

# BIOMEDICAL PHOTONICS

## BIOMEDICAL PHOTONICS –

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

Входит в Перечень ведущих рецензируемых  
научных журналов ВАК РФ.  
Индексируется в международной  
реферативной базе данных Scopus.

Издательство «Агентство МОРЕ».  
Москва, Хохловский пер., д. 9

## Редакция:

|                       |                                |
|-----------------------|--------------------------------|
| Зав. редакцией        | Иванова-Радкевич В.И.          |
| Научный редактор      | проф. Мамонтов А.С.            |
| Литературный редактор | Моисеева Р.Н.                  |
| Переводчики           | Урлова А.Н.<br>Романишкин И.Д. |
| Компьютерный дизайн   | Кренева Е.И.                   |
| Компьютерная верстка  | Меркулова О.Е.                 |

## 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 г.

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.**, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, генеральный  
директор Национального медицинского исследовательского центра радиологии  
Минздрава России (Москва, Россия)

**Лукьянец Е.А.**, доктор химических наук, профессор, заведующий  
лабораторией Государственного научного центра «Научно-  
исследовательский институт органических полупродуктов 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 фотодинамической терапии  
Государственного научного центра лазерной медицины ФМБА (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)

**Blondel V.**, профессор Университета Лотарингии, руководитель отделения  
Здравоохранение-Биология-Сигналы (SBS), (Нанси, Франция)

**Bolotine L.**, профессор научно-исследовательского центра автоматики  
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.**, Academician 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 FMBA (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)

**Blondel V.**, PhD, professor at University of Lorraine, joint-Head of the Health-Biology-Signal Department (SBS) (Nancy, France)

**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 journal is included into the List of peer-reviewed science press of the State Commission for Academic Degrees and Titles of Russian Federation

The journal is indexed in the international abstract and citation database – Scopus.

The publisher «Agentstvo MORE». 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.          |
| Translators                  | Urlova A.N.            |
|                              | Romanishkin I.D.       |
| Computer design              | Kreneva E.I.           |
| Desktop publishing           | Merkulova O.E.         |

## 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 Board admits for publication only the articles prepared in strict accordance with guidelines for authors. Whole or partial presentation of the material published in the Journal is acceptable only with written permission of the Editorial board.

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**Visualization of Nd<sup>3+</sup>-doped LaF<sub>3</sub> nanoparticles for near infrared bioimaging via upconversion luminescence at multiphoton excitation microscopy**

Ryabova A.V., Keevend K., Tsolaki E., Bertazzo S., Pominova D.V., Romanishkin I.D., Grachev P.V., Makarov V.I., Burmistrov I.A., Vanetsev A.S., Orlovskaya E.O., Baranchikov A.E., Rähn M., Sildos I., Sammelseg V., Loschenov V.B., Orlovskii Y.V. **4**

**Флуоресцентная диагностика злокачественных новообразований кожи с фотосенсибилизаторами хлоринового ряда**

Е.В. Ярославцева-Исаева, М.А. Каплан, В.Н. Капинус, И.С. Спиченкова, Н.И. Сокол **13**

**Антеградная папиллотомия с использованием YAG:Ho лазера при стенозе большого сосочка двенадцатиперстной кишки**

Н.В. Левченко, В.В. Хрячков, Р.Р. Шавалиев, Д.П. Кислицин **21**

**Оперативный анализ сложных медицинских состояний методами фотоники**

А.И. Ларкин, К.А. Труханов **28**

**Метод бесконтактной фотолюминесцентной диагностики состояния фиброзной оболочки глаза**

С.Ю. Петров, И.А. Бубнова, И.А. Новиков, Н.А. Пахомова, А.В. Волжанин, В.А. Семчишен, Е.В. Хайдуков, А.П. Свиридов **32**

## КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

**Фотодинамическая терапия лейкоплакии головки полового члена (клиническое наблюдение)**

Д.А. Церковский, Т.П. Артемьева **37**

## ORIGINAL ARTICLES

**Visualization of Nd<sup>3+</sup>-doped LaF<sub>3</sub> nanoparticles for near infrared bioimaging via upconversion luminescence at multiphoton excitation microscopy**

Ryabova A.V., Keevend K., Tsolaki E., Bertazzo S., Pominova D.V., Romanishkin I.D., Grachev P.V., Makarov V.I., Burmistrov I.A., Vanetsev A.S., Orlovskaya E.O., Baranchikov A.E., Rähn M., Sildos I., Sammelseg V., Loschenov V.B., Orlovskii Y.V. **4**

**Fluorescent diagnostics of malignant skin tumors with chlorin series photosensitizers**

Yaroslavtseva-Isaeva E.V., Kaplan M.A., Kapinus V.N., Spichencova I.S., Sokol N.I. **13**

**Antegrade papillotomy with the use of YAG:Ho laser in stenosis of the major duodenal papilla**

Levchenko N.V., Khrachkov V.V., Shavaliyev R.R., Kislytsyn D.P. **21**

**Operational analysis of complex medical states by photonics methods**

Larkin A.I., Trukhanov K.A. **28**

**Method of non-contact photoluminescent diagnostics of the eye fibrous tunic condition**

Petrov S. Yu., Bubnova I.A., Novikov I.A., Pakhomova N.A., Volzhanin A.V., Semchishen V.A., Khaydukov E.V., Sviridov A.P. **32**

## CASE REPORTS

**Photodynamic therapy for penile leukoplakia (case report)**

Tzerkovsky D.A., Artemyeva T.P. **37**

# VISUALIZATION OF Nd<sup>3+</sup>-DOPED LaF<sub>3</sub> NANOPARTICLES FOR NEAR INFRARED BIOIMAGING VIA UPCONVERSION LUMINESCENCE AT MULTIPHOTON EXCITATION MICROSCOPY

Ryabova A.V.<sup>1</sup>, Keevend K.<sup>2</sup>, Tsolaki E.<sup>3</sup>, Bertazzo S.<sup>3</sup>, Pominova D.V.<sup>1</sup>, Romanishkin I.D.<sup>1</sup>, Grachev P.V.<sup>1</sup>, Makarov V.I.<sup>1</sup>, Burmistrov I.A.<sup>4</sup>, Vanetsev A.S.<sup>1,6</sup>, Orlovskaya E.O.<sup>1</sup>, Baranchikov A.E.<sup>5</sup>, Rahn M.<sup>6</sup>, Sildos I.<sup>6</sup>, Sammelselg V.<sup>6</sup>, Loschenov V.B.<sup>1</sup>, Orlovskii Y.V.<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Swiss Federal Laboratories for Materials Science and Technology (Empa), St. Gallen, Switzerland

<sup>3</sup>University College London (UCL), London, United Kingdom

<sup>4</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>5</sup>Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

<sup>6</sup>Institute of Physics, University of Tartu, Tartu, Estonia

## Abstract

Recent developments in the field of biophotonics facilitate the raise of interest to inorganic nanoparticles (NPs) doped with Nd<sup>3+</sup> ions, because of their near-infrared (NIR) absorption. These NPs are interesting bioimaging probes for deep tissue visualization, while they can also act as local thermometers in biological tissues. Despite the good possibilities for visualization of NPs with Nd<sup>3+</sup> ions in NIR spectral range, difficulties arise when studying the cellular uptake of these NPs using commercially available fluorescence microscopy systems, since the selection of suitable luminescence detectors is limited. However, Nd<sup>3+</sup> ions are able to convert NIR radiation into visible light, showing upconversion properties. In this paper we found optimal parameters to excite upconversion luminescence of Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs in living cells and to compare the distribution of the NPs inside the cell culture of human macrophages THP-1 obtained by two methods. Firstly, by detecting the upconversion luminescence of the NPs in VIS under NIR multiphoton excitation using laser scanning confocal microscopy and secondly, using transmission electron microscopy.

**Keywords:** Nd<sup>3+</sup>-doped nanoparticles, near-infrared, upconversion luminescence, multiphoton excitation, laser scanning confocal microscopy.

**For citations:** Ryabova A.V., Keevend K., Tsolaki E., Bertazzo S., Pominova D.V., Romanishkin I.D., Grachev P.V., Makarov V.I., Burmistrov I.A., Vanetsev A.S., Orlovskaya E.O., Baranchikov A.E., Rahn M., Sildos I., Sammelselg V., Loschenov V.B., Orlovskii Yu.V. Visualization of Nd<sup>3+</sup>-doped LaF<sub>3</sub> nanoparticles for near infrared bioimaging via upconversion luminescence at multiphoton excitation microscopy, *Biomedical Photonics*, 2018, T. 7, No. 1, pp. 4–12.

**Contacts:** Ryabova A.V., e-mail: nastya.ryabova@gmail.com

## ВИЗУАЛИЗАЦИЯ НАНОЧАСТИЦ LaF<sub>3</sub>, ДОПИРОВАННЫХ Nd<sup>3+</sup>, ДЛЯ БИОИМИДЖИНГА В БЛИЖНЕМ ИНФРАКРАСНОМ ДИАПАЗОНЕ ПО АП-КОНВЕРСИОННОЙ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПРИ МИКРОСКОПИИ С МУЛЬТИФОТОННЫМ ВОЗБУЖДЕНИЕМ

А.В. Рябова<sup>1</sup>, К. Кеевенд<sup>2</sup>, Е. Тсолаци<sup>3</sup>, С. Бертаццо<sup>3</sup>, Д.В. Поминова<sup>1</sup>, И.Д. Романишкин<sup>1</sup>, П.В. Грачев<sup>1</sup>, В.И. Макаров<sup>1</sup>, И.А. Бурмистров<sup>4</sup>, А.С. Ванецев<sup>1,6</sup>, Е.О. Орловская<sup>1</sup>, А.Е. Баранчиков<sup>5</sup>, М. Рahn<sup>6</sup>, I. Sildos<sup>6</sup>, V. Sammelselg<sup>6</sup>, В.Б. Лощенов<sup>1</sup>, Ю.В. Орловский<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Swiss Federal Laboratories for Materials Science and Technology (Empa), Switzerland

<sup>3</sup>University College London (UCL), London, United Kingdom

<sup>4</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>5</sup>Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, Москва, Россия

<sup>6</sup>Institute of Physics, University of Tartu, Estonia

## Резюме

Последние разработки в области биофотоники способствуют повышению интереса к неорганическим наночастицам (НЧ), допированным ионами Nd<sup>3+</sup>, из-за их поглощения в ближнем инфракрасном (БИК) спектральном диапазоне. Эти НЧ являются перспективными зондами для глубокой визуализации тканей, в то же время они могут служить локальными термометрами в биологических тканях. Несмотря на хорошие возможности визуализации НЧ с ионами Nd<sup>3+</sup> в БИК спектральном диапазоне, при изучении внутриклеточного распределения этих НЧ с использованием коммерчески доступных флуоресцентных микроскопических систем возникают трудности из-за ограниченности выбора подходящих детекторов люминесценции. Однако, ионы Nd<sup>3+</sup> способны преобразовывать БИК излучение в видимый свет, демонстрируя ап-конверсионные свойства. В этой работе мы определили оптимальные параметры для возбуждения ап-конверсионной люминесценции НЧ Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> в живых клетках и сравнили распределение НЧ внутри клеток культуры человеческих макрофагов THP-1, полученное двумя методами. Во-первых, путем регистрации ап-конверсионной люминесценции НЧ в видимом диапазоне при многофотонном возбуждении в БИК диапазоне спектра с использованием лазерной сканирующей конфокальной микроскопии и, во-вторых, с использованием просвечивающей электронной микроскопии.

**Ключевые слова:** наночастицы, допированные Nd<sup>3+</sup>, ближний инфракрасный спектральный диапазон, ап-конверсионная люминесценция, мультифотонное возбуждение, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия.

**Для цитирования:** Рябова А.В., Keevend K., Tsolaki E., Bertazzo S., Поминова Д.В., Романишкин И.Д., Грачев П.В., Макаров В.И., Бурмистров И.А., Ванецев А.С., Орловская Е.О., Баранчиков А.Е., Rähn M., Sildos I., Sammelselg V., Лощенов В.Б., Орловский Ю.В. Визуализация наночастиц LaF<sub>3</sub>, допированных Nd<sup>3+</sup>, для биоимиджинга в ближнем инфракрасном диапазоне по ап-конверсионной люминесценции при микроскопии с мультифотонным возбуждением // Biomedical Photonics. – 2018. – Т. 7, № 1. – С. 4–12.

**Контакты:** Рябова А.В., e-mail: nastya.ryabova@gmail.com

## Introduction

Optical imaging plays an important role in biomedical research and clinical diagnosis. Obtaining optical images from the depth of biological tissue is a serious scientific task, since biotissue is heterogeneous and has a strong scattering and absorption by various components. NIR spectral region (700-950 nm) is most suitable for excitation during *in vivo* visualization due to minimal absorption by biotissue.

In the last decade a lot of attention has been paid to the inorganic NPs containing rare-earth ions, as a promising class of nanomaterials for biophotonics. The advantages of rare-earth ions as luminescent labels include narrow-band radiation, a large spectral shift between the excitation and emission wavelengths, which is characteristic for the up- and down-conversion, long luminescence lifetime, high photostability of materials and low toxicity, minimization of autofluorescence of biological tissues by time resolved fluorescence spectroscopy and the greatest penetration depth when NPs are excited in the NIR spectral range [1]. Rare-earth ions can be excited through multiple electronic states, and, due to internal conversion, can show luminescence bands in a wide range of UV, VIS, and IR including the second biological window of optical transparency in short-wavelength infrared (SWIR) [2].

NPs doped with Nd<sup>3+</sup> ions, are increasingly considered as an improvement for the upconversion system of ion pair, one of which is the sensitizer Yb<sup>3+</sup>, with the possibility of excitation by 800 nm [3-6]. The absorption cross section of Nd<sup>3+</sup> at 808 nm is  $1.2 \times 10^{-19} \text{ cm}^2$ , about ten times larger than that of Yb<sup>3+</sup> at 980 nm [7], which is conducive to improve the efficiency of upconversion process

through Nd-sensitizing [8]. Also, the Nd<sup>3+</sup>-containing NPs are perspective as bioimaging probes [9] and non-invasive contactless fluorescence temperature sensors [10]. The water colloids of Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs synthesized by hydrothermal microwave treatment have already shown themselves to be excellent fluorescent agents for bioimaging in the NIR spectral range [11].

Despite the good possibilities for visualization of NPs with Nd<sup>3+</sup> ions in NIR spectral range, difficulties arise when studying the cell uptake of these NPs using the methods of common VIS fluorescent microscopy that are associated with the selection of suitable detectors of luminescence [12-14]. Fortunately, the materials doped with Nd<sup>3+</sup> ions can convert NIR radiation into VIS, while Nd<sup>3+</sup> ions can simultaneously act as both sensitizers and activators of upconversion. In this case, the probability of emission in VIS is higher at high pump densities, when high-energy levels of most of the Nd<sup>3+</sup> ions in one NP are populated [15].

The present work demonstrates the visualization of the intracellular distribution of Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs by laser scanning confocal microscopy with multiphoton excitation in the NIR spectral range by pumping into the  $^4F_{5/2}$ ,  $^2H_{9/2}$  (795 nm) and  $^4F_{7/2}$ ,  $^2S_{3/2}$  (738 nm) levels of Nd<sup>3+</sup> and detection of two-photon and three-photon upconversion luminescence in the VIS range.

## Materials and methods

### *Synthesis of Nd<sup>3+</sup>-doped lanthanum trifluoride NPs*

We use water based hydrothermal microwave treatment (HTMW) synthetic approaches to crystalline 4% Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs. NPs with such Nd<sup>3+</sup> doping concentration

is selected as having the highest NIR luminescence brightness. For the synthesis of LaF<sub>3</sub> NPs doped with 4% Nd<sup>3+</sup> ions, 0.48 mM La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O and 0.02 mM Nd(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O were dissolved in 15 ml deionized water (dH<sub>2</sub>O). The solution of rare-earth salts was added dropwise to the 5 mM NH<sub>4</sub>F solution in 25 ml dH<sub>2</sub>O under vigorous stirring. To improve the dispersibility of the obtained NPs, 1 g of biocompatible surfactant polyvinylpyrrolidone (PVP, average M<sub>w</sub> ~55000, Aldrich) was added to the solutions. The surfactant was added to the rare-earth nitrates solutions before precipitation. The freshly precipitated gel was diluted with 10 ml dH<sub>2</sub>O and left stirring for 15 min. The solution was transferred into a 100 ml Teflon autoclave and placed under microwave irradiation for 2 hours at 200°C using a microwave digestion laboratory device Speedwave Four (2.45 GHz, 1 kW maximum output power, Berghof, Germany). The resulting solution was cooled, centrifuged using a Heraeus Multifuge X1 (Thermo Fisher Scientific, USA) and washed several times with dH<sub>2</sub>O. The resulting powder was redispersed in dH<sub>2</sub>O.

#### **Characterization of Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs**

The X-Ray Diffraction (XRD) analysis of the Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs synthesized using HTMW treatment was performed as earlier [16]. The NPs demonstrate pure and highly crystalline LaF<sub>3</sub> phase.

The morphology of the Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs was studied by means of high-resolution transmission electron microscopy (HR TEM) using the Titan 200 instrument (FEI, USA) with a field emission gun operating at 200 kV. The sample was prepared by dropping NPs colloidal solution onto a formvar or holey carbon coated copper (grid 3 mm in diameter) followed by the evaporation of the solvent.

Hydrodynamic sizes of Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs in dH<sub>2</sub>O were determined by multiangle spectrometer of dynamic light scattering Photocor Complex (Photocor, Russia). ζ-potential measurements were determined using a Zeta-sizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) analyzer in dH<sub>2</sub>O at 25 °C. All measurements were performed in triplicate.

The absorption spectra of Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs were recorded on a spectrophotometer U-3400 (Hitachi, Japan).

#### **Confocal microscopy**

Intracellular Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs distribution was studied using human monocytic cell line derived from an acute monocytic leukaemia patient (THP-1). THP-1 cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640) containing 10% fetal bovine serum (FBS) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Cells were sub-cultured every seventh day. For confocal microscopy experiments, monocytic cells were differentiated into macrophage-like cells using Concanavalin A (ConA). Cells were seeded at a density of 100 000 cells/cm<sup>2</sup> on glass bottom dishes with cell culture medium containing 30 µg/ml ConA for three days. During this time, cells attach to the glass bottom and develop

macrophage-like morphology. Next, macrophages were incubated with Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs (100 µg for 500 000 cells) for 2÷72 hours.

For microscopy the cells were finally washed twice with pre-warmed phosphate buffered saline (PBS). For visualization of lysosomes the washed cells were incubated in PBS with 50 nM LysoTracker Green DND-26 (Molecular Probes®) during 20 min at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. The nuclei were stained in PBS with 2 nM Hoechst 33342 (Molecular Probes®) during 10 min at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. To acquire images a laser scanning microscope LSM-710-NLO (Zeiss, Germany) was used. The 63× oil Plan-Apochromat objective with numerical aperture (NA) of 1.4 was used.

The upconversion luminescence of Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs were excited with a pulse femtosecond Chameleon Ultra II laser system (Coherent, USA), tunable in the 690÷1060 nm range, 80 MHz pulse laser, 140 fs pulse width.

The power density produced by the scanning laser beam emerging from the objective lens in the object plane was calculated as follows. The size of this focusing laser spot, assuming uniform illumination, is a function of the excitation wavelength ( $\lambda_{exc}$ ) and the parameter NA of the objective:

$$S_{spotsize} = 1.22\lambda_{exc}/NA$$

Thus, for a wavelength of 738 nm and a 63×Oil objective with aperture NA = 1.4, the spot size was ~640 nm, for a wavelength of 795 nm ~690 nm. Accordingly, for the 1% laser power or 1 mW measured at the output of the objective with the LabMax-TO laser power meter (Coherent, USA) the power densities are 0.313 MW/cm<sup>2</sup> (for 738 nm laser) and 0.263 MW/cm<sup>2</sup> (for 795 nm laser). The dose of laser radiation with a single scan at speed 2.55 µs/pix was 0.80 J/cm<sup>2</sup> for 738 nm laser and 0.67 J/cm<sup>2</sup> for 795 nm laser, respectively.

The luminescence emission was detected by the 32 channel GaAsP detector in VIS spectral range 400÷750 nm. To discriminate between Nd<sup>3+</sup> upconversion luminescence and fluorescence of LysoTrackerGreen DND-26 or Hoechst 33342, "Online Fingerprint" mode was used. For this purpose, the upconversion luminescence spectra of the Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs and fluorescence of LysoTrackerGreen DND-26 or Hoechst 33342 at the same two photon excitation were detected beforehand. As fluorescence of LysoTrackerGreen DND-26 or Hoechst 33342 has gently sloping broad line in the range 400-600 nm, and upconversion luminescence Nd<sup>3+</sup> ions has characteristic comb of narrow peaks, then the total fluorescence corresponding to each pixel can be decomposed into the components [17].

#### **The Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs upconversion luminescence intensity dependence from pump power**

The Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs upconversion luminescence intensity dependence in VIS spectral range 400÷750 nm on 140 fs pulse width 80 MHz pulse laser pump power

varying in 0.1÷5.5 MW/cm<sup>2</sup> at 738 and 795 nm wavelengths was measured using 32 channel GaAsP photo-multiplier detector in LSM-710-NLO. The obtained spectral images were used to plot the intensity dependences of the upconversion luminescence for individual Nd<sup>3+</sup> electronic transitions.

### Transmission electron microscopy (TEM)

For TEM experiments, THP-1 cells were differentiated into macrophage-like cells using phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). The cells were seeded at a density of 50 000 cells/cm<sup>2</sup> in cell culture medium in the presents of PMA at final concentration of 200 nM for differentiation for three days. After differentiation, macrophages were incubated with Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs (100 µg for 100 000 cells) for 48 hours.

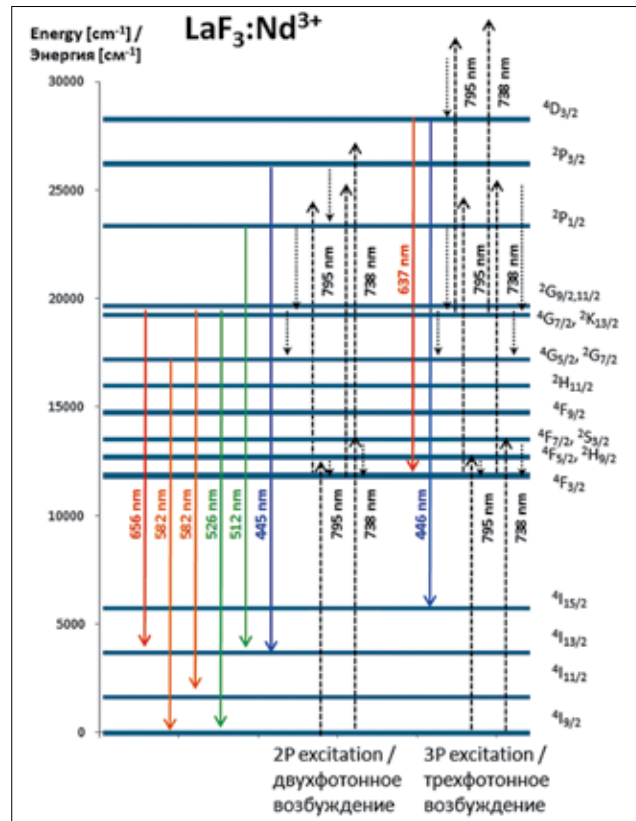
Cells were then gently washed with pre-warmed PBS, trypsinized for 5 min at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> and fixed with 4% methanol-free paraformaldehyde (PFA) overnight in the fridge to produce pellets. Then the pellets were washed three times with double distilled water (ddH<sub>2</sub>O) and 0.1 M cacodylate buffer. For TEM contrast, the pellets were stained with 2% osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) and 1.5% potassium ferricyanide for 1 hour. Next, the pellets were washed with ddH<sub>2</sub>O and gradually dehydrated using an ethanol gradient (20%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% (3x)) for 5 min. The pellets were embedded to epoxy resin (EPON 812) according to procedures described in the manufacturer's protocol. Resin blocks were cured in the oven for 72 hours, trimmed with a razor blade and sectioned in 100 nm sections using an ultramicrotome. Acquired thin sections were imaged using JEOL 2000FX at 80 kV.

## Results and discussion

Nd<sup>3+</sup>-doped LaF<sub>3</sub> nanoparticles are synthesized via microwave assisted hydrothermal reaction. HR TEM results show that synthesized Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs are crystalline with elongated or hexagonal form and a size around 15 to 20 nm (Inset on the Fig. 2). The hydrodynamic size of the particles in colloid is amounted to be 70 nm. The colloidal solution remains stable more than 6 months without noticeable precipitation, because of PVP envelope for each NP. The ζ-potential of these NPs was 13.7±0.9 mV, which is similar to the results obtained for other PVP-functionalized nanoparticles.

The energy level scheme for the trivalent neodymium ions in a Nd<sup>3+</sup> LaF<sub>3</sub> crystal is plotted on the base of literature data (Fig. 1) [18, 19].

The absorption spectra, NIR luminescence spectra of the Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs aqueous colloidal solution, obtained by excitation with 800 nm wavelength at 1 W/cm<sup>2</sup> of continuous wave (CW) laser, and upconversion luminescence obtained with 738 nm and 795 nm wavelengths of femtosecond laser, at 1 MW/cm<sup>2</sup> average power density are presented in Fig. 2.

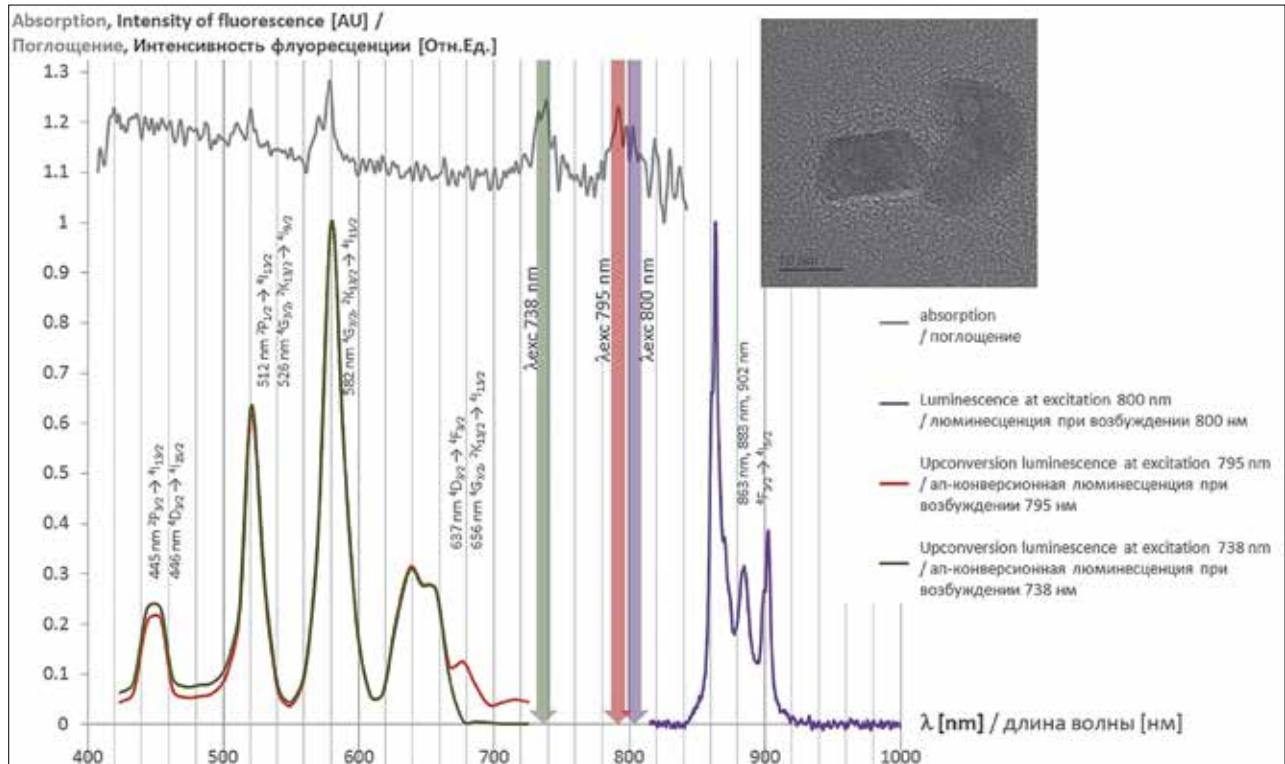


**Fig. 1.** The energy level diagram of Nd<sup>3+</sup> ions in the LaF<sub>3</sub> host matrix  
**Рис. 1.** Диаграмма уровней энергии иона Nd<sup>3+</sup> в допирующей матрице LaF<sub>3</sub>

At both types of excitation, 738 nm and 795 nm, the upconversion luminescence has almost equal intensity and shows different spectral bands of Nd<sup>3+</sup> (Fig. 2). The laser excitation at 795 nm induces the <sup>4</sup>I<sub>9/2</sub>→<sup>2</sup>H<sub>9/2</sub>, <sup>4</sup>F<sub>5/2</sub> transition of Nd<sup>3+</sup> ions, followed by nonradiative relaxation to the <sup>4</sup>F<sub>3/2</sub> metastable state. The laser excitation at 738 nm induces the <sup>4</sup>I<sub>9/2</sub>→<sup>4</sup>F<sub>7/2</sub>, <sup>2</sup>S<sub>3/2</sub> transition of Nd<sup>3+</sup> ions, followed by nonradiative relaxation to the <sup>4</sup>F<sub>3/2</sub> metastable state. At a sufficient power density, the next photon induced absorption transition from the excited <sup>4</sup>F<sub>3/2</sub> state (excited state absorption process, ESA). In addition, there is a resonance cross-relaxation (<sup>4</sup>F<sub>3/2</sub>→<sup>4</sup>I<sub>15/2</sub>, <sup>4</sup>I<sub>9/2</sub>→<sup>4</sup>I<sub>15/2</sub>) transitions from this state, but it is not involved in the upconversion. Thus, the <sup>2</sup>P<sub>1/2</sub> level is excited, followed by nonradiative relaxation to the <sup>4</sup>G<sub>7/2</sub>, <sup>2</sup>K<sub>13/2</sub> metastable state and then to the <sup>4</sup>G<sub>5/2</sub> state. When the third photon is absorbed, the levels higher than <sup>2</sup>P<sub>3/2</sub> are populated (Fig. 1).

The upconversion luminescence intensity I<sub>vis</sub> in the VIS spectral range depends on the pumping power I<sub>p</sub> as I<sub>vis</sub> ∝ I<sub>p</sub><sup>n</sup> where n is the number of NIR photons which are absorbed for emission of one photon in the VIS range [20].

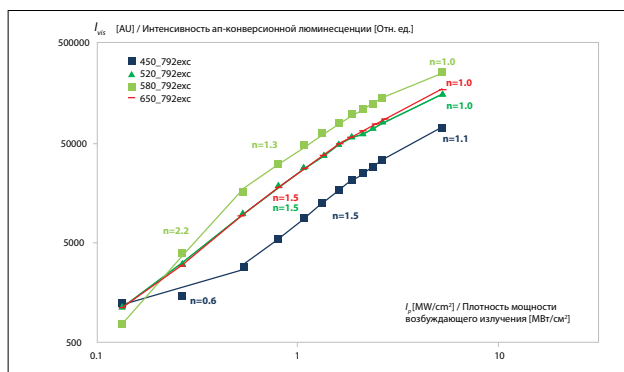
However, in practice, deviations from this dependence can be observed. The slope of the dependence



**Fig. 2.** Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub>NPs spectra: absorption, upconversion luminescence at fs pulsed excitation 738 nm and 795 nm, NIR luminescence at excitation 800 nm; on the inset is HRTEM image of Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs

**Рис. 2.** Спектры НЧ Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub>: поглощение, ап-конверсионная люминесценция при фемтосекундном импульсном возбуждении 738 нм и 795 нм, БИК люминесценция при возбуждении 800 нм; на вставке – высокоразрешающая просвечивающая электронная микроскопия НЧ Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub>

of the upconversion luminescence intensity on the pump power is determined by the competition between relaxation processes and upconversion during the population of excited states of the acceptor. The slope depends on energy transfer to impurity ions, energy migration among donor ions, the inhomogeneous distribution of doping ions in the matrix, and temperature [21]. In our experiments, the dependence of the intensity of the transition  $^2P_{3/2} \rightarrow ^4I_{13/2}$  and  $^4D_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$  (420÷460 nm),



**Fig. 3.** The pumping power dependence of Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs upconversion luminescence intensity under 795 nm excitation

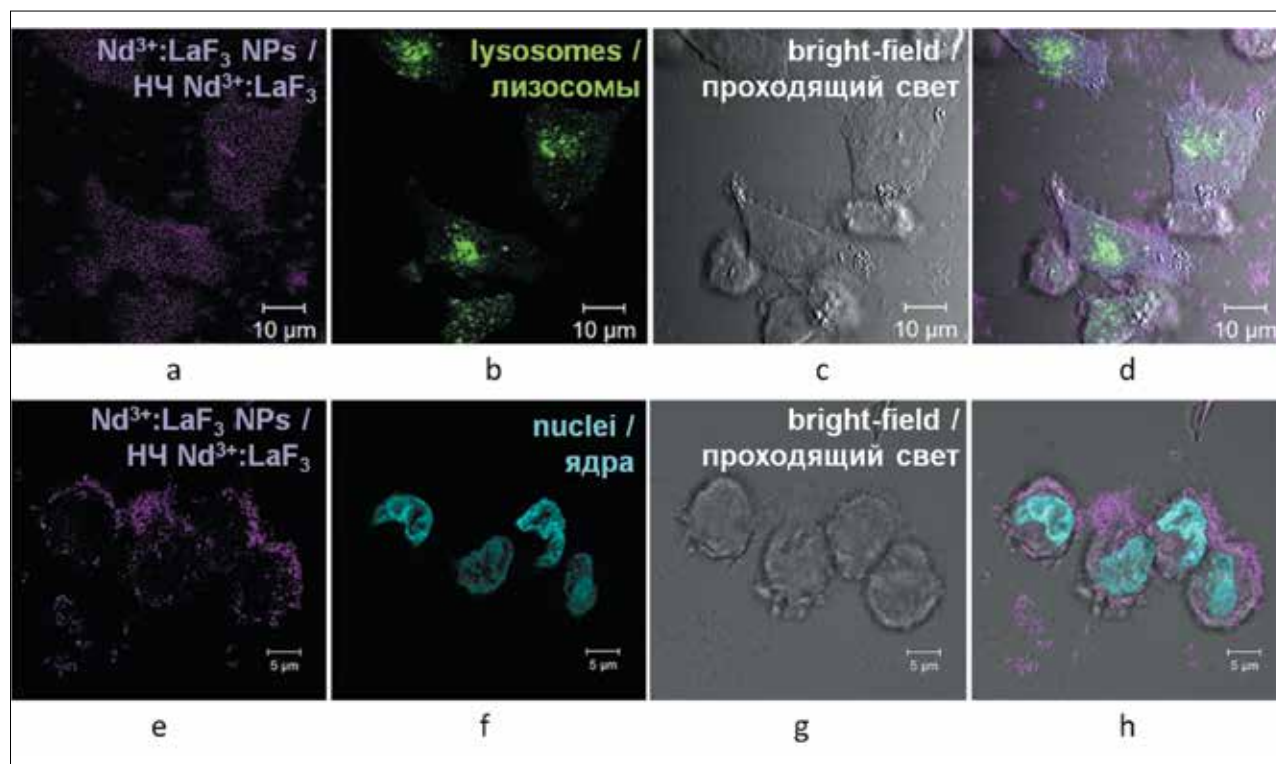
**Рис. 3.** Зависимость интенсивности ап-конверсионной люминесценции НЧ Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> от плотности мощности накачки при возбуждении 795 нм

$^2P_{1/2} \rightarrow ^4I_{13/2}$  and  $^4G_{7/2} \rightarrow ^4I_{13/2}$  (500÷550 nm),  $^4G_{5/2} \rightarrow ^4I_{9/2}$  and  $^4G_{7/2} \rightarrow ^4I_{11/2}$  (560÷600 nm),  $^4D_{3/2} \rightarrow ^4F_{3/2}$  and  $^4G_{7/2} \rightarrow ^4I_{13/2}$  (620÷660 nm) on the incident pump power (in the range 0.5÷2 MW/cm<sup>2</sup>) gives values of 1.5, 1.5, 1.3 and 1.5 for  $n$ , respectively, which indicate two-photon upconversion processes (Fig. 3).

The exponent  $n$ , if smaller than unity, is related to deactivation processes. The upconversion efficiency for studied NPs is far from ideal, but using a pulsed laser for excitation makes it possible to produce images without visible cell structures damage. Similar orders of power density (35 kW/cm<sup>2</sup> ÷ 3.6 MW/cm<sup>2</sup>) of CW 730 nm laser was used to obtain two-photon, three-photon image and four-photon image of Nd<sup>3+</sup>-doped NPs [15]. Fast scanning speeds can cause artifacts in fluorescence imaging because of long lifetimes from Nd<sup>3+</sup> NPs. The authors of this article noted the streaking artifacts at the scan speed more than 100 μs/pixel. We use scan speed 2.55 μs/pixel to reduce the laser heating effects on cells, and at such scan speed the streaking effect was not observed.

The images in the Fig. 4 are obtained at the simultaneous excitation of the LysoTrackerGreen DND-26 or Hoechst 33342 and Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs by laser 795 nm with a power density 1 MW/cm<sup>2</sup>.

Confocal microscopy indicates cellular uptake of Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs. After incubation of live cells with NPs, it



**Fig. 4.** Confocal fluorescent images of intracellular distribution of Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs on THP-1 cells acquired at excitation wavelengths of 795 nm by separation into individual channels after linear unmixing of spectral image (on the images a, b, c and d the lysosomes are additionally stained, on the images e, f, g and h the nuclei are additionally stained):

- a – deconvoluted from the spectral image signal of upconversion luminescence from the Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs;
- b – deconvoluted from the spectral image signal from lysosomes stained with LysoTrackerGreen DND-26;
- c – bright-field micrographs of the cell taken under visible light;
- d – superimposing of a, b and c images;
- e – deconvoluted from the spectral image signal of upconversion luminescence from the Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs;
- f – deconvoluted from the spectral image signal from nuclei stained with Hoechst 3334;
- g – bright-field micrographs of the cell taken under visible light;
- h – superimposing of e, f and g images

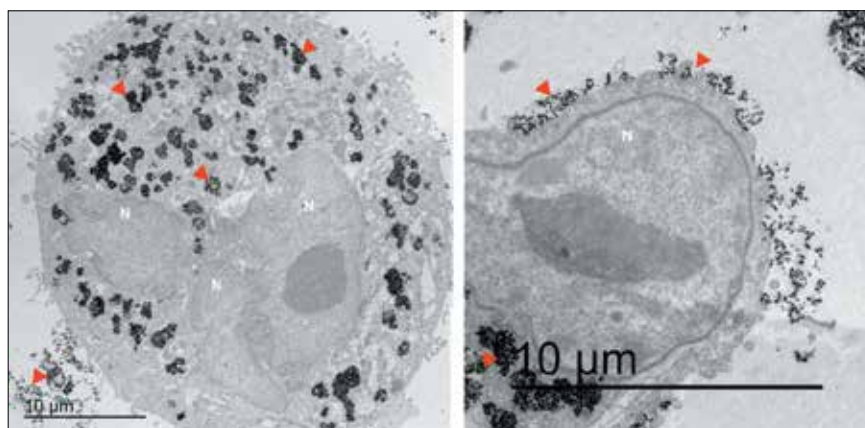
**Рис. 4.** Конфокальное флуоресцентное изображение внутриклеточного распределения НЧ Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> в клетках THP-1, полученное при возбуждении 795 нм путем разделения на отдельные каналы после линейного разложения спектрального изображения (на изображениях a, b, c и d – клетки дополнительно окрашены на лизосомы; на изображениях e, f, g и h – клетки дополнительно окрашены на ядра):

- a – сигнал ап-конверсионной люминесценции НЧ Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub>, выделенный из спектрального изображения;
- b – выделенный из спектрального изображения сигнал лизосомального красителя LysoTrackerGreen DND-26;
- c – изображение клеток в проходящем свете;
- d – наложение изображений a, b и c;
- e – сигнал ап-конверсионной люминесценции НЧ Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub>, выделенный из спектрального изображения;
- f – выделенный из спектрального изображения сигнал ядерного красителя Hoechst 3334;
- g – изображение клеток в проходящем свете;
- h – наложение изображений e, f и g

is confirmed that NPs are located inside the cells. The fluorescence obtained from NPs coincides quite well with the signal from the stained lysosomes. However, it is also seen that some NPs are attached to the inner and outer membranes. Also, some of the bigger aggregates, not associated with the uptake, are visible. From the confocal microscopy images it is obvious that the Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs are located in macrophage-like THP-1 cells closer to the cytoplasm membrane, but also occur throughout the cytoplasm. In the cytoplasm, NPs formed clusters, feasibly, are occur in small spherical endosome-like organelles, but not all organelles containing NPs are stained as

lysosomes. Some of the NPs are attached to the surface of the cells from the outside, and in addition, the NPs aggregates at the bottom of the Petri dish can be seen. Perhaps such a distribution of NPs is associated with their positive surface charge.

A more detailed Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs distribution within the THP-1 cell can be seen on the TEM image (Fig. 5). The images clearly indicate uptake of NPs into vesicles and their aggregation in the live cells. On the right image on the Fig. 5 protrusion of the plasma membrane for phagocytosis is observed. TEM indicate the presence of NPs in the endosomes and on the plasma membrane outside the cell.



**Fig. 5.** TEM images of differentiated THP-1 cells after being exposed to Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs for 48 hour: white letter N mark nuclei, red arrows indicate NPs

**Рис. 5.** Просвечивающая электронная микроскопия дифференцированных клеток THP-1 после инкубации с НЧ Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> в течение 48 ч: ядра отмечены белыми буквами N, НЧ указаны красными стрелками

Cellular uptake of NPs is strongly dependent on their surface charge. It has been shown that positively charged NPs are more permeable for cells [22]. Studied PVP enveloped Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs show a small positive charge. In general, hydrophilic sodium fluoride-based NPs doped with lanthanide ions have very low toxicity to granulocytes from the phagocytosis point of view [23]. Their uptake by macrophage-like cells THP-1 was observed from two hours to three days.

## Conclusion

Accumulation of Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs in living cells was demonstrated by detecting upconversion luminescence with laser scanning confocal microscopy. Despite the low quantum yields of the VIS upconversion luminescence for the Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs in aqueous colloidal solutions,

when pulse excitation is used, it is possible to reliably record the VIS signal of Nd<sup>3+</sup>:LaF<sub>3</sub> NPs upconversion luminescence at 1 MW/cm<sup>2</sup> power density, still not destroying the cells. The excitation at 738 nm, induces the <sup>4</sup>I<sub>9/2</sub> → <sup>4</sup>F<sub>7/2</sub> <sup>2</sup>S<sub>3/2</sub> transition of Nd<sup>3+</sup> ions and 795 nm, induces the <sup>4</sup>I<sub>9/2</sub> → <sup>2</sup>H<sub>9/2</sub>, gives almost equal the upconversion luminescence intensity from the Nd<sup>3+</sup> bands.

*This work was supported by the Russian Science Foundation [grant number 16-12-10077], the Marie Curie Actions FP7-PEOPLE-2013-IRSES [grant number 612620] and the European Regional Development Fund (TK141 "Advanced materials and high-technology devices for energy recuperation systems"). HR TEM measurements were supported by projects IUT2-24 and IUT20-54 of the Estonian Ministry of Education and Research.*

## ЛИТЕРАТУРА

- Escudero A., Carrillo-Carrión C., Zyuzin M.V., Parak W.J. Luminescent rare-earth-based nanoparticles: a summarized overview of their synthesis, functionalization, and applications // *Top Curr Chem (Cham)*. – 2016. – Vol. 374(4). – P. 48. <https://doi.org/10.1007/s41061-016-0049-8>.
- Ma D., Xu X., Hu M., et al. Rare-earth-based nanoparticles with simultaneously enhanced near-infrared (NIR)-visible (Vis) and NIR-NIR dual-conversion luminescence for multimodal imaging // *Chem Asian J.* – 2016. – Vol. 11(7). – P. 1050-1058. <http://dx.doi.org/10.1002/asia.201501456>.
- Li X., Wang R., Zhang F., et al. Nd<sup>3+</sup> Sensitized up/down converting dual-mode nanomaterials for efficient *in-vitro* and *in-vivo* bioimaging excited at 800 nm // *Sci. Rep.* – 2013. – Vol. 3. – P. 3536. <http://dx.doi.org/10.1038/srep03536>.
- Wang Z., Zhang P., Yuan Q., et al. Nd<sup>3+</sup>-sensitized NaLuF<sub>4</sub> luminescent nanoparticles for multimodal imaging and temperature sensing under 808 nm excitation // *Nanoscale*. – 2015. – Vol. 7(42). – P. 17861-17870. <http://dx.doi.org/10.1039/C5NR04889C>.

## REFERENCES

- Escudero A., Carrillo-Carrión C., Zyuzin M.V., Parak W.J. Luminescent rare-earth-based nanoparticles: a summarized overview of their synthesis, functionalization, and applications, *Top Curr Chem (Cham)*, 2016, Vol. 374(4), p. 48. Available at: <https://doi.org/10.1007/s41061-016-0049-8>
- Ma D., Xu X., Hu M., Wang J., Zhang Z., Yang J., Meng L. Rare-earth-based nanoparticles with simultaneously enhanced near-infrared (NIR)-visible (Vis) and NIR-NIR dual-conversion luminescence for multimodal imaging, *Chem Asian J*, 2016, Vol. 11(7), pp. 1050-1058. Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/asia.201501456>
- Li X., Wang R., Zhang F., Zhou L., Shen D., Yao C., Zhao D. Nd<sup>3+</sup> Sensitized up/down converting dual-mode nanomaterials for efficient *in-vitro* and *in-vivo* bioimaging excited at 800 nm, *Sci. Rep.*, 2013, Vol. 3, p. 3536. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/srep03536>
- Wang Z., Zhang P., Yuan Q., Xu X., Lei P., Liu X., Su Y., Dong L., Feng J., Zhang H. Nd<sup>3+</sup>-sensitized NaLuF<sub>4</sub> luminescent nanoparticles for multimodal imaging and temperature sensing under 808 nm excitation, *Nanoscale*, 2015, Vol. 7(42), pp. 17861-17870. Available at: <http://dx.doi.org/10.1039/C5NR04889C>

5. Zhong Y., Tian G., Gu Z., et al. Elimination of photon quenching by a transition layer to fabricate a quenching-shield sandwich structure for 800 nm excited upconversion luminescence of Nd<sup>3+</sup>-sensitized nanoparticles // *Adv. Mater.* – 2014. – Vol. 26(18). – P. 2831-2837. <http://dx.doi.org/10.1002/adma.201304903>.
6. Zhan Q., Wang B., Wen X., He S. Controlling the excitation of upconverting luminescence for biomedical theranostics: neodymium sensitizing // *Opt. Mater. Express.* – 2016. – Vol. 6. – P. 1011-1023. <https://doi.org/10.1364/OME.6.001011>.
7. Kushida T., Marcos H.M., Geusic J.E. Laser transition cross section and fluorescence branching ratio for Nd<sup>3+</sup> in yttrium aluminum garnet // *Phys. Rev.* – 1968. – Vol. 167. – P. 289-291. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.167.289>.
8. Xu B., Zhang X., Huang W., et al. Nd<sup>3+</sup> sensitized dumbbell-like upconversion nanoparticles for photodynamic therapy application // *J. Mater. Chem. B.* – 2016. – Vol. 4. – P. 2776-2784. <http://dx.doi.org/10.1039/C6TB00542J>.
9. Wang Y.F., Liu G.Y., Sun L.D., et al. Nd(3+)-sensitized upconversion nanophosphors: efficient in vivo bioimaging probes with minimized heating effect // *ACS Nano.* – 2013. – Vol. 7. – P. 7200-7206. doi:10.1021/nn402601d.
10. Qin Q.-S., Zhang P.-Z., Sun L.-D., et al. Ultralow-power near-infrared excited neodymium-doped nanoparticles for long-term in vivo bioimaging // *Nanoscale.* – 2017. – Vol. 9. – P. 4660-4664. <http://dx.doi.org/10.1039/C7NR00606C>.
11. Rocha U., Hu J., Rodriguez E.M., et al. Subtissue Imaging and Thermal Monitoring of Gold Nanorods through Joined Encapsulation with Nd-Doped Infrared-Emitting Nanoparticles // *Small.* – 2016. – Vol. 12. – P. 5394-5400. <http://dx.doi.org/10.1002/smll.201600866>.
12. Pichaandi J., Boyer J.-C., Delaney K.R., van Veggel F.C.J.M. Two-photon upconversion laser (scanning and wide-field) microscopy using Ln<sup>3+</sup>-doped NaYF<sub>4</sub> upconverting nanocrystals: a critical evaluation of their performance and potential in bioimaging // *J. Phys. Chem. C.* – 2011. – Vol. 115. – P. 19054-19064. doi:10.1021/jp206345j.
13. Zhan Q., He S., Qian J., et al. Optimization of optical excitation of upconversion nanoparticles for rapid microscopy and deeper tissue imaging with higher quantum yield // *Theranostics.* – 2013. – Vol. 3. – P. 306-316. doi:10.7150/thno.6007.
14. Wu R., Zhan Q., Liu H., et al. Optical depletion mechanism of upconverting luminescence and its potential for multi-photon STED-like microscopy // *Opt. Express.* – 2015. – Vol. 23. – P. 32401-32412. <https://doi.org/10.1364/OE.23.032401>.
15. Wang B., Zhan Q., Zhao Y., et al. Visible-to-visible four-photon ultrahigh resolution microscopic imaging with 730-nm diode laser excited nanocrystals // *Opt. Express.* – 2016. – Vol. 24(2). – P. A302-A311. <https://doi.org/10.1364/OE.24.00A302>.
16. Vanetsev A., Kaldvee K., Puust L., et al. Relation of crystallinity and fluorescent properties of LaF<sub>3</sub>:Nd<sup>3+</sup> nanoparticles synthesized with different water-based techniques. // *Chemistry Select.* – 2017. – Vol. 2. – P. 4874-4881. <http://dx.doi.org/10.1002/slct.201701075>.
17. Shcherbakov A.B., Zholobak N.M., Baranchikov A.E., et al. Cerium fluoride nanoparticles protect cells against oxidative stress // *Mater Sci. Eng. C Mater Biol. Appl.* – 2015. – Vol. 50. – P. 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.01.094>.
18. Carnall W.T., Crosswhite Hannah, Crosswhite H.M. Energy level structure and transition probabilities in the spectra of the trivalent lanthanides in LaF<sub>3</sub>. – United States, 1978. doi:10.2172/6417825.
19. Carnall W.T., Goodman G.L., Rajnak K., Rana R.S. A systematic analysis of the spectra of the lanthanides doped into single crystal LaF<sub>3</sub> // *J. Chem. Phys.* – 1989. – Vol. 90. – P. 3443. <http://dx.doi.org/10.1063/1.455853>.
5. Zhong Y., Tian G., Gu Z., Yang Y., Gu L., Zhao Y., Ma Y., Yao J. Elimination of photon quenching by a transition layer to fabricate a quenching-shield sandwich structure for 800 nm excited upconversion luminescence of Nd<sup>3+</sup>-sensitized nanoparticles, *Adv. Mater.*, 2014, Vol. 26(18), pp. 2831-2837. Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/adma.201304903>
6. Zhan Q., Wang B., Wen X., He S. Controlling the excitation of upconverting luminescence for biomedical theranostics: neodymium sensitizing, *Opt. Mater. Express*, 2016, Vol. 6, pp. 1011-1023. Available at: <https://doi.org/10.1364/OME.6.001011>
7. Kushida T., Marcos H.M., Geusic J.E. Laser transition cross section and fluorescence branching ratio for Nd<sup>3+</sup> in yttrium aluminum garnet, *Phys. Rev.*, 1968, Vol. 167, pp. 289-291. Available at: <https://doi.org/10.1103/PhysRev.167.289>
8. Xu B., Zhang X., Huang W., Yang Y., Ma Y., Gu Z., Zhai T., Zhao Y. Nd<sup>3+</sup> sensitized dumbbell-like upconversion nanoparticles for photodynamic therapy application, *J. Mater. Chem. B.*, 2016, Vol. 4, pp. 2776-2784. Available at: <http://dx.doi.org/10.1039/C6TB00542J>
9. Wang Y.F., Liu G.Y., Sun L.D., Xiao J.W., Zhou J.C., Yan C.H. Nd(3+)-sensitized upconversion nanophosphors: efficient in vivo bioimaging probes with minimized heating effect, *ACS Nano*, 2013, Vol. 7, pp. 7200-7206. doi:10.1021/nn402601d
10. Qin Q.-S., Zhang P.-Z., Sun L.-D., Shi S., Chen N.-X., Dong H., Zheng X.-Y., Li L.-M. and Yan C.-H. Ultralow-power near-infrared excited neodymium-doped nanoparticles for long-term in vivo bioimaging, *Nanoscale*, 2017, Vol. 9, pp. 4660-4664. Available at: <http://dx.doi.org/10.1039/C7NR00606C>
11. Rocha U., Hu J., Rodriguez E.M., Vanetsev A.S., Rähn M., Sammelselg V., Orlovskii Y.V., García Sole J., Jaque D., Ortigues D.H. Subtissue Imaging and Thermal Monitoring of Gold Nanorods through Joined Encapsulation with Nd-Doped Infrared-Emitting Nanoparticles, *Small*, 2016, Vol. 12, pp. 5394-5400. Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/smll.201600866>
12. Pichaandi J., Boyer J.-C., Delaney K.R., van Veggel F.C.J.M. Two-photon upconversion laser (scanning and wide-field) microscopy using Ln<sup>3+</sup>-doped NaYF<sub>4</sub> upconverting nanocrystals: a critical evaluation of their performance and potential in bioimaging, *J. Phys. Chem. C.*, 2011, Vol. 115, pp. 19054-19064. doi:10.1021/jp206345j
13. Zhan Q., He S., Qian J., Cheng H., Cai F. Optimization of optical excitation of upconversion nanoparticles for rapid microscopy and deeper tissue imaging with higher quantum yield, *Theranostics*, 2013, Vol. 3, pp. 306-316. doi:10.7150/thno.6007
14. Wu R., Zhan Q., Liu H., Wen X., Wang B., He S. Optical depletion mechanism of upconverting luminescence and its potential for multi-photon STED-like microscopy, *Opt. Express*, 2015, Vol. 23, pp. 32401-32412. Available at: <https://doi.org/10.1364/OE.23.032401>
15. Wang B., Zhan Q., Zhao Y., Wu R., Liu J., He S. Visible-to-visible four-photon ultrahigh resolution microscopic imaging with 730-nm diode laser excited nanocrystals, *Opt. Express*, 2016, Vol. 24(2), pp. A302-A311. Available at: <https://doi.org/10.1364/OE.24.00A302>
16. Vanetsev A., Kaldvee K., Puust L., Keevend K., Nefedova A., Fedorenko S., Baranchikov A., Sildos I., Rahn M., Sammelselg V., Orlovskii Y. Relation of crystallinity and fluorescent properties of LaF<sub>3</sub>:Nd<sup>3+</sup> nanoparticles synthesized with different water-based techniques, *Chemistry Select*, 2017, Vol. 2, pp. 4874-4881. Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/slct.201701075>
17. Shcherbakov A.B., Zholobak N.M., Baranchikov A.E., Ryabova A.V., Ivanov V.K. Cerium fluoride nanoparticles protect cells against oxidative stress, *Mater Sci. Eng. C Mater Biol. Appl.*, 2015, Vol. 50, pp. 151-159. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.01.094>
18. Carnall W.T., Crosswhite Hannah, Crosswhite H.M. *Energy level structure and transition probabilities in the spectra of the trivalent lanthanides in LaF<sub>3</sub>*. United States, 1978. doi:10.2172/6417825
19. Carnall W.T., Goodman G.L., Rajnak K., Rana R.S. A systematic analysis of the spectra of the lanthanides doped into single crystal LaF<sub>3</sub>, *J. Chem. Phys.*, 1989, Vol. 90, p. 3443. Available at: <http://dx.doi.org/10.1063/1.455853>

20. Pollnau M., Gamelin D.R., Luthi S.R., et al. Power dependence of upconversion luminescence in lanthanide and transition-metal-ion systems // *Phys. Rev. B.* – 2000. – Vol. 61. – P. 3337-3346. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.61.3337>.
21. Jacinto C., Oliveira S.L., Catunda T., et al. Upconversion effect on fluorescence quantum efficiency and heat generation in Nd<sup>3+</sup>-doped materials // *Opt. Express.* – 2005. – Vol. 13. – P. 2040-2046. <https://doi.org/10.1364/OPEX.13.002040>.
22. Fröhlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles // *Int. J. Nanomedicine.* – 2012. – Vol. 7. – P. 5577-5591. <https://doi.org/10.2147/IJN.S36111>.
23. Sojka B., Liskova A., Kuricova M., et al. The effect of core and lanthanide ion dopants in sodium fluoride-based nanocrystals on phagocytic activity of human blood leukocytes // *J. Nanopart. Res.* – 2017. – Vol. 19. – P. 68. <https://doi.org/10.1007/s11051-017-3779-9>.
20. Pollnau M., Gamelin D.R., Luthi S.R., Gudel H.U., Hehlen M.P. Power dependence of upconversion luminescence in lanthanide and transition-metal-ion systems, *Phys. Rev. B.*, 2000, Vol. 61, pp. 3337-3346. Available at: <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.61.3337>
21. Jacinto C., Oliveira S.L., Catunda T., Andrade A.A., Myers J.D., Myers M.J. Upconversion effect on fluorescence quantum efficiency and heat generation in Nd<sup>3+</sup>-doped materials, *Opt. Express*, 2005, Vol. 13, pp. 2040-2046. Available at: <https://doi.org/10.1364/OPEX.13.002040>
22. Fröhlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles, *Int. J. Nanomedicine*, 2012, Vol. 7, pp. 5577-5591. Available at: <https://doi.org/10.2147/IJN.S36111>
23. Sojka B., Liskova A., Kuricova M., Banski M., Misiewicz J., Dusinska M., Horvathova M., Ilavská S., Szabova M., Rollerova E., Podhoro-decki A., Tulinska J. The effect of core and lanthanide ion dopants in sodium fluoride-based nanocrystals on phagocytic activity of human blood leukocytes, *J. Nanopart. Res.*, 2017, Vol. 19, p. 68. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11051-017-3779-9>

# ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ КОЖИ С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРАМИ ХЛОРИНОВОГО РЯДА

Е.В. Ярославцева-Исаева, М.А. Каплан, В.Н. Капинус, И.С. Спиченкова, Н.И. Сокол

Национальный медицинский исследовательский радиологический центр Минздрава России,  
Москва, Россия

## Резюме

В статье показаны возможности флуоресцентной диагностики злокачественных новообразований кожи с фотосенсибилизаторами (ФС) хлоринового ряда фотолон и фотодитазин. Изучены закономерности накопления фотосенсибилизатора по данным локальной флуоресцентной спектроскопии в зависимости от фотосенсибилизатора и его дозы, клинической картины и гистологической формы злокачественного новообразования кожи. Показано, что уровень и селективность накопления ФС в опухолевом очаге зависит от дозы фотосенсибилизатора. Так, в исследованиях, включавших 10 пациентов с базальноклеточным раком кожи, после введения фотодитазина в дозе менее 1 мг/кг флуоресцентная контрастность «опухоль/здоровая ткань» варьировала в пределах 1,3-9,5 и в среднем составила  $2,8 \pm 0,3$ ; у пациентов, которым фотодитазин вводили в дозе от 1 до 1,9 мг/кг, флуоресцентная контрастность варьировала в пределах 1,4-5 и в среднем составила  $2,9 \pm 0,4$ . В исследованиях, включавших 127 пациентов, после введения фотолона в дозе 0,7-1 мг/кг среднее значение интенсивности флуоресценции в неизменной коже составило  $6,9 \pm 0,3$  усл.ед. (мин. 4,6, макс. 12,2), в дозе 1,1-1,4 мг/кг –  $8,0 \pm 0,3$  усл. ед. (мин. 4,6, макс. 12,5), в дозе 1,5-2 мг/кг –  $9,9 \pm 0,7$  усл. ед. (мин. 5,7, макс. 20,3). Также показано, что интенсивность флуоресценции в злокачественном новообразовании кожи при одинаковой дозе фотолона зависит от его клинической формы и гистологической структуры. Так, через 3 ч после введения фотолона в дозе 1,3 мг/кг флуоресцентная контрастность в поверхностной форме рака кожи в среднем составила  $2,7 \pm 0,5$ , в узловой –  $2,3 \pm 0,2$ , в эрозивно-язвенной –  $3,6 \pm 0,3$ . У пациентов с узловой формой плоскоклеточного рака кожи флуоресцентная контрастность после введения фотолона в дозе 1,3 мг/кг была достоверно ( $p < 0,05$ ) выше (в среднем  $2,8 \pm 0,2$ ), чем при узловой форме базальноклеточного рака кожи после введения фотолона в той же дозе (в среднем  $2,1 \pm 0,2$ ).

**Ключевые слова:** фотодинамическая терапия, фотолон, фотодитазин, флуоресцентная визуализация, локальная флуоресцентная спектроскопия, злокачественные новообразования кожи.

**Для цитирования:** Ярославцева-Исаева Е.В., Каплан М.А., Капинус В.Н., Спиченкова И.С., Сокол Н.И. Флуоресцентная диагностика злокачественных новообразований кожи с фотосенсибилизаторами хлоринового ряда // Biomedical Photonics. – 2018. – Т. 7, № 1. – С. 13–20.

**Contacts:** Ярославцева-Исаева Е.В., e-mail: elena.yaris@gmail.com

## FLUORESCENT DIAGNOSTICS OF MALIGNANT SKIN TUMORS WITH CHLORIN SERIES PHOTSENSITIZERS

Yaroslavl'tseva-Isaeva E.V., Kaplan M.A., Kapinus V.N., Spichencova I.S., Sokol N.I.

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

## Abstract

The article shows possibilities in fluorescence imaging of malignant skin tumors with chlorin series photosensitizers (PS) photolon and fotoditazin. The regularities of photosensitizer accumulation from the data of local fluorescence spectroscopy depending on the PS and its dose, the clinical picture and the histological form of the malignant skin neoplasm is investigated. It is shown that the level and selectivity of PS accumulation in the tumor focus depends on the PS dose. In studies on 10 patients with basal cell skin cancer after the introduction of fotoditazin at a dose less than 1 mg/kg, fluorescent contrast between tumor and healthy tissue varied between 1.3 and 9.5, the average was  $2.8 \pm 0.3$ ; for patients who had the administered fotoditazin dose of 1 mg/kg, fluorescent contrast was  $2.9 \pm 0.4$ , varying from 1.4 to 5. In a study with 127 patients after the introduction of photolon in the dose of 0.7-1 mg/kg, the average value of the fluorescence intensity in relative units in the intact skin was  $6.9 \pm 0.3$  (min 4.6, max 12.2), at a dose of 1.1 to 1.4 mg/kg –  $8.0 \pm 0.3$  (min 4.6, max 12.5), at a dose of 1.5-2 mg/kg –  $9.9 \pm 0.7$  (min 5.7, max 20.3). It is also shown that fluorescence intensity of malignant neoplasm of the skin with the same dose of the photosensitizer depends on the neoplasm's clinical and histological forms. So, 3 hours after the introduction of photolon at a dose of 1.3 mg/kg the average fluorescent contrast in the surface type of skin cancer was  $2.7 \pm 0.5$ , in the nodal form –  $2.3 \pm 0.2$ , in erosive-ulcerative form –  $3.6 \pm 0.3$ . In patients with nodular form of squamous skin cancer after the introduction of photolon at a dose of 1.3 mg/kg fluorescent contrast was significantly

higher ( $p < 0.05$ ) (average of  $2.8 \pm 0.2$ ) than in the nodular form of basal cell carcinoma after the introduction of photolon at the same dose (average of  $2.1 \pm 0.2$ ).

**Key words:** photodynamic therapy, photolon, fotoditazin, fluorescence imaging, fluorescence spectroscopy, malignant neoplasms of the skin.

**For citations:** Yaroslavtseva-Isaeva E.V., Kaplan M.A., Kapinus V.N., Spichenkova I.S., Sokol N.I. Fluorescent diagnostics of malignant skin tumors with photosensitizers chlorin number, *Biomedical Photonics*, 2018, T. 7, No. 1, pp. 13–20 (in Russian).

**Contacts:** Yaroslavtseva-Isaeva E.V., e-mail: elena.yaris@gmail.com

## Введение

Флуоресценция – свечение веществ (флуорофоров), возникающее вследствие воздействия светом определенной длины волны и быстро в течение  $10^{-9}$ – $10^{-8}$  с затухающее после прекращения облучения. При этом вещества испускают лучи другой длины волны, чем та, которая вызывает свечение. Спектр флуоресценции сдвинут относительно спектра поглощения в сторону длинных волн. Это явление получило название «Стоксов сдвиг». Впервые флуоресценцию соединений хирина наблюдал физик G.G. Stokes в 1852 г. Термин «флуоресценция» происходит от названия минерала флуорит, у которого она впервые была обнаружена, и лат. -escent – суффикс, означающий слабое действие. К флуоресценции способны многие органические вещества. Наиболее известными являются хинин (голубая флуоресценция при возбуждении ультрафиолетовым излучением), родамины (родамин 6G, родамин В) – красно-оранжевое свечение, флуоресцеин – зеленое свечение, эозин, акридиновые красители (акридиновый оранжевый, акридиновый желтый) и многие другие [1,2]. Каждый флуорофор имеет индивидуальный спектр поглощения и флуоресценции и может быть эндогенным или экзогенным. В зависимости от происхождения изучаемого флуорофора флуоресцентную диагностику разделяют на следующие направления: аутофлуоресценция – флуоресценция эндогенных флуорофоров (коллаген, эластин, флавины, порфирины и их производные, триптофан, NADH и др.), для регистрации аутофлуоресценции и измерения ее характеристик необходима высокочувствительная аппаратура, диагностически значимыми признаками могут быть как повышение, так и снижение уровня флуоресценции в зависимости от изучаемого флуорофора [3-5]; индуцированная флуоресценция – канадские ученые (Kennedy et al., 1990) обнаружили, что можно искусственно усилить накопление протопорфиринов в ткани путем введения предшественника – 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК), это открытие стало толчком для развития флуоресцентной диагностики новообразований на основе 5-АЛК-индуцированной флуоресценции, и сегодня именно эта методика наиболее распространена в онкологии [6-13]; анализ флуоресценции экзогенных флуорофоров (фотосенсибилизаторов).

В настоящее время для лечения различных злокачественных новообразований с успехом применяется фотодинамическая терапия (ФДТ).

Метод ФДТ выгодно отличается от традиционной противоопухолевой лучевой и лекарственной терапии высокой избирательностью поражения опухолевой ткани, отсутствием тяжелых местных и системных осложнений лечения, возможностью повторения лечебной процедуры. Достоинством метода является возможность сочетания в одной процедуре лечения и флуоресцентной диагностики. В последние годы при проведении ФДТ широко применяют фотосенсибилизаторы (ФС) хлоринового ряда. Хлорины по химическому строению относятся к гидратированным порфиринам, у которых двойная связь пиррольного кольца восстановлена до одинарной. Одним из главных отличительных признаков хлоринов является наличие в спектре поглощения выраженного пика в длинноволновой части спектра (640-700 нм). Природным хлорином является хлорофилл, но его сложно использовать в качестве ФС из-за низкой устойчивости. Поэтому в клинической практике для диагностики и ФДТ используют его производное – хлорин  $e_6$ . Спектр поглощения хлорина  $e_6$  характеризуется наличием пика на 400 нм и трех-четырех менее выраженных пиков в диапазоне 500-670 нм. Максимум его флуоресценции соответствует длине волны 670 нм.

Для флуоресцентной диагностики с ФС хлоринового ряда применяют две методики: визуализацию (использование цифровых камер) и локальную флуоресцентную спектроскопию (использование точечных регистраторов). Возможности флуоресцентной визуализации: определение границ опухоли, контроль за процессом ФДТ, выявление скрытых очагов патологического процесса. Эффективность ФДТ злокачественных новообразований зависит от нескольких факторов, в том числе от характера предыдущего лечения, дозы лазерного облучения и количества ФС в опухолевой ткани. Определение количества ФС в опухолевой ткани является важным фактором для планирования дозы лазерного облучения. Единственной клинической методикой для определения количества ФС в опухолевом очаге является локальная флуоресцентная спектроскопия.

Целью исследования являлась демонстрация возможностей флуоресцентной визуализации и изучение закономерности накопления ФС хлоринового

ряда в злокачественных новообразованиях кожи по данным локальной флуоресцентной спектроскопии.

## Материалы и методы

В работе применяли ФС хлоринового ряда фотолон (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь, регистрационное удостоверение П N015948/01 от 30.11.2012) и фотодитазин (ООО «ВЕТА-ГРАНД», Россия, регистрационное удостоверение №ЛС 001246 от 18.05.2012), которые вводили внутривенно капельно перед проведением сеанса облучения больным злокачественными новообразованиями кожи.

В исследование было включено 137 пациентов: 10 пациентам вводили препарат фотодитазин, 127 – фотолон. Все пациенты давали добровольное информированное согласие на проведение диагностики и терапии. Распределение пациентов по гистологической форме новообразования представлено в табл.

Фотодитазин вводили пациентам в дозах 0,6-1,9 мг/кг, после чего оценивали уровень накопления ФС (по данным локальной флуоресцентной спектроскопии) в опухолевом очаге и в неизменной коже тыльной поверхности кисти и определяли флуоресцентную контрастность «опухолевая/здоровая ткань».

Фотолон вводили 30 пациентам в дозах 0,7-1,0 мг/кг, 69 пациентам – в дозах 1,1-1,4 мг/кг (из них 62 пациентам – в дозе 1,3 мг/кг), 28 пациентам – в дозах 1,5-2,0 мг/кг. У всех пациентов после введения фотолон оценивали уровень накопления ФС (по данным локальной флуоресцентной спектроскопии) в опухолевом очаге и в неизменной коже тыльной поверхности кисти. У 62 пациентов с одинаковой дозой фотолон (1,3 мг/кг) оценивали зависимость флуоресцентной контраст-

ности «опухолевая/здоровая ткань» от клинической формы злокачественного новообразования кожи (поверхностная (n=14), эрозивно-язвенная (n=14) и узловая (n=34). Из них у 34 пациентов с одинаковой дозой фотолон (1,3 мг/кг) и одинаковой клинической формой рака кожи (узловой) дополнительно оценивали зависимость флуоресцентной контрастности «опухолевая/здоровая ткань» от гистологической формы (плоскоклеточный (n=17), базальноклеточный (n=17)).

## Аппаратура для флуоресцентной визуализации

1. Устройство светодиодное видеофлуоресцентное УФФ-630/675-01 (ЗАО «БИОСПЕК», Россия) со светодиодным облучателем (длина волны 660-680 нм, плотность мощности излучения 40 мВт/см<sup>2</sup>) и встроенной высокочувствительной видеокамерой.

2. Аппарат для визуализации и анализа пространственного распределения флуоресценции ФС в реальном времени «Флуовизор-1» (ООО «АТКУС», Россия). Включает оптический блок с видеокамерой на основе высокочувствительной монохромной ПЗС матрицы, осветитель (длина волны излучения светодиода – 660±20 нм, мощность излучения не менее 40 мВт на выходе), объектив и селективный узкополосный оптический фильтр, обеспечивающий фокусировку картины пространственного распределения флуоресценции ФС в плоскости ПЗС матрицы, цифровой блок управления и видеозахвата, обеспечивающий необходимый режим работы ПЗС матрицы, оцифровку и передачу видеосигнала в персональный компьютер по интерфейсу USB 2.0. Освещение ткани

### Таблица

Распределение пациентов по гистологической форме новообразования

#### Table

Distribution of patients according to histological form of neoplasm

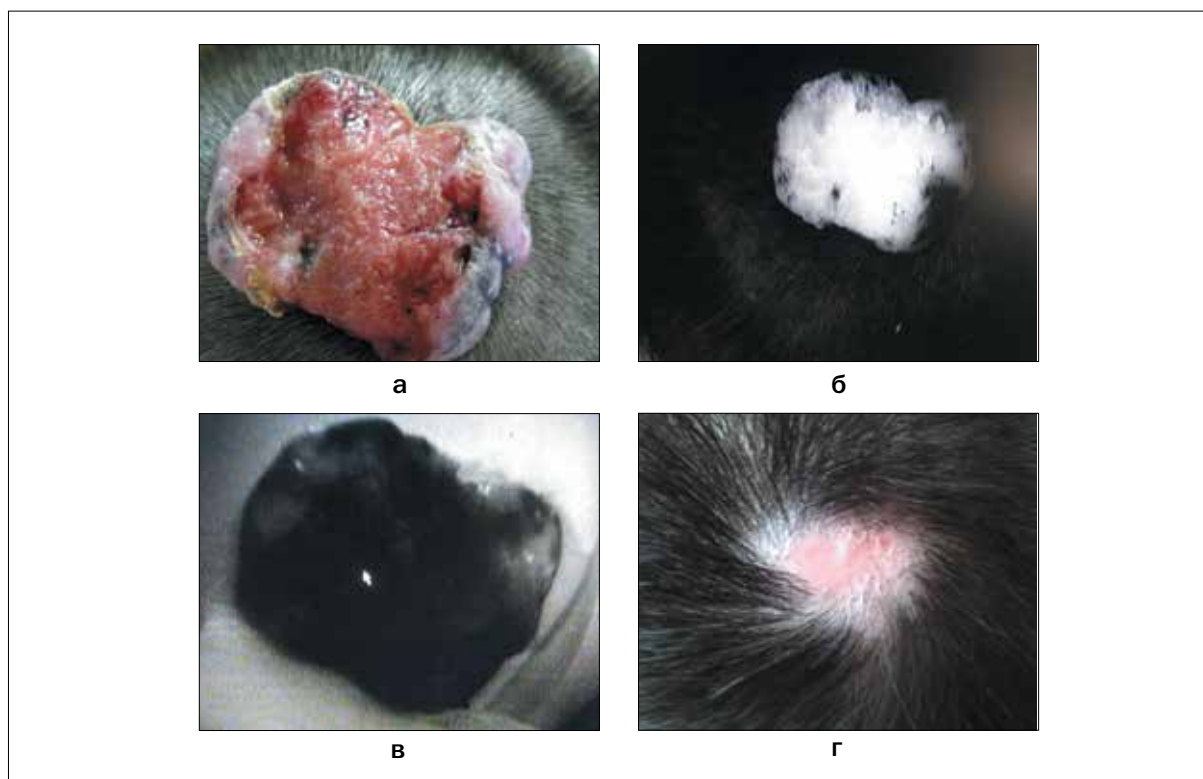
| Гистологическая форма новообразования<br>Histological form of neoplasm | Используемый фотосенсибилизатор<br>Used photosensitizer |                            |
|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------|
|                                                                        | фотолон<br>photolon                                     | фотодитазин<br>fotoditazin |
| Базальноклеточный рак кожи T1-2N0M0<br>Basal cell carcinoma T1-2N0M0   | 100                                                     | 10                         |
| Плоскоклеточный рак кожи T1-2N0M0<br>Squamous cell carcinoma T1-2N0M0  | 23                                                      | -                          |
| Внутрикожные метастазы меланомы<br>Intradermal melanoma metastases     | 2                                                       | -                          |
| Рак придатков кожи T1-2N0M0<br>Skin appendage neoplasms T1-2N0M0       | 2                                                       | -                          |
| Всего<br>Total                                                         | 127                                                     | 10                         |

приводит к появлению флуоресценции препарата, пространственное распределение интенсивности которого позволяет судить о форме и размерах опухоли. Компьютерная обработка изображения (в том числе 3D-формат) с возможностью цифровой оценки позволяют выявить зоны максимального накопления ФС в опухоли. Фоновое освещение в помещении, в котором проводили визуализацию, минимизировали за счет максимального затемнения окон.

#### **Аппаратура для локальной флуоресцентной спектроскопии**

Локальную флуоресцентную спектроскопию проводили на оптоволоконном спектроанализаторе ЛЭСА-6 с гелий-неоновым диагностическим лазером «ЛГН 633-25» (ЗАО «БИОСПЕК», Россия). Средняя мощность лазерного излучения 2 мВт, плотность энергии локального лазерного излучения на поверхности тканей в процессе одного обследования не более 1 Дж/см<sup>2</sup>. Полученные путем точечных измерений спектры тка-

ней, а также визуально здоровой кожи анализировали по форме, величине и амплитуде сигнала. Определяли интенсивность флуоресценции по соотношению площади флуоресценции к площади отраженного от тканей лазерного излучения в условных единицах (усл. ед.). Свет от лазерного источника фокусируется на входной конец Y-образного волоконно-оптического катетера и передается к новообразованию кожи. Диагностическое зондирование опухоли проводили при непосредственном контакте с ней катетера: не менее 4 точек в центре опухоли, 4 точек по периферии и 2 контрольных точек на здоровой коже: в зоне поражения и на неизменной коже тыльной поверхности кисти. Флуоресцентный и рассеянный свет поступает в приемные волокна волоконно-оптического катетера, которые окружают центральное волокно для доставки света. Проксимальный (выходной) конец катетера соединен со спектральным анализатором. Принимаемый системой сигнал подвергается аналогово-цифровому преобразованию, передается в оперативную память



**Рис. 1.** Базальноклеточный рак кожи теменной области T2N0M0:

а – частичная регрессия после 1-го курса ФДТ;

б – флуоресцентная визуализация на аппарате УФФ-630/675-01 (ЗАО «БИОСПЕК», Россия) через 3 ч после введения фотолон в дозе 1,3 мг/кг, флуоресцентная контрастность «опухолевая/здоровая ткань» 2,4;

в – флуоресцентная визуализация после сеанса ФДТ (интерстициальная + дистанционная);

г – полная регрессия опухоли через 1 год после лечения

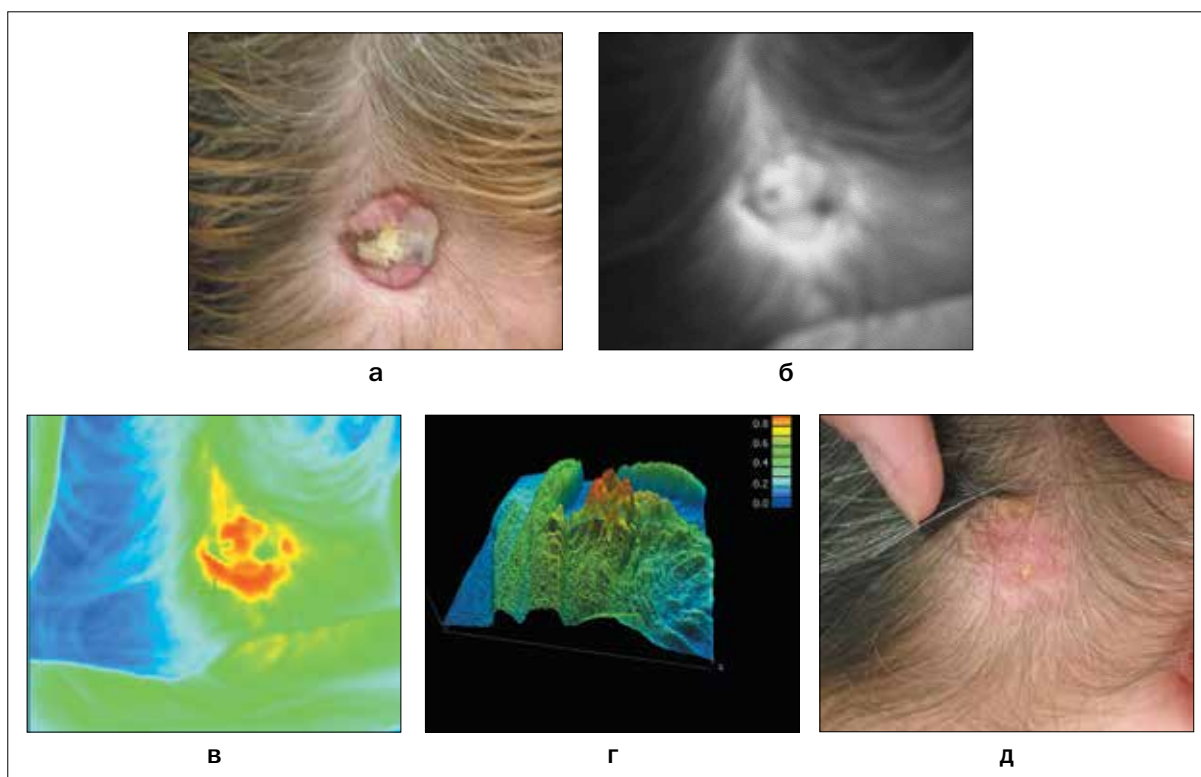
**Fig. 1.** Basal cell carcinoma in the parietal region T2N0M0:

а – partial regression after 1 course of PDT;

б – fluorescence imaging using UFPh-630/675-01-BIOSPEC («BIOSPEC», Russia) 3 hours after the introduction of photolon at a dose of 1.3 mg/kg, fluorescent contrast between tumor and healthy tissue is 2.4;

в – fluorescence imaging after the session of combined PDT (interstitial + remote);

г – complete tumor regression 1 year after the treatment



**Рис. 2.** Базальноклеточный рак кожи затылочной области T2N0M0, узловая форма:

- а – опухоль до ФДТ;
- б – флуоресцентная визуализация через 3 ч после введения фотолона в дозе 0,8 мг/кг, флуоресцентная контрастность «опухолевая/здоровая ткань» 1,5;
- в – максимальное накопление фотолона окрашено красным цветом (на «Флуовизоре-1» через 3 ч после введения фотолона);
- г – 3D-визуализация на «Флуовизоре-1»;
- д – полная регрессия опухоли через 2 года после лечения

**Fig. 2.** Basal cell carcinoma in the occipital region T2N0M0, nodular type:

- а – tumor before PDT;
- б – fluorescence imaging 3 hours after the introduction of photolon at a dose of 0.8 mg/kg, fluorescent contrast between tumor and healthy tissue is 1.5;
- в – the maximum accumulation of photolon is colored in red (image obtained using «Fluovisor-1» 3 hours after the introduction of photolon);
- г – 3d imaging on the «Fluovisor-1»;
- д – complete tumor regression 2 years after treatment

компьютера и отображается на дисплее в реальном масштабе времени в виде кривой. Степень накопления ФС оценивали по интенсивности флуоресценции, а также рассчитывали флуоресцентную контрастность «опухолевая/здоровая ткань» по средним значениям интенсивности флуоресценции в опухолевой и здоровой коже.

Статистическую обработку данных и анализ результатов проводили с помощью пакета программ «STATISTICA 6». Для оценки различия между группами использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

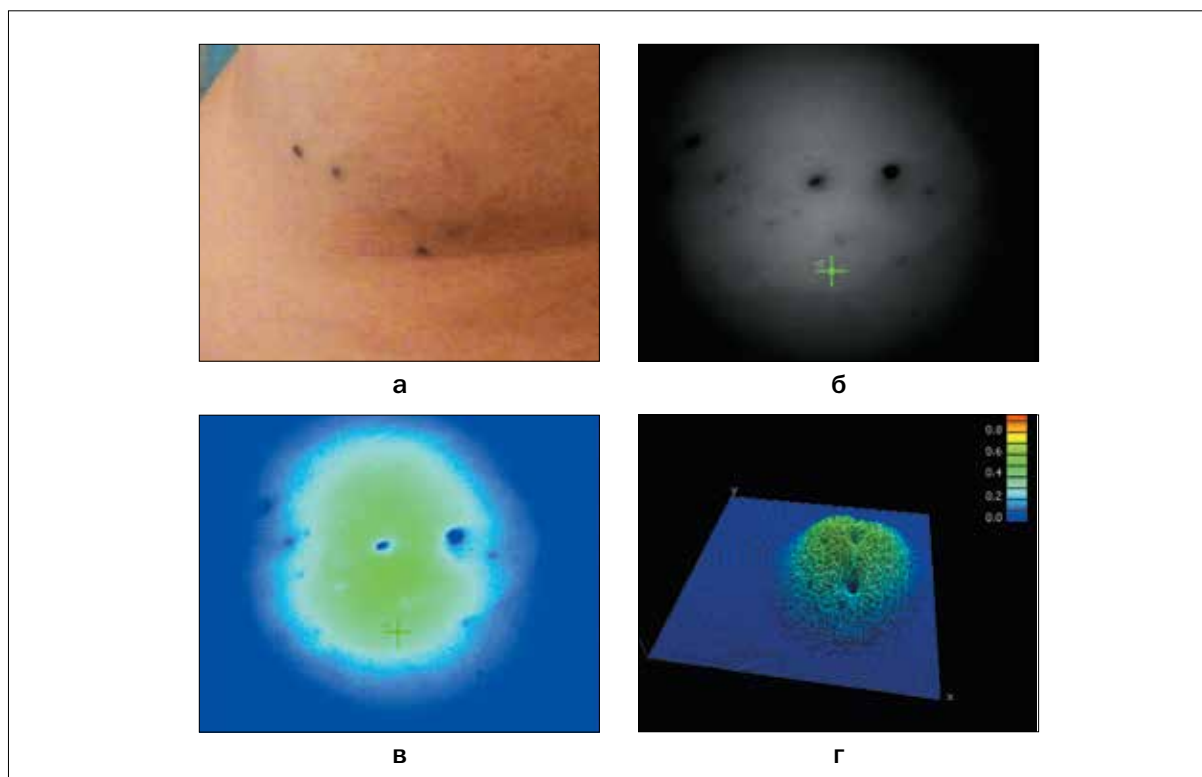
## Результаты

После внутривенного введения ФС у больных злокачественными новообразованиями кожи при флуоресцентной визуализации отмечали очаг флуоресценции в зоне злокачественного новообразования

различной интенсивности в зависимости от дозы ФС, клинической и гистологической формы рака кожи, проведенного ранее лечения (рис. 1 а, б, в, г; рис. 2 а, б, в, г, д).

Если флуоресцентная контрастность «опухолевая/здоровая ткань» по данным локальной флуоресцентной спектроскопии была ниже 2, то визуальная интенсивность флуоресценции была низкой. При пигментной меланоме и внутрикожных метастазах меланомы отмечали отсутствие флуоресценции при визуализации (рис. 3 а, б, в, г).

В процессе сеанса ФДТ интенсивность флуоресценции снижалась или отмечалось ее полное отсутствие в зависимости от подведенной дозы лазерного облучения. Недостаточное снижение интенсивности флуоресценции после курса ФДТ может быть предиктором рецидива [14].



**Рис. 3.** Меланома кожи левой подлопаточной области T4bN2cM0, III стадия, IV клиническая группа, множественные внутрикожные метастазы:

- а – опухоль до ФДТ;
- б – флуоресцентная визуализация через 3 ч после введения фотолон в дозе 1 мг/кг;
- в – компьютерное окрашивание флуоресцентной визуализации;
- г – 3D-визуализация на «Флуовизоре-1»

**Fig. 3.** Skin melanoma of the left subscapular region T4bN2cM0, stage III, clinical group IV, multiple intradermal metastases:

- а – before treatment;
- б – fluorescence imaging 3 hours after the introduction of photolon at a dose of 1 mg/kg;
- в – computer staining of the fluorescent image;
- г – 3D imaging using «Fluovisor-1»

Интенсивность флуоресценции по данным локальной флуоресцентной спектроскопии также зависит от вида ФС и времени после его внутривенного введения.

Как видно из рис. 4, максимальное накопление фотолон после его внутривенного введения в дозе 1,1 мг/кг в очаге базальноклеточного рака кожи (БКРК) наблюдается через 3 ч, а после внутривенного введения фотодитазина в дозе 0,9 мг/кг – через 1,5 ч (рис. 5), при этом интенсивность флуоресценции больше при эрозивной форме БКРК.

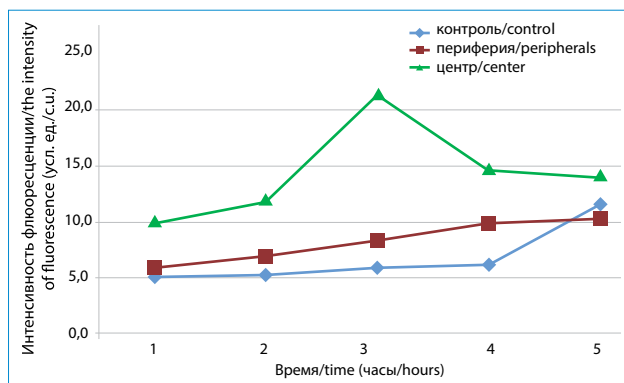
В исследованиях *in vitro* было показано, что интенсивность флуоресценции фотолон зависит от его концентрации (рис. 6). Однако эта зависимость не прямая: если концентрация раствора увеличивается в несколько раз, то интенсивность флуоресценции увеличивается незначительно. Поэтому можно предположить, что даже при небольшой флуоресцентной контрастности «опухолевая/здоровая ткань» по данным локальной флуоресцентной спектроскопии, в злокачественном ново-

образовании накопление ФС значительно выше, чем в здоровых тканях.

Фотолон и фотодитазин через 1,5-3 ч после в/в введения накапливаются в опухоли и в меньшей степени в здоровой коже. Степень накопления ФС в неизменной коже зависит от введенной дозы.

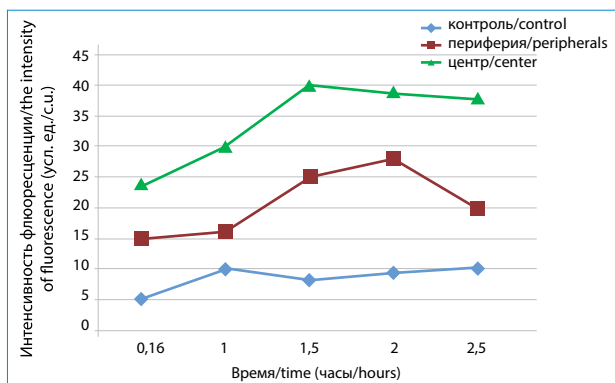
В исследованиях, включавших 10 пациентов с БКРК, после введения фотодитазина в дозе менее 1 мг/кг (5 больных) флуоресцентная контрастность «опухолевая/здоровая ткань» варьировала в пределах 1,3-9,5 и в среднем составила  $2,8 \pm 0,3$ . У пациентов, которым фотодитазин вводили в дозе от 1,0 до 1,9 мг/кг (5 больных), флуоресцентная контрастность варьировала в пределах 1,4-5 и в среднем составила  $2,9 \pm 0,4$ .

Фотолон вводили 30 пациентам (1-я группа) в дозе 0,7-1 мг/кг, 69 пациентам (2-я группа) – в дозе 1,1-1,4 мг/кг и 28 пациентам (3-я группа) – в дозе 1,5-2 мг/кг. В 1-ой группе значение интенсивности флуоресценции составило в среднем  $6,9 \pm 0,3$  усл. ед. (мин. 4,6, макс. 12,2), во 2-ой группе –  $8,0 \pm 0,3$  усл. ед. (мин. 4,6, макс.



**Рис. 4.** Динамика накопления фотолон (1,1 мг/кг) в очаге БКРК (папулезное образование с эрозией в центре)

**Fig. 4.** Dynamics of photolon accumulation (1.1 mg/kg) in basal cell skin cancer focus (papular formation with central erosion)



**Рис. 5.** Динамика накопления фотодитазина (0,9 мг/кг) в очаге БКРК с эрозией на поверхности

**Fig. 5.** Dynamics of fotoditazin accumulation (0.9 mg/kg) in basal cell skin cancer focus with surface erosion

12,5), в 3-ей группе –  $9,9 \pm 0,7$  усл. ед. (мин. 5,7, макс. 20,3). Выявлена корреляция ( $r=0,997$ ,  $p<0,05$ ) между интенсивностью флуоресценции в неизменной коже тыльной поверхности кисти пациента и введенной дозой ФС. Уравнение регрессии по средним величинам имело вид  $y=3,24x+4,08$ , где  $x$  – среднегрупповая доза ФС.

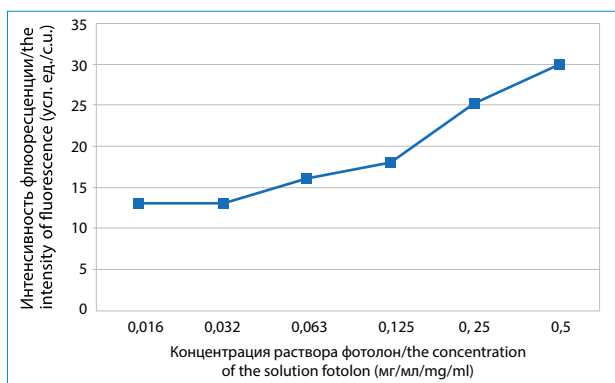
Оценка зависимости флуоресцентной контрастности «опухолевая/здоровая ткань» от клинической формы злокачественного новообразования кожи, проведенная у 62 пациентов, показала, что через 3 ч после введения фотолон в дозе 1,3 мг/кг флуоресцентная контрастность «опухолевая/здоровая ткань» в поверхностной форме рака кожи в среднем составляла  $2,7 \pm 0,5$ , в узловой –  $2,3 \pm 0,2$ , в эрозивно-язвенной –  $3,6 \pm 0,3$ ; достоверные различия получены между поверхностной и эрозивно-язвенной формами рака,  $U(14, 14) = 58$  ( $p<0,05$ ), и между узловой и эрозивно-язвенной формами,  $U(34, 14) = 50$  ( $p<0,0025$ ).

Оценка зависимости флуоресцентной контрастности «опухолевая/здоровая ткань» от гистологической формы рака кожи, проведенная у 34 пациентов, показала, что при одинаковой дозе фотолон (1,3 мг/кг) и одинаковой клинической форме новообразования (узловая форма) флуоресцентная контрастность «опухолевая/здоровая ткань» была достоверно выше у пациентов с плоскоклеточным раком кожи (в среднем  $2,8 \pm 0,2$ ), чем у пациентов с базальноклеточным раком кожи (в среднем  $2,1 \pm 0,2$ ),  $t=2,1$   $p<0,05$ .

## Заключение

Таким образом, интенсивность флуоресценции фотосенсибилизаторов производных хлорина фотодитазин и фотолон в очаге злокачественного новообразования кожи зависит от внутривенно введенной дозы препарата, клинической и гистологической формы опухоли. Флуоресцентная диагностика

до проведения фотодинамической терапии – необходимое условие для правильного формирования полей облучения, индивидуального планирования световой дозы, ее увеличения при низкой (менее 2) флуоресцентной контрастности, т.к. проведенные ранее исследования с фотодитазин показали, что при более низком уровне флуоресценции возникновение рецидивов вероятнее. Флуоресцентная контрастность «опухолевая/здоровая ткань» ниже в узловых формах злокачественных новообразований. Недостаточное снижение интенсивности флуоресценции после курса ФДТ может быть предиктором рецидива, поэтому в дальнейших исследованиях планируется оценить степень снижения интенсивности флуоресценции в зависимости от подведенной дозы лазерного облучения и связь с возникновением рецидивов. Отсутствие флуоресцентной визуализации в пигментных новообразованиях кожи также можно использовать в качестве диагностического критерия распространенности процесса.



**Рис. 6.** Зависимость интенсивности флуоресценции in vitro от концентрации раствора фотолон

**Fig. 6.** Photolon solution fluorescence intensity in vitro dependence on its concentration

## ЛИТЕРАТУРА

1. Александров М.Т. Лазерная клиническая биофотометрия (теория, эксперимент, практика). – М.: Техносфера, 2008. – 584 с.
2. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. – М.: Мир, 1986. – 496 с.
3. Горенков Р.В., Карпов В.Н., Рогаткин Д.А., Шумский В.И. Хроническая гипоксия как один из факторов повышенной флуоресценции эндогенных порфиринов в живых биологических тканях // Биофизика. – 2007. – Т. 52, № 4. – С. 711-717.
4. Рогаткин Д.А., Быченков О.А., Поляков П.Ю. Неинвазивная спектрофотометрия в современной радиологии: вопросы точности и информативности результатов измерений // Альманах клинической медицины. – 2008. – Т. 17-1. – С. 83-87.
5. Schor N. Correlation between autofluorescence intensity and tumor area in mice bearing renal cell carcinoma // J Fluoresc. – 2008. – No. 18(6). – P. 1163-1168.
6. Дронова О.Б., Третьяков А.А., Мищенко А.Н., Булгакова Н.Н. Исследование возможностей лазер-индуцированной аутофлуоресценции в диагностике пищевода Баррета // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – № 4. – С. 11-12.
7. Лощенов В.Б., Линьков К.Г., Савельева Т.А. и др. Аппаратурное и инструментальное обеспечение флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии // Biomedical photonics. – 2013. – № 3. – С. 17-25.
8. Соколов В.В., Русаков И.Г., Булгакова Н.Н. и др. Флуоресцентные методы исследования в диагностике поверхностного рака мочевого пузыря (обзор литературы) // Сибирский онкологический журнал. – 2007. – № 4. – С. 117-126.
9. Чиссов В.И., Соколов В.В., Булгакова Н.Н., Филоненко Е.В. Флуоресцентная эндоскопия, дерматоскопия, спектрофотометрия в диагностике злокачественных опухолей основных локализаций // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 5, № 4. – С. 42-56.
10. Филоненко Е.В., Лощенов В.Б., Сотников В.Н. и др. Аутофлуоресцентная диагностика у больных с эпителиальными новообразованиями толстой кишки // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – № 5. – С. 17-21.
11. Rotomskis R., Streckyte G. Fluorescence diagnostics of tumors // Medicina (Kaunas). – 2004. – 40(12). – P. 1219-1230.
12. Zhao J., Lui H., McLean D.I., Zeng H. Real-time raman spectroscopy for non-invasive skin cancer detection – preliminary results // ConfProc IEEE Eng Med Biol Soc. – 2008. – 2008. – P. 3107-3109. doi: 10.1109/IEMBS.2008.4649861
13. Moan J., Bech O., Peng Q., Berg K. Use of 5-aminolevulinic acid in photochemotherapy and fluorescence diagnostics // Tidsskr Nor Laegeforen. – 1998. – 118(8). – P. 1206-1211.
14. Гамаюнов С.В., Корчагина К.С., Скребцова Р.Р., Каров В.А. Изучение возможности флуоресцентного мониторинга ФДТ // Сибирский онкологический журнал. – 2015. – № 51. – С. 24.

## REFERENCES

1. Aleksandrov M.T. *Lazernaya klinicheskaya biofotometriya (teoriya, eksperiment, praktika)* [Laser clinical biophotometry (theory, experiment, practice)]. Moscow, Tekhnosfera Publ., 2008. 584 p.
2. Lakovich Dzh. *Osnovy fluorestsentnoi spektroskopii* [Fundamentals of fluorescence spectroscopy]. Moscow, Mir Publ., 1986. 496 p.
3. Gorenkov R.V., Karpov V.N., Rogatkin D.A., Shumskii V.I. Chronic hypoxia as one of the factors of increased fluorescence of endogenous porphyrins in living biological tissues, *Biophizika*, 2007, Vol. 52, No. 4, pp. 711-717. (in Russian)
4. Rogatkin D.A., Bychenkov O.A., Polyakov P.Yu. Noninvasive spectrophotometry in modern radiology: accuracy and informativity of measurement results, *Al'manakh klinicheskoi meditsiny*, 2008, Vol. 17-1, pp. 83-87. (in Russian)
5. Schor N. Correlation between autofluorescence intensity and tumor area in mice bearing renal cell carcinoma, *J Fluoresc*, 2008, No. 18(6), pp. 1163-1168.
6. Dronova O.B., Tret'yakov A.A., Mishchenko A.N., Bulgakova N.N. Study of the possibilities of laser-induced fluorescence in the diagnosis of Barrett's esophagus, *Sibirskii onkologicheskii zhurnal*, 2008, No. 4, pp. 11-12. (in Russian)
7. Loshchenov V.B., Lin'kov K.G., Savel'eva T.A., Loshchenov M.V., Model' S.S., Borodkin A.V. Hardware and tool equipment for fluorescence diagnostics and photodynamic therapy, *Biomedical photonics*, 2013, No. 3, pp. 17-25. (in Russian)
8. Sokolov V.V., Rusakov I.G., Bulgakova N.N., Ul'yanov R.V., Teplov A.A. Fluorescent techniques in the diagnosis of superficial bladder cancer (review), *Sibirskii onkologicheskii zhurnal*, 2007, No. 4, pp. 117-126. (in Russian)
9. Chissov V.I., Sokolov V.V., Bulgakova N.N., Filonenko E.V. Fluorescent endoscopy, dermatoscopy, spectrophotometry in the diagnosis of malignant tumors of the main localizations, *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal*, 2003, Vol. 5, No. 4, pp. 42-56.
10. Filonenko E.V., Loshchenov V.B., Sotnikov V.N., Razzhivina A.A., Perevoznikov A.I., Savel'eva T.A., Radvanskaya O.A., Sokolov A.A., Ageikina N.V. Autofluorescent diagnostics in patients with epithelial neoplasms of the colon, *Sibirskii onkologicheskii zhurnal*, 2010, No. 5, pp. 17-21. (in Russian)
11. Rotomskis R., Streckyte G. Fluorescence diagnostics of tumors, *Medicina (Kaunas)*, 2004, 40(12), pp. 1219-1230. (in Lithuanian)
12. Zhao J., Lui H., McLean D.I., Zeng H. Real-time raman spectroscopy for non-invasive skin cancer detection – preliminary results, *Conf-Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2008, 2008, pp. 3107-3109. doi: 10.1109/IEMBS.2008.4649861
13. Moan J., Bech O., Peng Q., Berg K. Use of 5-aminolevulinic acid in photochemotherapy and fluorescence diagnostics, *Tidsskr Nor Laegeforen*, 1998, 118(8), pp. 1206-1211.
14. Gamayunov S.V., Korchagina K.S., Skrebtsova R.R., Karov V.A. Exploring the possibility of fluorescent monitoring of PDT in clinic, *Sibirskii onkologicheskii zhurnal*, 2015, No. 51, p. 24. (in Russian)

# АНТЕГРАДНАЯ ПАПИЛЛОТОМИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ YAG:HO ЛАЗЕРА ПРИ СТЕНОЗЕ БОЛЬШОГО СОСОЧКА ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ

Н.В. Левченко<sup>1,3</sup>, В.В. Хрячков<sup>1</sup>, Р.Р. Шавалиев<sup>1,3</sup>, Д.П. Кислицин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Ханты-Мансийская государственная медицинская академия, Ханты-Мансийск, Россия

<sup>2</sup>Окружная клиническая больница, Ханты-Мансийск, Россия

<sup>3</sup>Няганская окружная больница, Нягань, Россия

## Резюме

Разработан и внедрен новый способ папиллотомии путем антеградного рассечения большого сосочка двенадцатиперстной кишки высокоэнергетическим излучением гольмиевого (YAG:Ho) лазера. Представлены результаты выполнения антеградной лазерной папиллотомии у 35 пациентов. Все оперативные вмешательства выполнены лапароскопически, показаний для конверсии не было. Применение высокоэнергетического гольмиевого лазерного излучения позволило выполнить адекватную папиллотомию при минимальном риске повреждения окружающих тканей. Исследования показали, что антеградная лазерная папиллотомия выполнима при наличии парапиллярных дивертикулов, выраженной деформации двенадцатиперстной кишки, а также когда ретроградные вмешательства крайне затруднительны или невыполнимы. Показана высокая эффективность применяемой методики (во всех случаях успешно устранен стеноз большого дуоденального сосочка) и отсутствие осложнений и летальных исходов. На основе анализа результатов исследования предложен лечебный алгоритм ведения пациентов со стенозом большого сосочка двенадцатиперстной кишки.

**Ключевые слова:** большой сосочек двенадцатиперстной кишки, холедохолитиаз, гольмиевый лазер, антеградная лазерная папиллотомия.

**Для цитирования:** Левченко Н.В., Хрячков В.В., Шавалиев Р.Р., Кислицин Д.П. Антеградная папиллотомия с использованием YAG:Ho-лазера при стенозе большого сосочка двенадцатиперстной кишки // Biomedical Photonics. – 2018. – Т. 7, № 1. – С. 21–27.

**Контакты:** Левченко Н.В., e-mail: nvlev07@yandex.ru

## ANTEGRADE PAPILLOTOMY WITH THE USE OF YAG:HO LASER IN STENOSIS OF THE MAJOR DUODENAL PAPILLA

Levchenko N.V.<sup>1,3</sup>, Khrachkov V.V.<sup>1</sup>, Shavaliyev R.R.<sup>1,3</sup>, Kislytsyn D.P.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>State Medical Academy of Khanty-Mansiysk, Khanty-Mansiysk, Russia

<sup>2</sup>District Clinical Hospital, Khanty-Mansiysk, Russia

<sup>3</sup>Nyagan District Hospital, Nyagan, Russia

## Abstract

The purpose of our study was to develop and implement a new invasive method of papillotomy – an antegrade dissection of the major duodenal papilla using high-energy holmium (YAG:Ho) laser. Results of antegrade laser papillotomy in 35 patients are presented. All surgical procedures were laparoscopic, no indications for conversion were found. The use of high-energy holmium laser helps perform an adequate papillotomy with minimal damage to the surrounding tissues. Studies have shown that antegrade laser papillotomy is feasible in the presence of parapillary diverticula, severe deformity of the duodenum, and also when retrograde interventions are extremely difficult or impracticable. The high efficiency of the applied technique (in all cases the stenosis of the major duodenal papilla has been successfully eliminated) and the absence of complications and deaths is shown. Based on the analysis of the study results, a therapeutic algorithm for managing patients with stenosis of the major duodenal papilla is proposed.

**Key words:** major duodenal papilla stenosis, choledocholithiasis, Ho:YAG, antegrade laser papillotomy.

**For citations:** Levchenko N.V., Khrachkov V.V., Shavaliyev R.R., Kislytsyn D.P. Antegrade papillotomy with the use of YAG:Ho laser in stenosis of the major duodenal papilla, *Biomedical Photonics*, 2018, T. 7, No. 1, pp. 21–27 (in Russian).

**Contacts:** Levchenko N.V., e-mail: nvlev07@yandex.ru

## Введение

В хирургии панкреатобилиарнодуденальной зоны одной из актуальных проблем является раннее выявление и лечение стеноза большого сосочка двенадцатиперстной кишки [1-7]. Стеноз большого сосочка двенадцатиперстной кишки при первичных операциях на желчных путях встречается в 6,2-25% случаев, а при повторных вмешательствах частота его выявления возрастает до 11,2-84%. В настоящее время лечение стеноза большого сосочка двенадцатиперстной кишки имеет много вариантов.

У каждого способа имеются как свои плюсы, так и свои минусы, поэтому необходимы обоснованные тактические подходы и поиск новых технических решений для восстановления пассажа желчи. Из малоинвазивных методик в настоящее время для лечения стеноза большого сосочка двенадцатиперстной кишки самой распространенной является эндоскопическая ретроградная папиллосфинктеротомия [5,8-14]. При выполнении эндоскопической ретроградной папиллосфинктеротомии могут возникнуть сложности с канюляцией большого сосочка двенадцатиперстной кишки, установкой режущей струны папиллотомы в нужном положении, а также существует риск кровотечения из зоны папиллосфинктеротомии при недостаточной диатермокоагуляции. В тоже время, избыточная диатермокоагуляция может стать причиной развития острого панкреатита. Недостаточная длина разреза способна привести к рестенозированию, в то время как избыточная – к перфорации двенадцатиперстной кишки [15].

Осложнения после эндоскопической ретроградной папиллосфинктеротомии, по литературным данным, встречаются в 1-13% случаев: при этой процедуре частота панкреонекроза – 0,5-1,3%, частота перфорации задней стенки двенадцатиперстной кишки – 0,5%, летальность – 0,1-1% [6,16-19]. В некоторых случаях, парафатериальные дивертикулы также представляют сложности, а иногда делают невозможным выполнение эндоскопической ретроградной папиллосфинктеротомии [3,17].

Нами был разработан новый способ папиллотомии путем антеградного рассечения большого сосочка двенадцатиперстной кишки высокоэнергетическим излучением гольмиевого (YAG:Ho) лазера.

## Материалы и методы

В основе работы лежит анализ результатов выполненных антеградных вмешательств у 35 пациентов со стенозом большого сосочка двенадцатиперстной кишки, проходивших обследование и лечение в Няганской окружной больнице в 2010-2017 гг. Возраст больных варьировал от 25 до 79 лет (средний возраст – 55 лет). Преобладали пациенты в возрасте старше 60. Женщин было 21, мужчин 14. У части пациентов

имелось несколько сопутствующих заболеваний. Наиболее часто встречались: патология сердечно-сосудистой системы – в 51,92%, описторхоз – в 15,8%, ожирение различной степени – в 39,8% случаев.

При обследовании пациентов были выполнены лабораторные исследования, такие как общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови (билирубин и его фракции, мочевины, креатинин, общий белок, глюкоза), по показаниям – коагулограмма. Все лабораторные исследования проводили до вмешательства на большом сосочке двенадцатиперстной кишки, а в послеоперационном периоде – неоднократно, вплоть до достижения нормальных показателей. Инструментальные методы исследования применяли в первые сутки от момента поступления и включали ЭКГ, по показаниям – рентгенографию органов грудной клетки и брюшной полости, обязательное ультразвуковое исследование органов брюшной полости (печень, желчный пузырь, поджелудочная железа, внутривеночные и внепеченочные желчные протоки) и эзофагогастродуоденоскопию. При наличии показаний проводили КТ и МРТ. Всем пациентам старше 40 лет была назначена консультация терапевта. Показаниями к выполнению эндоскопических вмешательств на большом сосочке двенадцатиперстной кишки у пациентов были следующие ультразвуковые признаки: наличие в просвете холедоха конкрементов, расширение холедоха 9 мм и более, расширение внутривеночных протоков более 3 мм. Для выполнения ретроградных эндоскопических вмешательств использовали цифровой дуоденоскоп (Olympus, Япония) с инструментальным каналом 3,2 мм, стандартный и игольчатый папиллотомы (Olympus, Япония).

Уровень билирубинемии при поступлении у пациентов варьировал от 8,8 мкмоль/л до 388 мкмоль/л. Билирубинемия до 100 мкмоль/л была у 22 (62,9%) пациентов, более 100 мкмоль/л – у 9 (25,7%) пациентов. При УЗИ до операции признаки внутрипротоковой гипертензии были обнаружены у 11 (31,4%) пациентов, у 6 (17,1%) пациентов был выявлен холедохолитиаз. Максимальный диаметр холедоха, выявленный при дооперационном УЗИ составил 18,5 мм.

При дуоденоскопии у 3 (8,6%) пациентов найдены парапапиллярные дивертикулы двенадцатиперстной кишки.

Интраоперационную антеградную холедохоскопию проводили всем пациентам с обоснованным подозрением или доказанным стенозом большого сосочка двенадцатиперстной кишки, с холедохолитиазом, при наличии механической желтухи на момент операции или в анамнезе, с признаками расширения желчных протоков более 3 мм по данным УЗИ, при обнаружении расширенных внепеченочных протоков во время операции больше 9 мм. Показанием к

антеградной лазерной папиллотомии считали сужение просвета большого сосочка двенадцатиперстной кишки менее 3 мм.

Для выполнения антеградной лазерной папиллотомии использовали эндовидеохирургические комплексы Stryker (США) и Karl Storz (Германия), фиброхоледохоскоп Karl Storz (Германия), а также лазерную установку Coherent (США), оснащенную высокоэнергетическим YAG:Ho лазером (мощность до 80 Ватт).

Благодаря высокоэнергетическому лазерному излучению систему можно использовать для лечения широкого спектра урологических и хирургических заболеваний. На сегодняшний день YAG:Ho лазер является эффективным инструментом для папиллотомии. Также доказана его эффективность при проведении контактной лазерной литотрипсии. Благодаря заданным параметрам, энергия излучения YAG:Ho поглощается в воде и водосодержащих тканях, приводя к быстрому выделению большого количества тепла. Удобство применения данного лазера заключается в том, что излучение с длиной волны 2100 нм может быть передано через кварцевые световоды, что дает возможность проведения эндоскопических хирургических вмешательств. Кроме того, световоды 200 мкм и 365 мкм могут быть проведены через каналы фиброхоледохоскопа. При случайном попадании на стенки холедоха излучение YAG:Ho лазера проникает в ткань лишь на глубину 0,4 мм и производит термическое повреждение ткани на расстоянии менее 0,5 мм. Благодаря этому лазер может быть использован для высокоточного рассечения и коагуляции тканей. Еще одним преимуществом YAG:Ho лазера является хорошая визуализация, так как при его использовании фактически не образуются пузырьки пара. Наряду с этим постоянное орошение ирригационной жидкостью обеспечивает хорошую визуализацию рабочей зоны.

### **Методика проведения операции**

Методика проведения операции состояла в следующем. Операционный доступ осуществляли из четырех небольших разрезов передней брюшной стенки, через которые устанавливали троакары с оптической системой и инструментами. Расположение троакаров было такое же, как при лапароскопической холецистэктомии. Для уменьшения влияния пневмоперитонеума на гемодинамику у пожилых пациентов и пациентов с сопутствующей субкомпенсированной сердечно-сосудистой патологией, операцию выполняли при внутрибрюшном давлении не более 10 мм.рт.ст. Для улучшения доступа к элементам гепатодуоденальной связки, операционный стол наклоняли на 15-25° влево, а его головной конец приподнимали на 5-25° градусов. Параумбиликальный троакар № 1 (10 мм) использовали для введения лапароскопа.

Субкисфоидаальный троакар № 2 (10 мм) использовали для введения «рабочих» инструментов – диссектора, зажима, иглодержателя, коагуляционного крючка. Троакар № 3 (5 мм), установленный в правой подреберье по среднеключичной линии, также использовали для введения рабочих инструментов – диссектора, зажима, холедохоскопа. Также через этот троакар, как правило, выводили наружу дренаж холедоха, если таковой имелся. При проведении холедохоскопии использовали специальный проводник-тубус, который устанавливали в троакар № 3. Через данный проводник холедохоскоп вводили в брюшную полость и холедох. Холедохоскопию выполняли холедохоскопом фирмы Karl Storz (Германия). Троакар № 4 (5 мм) устанавливали по передней подмышечной линии в правом подреберье, его использовали для введения зажима, с помощью которого осуществляли тракцию желчного пузыря. Впоследствии через этот доступ при необходимости выполняли дренирование брюшной полости.

Выделяли пузырный проток и пузырную артерию. Пузырную артерию клипировали, пересекали. Пузырный проток клипировали в дистальном отделе и надсекали. Через троакар, установленный по среднеключичной линии, в брюшную полость вводили холедохоскоп в тубусе, который имелся в комплекте поставки фиброхоледохоскопа. Далее фиброхоледохоскоп вводили через надрез стенки пузырного протока в холедох. Достаточно затруднительным оставался момент проведения фиброхоледохоскопа в холедох через пузырный проток при сужении последнего на фоне его воспалительных изменений, а также при наличии острого угла впадения протока в холедох. В этих случаях высока вероятность повреждения наружной оболочки фиброхоледохоскопа из-за его чрезмерного перегиба.

На основании полученного опыта нами было предложено направляющее устройство для холедохоскопа (патент РФ на полезную модель № 149055, приоритет от 12.05.2014, регистрация в Государственном реестре полезных моделей РФ от 21.11.2014), которое значительно облегчает проведение холедохоскопии и позволяет избежать повреждения холедохоскопа [20].

Направляющее устройство для проведения интраоперационной холедохоскопии представляет собой выполненную из нержавеющей стали цилиндрическую трубку с длиной 250-300 мм, дистальный конец которой посредством тяг может изгибаться от 0° до 100° по отношению к проксимальному концу, с возможностью размещения в ней эндоскопа и выведения дистального конца его за пределы трубки. Рычаг управления тягами позволяет выбрать оптимальный угол изгиба рабочей части. При использовании данного устройства, его дистальный конец устанавливали на границе с раной холедоха или пузырного про-

тока таким образом, чтобы дистальный конец эндоскопа беспрепятственно проникал в просвет протока.

Если просвет пузырного протока был сужен, непроходим для холедохоскопа, то в супрадуоденальном отделе холедоха выполняли холедохотомию. Учитывали, что длина холедохотомического разреза должна соответствовать диаметру холедохоскопа. Это позволяет минимизировать травму стенки холедоха и способствует созданию необходимого давления промывной жидкости в холедохе и улучшению визуализации при проведении манипуляций.

Далее проводили ревизию холедоха. Оценивали состояние стенки холедоха, наличие дополнительных образований, состояние сфинктера Одди и ампулы большого сосочка двенадцатиперстной кишки.

При наличии стеноза большого сосочка двенадцатиперстной кишки, под визуальным контролем, по рабочему каналу холедохоскопа подводили гибкий лазерный световод. С применением YAG:Ho лазера выполняли процедуру рассечения сосочка в избранном режиме (рис. 1).

После устранения стеноза большого сосочка двенадцатиперстной кишки холедохоскоп, как правило, беспрепятственно проникал в просвет двенадцатиперстной кишки. Извлечение холедохоскопа из холедоха производили после контрольного осмотра желчных путей.

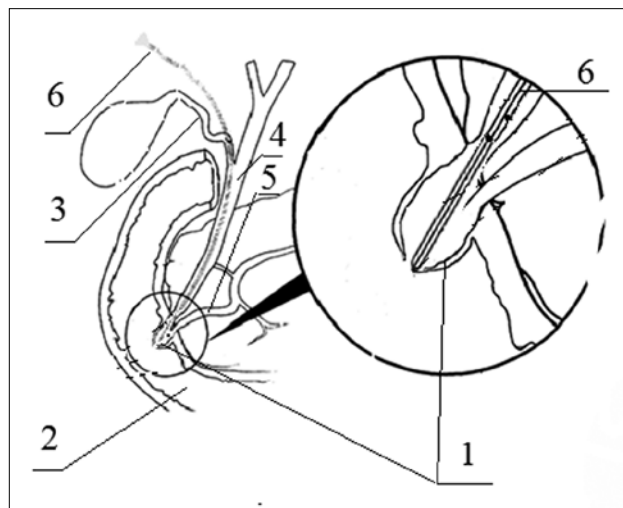
Решение о дренировании холедоха принимал хирург в каждом конкретном случае. При этом он учитывал выраженность воспалительных изменений стенки холедоха, наличие явлений панкреатита.

В настоящее время существует много способов дренирования холедоха. Мы отдавали предпочтение дренированию холедоха через культю пузырного протока. В случаях облитерации пузырного протока устанавливали дренаж через холедохотомическое отверстие, которое ушивали до дренажа.

Иногда пузырный проток был непроходим для холедохоскопа, а дренаж провести через него удавалось. Тогда дренаж в холедох устанавливали через культю пузырного протока, а холедохотомическое отверстие ушивали наглухо. Фиксацию дренажа в культе пузырного протока производили лигированием или наложением клипсы. Отдавали предпочтение дренированию холедоха после холедохотомии.

Если было принято решение не устанавливать дренаж в холедох через культю пузырного протока, то ее клипировали. При наличии дренажа холедоха, его выводили наружу через троакар, расположенный по среднеключичной линии.

При завершении операции проводили контрольный осмотр брюшной полости и области вмешательства. При необходимости устанавливали дренаж в подпечёночное пространство справа через троакар, установленный по передней подмышечной линии.

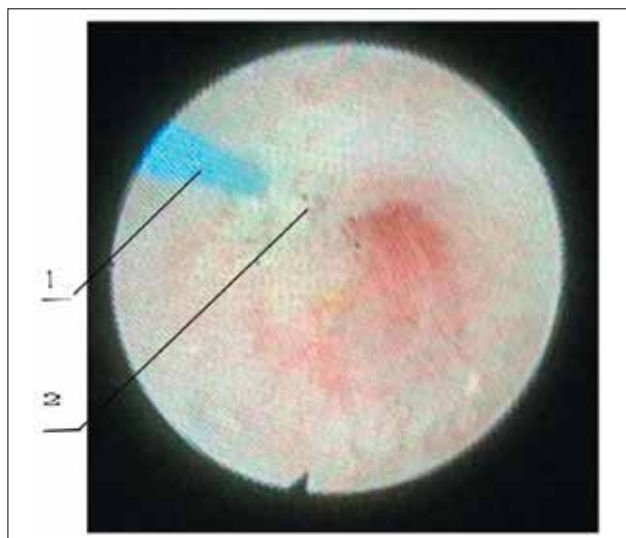


**Рис. 1.** Схематичное изображение антеградной папиллотомии YAG:Ho лазером (1 – большой сосочек двенадцатиперстной кишки, 2 – просвет двенадцатиперстной кишки, 3 – пузырный проток, 4 – общий желчный проток, 5 – панкреатический проток, 6 – холедохоскоп с лазерным световодом)  
**Fig. 1.** Schematic depiction of the antegrade papillotomy using YAG: Ho laser (1 – major duodenal papilla, 2 – duodenal lumen, 3 – cystic duct, 4 – common bile duct, 5 – pancreatic duct, 6 – choledochoscope with laser light guide)

## Результаты и обсуждение

Лазерная папиллотомия была успешно произведена у 35 (100%) пациентов со стенозом большого сосочка двенадцатиперстной кишки. Из них у 15 (42,9%) стеноз большого сосочка двенадцатиперстной кишки сочетался с холедохолитиазом, который в 9 (25,7%) случаях был выявлен интраоперационно. Все оперативные вмешательства были выполнены лапароскопически, показаний для конверсии не было. У 3 (8,6%) пациентов большой сосочек двенадцатиперстной кишки был расположен в дивертикуле двенадцатиперстной кишки, при этом эффективность выполнения антеградной лазерной папиллотомии у пациентов с парафатериальными дивертикулами составила 100%. В качестве примера приводим клиническое наблюдение.

Пациент Б., 52 года, поступил в экстренном порядке с жалобами на интенсивные боли постоянного характера в правом подреберье с иррадиацией в правую лопатку, сухость во рту, тошноту, рвоту, «кислый» привкус во рту. Из анамнеза было установлено, что пациент заболел около 5 дней назад, когда после приема жирной пищи появились вышеуказанные жалобы. Пациент обратился к врачу по месту жительства и был направлен в приемное отделение. При осмотре общее состояние удовлетворительное. Кожные покровы желтушные. Живот мягкий, не вздут, болезненный в правом подреберье. Пузырные симптомы (Керра, Ортнера, Мерфи) положительные. Симптомы



**Рис. 2.** Вид стенозированного сосочка двенадцатиперстной кишки и подведенного к нему лазерного световода при холедохоскопии (1 – лазерный световод, 2 – стеноз большого сосочка двенадцатиперстной кишки)

**Fig. 2.** View of stenotic papilla of the duodenum and a laser light guide delivered to it during choledochoscopy (1 – laser light guide, 2 – stenosis of the major duodenal papilla)

раздражения брюшины отрицательные. Диурез достаточный. При поступлении общий анализ крови и общий анализ мочи в пределах нормы. В биохимическом анализе крови при поступлении: амилаза – 95,4 ед/л; общий билирубин – 117,8 мкмоль/л; прямой билирубин – 76,6 мкмоль/л. При ультразвуковом исследовании органов брюшной полости: холедох до 10 мм, в дистальном отделе нечетко лоцируется гиперэхогенное включение до 6 мм, с эхотенью. Желчный пузырь 86x43 мм, стенка утолщена до 4 мм, содержимое неомогенное, гиперэхогенная взвесь. Фиброгастроскопия: слизистая двенадцатиперстной кишки умеренно гиперемирована, в просвете следы желчи. В проекции большого дуоденального сосочка дивертикул, с широким основанием. Устье большого дуоденального сосочка расположено в дивертикуле. Заключение терапевта – без соматической патологии.

После подготовки выполнена операция в следующем объеме: лапароскопическая холецистэктомия, интраоперационная холедохоскопия с контактной лазерной литотрипсией и антеградной лазерной папиллотомией, дренирование холедоха и брюшной полости. Первым этапом хирургического вмешательства произведена интраоперационная ревизия, отмечено что желчный пузырь флегмонозно изменен. Пузырный проток клипирован в дистальном отделе, надсечён, отмечалось выделение коричневой замазкообразной жёлчи под давлением, холедох до 1 см в диаметре. Через культю пузырного протока в просвет холедоха был введён холедохоскоп, слизистая холедоха местами гиперемирована, с точечными кровоизлияниями, в просвете холедоха большое ко-

личество описторхов, в дистальном отделе фиксированный конкремент размерами до 1 см. Выполнена лазерная литотрипсия. Устье большого дуоденального сосочка резко сужено, для холедохоскопа не проходимо. К стенозированному сосочку двенадцатиперстной кишки подведен лазерный световод (рис. 2). С помощью YAG:Ho лазера выполнена антеградная папиллотомия 0,8 см. После хирургического этапа холедохоскоп беспрепятственно введен в двенадцатиперстную кишку через папиллотомную рану. Через культю пузырного протока в дистальном направлении установлена дренажная трубка.

Клинический диагноз: желчекаменная болезнь; острый флегмонозный холецистит; холедохолитиаз; описторхоз; острый катаральный холангит; стеноз устья большого дуоденального сосочка; механическая желтуха.

Течение послеоперационного периода спокойное. Контрольная фиброгастродуоденоскопия: в проекции большого сосочка двенадцатиперстной кишки парафатереальный дивертикул до 2 см с широким устьем, без признаков воспаления; папиллотомическое отверстие до 7-8 мм, отмечается поступление светлой желчи; перистальтика активная.

Пациент выписан в удовлетворительном состоянии. При контрольной фиброгастродуоденоскопии через 3 мес признаков рестенозирования не выявлено.

Наш опыт выполнения антеградной лазерной папиллотомии позволяет утверждать, что обнаружение дивертикула при дуоденоскопии не должно являться причиной отказа от проведения антеградной лазерной папиллотомии.

У 2 пациентов с парафатериальными дивертикулами стеноз большого сосочка двенадцатиперстной кишки сочетался с холедохолитиазом. Обоим пациентам были проведены антеградная лазерная папиллотомия и литотрипсия.

У всех 35 пациентов, включенных в исследование, был достигнут желаемый результат. Летальных исходов не было. У наблюдаемых более 5 лет пациентов осложнений не выявлено, повторных операций не было.

У 5 (14,3%) пациентов в послеоперационном периоде было отмечено повышение уровня амилазы крови до 229 Ед/л, при норме до 100 Ед/л, которое удалось купировать консервативной терапией.

Одним из наиболее технически сложных этапов в процессе антеградной лазерной папиллотомии, как показал накопленный опыт, является проведение фиброхоледохоскопа через пузырный проток. Значительно усложняют выполнение этой манипуляции анатомические особенности пузырного протока, такие как протяженность, извитость, облитерация просвета и угол впадения в холедох.

В 7 (20%) из 35 наблюдений не удалось провести фиброхоледохоскоп через пузырный проток. В этих

случаях его вводили через холедохотомическое отверстие. Дренажирование холедоха выполняли через культю пузырного протока в 16 (42,8%) случаях и только одному пациенту (2,8%) было произведено дренажирование холедоха через холедохотомическое отверстие.

## Заключение

Предложенный способ лапароскопического лечения стеноза большого сосочка двенадцатиперстной кишки, с использованием YAG:Ho-лазера (патент на изобретение № 2449757 от 09.11.2010), позволил во всех случаях выполнить папиллотомию. Одним из наиболее информативных методов в диагностике стеноза большого сосочка двенадцатиперстной кишки является интраоперационная холедохоскопия.

Антеградная лазерная папиллотомия при стенозе большого сосочка двенадцатиперстной кишки под

контролем эндофиброхоледохоскопии позволяет одноэтапно выполнить холецистэктомию, санацию холедоха и папиллотомию с сохранением анатомической целостности и физиологической функции сфинктера Одди; достичь малой травматичности, за счет проведения операции без введения дополнительных троакаров; сократить период реабилитации; избежать повреждения терминального отдела холедоха и осложнений за счет прицельного подведения лазерного излучения.

Антеградная лазерная папиллотомия выполняема при наличии парапиллярных дивертикулов, выраженной деформации двенадцатиперстной кишки, а также когда ретроградные вмешательства крайне затруднительны или невыполнимы.

Предложенное направляющее устройство для холедохоскопа облегчает выполнение антеградной холедохоскопии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев А.Л., Рыбин Е.П., Учваткин Е.Г., Филин А.С. Комбинированная эндоскопическая хирургия желчнокаменной болезни, осложненной заболеваниями терминального отдела общего желчного протока // Вестн. хирургии им. И.И. Грекова. – 1997. – Т. 156, № 3. – С. 30-34.
2. Ветшев П.С. Механическая желтуха: причины и диагностические подходы (лекция) // Анналы хирург. гепатологии. – 2011. – Т. 16, № 3. – С. 50-57.
3. Гальперин Э.И., Ветшев П.С. Руководство по хирургии желчных путей. – М.: Видар-М, 2009. – 568 с.
4. Глебов К.Г., Котовский А.Е., Дюжева Т.Г. Критерии выбора конструкции эндопротеза для эндоскопического стентирования желчных протоков // Анналы хирург. гепатологии. – 2014. – Т. 19, № 2. – С. 55-65.
5. Парфенов И.П., Ярош А.Л., Сергеев О.С. и др. Прогнозирование острого билиарного панкреатита при ущемленном конкременте большого сосочка двенадцатиперстной кишки // Анналы хирург. гепатологии. – 2010. – Т. 15, № 2. – С. 87-91.
6. Bagnato V.J. Laparoscopic choledochoscopy and choledocholithotomy // Surg. Laparosc. Endosc. Percutan. Tech. – 1993. – Vol. 3, No. 3. – P. 164-166.
7. Catheline J.-M., Turner R., Rizk N., et al. Evaluation of the biliary tree during laparoscopic cholecystectomy: laparoscopicultrasound versus intraoperative cholangiography: a prospective study of 150 cases // Surg. Laparosc. Endosc. – 1998. – Vol. 8, No. 2. – P. 85-91.
8. Ермолов А.С., Иванов П.А., Благовестнов Д.А. и др. Тактика лечения острого холецистита, осложненного холедохолитиазом // Хирургия. Журн. им. Н. И. Пирогова. – 2014. – № 1. – С. 10-14.
9. Михайлузов С.В., Моисеев Е.В., Мисроков М.М. Особенности течения панкреонекроза на фоне камня большого сосочка двенадцатиперстной кишки // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2014. – № 5. – С. 29-35.
10. Славин Л.Е. Лапароскопическая холецистэктомия // Прак. медицина. – 2010. – № 41. – С. 30-35.
11. Старков Ю.Г., Стрекаловский В.П., Григорян Р.С. и др. Антеградная папиллосфинктеротомия во время лапароскопической холецистэктомии // Анналы хирург. гепатологии. – 2001. – Т. 6, № 1. – С. 99-106.
12. Golden W.E., Jonston J.C., Cleves M.A.S. Laparoscopic cholecystectomy in the geriatric population // J. Am. Geriatr. Soc. – 1996. – Vol. 44, No. 11. – P. 1380-1383.

## REFERENCES

1. Andreev A.L., Rybin E.P., Uchvatkin E.G., Filin A.S. Combined endoscopic surgery of cholelithiasis, complicated by diseases of the terminal section of the common bile duct, *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova*, 1997, Vol. 156, No. 3, pp. 30-34. (in Russian)
2. Vetshev P.S. Mechanical jaundice: causes and diagnostic approaches (lecture), *Annaly khirurgicheskoi gepatologii*, 2011, Vol. 16, No. 3, pp. 50-57. (in Russian)
3. Gal'perin E.I., Vetshev P.S. *Rukovodstvo po khirurgii zhelchnykh putei* [Guide to biliary tract surgery]. Moscow, Vidar-M Publ., 2009. 568 p.
4. Glebov K.G., Kotosvskii A.E., Dyuzheva T.G. Criteria for selecting an endoprosthesis design for endoscopic stenting of the bile ducts, *Annaly khirurgicheskoi gepatologii*, 2014, Vol. 19, No. 2, pp. 55-65. (in Russian)
5. Parfenov I.P., Yarosh A.L., Sergeev O.S., Soloshenko A.V., Karpachev A.A. Prediction of acute biliary pancreatitis with injured concrement of the major duodenal papilla, *Annaly khirurgicheskoi gepatologii*, 2010, Vol. 15, No. 2, pp. 87-91. (in Russian)
6. Bagnato V.J. Laparoscopic choledochoscopy and choledocholithotomy, *Surg. Laparosc. Endosc. Percutan. Tech.*, 1993, Vol. 3, No. 3, pp. 164-166.
7. Catheline J.-M., Turner R., Rizk N., Barrat C., Buenos P., Chaumpault G. Evaluation of the biliary tree during laparoscopic cholecystectomy: laparoscopicultrasound versus intraoperative cholangiography: a prospective study of 150 cases, *Surg. Laparosc. Endosc.*, 1998, Vol. 8, No. 2, pp. 85-91.
8. Ermolov A.S., Ivanov P.A., Blagovestnov D.A., Demchenko S.S., Novosel S.N., Almakaev F.R. Clinical management of acute cholecystitis complicated by choledocholithiasis, *Khirurgiya. Zhurnal im. N. I. Pirogova*, 2014, No. 1, pp. 10-14. (in Russian)
9. Mikhailusov S.V., Moiseenkova E.V., Misrokov M.M. Features of the course of pancreatic necrosis against the background of the major duodenal papilla stone, *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*, 2014, No. 5, pp. 29-35. (in Russian)
10. Slavin L.E. Laparoscopic cholecystectomy, *Prakticheskaya meditsina*, 2010, No. 41, pp. 30-35. (in Russian)
11. Starkov Yu.G., Strekalovskii V.P., Grigoryan P.C., Rizaev K.S., Shishin K.V. Antegrade papillosphincterotomy during laparoscopic cholecystectomy, *Annaly khirurgicheskoi gepatologii*, 2001, Vol. 6, No. 1, pp. 99-106. (in Russian)
12. Golden W.E., Jonston J.C., Cleves M.A.S. Laparoscopic cholecystectomy in the geriatric population, *J. Am. Geriatr. Soc.*, 1996, Vol. 44, No. 11, pp. 1380-1383.

13. Voitk A. Its outpatient cholecystectomy safe for the hingerriscelec-  
 tive patient // *Surg. Endosc.* – 1997. – Vol. 11, No. 12. – P. 1147-1149.
14. Wojtuś S., Gil J., Zyśko B. The use of endoscopic method in treat-  
 ment of strictures of biliary tree // *Pol. Merkur. Lekarski.* – 2007. –  
 Vol. 22, No. 131. – P. 477-481.
15. Бебуришвили А.Г., Мандриков В.В., Зюбина Е.Н., Туровец М.И. Про-  
 филактика острого панкреатита при эндоскопических транспа-  
 пиллярных вмешательствах у пациентов с высоким риском его  
 развития // *Эндоскоп. хирургия.* – 2014. – Т. 20, № 1. – С. 69-70.
16. Красильников Д.М., Захарова А.В., Миргасимова Д.М., Нигматзя-  
 нов Р.И. Комплексное лечение больных с механической желту-  
 хой // *Практ. медицина.* – 2014. – № 5 (81). – С. 71-74.
17. Майстренко Н.А., Стукалов В.В. Холедохолитиаз. – СПб.: ЭЛБИ-  
 СПб, 2000. – 285 с.
18. Пархисенко Ю.А., Жданов А.И., Пархисенко В.Ю., Калашник Р.С.  
 Механическая желтуха: современные взгляды на проблему  
 диагностики и хирургического лечения // *Український журнал  
 хірургії.* – 2013. – № 3 (22). – С. 202-211.
19. Шаповальянц С.Г., Ардасенов Т.Б., Фрейдович Д.А. и др. Про-  
 блемы современной диагностики холедохолитиаза // *Рос. журн.  
 гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* – 2011. – Т. 21,  
 № 2. – С. 22-29.
20. Хрячков В.В., Левченко Н.В., Шавалиев Р.Р. Направляющее  
 устройство для холедохоскопа // Патент России № 149055. –  
 2014.
13. Voitk A. Its outpatient cholecystectomy safe for the hingerriscelec-  
 tive patient, *Surg. Endosc.*, 1997, Vol. 11, No. 12, pp. 1147-1149.
14. Wojtuś S., Gil J., Zyśko B. The use of endoscopic method in treatment  
 of strictures of biliary tree, *Pol. Merkur. Lekarski.*, 2007, Vol. 22, No. 131,  
 pp. 477-481.
15. Beburishvili A.G., Mandrikov V.V., Zyubina E.N., Turovets M.I. Preven-  
 tion of acute pancreatitis during endoscopic transpapillary interven-  
 tions in patients at high risk of its development, *Endoskopicheskaya  
 khirurgiya*, 2014, Vol. 20, No. 1, pp. 69-70. (in Russian)
16. Krasil'nikov D.M., Zakharova A.V., Mirgasimova D.M., Nigmatzyanov  
 R.I. Complex treatment of patients with mechanical jaundice, *Prak-  
 ticheskaya meditsina*, 2014, No. 5 (81), pp. 71-74. (in Russian)
17. Maistrenko N.A., Stukalov V.V. *Kholedokholitiaz* [Choledocholithiasis].  
 Saint-Petersburg, ELBI-SPb Publ, 2000. 285 p.
18. Parkhisenko Yu.A., Zhdanov A.I., Parkhisenko V.Yu., Kalashnik R.S.  
 Mechanical jaundice: modern views on the problem of diagnosis  
 and surgical treatment, *Ukrains'kii zhurnal khirurgii*, 2013, No. 3 (22),  
 pp. 202-211. (in Russian)
19. Shapoval'yants S.G., Ardasenov T.B., Freidovich D.A., Myl'nikov A.G.  
 Pan'kov A.G., Budzinskii S.A., Nikonov A.A. Problems of modern diag-  
 nosis of choledocholithiasis, *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepa-  
 tologii, koloproktologii*, 2011, Vol. 21, No. 2, pp. 22-29. (in Russian)
20. Khryachkov V.V., Levchenko N.V., Shavaliyev R.R. *Napravlyayushchee  
 ustroystvo dlya kholedokhoskopa* [Choledochoscope guide], Patent  
 RF, no 149055, 2014.

# ОПЕРАТИВНЫЙ АНАЛИЗ СЛОЖНЫХ МЕДИЦИНСКИХ СОСТОЯНИЙ МЕТОДАМИ ФОТОНИКИ

А.И. Ларкин<sup>1</sup>, К.А. Труханов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

## Резюме

В работе анализируются возможности специальных методов и оборудования когерентной фотоники при работе с многопараметрической информацией. Обратное парафазное кодирование и оперативный анализ многопараметрической информации позволяют реализовать ряд вероятностных алгоритмов. Обосновывается возможность и целесообразность реализации методами фотоники не только корреляционного алгоритма, лежащего в основе голографического распознавания образов, но и универсальных статистических алгоритмов. Проводится сравнительный анализ фотонных систем медицинской диагностики, работающих по широкому классу алгоритмов: поиск прецедента, диагностика соответствия, детерминистская диагностика, алгоритм Байеса. Приводятся экспериментальные результаты по постановке медицинского диагноза и прогнозированию сложных состояний с помощью методов и средств цифровой фотоники. Существенно, что при расширении диапазона вероятностных алгоритмов удается сохранить известные достоинства голографического метода: многомерность, оперативность, рекордно высокую информационную емкость и быстродействие, наглядность и гибкость представления результата. Описанные методы приобретают особую актуальность в связи с появлением первых образцов фотонных процессоров.

**Ключевые слова:** лазерная фотоника, голография, корреляция, когерентность, оптический компьютеринг, фотонный процессор.

**Для цитирования:** Ларкин А.И. Труханов К.А. Оперативный анализ сложных медицинских состояний методами фотоники // Biomedical Photonics. – 2018. – Т. 7, № 1. – С. 28–31.

**Контакты:** Ларкин А.И., e-mail: alexlarkin16@gmail.com

## OPERATIONAL ANALYSIS OF COMPLEX MEDICAL STATES BY PHOTONICS METHODS

Larkin A.I.<sup>1</sup>, Trukhanov K.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russia

<sup>2</sup>Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

## Abstract

In this paper we analyze the possibility of using special methods and equipment of coherent photonics when working with multi-parameter information. Inverse two-phase coding and operational analysis of multi-parameter data can realize a number of probabilistic algorithms. The possibility and expediency of realization of not only the correlation algorithm underlying the holographic image recognition but also universal statistical algorithms using photonics methods is substantiated. A comparative analysis of photonic medical diagnostic systems running on a wide range of algorithms: search for precedent, correspondence diagnostics, deterministic diagnostics, Bayes algorithm. The results of experimental studies of medical diagnosis and the prediction of complex conditions is presented. Such an analysis is carried out by the means of vector-matrix multiplication using laser photonics methods. It is significant that with the widening of the range of probability algorithms, it is possible to preserve certain advantages of the holographic method: multidimensionality, efficiency, high information capacity and speed, visibility and flexibility of the result presentation. The methods described are of particular relevance in connection with the first photonic processors.

**Key words:** laser photonics, holography, correlation, coherence, optical computing, photonic processor.

**For citations:** Larkin A.I., Trukhanov K.A. Operational analysis of complex medical states by photonics methods, *Biomedical Photonics*, 2018, T. 7, No. 1, pp. 28–31 (in Russian).

**Contacts:** Larkin A.I. e-mail: alexlarkin16@gmail.com

## Введение

Когерентное лазерное излучение эффективно используется в различных видах медицинской диагностики: оптическая когерентная томография, исследование крови, изучение состояния кожи и зубов и др. [1-3]. Голографические методы пригодны для диагностирования в общем случае. Они не накладывают никаких ограничений на статистическую функцию состояния системы и позволяют анализировать информацию, представленную в универсальной многопараметрической форме. Это очень важно и полезно для оперативного анализа и распознавания изображений в медицине и других сложных ситуациях. В последние годы отмечается переход от простых устройств распознавания и обработки изображений к разработке сложных систем анализа многопараметрической информации. В общем случае такой анализ может быть осуществлен посредством векторно-матричного умножения [4]. Показанная в работах [4,5] возможность реализации этого процесса методами лазерной фотоники дает возможность расширения диапазона вероятностных алгоритмов при сохранении известных достоинств голографического метода, таких как многомерность, оперативность, высокая информационная емкость, наглядность и гибкость представления результата.

### Алгоритмы голографической памяти

Лазерная голография предоставляет уникальные возможности параллельной обработки двумерных массивов данных, простой реализации корреляционного алгоритма, обеспечивая оперативную обработку информации и рекордно высокую плотность памяти. В медицине диагноз и прогноз состояния пациента определяются сочетанием большого числа разнообразных параметров. В связи с этим необходимо учитывать большое количество различных комбинаций параметров и возможность сравнения этой многопараметрической картины с прошлым опытом. В идеальном случае на первом этапе необходимо определить информативный вес каждого признака. Однако поиск наиболее информативных признаков – неразрешимая проблема не только в общем случае, но и для большинства конкретных ситуаций. Кроме того, зачастую информативный вес конкретного признака зависит от окончательного диагноза. Реальный подход требует увеличивать количество параметров, что увеличивает избыточную информацию и создает два рода трудностей. Во-первых, количество анализов не может быть бесконечно большим, тем более, если число пациентов велико и необходим оперативный диагноз. Во-вторых, при увеличении избыточной информации требуемая мощность обрабатывающей системы экспоненциально растет с количеством параметров. С учетом этих обстоятельств достоинства

голографического метода становятся принципиально необходимыми. В общем случае, статистическая обработка многопараметрической информации может привести к многомерным распределениям. В простейшем случае мы должны принять решение о том, соответствует ли ситуация определенному набору символов, относящихся к данному классу или выходит за его пределы.

Простейшим алгоритмом диагностики является поиск прецедента. Это единственный алгоритм, в котором объем обрабатываемой информации практически равен емкости хранения данных. Число возможных состояний системы составляет  $q^m$ , где  $q$  – количество возможных значений определенного параметра, а  $m$  – число параметров. Такой алгоритм не требует предварительной обработки исходных данных, но предъявляет самые жесткие требования к емкости памяти.

Более приемлемы диагностические процедуры, основанные на метрических или вероятностных методах. Наиболее надежны вероятностные алгоритмы, основанные на теореме Байеса, согласно которой сведения, содержащиеся в символе  $S_i$  (или в системе символов  $S$ ) при условии, что болезнь  $B_j$  имеет место, равна информации, содержащейся в диагнозе  $B_j$  при условии, что символ  $S_i$  (или система символов  $S$ ) имеет место.

Наиболее привлекателен алгоритм определения соответствия [6,7]. Это наиболее общий случай классификации, который не накладывает никаких ограничений на характеристическую независимость параметров. В то же время этот алгоритм не нуждается в измерении интенсивности в корреляционной плоскости и дает информацию о точной результирующей оценке и ее вероятности. Этот алгоритм не ограничивает вид исходного статистического распределения и дает возможность учитывать форму конкретного статистического распределения при определении вероятности результирующего диагноза. Он сочетает в себе преимущества детерминистских и вероятностных методов, но требует самой серьезной математической обработки исходной статистической информации.

Сравнительная оценка возможностей алгоритмов фотоники приведена в таблице. В ней представлен список тестируемых алгоритмов в порядке убывания необходимого объема информации, соответствующего постоянному количеству обрабатываемых данных.

### Реализация диагностических алгоритмов методами фотоники

В общем случае методы фотоники пригодны для диагностирования без ограничений на статистические функции состояний системы (метод соответствия), а также для случаев, когда распределение представлено в виде гистограммы (детерминистский

**Таблица**  
Сравнительные характеристики алгоритмов голографической памяти  
**Table**  
Comparative characteristics of holographic memory algorithms

| Алгоритм диагностирования<br>Algorithm of diagnosing          | Информация о вероятности результата<br>Information on probability of result | Информационная емкость параметров<br>Information capacity of parameters | Взаимная независимость параметров<br>Mutual independence of parameters |
|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Поиск прецедента<br>Search for precedent                      | -                                                                           | +                                                                       | +                                                                      |
| Диагностика соответствия<br>Correspondence diagnostics        | +                                                                           | +                                                                       | +                                                                      |
| Детерминистская диагностика<br>Deterministic diagnostics      | -                                                                           | +                                                                       | ±                                                                      |
| Диагностика Байеса<br>Bayesian diagnostics                    | +                                                                           | +                                                                       | ±                                                                      |
| Измерение расстояния Хемминга<br>Hamming distance measurement | +                                                                           | ±                                                                       | ±                                                                      |

«+» – возможность реализации;

«-» – невозможность реализации;

«±» – возможность реализации, но за счет увеличения информационной емкости входного транспаранта.

«+» – possible to implement;

«-» – impossible to implement;

«±» – possible to implement but requires increasing the information capacity of the input transparency.

метод), или параметры системы статистически независимы (Байесовский метод), или объем статистических выборок имеет ограниченный размер (метрический метод). Важно, что система сохраняет все известные преимущества голографического метода. Процедура постановки диагноза методами фотоники включает в себя следующие этапы:

1. Подготовка и формализация данных.
2. Кодирование и запись исходных данных – формирование памяти.
3. Оперативное кодирование результатов обследования пациента на динамическом транспаранте – ввод данных.
4. Обработка результатов обследования пациента и вероятностное сопоставление со статистическим материалом, хранящимся в архивной памяти.

Первые два этапа являются подготовительными. Целесообразно, чтобы они были проведены в ведущих учреждениях здравоохранения и только один раз, если не предполагается, что память будет пополняться новыми данными.

## Материалы и методы

При экспериментальной реализации записи исходной статистической информации на голографический фильтр и ввода данных каждому параметру присваиваются две ячейки динамического модулятора света. Это позволяет реализовать парафазное

кодирование и нормировать выходные сигналы. Для модуляции применяется динамическое рассеивание света подачей управляющего потенциала на соответствующие части входного транспаранта. Отдельные опорные лучи используются для записи двух совмещенных голограмм, соответствующих благоприятному и неблагоприятному прогнозу болезни.

## Результаты и обсуждение

Мы испытали диагностическую систему, используя опубликованные данные по диагностике заболеваний печени и распределения, описывающие заболевания желудка. Наибольшее внимание было уделено непосредственному анализу и прогнозированию состояния пациентов после многочисленных сочетанных поражений в результате крупных катастроф, когда к скорости многопараметрического анализа предъявляются особенно жесткие требования. На первом этапе были определены возможные состояния и их результаты для пациента по выборке из 200 реальных историй болезни института Склифосовского с 20 параметрами каждая. В результате была построена карта медицинской информации и составлены матрицы статистических распределений, необходимые для записи данных в голографическую память. Решение принималось с учетом относительной интенсивности корреляционных сигналов на выходе.

Тестирование на реальном медицинском материале подтвердило оперативную работоспособность си-

системы многопараметрической фотоники. Сопоставление с известными медицинскими результатами института Склифосовского показало, что голографический анализ и прогноз при таких статистических данных совпадает с известным с точностью более 80 процентов.

## Заключение

Методы когерентной фотоники можно и целесообразно использовать не только при работе с изображениями, но и для обработки информации, представленной в универсальной многомерной форме. Наша система позволяет реализовывать не только классический корреляционный алгоритм, но и ряд более сложных алгоритмов обработки.

В отличие от оптических методов, работающих с сигналами и изображениями в натуральном виде, рассмотренные методы позволяют анализировать информацию, представленную в многопараметрической форме. Таким образом, становится возможной реализация комбинированного метода, сочетающего рекордно высокую емкость голографической памяти и оперативную реализацию статистических алгоритмов обработки данных методами фотоники. Этот универсальный результат приобретает самостоятельное значение в связи с сообщениями [8] о разработке первого фотонного процессора способного умножать 256-байтный вектор на 256x256-байтную матрицу за один такт – 8 нс.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Antonov V.A., Grosmann M.H., Larkin A.I., et al. Medicine Application of Laser Holography and Speckle Interferometry / Computational vision and medical image processing – VIPIMAGE 2011. – Algarve: CRC Press, 2011. – P. 12-14.
2. Grosmann M.H., Kiryushin M.A., Larkin A.I., et al. Laser photonics application for denture design optimization // *Laser Physics*. – 2010. – Vol. 20, Is. 6. – P. 1481-1485.
3. Ларкин А.И., Юу Ф.Т.С. Когерентная фотоника. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2007. – 316 с.
4. Ларкин А.И., Стариков С.Н. Лазерная фотоника как инструмент для регистрации и обработки следов частиц // *Приборы и техника эксперимента*. – 2017. - № 3. – С. 1.
5. Zakharov S.M., Manykin E.A. Digital vector - matrix multiplication on the basis of a photon echo // *Laser Physics*. – 1996. – Vol. 6, No. 4. – P. 793-802.
6. Antonov V.A., Larkin A.I., Grosmann M.H., et al. Holographic data processing methods for medical prognosis // *Laser Physics*. – 2015. – Vol. 25, No. 10. – P. 105601.
7. Duda R.O., Hart P.E. *Pattern Classification and Scene Analysis*. – New York: Wiley-Interscience, 1973.
8. EnLight256 8000 Giga MAC/sec fixed point DSP. – Herzelia Pituach, Lenslet, 2003. [http://www.lenslet.com/docs/EnLight256\\_White\\_Paper.pdf](http://www.lenslet.com/docs/EnLight256_White_Paper.pdf)

## REFERENCES

1. Antonov V.A., Grosmann M.H., Larkin A.I., Osintsev A.V., Schepinov V.P. Medicine Application of Laser Holography and Speckle Interferometry in *Computational vision and medical image processing – VIPIMAGE 2011*. Algarve, CRC Press, 2011. pp. 12-14.
2. Grosmann M.H., Kiryushin M.A., Larkin A.I., Lebedenko A.I., Lebedenko I.Yu., Lopatina N.A., Osincev A.V., Shchepinov V.P., Shchepinova I.V. Laser photonics application for denture design optimization, *Laser Physics*, 2010, Vol. 20, Is. 6, pp. 1481-1485.
3. Larkin A.I., Juu F.T.S. *Kogerentnaja fotonika* [Coherent photonics]. Moscow, BINOM, Laboratoriya znaniy Publ., 2007. 316 p.
4. Larkin A.I., Starikov S.N. Laser photonics as a tool for recording and processing particle traces, *Pribory i tehnika jeksperimenta*, 2017, No. 3, p. 1. (in Russian)
5. Zakharov S.M., Manykin E.A. Digital vector - matrix multiplication on the basis of a photon echo, *Laser Physics*, 1996, Vol. 6, No. 4, pp. 793-802.
6. Antonov V.A., Larkin A.I., Grosmann M.H., Kartavenko V.I., Trukhanov K.A. Holographic data processing methods for medical prognosis, *Laser Physics*, 2015, Vol. 25, No. 10, p. 105601.
7. Duda R.O., Hart P.E. *Pattern Classification and Scene Analysis*. New York, Wiley-Interscience, 1973.
8. *EnLight256 8000 Giga MAC/sec fixed point DSP*. Herzelia Pituach, Lenslet, 2003 Available at: [http://www.lenslet.com/docs/EnLight256\\_White\\_Paper.pdf](http://www.lenslet.com/docs/EnLight256_White_Paper.pdf)

# МЕТОД БЕСКОНТАКТНОЙ ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ СОСТОЯНИЯ ФИБРОЗНОЙ ОБОЛОЧКИ ГЛАЗА

С.Ю. Петров<sup>1</sup>, И.А. Бубнова<sup>1</sup>, И.А. Новиков<sup>1</sup>, Н.А. Пахомова<sup>1</sup>, А.В. Волжанин<sup>1</sup>,  
В.А. Семчишен<sup>2</sup>, Е.В. Хайдуков<sup>2</sup>, А.П. Свиридов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт глазных болезней, Москва, Россия

<sup>2</sup>Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и Фотоника»  
Российской академии наук, Москва, Россия

## Резюме

Бесконтактная оптическая диагностика структурных нарушений глаза обладает рядом преимуществ: высокая скорость, точность и большой спектр параметров, доступных для анализа. В работе представлены результаты исследований фотолюминесценции фиброзной оболочки глаза, возбуждаемой поляризованным светом, в зависимости от внутриглазного давления. В эксперименте применяли деэпителизированные глаза кролика с искусственно повышенным офтальмотонусом до 50 мм рт.ст. При этом склеру и роговицу освещали линейно поляризованным светом на длинах волн 250, 350 и 450 нм, возбуждая фотолюминесценцию в диапазоне длин волн до 700 нм. Были получены ко- и кросс-поляризованные спектры фотолюминесценции, возбуждаемые линейно поляризованным светом. При возбуждении поляризованным светом фотолюминесценция роговицы оказалась частично поляризованной. В зависимости от длины волны фотолюминесценции степень поляризации изменяется от 0,2 до 0,35. Показано, что степень поляризации фотолюминесценции роговицы глаза при возбуждении линейно поляризованным светом можно рассматривать в качестве измеряемого параметра для оценки состояния внутриглазного давления. Показано, что спектр фотолюминесценции состоит из двух полос с максимумами вблизи 460–470 и 430–440 нм. Эти полосы отнесены, соответственно, к пиридиннуклеотидам и гликозилированному коллагену. Существенный вклад оказывает эпителий глаза, в котором содержится рибофлавин с полосами поглощения вблизи длин волн 450 и 365 нм. При возбуждении на длине волны 450 нм максимум фотолюминесценции расположен вблизи 540 нм, что соответствует спектру флуорофоров в эндотелии и эпителии. Спектр фотолюминесценции при возбуждении на длине волны 250 нм можно приписать триптофану, находящемуся в хрусталике глаза.

**Ключевые слова:** глаукома, роговица, склера, фиброзная оболочка глаза, фотолюминесценция, поляризация.

**Для цитирования:** Петров С.Ю., Бубнова И.А., Новиков И.А., Пахомова Н.А., Волжанин А.В., Семчишен В.А., Хайдуков Е.В., Свиридов А.П. Метод бесконтактной фотолюминесцентной диагностики состояния фиброзной оболочки глаза // Biomedical Photonics. – 2018. – Т. 7, № 1. – С. 32–36.

**Контакты:** Петров С.Ю., e-mail: glaucomatosis@gmail.com

## METHOD OF NON-CONTACT PHOTOLUMINESCENT DIAGNOSTICS OF THE EYE FIBROUS TUNIC CONDITION

Petrov S.Yu.<sup>1</sup>, Bubnova I.A.<sup>1</sup>, Novikov I.A.<sup>1</sup>, Pakhomova N.A.<sup>1</sup>, Volzhanin A.V.<sup>1</sup>,  
Semchishen V.A.<sup>2</sup>, Khaydukov E.V.<sup>2</sup>, Sviridov A.P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Experience Scientific-Research Institute of Eye Diseases of the Russian Academy  
of Medical Sciences, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Shubnikov Crystallography Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

## Abstract

Non-contact optical diagnostics of structural disorders of the eye has a number of advantages: high speed, accuracy and a large range of parameters available for analysis. The paper presents the results of studies of the photoluminescence of the fibrous tunic of the eye, excited by polarized light, depending on the intraocular pressure. In the experiments, isolated de-epithelized eyes of the rabbit were used, inside of which pressure up to 50 mm Hg was artificially created. Under these conditions, the cornea and sclera were illuminated with linearly polarized light at wavelengths of 250, 350 and 450 nm, exciting photoluminescence in the wavelength range up to 700 nm. Cross and co-polarized photoluminescence spectra excited by linearly polarized light were obtained. It has been established that, when excited by polarized light, the photoluminescence of the cornea is partially polarized. Depending on the wavelength of the photoluminescence, the degree of polarization varies from 0.2 to 0.35. It is shown that the degree of polarization of the photoluminescence of the cornea of the eye upon excitation by linearly polarized light can be used as a measurable parameter for assessing the physiological state of the eye. It is shown that the photoluminescence spectrum consists of two bands with maxima near 460–470

and 430-440 nm. These bands are assigned, respectively, to pyridinnucleotides and glycosylated collagen. A significant contribution can be made by the epithelium of the eye, which contains riboflavin with characteristic absorption bands near 450 and 365 nm. When excited at 450 nm, the photoluminescence maximum is located near 540 nm, which corresponds to the spectrum of fluorophores in the endothelium and epithelium. The spectrum of photoluminescence upon excitation at a wavelength of 250 nm can be attributed to tryptophan located in the intraocular lens.

**Keywords:** glaucoma, cornea, sclera, fibrous envelope of the eye, photoluminescence, polarization.

**Key words:** laser photonics, holography, correlation, coherence, optical computing, photonic processor.

**For citations:** Petrov S.Yu., Bubnova I.A., Novikov I.A., Petrov S.Yu., Pakhomova N.A., Volzhanin A.V., Semchishen V.A., Khaydukov E.V., Sviridov A.P. Method of non-contact photoluminescent diagnostics of the eye fibrous tunic condition, *Biomedical Photonics*, 2018, T. 7, No. 1, pp. 32–36 (in Russian).

**Contacts:** Petrov S.Yu., e-mail: glaucomatosis@gmail.com

## Введение

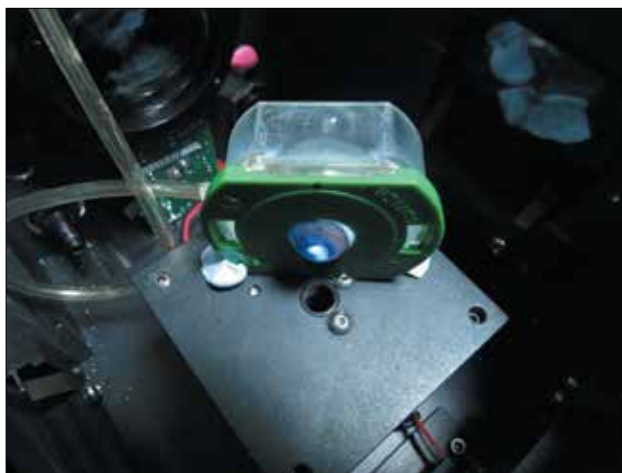
Механические и оптические свойства склеры и роговицы глаза определяются специфической организацией волокон коллагена, эластина и протеогликанов, что позволяет выполнять им свои биологические функции. Исследования взаимосвязей механических напряжений в склере и роговице глаза с их оптическими характеристиками вызывают значительный фундаментальный и практический интерес офтальмологов [1-3] поскольку они открывают новые перспективы для бесконтактной оптической диагностики состояния глаза [4,5]. Например, состояние поляризации фотолюминесценции, возбуждаемой в локальных областях тканей глаза поляризованным светом, можно экспериментально измерить в зависимости от внутриглазного давления. Тогда обратная функция может стать основой для контроля внутриглазного давления. Так, роговица глаза обладает свойством фотоупругости – изменением параметров, характеризующих двулучепреломление при механической нагрузке [6-8]. Поскольку роговицу глаза можно отнести к линейно упругим материалам, то механические напряжения в ней и вызванные ими деформации однозначно связаны с оптическими эффектами [9]. В последнее время активно развиваются методики визуализации внутренней микроструктуры коллагенсодержащих тканей, в частности, тканей глаза, измеряя интенсивности излучения второй гармоники, генерируемой пучками коллагеновых волокон биотканей [10,11]. В работе [12] показано, что фотолюминесценция роговицы глаза, возбуждаемая поляризованным излучением, является частично поляризованной, при этом степень поляризации зависит от механических напряжений. В представленной работе проведены исследования спектров возбуждения и спектров фотолюминесценции роговицы и склеры глаза поляризованным излучением, направленные на выявление возможностей контроля внутриглазного давления оптическими методами.

## Материалы и методы

Эксперименты проводили на глазных яблоках кролика *ex vivo*, в пределах 10 ч после энуклеации. Транспортировку глаз осуществляли в холодильной сумке

при температуре не выше 4°C. В ряде экспериментов эпителий глаза снимали. Эту процедуру выполняли либо механически специально разработанным для этих целей разметчиком, либо с помощью 20%-го раствора этанола. Измерения проводили при комнатной температуре 18-20°C. Глазное яблоко крепили в специальном держателе на эластичной мембране и прикрывали жестким фланцем с круглым отверстием. При этом область роговицы выступала наружу через отверстие. С помощью ручного воздушного компрессора осуществляли наддув до заданного давления, которое и определяло внутриглазное давление. В наших экспериментах оно достигало 50 мм рт.ст.

Для регистрации спектров фотолюминесценции и спектров возбуждения фотолюминесценции глаз использовали спектрофотометр Flurolog-3 (Jobin-Yvon, Франция). Возбуждение фотолюминесценции осуществляли светом ксеноновой разрядной лампы, из которого с помощью монохроматора выделяли узкий участок спектра. Измерения спектров фотолюминесценции проводили при постоянном внутриглазном давлении. На рис. 1 представлена фотография держателя с глазом кролика в измерительном отсеке спектрофотометра.



**Рис. 1.** Держатель с глазом кролика в измерительном отсеке спектрофотометра

**Fig. 1.** A holder with a rabbit eye in the measurement compartment of a spectrofluorometer

На пути возбуждающего света от монохроматора до образца и на пути люминесцентного света от образца к приемнику устанавливали поляризационные фильтры, с параллельной или ортогональной взаимной ориентацией оптических осей. Таким образом получали ко- и кросс-поляризационные спектры фотолюминесценции. В качестве поляризационных фильтров в канале возбуждения использовали призму Глана-Тейлора. Дискриминация света в диапазоне длин волн 450-700 нм при взаимно ортогональной конфигурации поляризаторов была не хуже  $10^2$ .

## Результаты

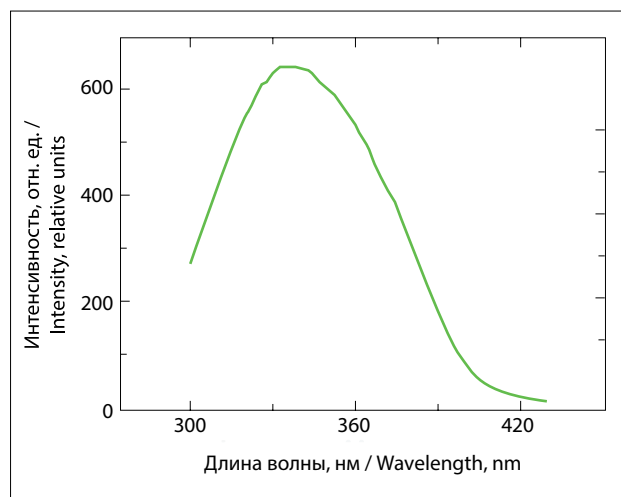
### Спектр фотовозбуждения

На рис. 2 приведен спектр возбуждения фотолюминесценции роговицы глаза кролика *in vitro* при регистрации излучения на длине волны 455 нм. Он имеет колоколообразную форму с максимумом сигнала в области 330-360 нм. Важно с точки зрения дистанционной диагностики, что интенсивность фотолюминесценции при длинах волн возбуждающего света более 380 нм (видимый диапазон) остается достаточно высокой для измерений обычными фотоприемниками.

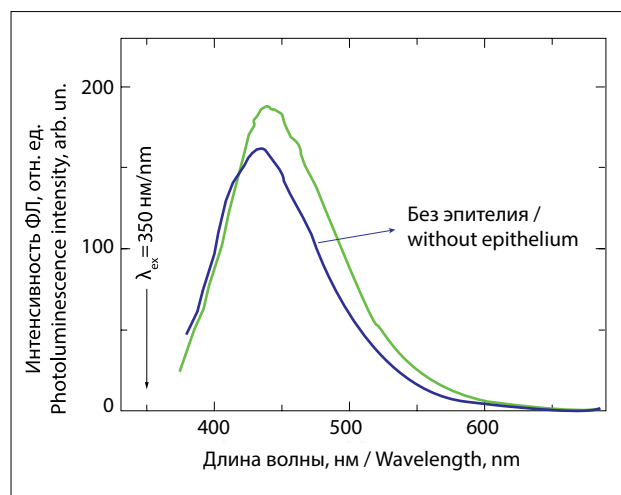
### Спектры фотолюминесценции

На рис. 3 представлены спектры фотолюминесценции роговицы глаза кролика *in vitro* с эпителием и без эпителия при возбуждении на длине волны 350 нм. Полученные спектры могут быть представлены в виде суммы двух полос гауссового профиля с максимумами в областях 430-440 и 470-480 нм (на рисунке не показаны). Видно, что довольно значителен вклад эпителия в сигнал фотолюминесценции.

Для клинического применения необходимо также учитывать возможные фотохимические повреждения клеток и биотканей, вероятность которых существенно возрастает при возбуждении фотолюминесценции светом УФ области спектра. Поэтому спектры фотолюминесценции роговицы глаза при возбуждении в УФ области представляют в основном академический интерес. С точки зрения практических приложений наибольший интерес привлекают исследования возможности возбуждения фотолюминесценции роговицы глаза фиолетовым и синим светом видимой области спектра, причем желательно сдвигаться дальше в длинноволновую область спектра. Наши исследования показали, что при возбуждении роговицы глаза даже слабым голубым светом ксеноновой лампы с длиной волны 450 нм ее фотолюминесценция может быть отчетливо измерена. При этом, как видно из рис. 4а, спектр ее фотолюминесценции простирается примерно до 700 нм. На рис. 4б представлен спектр фотолю-



**Рис. 2.** Спектр возбуждения фотолюминесценции роговицы глаза кролика *in vitro* при регистрации на длине волны 455 нм  
**Fig. 2.** Excitation spectrum of a rabbit eye cornea photoluminescence *in vitro*, registered at 455-nm wavelength

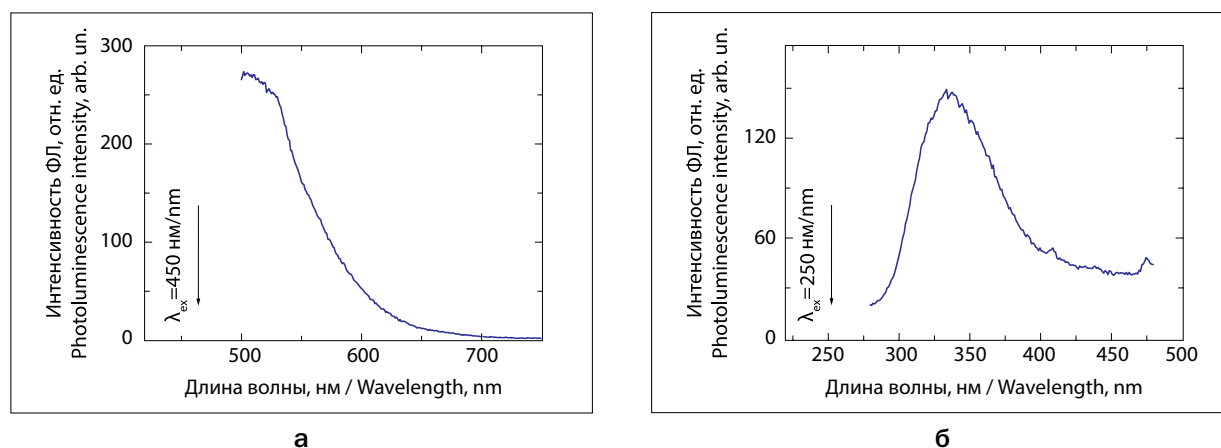


**Рис. 3.** Спектры фотолюминесценции роговицы глаза кролика *in vitro* при возбуждении на длине волны 350 нм с эпителием (зеленая кривая) и без эпителия (синяя кривая)  
**Fig. 3.** Photoluminescence spectra of a rabbit eye cornea *in vitro* with epithelium (green curve) and without epithelium (blue curve) excited at 350 nm wavelength

минесценции роговицы глаза при возбуждении на длине волны 250 нм. Все представленные спектры фотолюминесценции отстроены от возбуждающего света в сторону больших длин волн на 20-50 нм. Это связано с фильтрацией возбуждающего излучения, чтобы исключить его влияние на результаты спектральных измерений.

### Поляризационные измерения

Поляризационные спектры фотолюминесценции роговицы глаза *in vitro* измеряли при возбуждении линейно поляризованным светом с длиной волны 450 нм. Для этого на пути света от образца к приемнику спектрометра устанавливали поляризационный



**Рис. 4.** Спектры фотолюминесценции роговицы глаза при возбуждении на длинах волн:  
а – 450 нм;  
б – 250 нм

**Fig. 4.** Photoluminescence spectra of cornea excited at wavelengths:  
а – 450 nm;  
б – 250 nm

фильтр, оптическая ось которого была направлена перпендикулярно или параллельно вектору поляризации возбуждающего света. Полученные ко- и кросс-поляризационные спектры позволили построить спектры доли линейно поляризованного света в фотолюминесценции от длины волны как разность ко- и кросс поляризационных сигналов деленная на их сумму. Результаты измерений и соответствующих вычислений представлены на рис. 5. Из этого рисунка видно, что интенсивность фотолюминесценции роговицы глаза зависит от взаимной ориентации оптических осей поляризатора и анализатора. При изменении длины волны фотолюминесценции от 500 до 700 нм степень поляризации изменяется от ~0,2 до ~0,35. Уровень ошибок при измерении степени поляризации также спектрально зависим. Ошибки

измерений значительно растут с увеличением длины волны, что, очевидно, связано с ослаблением сигнала люминесценции.

## Обсуждение

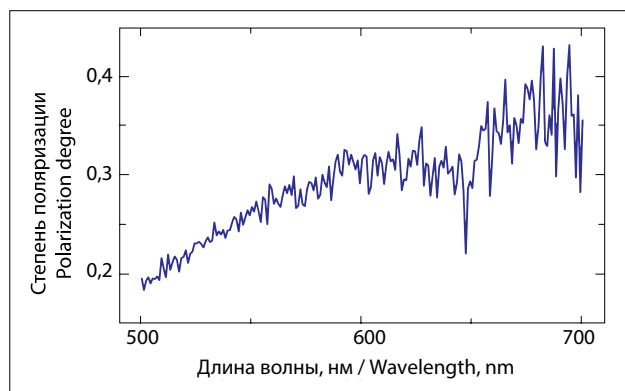
Максимум спектра фотолюминесценции роговицы глаза при возбуждении на длине волны 450 нм находится вблизи 540 нм, что соответствует спектрам флуоресценции флуорофоров, локализованных в эпителии и эндотелии, среди которых основными являются флавопротеины, такие как флавин, аденин динуклеотид, и др. Отличия спектров фотолюминесценции роговицы глаза с эпителием и без эпителия, представленные на рис. 3, скорее всего, связаны с вкладом фотолюминесценции рибофлавина, с двумя характерными максимумами поглощения на длинах волн 450 и 365 нм [13].

Спектр фотолюминесценции глаза, полученный при возбуждении на длине волны 250 нм, может быть приписан триптофану, который содержится во внутриглазной линзе [13].

Спектр фотолюминесценции, полученный при возбуждении на длине волны 350 нм, имеет максимум вблизи 440-455 нм. Он может быть представлен в виде комбинации фотолюминесценции пиридиннуклеотидов с максимумом вблизи 460-470 нм и фотолюминесценции гликозилированного коллагена с максимумом вблизи 430-440 нм [13].

## Заключение

В представленной работе исследованы кросс- и ко-поляризованные спектры фотолюминесценции фиброзных тканей глазного яблока, возбуждаемые линейно поляризованным светом. Получены новые



**Рис. 5.** Спектр степени поляризации люминесценции глаза кролика *in vitro*, полученный при возбуждении на длине волны 450 нм линейно поляризованным светом

**Fig. 5.** Polarization degree spectra of rabbit eye cornea photoluminescence *in vitro*, excited by linearly polarized light ( $\lambda=450$  nm)

данные о спектрах фотолюминесценции и спектрах возбуждения тканей глаза, необходимые для неинвазивной диагностики структурных нарушений тканей глаза и механических напряжений. Показано, что фотолюминесценция тканей глаза при возбуждении линейно поляризованным светом является частично поля-

ризованной. При возбуждении на длине волны 450 нм степень поляризации фотолюминесценции спектрально зависима и изменяется в пределах 20-30%.

*Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант 15-29-03843).*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аветисов С.Э., Мамиконян В.Р., Завалишин Н.Н., Ненюков А.К. Экспериментальное исследование механических характеристик роговицы и прилегающих участков склеры // Офтальмологический журнал. – 1988. – № 4. – С. 233-237.
2. Аветисов С.Э., Мамиконян В.Р., Казарян Э.Э., Шмелева-Демир О.А. и др. Результаты клинической оценки нового скринингового метода определения индивидуальной нормы внутриглазного давления // Вестник офтальмологии. – 2010. – Т. 126, № 2. – С. 5-7.
3. Аветисов С.Э., Полунин Г.С., Шеремет Н.Л., Муранов К.О. и др. Поиск шапероноподобных антикатарактальных препаратов - антиагрегантов кристаллинов хрусталика глаза. Сообщение 3. Возможности динамического наблюдения за процессами катарактогенеза на "продолжительной" модели УФ-индуцированной катаракты у крыс // Вестник офтальмологии. – 2008. – Т. 124, № 2. – С. 3-7.
4. Арутюнян Л.Л., Еричев В.П., Филиппова О.М., Акопян А.И. Вязкоэластические свойства роговицы при первичной открытоугольной глаукоме // Глаукома. – 2007. – № 1. – С. 62-65.
5. Владимиров Ю.А. Фотохимия и люминесценция белков. – Москва: Наука, 1965. – 232 с.
6. Еремина М.В., Еричев В.П., Якубова Л.В. Влияние центральной толщины роговицы на уровень внутриглазного давления в норме и при глаукоме // Глаукома. 2006. – № 4. – С. 78-83.
7. Семчишен А.В., Семчишен В.А. Измерения фотоупругости роговицы глаза. Астигматизм и аномалии внутренних напряжений роговицы // Альманах клинической медицины. – 2008. – Т. 17, № 2. – С. 128-132.
8. Avetisov S.E., Bubnova I.A., Novikov I.A., Antonov A.A., et al. Experimental study on the mechanical strain of corneal collagen // Journal of biomechanics. – 2013. – Vol. 46, No. 10. – P. 1648-1654.
9. Duan L., Yamanari M., Yasuno Y. Automated phase retardation oriented segmentation of chorio-scleral interface by polarization sensitive optical coherence tomography // Optics express. – 2012. – Vol. 20, No. 3. – P. 3353-3366.
10. Nagase S., Yamanari M., Tanaka R., Yasui T., et al. Anisotropic alteration of scleral birefringence to uniaxial mechanical strain // PloS one. – 2013. – Vol. 8, No. 3. – e58716.
11. Roth S., Freund I. Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon // Biopolymers. – 1981. – Vol. 20, No. 6. – P. 1271-1290.
12. Tan H.Y., Teng S.W., Lo W., Lin W.C., et al. Characterizing the thermally induced structural changes to intact porcine eye, part 1: second harmonic generation imaging of cornea stroma // Journal of biomedical optics. – 2005. – Vol. 10, No. 5. – 054019.
13. Yamanari M., Nagase S., Fukuda S., Ishii K., et al. Scleral birefringence as measured by polarization-sensitive optical coherence tomography and ocular biometric parameters of human eyes in vivo // Biomedical optics express. – 2014. – Vol. 5, No. 5. – P. 1391-1402.

## REFERENCES

1. Avetisov S.E., Mamikonyan V.R., Zavalishin N.N., Nenyukov A.K. Experimental study of the mechanical characteristics of the cornea and adjoining areas of the sclera, *Oftal'mologicheskii zhurnal*, 1988, No. 4, pp. 233-237. (in Russian)
2. Avetisov S.E., Mamikonyan V.R., Kazaryan E.E., Shmeleva-Demir O.A., Galoyan N.S., Mazurova Yu.V., Tatevosyan A.A., Ryzhkova E.G. Results of clinical evaluation of a new screening method for determining the individual normal level of intraocular pressure, *Vestnik oftal'mologii*, 2010, Vol. 126, No. 2, pp. 5-7. (in Russian)
3. Avetisov S.E., Polunin G.S., Sheremet N.L., Muranov K.O., Makarov I.A., Fedorov A.A., Karpova O.E., Ostrovskii M.A. Search for chaperon-like anticataract agents, the antiaggregants of lens crystallins. Communication 3. Possibilities of a follow-up of cataractogenesis processes on a prolonged rat model of JV-induced cataract, *Vestnik oftal'mologii*, 2008, Vol. 124, No. 2, pp. 3-7. (in Russian)
4. Arutyunyan L.L., Eriчев V.P., Filippova O.M., Akopyan A.I. Viscoelastic properties of the cornea in primary open-angle glaucoma, *Glaukoma*, 2007, No. 1, pp. 62-65. (in Russian)
5. Vladimirov Yu.A. *Fotokhimiya i lyuminestsentsiya belkov* [Photochemistry and luminescence of proteins]. Moscow, Nauka Publ., 1965. 232 p.
6. Eremina M.V., Eriчев V.P., Yakubova L.V. The effect of central corneal thickness on intraocular pressure level in normal population and patients with glaucoma, *Glaukoma*, 2006, No. 4, pp. 78-83. (in Russian)
7. Semchishen A.V., Semchishen V.A. Eye cornea photoelasticity measurement. Astigmatism and internal mechanical stress distribution, *Al'manakh klinicheskoi meditsiny*, 2008, Vol. 17, No. 2, pp. 128-132. (in Russian)
8. Avetisov S.E., Bubnova I.A., Novikov I.A., Antonov A.A., Siplivyi V.I. Experimental study on the mechanical strain of corneal collagen, *Journal of biomechanics*, 2013, Vol. 46, No. 10, pp. 1648-1654.
9. Duan L., Yamanari M., Yasuno Y. Automated phase retardation oriented segmentation of chorio-scleral interface by polarization sensitive optical coherence tomography, *Optics express*, 2012, Vol. 20, No. 3, pp. 3353-3366.
10. Nagase S., Yamanari M., Tanaka R., Yasui T., Miura M., Iwasaki T., Goto H., Yasuno Y. Anisotropic alteration of scleral birefringence to uniaxial mechanical strain, *PloS one*, 2013, Vol. 8, No. 3, e58716.
11. Roth S., Freund I. Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon, *Biopolymers*, 1981, Vol. 20, No. 6, pp. 1271-1290.
12. Tan H.Y., Teng S.W., Lo W., Lin W.C., Lin S.J., Jee S.H., Dong C.Y. Characterizing the thermally induced structural changes to intact porcine eye, part 1: second harmonic generation imaging of cornea stroma, *Journal of biomedical optics*, 2005, Vol. 10, No. 5, 054019.
13. Yamanari M., Nagase S., Fukuda S., Ishii K., Tanaka R., Yasui T., Oshika T., Miura M., Yasuno Y. Scleral birefringence as measured by polarization-sensitive optical coherence tomography and ocular biometric parameters of human eyes in vivo, *Biomedical optics express*, 2014, Vol. 5, No. 5, pp. 1391-1402.

# ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ЛЕЙКОПЛАКИИ ГОЛОВКИ ПОЛОВОГО ЧЛЕНА (КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ)

Д.А. Церковский, Т.П. Артемьева

Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, Лесной, Республика Беларусь

## Резюме

В публикации авторы представили клинический случай успешного применения фотодинамической терапии с фотолоном – фотосенсибилизатором хлоринового ряда, у пациента с лейкоплакией головки полового члена. Фотолон вводили в дозе 2 мг/кг за 2,5 ч до проведения облучения (световая доза 50 Дж/см<sup>2</sup>). Проведенное лечение включало 3 курса фотодинамической терапии с интервалом в 1 мес. В результате проведенного лечения получена полная регрессия патологических очагов и длительная клиническая ремиссия (более 6 мес).

**Ключевые слова:** лейкоплакия, половой член, фотодинамическая терапия.

**Для цитирования:** Церковский Д.А., Артемьева Т.П. Фотодинамическая терапия лейкоплакии головки полового члена (клиническое наблюдение) // Biomedical Photonics. – 2018. – Т. 7, № 1. – С. 37–40.

**Контакты:** Церковский Д.А., e-mail: tzerkovsky@mail.ru

## PHOTODYNAMIC THERAPY FOR PENILE LEUKOPLAKIA (CASE REPORT)

Tzerkovsky D.A., Artemyeva T.P.

N.N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, Lesnoy, Republic of Belarus

## Abstract

In the publication, the authors present a clinical case of successful application of photodynamic therapy with photolon – a chlorin series photosensitizer, in a young patient with leukoplakia of the glans penis. Photolon was administered in a dose of 2 mg/kg 2.5 hours before photodynamic therapy (light dose 50 J/cm<sup>2</sup>). The treatment included 3 sessions of photoirradiation with 1 month interval. The authors note complete regression of pathological foci and long-term clinical remission (more than 6 months).

**Key words:** leukoplakia, penis, photodynamic therapy.

**For citations:** Tzerkovsky D.A. Artemyeva T.P. Photodynamic therapy for penile leukoplakia (case report), *Biomedical Photonics*, 2018, T. 7, No. 1, pp. 37–40 (in Russian).

**Contacts:** Tzerkovsky D.A., e-mail: tzerkovsky@mail.ru

## Введение

Лейкоплакия представляет собой хронический дистрофический процесс слизистой оболочки, выражающийся пролиферацией и повышенным ороговением многослойного плоского эпителия и дальнейшим склерозированием тканей. Заболевание может локализоваться на любых слизистых оболочках, но чаще всего обнаруживается в полости рта, возле заднего прохода, на наружных половых органах и в дыхательных путях. Лейкоплакия полового члена

является достаточно редкой патологией, чаще всего встречаясь в возрастной группе мужчин 30 и более лет. Основными причинами развития данного заболевания являются химические, механические и химические факторы, воздействие которых приводит к возникновению хронического повреждения слизистой оболочки. Ведущими факторами, комплексное влияние которых приводит к появлению патологических очагов, являются механическое,

систематическое повреждение головки тесным бельем, длительно существующий фимоз, нарушение гормонального баланса; заболевания эндокринной системы (сахарный диабет), возрастные и физиологические изменения слизистой («старческие» атрофии), воспалительные процессы мочеполовой системы мужчины, гиповитаминоз А, наследственная предрасположенность.

Основным клиническим проявлением лейкоплакии данной локализации является появление на головке полового члена или крайней плоти одной или нескольких бляшек белесоватого цвета с гладкой поверхностью (рис. 1).

Начинается развитие лейкоплакии с участка воспаления. На данном этапе каких-либо клинических проявлений не отмечается, и мужчины часто не замечают изменений в организме. В месте воспаления начинает происходить чрезмерное ороговение с появлением мутных пленочек, которое не сопровождается субъективной симптоматикой. В дальнейшем ороговение продолжает прогрессировать, поэтому на месте пленки образуется бляшка, выступающая над слизистой оболочкой. Форма новообразования бугристая и при дальнейшем развитии патологии оно трескается и изъязвляется. В ряде случаев, возможно нарушение или задержка мочеиспускания (при вовлечении в процесс ладьевидной ямки мочеиспускательного канала) [1, 2].

Основными клиническими формами лейкоплакии полового члена являются:

- плоская;
- бородавчатая (веррукозная);
- эрозивно-язвенная.

Плоская форма является начальным проявлением заболевания и характеризуется возникновением патологических очагов белесоватого или сероватого цвета, не снимающихся при механическом воздействии на них. В дальнейшем при прогрессировании клинической симптоматики и отсутствии адекватного лечения появляются безболезненные бляшки белого



**Рис. 1.** Клиническая картина лейкоплакии полового члена  
**Fig. 1.** Clinical picture of penile leukoplakia

цвета, возвышающиеся над поверхностью слизистой оболочки (веррукозная форма). Третьей и наиболее серьезной с точки зрения прогноза заболевания является эрозивно-язвенная форма, характеризующаяся появлением в зоне патологическим очагов кровоточащих трещин и язвочек, в ряде случаев, болезненных при пальпации. Следующим этапом в развитии лейкоплакии является малигнизация. Основными клиническими признаками злокачественной трансформации лейкоплакии полового члена являются: изменение консистенции патологического очага (уплотнение), появление и быстрое прогрессирование эрозий и язв, неравномерность контуров патологического очага.

Диагностика лейкоплакии полового члена достаточно проста и основывается на данных клинического осмотра и выполнении гистологического исследования подозрительных на малигнизацию патологических очагов. Дифференциальную диагностику проводят с эритроплазией Кейра, кандидозом, первичным/вторичным сифилисом и инвазивным плоскоклеточным раком [1].

Все клинические формы лейкоплакии полового члена представляют собой очаги избыточной пролиферации эпителия и являются облигатным предраком. Терапевтический подход в лечении начальных форм заболевания включает в себя, в первую очередь, устранение влияния этиологических факторов, вызывающих его развитие. Наиболее эффективным является радикальный подход, направленный на удаление патологических очагов. К неинвазивным методам принято относить диатермокоагуляцию, электроэксцизию, криодеструкцию, лазерную терапию и радиоволновое воздействие; к инвазивным – хирургическое удаление с циркумцизией [2]. При подтверждении злокачественной трансформации патологических очагов показано выполнение радикальных операций и последующим проведением курса лучевой терапии.

Следует отметить тот факт, что все перечисленные методы лечения данной патологии направлены на механическое удаление очагов лейкоплакии без воздействия на механизмы ее развития, что может послужить причиной недостаточной эффективности лечения. В связи с этим, необходимым является поиск новых методов лечения. Альтернативным методом лечения является фотодинамическая терапия (ФДТ) – метод, основанный на использовании лекарственного средства – фотосенсибилизатора (ФС), цитотоксичность которого проявляется при воздействии лазерного излучения с определенной длиной волны.

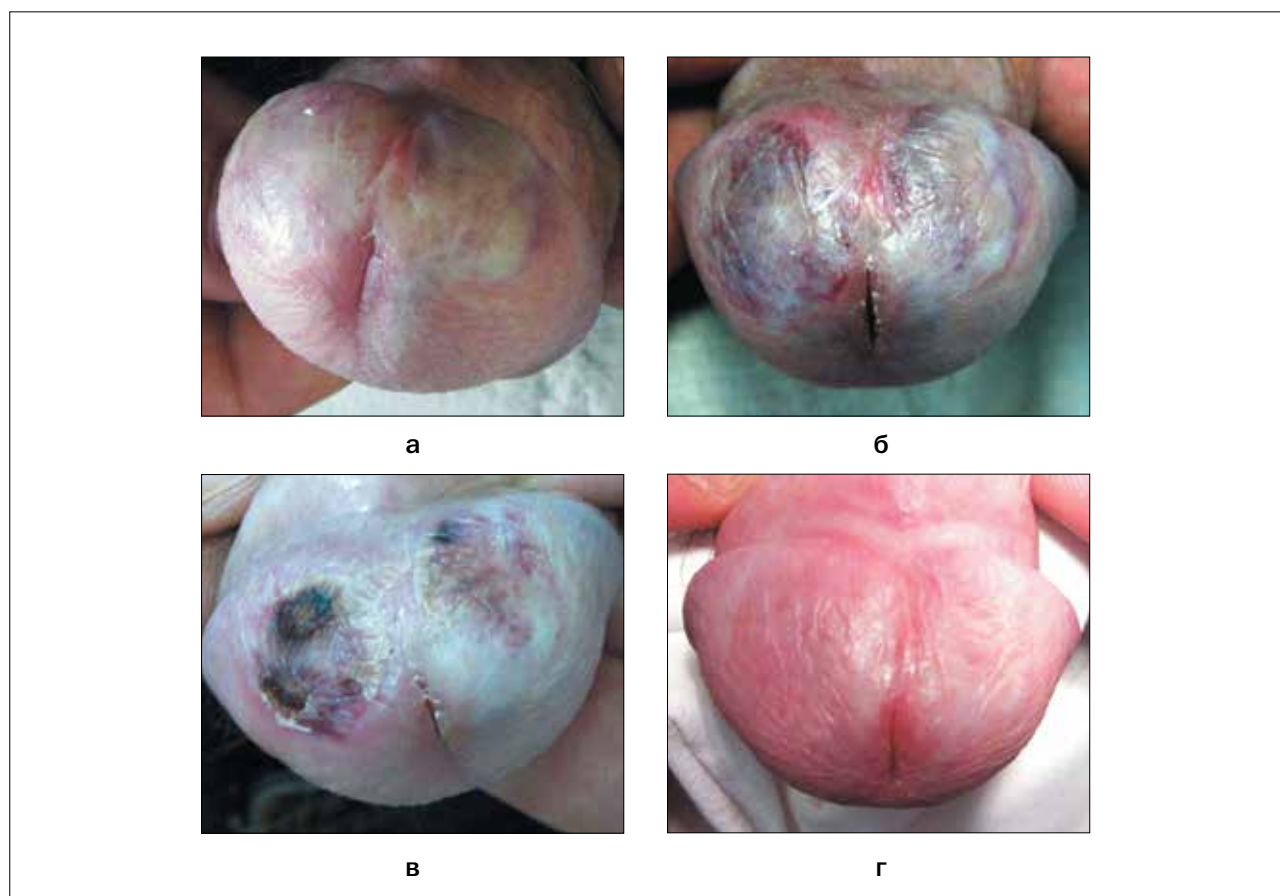
Основную роль в развитии запрограммированной гибели клетки при ФДТ играют процессы фотоинициированного окисления. Фотохимические реакции включают прямое взаимодействие возбужденной ла-

зерным излучением молекулы ФС с субстратом и образование переходных радикалов, которые вступают в реакцию с кислородом. Сложный каскад взаимодействий инициирует образование свободных радикалов, таких как синглетный кислород ( $^1O_2$ ), гидроксил-радикал ( $OH\cdot$ ), супероксид-анион ( $O_2^{\cdot-}$ ) и пероксид водорода ( $H_2O_2$ ), вызывающих развитие окислительного стресс-синдрома. Основопологающим моментом при развитии апоптоза является нарушение целостности мембран митохондрий, которое приводит к быстрому высвобождению митохондриального цитохрома С в цитозоль с последующей активацией апоптосома и прокаспазы-3 [3-5]. Вместе с тем, фотодинамическое повреждение эндотелиоцитов капилляров, питающих опухолевую ткань, приводит к развитию сосудистого стаза, тромбоза и выраженной гипоксии клеток, результатом чего является ишемический некроз. Таким образом, результатом облучения пред-

варительно сенсibilизированной ткани является апоптоз, аутофагия и ишемический некроз зоны облученных патологических тканей [6].

Целью данной публикации является представление клинического случая применения ФДТ в лечении пациента с лейкоплакией головки полового члена.

Пациент 3., 1985 года рождения, был направлен на консультацию в отделение гипертермии и фотодинамической терапии Республиканского научно-практического центра онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова с предварительным диагнозом: доброкачественное заболевание головки полового члена. По данным анамнеза пациент считал себя больным в течение 6 мес, с тех пор, как начал отмечать жалобы на появление белесоватого патологического очага на головке полового члена, не поддающегося механическому снятию. На момент



**Рис. 2.** Лейкоплакия головки полового члена:

- а – состояние до ФДТ;
- б – состояние через 24 ч после ФДТ;
- в – состояние 7 сут после ФДТ;
- г – полная регрессия через 1 мес после ФДТ

**Fig. 2.** Leukoplakia of the glans penis:

- а – status localis before PDT;
- б – status localis 24 hour after PDT;
- в – status localis 7 days after PDT;
- г – complete regression 1 month after PDT

осмотра пациент предъявлял жалобы на наличие патологического очага и умеренно-выраженный зуд и жжение. Объективно на коже головки полового члена определялся патологический очаг белесоватого цвета, неправильной формы с вовлечением в процесс наружного отверстия мочеиспускательного канала, безболезненный при пальпации. Выполнена биопсия новообразования. На основании данных гистологического исследования был установлен диагноз: лейкоплакия головки полового члена. Пациенту было рекомендовано проведение лечения методом ФДТ.

Пациент был проинформирован о методе ФДТ, сроках наблюдения и возможных нежелательных реакциях, и подписал информированное согласие. В условиях затемненного помещения пациенту внутривенно капельно был введен раствор фотолона (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь, регистрационное удостоверение П N015948/01 от 30.11.2012) в дозе 2 мг/кг. Через 2,5 ч после инфузии было произведено облучение патологических очагов (световая доза лазерного излучения 50 Дж/см<sup>2</sup>, плотность мощности 0,11 Вт/см<sup>2</sup>). В качестве источника лазерного излучения применяли полупроводниковый лазер «УПЛ ФДТ» («БелОМО», Республика Беларусь,  $\lambda=660\pm5$  нм). Нормальные ткани полового члена были экранированы с целью профилактики возникновения нежелательных фототоксических реакций. Облучение

сопровождалось развитием умеренно выраженного болевого синдрома в виде чувства жжения и покалывания. С целью его купирования были применены ненаркотические анальгетики (кеторолак, в/м, 4,0 мл).

С целью профилактики рецидивов заболевания через 1 и 2 мес после первого курса были выполнены еще 2 курса ФДТ с фотолоном в дозе 2 мг/кг (световая доза лазерного излучения 50 Дж/см<sup>2</sup>, плотность мощности 0,08 Вт/см<sup>2</sup>).

Реакцию на проведение ФДТ оценивали во время сеанса облучения, непосредственно после его окончания и через 7 сут. Кроме этого через 3 и 6 мес после третьего курса ФДТ оценивали результат лечения. Сразу после первого сеанса ФДТ отмечено появление признаков фотохимического геморрагического некроза: цвет элемента изменился на темно-бурый. Окончательное формирование некротического струпа с четкой границей и правильной формой в зоне облучения произошло через 7 сут после лечения (рис. 2).

По данным контрольного клинического наблюдения через 3 и 6 мес после завершения лечения признаков заболевания не выявлено.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что метод ФДТ можно рассматривать как хорошо переносимую и эффективную опцию в лечении лейкоплакии полового члена, позволяющую эффективно воздействовать на патологический очаг.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Урология: учеб. для студентов учреждений высш. проф. образования, обучающихся по специальности 060101.65 «Лечебное дело» по дисциплине «Урология» / под ред. Д.Ю. Пушкаря. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 384 с.
2. Руководство по онкологии. В 2 т. Т. II. В 2 кн. кн. 2 / под ред. О.Г. Суконко. – Минск, Беларусь: Энцикл. им. П. Бровки, 2016. – 440 с.
3. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., et al. Photodynamic Therapy // J. Nat. Cancer Ins. – 1998. – Vol. 90, No. 12. – P. 889-905.
4. Mroz P., Yaroslavsky A., Kharkwal G.B., Hamblin M.R. Cell death pathways in photodynamic therapy of tumors // Cancers. – 2011. – Vol. 3(2). – P. 2516-2539.
5. Rapozzi V., Jori G. Resistance to photodynamic therapy in cancer. – Switzerland: Springer, 2015. – 251 p.
6. Abder-Kader M.H. Photodynamic therapy. From theory to application. – Verlag, Berlin, Heidelberg: Springer, 2014. – 317 p.

## REFERENCES

1. Urologiya: ucheb.dlya studentov uchrezhdenii vyssh. prof. Obrazovaniya, obuchayushchikhsya po spetsial'nosti 060101.65 «Lechebnoe delo» po distsipline «Urologiya» [ Urology: a textbook for students of institutions of higher professional education studying in the specialty 060101.65 "Medicine" on the discipline "Urology"] by eds Pushkar' D.Yu. Moscow, GEOTAR-MEDIA Publ., 2013. 384 p.
2. Rukovodstvo po onkologii. V 2 t. T. II. V 2 kn. kn. 2 [Guide to Oncology in 2 volumes. Vol. II, In 2 books. Book 2] by eds Sukonko O.G. Minsk, Belarus', Enciklopediya im. P. Brovki Publ., 2016. 440 p.
3. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Peng Q. Photodynamic Therapy, J. Nat. Cancer Ins., 1998, Vol. 90, No. 12, pp. 889-905.
4. Mroz P., Yaroslavsky A., Kharkwal G.B., Hamblin M.R. Cell death pathways in photodynamic therapy of tumors, Cancers, 2011, Vol. 3(2), pp. 2516-2539.
5. Rapozzi V., Jori G. Resistance to photodynamic therapy in cancer. Switzerland, Springer, 2015. 251 p.
6. Abder-Kader M.H. Photodynamic therapy. From theory to application. Verlag, Berlin, Heidelberg, Springer, 2014. 317 p.