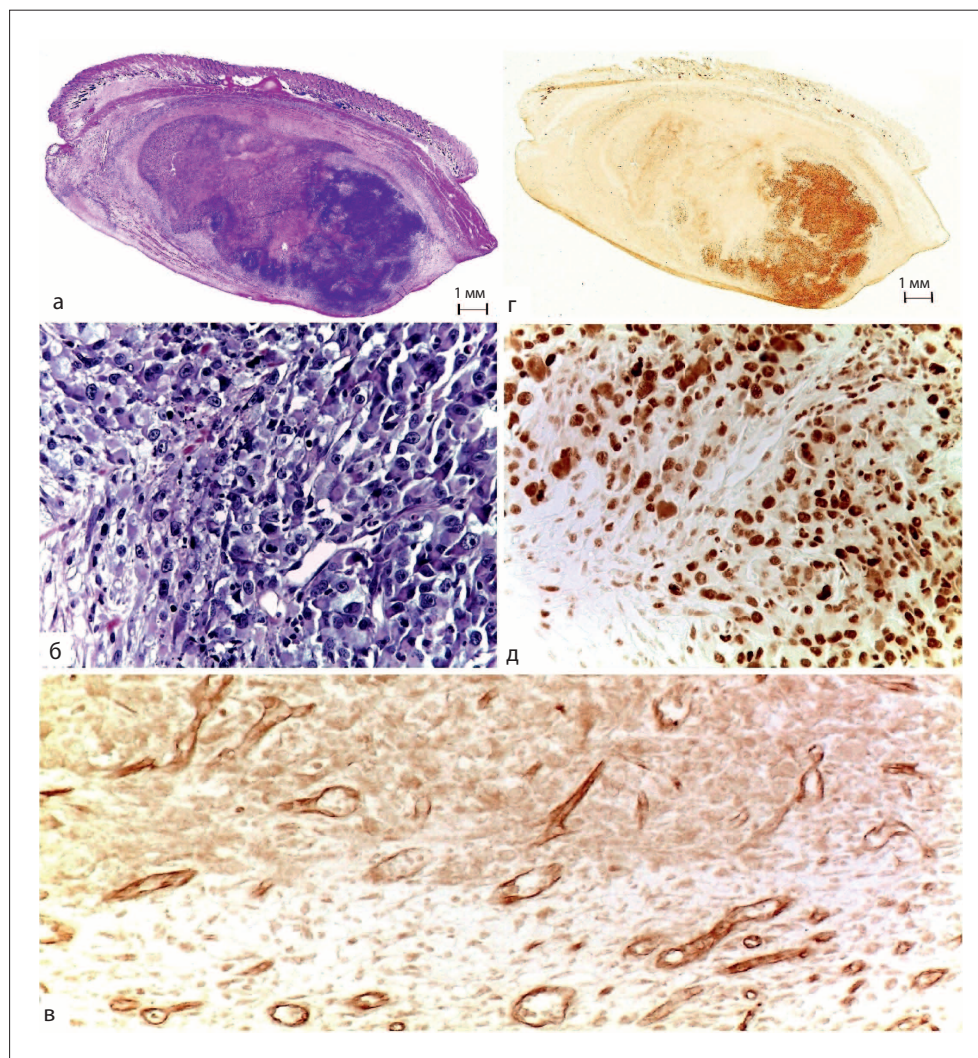


Рис. 4. Функциональная морфология саркомы М-1 через 3 сут после ФДТ с дисульфид-БПИ: а, б – окрашивание гематоксилином и эозином; в – иммуноокрашивание эндотелия сосудов с антителами к CD31 в перитуморальной зоне; г, д – иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA
 Увеличение: $\times 250$ (б, в, д)

Fig. 4. Functional morphology of sarcoma M-1 3 days after PDT with disulfide-BPI: а, б – hematoxylin and eosin staining; в – vascular endothelial immunostaining with anti-CD31 antibodies in peritumoral area; г, д – immunohistochemical reaction of cell nuclei with anti-PCNA antibodies
 Magnification: $\times 250$ (б, в, д)

вленной сети новых капилляров. Можно полагать, что ангиогенез в зонах сохранившихся жизнеспособными опухолевых клеток может способствовать их выживанию и/или активировать их пролиферацию. И не случайно в большинстве представлений о биологии злокачественных новообразований и их таргетного лечения особая роль отводится клеточным и молекулярным механизмам опухолевого ангиогенеза [21] и перспективам применения анти-

ангиогенных мероприятий при фотодинамической терапии [22, 23].

Закключение

Анализ полученных результатов свидетельствует, что дисульфид-БПИ обладает высокой фотодинамической активностью *in vivo* для ФДТ солидной соединительнотканной опухоли. Фотодинамическое действие нового фотосенсибилизатора обусловлено

разрушением сосудистого русла, быстрым ингибированием пролиферативной активности и девитализацией опухолевых клеток путем апоптоза и некроза. В ранние сроки после ФДТ деструкция микроциркуляторного русла и фотоцитостатический эффект в отношении опухолевых клеток с последующим развитием некроза обусловлены, по-видимому, прямым воздействием светового потока на сенсibilизированные дисульфид-БПИ клеточные элементы паренхимы и стромы опухолей. Зарегистрированное снижение пролиферативной активности опухолевых клеток по ИГХ реакции их ядер на PCNA также может быть обусловлено прямым действием продуктов фотохимических реакций используемого сенсibilизатора на соответствующие внутриклеточные структуры. В то же время нельзя исключить и возможный вклад гипоксии, быстро развивающейся в условиях

не только нарушения гемодинамики, но и расхода кислорода в процессе фотохимической реакции.

Согласно полученным данным, конечный результат ФДТ с дисульфид-БПИ определяется последовательностью деструктивных и воспалительных изменений в паренхиме опухолей и окружающих тканях, а также репопуляционным потенциалом выживших после лечения опухолевых клеток. Возможно, по причине неравномерности распределения сенсibilизатора в достаточно эффективной концентрации в отдельных слабо васкуляризованных участках саркомы М-1, подвергнутой ФДТ, сохраняются выжившие опухолевые клетки.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения дисульфид-БПИ для фотодинамической терапии солидных злокачественных новообразований.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант РНФ № 16-13-10092) и Российским фондом фундаментальных исследований (ОФИ-м № 15-29-01156 и № 16-03-00519 А).

ЛИТЕРАТУРА

1. Каплан М.А., Капинус В.Н., Попучиев В.В., и др. Фотодинамическая терапия: результаты и перспективы // Радиация и риск. – 2013. – Т. 22, № 3. – С. 115-123.
2. Филоненко Е.В., Серова Л.Г. Фотодинамическая терапия в клинической практике // Biomedical Photonics. – 2016. – Т. 5, № 2. – С. 26-37.
3. Pervaiz S. Reactive oxygen-dependent production of novel photochemotherapeutic agents // FASEB J. – 2001. – Vol. 15, No. 3. – P. 612-617.
4. Sibata C.H., Colussi V.C., Oleinick N.L., Kinsella T.J. Photodynamic therapy in oncology // Expert Opin. Pharmacother. – 2001. – Vol. 2, No. 6. – P. 917-927.
5. Каплан М.А., Романко Ю.С., Попучиев В.В., и др. Действие фотодинамической терапии с Фотодитазином на рост и функциональную морфологию саркомы М-1 // Лазерная медицина. – 2005. – Т. 9, № 4. – С. 41-47.
6. Каплан М.А., Романко Ю.С., Попучиев В.В., и др. Влияние плотности световой энергии на противоопухолевую эффективность фотодинамической терапии с Фотодитазином // Лазерная медицина. – 2005. – Т. 9, № 2. – С. 46-54.
7. Филоненко Е.В. Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия – и фотодиагностика. – 2014. – Т. 3, № 1. – С. 3-7.
8. Акопов А.Л., Казаков Н.В., Русанов А.А., Карлсон А. Механизмы фотодинамического воздействия при лечении онкологических больных // Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. – 2015. – Т. 4, № 2. – С. 9-16.
9. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., et al. Photodynamic therapy // J. Natl. Cancer Inst. – 1998. – Vol. 90, No. 12. – P. 889-905.
10. Rak J.W., St. Croix B.D., Kerbel R.S. Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer therapy // Anticancer Drugs. – 1995. – Vol. 6, No. 1. – P. 3-18.
11. Goel S., Duda D.G., Xu L., et al. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases // Physiol Rev. – 2011. – Vol. 91, No. 3. – P. 1071-1121.

REFERENCES

1. Kaplan M.A., Kapinus V.N., Popuchiev V.V., Romanko Yu.S., Yaroslavlseva-Isaeva E.V., Spichenkova I.S., Shubina A.M., Borgul O.V., Goranskaya E.V. Photodynamic therapy: results and prospects, *Radiatsiya i risk*, 2013, Vol. 22, No. 3, pp. 115-123. (in Russian).
2. Filonenko E.V., Serova L.G. Photodynamic therapy in clinical practice, *Biomedical Photonics*, 2016, Vol. 5, No. 2, pp. 26-37. (in Russian).
3. Pervaiz S. Reactive oxygen-dependent production of novel photochemotherapeutic agents, *FASEB J.*, 2001, Vol. 15, No. 3, pp. 612-617.
4. Sibata C.H., Colussi V.C., Oleinick N.L., Kinsella T.J. Photodynamic therapy in oncology, *Expert Opin. Pharmacother.*, 2001, Vol. 2, No. 6, pp. 917-927.
5. Kaplan M.A., Romanko Yu.S., Popuchiev V.V., Yuzhakov V.V., Bandurko L.N., Fomina N.K., Mikhina L.N., Malygina A.I., Ingel' I.E. Action of photodynamic therapy with Photoditazin on the growth and functional morphology of sarcoma M-1, *Lazernaya meditsina*, 2005, Vol. 9, No. 4, pp. 41-47. (in Russian).
6. Kaplan M.A., Romanko Yu.S., Popuchiev V.V., Yuzhakov V.V., Bandurko L.N., Mikhina L.N., Fomina N.K., Malygina A.I., Ingel' I.E. Influence of the density of light energy on the antitumor efficiency of photodynamic therapy with Photoditazin, *Lazernaya meditsina*, 2005, Vol. 9, No. 2, pp. 46-54. (in Russian).
7. Filonenko E.V. Fluorescence diagnostics and photodynamic therapy: justification of applications and opportunities in oncology, *Biomedical Photonics*, 2014, Vol. 3, No. 1, pp. 3-7. (in Russian).
8. Akopov A.L., Kazakov N.V., Rusanov A.A., Karlson A. The mechanisms of photodynamic action for treating of cancer patients, *Biomedical Photonics*, 2015, Vol. 4, No. 2, pp. 9-16. (in Russian).
9. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbelyik M., Moan J., Peng Q. Photodynamic therapy, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1998, Vol. 90, No. 12, pp. 889-905.
10. Rak J.W., St. Croix B.D., Kerbel R.S. Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer therapy, *Anticancer Drugs*, 1995, Vol. 6, No. 1, pp. 3-18.
11. Goel S., Duda D.G., Xu L., Munn L.L., Boucher Y., Fukumura D., Jain R.K. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases, *Physiol Rev.*, 2011, Vol. 91, No. 3, pp. 1071-1121.

12. Grin M.A., Mironov A.F., Shtil A.A. Bacteriochlorophyll a and its derivatives: Chemistry and perspectives for cancer therapy // *Anti-Cancer Agents in Med. Chem.* – 2008. – Vol. 8, No. 6. – P. 683-697.
13. Пантюшенко И.В., Грин М.А., Якубовская Р.И., и др. Новый высокоэффективный ИК-фотосенсибилизатор для фотодинамической терапии рака // *Тонкие химические технологии.* – 2014. – Т. 9, № 3. – С. 3-10.
14. Чиссов В.И., Якубовская Р.И., Миронов А.Ф., и др. Препарат для фотодинамической терапии и способ фотодинамической терапии рака с его использованием // Патент России № 2521327. – 2014. – Бюлл. № 18.
15. Южаков В.В., Хавинсон В.Х., Кветной И.М., и др. Кинетика роста и функциональная морфология саркомы М-1 у интактных крыс и после гамма-облучения // *Вопр. онкол.* – 2001. – Т. 47, № 3. – С. 328-334.
16. Южаков В.В., Севаньяева Л.Е., Конопляников А.Г., и др. Морфофункциональное изучение действия мезенхимальных стволовых клеток на саркому М-1 // *Молекулярная медицина.* – 2015. – № 1. – С. 39-45.
17. Южаков В.В., Севаньяева Л.Е., Ульяненко С.Е., и др. Эффективность фракционированного воздействия γ -излучения и быстрых нейтронов на саркому М-1 // *Радиационная биология. Радиоэкол.* – 2013. – Т. 53, № 3. – С. 267-279.
18. Weidner N., Semple J.P., Welch W.R., Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma // *N. Engl. J. Med.* – 1991. – Vol. 324, No. 1. – P. 1-8.
19. Al-Najar A., Al-Sanabani S., Korda J.B., et al. Microvessel density as a prognostic factor in penile squamous cell carcinoma // *Urol. Oncol.* – 2012. – Vol. 30, No. 3. – P. 325-329.
20. Южаков В.В., Каплан М.А., Кветной И.М. Функциональная морфология опухолей при действии лазерного и ионизирующего излучения. Перспективы применения низкоинтенсивных лазеров в комплексной противоопухолевой терапии // *Физическая медицина.* – 1993. – Т. 3, № 1-2. – С. 5-13.
21. Plate K.H., Scholz A., Dumont D.J. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in malignant gliomas revisited // *Acta Neuropathol.* – 2012. – Vol. 124, No. 6. – P. 763-775.
22. Ferrario A., von Tiehl K.F., Rucker N., et al. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma // *Cancer Res.* – 2000. – Vol. 60, No. 15. – P. 4066-4069.
23. Gomer C.J., Ferrario A., Luna M., et al. Photodynamic therapy: combined modality approaches targeting the tumor microenvironment // *Lasers Surg. Med.* – 2006. – Vol. 38, No. 5. – P. 516-521.
12. Grin M.A., Mironov A.F., Shtil A.A. Bacteriochlorophyll a and its derivatives: Chemistry and perspectives for cancer therapy, *Anti-Cancer Agents in Med. Chem.*, 2008, Vol. 8, No. 6, pp. 683-697.
13. Pantyushenko I.V., Grin M.A., Yakubovskaya R.I., Plotnikova E.A., Morozova N.B., Tsygankov A.A. Mironov A.F. The novel highly effective IR-photosensitized for photodynamic therapy of cancer, *Tonkiye khimicheskiye tekhnologii*, 2014, Vol. 9, No. 3, pp. 3-10. (in Russian).
14. Chissov V.I., Jakubovskaja R.I., Mironov A.F., Grin M.A., Plotnikova E.A., Morozova N.B., Tsygankov A.A. The drug for photodynamic therapy and method of photodynamic therapy for cancer, *Patent RF* No. 2521327, 2014.
15. Iuzhakov V.V., Khavinson V.Kh., Kvetnoi I.M., Fomina N.K., Kuznetsova M.N. Growth kinetics and functional morphology of M-1 sarcoma in rats before and after gamma-irradiation, *Vopr. Onkol.*, 2001, Vol. 47, No. 3, pp. 328-334. (in Russian).
16. IYuzhakov V.V., Sevan'kaeva L.E., Konoplyannikov A.G., Bandurko L.N., Konoplyannikov M.A., Ingel' I.E., Fomina N.K., Tsyganova M.G., Kal'sina S.Sh. A morphofunctional study of mesenchymal stem cells' effects on sarcoma M-1, *Molekulyarnaya meditsina*, 2015, No. 1, pp. 39-45. (in Russian).
17. Iuzhakov V.V., Sevan'kaeva L.E., Ul'ianenko S.E., Iakovleva N.D., Kuznetsova M.N., Tsyganova M.G., Fomina N.K., Ingel' I.E., Lychagin A.A. The effectiveness of fractionated exposure of sarcoma M-1 to gamma-radiation and fast neutrons, *Radiats. Biol. Radioecol.*, 2013, Vol. 53, No. 3, pp. 267-279. (in Russian).
18. Weidner N., Semple J.P., Welch W.R., Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis — correlation in invasive breast carcinoma, *N. Engl. J. Med.*, 1991, Vol. 324, No. 1, pp. 1-8.
19. Al-Najar A., Al-Sanabani S., Korda J.B., Hegele A., Bolenz C., Herbst H., Jönemann K.P. Naumann C.M. Microvessel density as a prognostic factor in penile squamous cell carcinoma, *Urol. Oncol.*, 2012, Vol. 30, No. 3, pp. 325-329.
20. Yuzhakov V.V., Kaplan M.A., Kvetnoy I.M. Functional morphology of tumors exposed to laser and ionizing radiation. Prospects of the low level laser applications in complex antitumor therapy, *Fizicheskaya meditsina*, 1993, Vol. 3, No. 1-2, pp. 5-13. (in Russian).
21. Plate K.H., Scholz A., Dumont D.J. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in malignant gliomas revisited, *Acta Neuropathol.*, 2012, Vol. 124, No. 6, pp. 763-775.
22. Ferrario A., von Tiehl K.F., Rucker N., Schwarz M.A., Gill P.S., Gomer C.J. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma, *Cancer Res.*, 2000, Vol. 60, No. 15, pp. 4066-4069.
23. Gomer C.J., Ferrario A., Luna M., Rucker N., Wong S. Photodynamic therapy: combined modality approaches targeting the tumor microenvironment, *Lasers Surg. Med.*, 2006, Vol. 38, No. 5, pp. 516-521.

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА И ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ В КОМБИНИРОВАННОМ ЛЕЧЕНИИ ХОЛАНГИОЦЕЛЛЮЛЯРНОГО РАКА

А.А. Ширяев¹, Г.Х. Мусаев¹, М.В. Лощенов², А.В. Бородин², В.В. Левкин¹,
Н.Л. Охотникова¹, В.В. Волков², В.И. Макаров², В.Б. Лощенов²

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова,
Москва, Россия

²Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия

Резюме

В статье представлены результаты пилотного исследования по применению комбинированного лечения нерезектабельной холангиокарциномы, осложненной механической желтухой. Метод включал в себя чрескожное чреспеченочное желчеотведение, эндовидеофлуоресцентную диагностику, фотодинамическую терапию опухолевой стриктуры и стентирование желчных протоков. В исследование были включены 14 пациентов, находящихся на лечении в клинике факультетской хирургии имени Н.Н. Бурденко Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова.

Флуоресцентную диагностику и фотодинамическую терапию проводили с применением фотосенсибилизаторов фотосенс (0,5 мг/кг), фотолон (1,0 мг/кг) и радахлорин (1,0 мг/кг). Средняя доза лазерного облучения за один сеанс составила 115 ± 5 Дж/см².

Флуоресцентная диагностика с использованием эндовидеофлуоресцентного модуля для эндоскопии и минимальноинвазивной хирургии позволила получить видеофлуоресцентное изображение опухоли и оценить уровень флуоресценции фотосенсибилизатора в опухоли у всех пациентов. Морфологически злокачественный процесс подтвержден у 12 пациентов, у 2 пациентов с опухолью Клатскина не удалось забрать материал из желчных протоков для морфологического исследования.

Первоначальные результаты применения комбинированного минимальноинвазивного лечения оценены, как обнадеживающие. У 4 пациентов продолжительность жизни после лечения составила 21, 17, 13 и 11 мес. 5 пациентов находятся в настоящее время под динамическим наблюдением. Из них 2 наблюдаются со сроком 13 и 19 мес, и 3 – от 4 до 6 мес. 5 больных, которые изначально имели множественные отдаленные метастазы, умерли в течение 3 ± 1 мес после проведенного лечения. Средняя продолжительность жизни у пролеченной группы пациентов составляет на данный момент 9,5 мес, но следует ожидать ее повышения вследствие того, что 5 из 14 больных в настоящий момент живы.

Ключевые слова: нерезектабельная холангиокарцинома, чрескожное желчеотведение, видеофлуоресцентная диагностика, фотодинамическая терапия, стентирование опухолевой стриктуры.

Для цитирования: Ширяев А.А., Мусаев Г.Х., Лощенов М.В., Бородин А.В., Левкин В.В., Охотникова Н.Л., Волков В.В., Макаров В.И., Лощенов В.Б. Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия в комбинированном лечении холангиоцеллюлярного рака. – 2016. – Т. 5, № 4. – С. 15–24.

Контакты: Ширяев А.А., e-mail: artemdoc@mail.ru

FLUORESCENCE DIAGNOSIS AND PHOTODYNAMIC THERAPY IN COMBINED TREATMENT OF CHOLANGIOCARCINOMA

Shiryayev A.A.¹, Musaev G.Kh.¹, Loshenov M.V.², Borodkin A.V.², Levkin V.V.¹,
Okhotnikova N.L.¹, Volkov V.V.², Makarov V.I.², Loshenov V.B.²

¹The State Education Institution of Higher Professional Training The First Sechenov Moscow State Medical University under Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

²General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract

The results of the pilot study of combined treatment for non-resectable cholangiocarcinoma complicated with obstructive jaundice are represented this paper. Method included percutaneous transhepatic biliary drainage, endoscopic fluorescence diagnosis, photodynamic therapy of tumor stricture, and stenting of bile ducts. Fourteen patients who underwent the treatment in the surgery department clinic of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University were enrolled in the study.

Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy were carried out using photosensitizers photosens (0.5 mg/kg), fotolon (1 mg/kg), and radachlorin (1 mg/kg). The average light dose for one session was 115 ± 5 J/cm².

Fluorescence diagnosis using endoscopic video-fluorescence system for endoscopy and minimally invasive surgery allowed to obtain video-assisted fluorescence image of the tumor and to measure level of photosensitizer fluorescence in tumor in all patients. Malignant tumor was confirmed by morphological study in 12 patients, biopsy of material for morphological study failed in 2 patients with Klatskin tumor.

The preliminary results of combined minimally invasive treatment were assessed as promising. The survival time in 4 patients after treatment accounted for 21, 17, 13 and 11 months, respectively. For now 5 patients are under follow-up. Follow-up periods are 13 and 19 months in 2 of them and from 4 to 6 months in 3 of them. Five patients with multiple distant metastases before the treatment died in 3 ± 1 months after therapy. The average lifetime in the treatment group is 9.5 months up to date, however the duration is expected to be longer because 5 of 14 patients are alive.

Key words: non-resectable cholangiocarcinoma, percutaneous biliary drainage, video-assisted fluorescence diagnosis, photodynamic therapy, stenting for tumor stricture.

For citations: Shiryayev A.A., Musaev G.Kh., Loshenov M.V., Borodkin A.V., Levkin V.V., Okhotnikova N.L., Volkov V.V., Makarov V.I., Loshenov V.B. Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy in combined treatment of cholangiocarcinoma, *Biomedical Photonics*, 2016, T. 5, No. 4, pp. 15–24 (in Russian).

Contacts: Shiryayev A.A., e-mail: artemdoc@mail.ru

Введение

Холангиоцеллюлярный рак (ХЦР) – заболевание, характеризующееся медленным ростом, поздним метастазированием и имеющее плохой прогноз [1, 2]. Известно, что радикальная операция возможна примерно у 20% больных с этим диагнозом. Причиной этому является частая инвазия опухоли в сосуды ворот печени и ее паренхиму, наличие гнойного холангита, билиарного цирроза и других осложнений основного процесса [3]. Кроме того, чаще всего указанная патология определяется у пациентов пожилого возраста с множественными сопутствующими заболеваниями [4, 5].

При успешном хирургическом лечении 5-летняя выживаемость составляет от 20% до 40% [4]. В случае нерезектабельной опухоли продолжительность жизни не превышает 4–6 мес. Эти сроки уменьшаются при развитии желтухи [4, 5]. Основной причиной является фатальная печеночная недостаточность, которая развивается вследствие распространения опухолевого процесса по желчным протокам, приводящего к их непроходимости, а также быстрое присоединение на этом фоне холангита. К сожалению, следует отметить, что большинство больных с холангиоцеллюлярным раком умирает в течение первого года после установления диагноза [6, 7].

Механическая желтуха значительно усугубляет течение заболевания, хотя и является чаще всего манифестным симптомом, из-за которого пациент попадает в стационар [1, 8, 9].

Несмотря на совершенствование методов диагностики, решение проблемы механической желтухи и причины ее появления нередко сопряжены с определенными трудностями. Обусловлены они тем, что этому контингенту больных наравне со срочными диагностическими манипуляциями и интенсивной терапией требуется срочный и правильный выбор метода лечения, что во многом зависит от причины билиарного блока и его протяженности. Инструментальная и лабораторная диагностика непосредственно механической желтухи, в частности желчной гипертензии, не составляет особого труда. В то же время диагно-

стика ХЦР, а тем более его морфологическая верификация может представлять определенные сложности. Нередко диагноз удается подтвердить только во время радикальной операции при морфологическом исследовании удаленной опухоли [10, 11, 12]. С целью диагностики ХЦР применяют целый ряд неинвазивных и инвазивных методов. Первая группа методов – это ультразвуковое исследование, компьютерная или магниторезонансная томография. Ко второй группе относятся эндоскопическая ретроградная холангиопанкреатография и чрескожная чреспеченочная холангиография [1, 3]. Они позволяют не только точно установить локализацию, протяженность стриктуры и характер блока контрастирования (полный или частичный), но и выполнить дренирование желчных протоков, а также осуществить забор материала для морфологического исследования. Разрабатываются и другие методы диагностики, в частности метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) для определения рака желчных протоков как в биопсийном материале, так и в аспиратах желчи. Ряд авторов считают, что данная методика более чувствительна для подтверждения злокачественного характера билиарных стриктур в отличие от традиционных способов диагностики [13].

Первоочередной задачей при развитии механической желтухи является снижение желчной гипертензии, которая достигается выполнением процедуры желчеотведения [6, 7, 8, 10, 14, 15]. Для этого применяют различные способы антеградного или ретроградного дренирования желчных протоков. Выбор способа зависит от локализации опухоли, а также от технических возможностей лечебного учреждения и квалификации его сотрудников [5, 16, 17].

К самым распространенным способам минимальноинвазивного чрескожного желчеотведения под контролем УЗИ и рентгеноскопии относят наружную, наружно-внутреннюю холангиостомию и стентирование желчных протоков [7, 10, 14].

Чрескожная наружная холангиостомия заключается в отводе желчи из желчного дерева наружу. При этом дистальная часть дренажа фиксируется в желч-

ных протоках над стриктурой или в просвете желчного пузыря (холецистостома). При этой методике возможна быстрая и адекватная санация желчных протоков, поэтому чаще всего ее используют в качестве первого этапа лечения при планировании радикальной операции или стентировании желчных протоков, а также у больных с терминальной стадией заболевания, как окончательный вариант лечения [7, 14].

При чрескожной наружно-внутренней холангиостомии конечная часть дренажа располагается ниже стриктуры, чаще в просвете кишечника, а множественные перфорирующие дренаж отверстия – выше и ниже области стриктуры желчного протока [14]. При этом виде дренирования желчь поступает в просвет кишечника, но имеется вероятность развития холангита.

Стентирование желчных протоков, помимо того, что позволяет наладить отток желчи, улучшает качество жизни пациента ввиду отсутствия внешней части дренажа на брюшной стенке. Основным ограничением стентирования является высокая стоимость расходных материалов относительно других способов билиарного дренирования [6, 10, 14].

Следует отметить, что выбор варианта дренирования желчных путей, как окончательного метода лечения, также зависит от предполагаемой продолжительности жизни больного. Если ожидаемая продолжительность жизни составляет более 3 мес, то предпочтение следует отдавать стентированию желчных протоков [8, 18].

Минимальноинвазивные методики дренирования желчных протоков в той или иной степени отработаны и широко применяются в клинической практике. При диагностике причины билиарной гипертензии локализацию и протяженность стриктуры желчных протоков возможно выявить на стадии выполнения желчеотведения. Трудности возникают при морфологической верификации диагноза ХЦР, поскольку существуют сложности со взятием материала для гистологического исследования.

В большинстве стационаров желчеотведение является окончательным методом паллиативного лечения и после купирования явлений желтухи больных выписывают с дренажем под наблюдение врачей по месту жительства без какого-либо противоопухолевого лечения. В случае стентирования стриктуры большой проблемой также является прорастание опухолью непокрытого стента или распространение опухолевой инфильтрации за его границы. Это приводит к повторной механической желтухе [8, 11, 13, 19].

Целью нашей работы было усовершенствование методов диагностики и лечения нерезектабельного рака желчных протоков с использованием методов флуоресцентной диагностики (ФД) и фотодинамической терапии (ФДТ).

Материал и методы

В исследование было включено 14 пациентов с подозрением на ХЦР, находящихся на лечении в Клинике факультетской хирургии имени Н.Н. Бурденко Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, которым было выполнено комбинированное минимальноинвазивное лечение. Средний возраст больных составил 67 ± 12 лет. Мужчин было 8, женщин – 6. У 7 пациентов было выявлено поражение общего печеночного протока, у 5 – нодулярная карцинома с поражением общего печеночного протока с переходом на бифуркацию долевых протоков, у 2 – опухоль проксимального отдела общего желчного протока (у 1 из них с переходом на пузырный проток). У 7 пациентов были диагностированы отдаленные метастазы (регионарные лимфоузлы, печень, легкие). Радикальная операция не могла быть выполнена по причине распространенности процесса (множественные метастазы) или функционального состояния больного (возраст, сопутствующая патология). Оценка функционального состояния больных производилась по шкале Карновского. Получены следующие результаты: у 5 пациентов – 20% активности, у 4 – 30% активности, у 2 – 50% активности, и у 3 – 70% активности.

Всем пациентам было выполнено комбинированное минимальноинвазивное лечение, которое состояло из следующих этапов:

1. Чрескожное чреспеченочное желчеотведение под ультразвуковым и рентгеноскопическим контролем.
2. Чресфистульная эндовидеофлуоресцентная диагностика с прицельной биопсией.
3. Фотодинамическая терапия опухоли.
4. Стентирование желчных протоков.

Первым этапом, для уменьшения желчной гипертензии, выполняли чрескожное чреспеченочное желчеотведение под контролем УЗИ и рентгеноскопии. 12 пациентам было выполнено наружно-внутреннее желчеотведение (рис. 1). У 2 пациентов с опухолью Клатскина удалось осуществить только наружное желчеотведение (рис. 2), которое в последующем было переведено в наружно-внутреннее.

После стабилизации состояния на 2–3 сутки выполняли эндовидеофлуоресцентную и локальную флуоресцентную спектроскопию (ЛЭСА-6, ЗАО «БИОСПЕК», длина волны 633 нм). Флуоресцентную диагностику проводили через установленный в желчные протоки интрадьюсер диаметром 9 Fr (3 мм), при помощи видеофлуоресцентного модуля для эндоскопии и минимальноинвазивной хирургии, разработанного в ЗАО «БИОСПЕК», и гибкого тонкого оптического эндоскопа производства Karl Storz диаметром 2,8 мм (рис. 3, 4).

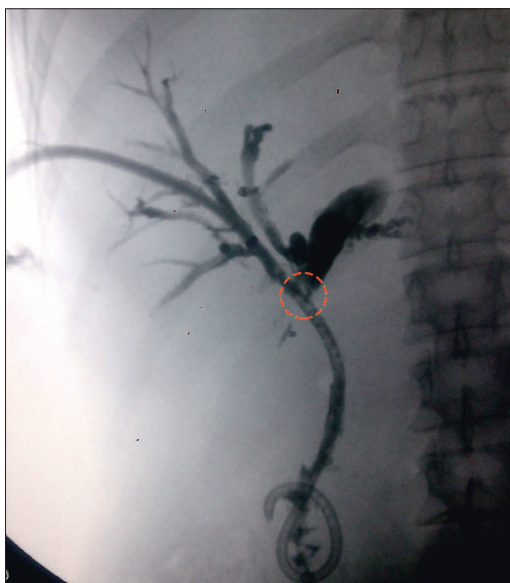


Рис. 1. Чрескожная чреспеченочная наружно-внутренняя холангиостомия

Fig. 1. Percutaneous transhepatic external-internal cholangiostomy

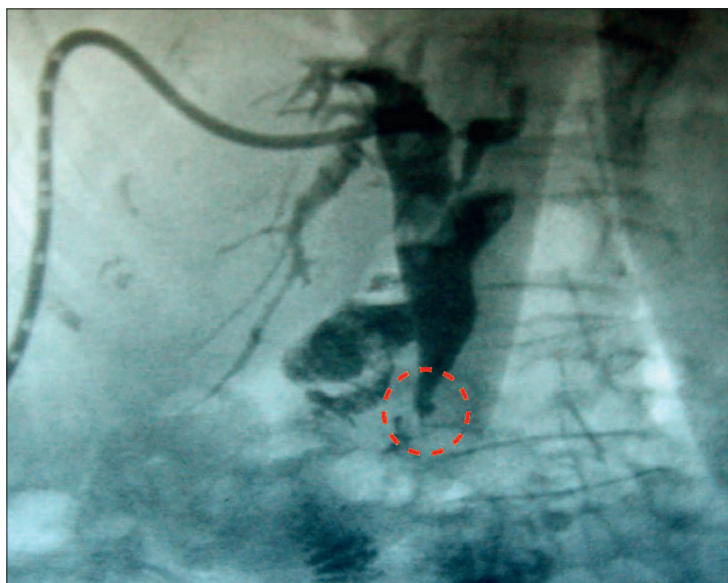


Рис. 2. Чрескожная наружная холангиостомия

Fig. 2. Percutaneous external cholangiostomy

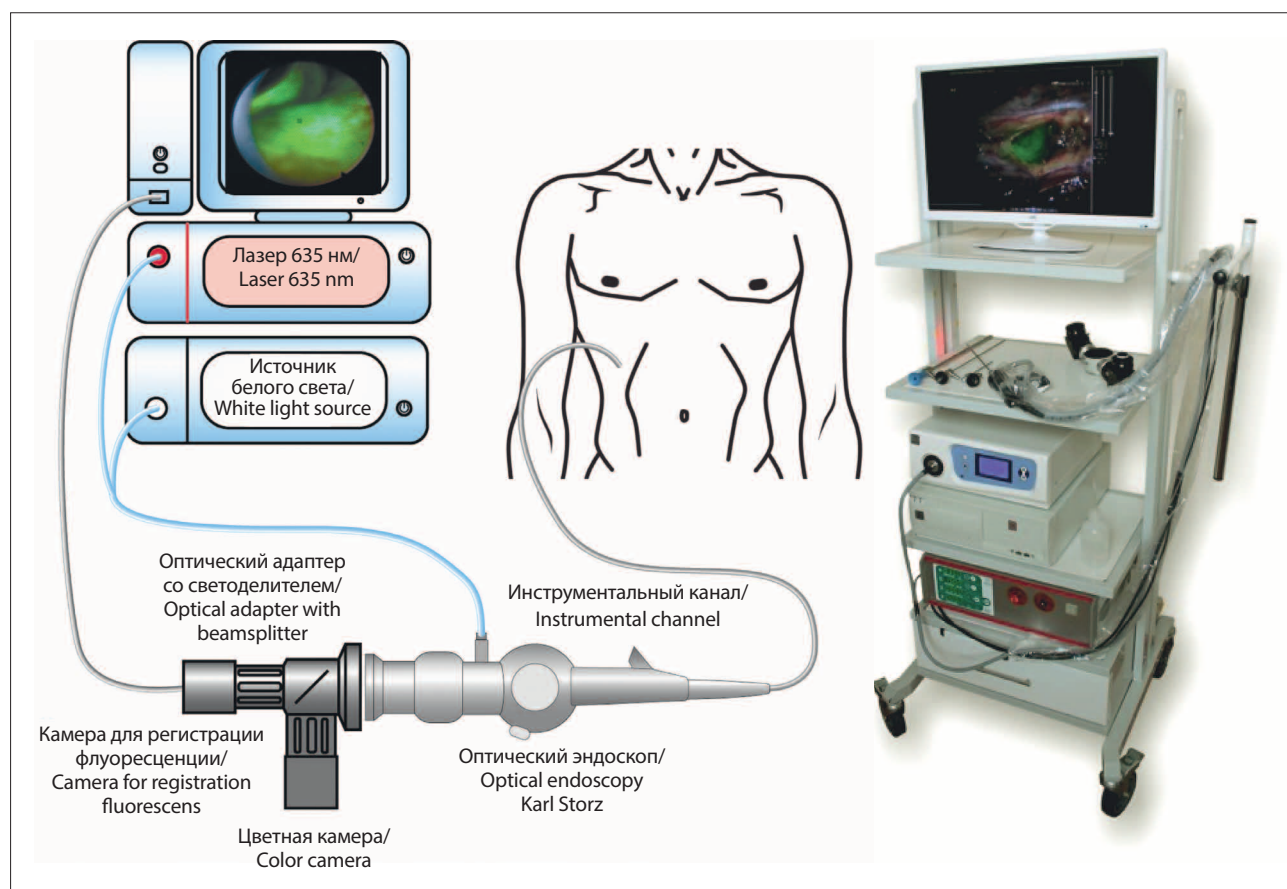


Рис. 3. Схема видеофлуоресцентной системы для эндоскопии

Fig. 3. Scheme of videoendofluorescence system for endoscopy



Рис. 4. Сеанс чресфистульной эндовидеоскопии

Fig. 4. Session of transfistular video-assisted endoscopy

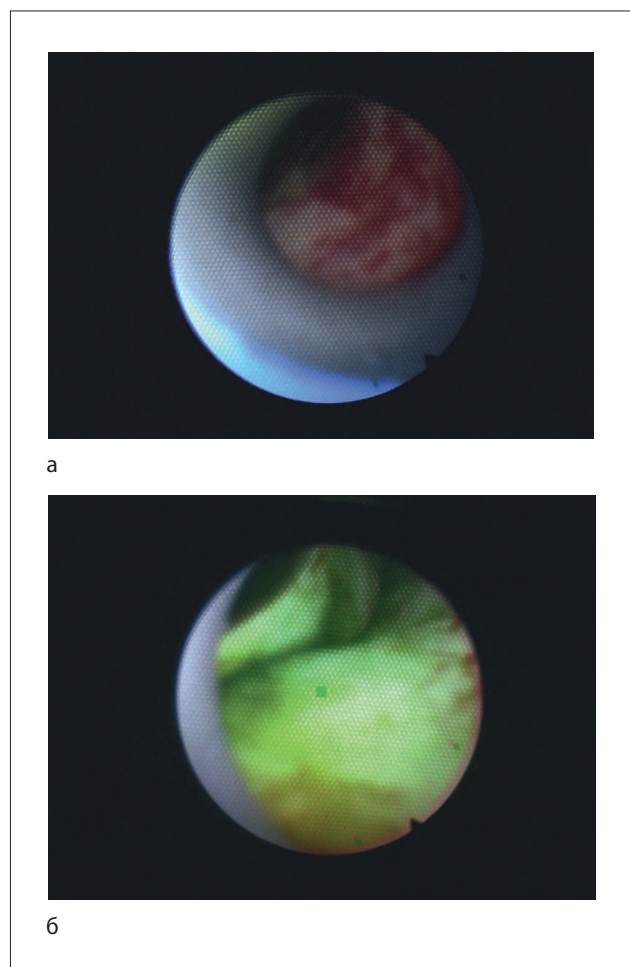


Рис. 5. Чрескожная флуоресцентная диагностика:
а – осмотр в белом свете;
б – флуоресцентное изображение (опухолевый процесс
маркирован зеленым цветом)

Fig. 5. Percutaneous fluorescence diagnosis:
a – examination in white light;
b – fluorescence image (tumor process is marked with green
color)

При помощи модуля получали видеофлуоресцентное изображение опухоли. На экране монитора присутствует интерактивная метка-мишень, которую можно наводить на различные участки видеофлуоресцентного изображения, определяя уровень накопления фотосенсибилизатора в тканях. Биопсию из подозрительных на наличие опухолевого процесса тканей проводили эндоскопическими щипцами через биопсийный канал эндоскопа.

В качестве фотосенсибилизатора использовали один из следующих препаратов:

- фотосенс (ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Россия, регистрационное удостоверение PN000199/02 от 04.03.2010) в дозе 0,5 мг/кг внутривенно за 24 ч до процедуры;
- радахлорин (ООО «РАДА-ФАРМА», Россия, регистрационное удостоверение №ЛС-001868 от 16.12.2011) в дозе 1,0 мг/кг внутривенно за 3–5 ч до процедуры;
- фотолон (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь) в дозе 1,0 мг/кг внутривенно за 3–5 ч до процедуры.

При помощи видеофлуоресцентного модуля проводили диагностику, позволившую получить видеофлуоресцентную картину опухоли желчных протоков (рис. 5). Средняя мощность лазерного излучения во время ФД составила 2 мВт, плотность энергии лазерного излучения не превышала 1 Дж/см².

После эндовидеофлуоресцентной диагностики проводили сеанс ФДТ (рис. 6).

Для проведения сеанса ФДТ в просвет желчных протоков вводили оптоволоконную систему ЛФТ-675-01-БИОСПЕК (ЗАО «БИОСПЕК», Россия) с длиной волны излучения 670 нм. Мощность на выходе лазерной системы излучения составила 1,5 Вт, что позволило получить, с учетом потерь на волокне

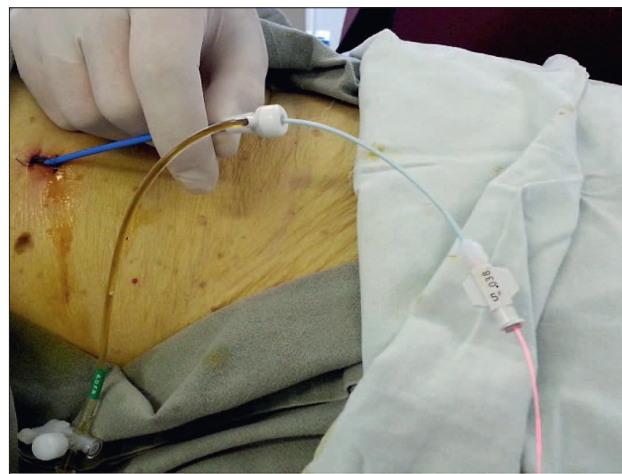


Рис. 6. Сеанс ФДТ опухоли желчного протока

Fig. 6. Session PDT for bile duct cancer

в размере $20 \pm 5\%$, плотность мощности излучения 160 ± 5 мВт/см². Продолжительность сеансов составила 12 ± 2 мин, средняя плотность энергии -115 ± 10 Дж/см².

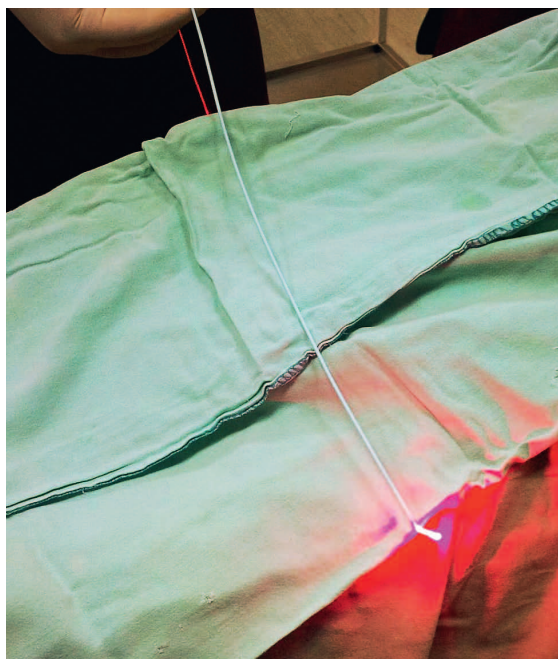
Для облучения использовали гибкий оптоволоконный световод с цилиндрическим облучателем на дистальном конце. Облучатель выводили из дренажного канала и осуществляли облучение. Впоследствии совместно с ЗАО «БИОСПЕК» был разработан баллонный катетер, дистальная часть которого расширялась в просвете протока разведенным в 20 раз раствором липофундина для более равномерного воздействия на опухоль. Световод с цилиндрическим облучателем при этом располагался на уровне раздутого баллона (рис. 7 а, б).

Эндопротезирование желчных протоков, как завершающий этап лечения больных нерезектабельным ХЦР, выполняли сразу же после сеанса ФДТ. Стент устанавливали непосредственно в область стриктуры, края его фиксировали, отступая на 1–2 см от края опухоли. Размеры стентов подбирали индивидуально, в зависимости от локализации и протяженности

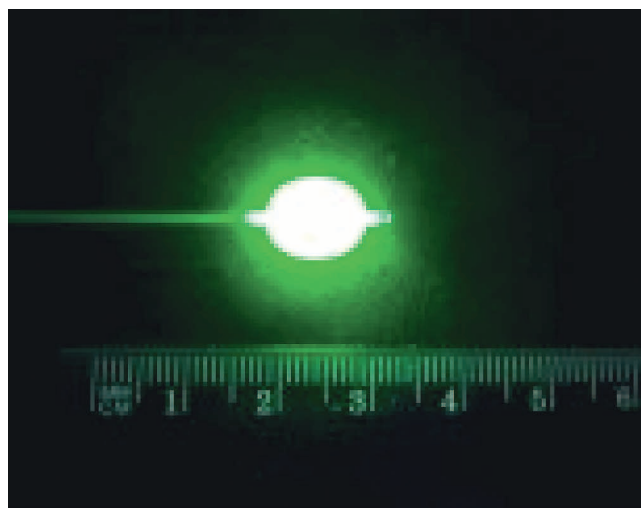
стриктуры. У 9 пациентов применяли покрытые саморасширяющиеся нитиноловые стенты длиной от 4 до 10 см и диаметром 8–10 мм. При распространении опухоли на конfluence долевых протоков и/или один из долевых протоков стентирование осуществляли непокрытым стентом длиной 4–6 см, диаметром 8 мм (у 5 пациентов). Делали это по причине того, что желчное дерево состоит не из изолированных сегментов, так что только непокрытый нитиноловый стент позволяет достигнуть адекватного оттока желчи, особенно при поражении области бифуркации долевых протоков. Хотя известно, что непокрытый стент может быстрее прорасти опухолью, чем покрытый, вследствие чего возникает механическая желтуха, что требует повторного желчеотведения [11, 20].

Результаты и обсуждение

Комбинированное минимальноинвазивное лечение, включающее желчеотведение, ФД, ФДТ и стентирование проведено 14 пациентам. Верифицировать морфологически диагноз холангиоцеллюлярного рака удалось у 12 пациентов из 14. У 2 больных с опу-



а



б

Рис. 7. Оптоволоконная система доставки лазерного излучения:

а – в нерабочем состоянии;

б – в рабочем состоянии с включенным источником лазерного излучения и расправленными стенками баллона

Fig. 7. Fiber optic system for delivery of laser radiation:

а – inoperative condition;

б – operative condition with the power-on laser source and expanded balloon walls

холью Клатскина технически не удалось взять материал. С трудностями биопсии опухоли данной локализации сталкивались и другие авторы [11, 13].

12 пациентов хорошо перенесли процедуру, осложнений не было. У 2 пациентов в первые сутки отмечен холангит, который был купирован за счет декомпрессии желчных протоков и инфузионной терапии. Фототоксических реакций не отмечено, все больные соблюдали световой режим.

Первоначальные результаты, полученные у пролеченных пациентов, можно оценить как обнадеживающие. Наибольшая продолжительность жизни (21 мес) отмечена у одного пациента, трое прожили 17, 13 и 11 мес, соответственно. Пять пациентов находятся в настоящее время под динамическим наблюдением. Из них двое наблюдаются со сроком 13 и 19 мес, а трое – от 4 до 6 мес. Пятеро больных, которые изначально имели множественные отдаленные метастазы, умерли в течение 3 ± 1 мес после проведенного лечения. Средняя продолжительность жизни у пролеченной группы пациентов составляет на данный момент 9,5 мес, но следует ожидать ее повышения вследствие того, что 5 из 14 больных живы.

У 12 из 14 пациентов удалось сразу провести наружно-внутреннее желчеотведение и после ФД и ФДТ выполнить стентирование стриктуры. У 2 пациентов при желчеотведении во время фистулографии выявлен полный блок контрастирования общего печеночного протока. Многочисленные попытки провести проводник и/или получить контрастирование протока дистальнее стриктуры были безуспешны. В связи с чем этим пациентам была установлена наружная холангиостома и после стабилизации состояния были выполнены ФД и ФДТ. На третий день после ФДТ и декомпрессии желчных протоков при фистулографии у этих пациентов была отмечена частичная реканализация протока. Контрастный препарат свободно поступал в просвет кишечника. Этим пациентам был повторно проведен сеанс ФДТ с целью облучения опухолевой стриктуры на всем протяжении и установлен стент.

Следует отметить, что желчеотведение и многокомпонентную дезинтоксикационную терапию (инфузионную терапию, стимуляцию диуреза, борьбу с другими видами полиорганной недостаточности и т.д.) следует проводить в максимально ранние сроки с момента госпитализации больного. Тем не менее, механическая желтуха не является противопоказанием для ФД и ФДТ, в отличие от химиотерапии [21].

Фотосенсибилизаторы фотосенс, радахлорин и фотолон применяли как для диагностики, так и для лечения.

В настоящем исследовании у 3 пациентов использовали фотосенс, у 7 – радахлорин и у 4 – фотолон.

Все эти препараты можно использовать не только для однократной, но и для многокурсовой ФДТ [22]. Преимущество препаратов хлоринового ряда (радахлорин и фотолон) обусловлено более быстрым периодом выведения их из организма – до 48 ч, и небольшим сроком соблюдения светового режима пациентами. Однако для повторного проведения ФДТ необходимо дополнительное введение препарата.

Что касается препарата фотосенс, то он имеет особенность длительно удерживаться в тканях (до 30% от максимальных значений определяется в течение недели после внутривенного введения), что дает возможность проведения до 5-7 сеансов облучения в эти сроки с коррекцией дозы лазерного облучения [22]. В дальнейшем концентрация препарата медленно снижается. В следовых количествах (0,1 мкг/мл и менее) он обнаруживается до 14 нед после введения. Длительный период выведения препарата обуславливает его фототоксичность и требует длительного соблюдения светового режима.

Методика диагностики опухоли желчных протоков, выполняемая с использованием видеофлуоресцентного модуля для эндоскопии и минимальноинвазивной хирургии, основана на преимущественном накоплении фотосенсибилизаторов в злокачественных новообразованиях по сравнению со здоровыми тканями. При этом представляется возможность визуально за счет флуоресценции определить границы опухолевого поражения [23–27]. Идентичные исследования были проведены в различных учреждениях, о чем свидетельствуют публикации в периодической печати [19, 23, 26, 28].

У всех 14 пациентов было получено видеофлуоресцентное изображение опухоли желчных протоков. При этом показано, что одновременно возможно произвести измерение уровня накопления фотосенсибилизатора в интересующих участках по уровню его флуоресценции.

В нашем исследовании была использована новая диагностическая установка, которая позволяет одновременно получать визуальное изображение флуоресценции и диагностический параметр, характеризующий уровень накопления фотосенсибилизатора в тканях. Уровень накопления фотосенсибилизатора в опухоли превышал в два раза и более уровень его накопления в нормальной ткани.

Следует отметить, что для удобства диагностики эндоскоп следует проводить через двухканальный интрадьюсер, позволяющий одновременно с исследованием промывать желчные протоки от поступающей в поле зрения желчи и крови, которые могут давать ложную флуоресценцию или, наоборот, экранировать лазерное излучение.

У 1 из 14 пациентов был установлен непокрытый нитиновый стент в область стриктуры общего

желчного протока и проведена ФДТ. Через 9 мес после операции у пациента были отмечены признаки желчной гипертензии, которые были связаны с распространением опухолевой инфильтрации выше стента с образованием стриктуры общего печеночного протока. После того как было выполнено желчеотведение, при фистулографии было установлено, что просвет стента проходим для контрастного препарата. Пациенту был выполнен повторный курс ФДТ с последующим рестентированием по типу стент в стент (рис. 8). После лечения пациент прожил еще 12 мес, сохраняя трудовую и социальную активность.

Что касается основной причины повторной желтухи после ранее выполненного стентирования, то мы считаем, что это обусловлено обструкцией стента за счет врастания опухоли в непокрытый стент и распространением опухолевой инфильтрации за его границы. Такого же мнения придерживаются другие авторы [12, 13, 29, 30]. Поэтому крайне важно наладить как можно более длительную проходимость протоков для улучшения качества жизни пациентов [11].

Для предотвращения прогрессирования заболевания могут применяться различные методики локорегионарного воздействия, в частности внутрипротоковая лучевая, химиотерапия и фотодинамическая терапия [11, 19, 28, 29]. При этом в случае лучевой терапии необходимость подведения

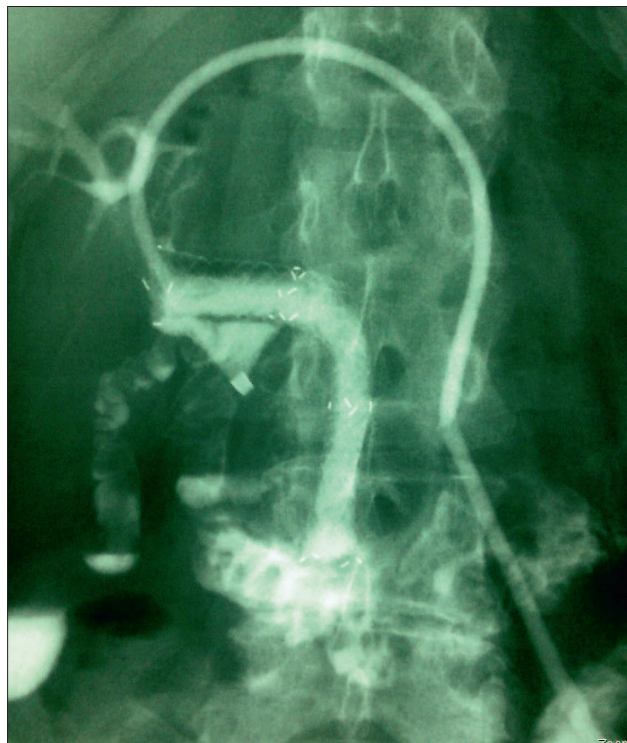


Рис. 8. Методика стентирования «стент в стент»

Fig. 8. The method of «stent into stent» stenting

больших доз излучения несет в себе потенциальные риски развития осложнений и повреждений окружающих тканей и органов, как во время лечения, так и в отдаленном периоде [2]. Что касается химиотерапии, то в качестве самостоятельного метода лечения ХЦР она малоэффективна, частичный эффект не превышает 20–30% [2, 24]. Кроме того, желтуха, печеночная недостаточность и сопутствующий холангит затрудняют ее применение у такой категории больных.

Мы в своей работе основывались на локорегионарном фотодинамическом воздействии на опухолевую стриктуру желчных протоков [22, 25, 26]. При этом возникает фотохимическая реакция, вызывающая образование синглетного кислорода, который воздействует на опухолевые клетки, вызывая их гибель [9]. Кроме того, помимо прямого фототоксического воздействия на опухолевые клетки, важную роль в механизме деструкции имеет нарушение кровоснабжения опухоли за счет микротромбоза и повреждения эндотелия питающих опухоль сосудов [22]. На сосудистый механизм приходится до 60% противоопухолевого действия ФДТ. Наряду с этим, ФДТ стимулирует иммунные реакции организма против опухоли как за счет активации лимфоцитов, нейтрофилов и макрофагов в подвергнутой ФДТ ткани опухоли (что само по себе приводит к замедлению роста опухоли), так и за счет действия цитокинов (интерлейкина 6 и интерлейкина 10, фактора некроза опухоли), ответственных за противоопухолевый эффект ФДТ [22, 25, 27].

Закключение

Применение минимальноинвазивного метода лечения холангиокарциномы в сочетании с желчеотведением, эндовидеофлуоресцентной диагностикой, фотодинамической терапией и стентированием желчных протоков позволяет расширить возможности оказания паллиативной помощи при нерезектабельной опухоли и для функционально неоперабельных больных.

Флуоресцентная диагностика позволила у всех 14 пациентов, участвующих в исследовании, получить эндовидеофлуоресцентное изображение опухоли и определить место прицельной биопсии.

Показано, что ФДТ в сочетании со стентированием желчных протоков увеличивает продолжительность жизни пациентов, не снижая ее качество.

Выполнение ФД и ФДТ возможно без анестезии и при сохраняющихся явлениях желтухи в отличие от лучевой терапии и химиотерапии.

Можно сделать вывод, что первые результаты клинического применения разработанной методики являются обнадеживающими, но требуют дальнейшего накопления клинического опыта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ветшев П.С. Диагностический подход при обтурационной желтухе // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1999. – № 6. – С. 18-24.
2. Чистяков С.С. Онкология для практикующих врачей. – Москва: Изд-во «Товарищество научных изданий КМК», 2009. – 634 с.
3. Майстренко Н.А., Шейко С.Б., Алентьев А.В., Азимов Ф.Х. Холангиоцеллюлярный рак (особенности диагностики и лечения) // Практическая онкология. – 2008. – Т. 9, № 4 – С. 229-236.
4. Isayama H., Tsujino T., Nakai Y., et al. Clinical benefit of radiation therapy and metallic stenting for unresectable hilar cholangiocarcinoma // *World J Gastroenterol.* – 2012. – Vol. 18. – P. 2364-2370. doi: 10.3748/wjg.v18.i19.2364.
5. Шевченко Ю.Л., Карпов О.Э., Ветшев П.С. и соавт. Применение саморасширяющихся нитиноловых стентов при механической желтухе опухолевого генеза // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. – 2014. – Т. 9, № 2. – С. 30-34.
6. Hucl T. Malignant biliary obstruction // *Cas. Lek. Cesk.* – 2016. – Vol. 155(1). – P. 30-7.
7. Khan S.A., Thomas H.C., Davidson B.R., Taylor-Robinson S.D. Cholangiocarcinoma // *Lancet.* – 2005. – Vol. 366, No. 9493. – P. 1303-1305.
8. Bakhru M., Tekola B., Kahaleh M. Endoscopic palliation for pancreatic cancer // *Cancers (Basel).* – 2011. – Vol. 3, No. 2. – P. 1947-1956.
9. Lee T.Y., Cheon Y.K., Shim C.S. Current status of photodynamic therapy for bile duct cancer // *Clin Endosc.* – 2013. – Vol. 46(1). – P. 38-44. doi: 10.5946/ce.2013.46.1.38.
10. Quyn A.J., Ziyaie D., Polignano F.M., Tait I.S. Photodynamic therapy is associated with an improvement in survival in patients with irresectable hilar cholangiocarcinoma // *HPB (Oxford).* – 2009. – Vol. 11. – P. 570-577.
11. Tan Y., Zhu J.Y., Qiu B.A. et al. Percutaneous biliary stenting combined with radiotherapy as a treatment for unresectable hilar cholangiocarcinoma // *Oncol Lett.* – 2015. – 10(4). – P. 2537-2542.
12. Kose F., Oguzkurt L., Besen A. et al. Effectiveness of percutaneous metal stent placement in cholangiocarcinoma patients with midterm follow-up: Single center experience // *Eur J Radiol.* – 2012. – Vol. 81. – P. 1724-1727. doi:10.1016/j.ejrad.2011.04.056.
13. Kipp B.R., Stadheim L.M., Halling S.A., Pochron N.L., Harmsen S., Nagorney D.M., et al. A comparison of routine cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of malignant bile duct strictures // *Am J Gastroenterol.* – 2004. – Vol. 99. – P. 1675-1681.
14. Кулезнева Ю.В., Бруслик С.В., Мусаев Г.Х. и соавт. Антеградные методы декомпрессии желчных протоков: эволюция и спорные вопросы // *Анналы хирургической гепатологии.* – 2011. – Т. 16, № 3. – С. 35-43.
15. Вишневецкий В.А., Тарасюк Т.И. Диагностика и хирургическое лечение рака проксимальных печеночных протоков (опухолей Клатскина) // *Практическая онкология.* – 2004. – Т. 5, № 2. – С. 126-134.
16. Гальперин Э.И., Ветшев П.С. Руководство по хирургии желчных путей. – Москва: Видар, 2009. – 568 с.
17. Охотников О.И., Григорьев С.Н., Яковлева М.В. Антеградные эндобилиарные вмешательства при синдроме механической желтухи // *Анналы хирургической гепатологии.* – 2011. – Т. 16, № 3. – С. 44-49.
18. Jaganmohan S., Lee J.H. Self-expandable Metal Stents in Malignant Biliary Obstruction Surgical versus Endoscopic Biliary Drainage // *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2012. – Vol. 6, No. 1. – P. 105-114.

REFERENCES

1. Vetshev P.S. The Diagnostic approach to Obstructive Jaundice, *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*, 1999, No. 6, pp. 18-24. (in Russian).
2. Chistyakov S.S. *Onkologiya dlya praktikuyushchikh vrachei* [Oncology for practicing physicians]. Moscow, *Tovarishestvo nauchnykh izdaniy KMK Publ.*, 2009. 634 p.
3. Maistrenko N.A., Sheiko S.B., Alentiev A.V., Azimov, F.H. Cholangiocellular cancer (diagnostics and treatment), *Prakticheskaya onkologiya*, 2008, Vol. 9, No. 4, pp. 229-236. (in Russian).
4. Isayama H., Tsujino T., Nakai Y., Sasaki T., Nakagawa K., Yamashita H., Aoki T., Koike K. Clinical benefit of radiation therapy and metallic stenting for unresectable hilar cholangiocarcinoma, *World J Gastroenterol*, 2012, Vol.18, pp. 2364-2370. doi: 10.3748/wjg.v18.i19.2364.
5. Shevchenko Y.L., Karpov O.E., Vetshev P.S., Maadi A.S. Alekseev K.I., Osipov A.S., Vasiliev I.V., Tyurbuev B.Ts. Application self-expanding nitinol stents in obstructive tumor genesis of icterus, *Vestnik Natsional'nogo mediko-khirurgicheskogo Tsentra im. N.I. Pirogova*, 2014, Vol. 9, No. 2, pp. 30-34. (in Russian).
6. Hucl T. Malignant biliary obstruction, *Cas. Lek. Cesk*, 2016, Vol. 155(1), pp. 30-7.
7. Khan S.A., Thomas H.C., Davidson B.R., Taylor-Robinson S.D. Cholangiocarcinoma, *Lancet*, 2005, Vol.366, No. 9493, pp. 1303-1305.
8. Bakhru M., Tekola B., Kahaleh M. Endoscopic palliation for pancreatic cancer, *Cancers (Basel)*, 2011, Vol. 3, No. 2, pp. 1947-1956.
9. Lee T.Y., Cheon Y.K., Shim C.S. Current status of photodynamic therapy for bile duct cancer, *Clin Endosc*, 2013, Vol. 46(1), pp. 38-44. doi: 10.5946/ce.2013.46.1.38.
10. Quyn A.J., Ziyaie D., Polignano F.M., Tait I.S. Photodynamic therapy is associated with an improvement in survival in patients with irresectable hilar cholangiocarcinoma, *HPB (Oxford)*, 2009, Vol. 11, pp. 570-577.
11. Tan Y., Zhu J.Y., Qiu B.A., Xia N.X., Wang J.H. Percutaneous biliary stenting combined with radiotherapy as a treatment for unresectable hilar cholangiocarcinoma, *Oncol Lett*, 2015, Vol. 10(4), pp. 2537-2542.
12. Kose F., Oguzkurt L., Besen A., Sumbul T., Sezer A., Karadeniz C., Disel U., Mertsoylu H., Ozyilkan O. Effectiveness of percutaneous metal stent placement in cholangiocarcinoma patients with midterm follow-up: Single center experience, *Eur J Radiol*, 2012, Vol. 81, pp. 1724-1727. doi:10.1016/j.ejrad.2011.04.056.
13. Kipp B.R., Stadheim L.M., Halling S.A., Pochron N.L., Harmsen S., Nagorney D.M., Sebo T.J., Therneau T.M., Gores G.J., de Groen P.C., Baron T.H., Levy M.J., Halling K.C., Roberts L.R. A comparison of routine cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of malignant bile duct strictures, *Am J Gastroenterol*, 2004, Vol. 99, pp. 1675-1681.
14. Kulezneva Yu.V., Bruslik S.V., Musaev G.H., Israilov R.E., Kirillova M.S. Percutaneous Modalities of Biliary Decompression: Development and Disputable Items Development and Disputable Items, *Annaly khirurgicheskoi gepatologii*, 2011, Vol. 16, No. 3, pp. 35-43. (in Russian).
15. Vishnevskiy V.A., Tarasyuk I.T. Diagnosis and Surgical treatment of Cancer of the proximal hepatic ducts (tumors Klatskin), *Prakticheskaya onkologiya*, 2004, Vol. 5, No. 2, pp. 126-134. (in Russian).
16. Galperin E.I., Vetshev P.S. *Rukovodstvo po khirurgii zhelchnykh putei* [Guidelines for biliary tract surgery]. Moscow, *Vidar Publ.*, 2009. 568 p.
17. Okhotnikov O.I., Grigoriev S.N., Yakovleva M.V. Percutaneous Endobiliary Interventions in Obstructive Jaundice Syndrome in Obstructive Jaundice Syndrome, *Annaly khirurgicheskoi gepatologii*, 2011, Vol. 16, No. 3, pp. 44-49. (in Russian).
18. Jaganmohan S., Lee J.H. Self-expandable Metal Stents in Malignant Biliary Obstruction Surgical versus Endoscopic Biliary Drainage, *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012, Vol. 6, No. 1, pp. 105-114.

19. Лобаков А.И., Странадко Е.Ф., Мокин М.В. и соавт. Возможности фотодинамической терапии в лечении рака большого дуоденального сосочка // *Анналы хирургической гепатологии*. – 2005. – Т. 10, № 1. – С. 86-89.
20. Rerknimitr R., Angsuwatcharakon P., Ratanachu-ek T., et al. Asia-pacific consensus recommendations for endoscopic and interventional management of hilar cholangiocarcinoma // *J Gastroenterol Hepatol*. – 2013. – Vol. 28. – P. 593-607.
21. Höblinger A., Gerhardt T., Gonzalez-Carmona M.A., et al. Feasibility and safety of long-term photodynamic therapy (PDT) in the palliative treatment of patients with hilar cholangiocarcinoma // *Eur J Med Res*. – 2011. – Vol. 16. – P. 391-395. doi: 10.1186/2047-783X-16-9-391.
22. Чиссов В.И., Филоненко Е.В. Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия в клинической онкологии. – Москва: Изд-во Триумф, 2012. – 272 с.
23. Kniebühler G.1., Pongratz T., Betz C.S., et al. Photodynamic therapy for cholangiocarcinoma using low dose mTHPC (Foscan®) // *Photodiagnosis Photodyn Ther*. – 2013. – Vol. 10(3). – P. 220-8. doi: 10.1016/j.pdpdt.2012.12.005.
24. Wentrup R, Winkelmann N, Mitroshkin A, et al. Photodynamic Therapy Plus Chemotherapy Compared with Photodynamic Therapy Alone in Hilar Nonresectable Cholangiocarcinoma // *Gut Liver*. – 2016. – Vol. 10(3). – P. 470-5. doi: 10.5009/gnl15175.
25. Levkin V., Gagarina N., Kharnas S., Musaev G., et al. Modern Technologies for Timely Detection and Differential Diagnosis of Gastric Cancer / *New Aspects in Molecular and Cellular Mechanisms of Human Carcinogenesis*, Dmitry Bulgin (Ed.). – InTech, 2016. doi: 10.5772/59826.
26. Chen Y.J., Jiang H.T., Cao J.Y. Influence of Photodynamic Therapy on Apoptosis and Invasion of Human Cholangiocarcinoma QBC939 Cell Line // *Chin. Med. Sci. J*. – 2015. – Vol. 30(4). – P. 252-9.
27. Цыб А.Ф., Каплан М.А., Романенко Ю.С., Попучиев В.В. Клинические аспекты фотодинамической терапии. – Калуга: Изд-во науч. литер-ры. Н.Ф. Бочкаревой, 2009. – 204 с.
28. Ortnr M.E., Caca K., Berr F., et al. Successful photodynamic therapy for nonresectable cholangiocarcinoma: a randomized prospective study // *Gastroenterology*. – 2003. – Vol. 125(5). – P. 1355-63.
29. Макаров Е.С., Нечушкин М.И., Долгушин Б.И., Файнштейн И.А. Внутривисцеральная лучевая терапия местнораспространенного рака внепеченочных желчных протоков // *Анналы хирургической гепатологии*. – 2006. – Т. 11, № 1. – С. 45-53.
30. Tapping C.R., Byass O.R., Cast J.E. Percutaneous transhepatic biliary drainage (PTBD) with or without stenting-complications, re-stent rate and a new risk stratification score // *Eur Radiol*. – 2011. – Vol. 21. – P. 1948-1955. doi: 10.1007/s00330-011-2121-7.
19. Lobakov A.I., Strnadko E.F., Mokin M.V., Kruglov E.E., Denisov V.A., Sachechelashvili G.L., Zakharov Yu.I., Lavrova N.N. Possibilities of Photodynamic Therapy in the treatment of Cancer of major duodenal papilla, *Annaly khirurgicheskoi gepatologii*, 2005, Vol. 10, No. 1, pp. 86-89. (in Russian).
20. Rerknimitr R., Angsuwatcharakon P., Ratanachu-Ek T., Khor C.J., Pon-nudurai R., Moon J.H., Seo D.W., Pantongrag-Brown L., Sangchan A., Pisespongsa P., et al. Asia-pacific consensus recommendations for endoscopic and interventional management of hilar cholangiocarcinoma, *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, Vol. 28, pp. 593-607.
21. Höblinger A., Gerhardt T., Gonzalez-Carmona M.A., Hüneburg R., Sauerbruch T., Schmitz V. Feasibility and safety of long-term photodynamic therapy (PDT) in the palliative treatment of patients with hilar cholangiocarcinoma, *Eur J Med Res*, 2011, Vol. 16, pp. 391-395. doi: 10.1186/2047-783X-16-9-391.
22. Chissov V.I., Filonenko E. V. *Fluorescentnaya diagnostika i fotodinamicheskaya terapiya v klinicheskoi onkologii* [Fluorescence Diagnosis and Photodynamic Therapy in clinical Oncology]. Moscow, Triumph Publ., 2012. 272 p.
23. Kniebühler G.1., Pongratz T., Betz C.S., Göke B., Sroka R., Stepp H., Schirra J. Photodynamic therapy for cholangiocarcinoma using low dose mTHPC (Foscan®), *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2013, Vol. 10(3), pp. 220-8. doi: 10.1016/j.pdpdt.2012.12.005.
24. Wentrup R, Winkelmann N, Mitroshkin A., Prager M., Voderholzer W., Schachschal G., Jürgensen C., Büning C. Photodynamic Therapy Plus Chemotherapy Compared with Photodynamic Therapy Alone in Hilar Nonresectable Cholangiocarcinoma, *Gut Liver*, 2016, Vol. 10(3), pp. 470-5. doi: 10.5009/gnl15175.
25. Levkin V., Gagarina N., Kharnas S., Musaev G., Shiryayev A., Bulgin D. Modern Technologies for Timely Detection and Differential Diagnosis of Gastric Cancer, *New Aspects in Molecular and Cellular Mechanisms of Human Carcinogenesis*, by Bulgin D. InTech Publ., 2016. doi: 10.5772/59826.
26. Chen Y.J., Jiang H.T., Cao J.Y. Influence of Photodynamic Therapy on Apoptosis and Invasion of Human Cholangiocarcinoma QBC939 Cell Line, *Chin. Med. Sci. J.*, 2015, Vol. 30(4), pp. 252-9.
27. Tsyb A.F., Kaplan M.A., Romanenko Y.S., Popuchiev V.V. *Klinicheskie aspekty fotodinamicheskoi terapii* [Clinical aspects of Photodynamic Therapy]. Kaluga, Publ. of Nauch. liter-ry. N.F. Bochkarevoi, 2009. 204 p.
28. Ortnr M.E., Caca K., Berr F., Liebetruht J., Mansmann U., Huster D., Voderholzer W., Schachschal G., Mössner J., Lochs H. Successful photodynamic therapy for nonresectable cholangiocarcinoma: a randomized prospective study, *Gastroenterology*, 2003, Vol. 125(5), pp. 1355-63.
29. Makarov E.S., Nechushkin M.I., Dolgushin B.I., Feinstein I.A. Intraluminal Radiotherapy of the Locally Spread Cancer of the Extrahepatic Bile Ducts, *Annaly khirurgicheskoi gepatologii*, 2006, Vol. 11, No. 1, pp. 45-53.
30. Tapping C.R., Byass O.R., Cast J.E. Percutaneous transhepatic biliary drainage (PTBD) with or without stenting-complications, re-stent rate and a new risk stratification score, *Eur Radiol*, 2011, Vol. 21, pp. 1948-1955. doi: 10.1007/s00330-011-2121-7.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦ МЕЗО-ТЕТРА(3-ПИРИДИЛ)БАКТЕРИОХЛОРИНА

Ю.С. Маклыгина¹, А.В. Бородин¹, А.В. Рябова^{1,2}, Д.В. Поминова¹, Е.А. Макарова³,
Е.А. Лукьянец³, В.Б. Лощенов^{1,2}

¹Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия

²Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ, Москва, Россия

³Государственный научный центр «НИОПИК», Москва, Россия

Резюме

В настоящей статье представлены результаты исследования внутриклеточного распределения молекулярных нанокристаллов мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина, предлагаемых для использования в качестве терапевтических агентов для фотодинамической терапии. Исследования и оценка изменений спектроскопических свойств молекулярных кристаллов фотосенсибилизатора ближнего инфракрасного диапазона были проведены с помощью специального комплекса оборудования, созданного на базе волоконного спектрометра. В рамках работы проведено исследование и анализ характера внутриклеточного накопления мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в молекулярной (растворитель диметилсульфоксид) и нанокристаллической формах на различных культурах клеток: моноциты человека (THP-1), клетки рака шейки матки человека (HeLa) и клетки злокачественной опухоли мозга мыши (глиома С6). Оценку динамики внутриклеточного накопления исследуемого препарата в концентрациях 5 и 10 мг/л проводили с помощью лазерного микроскопа-спектроанализатора, а также методом конфокальной микроскопии. В ходе исследования было показано, что при взаимодействии с клеточными культурами молекулярные нанокристаллы исследуемого препарата приобретают способность к флуоресценции, откуда следует, что в клеточном окружении наночастицы мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина становятся фототоксичными, что открывает перспективы их использования для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии. Особая роль мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в ряду фотосенсибилизаторов обусловлена его спектральными характеристиками, а именно поглощением и флуоресценцией в ближнем инфракрасном диапазоне, что позволяет анализировать и воздействовать на более глубокие слои биоткани. Таким образом, использование наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в качестве нано-фотосенсибилизатора может повысить эффективность диагностики и терапии глубокозалегающих опухолей.

Ключевые слова: флуоресцентная диагностика, спектроскопия обратного рассеяния, внутриклеточное распределение фотосенсибилизатора, фотосенсибилизатор ближнего инфракрасного диапазона, мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин, кристаллические наночастицы мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина.

Для цитирования: Маклыгина Ю.С., Бородин А.В., Рябова А.В., Поминова Д.В., Макарова Е.А., Лукьянец Е.А., Лощенов В.Б. Исследование внутриклеточного распределения кристаллических наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина // Biomedical Photonics – 2016. – Т. 5, № 4. – С. 25–34.

Контакты: Лощенов В.Б., e-mail: loschenov@mail.ru

STUDY OF SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF CRYSTALLINE MESO-TETRA(3-PYRIDYL)BACTERIOCHLORIN NANOPARTICLES

Maklygina Yu. S.¹, Borodkin A.V.¹, Ryabova A.V.^{1,2}, Pominova D.V.¹, Makarova E.A.³,
Lukyanets E.A.³, Loshchenov V.B.^{1,2}

¹General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russia

³State Scientific Center Scientific Research Institute Organic Intermediates and Dyes, Moscow, Russia

Abstract

The results of the study of subcellular distribution of molecular meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin nanocrystals proposed as therapeutic agents for photodynamic therapy are represented in the article. Investigations and measurement of spectroscopic properties of molecular crystals of near-infrared photosensitizer were conducted using special device complex based on fiber-optic spectrometer. Investigation and analysis of the pattern of subcellular accumulation of meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin in molecular (dimethyl sulfoxide (DMSO)

as solvent) and nanocrystalline forms on different cell lines: human monocytes (THP-1), human cervical cancer cells (HeLa) and mouse malignant brain tumor cells (glioma C6). The dynamics of subcellular accumulation of the agent at concentration of 5 and 10 mg/l was assessed with laser microscope-spectrum analyzer and by confocal microscopy. The study showed that in the course of interaction with cell lines molecular nanocrystals of the agent developed ability to fluorescence. Hence, in the cellular environment *meso*-tetra(3-pyridyl) bacteriochlorin nanoparticles became phototoxic giving opportunities for their use for fluorescence diagnosis and photodynamic therapy. Specific role of *meso*-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin in the range of photosensitizers is determined by its spectral characteristics, i.e. absorption and fluorescence in near-infrared band, which allows measuring and affecting on deeper layers of biotissue. Thus, the use of *meso*-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin nanoparticles as nanophotosensitizers may improve the efficacy of diagnosis and treatment of deep-seated tumors.

Key words: fluorescence diagnosis, backscattering spectroscopy, photosensitizer intracellular distribution, NIR-photosensitizers, *meso*-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin, crystalline nanoparticles of *meso*-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin.

For citations: Maklygina Yu. S., Borodkin A.V., Ryabova A.V., Pominova D.V., Makarova E.A., Lukyanets E.A., Loshchenov V.B. Study of subcellular distribution *meso*-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin nanoparticles, *Biomedical Photonics*, 2016, T. 5, No. 4, pp. 25–34 (in Russian).

Contacts: Loschenov V.B., e-mail: loschenov@mail.ru

Введение

Создание многофункциональных наноматериалов для ранней диагностики и лечения онкологических заболеваний является актуальной задачей. В последнее время особое внимание уделяется повышению чувствительности и функциональной направленности наночастиц, тропных к опухолевым клеткам на ранней стадии развития новообразований, для оптических методов терапии и диагностики. Традиционно используемые для флуоресцентной диагностики фотосенсибилизаторы часто обладают недостаточной селективностью накопления в опухолевых и воспаленных тканях по сравнению с окружающими нормальными.

Решением в сложившейся ситуации может быть использование наночастиц, за счет размерности которых можно повысить селективность накопления в тканях-мишенях на несколько порядков. В частности, такими наночастицами могут быть молекулярные нанокристаллы на основе уже известных фотосенсибилизаторов [1]. Водонерастворимые и нетоксичные в кристаллическом виде, при контакте с опухолевыми или иммунными клетками они меняют свои спектроскопические свойства: приобретают способность флуоресцировать, становятся фототоксичными, чем обуславливается дополнительная избирательность воздействия [2]. Важнейшей характеристикой фотосенсибилизаторов наряду с высокой фотодинамической эффективностью и высоким квантовым выходом флуоресценции является спектральный диапазон оптического возбуждения. Тетрагидропроизводные порфиринов – бактериохлорины, обладая пиком поглощения в ближнем инфракрасном диапазоне, соответствующем области максимальной оптической прозрачности биологических тканей, способны обеспечить наибольшую глубину терапевтического воздействия, что делает их наиболее перспективными из ныне существующих фотосенсибилизаторов, особенно в аспекте диагностики и терапии глубоководящих новообразований [3–10].

Материал и методы

Исследуемый фотосенсибилизатор

В качестве фотосенсибилизатора использовали мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин (рис. 1) производства ФГУП «ГНЦ «НИОПИК» (Россия) [11–12].

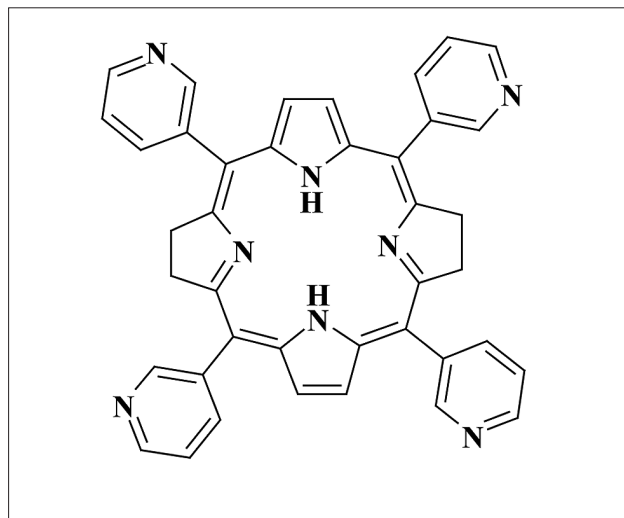


Рис. 1. Химическая формула мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина

Fig. 1. Chemical formula of *meso*-tetra(3-pyridyl) bacteriochlorin

Для проведения исследований был приготовлен водный коллоид молекулярных нанокристаллов мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина. Для этого поликристаллический порошок добавляли в дистиллированную воду до получения концентрации 1 мг/мл. Полученную суспензию подвергали диспергированию в ультразвуковом гомогенизаторе Bandelin SONOPLUS HD2070 (Германия) с насадкой KE76 (20 кГц, амплитуда 165 мкм). С помощью многоугольного спектрометра динамического рассеяния света Photocor Complex (Россия), позволяющего путем анализа корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного

света получить распределение по размерам наночастиц, было установлено, что средний диаметр частиц в водном коллоиде составил $220 \div 240$ нм.

Спектры поглощения были получены с помощью компьютеризированного спектрофотометра Hitachi U-3400 (Япония). Истинный раствор мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в полярном растворителе диметилсульфоксиде (ДМСО) демонстрировал максимумы поглощения на длинах волн 350, 373, 516 и 761 нм, соответствующие спектру поглощения мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина, и малоинтенсивные максимумы на длинах волн 417 и 655 нм, соответствующие спектру поглощения примеси хлорина (рис. 2). Если сравнить спектры раствора и водного коллоида мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина, то можно заметить, что длины волн пиков поглощения раствора совпадают с пиками пропускания коллоида.

Этот довольно необычный факт можно объяснить тем, что поверхностные молекулы наночастицы образуют своего рода антенну, которая эффективно рассеивает излучение в спектральном диапазоне, соответствующем поглощению свободных молекул. Нетрудно заметить, что в спектре поглощения кол-

лоида мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина имеется два провала. Один соответствует пику поглощения молекулы мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина при 516 нм, а второй – пику поглощения молекулы хлорина при 660–670 нм. Предположительно, эти молекулы связаны с поверхностью кристаллической наночастицы силами ван-дер-ваальса (диполь-дипольное притяжение), которые меняются под действием растворителя или других органических молекул. В зависимости от ближайшего окружения поверхностные молекулы могут «лежать», принимая пара-положение относительно поверхности наночастицы, или «вставать», принимая орто-положение, удерживаясь на поверхности и проявляя спектроскопические свойства раствора мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина или хлорина. Начало взаимодействия наночастиц с клеточной мембраной и органеллами клеток происходит через поверхностные молекулы, которые в зависимости от силы взаимодействия могут удерживаться на поверхности или отрываться от наночастицы, вероятно, оставляя отдельные молекулы в виде мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина или хлорина, связанные с биоорганическими молекулами.

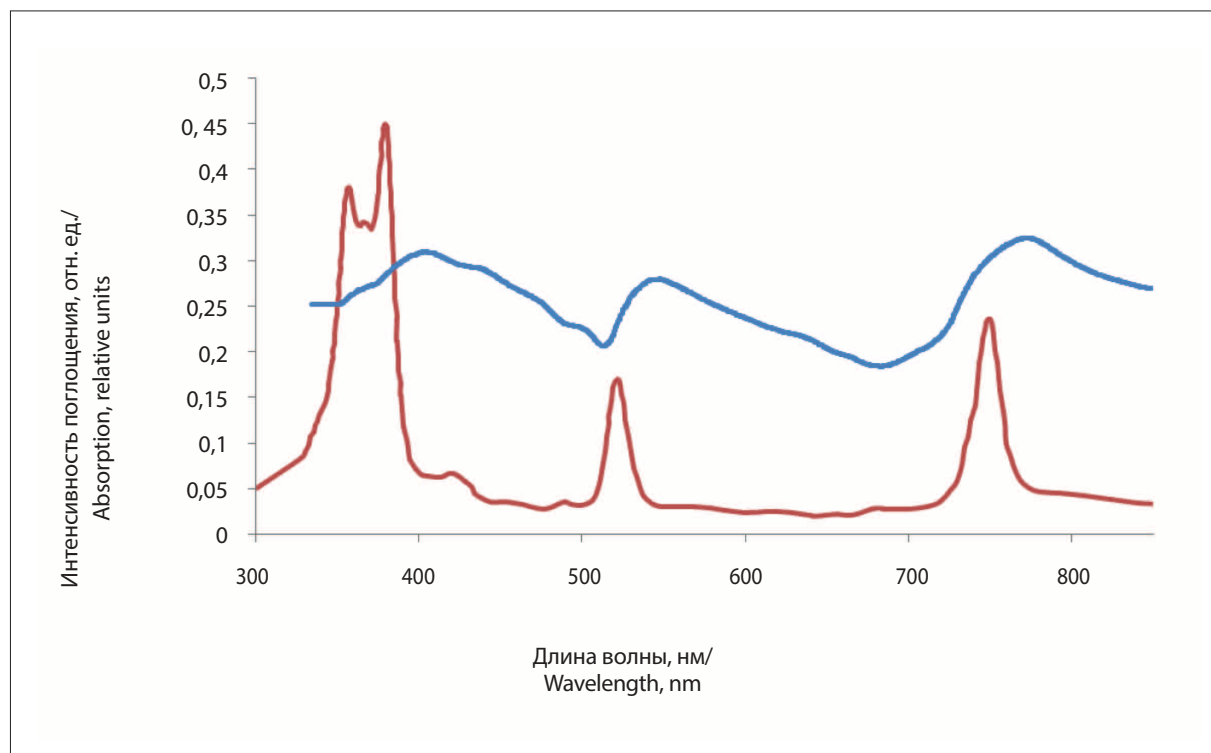


Рис. 2. Спектры поглощения раствора мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в ДМСО (•) и водного коллоида нанокристаллов мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина (•)

Fig. 2. Absorption spectra of *meso*-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin solution in DMSO (•) and aqueous colloid of *meso*-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin nanocrystals (•)

Биологические материалы

Для проведения экспериментов по внутриклеточному распределению использовали клетки иммунной системы – моноциты человека THP-1, культуру клеток рака шейки матки человека HeLa и культуру клеток злокачественной опухоли мозга мыши глиому С6. Водный коллоид мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина (1 мг/мл) добавляли к культуральной среде в объеме 5 мкл и 10 мкл на 1 мл среды – соответственно, концентрация препарата в наноформе в экспериментах составляла 5 мг/л и 10 мг/л. Раствор мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в ДМСО (0,5 мг/мл) добавляли к культуральной среде в объеме 10 мкл на 1 мл среды – соответственно, концентрация препарата в экспериментах составляла 5 мг/л.

Методы исследования**Спектральная лазерная микроскопия**

Для проведения спектральной лазерной микроскопии использован лазерный микроскоп-спектроанализатор [13], который позволяет одновременно получать микроскопическое изображение исследуемого объекта с визуализацией центров флуоресценции и спектры флуоресценции, регистрируемые в диапазоне 0,4–1,1 мкм с помощью волоконного спектрометра ЛЭСА-01-Биоспек (Россия), модифицированного специальными оптическими фильтрами, при возбуждении образца лазером с длиной волны излучения 510,6 нм и выходной плотностью мощности 100 мВт/см². Устройство микроскопа-спектроанализатора позволяет зондировать заданную область пространства и, сфокусировавшись визуально на интересующей области, получать спектр флуоресценции в заданной точке накопления фотосенсибилизатора.

Конфокальная микроскопия

С помощью конфокальной микроскопии были проведены исследования внутриклеточного распределения наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в различных клеточных культурах: клетках иммунной системы – моноцитах человека THP-1, и опухолевых клетках мозга мыши – глиомы С6.

Результаты**Культура опухолевых клеток HeLa**

В ходе исследований по внутриклеточному распределению коллоида наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина для культур клеток HeLa и THP-1 были выявлены некоторые различия.

Так, спустя 2 ч после инкубации коллоида наночастиц с опухолевыми клетками HeLa (концентрация раствора мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клеточной суспензии 10 мг/л), цитоплазматическая мембрана и отдельные внутриклеточные органеллы

проявляли интенсивную флуоресценцию, соответствующую спектру флуоресценции раствора мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина с максимумом на 752 нм. Микроскопические изображения клеток HeLa с центрами интенсивной флуоресценции мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина представлены на рис. 3, а спектр флуоресценции в области с интенсивной флуоресценцией – на рис. 4.

Клетки иммунной системы THP-1

После инкубации коллоида наночастиц с клетками иммунной системы (концентрация раствора мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клеточной суспензии 10 мг/л) спустя 2 ч сигнала флуоресценции, соответствующего раствору мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина, зарегистрировано не было. Однако при дополнительном лазерном освещении с длиной волны 510,6 нм наблюдалось возникновение флуоресценции с максимумом на длине волны 760 нм. Этот эффект вероятно можно объяснить трансформацией кристаллических наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина на границе

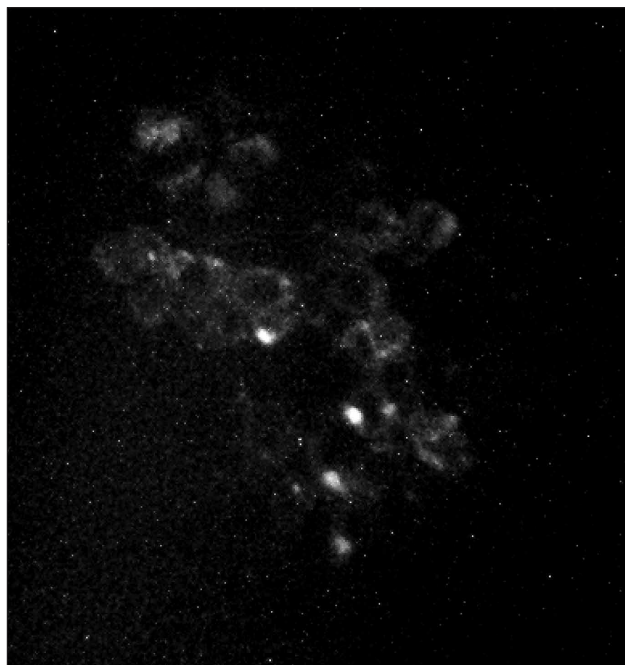


Рис. 3. Микроскопическое изображение (60-кратное увеличение) очагов флуоресценции, вызванной повышенной локальной концентрацией растворенного мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина внутри органелл клеток HeLa, полученное при возбуждении лазерным излучением ($\lambda=510,6$ нм)

Fig. 3. A micrograph (60-fold image magnification) of fluorescence foci caused by increased local concentration of dissolved meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin inside cell organelles HeLa, obtained with excitation by laser radiation ($\lambda=510,6$ nm)

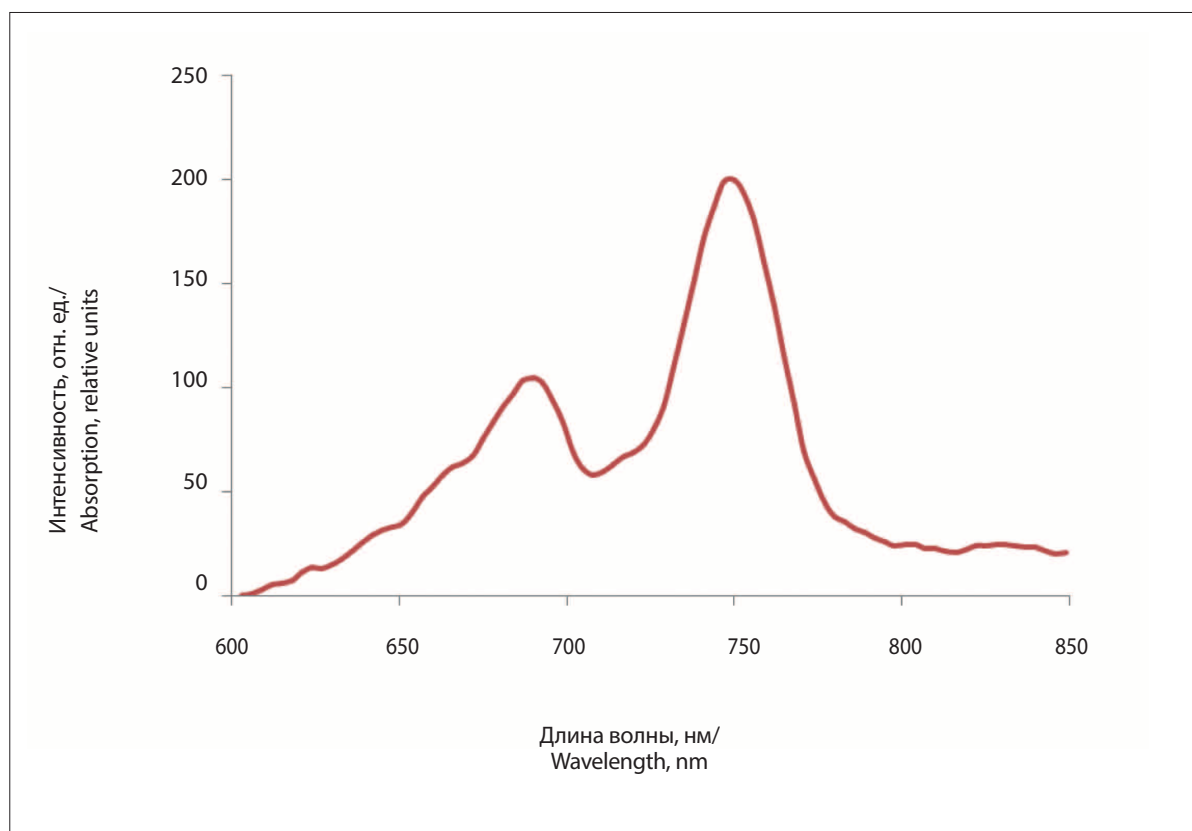


Рис. 4. Спектр флуоресценции молекулярного раствора мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клеточной среде HeLa при возбуждении лазерным излучением ($\lambda=510,6$ нм) (*)

Fig. 4. Fluorescence spectrum of molecular *meso*-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin solution in cell medium HeLa with excitation by laser radiation ($\lambda=510,6$ nm) (*)

клеток благодаря поглощению энергии лазерного излучения, вследствие чего отдельные молекулы мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина приобрели способность к флуоресценции (рис. 5–6).

В ходе работы была изучена динамика накопления и взаимодействие с клетками иммунной системы водного коллоидного раствора наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина, в частности проведена оценка изменения интенсивности флуоресценции изучаемого препарата при взаимодействии с клетками (концентрация раствора наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клеточной суспензии 5 мг/л).

С помощью конфокальной микроскопии были проведены исследования внутриклеточного распределения наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клетках иммунной системы – моноцитах человека THP-1. Полученное микроскопическое изображение внутриклеточного распределения коллоидного раствора наночастиц демонстрирует диффузное распределение мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина внутри цитоплазмы клеток исследуемых клеточных структур (рис. 7).



Рис. 5. Микроскопическое изображение (60-кратное увеличение) флуоресценции, вызванной повышенной внутриклеточной концентрацией кристаллических наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина, полученное при возбуждении лазерным излучением ($\lambda=510,6$ нм)

Fig. 5. A micrograph (60-fold image magnification) of fluorescence caused by increased intracellular concentration of crystalline *meso*-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin nanoparticles obtained with excitation by laser radiation ($\lambda=510.6$ nm)

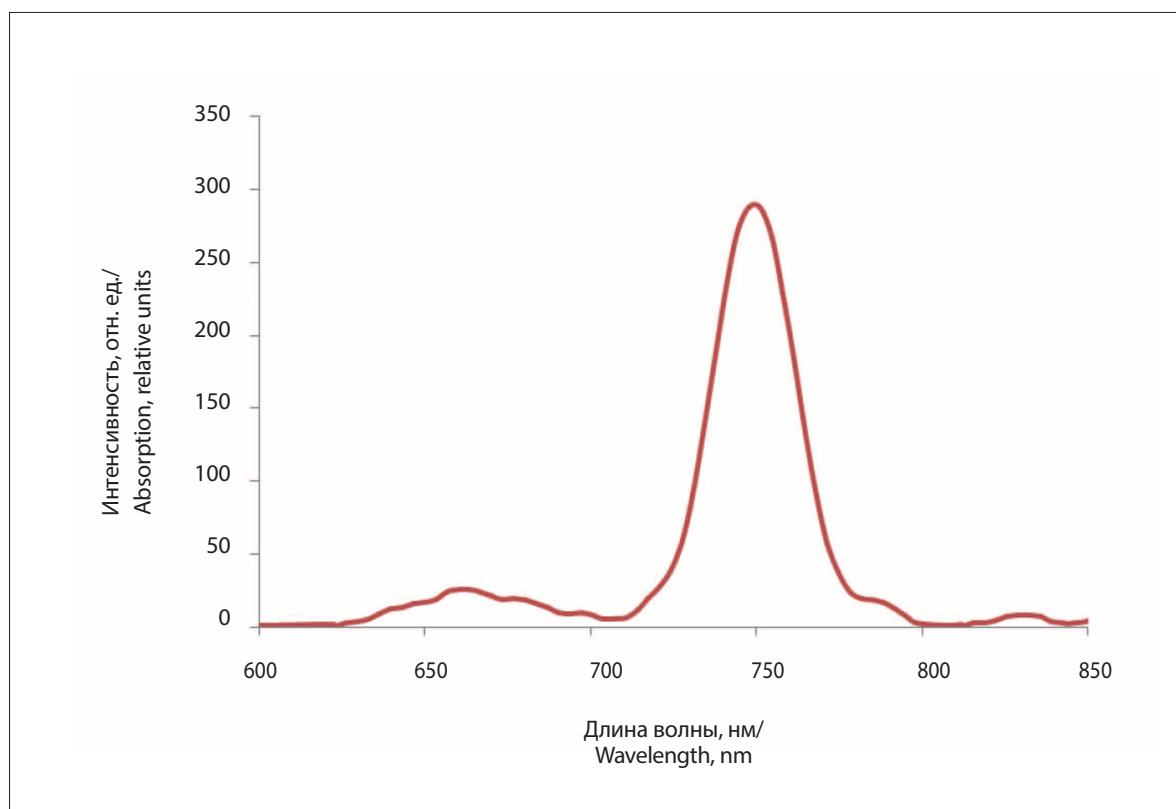


Рис. 6. Спектр флуоресценции коллоидного раствора наночастиц *мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина* в клеточной среде макрофагов при возбуждении лазерным излучением ($\lambda=510,6$ нм) (•)

Fig. 6. Fluorescence spectrum of colloid solution of *meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin* nanoparticles in the macrophages' cell medium with excitation by laser radiation ($\lambda=510,6$ nm) (•)

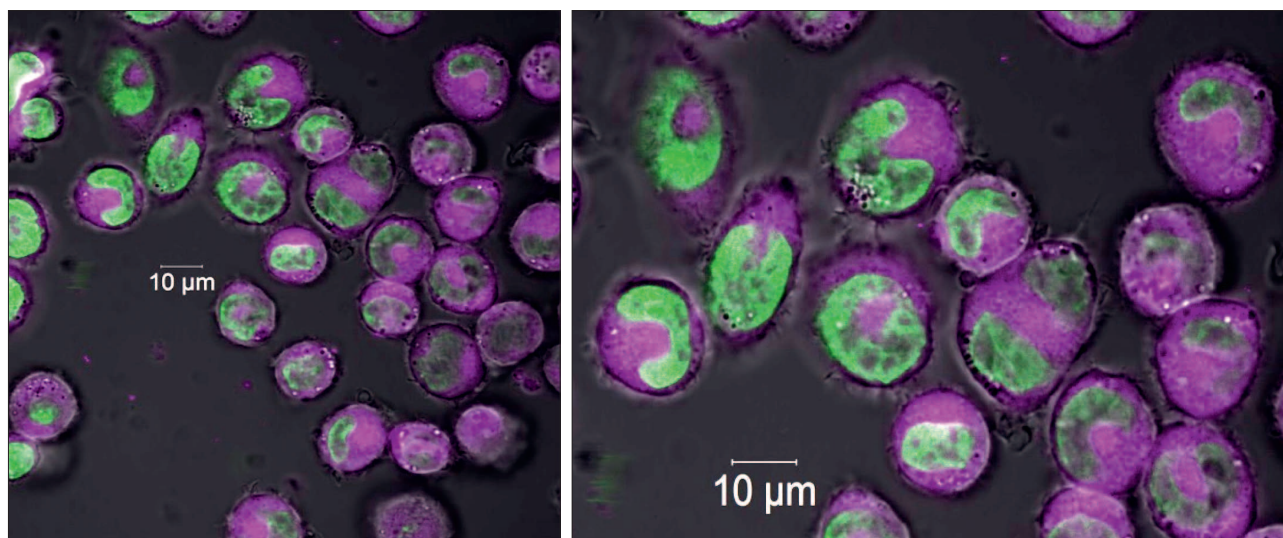


Рис. 7. Внутриклеточное распределение наночастиц *мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина* в клетках иммунной системы – моноцитах человека THP-1

Fig. 7. *Meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin* nanoparticle subcellular distribution within the immune system cells, i.e. human monocytes THP-1

Клетки злокачественной глиомы C6

С помощью конфокальной микроскопии были проведены исследования внутриклеточного распределения наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клетках злокачественной опухоли мозга мыши – глиоме C6 (концентрация раствора наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клеточной суспензии 5 мг/л). Полученное микроскопическое изображение внутриклеточного распределения коллоидного раствора наночастиц демонстрирует диффузное распределение мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина внутри цитоплазмы клеток исследуемых клеточных структур (рис. 8).

Обсуждение

Как уже было сказано ранее, в зависимости от ближайшего окружения поверхностные молекулы исследуемого вещества могут иметь различную пространственную ориентацию или положение, которые можно обозначить как орто- и пара-положения. Взаимодействие наночастиц с мембраной и органеллами клеток происходит за счет поверхностных молекул, конфигурация которых зависит от силы этого взаимодействия с клетками. Таким образом, поверхностные молекулы наночастиц могут удерживаться на поверхности или отрываться от наночастицы, оставляя отдельные молекулы в виде мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина или хлорина в контакте с клеточными структурами. В зависимости от того какое именно положение приняли поверхностные молекулы при контакте с клетками исследуемый препарат проявляет спектроскопические свойства моле-

кулы мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина или хлорина.

Для оценки флуоресцентного сигнала молекул хлорина использовали спектральный диапазон 633–691 нм, а для оценки флуоресцентного сигнала молекул мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина – спектральный диапазон 691–758 нм (рис. 9).

Экспериментальная оценка изменения интенсивности флуоресценции наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина (концентрация раствора наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клеточной суспензии 5 мг/л) при взаимодействии с клетками иммунной системы (моноцитами человека THP-1) и клетками злокачественной опухоли мозга мыши (глиомой C6) показала, что интенсивность флуоресценции молекул со спектроскопическими свойствами хлорина выше интенсивности флуоресценции молекул мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина. Полученная временная зависимость позволяет сделать вывод о том, что интенсивность флуоресценции наночастиц меняется во времени в средах с различными культурами клеток по-разному (рис. 10). Так, в экспериментах с клетками глиомы головного мозга мыши было установлено, что интенсивность флуоресцентного сигнала поверхностно-активных молекул наночастиц, которые приняли положение, отличающееся спектроскопическими свойствами, характерными для молекулы хлорина, со временем изменяется слабо, и в течение 24 ч был зафиксирован незначительный рост интенсивности сигнала. Интенсивность флуоресценции молекул мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина меняется со временем так, что можно выделить

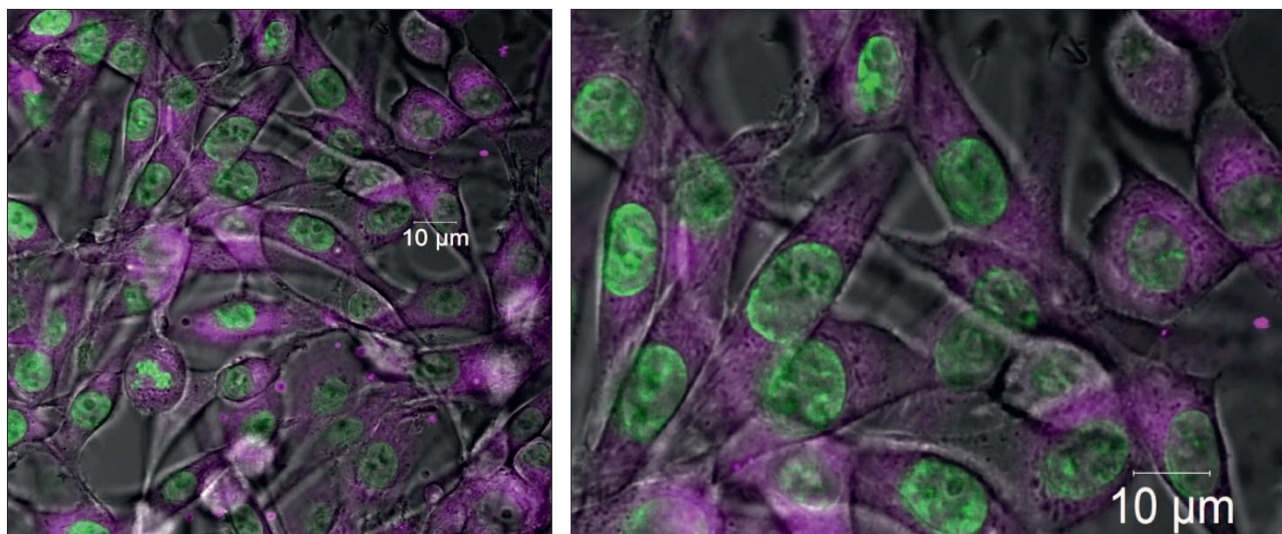


Рис. 8. Внутриклеточное распределение наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клетках злокачественной опухоли мозга мыши – глиомы C6

Fig. 8. Meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin nanoparticle subcellular distribution within cancer cells of mouse cerebral tumor, i.e., glioma C6

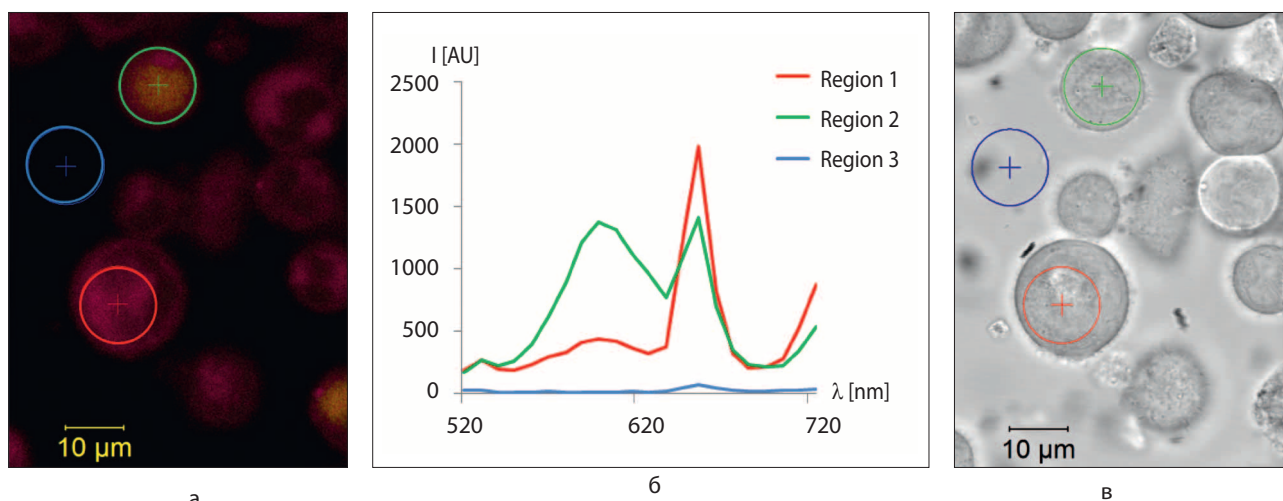
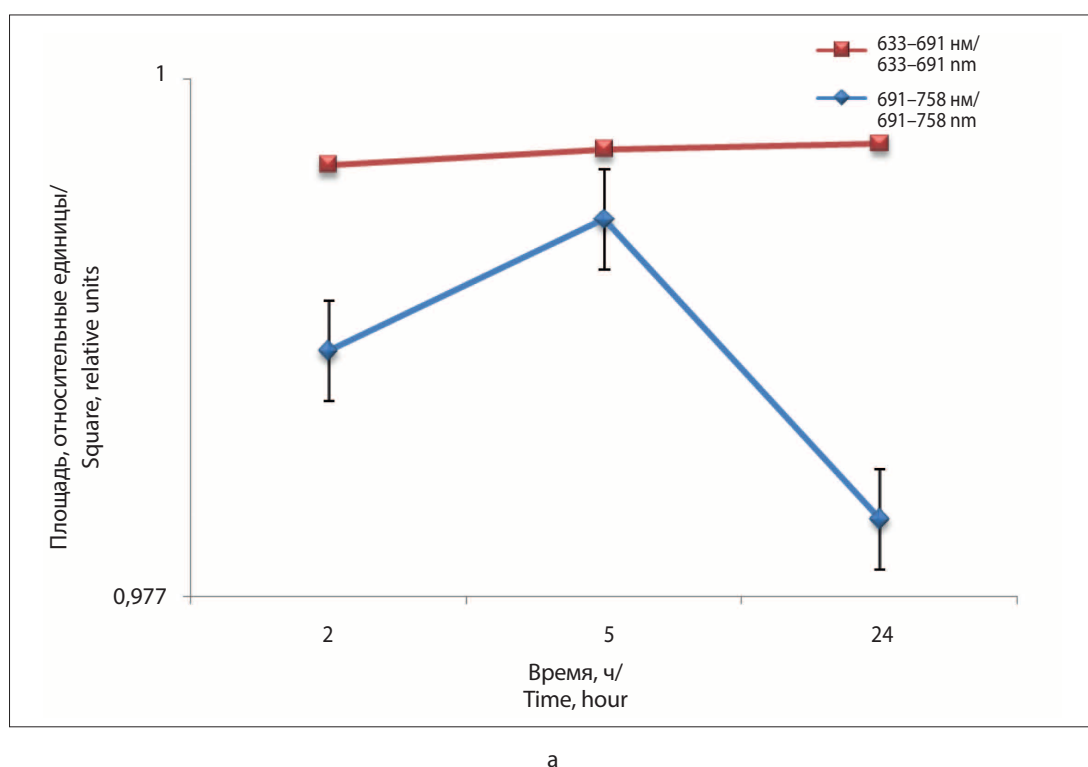


Рис. 9. Флуоресцентные свойства *мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина* в культуре клеток моноцитов человека THP-1:
 а – флуоресцентное микроскопическое изображение, полученное со спектральным разрешением при возбуждении лазером с длиной волны 514 нм;
 б – спектры флуоресценции, соответствующие выделенным областям:
 1 – клетка, накопившая *мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин*,
 2 – клетка, накопившая *мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин*, обладающая повышенным уровнем аутофлуоресценции в области 600 нм,
 3 – фоновое свечение культуральной среды;
 в – изображение клеток в проходящем свете

Fig. 9. Fluorescence properties of *meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin* within culture of human monocytes THP-1 cells:
 а – fluorescence microscopy image is obtained with a spectral resolution with laser excitation on the wavelength of 514 nm;
 б – fluorescence spectra correspond to the selected areas:
 1 – cell accumulated *meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin*,
 2 – cell accumulated *meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin* with elevated autofluorescence level in the 600 nm,
 3 – background glow of cell culture medium;
 в – the cell image in the transmitted light



а

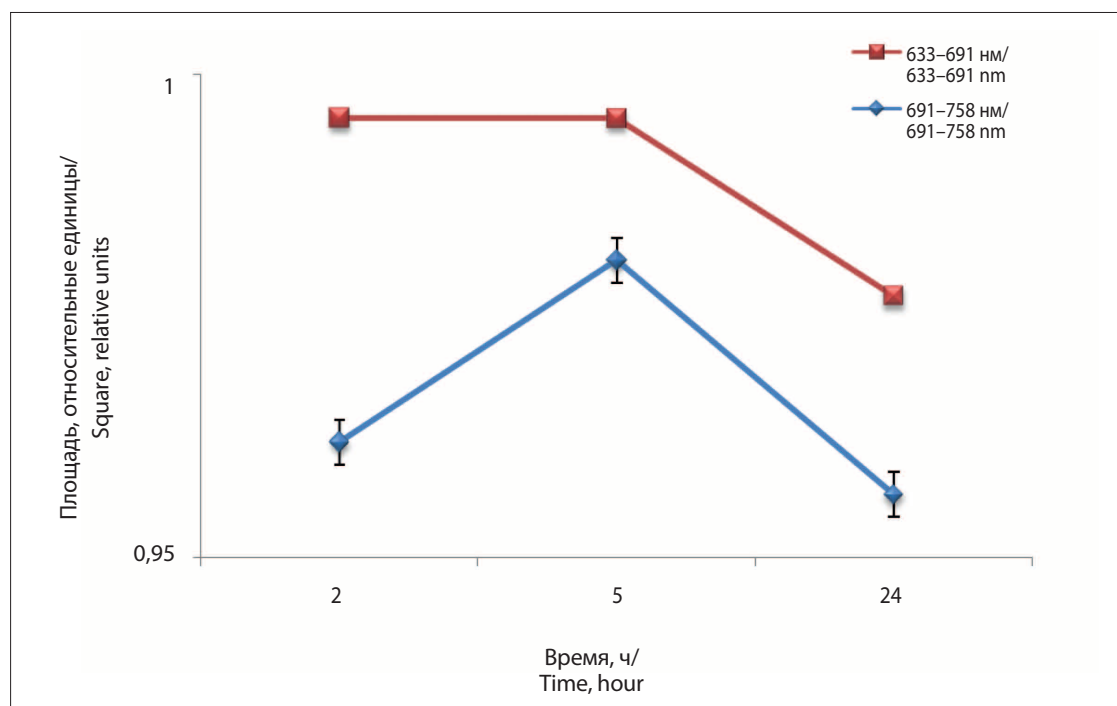


Рис. 10. Временная зависимость интенсивности сигнала флуоресценции

наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина:
а – в клетках глиомы С6;
б – в клетках иммунной системы – моноцитах человека THP-1

(•) 633–691 нм: флуоресцентный сигнал, соответствующий поверхностно активным молекулам, которые имеют спектроскопические свойства молекулы хлорина
(•) 691–758 нм: флуоресцентный сигнал, соответствующий поверхностно активным молекулам, которые имеют спектроскопические свойства молекулы мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина

Fig. 10. Fluorescence signal time dependency for the surface-active molecules of *meso*-tetra(3-pyridyl) bacteriochlorin nanoparticle

а – within the glioma C6 cells
б – within the immune system cells, i.e., human monocytes THP-1

(•) 633–691nm: fluorescent signal corresponding to the surface-active molecules, which have the spectroscopic properties of chlorin molecule
(•) 691–758 nm: fluorescent signal corresponding to the surface-active molecules, which have the spectroscopic properties of *meso*-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin molecule

период разгорания флуоресценции в течение первых 5 ч инкубации и период выведения по прошествии 5 ч (5–24 ч) после начала инкубации с клетками глиомы С6 (рис. 10а). Эксперименты с клетками иммунной системы показали, что и для молекул хлорина, и для молекул мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина характерны период разгорания флуоресценции в течение первых 5 ч инкубации с клетками и период выгорания при инкубации препарата с клетками более 5 ч (5–24 ч) (рис. 10б).

Заключение

Взаимодействие молекулярных нанокристаллов мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина с клетками приводит к появлению спектра флуоресценции,

характерного для раствора мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина. Водный коллоид нанокристаллов мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина, изначально не являясь фототоксичным, в условиях клеточного окружения демонстрирует свойства фотосенсибилизатора ближнего инфракрасного диапазона. С помощью конфокальной микроскопии продемонстрировано диффузное распределение мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина внутри цитоплазмы клеток исследуемых клеточных структур. Продemonстрировано, что исследованный мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин является перспективным соединением для создания препарата на основе его молекулярных нанокристаллов для использования в качестве терапевтического агента с большой глубиной фотодинамического воздействия.

Работа была поддержана грантами РФФИ № 15-29-04869 офи_м, Министерства Образования и науки РФ, соглашение №14.604.21.0014 от 17/06/2014 (RFMEFI60414X0014), FP7-PEOPLE-2013-IRSES No.612620.

ЛИТЕРАТУРА

1. Breymayer J., Rück A., Ryabova A.V., и др. Fluorescence Investigation of the Effect of Monocytes/Macrophages and Skin Cells on Aluminium Phthalocyanine Nanoparticle // *Journal Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2014. – Vol. 11, Is. 3. – P. 380-390.
2. Vasilchenko S.Yu., Volkova A.I., Ryabova A.V., et al. Application of aluminum phthalocyanine nanoparticles for fluorescent diagnostics in dentistry and skin autotransplantation // *J. Biophoton.* – 2010. – Vol. 3, No. 5-6. – P. 336-346.
3. Oertel M., Schastak S.I., Tannapfel A., et al. Novel bacteriochlorin for high tissue-penetration: photodynamic properties in human biliary tract cancer cells in vitro and in a mouse tumour model // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 2003. – Vol. 71. – P. 1-10.
4. Mazor O., Brandis A., Plaks V., et al. WST11, a novel water-soluble bacteriochlorophyll derivative; cellular uptake, pharmacokinetics, biodistribution, and vascular targeted photodynamic activity against melanoma tumors // *Photochem. Photobiol.* – 2005. – Vol. 81. – P. 342-351.
5. Rovers J.P., de Jode M.L., Rezzoug H., Grahn M.F. In vivo photodynamic characteristics of the near-infrared photosensitizer 5, 10, 15, 20-tetrakis (m-hydroxyphenyl) bacteriochlorin // *Photochem. Photobiol.* – 2000. – Vol. 72. – P. 358-364.
6. Миронов А.Ф., Грин М.А., Кармакова Т.А., и др. Новые фотосенсибилизаторы для ФДТ рака на основе природного бактериохлорофилла а // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2003. – Т. 2, № 1. – С. 33-34.
7. Якубовская Р.И., Плотникова Е.А., Морозова Н.Б., и др. Аминоамиды в ряду бактериохлорофилла а и их фотоиндуцированная активность в системах in vitro и in vivo // *Biomedical photonics*. – 2013. – № 3. – С. 29-30.
8. Грин М.А., Пантюшенко И.В., Плотникова Е.А., и др. Новые фотосенсибилизаторы на основе бактериопурпуринимида и их фотоиндуцированная противоопухолевая активность // *Biomedical photonics*. – 2013. – № 3. – С. 33-34.
9. Решетников Р.И., Грин М.А., Харитонов О.В., и др. Бактериохлорин-содержащая триада для совместной флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии рака // *Biomedical photonics*. – 2013. – № 3. – С. 34.
10. Миронов А.Ф., Грин М.А., Ципровский А.Г., и др. Новые фотосенсибилизаторы бактериохлороинового ряда для фотодинамической терапии рака // *Биоорганическая химия*. – 2003. – Т. 29, № 2. – С. 214-221.
11. Якубовская Р.И., Соловьева Л.И., Койфман О.И., и др. Фотосенсибилизатор для фотодинамической терапии // *Патент России № 2548726*. – 2015. – Бюл. № 11.
12. Dudkin S.V., Makarova E.A., Slivka L.K., Lukyanets E.A. Synthesis and properties of tetra- and octacationic meso-tetrakis(3-pyridyl)bacteriochlorin derivatives // *J. Porphyrins Phthalocyanines*. – 2014. – Vol. 18, No. 1-2. – P. 107-114.
13. Маклыгина Ю.С., Бородин А.В., Лощенов В.Б. Лазерный микроскоп-спектроанализатор для исследования внутриклеточного накопления фотосенсибилизаторов ближнего инфракрасного диапазона спектра in vitro // *Biomedical Photonics*. – 2015. – № 3. – С. 3-9.

REFERENCES

1. Breymayer J., Rück A., Ryabova A.V., Loschenov V.B., Steiner R.W. Fluorescence Investigation of the Effect of Monocytes/Macrophages and Skin Cells on Aluminium Phthalocyanine Nanoparticle, *Journal Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2014, Vol. 11, Is. 3, pp. 380-390.
2. Vasilchenko S.Yu., Volkova A.I., Ryabova A.V., Loschenov V.B., Konov V.I., Mamedov A.A., Kuzminand S.G., Lukyanets E.A. Application of aluminum phthalocyanine nanoparticles for fluorescent diagnostics in dentistry and skin autotransplantation, *J. Biophoton.*, 2010, Vol. 3, No. 5-6, pp. 336-346.
3. Oertel M., Schastak S.I., Tannapfel A., Hermann R., Sack U., Mossner J., Berr F. Novel bacteriochlorin for high tissue-penetration: photodynamic properties in human biliary tract cancer cells in vitro and in a mouse tumour model, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2003, Vol. 71, pp. 1-10.
4. Mazor O., Brandis A., Plaks V., Neumark E., Rosenbach-Belkin V., Salomon Y., Scherz A. WST11, a novel water-soluble bacteriochlorophyll derivative; cellular uptake, pharmacokinetics, biodistribution, and vascular targeted photodynamic activity against melanoma tumors, *Photochem. Photobiol.*, 2005, Vol. 81, pp. 342-351.
5. Rovers J.P., de Jode M.L., Rezzoug H., Grahn M.F. In vivo photodynamic characteristics of the near-infrared photosensitizer 5, 10, 15, 20-tetrakis (m-hydroxyphenyl) bacteriochlorin, *Photochem. Photobiol.*, 2000, Vol. 72, pp. 358-364.
6. Mironov A.F., Grin M.A., Karmakova T.A., Plyutinskaya A.D., Yakubovskaya R.I., Feofanov A.V., Vini P. Novel photosensitizers for PDT of cancer based on natural bacteriochlorophyll a, *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal*, 2003, Vol. 2, No. 1, pp. 33-34. (in Russian).
7. Yakubovskaya R.I., Plotnikova E.A., Morozova N.B., Grin M.A., Mironov A.F. Aminoamides derivative of bacteriochlorophyll a and their photo-induced activity in vitro and in vivo, *Biomedical photonics*, 2013, No. 3, pp. 29-30. (in Russian).
8. Grin M.A., Pantyushenko I.V., Plotnikova E.A., Plyutinskaya A.D., Malygina A.I., Kashirtseva I.V., Mikhailovskaya A.A., Yakubovskaya R.I., Kaplan M.A., Mironov A.F. Novel photosensitizers based on bacteriopurpurinimide and their photo-induced antitumor activity, *Biomedical photonics*, 2013, No. 3, pp. 33-34. (in Russian).
9. Reshetnikov R.I., Grin M.A., Kharitonova O.V., Kozlov A.C., Krasnovskii A.A., Feofanov A.V., Ermakova D.E., Mironov A.F. Bacteriochlorin-containing triad for fluorescence diagnosis and photodynamic therapy, *Biomedical photonics*, 2013, No. 3, p. 34. (in Russian).
10. Mironov A.F., Grin M.A., Tsiprovskii A.G., Segenevich A.V., Dzardanov D.V., Golovin K.V., Tsygankov A.A., Shim Ya.K. Novel bacteriochlorin photosensitizers for photodynamic therapy of cancer, *Bioorganicheskaya khimiya*, 2003, Vol. 29, No 2, pp. 214-221. (in Russian).
11. Yakubovskaya R.I., Solov'eva L.I., Koifman O.I., Ponomarev G.V., Lastovoi A.P., Luk'yanets E.A., Morozova N.B., Plotnikova E.A. Photosensitizer for photodynamic therapy, Patent RF No. 2548726, 2015.
12. Dudkin S.V., Makarova E.A., Slivka L.K., Lukyanets E.A. Synthesis and properties of tetra- and octacationic meso-tetrakis(3-pyridyl)bacteriochlorin derivatives, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2014, Vol. 18, No. 1-2, pp. 107-114.
13. Maklygina Yu.S., Borodkin A.V., Loshchenov V.B. Laser microscope-spectrum analyzer for studying intracellular accumulation of near infrared emitting photosensitizers in vitro, *Biomedical Photonics*, 2015, No. 3, pp. 3-9. (in Russian).

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ НАСЫЩЕНИЯ КИСЛОРОДОМ ГЕМОГЛОБИНА В КЛИНИЧЕСКОЙ ОФТАЛЬМОЛОГИИ

С.Ю. Петров¹, А.А. Антонов¹, И.А. Новиков¹, Т.А. Савельева^{2,3}

¹Научно-исследовательский институт глазных болезней, Москва, Россия

²Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия

³Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ, Москва, Россия

Резюме

Важным показателем жизнеобеспечения является содержание кислорода в жидкостях и тканях организма. Ряд патологий зрительного анализатора, таких как глаукома, предположительно, имеет сосудистый генез, заключающийся в нарушении кровоснабжения и циркуляции кислорода. Большая часть кислорода переносится кровью в виде химического соединения с гемоглобином. Проходя через капилляры, гемоглобин отдает кислород, превращаясь из оксигенированного в дезоксигенированный. Этот процесс сопровождается изменением спектральных характеристик гемоглобина, что обуславливает цвета артериальной и венозной крови. На различиях в поглощении света разными формами гемоглобина основан фотометрический метод измерения степени насыщения крови кислородом (сатурации). Метод её оценки называют оксиметрией. В медицине наиболее распространена тканевая пульсоксиметрия с оценкой показателя тканевой оксигенации. Степень насыщения гемоглобина кислородом в сосудах глаза является наиболее доступным для неинвазивного исследования в офтальмологии и вместе с тем информативным параметром. Многочисленные исследования показали важность этого параметра для диагностики ретинопатий различного генеза, анализа метаболического статуса при гипергликемии, диагностики и контроля в процессе лечения глаукомы и других патологических состояний, сопровождающихся нарушением кровоснабжения тканей глаза.

Отдельным методом оценки концентрации кислорода является измерение давления растворенного кислорода в крови – парциальное давление кислорода. В офтальмологии исследования данного показателя проводят в жидкости передней камеры, оценивая содержание кислорода при ряде офтальмопатий, включающих различные формы глаукомы, при инстилляциях гипотензивных препаратов, а также в стекловидном теле в области диска зрительного нерва при различных уровнях внутриглазного давления.

В настоящее время хорошо развито направление оценки сатурации в сосудах сетчатки – ретинальная оксиметрия, основанная на исследовании поглощения света кровью в зависимости от насыщения гемоглобина кислородом путем анализа спектрального состава света, диффузно-отраженного от сетчатки. Также проводят оксиметрию эписклерально-конъюнктивальной сосудистой сети, позволяющую оценить сатурацию сосудов, принимающих кровь от переднего отрезка глаза, и характеризующую состояние его метаболизма при ряде патологий, а также в процессе лечения.

Ключевые слова: оксигемоглобин, дезоксигемоглобин, оксигеметрия, пульсоксиметрия, парциальное давление кислорода, ретинальная оксиметрия, сатурация.

Для цитирования: Петров С.Ю., Антонов А.А., Новиков И.А., Савельева Т.А. Методы оценки насыщения кислородом гемоглобина в клинической офтальмологии // Biomedical Photonics. – 2016. – Т. 5, № 4. – С. 35–43.

Контакты: Петров С.Ю., e-mail: post@glaucomajournal.ruu

TECHNIQUES OF EVALUATION OF HEMOGLOBIN OXYGEN SATURATION IN CLINICAL OPHTHALMOLOGY

Petrov S.Yu.¹, Antonov A.A.¹, Novikov I.A.¹, Savelieva T.A.^{2,3}

¹The Scientific Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russia

²General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russia

Abstract

Oxygen content in body fluids and tissues is an important indicator of life support functions. A number of ocular pathologies, e.g. glaucoma, are of presumable vascular origin which means altered blood supply and oxygen circulation. Most oxygen is transported in the blood in the association with hemoglobin. When passing through the capillaries, hemoglobin releases oxygen, converting from oxygenated form to deoxygenated form. This process is accompanied by the changes in spectral characteristics of hemoglobin which result in different colors of arterial and venous blood. Photometric technique for the measurement of oxygen saturation in blood is based on the differences in light absorption by different forms of hemoglobin. The measurement of saturation is called oximetry. Pulse oximetry with assessment of tissue oxygenation is the most commonly used method in medicine. The degree of hemoglobin oxygen saturation in the eye blood vessels is the most accessible for noninvasive studies during ophthalmoscopy and informative. Numerous studies showed the importance of this parameter for the diagnosis of retinopathy of various genesis, metabolic status analysis in hyperglycemia, diagnosis and control of treatment of glaucoma and other diseases involving alterations in eye blood supply.

The specific method for evaluation of oxygen concentration is the measurement of pressure of oxygen dissolved in the blood, i.e. partial pressure of oxygen. In ophthalmological practice, this parameter is measured in anterior chamber fluid evaluating oxygen level for several ophthalmopathies including different forms of glaucoma, for instillations of hypotensive eye drops as well as in vitreous body near to the optic disc under various levels of intraocular pressure.

Currently, monitoring of oxygen saturation in retinal blood vessels, i.e. retinal oximetry, is well developed. This technique is based on the assessment of light absorption by blood depending on hemoglobin saturation with oxygen by analyzing spectral composition of light diffusively reflected from the retina. Oximetry of bulbar conjunctival and episcleral microvasculature can be also performed allowing for the evaluation of oxygen saturation in vessels which collect blood from the anterior segment and the characterization of anterior segment metabolism in a number of ocular pathologies and in the course of the treatment.

Key words: oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, oximetry, pulse oximetry, oxygen partial pressure, retinal oximetry, saturation.

For citations: Petrov S.Yu., Antonov A.A., Novikov I.A., Savelieva T.A. Techniques of evaluation of hemoglobin oxygen saturation in clinical ophthalmology, *Biomedical Photonics*, 2016, T. 5, No. 4, pp. 35–43 (in Russian).

Contacts: Petrov S.Yu., e-mail: post@glaucomajournal.ru

Введение

В 1872 г. известный немецкий физиолог E.F. Pflüger писал: «...главная тайна регуляции количества кислорода, потребляемого организмом, заключается в том, что оно определяется только самой клеткой... Содержание кислорода в артериальной крови, давление в аорте, скорость кровотока, тип дыхания – все они второстепенны и подчинены одной цели – обслуживанию клеток...» [1]. Кислородный баланс является ключевым показателем жизнеобеспечения. Адекватное поступление кислорода к тканям – важнейшее условие поддержания их функциональной активности.

Многие патологии зрительного анализатора, предположительно, имеют сосудистый патогенез, заключающийся в нарушении кровоснабжения и циркуляции сосудистого и тканевого кислорода. Так, согласно сосудистой теории, глаукомная оптическая нейропатия является следствием недостаточности кровоснабжения из-за повышения офтальмотонуса или иных причин, способствующих нарушению внутриглазного кровотока. Согласно результатам ряда исследований, при глаукоме имеет место снижение перфузии глаза по сравнению с нормой. Тот факт, что нарушение внутриглазного кровотока зачастую предшествует повреждению зрительного нерва, а при глаукоме кровоток может быть снижен и в других местах в организме, свидетельствует о том, что нарушение кислородного обмена, как минимум, в некоторых случаях может являться первичным [2].

Методы спектрального анализа являются высокоточными и неинвазивными, что обуславливает интерес к ним в приложении к оксиметрии тканей переднего отрезка глаза, сетчатки и прилегающих тканей. Однако их применение к биологическим средам, характеризующимся неоднородностью, значительными светорассеивающими свойствами и сложным составом хромофоров, приводящими к уширению и перекрытию спектральных линий, наложению эффектов рассеяния и поглощения при анализе диффузно-отраженного от тканей глаза излучения, представляет собой нетри-

виальную задачу. Первые работы по спектральному анализу тканей глазного дна были посвящены сопряжению существовавших на тот момент офтальмоскопических систем со стандартными спектрометрами, и это направление продолжает развиваться ввиду большого разнообразия хромофоров и флуорофоров, содержащихся в тканях глазного дна, что затрудняет точный количественный анализ концентрации гемоглобина в оксигенированной и редуцированной форме в сосудах сетчатки. Параллельное направление исследований посвящено развитию систем мультиспектральной визуализации, в которых отдается предпочтение одновременному анализу всей поверхности исследуемого участка ткани за счет понижения спектрального разрешения системы. В настоящей статье представлен обзор существующих методик оксиметрии в офтальмологии и рассмотрены исторические предпосылки к их развитию.

Принципы и методы исследования насыщения крови кислородом

Большая часть кислорода (O_2) в организме млекопитающих и человека переносится кровью в виде химического соединения с гемоглобином (Hb). В крови O_2 переносится в двух формах: связанный с гемоглобином (98%) и растворенный в плазме (2%). Количество физически растворенного в крови кислорода не играет значимой роли в его транспорте [3]. Гемоглобин обладает двумя свойствами, которые позволяют ему быть идеальным переносчиком кислорода: способностью присоединять кислород и отдавать его. Эти реакции протекают очень быстро – так, время полунасыщения гемоглобина кислородом составляет около 3 мс. Проходя через тканевые капилляры, гемоглобин отдает кислород, превращаясь при этом из оксигенированного (оксигемоглобин, O_2Hb или HbO_2) в дезоксигенированный гемоглобин (дезоксигемоглобин, восстановленный или редуцированный гемоглобин, Hb или HHb). Этот процесс сопровождается изменением спектральных

характеристик гемоглобина, что обуславливает цвета артериальной и венозной крови [4].

Оксигемоглобин – полностью оксигенированный гемоглобин, каждая молекула которого содержит четыре молекулы кислорода. Оксигемоглобин хорошо рассеивает красный свет (и потому сам имеет красный цвет), но поглощает инфракрасное излучение. Дезоксигемоглобин не содержит кислорода, имеет темно-вишневый цвет, интенсивно поглощает красный свет с длиной волны 620–680 нм [5]. На различиях поглощения света Hb и O₂Hb основан фотометрический метод измерения степени насыщения крови кислородом.

Насыщение кислородом гемоглобина называют сатурацией (SO₂, SatO₂, O₂Sat), а ее индекс выражают в процентах. Нормой сатурации артериальной крови (SaO₂) считают 95–100%, а венозной (SvO₂) – 75%. При индексе SaO₂ в 94% развивается гипоксия, при его снижении до 90% пациент нуждается в экстренной помощи. Для измерения кислородной сатурации крови проводят оксиметрию (гемоксиметрию, оксиметрию).

Первая попытка оксиметрии относится к 1874 г., когда К. von Vierordt, известный также изобретением сфигмографа, обнаружил, что поток красного света, проходя через кисть, ослабевает после наложения жгута [6]. В 30–60-х гг. нашего века были предприняты попытки создать устройство для быстрого выявления гипоксемии: прибор Карла Мэттеса (Лейпциг, 1936 г.), гемоксиметр Глена Милликана (Кембридж, 1940 г.). Широкому распространению гемоксиметров в те годы препятствовала низкая ценность результатов, поскольку световой поток, проходя через ткани, встречает на своем пути не только артериальную, но также венозную и капиллярную кровь, а значит, результат измерения зависит как от насыщения гемоглобина артериальной крови кислородом, так и от состояния периферического кровотока и метаболизма тканей. В 1972 г. Т. Аоуагэ обнаружил, что по колебаниям абсорбции света, вызванной пульсацией артериол, можно рассчитать оксигенацию именно артериальной крови (пульсоксиметр OLV-5100, 1975) [7]. В 1977 г. был выпущен пульсоксиметр Oximet MET-1471 (Minolta, Япония) со стекловолоконным кабелем, передающим световые потоки светодиодов от монитора к пальцевому датчику. Через несколько лет S. Wilber использовал принцип Т. Аоуагэ, но взял в качестве источников излучения светодиоды, что позволило создать легкий и компактный ушной датчик. К 1990 г. выпуском пульсоксиметров занимались уже более 30 фирм [5].

В зависимости от исследуемой зоны тела пациента клиническая оксиметрия разделяется на церебральную, висцеральную и собственно тканевую оксиметрию, описанную выше. Церебральная оксиметрия

применяется во время анестезии и при критических состояниях для анализа насыщения тканей головного мозга кислородом [8]. Использование висцеральной оксиметрии актуально в детской практике [9]. Тканевая пульсоксиметрия с оценкой показателя тканевой оксигенации (StO₂, %) получила широкое распространение в различных областях клинической медицины. Показатель оксигенации периферических тканей помимо баланса доставки и потребления кислорода отражает состояние кровотока в микроциркуляторном русле.

Отдельным методом оценки концентрации кислорода является методика измерения напряжения или давления растворенного кислорода в крови – парциального давления кислорода (PO₂) [10]. Снижение PO₂ в клинике может происходить вследствие снижения вентиляции легких и нарушения кровотока в сердце или легких. Нормальные значения PO₂ составляют 80–105 мм рт. ст. или 10,7–14,0 кПа (чтобы перевести значения PO₂ из мм рт. ст. в кПа, величины в мм рт. ст. умножают на 0,133). Метод определения PO₂ непосредственно в условиях *in vivo* был описан в 50-х гг. прошлого столетия [11]. Измерения напряжения кислорода проводили при помощи полярографического электрода/зонда Леланда Кларка. Принцип полярографического метода основан на диффузии кислорода, растворенного в среде, в которую помещен зонд, через кислород-проницаемую мембрану зонда в электролитный раствор внутри трубки зонда с последующей химической реакцией образования гидроксильных ионов. Данная химическая реакция приводит к появлению электрического тока, величина которого прямо пропорциональна концентрации кислорода в растворе электролита внутри зонда. В офтальмологии полярографические зонды погружали во влагу передней камеры (ВПК), оценивая величину PO₂ в различных ее зонах при офтальмопатологии, а также под воздействием ряда препаратов. Также было показано, что спектр поглощения гемоглобина изменяется с изменением величины парциального давления кислорода, что может быть использовано для спектроскопического измерения PO₂ [12].

Исследования оксигенации в офтальмологии

Парциальное давление кислорода

Первые отечественные экспериментальные работы, оценивающие SO₂ и PO₂ применительно к офтальмологии, проводились в Московском НИИ глазных болезней им. Гельмгольца в лаборатории клинической физиологии зрения под руководством А.А. Яковлева. Исследования 1964–1971 гг. касались транспорта кислорода в переднем отрезке глаза. Изучая влияние миотиков на оксигенацию тканей глаза методом полярографии в эксперименте, А.А. Яковлев

и С.В. Шолохов в 1967 г. установили, что после инстилляции 2%-го раствора пилокарпина возникает тканевая гипоксия радужки и цилиарного тела в течение 20 мин. После инстилляции 0,013%-го раствора фосфакола длительность гипоксии составляла 50 мин. Отрицательное влияние фосфакола и других антихолинэстеразных препаратов на тканевую обмен глаза послужило причиной прекращения их применения в клинической практике [13].

Первые зарубежные работы по экспериментальному определению PO_2 в ВПК принадлежат F.O. Drenckhahn (1958 г.), K.W. Jacobi (1966 г.) и J.K. Wegener (1971 г.) [14–16]. В 1974 г. E. Roetman продемонстрировал наличие градиента PO_2 в различных отделах передней камеры [17]. В 1986–1987 гг. V. Pakalnis продолжил исследования А.А. Яковлева по влиянию препаратов на индекс PO_2 [18]. Группа немецких офтальмологов исследовала PO_2 в норме и при псевдоэкзофолиативном синдроме [19].

Сатурация кислородом системы глазного кровотока

Тканевая пульсоксиметрия

С конца 1950-х гг. ЛПО «Красногвардеец» приступило к серийному выпуску модифицированного «Оксигеометра 036 М» с ушным датчиком, сделав тему оксиметрии весьма популярной в советской медицинской науке. Оксигеометр представлял собой автоматический электронный потенциометр, работающий от фотоэлектрического ушного датчика. Пионером отечественных исследований сатурации в офтальмологии стал коллектив под руководством директора НИИ глазных болезней им. Гельмгольца К.В. Трутневой. Ссылаясь на работы А.А. Яковлева, установившего в эксперименте снижение оксигенации в глазу, и G. Cristini (1954 г.) [20], впервые выявившего снижение оксигенации в глазах больных глаукомой, авторы опубликовали результаты многочисленных исследований общей сатурации при глаукоме, установив наличие общей гипоксемии, коррелирующей со стадией заболевания [21–24].

Лабораторный анализ сатурации

С конца 1950-х гг. в международную лабораторную практику поступили профессиональные анализаторы газов, в т.ч. для оксиметрии, что стимулировало экспериментальные исследования сатурации крови в офтальмологии.

Ряд авторов анализировал сатурацию в крови, взятой из передних цилиарных вен собак и свиней, вортикозных вен кошек и кроликов (B.E. Cohan, 1963 г.; S.S. Elgin, 1964 г.; A. Alm, 1970 г.; P. Tornquist, 1979 г.) [25–28]. В 1984 г. список зарубежных исследователей пополнил сотрудник лаборатории патофизиологии и биохимии глаза НИИ глазных болезней им. Гель-

мгольца Э.Г. Гамм, исследовавший влияние пилокарпина, тимолола и адреналина на сатурацию крови в вортикозных венах кроликов с помощью оксигеометра OSM-2 (Radiometer, Дания) [29].

Ретинальная оксиметрия

Принцип ретинальной оксиметрии основан на исследовании поглощения света кровью в зависимости от насыщения гемоглобина кислородом путем анализа спектрального состава света, диффузно-отраженного от сетчатки. Известно, что светопропускание раствора снижается с увеличением концентрации поглотителя (закон Бугера-Ламберта-Бэра). Зная показатель поглощения (коэффициент экстинкции) для вещества и длину пути, проходимого светом с определенной длиной волны, можно определить его концентрацию. Если рассчитать логарифм отношения яркостей падающего и проходящего света, можно определить оптическую плотность, как особую характеристику раствора. Это справедливо для геометрии измерений в проходящем свете. При регистрации света, диффузно-отраженного назад от объекта, а именно такова геометрия измерений в ретинальной оксиметрии, используется модификация закона Бугера-Ламберта-Бэра, учитывающая положительный вклад рассеяния в измеряемый сигнал [30]. Из спектра диффузно-отраженного от сетчатки света выделяют поглощающую компоненту, которую раскладывают на спектры поглощения отдельных хромофоров. Сетчатка в общем случае характеризуется достаточно сложным хромоформным составом, однако при рассмотрении достаточно узких спектральных диапазонов он может быть сокращен до нескольких компонентов, из которых выделяют два: окси- и дезоксигемоглобин. Результаты достигают, изучая поглощение света на длинах волн, где их показатель поглощения отличается, в сравнении с точкой равного поглощения (изобестической). На точность измерения влияют строение сосудистой стенки, движение клеток крови, их количество и распределение ретинального пигмента. Установлено, что наиболее достоверные результаты получаются при исследовании в зеленом диапазоне оптического спектра, а также в окне биологической прозрачности (красный и ближний инфракрасный диапазоны) [31]. В этих диапазонах спектра поглощение гемоглобина превалирует над поглощением других тканевых хромофоров и при этом наблюдаются существенные различия в спектрах окси- и дезоксигемоглобина.

Первые шаги в ретинальной оксиметрии были сделаны в 1959 г. J. Hickam, применившим фотометрию сосудов глазного дна для расчета сатурации [32]. Базовым методом служило измерение интенсивности отраженного света различных длин волн от ретинальных сосудов с помощью модифицированной

фундус-камеры [33, 34]. В 1988 г. F.C. Delori применил 3-волновую спектрофотометрию отраженного света для измерения сатурации гемоглобина кислородом [35]. Сама 3-волновая модель была впервые описана R.N. Pittman и B.R. Duling [36]. Для исследования используются две изобестические и одна характерная точки спектра, что позволяет учесть эффект рассеяния света эритроцитами. J.S. Tiedeman использовал цифровую систему обработки изображений для определения ретинальных сосудов, в ней отражение света двух длин волн анализируется с выявлением минимума яркости [37]. В 1972 г. Т. Аоуагi разработал концепцию тканевой пульсоксиметрии [7], основываясь на предположении о существовании разницы в поглощении красного и инфракрасного спектров для расчета сатурации, что в 1993 г. позволило J.P. de Kosk разработать метод непрерывного измерения ретинальной сатурации [38]. D. Schweitzer в 2001 г. предложил оценивать сатурацию по спектрально-разрешенным изображениям в диапазоне от 510 нм до 586 нм с учетом прошедшего через сетчатку и подвергнувшегося внутреннему отражению света, причем было показано, что спектр диффузно-отраженного излучения зависит от толщины слоя, содержащего гемоглобин, только в том спектральном диапазоне, в котором преобладает поглощение, в то время как в окне биологической прозрачности эта зависимость не наблюдается [39]. Той же группой авторов был предложен метод, компенсирующий влияние поглощения и рассеяния, не обусловленных гемоглобином, на регистрируемые спектры крови [40]. Для этого они проводили коррекцию по трем изобестическим точкам на длинах волн 522 нм, 569 нм и 586 нм. В 2004 г. G.H. Halldorsson с соавт. предложили метод автоматической регистрации спектрофотометрических изображений сетчатки и развили его два года спустя [41]. Для регистрации изображений использовалась фундус-камера с оптическим мультиплексором, разделяющим изображение с помощью узкополосных фильтров по четырем длинам волн: 542 нм, 558 нм, 586 нм и 605 нм. В 2005 г. Н. Narasimha-Iyer и J.M. Beach [42] предложили метод автоматического вычисления сатурации вдоль сосудов сетчатки по спектрально-разрешенным изображениям на двух длинах волн: 570 нм и 600 нм. Метод включал в себя алгоритм автоматического трекинга сосудов, определения их геометрических характеристик и топологии. При вычислении оптической плотности сосуда в качестве референтного сигнала принималась яркость фона в его окрестности, что является довольно сильным допущением. K.R. Deninghof и соавт. предложили использовать для анализа сатурации гемоглобина сдвиг локального минимума поглощения с 475 нм до 510 нм при переходе из редуцированного в оксигенированное состояние [43, 44]. Однако переход в более коротковолновую область

in vivo чреват понижением специфичности ввиду наложения спектров поглощения других хромофоров. В 2007 г. I. Alabboud и соавт. предложили метод спектрально-разрешенной визуализации сетчатки с использованием жидкокристаллического переключаемого фильтра, интегрированного в систему освещения [45]. Такой подход является достаточно универсальным, поскольку может обеспечить регистрацию изображений для большого числа длин волн (гиперспектральная визуализация), однако в этом случае возможна только последовательная регистрация изображений в отличие от ее одновременной регистрации при использовании оптического мультиплексирования, что замедляет процедуру и приводит к появлению сдвиговых артефактов из-за непроизвольных движений глаза. Установка фильтров в осветительную систему также не влияет на фоновое освещение, что повышает требования к затемнению кабинета, в котором осуществляется регистрация изображений. В 2007 г. W.R. Johnson предложил оценивать SatO₂ сетчатки с помощью гиперспектральных изображений в области от 450 нм до 700 нм в 50 узких спектральных диапазонах с построением пространственно-спектральных данных с построением карт насыщения кислородом [46]. Тем не менее, для картирования сатурации использовались данные на трех длинах волн, что говорит о некоторой избыточности гиперспектральных систем для этого приложения, не отменяя их ценности для широкого ряда других задач. Описанные спектрофотометрические принципы измерения индекса SatO₂ сосудов сетчатки нашли отражение в серийном ретинальном оксиметре «Охумар Т1» (Исландия). В ряде клинических исследований прибор продемонстрировал удовлетворительную повторяемость результатов, хотя их клиническое значение еще предстоит оценить [47].

Группа ученых из Института оптики и электроники (Китай) предложила метод ретинальной оксиметрии малых сосудов (<50 мкм) [48] с использованием конфокального лазерного офтальмоскопа на основе адаптивной оптики на длинах волн 680 нм и 796 нм [49, 50]. Проблема анализа мелких сосудов обусловлена ограничением пространственного разрешения стандартных систем визуализации глазного дна из-за aberrаций структур глаза, лежащих на пути к сетчатке. Адаптивная оптика позволяет решить эту проблему. Основанием для этого подхода явились две разработки. В 1981 г. R.H. Webb и G.W. Hughes предложили использовать для ретинальной оксиметрии сканирующий лазерный конфокальный микроскоп [51]. А в 1997 г. J. Liang и соавт. предложили использовать адаптивную оптику для коррекции монохроматических aberrаций фундус-камеры [52].

В настоящий момент вопрос количества используемых длин волн, порядка и способа регистрации

изображений для визуализации оксигенации гемоглобина в сосудах глаза не является однозначным, используются как мультиспектральные системы с двумя-тремя характерными длинами волн, так и гиперспектральные [53–58]. Решение в пользу какого-то подхода принимается в зависимости от диагностических целей.

Оксиметрия эписклерально-конъюнктивальной сосудистой сети

Принцип пульсоксиметрии, основанный на сквозном просвечивании тканей, и громоздкие датчики делают невозможной оценку оксигенации, локальное измерение сатурации на небольшом поверхностном участке глазного яблока и век. С другой стороны, бульбарная конъюнктива и эписклеральные сосуды хорошо доступны для визуализации. Локализация эписклеральных сосудов под слоем субконъюнктивы несколько снижает объективность потенциальных исследований. Напротив, сосуды бульбарной конъюнктивы, представленные многочисленными артериолами, венами, и капиллярами, располагаются в поверхностных слоях конъюнктивы, представляя ее уникальность, как одного из немногих участков в организме человека, доступных для прямой и неинвазивной визуализации циркуляции крови [59].

С 2008 г. группой исследователей НИИ глазных болезней РАМН совместно с Центром естественнонаучных исследований Института общей физики им. А.М. Прохорова РАН была разработана и апроби-

рована в эксперименте и клинике методика, позволяющая проводить оценку относительной концентрации общего гемоглобина и оксигенации в визуализируемом микроциркуляторном русле переднего отрезка глаза и век при условии либо хорошей васкуляризации исследуемого участка, либо наличия достаточно крупного сосуда. Основными преимуществами методики явился принцип спектрального анализа диффузно отраженного света, адаптирующий метод для офтальмологии; ограничение глубины просвечивания склерой, что позволило оценивать оксигенацию только поверхностных тканей и сосудов; а также микродатчик, позволяющий проводить исследования на небольшом участке, вплоть до эписклеральных сосудов [60, 61].

Заключение

Длительная история и разнообразие методов исследования кислорода в метаболизме зрительного анализатора свидетельствуют о важной роли кислородного баланса в обеспечении нормального функционирования глаза. Оценка сатурации кислорода в сосудах сетчатки, увеального тракта и тканях переднего отрезка, парциальное давление кислорода во влаге передней камеры и стекловидном теле – каждый из этих показателей с одной стороны является маркером состояния глазного метаболизма, с другой – указателем направления терапии. Несмотря на большой объем научных работ, проведенных в мире, в настоящее время есть понимание широких перспектив для будущих исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pflüger E.F.W. // Arch Gesamte Physiol. – 1872. – Vol. 6. – P. 43.
2. Mozaffarieh M., Grieshaber M.C., Flammer J. Oxygen and blood flow: players in the pathogenesis of glaucoma // *Molecular vision*. – 2008. – Vol. 14. – P. 224-233.
3. Кузьков В.В., Киров М.Ю., Сметкин А.А. Мониторинг венозной сатурации. Инвазивный мониторинг гемодинамики в интенсивной терапии и анестезиологии. – Архангельск: СГМУ, 2008. – С. 193-207.
4. Zijlstra W.G., Buursma A., van Assendelft O.W. Visible and near infrared absorption spectra of human and animal haemoglobin: determination and application. – Utrecht, Boston: VSP, 2000. – 368 p.
5. Шурыгин И.А. Мониторинг дыхания: пульсоксиметрия, капнография, оксиметрия. – Москва: Издательство БИНОМ, 2000. – 301 с.
6. Vierordt K. Die quantitative Spektralanalyse in ihrer Anwendung auf Physiologie, Physik, Chemie und Technologie. – Tübingen: H. Laupp'sche Buchhandlung, 1876.
7. Severinghaus J.W. Takuo Aoyagi: discovery of pulse oximetry // *Anesthesia and analgesia*. – 2007. – Vol. 105, Suppl. 6. – P. 1-4.
8. Harvey L., Edmonds Jr. Pro: all cardiac surgical patients should have intraoperative cerebral oxygenation monitoring // *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*. – 2006. – Vol. 20, No. 3. – P. 445-449.
9. Cortez J., Gupta M., Amaram A., et al. Noninvasive evaluation of splanchnic tissue oxygenation using near-infrared spectroscopy in preterm neonates // *J Matern Fetal Neonatal Med*. – 2011. – Vol. 24, No. 4. – P. 574-582.

REFERENCES

1. Pflüger E.F.W., *Arch Gesamte Physiol.*, 1872, Vol. 6, p. 43.
2. Mozaffarieh M., Grieshaber M.C., Flammer J. Oxygen and blood flow: players in the pathogenesis of glaucoma, *Molecular vision*, 2008, Vol. 14, pp. 224-233.
3. Kuz'kov V.V., Kirov M.Yu., Smetkin A.A. Monitoring of venous oxygen saturation. Invasive monitoring of hemodynamics in intensive therapy and anesthesiology, *Arkhangel'sk, SGMU Publ.*, 2008, pp. 193-207.
4. Zijlstra W.G., Buursma A., van Assendelft O.W. Visible and near infrared absorption spectra of human and animal haemoglobin: determination and application, *Utrecht, Boston, VSP Publ.*, 2000, 368 p.
5. Shurygin I.A. Respiratory monitoring: pulse oximetry, capnography, oximetry, Moscow, *BINOM Publ.*, 2000, 301 p.
6. Vierordt K. Quantitative spectral analysis applied to physiology, physics, chemistry and technology, *Tübingen, H. Laupp'sche Buchhandlung Publ.*, 1876. (in German).
7. Severinghaus J.W. Takuo Aoyagi: discovery of pulse oximetry, *Anesthesia and analgesia*, 2007, Vol. 105, Suppl. 6, pp. 1-4.
8. Harvey L., Edmonds Jr. Pro: all cardiac surgical patients should have intraoperative cerebral oxygenation monitoring, *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*, Vol. 20, No. 3, pp. 445-449.
9. Cortez J., Gupta M., Amaram A., Pizzino J., Sawhney M., Sood B.G. Noninvasive evaluation of splanchnic tissue oxygenation using near-infrared spectroscopy in preterm neonates, *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2011, Vol. 24, No. 4, pp. 574-582.

10. Clark L.C. Measurement of oxygen tension: a historical perspective // *Crit Care Med.* – 1981. – Vol. 9. – P. 960-962.
11. Stow R.W, Randall B.F. Electrical measurement of the pCO₂ of blood // *Am J Physiol.* – 1954. – Vol. 179. – P. 678 (abs).
12. Liu P, Zhu Z., Zeng C., Nie G. Specific absorption spectra of hemoglobin at different po₂ levels: potential noninvasive method to detect PO₂ in tissues // *J.Biomed.Opt.* – 2012. – Vol. 17, No. 12. – 125002.
13. Морозов В.И., Яковлев А.А. Фармакотерапия глазных болезней. – Москва: «МЕДпресс-информ», 2009. – 512 с.
14. Drenckhahn F.O., Lorenzen U.K. Oxygen pressure in the anterior chamber of the eye and the rate of oxygen saturation of the aqueous humor // *Albrecht von Graefe's Archiv fur Ophthalmologie.* – 1958. – Vol. 160, No. 4. – P. 378-387.
15. Jacobi K.W. Continuous measurement of oxygen partial pressure in the anterior chamber of the living rabbit eye // *Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie Albrecht von Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology.* – 1966. – Vol. 169, No. 4. – P. 350-356.
16. Wegener J.K., Moller P.M. Oxygen tension in the anterior chamber of the rabbit eye // *Acta ophthalmologica.* – 1971. – Vol. 49, No. 4. – P. 577-584.
17. Roetman E.L. Oxygen gradients in the anterior chamber of anesthetized rabbits // *Investigative ophthalmology.* – 1974. – Vol. 13, No. 5. – P. 386-389.
18. Pakalnis V.A., Rustgi A.K., Stefansson E., et al. The effect of timolol on anterior-chamber oxygenation // *Annals of ophthalmology.* – 1987. – Vol. 19, No. 8. – P. 298-300.
19. Helbig H., Schlotzer-Schrehardt U., Noske W., et al. Anterior-chamber hypoxia and iris vasculopathy in pseudoexfoliation syndrome // *German journal of ophthalmology.* – 1994. – Vol. 3, No. 3. – P. 148-153.
20. Cristini G. Uveal consumption of oxygen in the glaucomatous eye // *Annales d'oculistique.* – 1954. – Vol. 187, No. 5. – P. 401-408.
21. Трутнева К.В., Зарецкая Р.Б., Зубарева Т.В. Оксигенация крови у больных глаукомой // *Вестник офтальмологии.* – 1970. – № 5. – С. 23-28.
22. Новые методы функциональной диагностики в офтальмологии / Под ред. К.В. Трутневой. – Москва, 1973. – С. 112-135.
23. Трутнева К.В., Зарецкая Р.Б., Жданов В.К. Новые возможности объективного комплексного исследования кислородного обмена у больных с глазной патологией // *Вестник офтальмологии.* – 1977. – № 1. – С. 45-50.
24. Зарецкая Р.Б., Трутнева К.В. К механизму нарушения кислородного обмена у больных глаукомой // *Вестник офтальмологии.* – 1978. – № 5. – С. 5-10.
25. Cohan B.E., Cohan S.B. Flow and oxygen saturation of blood in the anterior ciliary vein of the dog eye // *The American journal of physiology.* – 1963. – Vol. 205. – P. 60-66.
26. Elgin S.S. Arteriovenous Oxygen Difference across the Uveal Tract of the Dog Eye // *Investigative ophthalmology.* – 1964. – Vol. 3. – P. 417-426.
27. Alm A., Bill A. Blood flow and oxygen extraction in the cat uvea at normal and high intraocular pressures // *Acta physiologica Scandinavica.* – 1970. – Vol. 80, No. 1. – P. 19-28.
28. Tornquist P., Alm A. Retinal and choroidal contribution to retinal metabolism in vivo. A study in pigs // *Acta physiologica Scandinavica.* – 1979. – Vol. 106, No. 3. – P. 351-357.
29. Gamm E.G., Puchkov S.G. Oxygen saturation of blood in the anterior ciliary veins in patients with primary glaucoma // *Acta ophthalmologica.* – 1985. – Vol. 63, No. 4. – P. 408-410.
30. Delpy D.T., Cope M., van der Zee P., et al. Estimation of optical path length through tissue from direct time of flight measurements // *Phys. Med. Biol.* – 1988. – Vol. 33. – P. 1433-1442.
31. Smith M.H. Optimum wavelength combinations for retinal vessel oximetry // *Applied optics.* – 1999. – Vol. 38, No. 1. – P. 258-267.
10. Clark L.C. Measurement of oxygen tension: a historical perspective, *Crit Care Med*, 1981, Vol. 9, pp. 960-962.
11. Stow R.W, Randall B.F. Electrical measurement of the pCO₂ of blood, *Am J Physiol*, 1954, Vol. 179, p. 678.
12. Liu P, Zhu Z., Zeng C., Nie G. Specific absorption spectra of hemoglobin at different po₂ levels: potential noninvasive method to detect PO₂ in tissues, *J.Biomed.Opt.*, 2012, Vol. 17, No. 12, 125002.
13. Morozov V.I., Yakovlev A.A. Pharmacotherapy of eye diseases, *Moscow, MEDpress-inform Publ.*, 2009, 512 p.
14. Drenckhahn F.O., Lorenzen U.K. Oxygen pressure in the anterior chamber of the eye and the rate of oxygen saturation of the aqueous humor, *Albrecht von Graefe's Archiv fur Ophthalmologie*, 1958, Vol. 160, No. 4, pp. 378-387.
15. Jacobi K.W. Continuous measurement of oxygen partial pressure in the anterior chamber of the living rabbit eye, *Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie Albrecht von Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*, 1966, Vol. 169, No. 4, pp. 350-356.
16. Wegener J.K., Moller P.M. Oxygen tension in the anterior chamber of the rabbit eye, *Acta ophthalmologica*, 1971, Vol. 49, No. 4, pp. 577-584.
17. Roetman E.L. Oxygen gradients in the anterior chamber of anesthetized rabbits, *Investigative ophthalmology*, 1974, Vol. 13, No. 5, pp. 386-389.
18. Pakalnis V.A., Rustgi A.K., Stefansson E., Wolbarsht M.L., Landers M.B. The effect of timolol on anterior-chamber oxygenation, *Annals of ophthalmology*, 1987, Vol. 19, No. 8, pp. 298-300.
19. Helbig H., Schlotzer-Schrehardt U., Noske W., Kellner U., Foerster M.N., Naumann G.O. Anterior-chamber hypoxia and iris vasculopathy in pseudoexfoliation syndrome, *German journal of ophthalmology*, 1994, Vol. 3, No. 3, pp. 148-153.
20. Cristini G. Uveal consumption of oxygen in the glaucomatous eye, *Annales d'oculistique*, 1954, Vol. 187, No. 5, pp. 401-408.
21. Trutneva K.V., Zaretskaya R.B., Zubareva T.V. Investigations of oxygenation in ophthalmology, *Vestnik oftal'mologii*, 1970, No. 5, pp. 23-28. (in Russian).
22. New methods of functional diagnostics in ophthalmology, by eds. K.V. Trutneva. Moscow, 1973, pp. 112-135.
23. Trutneva K.V., Zaretskaya R.B., Zhdanov V.K. New opportunities of the objective comprehensive study of the oxygen metabolism in patients with ocular pathology, *Vestnik oftal'mologii*, 1977, No. 1, pp. 45-50. (in Russian).
24. Zaretskaya R.B., Trutneva K.V. To mechanism of alteration of oxygen metabolism patients with glaucoma, *Vestnik oftal'mologii*, 1978, No. 5, pp. 5-10. (in Russian).
25. Cohan B.E., Cohan S.B. Flow and oxygen saturation of blood in the anterior ciliary vein of the dog eye, *The American journal of physiology*, 1963, Vol. 205, pp. 60-66.
26. Elgin S.S. Arteriovenous Oxygen Difference across the Uveal Tract of the Dog Eye, *Investigative ophthalmology*, 1964, Vol. 3, pp. 417-426.
27. Alm A., Bill A. Blood flow and oxygen extraction in the cat uvea at normal and high intraocular pressures, *Acta physiologica Scandinavica*, 1970, Vol. 80, No. 1, pp. 19-28.
28. Tornquist P., Alm A. Retinal and choroidal contribution to retinal metabolism in vivo. A study in pigs, *Acta physiologica Scandinavica*, 1979, Vol. 106, No. 3, pp. 351-357.
29. Gamm E.G., Puchkov S.G. Oxygen saturation of blood in the anterior ciliary veins in patients with primary glaucoma, *Acta ophthalmologica*, 1985, Vol. 63, No. 4, pp. 408-410.
30. Delpy D.T., Cope M., van der Zee P., Arridge S., Wray S., Wyatt J. Estimation of optical path length through tissue from direct time of flight measurements, *Phys. Med. Biol.*, 1988, Vol. 33, pp. 1433-1442.
31. Smith M.H. Optimum wavelength combinations for retinal vessel oximetry, *Applied optics*, 1999, Vol. 38, No. 1, pp. 258-267.

32. Hickam J.B., Sieker H.O., Frayser R. Studies of retinal circulation and A-V oxygen difference in man // *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. – 1959. – Vol. 71. – P. 34-44
33. Hickam J.B., Frayser R., Ross J.C. A study of retinal venous blood oxygen saturation in human subjects by photographic means // *Circulation*. – 1963. – Vol. 27. – P. 375-385.
34. Delori F.C., Gragoudas E.S., Francisco R., Pruett R.C. Monochromatic ophthalmoscopy and fundus photography. The normal fundus // *Archives of ophthalmology*. – 1977. – Vol. 95, No. 5. – P. 861-868.
35. Delori F.C. Noninvasive technique for oximetry of blood in retinal vessels // *Appl. Opt.* – 1988. – Vol. 27. – P. 1113-1125.
36. Pittman R.N., Duling B.R. Measurement of percent oxyhemoglobin in the microvasculature // *Journal of applied physiology*. – 1975. – Vol. 38, No. 2. – P. 321-327.
37. Tiedeman J.S., Kirk S.E., Srinivas S., Beach J.M. Retinal oxygen consumption during hyperglycemia in patients with diabetes without retinopathy // *Ophthalmology*. – 1998. – Vol. 105, No. 1. – P. 31-36.
38. de Kock J.P., Tarassenko L., Glynn C.J., Hill A.R. Reflectance pulse oximetry measurements from the retinal fundus // *IEEE transactions on bio-medical engineering*. – 1993. – Vol. 40, No. 8. – P. 817-823
39. Schweitzer D., Thamm E., Hammer M., Kraft J. A new method for the measurement of oxygen saturation at the human ocular fundus // *International ophthalmology*. – 2001. – Vol. 23, No. 4-6. – P. 347-353.
40. Hammer M., Thamm E., Schweitzer D. A simple algorithm for in vivo ocular fundus oximetry compensating for non-haemoglobin absorption and scattering // *Physics in medicine and biology*. – 2002. – Vol. 47. – P. 233-238.
41. Hardarson S.H., Harris A., Karlsson R.A., et al. Automatic retinal oximetry // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2006. – Vol. 47. – P. 5011-5016.
42. Narasimha-lyer H., Beach J.M., Khoobehi B., et al. Algorithms for automated oximetry along the retinal vascular tree from dual-wavelength fundus images // *Journal of Biomedical Optics*. – 2005. – Vol. 10(5). – 054013.
43. Denninghoff K.R., Chipman R.A., Hillman L.W. Oxyhemoglobin saturation measurements by green spectral shift // *Optics letters*. – 2006. – Vol. 31, No. 7. – P. 924-926.
44. Denninghoff K.R., Sieluzicka K.B., Hendryx J.K., et al. Retinal oximeter for the blue-green oximetry technique // *Journal of biomedical optics*. – 2011. – Vol. 16(10). – 107004.
45. Alabboud I., Muyo G., Gorman A., et al. New spectral imaging techniques for blood oximetry retina // *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*. – 2007. – Vol. 6631.
46. Johnson W.R., Wilson D.W., Fink W., et al. Snapshot hyperspectral imaging in ophthalmology // *Journal of biomedical optics*. – 2007. – Vol. 12(1). – 014036.
47. Palsson O., Geirsdottir A., Hardarson S.H., et al. Retinal oximetry images must be standardized: a methodological analysis // *Investigative ophthalmology & visual science*. – 2012. – Vol. 53, No. 4. – P. 1729-1733.
48. Li H., Lu J., Shi G., Zhang Y. Measurement of oxygen saturation in small retinal vessels with adaptive optics confocal scanning laser ophthalmoscope // *J. Biomed. Opt.* – 2011. – Vol. 11, No. 16. – 110504.
49. Roorda A., Romero-Borja F., Donnelly III W.J., et al. Adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy // *Opt. Express*. – 2002. – Vol. 10, No. 9. – P. 405-412.
50. Li H., Lu J., Shi G., Zhang Y. Tracking features in retinal images of adaptive optics confocal scanning laser ophthalmoscope using KLT-SIFT algorithm // *Biomed. Opt. Express*. – 2010. – Vol. 1, No. 1. – P. 31-40.
51. Webb R.H., Hughes G.W. Scanning laser ophthalmoscope // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. – 1981. – Vol. 28. – P. 488-492.
52. Liang J., Williams D.R., Miller D.T. Supernormal vision and high-resolution retinal imaging through adaptive optics // *Journal of the Optical Society of America A*. – 1997. – Vol. 14, No. 11. – P. 2884-2892.
32. Hickam J.B., Sieker H.O., Frayser R. Studies of retinal circulation and A-V oxygen difference in man, *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, Vol. 71, pp. 34-44.
33. Hickam J.B., Frayser R., Ross J.C. A study of retinal venous blood oxygen saturation in human subjects by photographic means, *Circulation*, 1963, Vol. 27, pp. 375-385.
34. Delori F.C., Gragoudas E.S., Francisco R., Pruett R.C. Monochromatic ophthalmoscopy and fundus photography. The normal fundus, *Archives of ophthalmology*, 1977, Vol. 95, No. 5, pp. 861-868.
35. Delori F.C. Noninvasive technique for oximetry of blood in retinal vessels, *Appl. Opt.*, 1988, Vol. 27, pp. 1113-1125.
36. Pittman R.N., Duling B.R. Measurement of percent oxyhemoglobin in the microvasculature, *Journal of applied physiology*, 1975, Vol. 38, No. 2, pp. 321-327.
37. Tiedeman J.S., Kirk S.E., Srinivas S., Beach J.M. Retinal oxygen consumption during hyperglycemia in patients with diabetes without retinopathy, *Ophthalmology*, 1998, Vol. 105, No. 1, pp. 31-36.
38. de Kock J.P., Tarassenko L., Glynn C.J., Hill A.R. Reflectance pulse oximetry measurements from the retinal fundus, *IEEE transactions on bio-medical engineering*, 1993, Vol. 40, No. 8, pp. 817-823.
39. Schweitzer D., Thamm E., Hammer M., Kraft J. A new method for the measurement of oxygen saturation at the human ocular fundus, *International ophthalmology*, 2001, Vol. 23, No. 4-6, pp. 347-353.
40. Hammer M., Thamm E., Schweitzer D. A simple algorithm for in vivo ocular fundus oximetry compensating for non-haemoglobin absorption and scattering, *Physics in medicine and biology*, 2002, Vol. 47, pp. 233-238.
41. Hardarson S.H., Harris A., Karlsson R.A., Halldorsson G.H., Kagemann L., Rechtman E., Zoega G.M., Eysteinnsson T., Benediktsson J.A., Thorsteinsson A., Jensen P.K., Beach J., Stefánsson E. Automatic retinal oximetry, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2006, Vol. 47, pp. 5011-5016.
42. Narasimha-lyer H., Beach J.M., Khoobehi B., Kawano H., Roysam B. Algorithms for automated oximetry along the retinal vascular tree from dual-wavelength fundus images, *Journal of Biomedical Optics*, 2005, Vol. 10(5), 054013.
43. Denninghoff K.R., Chipman R.A., Hillman L.W. Oxyhemoglobin saturation measurements by green spectral shift, *Optics letters*, 2006, Vol. 31, No. 7, pp. 924-926.
44. Denninghoff K.R., Sieluzicka K.B., Hendryx J.K., Ririe T.J., Deluca L., Chipman R.A. Retinal oximeter for the blue-green oximetry technique, *Journal of biomedical optics*, 2011, Vol. 16(10), 107004.
45. Alabboud I., Muyo G., Gorman A., Mordant D., McNaught A., Petres C., Petillot Y.R., Harvey A.R. New spectral imaging techniques for blood oximetry retina, *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, 2007, Vol. 6631.
46. Johnson W.R., Wilson D.W., Fink W., Humayun M., Bearman G. Snapshot hyperspectral imaging in ophthalmology, *Journal of biomedical optics*, 2007, Vol. 12(1), 014036.
47. Palsson O., Geirsdottir A., Hardarson S.H., Olafsdottir O.B., Kristjansdottir J.V., Stefánsson E. Retinal oximetry images must be standardized: a methodological analysis, *Investigative ophthalmology & visual science*, 2012, Vol. 53, No. 4, pp. 1729-1733.
48. Li H., Lu J., Shi G., Zhang Y. Measurement of oxygen saturation in small retinal vessels with adaptive optics confocal scanning laser ophthalmoscope, *J. Biomed. Opt.*, 2011, Vol. 11, No. 16, 110504.
49. Roorda A., Romero-Borja F., Donnelly III W.J., Queener H., Hebert T.J., Campbell M.C.W. Adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy, *Opt. Express*, 2002, Vol. 10, No. 9, pp. 405-412.
50. Li H., Lu J., Shi G., Zhang Y. Tracking features in retinal images of adaptive optics confocal scanning laser ophthalmoscope using KLT-SIFT algorithm, *Biomed. Opt. Express*, 2010, Vol. 1, No. 1, pp. 31-40.
51. Webb R.H., Hughes G.W. Scanning laser ophthalmoscope, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 1981, Vol. 28, pp. 488-492.
52. Liang J., Williams D.R., Miller D.T. Supernormal vision and high-resolution retinal imaging through adaptive optics, *Journal of the Optical Society of America A*, 1997, Vol. 14, No. 11, pp. 2884-2892.

53. Ashman R.A., Reinholz F., Eikelboom R.H. Oximetry with a multiple wavelength SLO // *International ophthalmology*. – 2001. – Vol. 23, No. 4-6. – P. 343-346.
54. Mordant D.J., Al-Abboud I., Muyo G., et al. Spectral imaging of the retina // *Eye (London, England)*. – 2011. – Vol. 25, No. 3. – P. 309-320.
55. Patel C.K., Fung T.H., Muqit M.M., et al. Non-contact ultra-widefield imaging of retinopathy of prematurity using the Optos dual wavelength scanning laser ophthalmoscope // *Eye (London, England)*. – 2013. – Vol. 27, No. 5. – P. 589-596.
56. Kristjansdottir J.V., Hardarson S.H., Halldorsson G.H., et al. Retinal oximetry with a scanning laser ophthalmoscope // *Investigative ophthalmology & visual science*. – 2014. – Vol. 55, No. 5. – P. 3120-3126.
57. Vehmeijer W.B., Magnusdottir V., Eliasdottir T.S., et al. Retinal Oximetry with Scanning Laser Ophthalmoscope in Infants // *PLOS ONE*. – 2016. – Vol. 11(2). – e0148077.
58. Савельева Т.А., Линьков К.Г., Модель С.С. и др. Визуализация оксигенации сосудов глаза // *Biomedical photonics*. – 2016. – № 5. – С. 13.
59. Mayrovitz H.N., Larnard D., Duda G. Blood velocity measurement in human conjunctival vessels // *Cardiovascular diseases*. – 1981. – Vol. 8, No. 4. – P. 509-526.
60. Шмырева В.Ф., Петров С.Ю., Антонов А.А. и др. Исследование метаболизма тканей переднего отрезка глаза по уровню оксигенации гемоглобина в венозном русле при первичной открытоугольной глаукоме // *Глаукома*. – 2008. – № 3. – С. 3-10.
61. Шмырева В.Ф., Петров С.Ю., Антонов А.А. и др. Метод оценки оксигенации субконъюнктивального сосудистого русла с помощью спектроскопии отраженного света (экспериментальное исследование) // *Глаукома*. – 2008. – № 2. – С. 9-14.
53. Ashman R.A., Reinholz F., Eikelboom R.H. Oximetry with a multiple wavelength SLO, *International ophthalmology*, 2001, Vol. 23, No. 4-6, pp. 343-346.
54. Mordant D.J., Al-Abboud I., Muyo G., Gorman A., Sallam A., Ritchie P., Harvey A.R., McNaught A.I. Spectral imaging of the retina, *Eye (London, England)*, 2011, Vol. 25, No. 3, pp. 309-320.
55. Patel C.K., Fung T.H., Muqit M.M., Mordant D.J., Brett J., Smith L., Adams E. Non-contact ultra-widefield imaging of retinopathy of prematurity using the Optos dual wavelength scanning laser ophthalmoscope, *Eye (London, England)*, 2013, Vol. 27, No. 5, pp. 589-596.
56. Kristjansdottir J.V., Hardarson S.H., Halldorsson G.H., Karlsson R.A., Eliasdottir T.S., Stefánsson E. Retinal oximetry with a scanning laser ophthalmoscope, *Investigative ophthalmology & visual science*, 2014, Vol. 55, No. 5, pp. 3120-3126.
57. Vehmeijer W.B., Magnusdottir V., Eliasdottir T.S., Hardarson S.H., Schalij-Delfos N.E., Stefánsson E. Retinal Oximetry with Scanning Laser Ophthalmoscope in Infants, *PLOS ONE*, 2016, Vol. 11(2), e0148077.
58. Savel'eva T.A., Lin'kov K.G., Model' S.S., Petrov S.Yu., Antonov A.A. Visualization of ocular vessel oxygenation, *Biomedical photonics*, 2016, No. 5, p. 13. (in Russian).
59. Mayrovitz H.N., Larnard D., Duda G. Blood velocity measurement in human conjunctival vessels, *Cardiovascular diseases*, 1981, Vol. 8, No. 4, pp. 509-526.
60. Shmyreva V.F., Petrov S.Yu., Antonov A.A., Stratonnikov A.A., Savel'eva T.A., Shevchik S.A., Ryabova A.V., Uryvaev Yu.V. Anterior segment of the eye tissue metabolism study by the level of oxygenation of hemoglobin in the venous bed with primary open angle glaucoma, *Glaukoma*, 2008, No. 3, pp. 3-10. (in Russian).
61. Shmyreva V.F., Petrov S.Yu., Antonov A.A., Sipliviy I.I., Stratonnikov A.A., Savel'eva T.A., Shevchik S.A., Ryabova A.V. Method for evaluation of subconjunctival vascular oxygenation using reflected light spectroscopy (experimental study), *Glaukoma*, 2008, No. 2, pp. 9-14. (in Russian).

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ СТОЙКОЙ КЕРАТОАКАНТОМЫ ЛБА

С.Д. Дибирова

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Резюме

Приведены результаты клинического наблюдения за пациенткой со стойкой кератоакантомой лба. Пациентке проведен 1 курс фотодинамической терапии с внутриочаговым введением фотосенсибилизатора радахлорин в дозе 0,75 мл/см² опухоли. Параметры облучения: плотность мощности лазерного излучения – 0,39 Вт/см², плотность энергии лазерного излучения – 300 Дж/см². Через 2 нед на месте лечения остался удовлетворительный в косметическом отношении мягкий нормотрофический рубец, не спаянный с окружающими тканями. При цитологическом исследовании опухолевые клетки не обнаружены. При наблюдении в течение 1 года – без рецидива.

Ключевые слова: кератоакантома, фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, радахлорин.

Для цитирования: Дибирова С.Д. Фотодинамическая терапия стойкой кератоакантомы лба // Biomedical Photonics. – 2016. – Т. 5, № 4. – С. 44–47.

Контакты: Дибирова С.Д., e-mail: 7263820@mail.ru

PHOTODYNAMIC THERAPY FOR RESISTANT FOREHEAD KERATOACANTHOMA

Dibirova S.D.

Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Abstract

The results of the follow-up of the patient with persistent forehead keratoacanthoma are represented. The patient underwent one course of PDT with intralesional administration of photosensitizer radachlorin at a dose of 0.75 ml/cm² of tumor. The characteristics of the irradiation were as follows: the laser power density 0.39 W/cm², the light dose – 300 J/cm². Two weeks after treatment there was a cosmetically satisfying soft normotrophic scar with no attachment to underlying tissues in the site of the treatment. According to cytological study tumor cells were not detected. For one-year follow-up there was no recurrence.

Key words: keratoacanthoma, photodynamic therapy, photosensitizer, radachlorin.

For citations: Dibirova S.D. Photodynamic therapy for resistant forehead keratoacanthoma, *Biomedical Photonics*, 2016, T. 5, No. 4, pp. 44–47 (in Russian).

Contacts: Dibirova S.D., e-mail: 7263820@mail.ru

За последние годы в литературе появились многочисленные сообщения об экспериментальных исследованиях, послуживших основой для разработки новых медицинских технологий в фотодинамической терапии (ФДТ) [1–11]. К настоящему времени сформулированы основные тенденции развития ФДТ в различных областях медицины [12]. В том числе показана высокая эффективность ФДТ в дерматовенерологии и дерматоонкологии: в лечении базальноклеточного рака [13–19], актинического кератоза [20–22], остроконечных кондилом [23,24]. В то же время в мировой литературе представлены лишь единичные примеры лечения методом ФДТ атипичной кератоакантомы (КА). В 2012 г. Молочков В.А. и соавт. впервые в России

сообщили о собственном опыте лечения КА с помощью ФДТ. В исследовании была показана высокая клиническая и косметическая эффективность однократной ФДТ с внутриочаговым введением фотосенсибилизатора радахлорин у 6 (66,6%) из 9 пациентов с атипичными солитарными кератоакантомами, что существенно выше частоты спонтанного регресса атипичных КА [25].

Анализ данных литературы показывает, что применение ФДТ в комплексе лечебных мероприятий у больных КА повышает эффективность терапии, сокращает сроки лечения, имеет минимальное количество ограничений [26,27]. Но вопреки положительным результатам, полученным в клинической прак-

тике, при лечении этой патологии ФДТ применяют незаслуженно редко. Учитывая эффективность, простоту, отсутствие побочных реакций и ограниченность противопоказаний при проведении процедур, ФДТ можно отнести к числу наиболее перспективных направлений в лечении данной патологии, и весьма целесообразно продолжать дальнейшие работы по изучению эффективности ФДТ при лечении различных форм КА.

Наглядным доказательством этому служит приведенное клиническое наблюдение.

Пациентка С., 56 лет, находилась в отделении дерматовенерологии и дерматоонкологии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского с диагнозом стойкая кератоакантома лба. До попадания в стационар пациентка в течение 3,5 мес отмечала появление и увеличение в размерах узла на ранее неизменной коже лба. Субъективно пациентка ощущала незначительную болезненность при активных мимических движениях. За 2 мес новообразование увеличилось до 1,8 см в диаметре, и в его центральной части сформировалась массивная корка. Через 3 мес рост очага поражения прекратился.

При осмотре в области лба с левой стороны наблюдали куполообразный узел размером 1,8х1,8х0,5 см с четкими границами. В центре его находилась псевдоязва, покрытая светло-коричневыми роговыми массами, по периферии – валикообразная зона, покрытая растянутой кожей телесной окраски с телеангиэктазиями (рис. 1). Периферические лимфатические узлы не увеличены. После проведения цитологического исследования больной установлен диагноз: стойкая кератоакантома лба.



Рис. 1. Состояние до лечения: гигантская кератоакантома лба с центральной псевдоязвой, заполненной роговыми массами, и валикообразной зоной с множественными телеангиэктазиями

Fig. 1. Before treatment: giant keratoacanthoma of forehead with central pseudoulcer filled with horny masses and vallate area with multiple telangiectasias

Перед началом ФДТ пациентке выполнена инфильтрационная анестезия путем введения 4 мл 2%-го раствора лидокаина. Затем проведен 1 сеанс ФДТ с внутриочаговым введением радахлорина (ООО «РАДА-ФАРМА», Россия, регистрационное удостоверение №ЛС-001868 от 16.12.2011) в дозе 0,75 мл/см² опухоли (параметры облучения: плотность мощности лазерного излучения – 0,39 Вт/см², плотность энергии лазерного излучения – 300 Дж/см²).

Переносимость лечения была удовлетворительной.

Сразу после проведения ФДТ за счет фотохимического воздействия произошел геморрагический некроз: опухоль изменила цвет на темно-фиолетовый, с поверхности начал выделяться геморрагический экссудат. На 2-е сутки вокруг опухоли отчетливо определялись два кольцевидных участка: примыкающий к основанию опухоли участок кожи шириной 1 см с бледно-цианотичной окраской и кнаружи от него участок воспалительной гиперемии шириной 1,5 см. Экссудация и темно-фиолетовая окраска очага сохранялись в течение 3 сут. На 4-е сутки на поверхности очага сформировалась плотная геморрагическая корка, начался регресс кератоакантомы с ее уменьшением до размеров 0,8х0,7х0,3 см. На 9-е сутки некротизированный очаг отторгся, а на его месте осталась эрозивная поверхность.

Через 2 нед на месте лечения остался удовлетворительный в косметическом отношении мягкий нормотрофический рубец, не спаянный с окружающими тканями (рис. 2). При цитологическом исследовании опухолевые клетки не обнаружены. При динамическом наблюдении в течение 1 года – без рецидива.



Рис. 2. Состояние через 2 нед после сеанса ФДТ: полная регрессия, рубец в зоне ФДТ

Fig. 2. 2 weeks after PDT session: complete regression, scar in PDT area

ЛИТЕРАТУРА

1. Каплан М.А., Никитина Р.Г., Романко Ю.С. и соавт. Фотодинамическая терапия саркомы М-1 у экспериментальных животных // Лазерная медицина. – 1998. – Т. 2, № 2-3. – С. 38-42.
2. Ярославцева-Исаева Е.В., Каплан М.А. и соавт. Разработка методики фотодинамической терапии экспериментальной опухоли (саркома М-1) при локальном введении фотосенсибилизатора // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 19-22.
3. Каплан М.А., Романко Ю.С., Попучиев В.В. и соавт. Морфофункциональные особенности саркомы М-1 при фотодинамической терапии с использованием фотосенсибилизатора фотодитазин // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 52.
4. Романко Ю.С., Цыб А.Ф., Каплан М.А., Попучиев В.В. Влияние фотодинамической терапии с фотодитазин на морфофункциональные характеристики саркомы М-1 // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2004. – Т. 138, № 12. – С. 658-664.
5. Каплан М.А., Романко Ю.С., Мардынская В.П. и соавт. Разработка метода фотодинамической терапии с Фотодитазин у экспериментальных животных с саркомой М-1 // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 52.
6. Каплан М.А., Романко Ю.С., Попучиев В.В. и соавт. Влияние плотности световой энергии на противоопухолевую эффективность фотодинамической терапии с фотодитазин // Лазерная медицина. – 2005. – Т. 9, № 2. – С. 46-54.
7. Каплан М.А., Галкин В.Н., Романко Ю.С. и соавт. Изучение эффективности фотодинамической терапии экспериментальной опухоли РС-1 с использованием липосомального фотосенсибилизатора на основе борированного хлорина е6 // Радиация и Риск. – 2016. – Т. 25, № 3. – С. 57-65.
8. Sun M., Zhou C., Zeng H, et al. Hiporfin-mediated photodynamic therapy in preclinical treatment of osteosarcoma // Photochem Photobiol. – 2015. – Vol. 91(3). – P. 533-544.
9. Zeng H., Sun M., Zhou C., et al. Hematoporphyrin monomethyl ether-mediated photodynamic therapy selectively kills sarcomas by inducing apoptosis // PLoS One. – 2013. – Vol. 8(10). – e77727.
10. Xue J., Li C., Liu H., et al. Optimal light dose and drug dosage in the photodynamic treatment using PHOTOCYANINE // Photodiagnosis Photodyn Ther. – 2011. – Vol. 8(3). – P. 267-274.
11. Castano A.P., Mroz P., Wu M.X., Hamblin M.R. Photodynamic therapy plus low-dose cyclophosphamide generates antitumor immunity in a mouse model // Proc Natl Acad Sci USA. – 2008. – Vol. 105(14). – P. 5495-5500.
12. Кузнецов В.В. Использование фотодинамической терапии в отечественной онкологии (обзор литературы) // Исследования и практика в медицине. – 2015. – Т. 2, № 4. – С. 98-105.
13. Капинус В.К., Романко Ю.С., Каплан М.А. и соавт. Эффективность флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором фотодитазин у больных раком кожи // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 3. – С. 69-75.
14. Кацалап С.Н., Романко Ю.С. Выбор варианта фотодинамической терапии рецидивной базалиомы // Вестник эстетической медицины. – 2012. – Т. 11, № 1. – С. 44-48.
15. Каплан М.А., Романко Ю.С. Фотодинамическая терапия как новый радикальный метод лечения у больных с рецидивными опухолями «неудобной» локализации // Вопросы онкологии. – 2000. – Т. 46, № 2. – С. 238.
16. Сухова Т.Е., Романко Ю.С., Ярославцева-Исаева Е.В. и соавт. Внутритканевой вариант введения фотосенсибилизатора при фотодинамической терапии базально-клеточного рака кожи (сообщение 1) // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2010. – № 2. – С. 4-10.

REFERENCES

1. Kaplan M.A., Nikitina R.G., Romanko Yu.S., Bozadzhiev L.L., Malygina A.I., Drozhzhina V.V. Photodynamic therapy sarcoma M-1 in experimental animals, Lazernaya meditsina, 1998, Vol. 2, No. 2-3, pp. 38-42. (in Russian).
2. Yaroslavtseva-Isaeva E.V., Kaplan M.A., Romanko Yu.S., Sokol N.I. Development of the method of photodynamic therapy for experimental tumor (sarcoma M-1) with local administration of photosensitizer, Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal, 2003. – Vol. 2, No. 4, pp. 19-22. (in Russian).
3. Kaplan M.A., Romanko Yu.S., Popuchiev V.V., Yuzhakov V.V., Bandurko L.N. Morphofunctional features of sarcoma M-1 in photodynamic therapy using a photosensitizer photodithazine, Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal, 2004, Vol. 3, No. 2, p. 52. (in Russian).
4. Romanko Yu.S., Tsyb A.F., Kaplan M.A., Popuchiev V.V. Impact of photodynamic therapy using photoditazin on the morphofunctional characteristics of sarcoma M-1, Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny, 2004, Vol. 138, No. 12, pp. 658-664. (in Russian).
5. Kaplan M.A., Romanko Yu.S., Mardynskaya V.P., Malygina A.I., Burmistrova N.V., Yaroslavtseva-Isaeva E.V., Spichenkova I.V. Development of a method of photodynamic therapy with photoditazin in experimental animals with sarcoma M-1, Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal, 2004, Vol. 3, No. 2, p. 52. (in Russian).
6. Kaplan M.A., Romanko Yu.S., Popuchiev V.V., Yuzhakov V.V., Bandurko L.N., Mikhina L.N., Fomina N.K., Malygina A.I., Ingel' I.E. Effect of light energy density on the antitumor efficacy of photodynamic therapy with photodithazine, Lazernaya meditsina, 2005, Vol. 9, No. 2, pp. 46-54. (in Russian).
7. Kaplan M.A., Galkin V.N., Romanko Yu.S., Osipchuk Yu.S., Drozhzhina V.V., Malova T.I., Ol'shevskaya V.A. Study of effectiveness of photodynamic therapy for PC-1 experimental tumors with a liposomal photosensitizer chlorine e6 boronated, Radiatsiya i Risk, 2016, Vol. 25, No. 3, pp. 57-65. (in Russian).
8. Sun M., Zhou C., Zeng H, Puebla-Osorio N., Damiani E., Chen J., Wang H., Li G., Yin F., Shan L., Zuo D., Liao Y., Wang Z., Zheng L., Hua Y., Cai Z. Hiporfin-mediated photodynamic therapy in preclinical treatment of osteosarcoma, Photochem Photobiol., 2015, Vol. 91(3), pp. 533-544.
9. Zeng H., Sun M., Zhou C., Yin F., Wang Z., Hua Y., Cai Z. Hematoporphyrin monomethyl ether-mediated photodynamic therapy selectively kills sarcomas by inducing apoptosis, PLoS One, 2013, Vol. 8(10), e77727.
10. Xue J., Li C., Liu H., Wei J., Chen N., Huang J. Optimal light dose and drug dosage in the photodynamic treatment using PHOTOCYANINE, Photodiagnosis Photodyn Ther, 2011, Vol. 8(3), pp. 267-274.
11. Castano A.P., Mroz P., Wu M.X., Hamblin M.R. Photodynamic therapy plus low-dose cyclophosphamide generates antitumor immunity in a mouse model, Proc Natl Acad Sci USA, 2008, Vol. 105(14), pp. 5495-5500.
12. Kuznetsov V.V. Application of photodynamic therapy in the national oncology (review of literature), Issledovaniya i praktika v meditsine, 2015, Vol. 2, No. 4, pp. 98-105. (in Russian).
13. Kapinus V.K., Romanko Yu.S., Kaplan M.A., Ponomarev G.V., Sokol N.I. The efficacy of fluorescence diagnostics and photodynamic therapy with photosensitizer photodithazine in patients with skin cancer Эффективность флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором фотодитазин у больных раком кожи, Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal, 2005, Vol. 4, No. 3, pp. 69-75. (in Russian).
14. Katsalap S.N., Romanko Yu.S. Photodynamic therapy of recurrent basal cell carcinoma, Vestnik esteticheskoi meditsiny, 2012, Vol. 11, No. 1, pp. 44-48. (in Russian).
15. Kaplan M.A., Romanko Yu.S. Photodynamic therapy as a new definitive method of treatment in patients with recurrent tumors of "uncomfortable" sites, Voprosy onkologii, 2000, Vol. 46, No. 2, pp. 238. (in Russian).

17. Молочков А.В., Сухова Т.Е., Третьякова Е.И. и соавт. Сравнительные результаты эффективности лазероиндуцированной термотерапии и фотодинамической терапии поверхностной и микронодулярной базалиом // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2012. – № 4. – С. 30-36.
18. Романко Ю.С., Каплан М.А., Иванов С.А. и соавт. Эффективность фотодинамической терапии базально-клеточной карциномы с использованием фотосенсибилизаторов различных классов // Вопросы онкологии. – 2016. – № 3. – С. 447-450.
19. Fargnoli M.C., Peris K. Photodynamic therapy for basal cell carcinoma // *Future Oncol.* – 2015. – Vol. 11(22). – P. 2991-2996.
20. Сухова Т.Е., Молочков В.А., Романко Ю.С. и соавт. Фотодинамическая терапия актинического кератоза с аппликационным применением «Фотодитазина» // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2010. – № 5. – С. 4-8.
21. Сухова Т.Е., Чанглян К.А., Молочков А.В. и соавт. Сравнительные исследования эффективности фотодинамической терапии и криодеструкции в лечении актинического кератоза // *Biomedical Photonics*. – 2016. – Т. 5, № 3. – С. 19-29.
22. Kessels J.P., Nelemans P.J., Mosterd K., et al. Laser-mediated Photodynamic Therapy: An Alternative Treatment for Actinic Keratosis? // *Acta Derm Venereol.* – 2016. – Vol. 96(3). – P. 351-354.
23. Галкин В.Н., Молочков А.В., Молочков В.А. и соавт. Фотодинамическая терапия остроконечных кондилом // Исследования и практика в медицине. – 2016. – Т. 3, № 2. – С. 66-70.
24. Kacerovska D., Pizinger K., Kumpova M., Cetkovska P. Genital warts treated by photodynamic therapy // *Skinmed.* – 2007. – Vol. 6(6). – P. 295-297.
25. Молочков В.А., Молочков А.В., Сухова Т.Е. и соавт. Местная фотодинамическая терапия кератоакантомы // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2012. – № 4. – С. 21-24.
26. Молочкова Ю.В., Кунцевич Ж.С., Сухова Т.Е., и соавт. Фотодинамическая терапия типичной и атипичной кератоакантомы // Альманах клинической медицины. – 2016. – Т. 44, № 1. – С. 64-70.
27. Галкин В.Н., Романко Ю.С., Каплан М.А., и соавт. Применение фотодинамической терапии при лечении кератоакантомы // *Biomedical Photonics*. – 2016. – Т. 5, № 2. – С. 21-25.
16. Sukhova T.E., Romanko Yu.S., Yaroslavlseva-Isaeva E.V., Korenev S.V., Prokof'ev A.A. Interstitial mode of photosensitizer injection for photodynamic therapy for basal cell carcinoma, *Rossiiskii zhurnal kozhnykh i venericheskikh boleznei*, 2010, No. 2, pp. 4-10. (in Russian).
17. Molochkov A.V., Sukhova T.E., Tret'yakova E.I., Akopova K.V., Koroleva L.P., Prokof'ev A.A., Rumyantsev S.A., Alieva P.M., Romanko Yu.S., Molochkov V.A. Comparative evaluation of the efficiency of laser-induced thermotherapy and photodynamic therapy for superficial and micronodular basalomas, *Rossiiskii zhurnal kozhnykh i venericheskikh boleznei*, 2012, No. 4, pp. 30-36. (in Russian).
18. Romanko Yu.S., Kaplan M.A., Ivanov S.A., Galkin V.N., Molochkova Yu.V., Kuntsevich Zh.S., Tret'yakova E.I., Sukhova T.E., Molochkov V.A., Molochkov A.V. Efficacy of photodynamic therapy for basal cell carcinoma using photosensitizers of different classes, *Voprosy onkologii*, 2016, No. 3, pp. 447-450. (in Russian).
19. Fargnoli M.C., Peris K. Photodynamic therapy for basal cell carcinoma, *Future Oncol*, 2015, Vol. 11(22), pp. 2991-2996.
20. Sukhova T.E., Molochkov V.A., Romanko Yu.S., Changlyan K.A., Tret'yakova E.I. Photodynamic therapy for actinic keratosis with topical application of the photosensitizer photoditazine, *Rossiiskii zhurnal kozhnykh i venericheskikh boleznei*, 2010, No. 5, pp. 4-8. (in Russian).
21. Sukhova T.E., Changlyan K.A., Molochkov A.V., Molochkov V.A., Korenev S.V., Kuntsevich Zh.S., Molochkova Yu.V., Galkin V.N., Romanko Yu.S. Comparative studies of efficacy of photodynamic therapy and kryotherapy for treatment of actinic keratosis, *Biomedical Photonics*, 2016, Vol. 5, No. 3, pp. 19-29. (in Russian).
22. Kessels J.P., Nelemans P.J., Mosterd K., Kelleners-Smeets N.W., Krekels G.A., Ostertag J.U. Laser-mediated Photodynamic Therapy: An Alternative Treatment for Actinic Keratosis?, *Acta Derm Venereol*, 2016, Vol. 96(3), pp. 351-354.
23. Galkin V.N., Molochkov A.V., Molochkov V.A., Korenev S.V., Sukhova T.E., Kuntsevich Zh.S., Romanko Yu.S. Photodynamic therapy of condylomata acuminata, *Issledovaniya i praktika v meditsine*, 2016, Vol. 3, No. 2, pp. 66-70. (in Russian).
24. Kacerovska D., Pizinger K., Kumpova M., Cetkovska P. Genital warts treated by photodynamic therapy, *Skinmed*, 2007, Vol. 6(6), pp. 295-297.
25. Molochkov V.A., Molochkov A.V., Sukhova T.E., Khlebnikova A.N., Kuntsevich Zh.S., Romanko Yu.S., Dibirova S.D., Bochkareva E.V. Local photodynamic therapy for keratoacanthoma, *Rossiiskii zhurnal kozhnykh i venericheskikh boleznei*, 2012, No. 4, pp. 21-24. (in Russian).
26. Molochkova Yu.V., Kuntsevich Zh.S., Sukhova T.E., Dibirova S.D., Galkin V.N., Ivanov S.A., Romanko Yu.S. Photodynamic therapy of typical and atypical keratoacanthoma, *Al'manakh klinicheskoi meditsiny*, 2016, Vol. 44, No. 1, pp. 64-70. (in Russian).
27. Galkin V.N., Romanko Yu.S., Kaplan M.A., Molochkov A.V., Molochkov V.A., Kuntsevich Zh.S., Sukhova T.E., Dibirova S.D. The use of photodynamic therapy in the treatment of keratoacanthomas, *Biomedical Photonics*, 2016, Vol. 5, No. 2, pp. 21-25. (in Russian).

ПРОФЕССОРУ ВЕРЕ АЛЕКСЕЕВНЕ ТИТОВОЙ – 75 ЛЕТ

16 июля 2016 г. исполнилось 75 лет профессору Вере Алексеевне Титовой.

В.А. Титова – доктор медицинских наук, врач-онколог-радиолог высшей категории, заслуженный врач РФ, Лауреат премии Совета Министров СССР за участие в создании автоматизированных терапевтических комплексов для дистанционной и внутриволостной гамма-терапии и их клиническое внедрение. В настоящее время возглавляет лабораторию радиохирургии и внутриволостных методов лечения отдела лучевой терапии и комбинированных методов лечения Российского научного центра рентгенорадиологии.

Вера Алексеевна закончила лечебный факультет ММА им И.С. Сеченова, затем аспирантуру МНИОИ им. П.А. Герцена в области радиационной онкологии под руководством академика А.С. Павлова и профессора К.Н. Костроминой. После окончания обучения специализировалась на кафедре клинической радиологии ЦОЛИУ врачей. С 1982 г. работает в Российском научном центре рентгенорадиологии. Кандидатская и докторская диссертации Веры Алексеевны были посвящены лучевому лечению злокачественных новообразований шейки матки и эндометрия.

Основные научные интересы профессора В.А. Титовой связаны с радиологией, а именно с лучевой терапией злокачественных опухолей, в том числе с проблемами сочетанного радиационного воздействия с системным и локальным применением цитостатиков, а также со смежными с радиологией областями – радиационной физикой, радиобиологией и лазерными технологиями в онкологии.

Под руководством профессора В.А. Титовой в лаборатории радиохирургии и внутриволостных методов лечения Российского научного центра рент-



генорадиологии проводят исследования по разработке новых и совершенствованию традиционных методов контактной и дистанционной гамма-терапии в органосохраняющем лечении опухолей полости рта, женской и мужской половой системы, прямой кишки и других нозологий с использованием современных программ системной полихимиотерапии и терморадисенсибилизации радиорезистентных опухолей.

Вера Алексеевна не только осуществляет руководство научно-практической и методической деятельностью, но

и ведет первичный амбулаторный прием больных в Российском научном центре рентгенорадиологии, определяет тактику специализированного лечения, проводит экспертную оценку эффективности проведенного лечения, динамическое наблюдение после окончания лучевой терапии.

В.А. Титова пользуется авторитетом в научных радиологических кругах, активно занимаясь педагогической и общественной работой. Несомненна заслуга Веры Алексеевны в формировании отечественной научной школы по онкорadiологии – под ее руководством выпущена целая плеяда талантливых учеников, работающих в различных учреждениях России, среди которых ведущие ученые и специалисты практического здравоохранения в области радиологии.

В.А. Титова – автор более 150 серьезных научных публикаций в отечественной и зарубежной литературе, ряда новых медицинских технологий, методических рекомендаций для практического здравоохранения и монографий.

Коллектив редакции, коллеги и друзья сердечно поздравляют Веру Алексеевну и желают крепкого здоровья, благополучия, счастья, творческих успехов и долгих лет активной жизни!

ПРЕСС-РЕЛИЗ V ВСЕРОССИЙСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ И ФОТОДИАГНОСТИКА»

**15–16 сентября 2016 г. в Москве прошла V Всероссийская конференция
«Фотодинамическая терапия и фотодиагностика»**

Ежегодная конференция «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» – ведущая тематическая всероссийская конференция, посвященная проблемам фотодинамической терапии, задачей которой является освещение новейших результатов научной и научно-практической (клинической и экспериментальной) деятельности в области флуоресцентной диагностики (ФД) и фотодинамической терапии (ФДТ).

Конференция вызывает стабильный и ежегодно растущий интерес со стороны специалистов в области ФДТ. По сравнению с 2015 г. количество участников конференции в 2016 г. увеличилось почти в два раза: с 300 до более чем 500 человек.

Среди слушателей и докладчиков конференции в 2016 г. были специалисты из 15 научно-исследовательских центров, 20 практикующих медицинских организаций, 11 образовательных учреждений и 9 научно-производственных компаний и компаний-разработчиков лазерного оборудования. На съезде были представлены все 9 Федеральных округов Российской Федерации (Центральный, Северо-Западный, Сибирский, Приволжский, Южный, Уральский, Северо-Кавказский и Дальневосточный, Крымский), 10 из 12 экономических районов Российской Федерации (Центральный, Восточно-Сибирский, Дальневосточный, Северный, Северо-Кавказский, Северо-Западный, Поволжский, Уральский, Волго-Вятский и Западно-Сибирский), 25 из 85 субъектов Российской Федерации (6 республик – Северная Осетия, Кабардино-Балкария, Чувашия, Саха (Якутия), Татарстан, Чечня; 4 края – Алтайский, Камчатский, Краснодарский, Ставропольский; 12 областей – Астраханская, Архангельская, Амурская, Ивановская, Нижегородская, Новосибирская, Калужская, Ростовская, Саратовская, Томская, Челябинская, Московская; 3 города федерального значения – Москва, Санкт-Петербург и Севастополь. Также в конференции приняли уча-



стие специалисты из стран ближнего и дальнего зарубежья: республики Беларусь и Франции.

В 2016 г. году конференция традиционно продлилась два дня.

15 сентября были проведены два больших пленарных заседания, на которых ведущими российскими специалистами в области фотодинамической терапии были представлены обзорные доклады и лекции.

Первое пленарное заседание открыл доклад профессора Е.В. Филоненко, освещающий клинические аспекты применения фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики в России



с акцентом на последних достижениях и перспективах развития метода. Далее слушателям был представлен ряд докладов, посвященных проблемам применения ФД и ФДТ в конкретных клинических областях: в диагностике и лечении рака мозга, бронхов и пищеварительной системы, а также артрозов и артритов.

Второе пленарное заседание открыл доклад профессора Р.И. Якубовской «Современные тенденции в развитии фотодинамической терапии». Профессор М.А. Каплан в своем докладе рассказал о поисках, создании и экспериментальных исследованиях новых фотосенсибилизаторов. Большой интерес слушателей вызвал доклад профессора В.Б. Лощенова, посвященный новым техническим и физическим методам в фототераностике. Профессор Е.Ф. Странадко в своем выступлении особое внимание уделил роли отечественных исследователей в развитии ФДТ в России. Завершил первый день конференции доклад профессора А.Ф. Мирнова о перспективах использования наноструктурированных фотосенсибилизаторов в медицине.

Во многих докладах звучало, что отечественные разработки в области фотодинамической терапии находятся на уровне последних мировых достижений. Так, в России разрабатываются инновационные перспективные фотосенсибилизаторы, оригинальное лазерное оборудование, новейшие средства доставки фотосенсибилизаторов к патологическим очагам, новые оригина-



нальные клинические методики диагностики и лечения.

Во второй день конференции было проведено 6 секционных заседаний: «Фотодинамическая терапия в лечении вирусассоциированных гинекологических и онкологических заболеваний», «Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия в дерматологии и косметологии», «Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия в клинической онкологии», «Биомедицинская фотоника в онкологии», «Экспериментальные аспекты флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии» и «Нанопотосенсибилизаторы для онкологической тераностики», на которых было представлено 49 устных докладов. Доклады последней секции вызвали особенный интерес у слушателей. Докладчики секции «Нанопотосенсибилизаторы для онкологической тераностики» ознакомили участников с последними отечественными разработками в области нанотехнологий применительно к ФД и ФДТ, в том числе с результатами экспериментальных исследований применения полимерных наночастиц с производным бактериохлорофилла *a* и оригинальных аминокислотамидных с производными хлорина *e*₆ как переносчиками наночастиц бора.

Многие слушатели участвовали в конференции не первый год и отмечали, что ежегодно состав обсуждаемых вопросов и поднимаемых проблем становится все шире и освещается все более гл-

боко. В этом году интересные доклады по экспериментальным и клиническим исследованиям, выполненным на высоком научном и технологическом уровне, были представлены специалистами со всей страны. Участие в конференции дало возможность слушателям из регионов пообщаться друг с другом и с ведущими учеными из центральных научных и клинических учреждений России. В перерывах между секциями участники конференции активно обсуждали представленный в докладах материал, обменивались опытом применения ФД и ФДТ в клинической практике, обсуждали новости в области синтеза и производства новых фотосенсибилизаторов, достижения в разработке и производстве лазерной аппаратуры и устройств доставки.





В период проведения конференции была организована постерная секция, включившая 13 докладов, и была проведена выставка оборудования для ФД и ФДТ. Второй год подряд в рамках конференции проводится конкурс молодых ученых – специалистов в области ФД и ФДТ. Победителям конкурса молодых ученых во второй день конференции были вручены ценные призы.

Также во второй день конференции было проведено заседание Президиума Правления Национальной Фотодинамической Ассоциации, на котором были подведены итоги конференции, принята резолюция, отмечены достижения и существующие проблемы, намечены основные направления дальнейшего развития и внедрения в медицинскую практику методов ФД и ФДТ.