

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.
Выпускающий редактор Мачинская Е.А.
Переводчики Урлова А.Н.
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)

Мионов 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 автоматизации
и управления Нанси (Нанси, Франция)

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

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

BIOMEDICAL PHOTONICS

FOUNDERS:

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

EDITOR-IN-CHIEF:

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

DEPUTY CHIEF EDITOR:

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

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

EDITORIAL BOARD:

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

Kaprin A.D., 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)

Bolotina 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.

Managing editor Machinskaya E.A.

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

Фотодинамическая терапия при лейкоплакии вульвы
Т.П. Артемьева, Д.А. Церковский 4

Цитологические эффекты в лимфатических узлах зоны абдоминальной лимфодиссекции после интраоперационной фотодинамической терапии при злокачественных новообразованиях желудочно-кишечного тракта
В.Ю. Кравцов, Е.С. Пироженко, К.В. Павелец, М.А. Протченков, У.А. Дрозд 11

Изучение фармакокинетики фотосенсибилизатора на основе липосомальной формы тетра-3-фенилтиопталоцианина гидроксиалюминия у мышей
А.П. Будько, З.Г. Дейчман, Г.А. Меерович, Л.М. Борисова, И.Г. Меерович, А.В. Ланцова, Н.Ю. Кульбачевская 16

Кластерный анализ результатов интраоперационной оптической спектроскопической диагностики в нейрохирургии глиальных опухолей головного мозга
И.А. Осьмаков, Т.А. Савельева, В.Б. Лощенов, С.А. Горайнов, А.А. Потапов 23

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

Комбинированное эндоскопическое лечение больного раком гортаноглотки с распространением на верхнюю треть пищевода
В.М. Легостаев, О.Ю. Бабенков, Г.В. Балицкий 35

ЮБИЛЕИ

Профессору Виктору Борисовичу Лощенову – 65 лет 41

Профессору Евгению Антоновичу Лукьянцу – 80 лет 42

ORIGINAL ARTICLES

Photodynamic therapy for vulvar leukoplakia
Artemyeva T.P., Tzerkovsky D.A. 4

Cytological effects in lymph nodes of abdominal lymphodissection zone after intraoperative photodynamic therapy of gastrointestinal cancers
Kravtsov V.Yu., Pirozhenko E.S., Pavelec K.V., Protchenkov M.A., Drozd U.A. 11

Study of pharmacokinetics of liposomal photosensitizer based on hydroxyaluminium tetra-3-phenylthiophthalocyanine on mice
Budko A.P., Deichman Z.G., Meerovich G.A., Borisova L.M., Meerovich I.G., Lantsova A.V., Kulbachevskaya N.Yu. 16

Cluster analysis of the results of intraoperative optical spectroscopic diagnostics in brain glioma neurosurgery
Osmakov I.A., Savelieva T.A., Loschenov V.B., Goryajnov S.A., Potapov A.A. 23

CASE REPORTS

Combined endoscopic treatment of a patient with cancer of the hypopharynx to the upper third of the esophagus with complete clinical and endoscopic effect
Legostaev V.M., Babenkov O.Y., Balitskiy G.V. 35

ANNIVERSARIES

Professor Victor Borisovich Loschenov turned 65 years old 41

Professor Evgeny Antonovich Lukyanets turned 80 years old 42

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ПРИ ЛЕЙКОПЛАКИИ ВУЛЬВЫ

Т.П. Артемьева, Д.А. Церковский

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

Резюме

Целью данной работы была оценка переносимости и эффективности фотодинамической терапии как органосохраняющего метода лечения у пациенток с лейкоплакией вульвы. В исследование было включено 50 пациенток с верифицированным диагнозом лейкоплакия вульвы. Возраст женщин варьировал от 27 до 74 лет. Метод лечения предполагал использование фотосенсибилизатора фотолон (РУП «Белмедпрепараты», Беларусь), который вводили внутривенно в дозах 1,8-2,5 мг/кг. Облучение патологических очагов осуществляли через 2,5-3 ч после внутривенного введения фотолон с помощью полупроводникового лазера «УПЛ ФДТ» («ЛЕМТ», Беларусь, $\lambda=661$ нм) в дозах от 30 до 100 Дж/см² с плотностью мощности излучения 100-170 мВт/см². Лечение осуществляли под медикаментозным обезболиванием. Результаты лечения оценивали по клиническим данным. Нежелательных реакций после введения фотосенсибилизатора и дальнейшего облучения зарегистрировано не было. Полная клиническая регрессия пролеченных патологических очагов отмечена в 100% случаев при контрольном наблюдении через 1 мес после проведенного лечения. При контрольном наблюдении через 3 мес у 4 пациенток выявлены локальные очаги продолженного роста опухоли, которые были успешно пролечены с помощью повторного курса фотодинамической терапии. Частота полных регрессий составила 92%, частичных – 8%. Полученные результаты позволяют судить о возможности применения фотодинамической терапии в лечении пациенток с лейкоплакией вульвы с сохранением целостности органа при получении удовлетворительного функционального и косметического результата.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, фотолон, лейкоплакия вульвы.

Для цитирования: Артемьева Т.П., Церковский Д.А. Фотодинамическая терапия при лейкоплакии вульвы // *Biomedical Photonics*. – 2018 – Т. 7, № 4. – С. 4–10. doi: 10.24931/2413-9432-2018-7-4-4-10.

Контакты: Церковский Д.А., tzerkovsky@mail.ru

PHOTODYNAMIC THERAPY FOR VULVAR LEUKOPLAKIA

Artemyeva T.P., Tzerkovsky D.A.

N.N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus, Minsk, Belarus

Abstract

The aim of study is to evaluate the tolerability and effectiveness of photodynamic therapy as an organ-preserving treatment in patients with vulvar leukoplakia. 50 patients with a verified diagnosis of «vulvar leukoplakia» were included in the study. The age varied from 27 to 74 years. The method of treatment assumed the use of the photosensitizer photolon (RUE «Belmedpreparaty», Belarus) administered intravenously in doses of 1.8–2.5 mg/kg. Photoirradiation of pathological foci was carried out 2.5–3 hours after intravenous injection of photolon[®] using a semiconductor laser «UPL PDT» (LEMT, Belarus, $\lambda=661$ nm) at exposure doses from 30 to 100 J/cm² with a power density of 100–170 mW/cm². The treatment was performed under medical anesthesia. The results of treatment were evaluated using clinical data. Adverse reactions and complications after the introduction of the photosensitizer and photoirradiation have not been observed. Complete clinical regression of the treated pathological foci was noted in 100% of cases with a follow-up observation 1 month after the treatment. At follow-up after 3 months, local recurrences of the disease were detected in 4 cases, which were successfully treated with repeated photodynamic therapy sessions. The percentage of complete regressions was 92%, partial – 8%. The obtained results allow judging on the possibility of using photodynamic therapy in the treatment of patients with vulvar leukoplakia, which allows to preserve the organ and obtain a satisfactory functional and cosmetic result.

Key words: photodynamic therapy, photosensitizer, photolon, vulvar leukoplakia.

For citations: Artemyeva T.P., Tzerkovsky D.A. Photodynamic therapy for vulvar leukoplakia, *Biomedical Photonics*, 2018, vol. 7, no. 4, pp. 4–10. (in Russ.) doi: 10.24931/2413-9432-2018-7-4-4-10.

Contacts: Tzerkovsky D.A., tzerkovsky@mail.ru

Введение

В последнее десятилетие отмечается увеличение числа пациенток с дистрофическими заболеваниями вульвы (ДЗВ), занимающих в структуре гинекологической патологии по различным данным от 1% до 10% [1]. К этим заболеваниям, объединенным единым термином «нейродистрофические заболевания», относят склеротический лишай (лихен, крауроз), плоскоклеточную гиперплазию (лейкоплакию) и вульварную интраэпителиальную неоплазию вульвы (VIN) [2]. Лейкоплакия вульвы (ЛВ) является основным проявлением плоскоклеточной гиперплазии – ДЗВ с поражением многослойного плоского неороговевающего эпителия. В эпидемиологической структуре доброкачественных поражений вульвы более 50% приходится на плоскоклеточную гиперплазию, 25% – на склеротический лишай и в 25% случаев имеет место их ассоциация [3]. Данная группа заболеваний также характеризуется высоким риском малигнизации: на фоне крауроза риск малигнизации составляет 9%, VIN – от 6% до 18%, при сочетании обоих процессов – 60% [4]. Таким образом, учитывая длительность и тяжесть течения, а также высокую вероятность малигнизации, поиск эффективных методов лечения данной патологии представляет собой актуальную проблему современной медицины [5].

Ведущим методом лечения пациенток с ДЗВ является хирургический. В большинстве случаев производится эксцизия патологических очагов, при значительной распространенности – вульвэктомия. Преимуществом данного метода лечения является возможность гистологической верификации в тканях удаленных патологических очагов и определения риска малигнизации, к недостаткам относят травматичность, риск развития послеоперационных осложнений и, в ряде случаев, неудовлетворительные косметические результаты. Кроме того, по данным литературы, частота локальных рецидивов после хирургических вмешательств на вульве составляет от 30% до 46% [7].

Ведущими нехирургическими подходами в лечении ДЗВ являются лазерная CO_2 -коагуляция и вапоризация патологических участков вульвы с интенсивностью излучения более 1000 Вт/см². В отличие от хирургического метода лечения, данные лечебные воздействия обеспечивают хороший косметический результат, но, также как и хирургическое лечение, не влияют на этиопатогенетические механизмы возникновения заболеваний, что является причиной развития локальных рецидивов в ранние сроки после лечения. Частота возникновения локальных рецидивов после лазерной CO_2 -коагуляции и вапоризации колеблется от 15% до 48% [8, 9].

Актуальным направлением исследований является использование высокоинтенсивного сфокусиро-

ванного ультразвука, применение которого характеризуется хорошей переносимостью, высокой частотой гистологически подтвержденных полных регрессий (до 88,9%) и длительным периодом клинической ремиссии заболевания (до 6 мес) [10].

Определенными терапевтическими возможностями обладает иммуномодулятор imiquimod [11]. Частота локальных рецидивов при его применении превышает 40% [12]. Использование аппликационных форм 5-фторурацила в лечении ДЗВ характеризуется невысокой частотой полных регрессий (до 34%) и развитием нежелательных реакций (ожоги I-II степени, болезненные язвы) [13].

Основными причинами поиска новых методов лечения ДЗВ являются частое рецидивирование процесса, длительное и упорное течение заболевания, необоснованное и малоэффективное использование лекарственных средств, что приводит к развитию у пациенток различных психосоматических нарушений, оказывающих неблагоприятное воздействие на состояние организма в целом и ухудшение качества жизни женщины. Существующие консервативные методы, уменьшая основной симптом – зуд наружных половых органов, не обеспечивают полного устранения местных морфологических проявлений заболевания, не дают длительных ремиссий и требуют продолжительных сроков лечения. Кроме того, многолетняя консервативная терапия не предупреждает малигнизацию заболевания.

Одним из наиболее перспективных направлений в лечении ДЗВ является фотодинамическая терапия (ФДТ). Данный метод лечения основан на применении специального вещества – фотосенсибилизатора (ФС), цитотоксичность которого проявляется при воздействии лазерного излучения с определенной длиной волны. Результатом облучения предварительно сенсибилизированной ткани является апоптоз, аутофагия и ишемический некроз зоны облученных тканей [14].

Основными ФС, применяемыми для ФДТ ДЗВ, являются 5-аминолевулиновая кислота (5-АЛК), производные хлоринов и красители [15–17]. Основные исследования направлены на изучение эффективности ФДТ ДЗВ с локальным применением фотосенсибилизирующих агентов. Однако при местном применении ФС хлоринового ряда эффективность лечения низка по сравнению с традиционными методами (более чем в 30–40% случаев нет эффекта) [18].

Большинство опубликованных за рубежом клинических исследований, подтверждающих эффективность использования ФДТ, посвящено использованию в качестве ФС аппликационных форм 5-АЛК.

По данным P. Hillemanns и соавт., ФДТ (плотность энергии лазерного облучения – 100 Дж/см², $\lambda=635$ нм) с местным применением 20%-ого раствора 5-АЛК у

25 пациенток с VIN I-III степеней позволило достигнуть высокой частоты полных регрессий (ПР): при VIN I степени и моно- и бифокальном поражении II-III степеней данный показатель соответствовал 100%, при мультифокальной форме заболевания – 27% [15]. М.К. Fehr сообщил о 66% клинических и 57% гистологически подтвержденных ПР при ФДТ (плотность энергии лазерного облучения – 80–125 Дж/см², $\lambda=635$ нм) у 22 пациенток с VIN II-III степеней с применением 10%-ой гелевой формы 5-АЛК [19]. А. Zawislak и соавт. представили опыт лечения 23 пациентов с VIN II-III степеней с применением ФДТ (плотность энергии лазерного облучения – 100 Дж/см², $\lambda=635$ нм) с 20%-ым раствором 5-АЛК. Авторы сообщили о 52% клинических и 38% гистологических ПР [20].

В странах СНГ накоплен значительный опыт применения ФДТ в лечении пациенток с ДЗВ с применением ФС хлоринового ряда (фотодитазин, фотолон, радахлорин). Так, О.Б. Отдельнова представила результаты лечения 6 пациенток с доброкачественными заболеваниями вульвы (склеротический лишай вульвы, плоскоклеточная гиперплазия вульвы). В качестве ФС авторы использовали фотодитазин (внутривенная инфузия в дозе 1 мг/кг + аппликация 1 мл 0,5%-ого геля-пенетратора). Облучение осуществляли с помощью полупроводникового лазера «Аткус-2» под местной анестезией 2%-ым раствором лидокаина с плотностью энергии лазерного облучения от 100 до 200 Дж/см². Оценку эффективности производили на основании данных объективного осмотра и наличия клинических симптомов заболевания (зуд). При наблюдении через 3 мес лечебный эффект сохранялся. У 3 из 4 пациенток со склеротическим лишаем отмечено исчезновение зуда, у всех пациенток с плоскоклеточной гиперплазией данные цитологического исследования соскоба и вульвоскопии свидетельствовали о полном излечении. Во всех случаях был зафиксирован хороший косметический результат. Вместе с тем, у всех пациенток были отмечена такая нежелательная реакция, как выраженный болевой синдром во время ФО, что ограничивало применение терапевтической дозы облучения к патологическим очагам [18].

Е.А. Чулкова сообщила о результатах лечения методом ФДТ с 20%-ой мазью 5-АЛК 90 пациенток с дистрофическими и предопухолевыми заболеваниями вульвы. Мощность излучения в среднем составляла 1,5 Вт в спектральном диапазоне 630±10 нм. Авторы отметили, что ФДТ с применением 20%-ой мази 5-АЛК показала себя как эффективный метод, минимально травмирующий нормальную ткань вульвы, что имеет большое значение для пациенток молодого и среднего возраста [21].

О.В. Макаров представил опыт лечения 97 пациенток с ДЗВ: у 75 (77,3%) верифицирован склеротический

лишай вульвы, у 18 – плоскоклеточная гиперплазия вульвы (18,6%), и у 4 – смешанная дистрофия (4,1%). ФДТ проводили с фотодитазин: ФС вводился внутривенно капельно в дозе 1 мг/кг (n=64) либо ФС применялся местно в виде 0,5%-ого геля-пенетратора (n=33). Облучение осуществляли в непрерывном или фракционном режиме с плотностью энергии лазерного облучения от 100–250 Дж/см² ($\lambda=630$ нм). Авторы отметили высокую частоту (90,6%) ПР при внутривенном введении ФС, и 78,8% – при местном. Количество рецидивов через один год после сеанса ФДТ в 1-й группе составило 9,1%, во 2-й группе – 22,6% [22].

А.З. Хашукоева проводила лечение методом ФДТ с фотодитазин (1 мг/кг) 50 пациенткам с ДЗВ (склеротический лишай, плоскоклеточная гиперплазия, смешанная дистрофия). Автор сообщает о 94% ПР (клиническая) при использовании плотности энергии лазерного облучения от 100 до 250 Дж/см² ($\lambda=662$ нм) [23].

Целью данной работы является оценка эффективности, безопасности и косметических результатов у пациенток с ДЗВ, пролеченными методом ФДТ с ФС фотолон.

Материалы и методы

В исследование включено 50 пациенток с морфологически верифицированным диагнозом лейкоплакии вульвы. Возраст пациенток варьировал от 27 до 74 лет.

Клинический диагноз был установлен на основании жалоб, данных анамнеза и осмотра пациенток, вульвоскопии и результатов морфологического (гистологического и/или цитологического) исследования патологически измененных тканей вульвы.

Критериями включения пациенток в исследование для проведения ФДТ были гистологическое и цитологическое подтверждение диагноза, отсутствие тяжелой сопутствующей патологии и наличие письменного согласия на лечение. Лечение осуществлялось в амбулаторных условиях.

В качестве ФС использовали фотолон (РУП «Белмедпрепараты», Беларусь), представляющий собой комплекс тринатриевой соли хлорина е₆ с поливинилпирролидоном. ФС растворяли в 200 мл физиологического раствора и вводили внутривенно капельно в дозах 1,8–2,5 мг/кг массы тела пациента в условиях затемненного помещения.

Сеанс ФДТ проводили через 2,5–3 ч после введения ФС с использованием полупроводникового лазера «УПЛ ФДТ» («Lemt», Беларусь, $\lambda=661$ нм). Подведение излучения осуществляли с помощью световода с микролинзой (ООО «Биоспек», Россия), обладающего гомогенным распределением энергии облучения по световому пятну.

Размер полей облучения варьировал от 1,5 до 2 см, число полей – от 1 до 4, плотность мощности – от 0,1 до 0,17 Вт/см², доза света – от 40 до 100 Дж/см². Дли-

тельность сеанса ФДТ варьировалась от 10 до 30 мин в зависимости от количества полей облучения. В зону облучения обязательно включали участок нормальной ткани, отступая от краев зоны поражения 3–5 мм.

Ввиду особой чувствительности обрабатываемой зоны, с целью купирования болевого синдрома за 15–20 мин до сеанса проводилась премедикация ненаркотическими анальгезирующими препаратами (кеторолак внутримышечно, 4 мл).

Реакция патологического очага на проведенное лечение оценивалась непосредственно после сеанса ФДТ, через 1, 7 и 30 сут.

Оценку переносимости проведенного лечения осуществляли на основании частоты и степени выраженности нежелательных реакций на основании анализа критериев СТСАЕ (версия 4.0).

Оценку противоопухолевой эффективности ФДТ с фотолоном осуществляли на основании данных визуального наблюдения за изменением площади пролеченных патологических очагов и информации о наличии или отсутствии клинических симптомов заболевания (для лейкоплакии – зуд в области вульвы) через 1 и 3 мес после проведенного лечения (критерии ВОЗ):

- полная регрессия (ПР) – отсутствие всех признаков заболевания после 100% резорбции патологических очагов через 1 мес после проведения ФДТ, подтвержденное через 3 мес после проведенного лечения;
- частичная регрессия (ЧР) – уменьшение суммарного размера патологических очагов на 50% и более с последующей стабилизацией, установленное через 1 мес и подтвержденное через 3 мес после проведения сеанса ФДТ;
- отсутствие эффекта – уменьшение суммарного размера патологических очагов менее чем на 50%, состояние без уменьшения или увеличения очага поражения.

Результаты и обсуждение

У всех пациенток, соблюдавших световой режим в течение 3–4 сут после проведенного лечения, нежелательных реакций, связанных с кожной фототоксичностью (поверхностные ожоги кожных покровов, гипо- и гиперпигментация, отек мягких тканей лица), отмечено не было.

Во время инфузии фотосенсибилизатора состояние пациенток было удовлетворительным, нежелательных реакций отмечено не было. Аллергических реакций, которые сопровождались выраженными нарушениями функции жизненно важных органов (падение артериального давления, бронхоспазм, генерализованная крапивница и др.) и потребовали бы прекращения инфузии, не зафиксировано.

Непосредственно после окончания сеанса ФДТ у всех пациенток определяли отек и гипертермия под-

вергнутых облучению зон с патологическими очагами. В течение 2–4 сут формировался фотохимический некротический струп коричневого или черного цвета, четко ограниченный от нормальных тканей. Полная эпителизация зоны облучения зафиксирована через 4–8 нед после ФДТ.

Сеансы ФДТ сопровождались развитием умеренно-выраженного болевого синдрома, который купировался медикаментозно (2%-ый кеторолак внутримышечно, 4 мл), либо снижением плотности мощности лазерного излучения при неизменной дозе света. У 15 пациенток (30% наблюдений) болевой синдром после проведенного лечения сохранялся в течение 3–7 сут (СТСАЕ, версия 4.0; I-II степень). У 5 пациенток (10% наблюдений) было отмечено незначительное повышение температуры тела (до +37,3–37,5°C).

Клинические признаки полной регрессии при контрольных наблюдениях через 1 мес были отмечены у всех пациенток с лейкоплакией вульвы. Частота ПР составила 100%. Проведение повторных курсов ФДТ было связано с обширной зоной распространения патологических очагов и невозможностью их одновременного облучения вследствие умеренно выраженного болевого синдрома.

В 4 случаях из 50 (8%) при контрольном наблюдении через 3 мес выявлены локальные очаги продолженного роста опухоли, успешно пролеченные с помощью повторного курса ФДТ. Частота ПР в данной временной точке после проведенного лечения составила 92%, частота ЧР – 8%.

В срок наблюдения 6 мес отмечена стойкая ремиссия клинических симптомов заболевания (зуд в области вульвы) в пролеченных патологических очагах, в том числе и после повторного применения ФДТ при достижении ЧР в 8% наблюдений.

В результате проведенного исследования определены показания к проведению ФДТ у пациенток с лейкоплакией вульвы, которыми являются:

1. морфологически верифицированный диагноз;
2. первичная и рецидивная форма заболевания;
3. резистентность к традиционным (консервативным) методам лечения;
4. отказ пациента от применения традиционных методов лечения;
5. множественный характер поражения.

Основными преимуществами ФДТ являются:

1. минимальная токсичность для нормальных тканей, расположенных в непосредственной близости от патологических очагов;
2. минимальный риск развития выраженного болевого синдрома и других нежелательных реакций;
3. отсутствие резистентности к проводимому лечению;

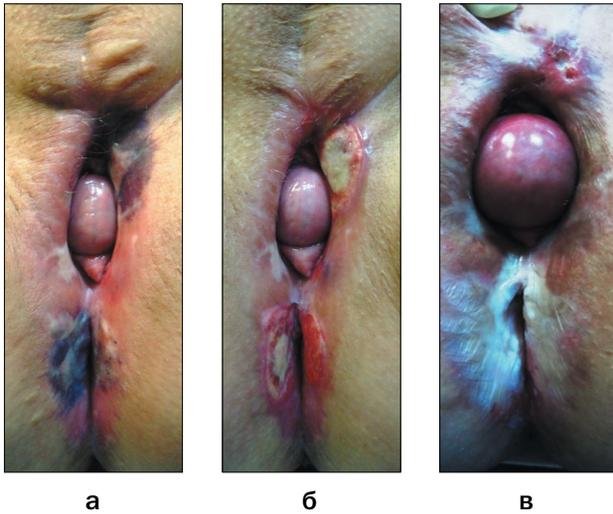


Рис. Лейкоплакия вульвы, состояние после ФДТ с фотолоном в дозе 2,5 мг/кг (плотность энергии лазерного облучения 50 Дж/см²):

- а – состояние через 24 ч после ФДТ;
б – полная регрессия через 1 мес после проведенного лечения;
в – полная регрессия через 3 мес после проведенного лечения

Fig. Vulvar leukoplakia. The state after PDT with photolon at a dose of 2.5 mg/kg and exposure dose of photoradiation of 50 J/cm²:

- а – 24 hours after PDT
б – complete regression 1 month after the treatment;
в – complete regression 3 months after the treatment.

4. возможность многократного повторения сеансов лечения;
5. возможность комбинации с традиционными методами лечения;
6. возможность применения при распространенном процессе;
7. хорошие косметические результаты;
8. возможность проведения органосохраняющего лечения;
9. относительная дешевизна и доступность лечения.

Полученные результаты использования метода ФДТ с фотолоном подтверждаются следующим клиническим примером.

Клинический пример

Пациентка Я. (№ амбулаторной карты 5747/06), 62 года. Наблюдается с жалобами на выраженный зуд в области вульвы с 2006 г. Поставлен диагноз лейкоплакия вульвы. В 2008–2010 гг. были выполнены хирургические вмешательства по причине основного заболевания. С 2011 г. отмечено прогрессирование в зоне

лечения. Консервативные методы лечения оказались неэффективны.

С целью консультации и лечения пациентка направлена в РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова. После проведенной консультации специалистов и гистологического исследования поставлен диагноз: лейкоплакия вульвы, рецидивирующая форма. Рекомендовано лечение с применением ФДТ. Проведенное лечение: пациентке 21.11.2012 г. провели в условиях стационара курс ФДТ с фотолоном, введенным внутривенно в дозе 2,5 мг/кг (200 мг). Облучение патологических очагов в области вульвы и перианальной области осуществляли с помощью полупроводникового лазера «УПЛ ФДТ» ($\lambda=661$ нм) через 3 ч после введения ФС в условиях затемненного помещения. Световодом с микролинзой облучали 3 поля диаметром по 2 см с плотностью энергии лазерного облучения 50 Дж/см² при плотности мощности 0,1 Вт/см² и мощности излучения 0,3 Вт в течение 9 мин на каждое поле. Реализацию эффекта в виде нарастающего некроза наблюдали к концу первой недели после лечения.

После выписки из стационара женщина проводила неспецифическую терапию зоны облучения. Завершение процессов эпителизации зафиксировали к 6 нед.

21.02.2013 г. (через 3 мес) при контрольном клиническом осмотре отмечено значительное улучшение в зоне лечения и полное отсутствие жалоб (рис. в).

Заключение

Продемонстрированные в настоящем исследовании результаты клинического использования метода ФДТ с фотолоном в лечении пациенток с фоновыми и предраковыми заболеваниями вульвы свидетельствуют о его высокой терапевтической эффективности, минимальном количестве нежелательных реакций и хороших косметических результатах. При контрольном наблюдении у всех пациенток зафиксирована полная регрессия патологических очагов. В 8% случаев через 3 мес после ФДТ выявлены локальные рецидивы заболевания, успешно пролеченные с помощью повторного курса

На основании всего вышесказанного, можно сделать вывод о том, что ФДТ удобна в применении, хорошо переносима, эффективна и может быть рекомендована в качестве терапии дистрофических заболеваний и для профилактики возникновения рака вульвы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Reyes M.C., Cooper K. An update on vulvar intraepithelial neoplasia: terminology and a practical approach to diagnosis // *J. Clin. Pathol.* – 2014. – Vol. 67, No. 4. – P. 290–294.
2. Hendriks J., Wilkinson E.J. Vulvar lichen sclerosus: immunohistologic // *J. Reprod. Med.* – 1994. – Vol. 38. – P. 37–40.
3. Judson P.L., Habermann E.B., Baxter N.N., et al. Trends in the incidence of invasive and in situ vulvar carcinoma // *Obstet. Gynecol.* – 2006. – Vol. 107, No. 5. – P. 1018–1022.
4. Козаченко В.П. Онкогинекология: руководство для врачей. – М.: Медицина, 2006. – 560 с.
5. Роговская С.И., Бебнева Т.Н. Лейкоплакия шейки матки, влагалища и вульвы. Современные аспекты // *Болезни влагалища и шейки матки.* – 2014. – № 1. – С. 51–55.
6. Gu Y., Zhu L., Li X., et al. Surgical treatment of usual type vulvar intraepithelial neoplasia: a study at three academic hospitals // *Chin. Med. J. (Engl.)*. – 2014. – Vol. 127, No. 4. – P. 784–786.
7. Mahner S., Wölber L. Surgery or topical therapy for vulvar intraepithelial neoplasia // *Lancet Oncol.* – 2014. – Vol. 15, No. 12. – P. 1287–1288.
8. Hillemanns P., Wang X., Staehle S., et al. Evaluation of different treatment modalities for vulvar intraepithelial neoplasia (VIN): CO₂ laser vaporization, photodynamic therapy, excision and vulvectomy // *Gynecol. Oncol.* – 2005. – Vol. 100, No. 2. – P. 271–275.
9. Kushnir C.L., Fleury A.C., Hill M.C., et al. The use of argon beam coagulation in treating vulvar intraepithelial neoplasia III: a retrospective review // *Gynecol. Oncol.* – 2013. – Vol. 131, No. 2. – P. 386–388.
10. Jia Y., Wu J., Xu M., et al. Clinical responses to focused ultrasound applied to women with vulvar intraepithelial neoplasia // *J. Ultrasound Med.* – 2014. – Vol. 33, No. 11. – P. 1903–1908.
11. Kim J.M., Lee H.J., Kim S.H., et al. Efficacy of 5% imiquimod cream on vulvar intraepithelial neoplasia in Korea: pilot study // *Ann. Dermatol.* – 2015. – Vol. 27, No. 1. – P. 66–70.
12. Westermann C., Fischer A., Clad A. Treatment of vulvar intraepithelial neoplasia with topical 5% imiquimod cream // *Int. J. Gynaecol. Obstet.* – 2013. – Vol. 120, No. 3. – P. 266–270.
13. Preti M., Van Seters M., Sideri M., Van Beurden M. Squamous vulvar intraepithelial neoplasia // *Clin. Obstet. Gynecol.* – 2005. – Vol. 48, No. 4. – P. 845–861.
14. 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.
15. Hillemanns P., Untch M., Dannecker C., et al. Photodynamic therapy of vulvar intraepithelial neoplasia using 5-aminolevulinic acid // *Int J Cancer.* – 2000. – Vol. 85(5). – P. 649–653.
16. Игнатова Т.П., Русакевич П.С., Рогов Ю.И. Клинико-морфологические аспекты при дистрофических заболеваниях вульвы в процессе фотодинамической терапии с метиленовым синим // *Онкол. журн.* – 2008. – Т. 2, № 2. – С. 105–125.
17. Русакевич П.С., Гришанович Р.В., Плавский В.Ю. Возможности применения фотодинамической терапии с местным применением фотосенсибилизаторов при нейродистрофических заболеваниях вульвы, цервикальной эктопии и метаплазии // *Онкол. Журн.* – 2010. – Т. 4, № 1(13). – С. 47–53.
18. Отдельнова О.Б., Хашукоева А.З., Ибрагимова М.И. Возможности фотодинамической терапии с использованием фотосенсибилизатора фотодитазин в лечении гинекологических заболеваний // *Рос. биотер. журн.* – 2008. – Т. 7, № 4. – С. 47–52.
19. Fehr M.K., Hornung R., Degen A., et al. Photodynamic therapy of vulvar and vaginal condyloma and intraepithelial neoplasia using topically applied 5-aminolevulinic acid // *Lasers Surg. Med.* – 2002. – Vol. 30, No. 4. – P. 273–279.
20. Zawislak A., Donnelly R.F., McCluggage W.G., et al. Clinical and immunohistochemical assessment of vulvar intraepithelial neoplasia following photodynamic therapy using a novel bioadhesive patch-type system loaded with 5-aminolevulinic

REFERENCES

1. Reyes M.C., Cooper K. An update on vulvar intraepithelial neoplasia: terminology and a practical approach to diagnosis, *J. Clin. Pathol.*, 2014, vol. 67, no. 4, pp. 290–294.
2. Hendriks J., Wilkinson E.J. Vulvar lichen sclerosus: immunohistologic, *J. Reprod. Med.*, 1994, vol. 38, pp. 37–40.
3. Judson P.L., Habermann E.B., Baxter N.N., Durham S.B., Virnig B.A. Trends in the incidence of invasive and in situ vulvar carcinoma, *Obstet. Gynecol.*, 2006, vol. 107, no. 5, pp. 1018–1022.
4. Kozachenko V.P. *Onkoginekologiya: rukovodstvo dlya vrachei* [Oncogynecology: a guide for doctors]. Moscow, Meditsina Publ., 2006, 560 p.
5. Rogovskaya S.I., Bebneva T.N. Leukoplakia of the cervix, vagina and vulva. Modern aspects, *Bolezni vlagalishcha i shejki matki*, 2014, no. 1, pp. 51–55. (in Russ.)
6. Gu Y., Zhu L., Li X., Jin H., Wang C. Surgical treatment of usual type vulvar intraepithelial neoplasia: a study at three academic hospitals, *Chin. Med. J. (Engl.)*, 2014, vol. 127, no. 4, pp. 784–786.
7. Mahner S., Wölber L. Surgery or topical therapy for vulvar intraepithelial neoplasia, *Lancet Oncol.*, 2014, vol. 15, no. 12, pp. 1287–1288.
8. Hillemanns P., Wang X., Staehle S., Michels W., Dannecker C. Evaluation of different treatment modalities for vulvar intraepithelial neoplasia (VIN): CO₂ laser vaporization, photodynamic therapy, excision and vulvectomy, *Gynecol. Oncol.*, 2005, vol. 100, no. 2, pp. 271–275.
9. Kushnir C.L., Fleury A.C., Hill M.C., Silver D.F., Spirtos N.M. The use of argon beam coagulation in treating vulvar intraepithelial neoplasia III: a retrospective review, *Gynecol. Oncol.*, 2013, vol. 131, no. 2, pp. 386–388.
10. Jia Y., Wu J., Xu M., Tang L., Li C. Clinical responses to focused ultrasound applied to women with vulvar intraepithelial neoplasia, *J. Ultrasound Med.*, 2014, vol. 33, no. 11, pp. 1903–1908.
11. Kim J.M., Lee H.J., Kim S.H., Kim H.S., Ko H.C. Efficacy of 5% imiquimod cream on vulvar intraepithelial neoplasia in Korea: pilot study, *Ann. Dermatol.*, 2015, vol. 27, no. 1, pp. 66–70.
12. Westermann C., Fischer A., Clad A. Treatment of vulvar intraepithelial neoplasia with topical 5% imiquimod cream, *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 2013, vol. 120, no. 3, pp. 266–270.
13. Preti M., Van Seters M., Sideri M., Van Beurden M. Squamous vulvar intraepithelial neoplasia, *Clin. Obstet. Gynecol.*, 2005, vol. 48, no. 4, pp. 845–861.
14. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D. Photodynamic Therapy, *J. Nat. Cancer Ins.*, 1998, vol. 90, no. 12, pp. 889–905.
15. Hillemanns P., Untch M., Dannecker C., Baumgartner R., Stepp H. Photodynamic therapy of vulvar intraepithelial neoplasia using 5-aminolevulinic acid, *Int J Cancer*, 2000, vol. 85(5), pp. 649–653.
16. Ignatova T.P., Rusakevich P.S., Rogov Yu.I. Clinical and morphological aspects of dystrophic diseases of the vulva in the process of photodynamic therapy with methylene blue, *Onkol. zhurn.*, 2008, vol. 2, no. 2, pp. 105–125. (in Russ.)
17. Rusakevich P.S., Grishanovich R.V., Plavskij V.Yu. Possibilities of using photodynamic therapy with local application of photosensitizers in neurodystrophic diseases of vulva, cervical ectopia and metaplasia, *Onkol. Zhurn.*, 2010, vol. 4, no. 1(13), pp. 47–53. (in Russ.)
18. Otdel'nova O.B., Hashukoeva A.Z., Ibragimova M.I. Possibilities of photodynamic therapy using fotoditazin photosensitizer in the treatment of gynecological diseases, *Ros. bioter. zhurn.*, 2008, vol. 7, no. 4, pp. 47–52. (in Russ.)
19. Fehr M.K., Hornung R., Degen A., Schwarz V.A., Fink D. Photodynamic therapy of vulvar and vaginal condyloma and intraepithelial neoplasia using topically applied 5-aminolevulinic acid, *Lasers Surg. Med.*, 2002, vol. 30, no. 4, pp. 273–279.
20. Zawislak A., Donnelly R.F., McCluggage W.G., Price J.H., McClelland H.R. Clinical and immunohistochemical assessment

- acid // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* – 2009. – Vol. 6, No. 1. – P. 28–40.
21. Чулкова Е.А., Макаров И.О., Соколов В.В. Современные аспекты флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии с 5-аминолевулиновой кислотой («Аласенс») при фоновых и предраковых заболеваниях вульвы // *Журнал акушерства и женских болезней*. – 2009. – Т. LVIII, Вып. 5. – С. 91–92.
 22. Макаров О.В., Хашукоева А.З., Купеева Е.С. и др. Лечение дистрофических заболеваний вульвы методом фотодинамической терапии // *Вестник РГМУ*. – 2014. – № 4. – С. 49–52.
 23. Хашукоева А.З., Купеева Е.С., Отдельнова О.Б. Фотодинамическая терапия в лечении дистрофических заболеваний вульвы // *Фотодинамическая терапия и фотодиагностика*. – 2012. – № 1. – С. 31.
- of vulval intraepithelial neoplasia following photodynamic therapy using a novel bioadhesive patch-type system loaded with 5-aminolevulinic acid, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2009, vol. 6, no. 1, pp. 28–40.
21. Chulkova E.A., Makarov I.O., Sokolov V.V. Modern aspects of fluorescent diagnostics and photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid (Alasens) for background and precancerous diseases of the vulva, *Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznei*, 2009, vol. LVIII, no. 5, pp. 91–92. (in Russ.)
 22. Makarov O.V., Khashukoeva A.Z., Kupeeve E.S., Khlynova S.A., Sukhova T.N. Treatment of dystrophic diseases of the vulva using photodynamic therapy, *Vestnik RGMU*, 2014, no. 4, pp. 49–52. (in Russ.)
 23. Khashukoeva A.Z., Kupeeve E.S., Otdelnova O.B. Photodynamic therapy in the treatment of dystrophic diseases of the vulva, *Fotodinamicheskaya terapiya i fotodiagnostika*, 2012, no. 1, pp. 31. (in Russ.)

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ В ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ ЗОНЫ АБДОМИНАЛЬНОЙ ЛИМФОДИСЕКЦИИ ПОСЛЕ ИНТРАОПЕРАЦИОННОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

В.Ю. Кравцов^{1,2}, Е.С. Пирожено¹, К.В. Павелец^{2,3,4}, М.А. Протченков^{2,4}, У.А. Дрозд³

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

²Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

⁴Городская Мариинская больница, Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Проведены цитологические исследования материала лимфатических узлов зоны абдоминальной лимфодиссекции после интраоперационной фотодинамической терапии (ИОФДТ) при злокачественных новообразованиях желудочно-кишечного тракта. Установлено, что в результате проведения ФДТ клетки метастатических опухолей разрушаются с исчезновением цитоплазматической мембраны и цитоплазмы, при этом остаются только интерфазные ядра («голые ядра») ($p < 0,0001$). Также представлено цитологическое подтверждение апоптоза (наличие апоптотических телец) в лимфатических узлах с метастазами после курсов ИОФДТ в лимфатических узлах зоны абдоминальной лимфодиссекции.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, цитопатология, интерфазные ядра, апоптоз, радахлорин, фотодитазин.

Для цитирования: Кравцов В.Ю., Пирожено Е.С., Павелец К.В., Протченков М.А., Дрозд У.А. Цитологические эффекты в лимфатических узлах зоны абдоминальной лимфодиссекции после интраоперационной фотодинамической терапии при злокачественных новообразованиях желудочно-кишечного тракта // Biomedical photonics. – 2018. – Т. 7, № 4. – С. 11–15. doi: 10.24931/2413-9432-2018-7-4-11-15.

Контакты: Кравцов В.Ю., e-mail: kvyspb@mail.ru

CYTOLOGICAL EFFECTS IN LYMPH NODES OF ABDOMINAL LYMPHODISSECTION ZONE AFTER INTRAOPERATIVE PHOTODYNAMIC THERAPY OF GASTROINTESTINAL CANCERS

Kravtsov V.Yu.^{1,2}, Pirozhenko E.S.¹, Pavelec K.V.^{2,3,4}, Protchenkov M.A.^{2,4}, Drozd U.A.³

¹Military Medical Academy of S.M. Kirov, Saint-Petersburg, Russia

²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

³Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, Saint-Petersburg, Russia

⁴Mariinsky hospital, St-Petersburg, Russia

Abstract

Cytological studies on lymph nodes of abdominal lymphodissection zone after local intraoperative photodynamic therapy (IOPDT) of gastrointestinal cancers were carried out. As a result of the PDT, the metastatic cells are destroyed, their cytoplasmic membranes and the cytoplasm disappears, leaving behind interphase nuclei ("naked nuclei") ($p < 0,0001$). Cytological confirmation of apoptosis (the presence of apoptotic bodies) in metastatic lymph nodes after IOPDT sessions on the lymph nodes of the abdominal lymphodissection zone is also presented.

Keywords: photodynamic therapy, cytopathology, interphase nucleus, apoptosis, radachlorin, fotoditazin.

For citations: Kravtsov V.Yu., Pirozhenko E.S., Pavelec K.V., Protchenkov M.A., Drozd U.A. Cytological effects in lymph nodes of abdominal lymphodissection zone after intraoperative photodynamic therapy of gastrointestinal cancers, *Biomedical photonics*, 2018, vol. 7, no. 4, pp. 11–15. (in Russ.) doi: 10.24931/2413–9432–2018–7–4–11–15.

Contacts: Kravtsov V.Yu., e-mail: kvyspb@mail.ru

Введение

В ранее опубликованной статье было описано исследование лимфатических узлов зоны абдоминальной лимфодиссекции, выполненной после интраоперационной фотодинамической терапии (ИОФДТ) с использованием фотосенсибилизатора (ФС) радахлорин или фотодитазин при злокачественных новообразованиях желудочно-кишечного тракта для выявления апоптоза. С помощью ДНК-электорофореза было доказано, что апоптоз после ФДТ индуцируется в лимфатических узлах, поражённых метастазами, и не возникает в интактных лимфатических узлах ($p < 0,01$). Данный факт указывает на избирательную способность ФДТ вызывать гибель злокачественных клеток [1].

В настоящем исследовании цитологические препараты, использовавшиеся на предыдущих этапах исследования для выявления метастазов, были снова проанализированы под иммерсией. Целью данного ретроспективного исследования стали поиски цитологических проявлений апоптотического (апоптотические тельца) и некротического (цитонекроз, фагоцитарная инфильтрация) процессов в популяциях метастатических клеток лимфатических узлов, индуцированных ФДТ.

Материалы и методы

Группы обследованных пациентов и их диагнозы, процедура проведения сеансов ФДТ и получение цитологических препаратов из лимфатических узлов были подробно изложены в тексте статьи, опубликованной ранее [1].

Цитологические исследования проводили на препаратах, полученных отпечатыванием на стеклах облученных и необлученных частей лимфатических узлов.

Препараты окрашивали азур-эозином по Романовскому и микроскопировали под иммерсией ($\times 1000$) в проходящем свете. Частоту встречаемости аномальных клеток (ядер) определяли путём подсчёта 500–1000 опухолевых клеток и выражали в процентах.

Статистическую обработку данных проводили непараметрическими методами (U-критерий Уилкоксона-Манна-Уитни) с использованием программного пакета Statistica 13.3.

Результаты

В предыдущей статье были приведены результаты изучения 40 лимфатических узлов, полученных по вышеуказанной методике, в 23 из них были выявлены метастатические клетки, в 17 – отсутствовали. Методом ДНК-электорофореза апоптоз (апоптотические тельца) был обнаружен в 17 из 23 лимфатических узлов, поражённых метастазами [1].

Теперь можно утверждать, что цитологические исследования в мазках-отпечатках, проведённые в этих же 17 лимфатических узлах, выявили апоптотические тельца (рис. 1).

В процессе микроскопирования под иммерсией был обнаружен резкий контраст в частоте встречаемости так называемых «голых ядер» (ГЯ) злокачественных метастатических клеток между облучёнными и необлучёнными половинами лимфатических узлов. Это явление отмечено как в случае плоскоклеточной, так и железистой структуре злокачественной опухоли. У ядер в обоих случаях наблюдался четкий ровный контур, характер окрашивания и структура хроматина соответствовали интактным клеткам с

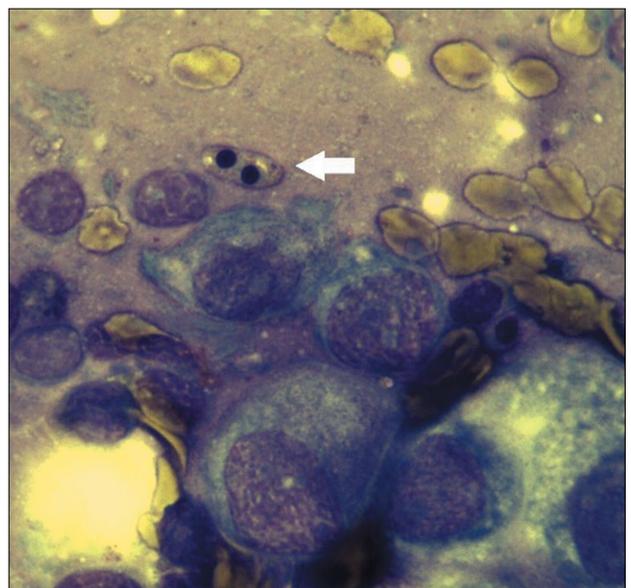


Рис. 1. Апоптотические тельца метастатических клеток аденокарциномы желудка в лимфатических узлах после проведения сеанса ФДТ
Fig. 1. Apoptotic bodies of metastatic cells in the lymph nodes of adenocarcinoma of stomach after PDT session

цитоплазмой и мембраной (рис. 2а). Наблюдаемые нами «голые ядра» имели как одиночное расположение (рис. 2б), так и были ассоциированы в виде виноградных гроздей, что, вероятно, соответствовало индукции «голых ядер» одновременно и сразу после облучения комплексов метастатических клеток (рис. 2).

Анализ частоты встречаемости ГЯ метастатических клеток в облученных и необлученных лимфатических узлах с метастазами у 15 пациентов с аденокарциномой и 19 пациентов с плоскоклеточным раком выполнены в программе STATISTICA и представлены на гистограммах (рис. 3,4).

Очевидно, что воздействие ИОФДТ значительно повышает количество «голых ядер» ($p < 0,0001$, U-критерий Уилкоксона-Манна-Уитни).

Таким образом, нами было получено цитологическое подтверждение апоптоза (наличие апоптотических телец) в лимфатических узлах с метастазами после ИОФДТ, который был выявлен нами ранее методом ДНК-электрофореза [1]. А также, с нашей точки зрения, это самое главное, в ходе данного исследования был обнаружен эффект «под лучом», проявлявшийся в виде индукции «голых ядер» метастатических клеток после завершения ФДТ.

Цитологические доказательства гибели опухолевых клеток путем апоптоза и некроза позволяют сделать вывод о способности ИОФДТ повышать абластичность операций и улучшать онкологические результаты резекционных вмешательств по поводу местнораспространенных злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта.

Обсуждение

Очевидно, что наблюдаемые ФДТ-индуцированные «голые ядра» могли возникнуть только в случаях,

когда клетки получили повреждения в цитоплазме (лизосомах, митохондриях, аппарате Гольджи и эндоплазматической сети) и цитоплазматической мембране, но никак не внутри и даже не на поверхности клеточного ядра. Интактность ядра при ФДТ была отмечена при исследовании субклеточной локализации фоскана в линии аденокарциномы человека MCF-7 М.Н. Teiten с соавт. [2]. Авторы с помощью конфокальной микроскопии и микроспектрофлуорометрии показали, что данный ФС незначительно накапливается в лизосомах и митохондриях и в основном локализуется в аппарате Гольджи и эндоплазматическом ретикулуме, не затрагивая при этом ядро. Согласно данным исследования А.Р. Castano и соавт., ФС локализуются в митохондриях, лизосомах, эндоплазматическом ретикулуме, аппарате Гольджи и в плазматической мембране [3]. С. Фаррахова с соавт. изучали локализацию хлорина e_6 и его диметилового эфира в клетках HT29 аденокарциномы человека и установили, что данные фотосенсибилизаторы в основном распределены в плазматической мембране и цитоплазме клеток и практически не накапливаются в области локализации клеточного ядра [4].

Вместе с тем, L.S. Fontana с соавт. получили неоднозначные результаты при исследовании внутриклеточной локализации ФС фотодитазин в клеточной линии глиобластомы 9L/LacZ. Флуоресцентная микроскопия показала диффузное накопление ФС во всей клетке, но нельзя было сказать точно аккумулируется ли ФС в ядре. Сам автор считает, что ложноположительный результат мог быть связан ассоциацией фотодитазина к ядерной мембране [5]. L.S. Fontana также столкнулся с феноменом индукции «голых ядер» и дал им описание, полностью совпадающее с описанием, изложенным нами ранее [6]. Первое же

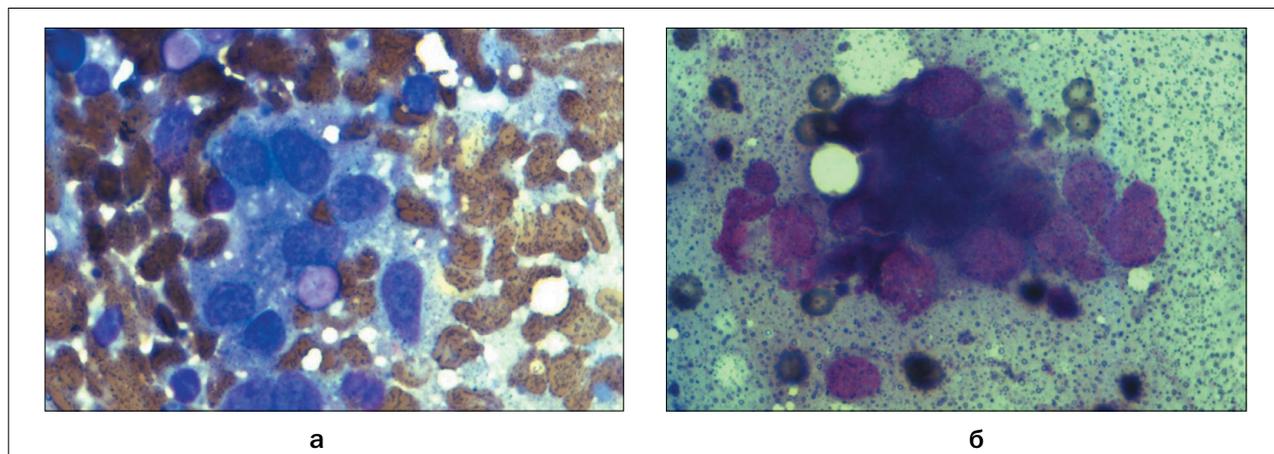


Рис. 2. Мазки-отпечатки метастатических клеток в лимфатическом узле 9А зоны абдоминальной лимфодиссекции до облучения (а) и после завершения (б) сеанса интраоперационной фотодинамической терапии, выполняемой аппаратом «Фара-2» в течении 20 мин (окрашивание азур-эозином по Романовскому, увеличение: $\times 1000$)

Fig. 2. Imprint smear of metastatic cells in the lymph node (9A) of the abdominal lymph node dissection zone before (a) and after (b) intraoperative PDT session carried out using «Fara-2» device for 20 minutes (staining with azur-eosin by Romanovsky, magnification: $\times 1000$).

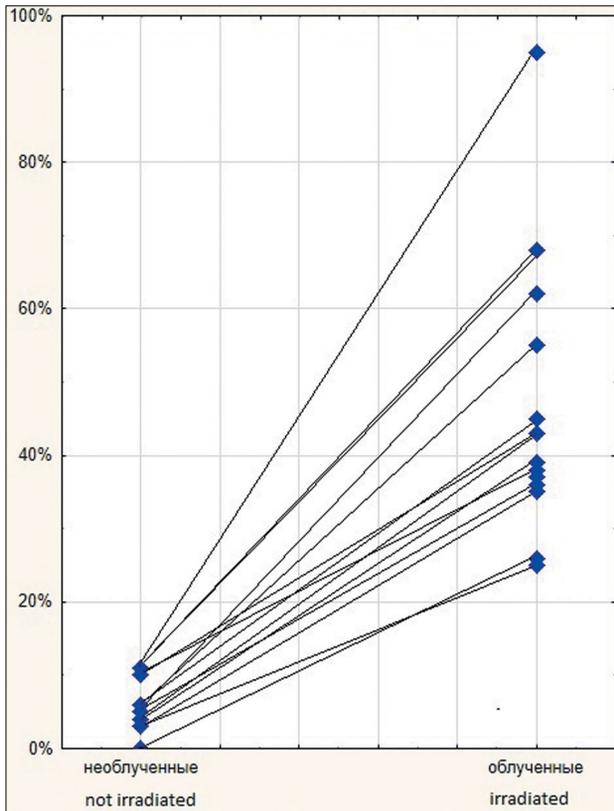


Рис. 3. Распределение половин лимфатических узлов по показателю «частота встречаемости "голых ядер"» при железистом раке

Fig. 3. Distribution of halves of lymph nodes according to the "frequency of occurrence of "naked nuclei" with glandular cancer

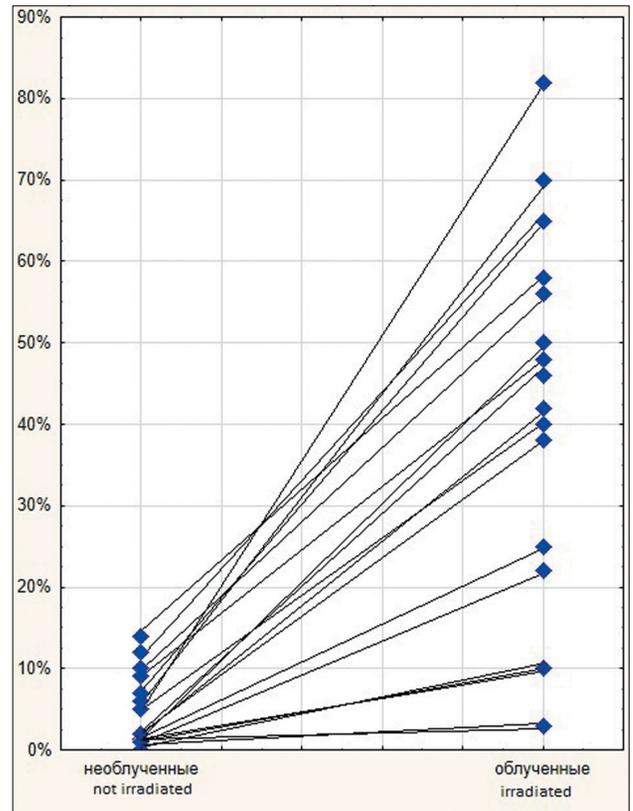


Рис. 4. Распределение половин лимфатических узлов по показателю «частота встречаемости "голых ядер"» при плоскоклеточном раке

Fig. 4. Distribution of halves of lymph nodes according to the "frequency of occurrence of "naked nuclei" with squamous cell carcinoma

сообщение об индукции ГЯ при ФДТ, которое нам удалось найти в поисковой системе PubMed приведено в китайском издании исследователем Y.T. Zhou и соавт. [7]. Следует отметить, что «голые ядра» L.S. Fontana и «голые ядра» Y.T. Zhou были индуцированы ФДТ в клеточных культурах *in vitro*.

Несмотря на то, что данные Fontana L.S. указывают на ассоциацию ФС с ядром, очевидно, что наличие радахлорина на поверхности ядра ещё недостаточно для его деструкции после фотоактивации.

Радиус поражения активированного ФС в субклеточном масштабе относительно мал [2, 3, 8, 9]. Высокая реакционная способность и короткий период полувыведения синглетного кислорода и гидроксильных радикалов напрямую влияют только на молекулы и структуры, которые находятся вблизи области ее производства (области локализации ФС). Период полувыведения синглетного кислорода в биологических системах составляет <40 нс, поэтому радиус действия синглетного кислорода составляет порядка 20 нм [2], в то время как толщина ядерной оболочки

(34–74 нм) в несколько раз превосходит возможный радиус поражения фотосенсибилизатора, поэтому ядро после ФДТ в целом сохраняет свою форму.

Заключение

ИОФДТ, проводимая у пациентов со злокачественными новообразованиями желудочно-кишечного тракта вызывает эффект «под лучом», проявляющийся в индукции «голых ядер» метастатических клеток абдоминальных лимфатических узлов зоны лимфодиссекции. В ходе проведенного исследования представлено цитологическое подтверждение апоптоза (наличие апоптотических телец) в лимфатических узлах с метастазами после сеансов ФДТ в лимфатических узлах зоны абдоминальной лимфодиссекции. Применение ИОФДТ в клинических условиях повышает абластичность операций и онкологическую результативность хирургического лечения местнораспространенных форм рака желудочно-кишечного тракта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Павелец К.В., Орёл В.И., Кравцов В.Ю. и др. Изучение апоптоза в лимфатических узлах зоны абдоминальной лимфодиссекции после интраоперационной фотодинамической терапии при злокачественных новообразованиях желудочно-кишечного тракта // *Biomedical Photonics*. – 2017. – Т. 6, № 3. – С. 39–44.
2. Teiten M.H., Bezdetnaya L., Morliere P., et al. Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan localisation in cultured tumour cells // *Br J Cancer*. – 2003. – Vol. 88. – P. 146–152.
3. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization // *Photodiagnosis Photodyn Ther*. – 2004. – Vol.1, No. 4. – P. 279–293.
4. Фаррахова Д.С., Яковец М.В., Лощенов В.Б. и др. Исследование распределения хлориновых фотосенсибилизаторов в двухмерных и трехмерных клеточных культурах // *Biomedical Photonics*. – 2017. – Т. 6, № 2. – С. 4–11.
5. Fontana L.C., Pinto J.G., Pereira A.H.C., et al. Photodithazine photodynamic effect on viability of 9L/lacZ gliosarcoma cell line // *Lasers Med Sci*. – 2017. – Vol. 32, No. 6. – P. 1245–1252.
6. Павелец К.В., Кравцов В.Ю., Протченков М.А. и др. Первый опыт применения интраоперационной флюоресцентной диагностики и фотодинамической терапии в абдоминальной онкологии // *Biomedical Photonics*. – 2015. – С. 1. – С. 69–70.
7. Zhou Y.K., Wu W.Z., Zhang L., et al. Effect of M007 mediated photodynamic therapy on proliferation of human osteosarcoma MG63 cells in vitro // *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. – 2012. – Vol. 43, No. 1. – P. 41–45.
8. Moan J., Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen // *Photochem Photobiol*. – 1991. – Vol. 53, No. 4. – P. 549–553.
9. Kessel D., Luol Y., Deng Y., Chang C.K. The Role of Subcellular Localization in Initiation of Apoptosis by Photodynamic Therapy // *Photochemistry and Photobiology*. – 1997. – Vol. 65, No. 3. – P. 422–426.

REFERENCES

1. Pavelec K.V., Orel V.I., Kravtsov V.Y., Protchencov M.A., Dysin A.V., Drozd U.A., Kuzmina T.I., Kostina U.D., Pavelec M.K., Rusanov D.S., Lacko E.F. Apoptosis in the lymph nodes of the abdominal lymphodissection zone after local intraoperative photodynamic therapy of gastrointestinal cancers, *Biomedical Photonics*, 2017, vol. 6, no. 3, pp. 39–44. (In Russian)
2. Teiten M.H., Bezdetnaya L., Morliere P., Santus R., Guillemin F. Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan localisation in cultured tumour cells, *Br J Cancer*, 2003, vol. 88, pp. 146–152.
3. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization, *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2004, vol.1, no. 4, pp. 279–293.
4. Farrahova D.S., Yakovets M.V., Loshchenov V.B., Bolotina L.N., Zorin V.P. Investigation of chlorin photosensitizers distribution in monolayer and spheroid cell cultures, *Biomedical Photonics*, 2017, vol. 6, no. 2, pp. 4–11. (In Russian)
5. Fontana L.C., Pinto J.G., Pereira A.H.C., Soares C.P., Raniero L.J., Ferreira-Strixino J. Photodithazine photodynamic effect on viability of 9L/lacZ gliosarcoma cell line, *Lasers Med Sci*, 2017, vol. 32, no. 6, pp. 1245–1252.
6. Pavelets K.V., Kravtsov V.Yu., Protchenkov M.A., Savinov I.P., Vitaleva U.A., Rusanov D.S., Fedorova P.S., Pavelets M.K., Kostina Yu.D. First experience of using intraoperative fluorescent diagnostics and photodynamic therapy in abdominal oncology, *Biomedical Photonics*, 2015, S. 1, pp. 69–70. (In Russian)
7. Zhou Y.K., Wu W.Z., Zhang L., Yang C.H., Wang Y.P. Effect of M007 mediated photodynamic therapy on proliferation of human osteosarcoma MG63 cells in vitro, *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2012, vol. 43, no. 1, pp. 41–45.
8. Moan J., Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen, *Photochem Photobiol*, 1991, vol. 53, no. 4, pp. 549–553.
9. Kessel D., Luol Y., Deng Y., Chang C.K. The Role of Subcellular Localization in Initiation of Apoptosis by Photodynamic Therapy, *Photochemistry and Photobiology*, 1997, vol. 65, no. 3, pp. 422–426

ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ТЕТРА-3-ФЕНИЛТИОФТАЛОЦИАНИНА ГИДРОКСИАЛЮМИНИЯ У МЫШЕЙ

А.П. Будько¹, З.Г. Дейчман¹, Г.А. Меерович^{2,3}, Л.М. Борисова¹, И.Г. Меерович⁴,
А.В. Ланцова¹, Н.Ю. Кульбачевская¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

²Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук, Москва, Россия

³Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ, Москва, Россия

⁴Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр

«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

Резюме

Настоящая работа посвящена исследованию фармакокинетики фотосенсибилизатора инфракрасного диапазона на основе тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия в стабилизированной липосомальной лекарственной форме. Исследования проводили на половозрелых мышцах-самках. Фотосенсибилизатор вводили мышам однократно внутривенно в дозе 6 мг/кг. Оценку динамики накопления фотосенсибилизатора в тканях и органах мышей проводили в интервалах времени от 5 мин до 7 сут с использованием спектрально-флуоресцентного метода. Максимальное накопление фотоактивной формы фотосенсибилизатора было зарегистрировано в легких (32 мкг/г в интервале 5–30 мин после введения), печени (20,8 мкг/г в интервале 4–24 ч после введения) и селезенке (28 мкг/г через 4 ч после введения). При этом в печени и селезенке к концу срока наблюдения (7 сут после введения) продолжали определяться следовые количества фотоактивной формы фотосенсибилизатора – расчетная концентрация составляла 0,5–1 мкг/г. Хуже всего фотосенсибилизатор накапливался в мышцах и коже. При этом в коже флуоресценция фотосенсибилизатора определялась практически сразу, и концентрация его оставалась на одном уровне (1,2–1,5 мкг/г) до 3 сут наблюдения. В мышцах концентрация фотосенсибилизатора достигала значения 1,5 мкг/г через 15 мин после введения, после чего постепенно снижалась и к 24 ч составила 0,25 мкг/г. Через 7 сут после введения, значения концентрации фотосенсибилизатора в коже и мышцах находились ниже предела детектирования. Исследования подтвердили, что ПЭГилирование липосомальной лекарственной формы фотосенсибилизатора замедляет процесс его захвата ретикуло-эндотелиальной системой. Показано, что фотосенсибилизатор длительно циркулирует в крови и органах мышей, распределение заканчивается только к 4 ч после введения.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, фармакокинетика, флуоресценция.

Для цитирования: Будько А.П., Дейчман З.Г., Меерович Г.А., Борисова Л.М., Меерович И.Г., Ланцова А.В., Кульбачевская Н.Ю. Изучение фармакокинетики фотосенсибилизатора на основе липосомальной формы тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия у мышей // Biomedical photonics. – 2018. – Т. 7, № 4. – С. 16–22. doi: 10.24931/2413–9432–2018–7–4–16–22.

Контакты: Будько А.П., e-mail: apbudko@mail.ru

STUDY OF PHARMACOKINETICS OF LIPOSOMAL PHOTOSENSITISER BASED ON HYDROXYALUMINIUM TETRA-3-PHENYLTHIOPHTHALOCYANINE ON MICE

Budko A.P.¹, Deichman Z.G.¹, Meerovich G.A.^{2,3}, Borisova L.M.¹, Meerovich I.G.⁴,
Lantsova A.V.¹, Kulbachevskaya N.Yu.¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

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

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

⁴Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract

The present work is devoted to the study of pharmacokinetics of infrared photosensitizer (PS) based on hydroxylaluminium tetra-3-phenylthiophthalocyanine in a sterically stabilized liposomal form. The study was carried out on adult female mice. The PS was administered once intravenously at a dose of 6 mg / kg. Evaluation of the PS accumulation dynamics in the mice tissues and organs was performed at time intervals from 5 minutes to 7 days using spectral-fluorescent method. The maximum accumulation of the PS photoactive form was recorded in lungs (32 µg / g in the interval of 5–30 minutes after introduction), liver (20.8 µg / g in the interval of 4–24 hours after introduction) and spleen (28 µg / g 4 hours after introduction). At the same time, by the end of the observation period (7 days after administration), trace amounts of the PS photoactive form were still detected in the liver and the spleen at a calculated concentration of 0.5-1 µg / g. The PS accumulated the least in muscles and skin. The fluorescent signal from the PS accumulated in skin was detectable almost immediately, and its concentration remained at the same level (1.2-1.5 µg / g) for up to 3 days of observation. In the muscles, the concentration of the PS reached 1.5 µg / g 15 minutes after administration, and then gradually decreased until 0.25 µg / g at 24 hours.

Data on the pharmacokinetics of PS in blood, basic organs and tissues of animals were obtained, pharmacokinetic parameters were calculated. 7 days after the administration, the PS concentration in the skin and muscles was below the detection limit. The studies confirmed that PEGylation of the PS liposomal form slows down the process of its capture by reticulo-endothelial system. It was shown that the PS circulates in blood and organs of mice for a long time and it completely distributes only when 4 hours pass after administration.

Keywords: photosensitizer, pharmacokinetics, fluorescence.

For citations: Budko A.P., Deichman Z.G., Meerovich G.A., Borisova L.M., Meerovich I.G., Lantsova A.V., Kulbachevskaya N.Yu. Study of pharmacokinetics of liposomal photosensitizer based on hydroxylaluminium tetra-3-phenylthiophthalocyanine on mice, *Biomedical photonics*, 2018, vol. 7, no. 4, pp. 16–22. (in Russ.) doi: 10.24931/2413–9432–2018–7–4–16–22.

Contacts: Budko A.P., e-mail: apbudko@mail.ru

Введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ) широко используется для лечения злокачественных новообразований, особенно, в случаях их поверхностного и внутриполостного расположения. Для эффективного воздействия на глубокие слои опухолей большого размера применяют фотосенсибилизаторы (ФС) ближнего инфракрасного (ИК) диапазона [1]. Использование липосомальных лекарственных форм (ЛЛФ) позволяет применять в ФДТ новые эффективные гидрофобные и гидрофильные субстанции, повысить селективность накопления ФС в опухоли по сравнению с окружающими тканями и эффективность методики в целом [1,2].

Для проведения доклинических исследований разрабатываемой лекарственной формы, в том числе на основе ФС, необходимо изучение фармакокинетики [1–3]. Данное исследование заключается в определении концентрации активной субстанции в различных органах, тканях и биологических жидкостях организма в определенные моменты времени после введения и дает информацию о продолжительности циркуляции ФС в организме, органах-мишенях, что позволяет связать концентрацию и вводимую дозу ФС с фармакологическим эффектом [4].

Одним из важнейших требований для проведения фармакокинетических исследований является широкий динамический диапазон метода и средств измерения, который должен составлять не менее трех порядков.

Для определения концентрации лекарств в биологических средах используются хроматографические, спектрофотометрические, пламенно-эмиссионные

[5] атомно-абсорбционные [6], оптико-спектральные и спектрально-флуоресцентные [7–11] и ряд других методов. Однако при изучении фармакокинетики ФС многие общепринятые методы количественного определения вещества сталкиваются со сложно решаемыми проблемами. Так, при выполнении хроматографии и спектрофотометрии необходимо как можно полнее экстрагировать изучаемую субстанцию из органов и тканей, в том числе из кожи (именно накопление ФС в коже приводит к отрицательным побочным явлениям), что достаточно затруднительно, особенно в случае количественного определения тетрапирролов, к которым относится большинство ФС. Задача еще более усложняется при использовании наноструктурированных ФС на основе гидрофобных субстанций (к которым относится и изучаемый ФС), поскольку в разные моменты времени после введения часть молекул активной субстанции остается в наноносителях, другая часть уже переходит в клеточные структуры.

Пламенно-эмиссионные и атомно-абсорбционные методы элементного анализа [5,6], которые могут быть использованы для анализа без экстракции исследуемых лекарственных субстанций из тканей, имеют ограниченный динамический диапазон, особенно для субстанций, которые состоят из тех же химических элементов, что и ткани организма (H,N,C,O) и не содержат малораспространенных элементов, например, атомов металлов. Атомно-абсорбционный метод был использован Р.Н. Brun и соавт. для изучения фармакокинетики фотосенсибилизатора Tookad в крови и основных внутренних органах, динамика

его содержания в органах и тканях оценивалась по интенсивности линии входящего в состав Tookad палладия [6].

В настоящее время для определения в биологических образцах концентрации активных субстанций, в частности ФС, обладающих характеристическими полосами поглощения и флуоресценции, используются оптико-спектральные и спектрально-флуоресцентные методы [7–11]. Применение аппаратуры с высоким спектральным разрешением позволяет обеспечить высокую чувствительность таких методов [10].

Целью настоящего исследования являлось изучение фармакокинетики ФС на основе тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия (3-(PhS)₄-PcAlOH) в ЛЛФ при его внутривенном введении мышам в дозе 6 мг/кг.

Материалы и методы

Были проведены исследования фармакокинетики ФС на основе разработанной в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ ЛЛФ гидрофобной фотоактивной субстанции тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия (сокр. 3-(PhS)₄-PcAlOH) (рис. 1), созданной во ФГУП «ГНЦ «НИОПИК». Спектральный максимум поглощения 3-(PhS)₄-PcAlOH соответствует длине волны 717 нм. Стабилизированные липосомы ЛЛФ включали в себя 3-(PhS)₄-PcAlOH, липиды лецитина (USP30-NF25, C.1145, Lipoid GmbH, Германия) и холестерина (USP30-NF25, C.1101, Avanti Polar Lipids, Inc., США), сахарозу (ФС.2.1.0034.15 ГОСТ 5833–75, ХИММЕД, Россия) в качестве криопротектора, PEG-2000-DSPE ((1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-

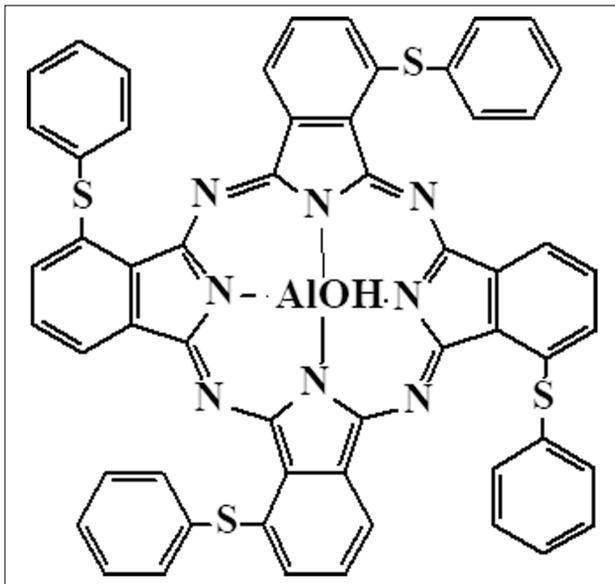


Рис. 1. Химическая формула тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия
Fig. 1. Chemical formula of hydroxyaluminum tetra-3-phenylthiophthalocyanine

N-[метокси-(полиэтилен-гликоль)-2000]аммониевая соль), Avanti Polar Lipids, Inc., США) для уменьшения захвата липосом ретикулоэндотелиальной системой и увеличения длительности их циркуляции в крови [12–16].

Исследования проведены на 50 половозрелых мышак-самках гибридах (C57Bl/6,×DBA/2) F1, массой 20–22 г, из разведения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Животные были случайным образом сгруппированы в 10 групп по 5 голов. Все животные были здоровы, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья. Животных содержали при температуре воздуха 20–23°C и относительной влажности 60–65% в условиях естественного освещения и принудительной вентиляции на подстилке из древесных стружек, стерилизованных в сушильном шкафу. Для кормления животных использовали стандартный промышленный сертифицированный брикетированный корм для грызунов с установленным сроком годности. Кормление проводили в одно, и то же время. Животные имели свободный доступ к корму и воде.

Все эксперименты проводили в соответствии с рекомендациями Good Clinical Practice [17].

Лиофилизат ЛЛФ 3-(PhS)₄-PcAlOH редиспергировали водой для инъекций в объеме 5,8 мл на флакон, при этом содержание 3-(PhS)₄-PcAlOH в дисперсии составляло 0,25 мг/мл. Объем вводимой дисперсии рассчитывали на основании данных о массе тела животных, дисперсию вводили однократно струйно в хвостовую вену в дозе 6 мг/кг.

В работе использовали механический гомогенизатор (GlasCol, США), вортекс Heildolph Reax Top (Heidolph, Германия), пипетки Microman 1000 с принудительным вытеснением (Gilson, Франция), 24-луночные планшеты с 16-миллиметровыми лунками 3424 Mark II для культуры тканей (Costar, США), дистиллированную воду.

Исследование флуоресценции проводили с использованием модифицированного лазерного электронного спектроанализатора ЛЭСА-01-«Биоспек» (ООО «БИОСПЕК», Россия). Динамический диапазон регистрируемых спектроанализатором флуоресцентных сигналов был расширен до 3,5 порядков, благодаря дополнительно разработанному алгоритму автоматического управления временем накопления фотоприемника. Линейность отклика спектроанализатора была установлена на образцах липосомальных дисперсий 3-(PhS)₄-PcAlOH в дистиллированной воде с концентрациями 0,01 мг/мл; 0,05 мг/мл; 0,1 мг/мл; 0,5 мг/мл; 2 мг/мл; 10 мг/мл; 25 мг/мл; 50 мг/мл и 0 (вода в качестве контрольного образца).

Статистический анализ проводили с использованием штатных возможностей программы Excel 2003 для Windows.

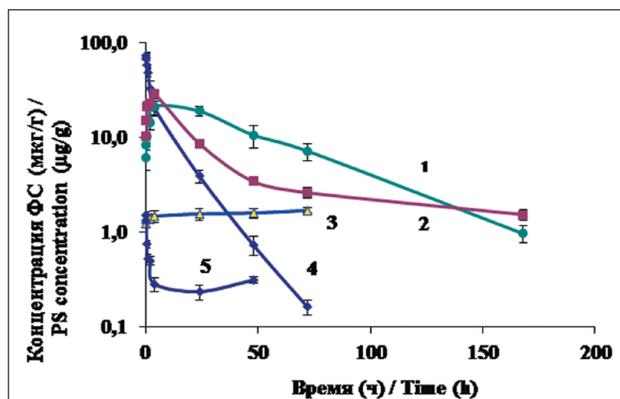


Рис. 2. Зависимость концентрации 3-(PhS)₄-PcAlOH от времени после его внутривенного введения в дозе 6 мг/кг в разных органах и тканях мышей: 1 – печень; 2 – селезенка; 3 – кожа; 4 – кровь; 5 – мышцы
Fig. 2. The dependence of 3-(PhS)₄-PcAlOH concentration on time after its intravenous administration at a dose of 6 mg/kg in different organs and tissues of mice: 1 – liver; 2 – spleen; 3 – skin; 4 – blood; 5 – muscle

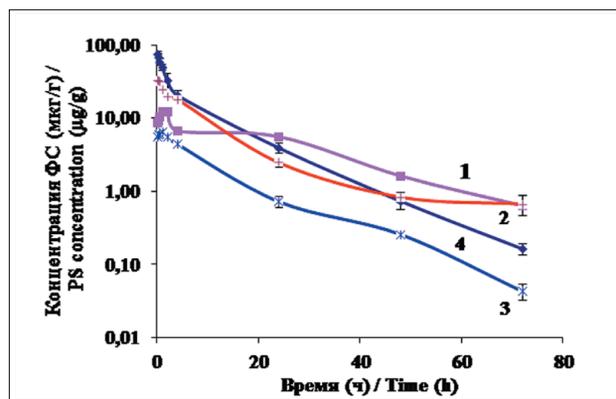


Рис. 3. Зависимость концентрации 3-(PhS)₄-PcAlOH от времени после его внутривенного введения в дозе 6 мг/кг в разных органах и тканях мышей: 1 – почки; 2 – легкие; 3 – сердце; 4 – кровь
Fig. 3. The dependence of 3-(PhS)₄-PcAlOH concentration on time after its intravenous administration at a dose of 6 mg/kg in different organs and tissues of mice: 1 – kidneys; 2 – lungs; 3 – heart; 4 – blood

Для изучения фармакокинетики проводили прободготовку следующим образом. Животных умерщвляли методом декапитации через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч и 168 ч после введения ФС, после чего получали кровь отбором из яремной вены и добавляли гепарин в качестве антикоагулянта. Образцы тканей и внутренних органов мышей (печень, почки, легкие, селезенка, сердце, мышца и кожа) получали хирургически. Печень, почки, мышцы отделяли, измельчали глазными ножницами в чашке Петри на льду и готовили навески массой 300±1 мг, к которым прибавляли 1,5 мл дистиллированной воды и гомогенизировали в стекле на механическом гомогенизаторе. Для селезенки, легких, сердца и кожи (образцы кожи отделяли от подкожной клетчатки выскабливанием) навеска составляла 100±1 мг, количество добавляемой воды пропорционально уменьшалось. Отбирали пипеткой количество гомогената эквивалентное 100 мг ткани и переносили в лунки планшетов для последующего измерения флуоресценции. К 100 мкл крови также пропорционально добавляли воду.

Флуоресценцию 3-(PhS)₄-PcAlOH в гомогенатах образцов возбуждали лазерным излучением с длиной волны 633 нм и регистрировали в спектральном диапазоне 720–770 нм, а его концентрацию определяли по интегральной интенсивности флуоресценции, нормированной на интенсивность сигнала возбуждающего лазерного излучения. Для пересчета значений интенсивности флуоресценции в значения концентрации ФС в ткани были построены калибровочные кривые путем добавления известного количества ФС к биологическим образцам. Опытные и калибровочные образцы обрабатывали одинаково.

При калибровке было установлено, что зависимость нормированной интегральной интенсивности

флуоресценции от концентрации 3-(PhS)₄-PcAlOH в образцах в широких пределах (для крови – в пределах 0,1–129 мкг/мл) линейно зависит от концентрации, и с точностью до 6% для всех органов может быть описана функцией

$$I = k \times C,$$

где $k = 27,99 \text{ (мкг/г)}^{-1}$ для зафиксированных в исследовании условий измерений, I – нормированная интегральная интенсивность флуоресценции, C – концентрация.

Полученное по результатам калибровки соотношение использовали для количественной оценки концентрации 3-(PhS)₄-PcAlOH в исследуемых органах и тканях.

Результаты и обсуждение

Зависимости концентрации 3-(PhS)₄-PcAlOH в крови и основных органах и тканях (печени, селезенке, почках, мышце, коже, сердце, легких) от длительности временного интервала между введением ФС и измерением флуоресценции в органах и тканях приведены на рис. 2, 3.

Значения концентраций ФС, представленные на рисунках, являются средним арифметическим из полученных данных и сопровождаются доверительным интервалом ($p=95\%$ при $n=5$).

В крови через 5 мин после введения концентрация составляет 73,4 мкг/л, к 24 ч снижается до 3,9 мкг/л.

В легких максимальная концентрация 32 мкг/г достигается к 5 мин наблюдения, не изменяется 30 мин, а затем медленно снижается: концентрация падает до значения 2,45 мкг/г за 24 ч. При этом в легких, сердце и почках нет фазы роста концентрации 3-(PhS)₄-PcAlOH в начале наблюдения.

Таблица 1
Фармакокинетические параметры**Table 1**
Pharmacokinetic parameters

Орган, ткань Organ, tissue	Параметры Parameters						
	C_0 , мкг/мл $\mu\text{g/ml}$	V_1 , мл ml	V_b , мл ml	AUC мкг \times ч/мл $\mu\text{g}\times\text{h/ml}$	Cl_{tot} , мл/ч ml/h	$T_{0,5a}$, час h	$T_{0,5b}$, час h
Кровь Blood	76,9	1,73	4,32	411,43	0,32	0,96	9,76

В печени концентрация 3-(PhS)₄-PcAlOH нарастает от значения 6,2 мкг/г через 5 мин наблюдения до 20,8 мкг/г через 4 ч, остается на этом уровне до 24 ч и затем медленно снижается до 0,5 мкг/г за 168 ч.

В селезенке концентрация увеличивается от значения 8,2 мкг/г к 5 мин наблюдения до 28 мкг/г через 4 ч, после чего быстро снижается до 8,5 мкг/г к 24 ч, но наблюдается до 168 ч.

В мышцах концентрация 3-(PhS)₄-PcAlOH максимальна к 15 мин после введения и составляет 1,5 мкг/г, после чего снижается к 24 ч до 0,25 мкг/г.

В почках максимальная концентрация 12,5 мкг/г достигается к 2 ч наблюдения, затем к 4 ч снижается в 2 раза до 6,64 мкг/г, а к 72 ч – до 0,65 мкг/г.

В коже (гомогенизированной, без подкожной клетчатки) значения концентрации 3-(PhS)₄-PcAlOH плавно увеличиваются от 1,2 мкг/г через 4 ч до 1,7 мкг/г через 72 ч после введения.

К 168 ч наблюдения значения концентрации 3-(PhS)₄-PcAlOH в коже, почках, легких, сердце, и мышцах находятся ниже предела детектирования.

Полученные результаты позволили рассчитать в соответствии с [18] для зависимости «концентрация ФС – время» в крови мышей после внутривенного введения 3-(PhS)₄-PcAlOH в дозе 6 мг/кг следующие фармакокинетические параметры: C_0 – расчетная концентрация в крови в момент времени наблюдения 0 ч; V_1 – «кажущийся» расчетный объем распределения дозы препарата в момент времени наблюдения 0 ч;

V_b – кинетический объем распределения;

AUC – площадь под кривой зависимости «концентрация- время»;

Cl_{tot} – клиренс общий – объем крови, освобождающийся от препарата в единицу времени;

$T_{0,5a}$ – время «полураспределения» препарата, быстрая фаза падения концентрации;

$T_{0,5b}$ – время «полувыведения» препарата, медленная фаза падения концентрации.

Из полученных данных следует, что зависимость «концентрация–время» для крови описывается уравнением двухкомпонентной модели. Фаза «рас-

пределения» с быстрым снижением концентрации 3-(PhS)₄-PcAlOH в крови характеризуется высоким значением $T_{0,5a}=0,96$ ч. Анализ полученных данных (в первую очередь – высокое значение $T_{0,5a}$) указывает на длительную циркуляцию ЛЛФ 3-(PhS)₄-PcAlOH в крови, распределение заканчивается к 4 ч после его введения. Высокие значения концентрации 3-(PhS)₄-PcAlOH в органах ретикулоэндотелиальной системы (печени, селезенке) достигаются только после 4 ч после введения. Эти данные согласуются с выводами [14–16] о том, что ПЭГилирование способствует уменьшению захвата липосом органами ретикулоэндотелиальной системы, а экстравазация липосом через дефекты эндотелиального слоя неоваскуляризации благодаря длительной

Таблица 2

Площадь под кривой зависимости концентрация-время AUC для тканей мышей, соотношение площадей AUC_{ткани}/AUC_{кровь}

Table 2
Area under curve AUC for tissue, area ratio AUC_{tissue}/AUC_{blood}

Орган, ткань Organ, tissue	AUC мкг \times ч/мл AUC $\mu\text{g}\times\text{h/ml}$	AUC _{ткани} /AUC _{кровь} AUC _{tissue} /AUC _{blood}
Печень Liver	959,7	2,3
Почки Kidneys	275,4	0,7
Легкие Lungs	342,8	0,8
Селезенка Spleen	669,4	1,6
Мышцы Muscles	22,1	0,1
Сердце Heart	87,7	0,2
Кожа Skin	111	0,3

циркуляции приводит к повышению уровня и селективности накопления ФС в опухоли. Это коррелирует с результатами, полученными при исследовании уровня и селективности накопления изучаемого ФС на опухолевых моделях [11], где наибольшие значения уровня и селективности накопления были отмечены через 4–7 ч после его введения (в зависимости от выбранной модели опухоли), и этот интервал времени был признан целесообразным для начала облучения при ФДТ.

Фаза «выведения» с медленным снижением концентрации ФС в крови продолжается до 72 ч после введения: $T_{0,5b} = 9,76$ ч.

Исходя из значения «кажущегося» объема распределения V_1 в начальный момент времени ЛЛФ, ФС распределяется только в крови. Значение кинетического объема распределения V_b составляет около 21% объема тела животного.

Наиболее высокие показатели площади под кривой АУС были получены в печени и селезенке (в 2,3 и 1,6 раза, соответственно, выше, чем в крови); в почках отношение $AUC_{ткань}/AUC_{кровь}$ составляло 0,7. Органами накопления ФС являются селезенка, печень и легкие. Почки и, возможно, печень являются органами выведения ФС.

Заключение

Отработан метод подготовки биологических проб для количественного определения концентрации ФС.

Проведены исследования фармакокинетики фотосенсибилизатора на основе тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия в липосомальной лекарственной форме.

Высокие (более 20 мкг/г) значения концентрации наблюдаются в печени, селезенке, и в первый час наблюдения в легких. К 24 ч наблюдения значения концентрации ФС достаточно велики во всех органах. В печени и селезенке следы ФС детектируются через 168 ч.

Подтверждено, что ПЭГилирование липосомальной лекарственной формы ФС замедляет процесс его захвата ретикулоэндотелиальной системой. ФС длительно циркулирует в крови и органах мышей, распределение заканчивается только к 4 ч после введения.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№ 17–07–01568).

ЛИТЕРАТУРА

1. Meerovich I.G., Sanarova E.V., Meerovich G.A. et al. Near-infrared photosensitizers based on nanostructured forms of phthalocyanine derivatives // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2015. – Vol. 85(1). – P.280–288. doi: 10.1134/S1070363215010430
2. Барышников А.Ю., Борисова Л.М., Ворожцов Г.Н. и др. Фотосенсибилизатор, липосомальная форма фотосенсибилизатора и способ проведения фотодинамической терапии // Патент РФ № 2257898. – 2005.
3. Sanarova E., Meerovich I., Lantsova A., et al. Thiosens liposomal dosage form technology development and photodynamic efficiency assessment // *J. Drug Delivery Science & Technology* – 2014. – Vol. 24(4). – P.315–319.
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая // под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К., 2012. – 944 с.
5. Гарифзянов А.Р. Эмиссионная фотометрия пламени и атомно-абсорбционная спектроскопия: электронное учебное пособие. – Казань: Казанский государственный университет, 2009. – 94 с.
6. Brun P.H., DeGroot J.L., Dickson E.F., et al. Determination of the in vivo pharmacokinetics of palladium-bacteriopheophorbide (WST09) in EMT6 tumour-bearing Balb/c mice using graphite furnace atomic absorption spectroscopy // *Photochem Photobiol Sci*. – 2004. – Vol. 3(11–12). – P. 1006–1010.
7. Каленков Г.С., Каленков С.Г., Штанько А.Е. Гиперспектральная голографическая фурье-микроскопия // *Квантовая электроника*. – 2015. – Т. 45(4). – С.333–338.
8. Стратонников А.А., Меерович Г.А., Рябова А.В. и др. Использование спектроскопии обратного диффузного отражения света для мониторинга состояния тканей при фотодинамической терапии // *Квантовая электроника*. – 2006. – Т. 36(12). – С. 1103–1110.

REFERENCES

1. Meerovich I.G., Sanarova E.V., Meerovich G.A., Volkov K.A., Negrinovsky V.M., Derkacheva V.M., Barkanova S.V., Lukyanets E.A., Oborotova N.A., Smirnova Z.S., Borisova L.M., Lantsova A.V., Polozkova A.P., Orlova O.L., Loschenov V.B., Umnova L.V., Baryshnikov A.Yu., Vorozhtsov G.N. Near-infrared photosensitizers based on nanostructured forms of phthalocyanine derivatives, *Russian Journal of General Chemistry*, 2015, vol. 85(1), pp. 280–288. doi: 10.1134/S1070363215010430
2. Baryshnikov A.Ju. Borisova L.M., Vorozhtsov G.N., Gerasimova G.K., Davydov M.I., Derkacheva V.M., Kokareva V.I., Kubasova I.Ju., Loshchenov V.B., Luzhkov Ju.M., Lukyanets E.A., Meerovich G.A., Meerovich I.G., Oborotova N.A., Polozkova A.P. Smirnova Z.S. Stratonnikov A.A. *Fotosensibilizator, liposomalnaya forma fotosensibilizatora i sposob provedeniya fotodinamicheskoi terapii* [Photosensitizing agent, liposomal formulation of photosensitizing agent and method for carrying out photodynamic therapy]. Patent RF no. 2257898, 2005.
3. Sanarova E., Meerovich I., Lantsova A., Kotova E., Shprakh Z., Polozkova A., Orlova O., Meerovich G., Borisova L., Lukyanets E., Smirnova Z., Oborotova N., Baryshnikov A. Thiosens liposomal dosage form technology development and photodynamic efficiency assessment, *J. Drug Delivery Science & Technology*, 2014, Vol. 24(4), pp.315–319.
4. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya* [A guide to preclinical drug research. Part 1], ed. A.N. Mironov. Moscow: Grif&K Publ., 2012. 944 p.
5. Garifzyanov A.R. *Emissionnaya fotometriya plameni i atomno-absorbtsionnaya spektroskopiya: elektronnoe uchebnoe posobie* [Emission photometry of flame and atomic absorption spectroscopy: an electronic textbook for 2nd year students]. Kazan', Kazan' state university Publ. 94 p.
6. Brun P.H., DeGroot J.L., Dickson E.F., Farahani M., Pottier R.H. Determination of the in vivo pharmacokinetics of palladium-bacte-

9. Лощенов В.Б., Линьков К.Г., Савельева Т.А. и др. Аппаратурное и инструментальное обеспечение флюоресцентной диагностики и фотодинамической терапии // Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. – 2013. – Т. 2, № 3. – С. 17–25.
10. Reshetnikov A.V., Ponomarev G.V., Ivanov A.V., et al. Novel drug form of chlorin e6 // Proc. SPIE – 2000. – Vol. 3909. – P. 124–129.
11. Меерович Г.А., Борисова Л.М., Будько А.П. и др. Исследование уровня и селективности накопления липосомальной формы фотосенсибилизатора тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксид алюминия на опухолевых моделях мышей при разных способах перевивки // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – Т. 16, № 4. – С. 74–79.
12. Abra R.M., Bankert R.B., Chen F., et al. The next generation of liposome delivery systems: recent experience with tumor-targeted, sterically-stabilized immunoliposomes and active-loading gradients // J Liposome Res. – 2002. – Vol. 12. – P. 1–3.
13. Brown I.M., Giaccia A.I. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy // Cancer Res. – 1998. – Vol. 58(7) – P. 1408–1416.
14. Allen T.M. Liposomes. Opportunities in drug delivery // Drugs. – 1997. – Vol. 54(4). – P. 8–14.
15. Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice // Pharmacol. Rev. – 2003. – Vol. 53. – P. 283–318.
16. Klibanov A.L., Maruyama K., Torchilin V.P., Huang L. Amphipatic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes // FEBS Lett. – 1990. – Vol. 268. – P. 235–238.
17. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных // Качественная клиническая практика. – 2002. – № 1. – С. 58–61.
18. Соловьев В.Н., Фирсов А.А., Филлов В.А. Фармакокинетика. – Москва: Медицина, 1980. – 223 с.
7. Kalenkov G.S., Kalenkov S.G., Shtan'ko A.E. Hyperspectral holographic Fourier-microscopy, *Kvantovaya elektronika*, vol. 45, no 4, pp. 333–338.
8. Stratonnikov A.A., Meerovich G.A., Ryabova A.V., Savelieva T.A., Loschenov V.B. Application of backward diffuse reflection spectroscopy for monitoring the state of tissues in photodynamic therapy, *Kvantovaya elektronika*, 2006, vol. 36(12), pp. 1103–1110. (in Russian)
9. Loschenov V.B., Lin'kov K.G., Savelieva T.A., Loschenov M.V., Model S.S., Borodkin A.V. Hardware and tool equipment for fluorescence diagnostics and photodynamic therapy, *Fotodinamicheskaya terapiya i fotodiagnostika*, 2013, vol. 2, no 3, pp. 17–25. (in Russian).
10. Reshetnikov A.V., Ponomarev G.V., Ivanov A.V., Abakumova O.Yu., Tsvetkova T.A., Karmenyan A.V., Rebeko A.G., Baum R.Ph. Novel drug form of chlorin e6, *Proc. SPIE*, 2000, vol. 3909, pp. 124–129.
11. Meerovich G.A., Borisova L.M., Bud'ko A.P., Kiseleva M.P., Nikolaeva L.L., Meerovich I.G., Lantsova A.V., Chernova S.V., Oborotova N.A. Study of the level and selectivity of accumulation of the liposomal form of the hydroxylaluminum tetra-3-phenylthiophthalocyanine photosensitizer on tumor models of mice with different methods of inoculation, *Rossiiskii bioterapevticheskii jurnal*, 2017, vol.16, no 4, pp. 74–79. (in Russian).
12. Abra R.M., Bankert R.B., Chen F., Egilmez N.K., Huang K., Saville R., Slater J.L., Sugano M., Yokota S.J. The next generation of liposome delivery systems: recent experience with tumor-targeted, sterically-stabilized immunoliposomes and active-loading gradients, *J. Liposome Res.*, 2002, vol. 12, pp. 1–3.
13. Brown I. M., Giaccia A. I. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy, *Cancer Res.*, 1998, vol. 58(7), pp. 1408–1416.
14. Allen T.M. Liposomes. Opportunities in drug delivery, *Drugs*, 1997, vol. 54(4), pp. 8–14.
15. Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice, *Pharmacol. Rev.*, 2003, vol. 53, pp. 283–318.
16. Klibanov A.L., Maruyama K., Torchilin V.P., Huang L. Amphipatic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes, *FEBS Lett*, 1990, vol. 268, pp. 235–238.
17. Bol'shakov O.P., Neznanov N.G., Babakhanyan H.V. Didactic and Ethical Aspects of Research on Biomodels and Experimental Animals, *Kachestvennaia klinicheskaja praktika*, 2002, no 1, pp. 58–61. (in Russian).
18. Soloviov V.N., Firsov A.A., Filov V.A. *Farmacokinetica* [Pharmacokinetics]. Moscow, Medicine Publ., 1980. 223 p.

КЛАСТЕРНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ИНТРАОПЕРАЦИОННОЙ ОПТИЧЕСКОЙ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ В НЕЙРОХИРУРГИИ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

И.А. Осьмаков¹, Т.А. Савельева^{1,2}, В.Б. Лощенов^{1,2}, С.А. Горяйнов³, А.А. Потапов³

¹Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, Россия

²Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук, Москва, Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии
имени академика Н. Н. Бурденко, Москва, Россия

Резюме

В работе представлены результаты сравнительного исследования методов кластерного анализа данных оптической интраоперационной спектроскопии при проведении операций по удалению глиальных опухолей различной степени злокачественности. Анализ проведен как для отдельных пациентов, так и для всей совокупности данных. Данные были получены методом комбинированной оптической спектроскопии, регистрирующим спектр диффузного отражения широкополосного излучения в диапазоне спектра 500–600 нм (с целью анализа кровенаполненности тканей и степени оксигенации гемоглобина), спектр флуоресценции индуцированного 5-аминолевулиновой кислотой протопорфирина IX (с целью анализа степени изменения тканей) и сигнал диффузно отраженного лазерного излучения, использовавшегося для возбуждения флуоресценции (с целью учета рассеивающих свойств тканей). Для определения пороговых значений указанных параметров для опухоли, зоны инфильтрации и нормального белого вещества был проведен поиск естественных кластеров в имеющихся интраоперационных данных оптической спектроскопии и их сопоставление с результатами патоморфологической экспертизы. Было показано, что среди рассмотренных методов кластеризации EM-алгоритм и метод k-средних оптимальны для рассмотренного набора данных и могут быть использованы для построения системы поддержки принятия решений при спектроскопической интраоперационной навигации в нейрохирургии. Релевантные результатам патоморфологических исследований модели были также получены с помощью методов спектральной и агломеративной кластеризации. Эти методы могут быть использованы для постобработки данных комбинированной спектроскопии.

Ключевые слова: оптическая спектроскопия, флуоресценция, диффузное отражение, 5-АЛК, протопорфирин IX, нейрохирургия, глиомы, кластерный анализ.

Для цитирования: Осьмаков И.А., Савельева Т.А., Лощенов В.Б., Горяйнов С.А., Потапов А.А. Кластерный анализ результатов интраоперационной оптической спектроскопической диагностики в нейрохирургии глиальных опухолей головного мозга // Biomedical photonics. – 2018. – Т. 7, № 4. – С. 23–34. doi: 10.24931/2413-9432-2018-7-4-23-34.

Контакты: Осьмаков И.А., e-mail: ilya.osmakov@gmail.com

CLUSTER ANALYSIS OF THE RESULTS OF INTRAOPERATIVE OPTICAL SPECTROSCOPIC DIAGNOSTICS IN BRAIN GLIOMA NEUROSURGERY

Osmakov I.A.¹, Savelieva T.A.^{1,2}, Loschenov V.B.^{1,2}, Goryajnov S.A.³, Potapov A.A.³

¹National Research Nuclear University MEPhI, Moscow, Russia

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

³N.N. Burdenko National Scientific and Practical Center for Neurosurgery
of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract

The paper presents the results of a comparative study of methods of cluster analysis of optical intraoperative spectroscopy data during surgery of glial tumors with varying degree of malignancy. The analysis was carried out both for individual patients and for the entire dataset. The data were obtained using combined optical spectroscopy technique, which allowed simultaneous registration of diffuse reflectance spectra of broadband radiation in the 500–600 nm spectral range (for the analysis of tissue blood supply and the degree of hemoglobin

oxygenation), fluorescence spectra of 5-ALA induced protoporphyrin IX (Pp IX) (for analysis of the malignancy degree) and signal of diffusely reflected laser light used to excite Pp IX fluorescence (to take into account the scattering properties of tissues). To determine the threshold values of these parameters for the tumor, the infiltration zone and the normal white matter, we searched for the natural clusters in the available intraoperative optical spectroscopy data and compared them with the results of the pathomorphology. It was shown that, among the considered clustering methods, EM-algorithm and k-means methods are optimal for the considered data set and can be used to build a decision support system (DSS) for spectroscopic intraoperative navigation in neurosurgery. Results of clustering relevant to the pathological studies were also obtained using the methods of spectral and agglomerative clustering. These methods can be used to post-process combined spectroscopy data.

Keywords: optical spectroscopy, fluorescence, diffuse reflectance, 5-ALA, protoporphyrin IX, neurosurgery, gliomas, cluster analysis

For citations: Osmakov I.A., Savelieva T.A., Loschenov V.B., Goryajnov S.A., Potapov A.A. Cluster analysis of the results of intraoperative optical spectroscopic diagnostics in brain glioma neurosurgery, *Biomedical photonics*, 2018, vol. 7, no. 4, pp. 23–34. (in Russ.) 10.24931/2413–9432–2018–7–4–23–34.

Contacts: Osmakov I.A., e-mail: ilya.osmakov@gmail.com

Введение

В настоящее время отмечается стабильный рост частоты онкологических заболеваний центральной нервной системы [1]. Одним из основных методов их лечения остается хирургическое удаление злокачественных новообразований. Однако определение границ глиальных опухолей представляет собой нетривиальную задачу в силу особенностей их роста вдоль миелинизированных нервных волокон и сосудов вглубь здорового белого вещества головного мозга [2, 3], что приводит к неполному удалению опухоли и высокой частоте послеоперационных рецидивов.

Именно инфильтрующим характером роста глиальных опухолей обусловлена необходимость использования дополнительных методов их демаркации во время операции. При этом оптические методы определения типа и состояния биологических тканей обладают рядом значимых преимуществ: высокой скоростью, точностью, неинвазивностью, компактностью рабочей части инструмента. Наиболее популярным среди оптических методов является регистрация флуоресценции маркеров опухолевых изменений, как эндогенной, так и экзогенной природы.

На настоящий момент рабочим инструментом, использующим принцип оптической детекции флуоресценции в нейрохирургии, является микроскоп Ormi Pentero с режимом Blue400, позволяющий наблюдать по уровню флуоресценции (возбуждаемой в фиолетовом диапазоне спектра) накопление в опухолевых клетках индуцированного 5-аминолевулиновой кислотой (5-АЛК) протопорфирина IX (ППИХ). Основным недостатком этого метода является субъективность оценки регистрируемого сигнала нейрохирургом. От врача в значительной степени зависит, какую яркость флуоресценции считать уже подпороговой для прекращения деструкции опухоли. И тактика хирургов в связи с этим может отличаться.

Поэтому принципиально важным является количественный подход при интраоперационном анализе типа ткани, который может быть обеспечен оптико-спектральным анализом. Более того, в случае достаточно большой выборки морфологически верифицированных заключений, предпочтительным является использование не просто числовых значений, но и предварительных заключений о типе тканей.

В случае с одним параметром, характеризующим степень злокачественности тканей (флуоресценцией ППИХ), определение типа ткани только по его значению является достаточно тривиальной задачей. Однако при увеличении числа параметров задача усложняется и требуется использование статистических методов анализа данных для вынесения предварительного заключения. Методы машинного обучения являются оптимальными для решения такой задачи.

Данная работа посвящена предварительному кластерному анализу спектроскопических данных для отдельных пациентов, а также для всей совокупности данных, с помощью встроенных библиотек языка программирования Python. В ней описывается метод оптической спектроскопии, использующий анализ спектров флуоресценции 5-АЛК-индуцированного ППИХ и спектров диффузного отражения тканей с последующим извлечением из них информации о поглотителях в тканях и их светорассеянии. Для определения пороговых значений для опухоли, зоны инфильтрации и нормы требуется поиск естественных кластеров в имеющихся интраоперационных данных оптической спектроскопии и их сопоставление с результатами патоморфологической экспертизы.

Материалы и методы

Метод интраоперационной оптической спектроскопии

Для одновременной регистрации спектров диффузного отражения и лазерно-индуцированной

флуоресценции была разработана установка, состоящая из спектроанализатора (ЛЭСА-01-Биоспек), двух источников излучения (гелий-неоновый лазер $\lambda=632,8$ нм и галогенная лампа), оптоволоконных средств доставки излучения к ткани и от нее, а также персонального компьютера со специальным программным обеспечением для регистрации и анализа спектров в режиме реального времени. В устройстве используется перекрестная система фильтров, позволяющая реализовать разделение видимого диапазона спектра на две области – регистрации спектра диффузного отражения и спектра флуоресценции ППХ.

При проведении измерений дистальный конец оптоволоконного зонда приближали к ткани до соприкосновения без оказания давления. В результате измерения на вход спектрометра поступают флуоресцентное, а также широкополосное и лазерное излучение, диффузно отраженные тканью. Регистрируемые спектральные зависимости подвергаются в реальном масштабе времени математической обработке в соответствии с алгоритмами, описанными в [4].

Рассеивающие свойства тканей оценивались по интенсивности рассеянного назад лазерного излучения и приводятся относительно удвоенного значения для неизменной коры (поскольку, согласно литературным данным, сигнал диффузного отражения от белого вещества в видимом диапазоне спектра в среднем вдвое выше, чем от серого). Интенсивность

флуоресценции вычисляли как отношение интенсивности флуоресценции ППХ в диапазоне 690–730 нм к интенсивности рассеянного назад лазерного излучения. Флуоресцентный контраст определяли как отношение интенсивности флуоресценции исследуемой ткани к интенсивности флуоресценции нормальной коры. Примеры регистрируемых спектров приведены на рис. 1.

Расчет параметров для анализа производился по следующим формулам:

$$FI_i = \frac{S_{[690..730],i}}{S_{[625..640],i}} \quad FC_i = \frac{FI_i}{FI_{norm}}$$

$$ScC_i = \frac{S_{[625..640],i}}{k * S_{[625..640],norm}} \quad Hb_{total,i} = [Hb]_i + [HbO_2]_i$$

$$HbC_i = \frac{Hb_{total,i}}{Hb_{total,norm}}$$

$$Sat(Hb)_i = \frac{HbO_{2,i}}{Hb_{total,i}} \quad Sat(Hb)C_i = \frac{Sat(Hb)_i}{Sat(Hb)_{norm}}$$

где S – площадь под графиком в диапазоне, который указан в нижнем индексе; i – интенсивность флуоресценции, вычисляемая по текущему спектру; $norm$ – интенсивность флуоресценции, вычисляемая по спектру нормальной ткани (как правило, от коры на некотором удалении от проекции опухоли); FI – интенсивность флуоресценции; FC – контраст исследуемой ткани по отношению к нормальной по интенсивности флуоресценции; ScC – контраст исследуемой ткани по отношению к нормальной по уровню светорассея-

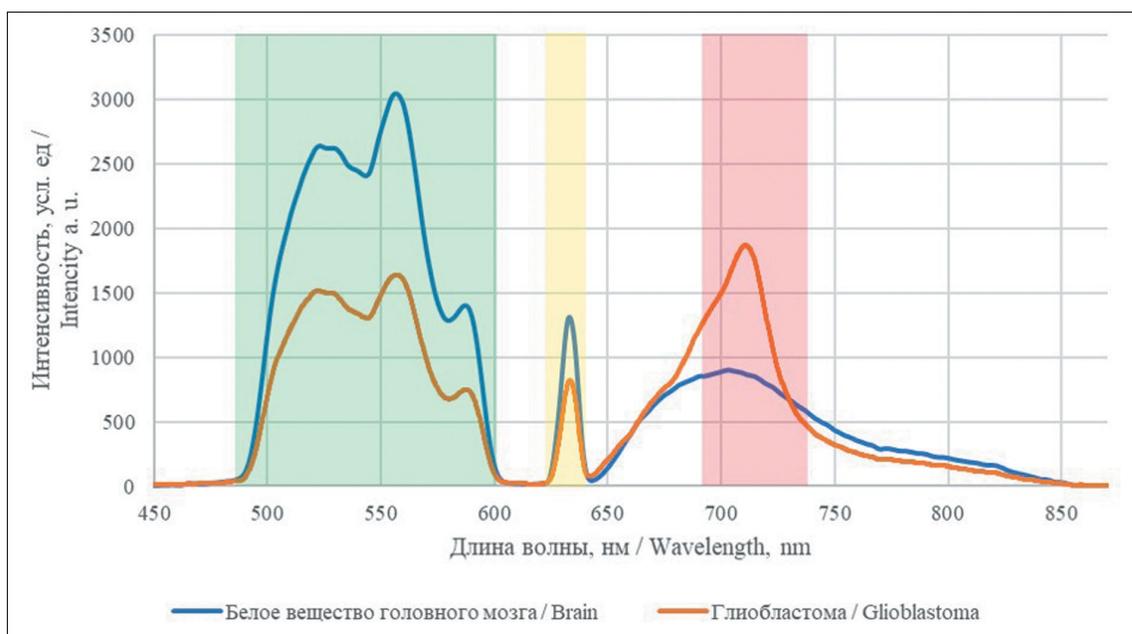


Рис. 1. Пример спектров различных типов тканей: зеленым цветом обозначена область оценки степени оксигенации, желтым – диффузного отражения лазерного излучения, красным – флуоресценции
Fig. 1. Example of spectra characteristic for different types of tissue: green – spectral range used for evaluation of oxygenation level, yellow – diffuse reflectance of laser light, red – fluorescence spectrum

ния; k – коэффициент, учитывающий различия светорассеяния для белого и серого вещества ($k=2$ при использовании в качестве нормы серого вещества, $k=1$ при использовании в качестве нормы белого вещества); $[Hb]$ – концентрация редуцированного гемоглобина; $[HbO_2]$ – концентрация оксигенированного гемоглобина; Hb_{total} – общая концентрация гемоглобина в ткани (кровенаполнение); $Sat(Hb)$ – степень оксигенации гемоглобина (сатурации кислородом).

Клинические данные

В исследовании ретроспективно использованы данные 13 пациентов. Из выборки были отделены 3 пациента, у которых были диагностированы глиобластомы и астроцитомы для проведения отдельных исследований. Обучение алгоритма кластеризации производилось на каждом пациенте отдельно, а затем в совокупности трех, для сравнения метрик качества на тестовой выборке, которой являлись оставшиеся пациенты. Таким образом, алгоритм тестировался на тех объектах, не включенных в обучающую выборку. Пациенты принимали внутрь раствор гидрохлорида 5-аминолевулиновой кислоты (препарат аласенс, производитель ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Россия) в расчете 25 мг/кг массы тела за 2–4 ч до начала удаления опухоли. С целью видеофлуоресцентной интраоперационной навигации применялся операционный микроскоп (Carl Zeiss Opmi Pentero, Германия) с флуоресцентным модулем одновременно с устройством для спектроскопической навигации ЛЭСА-01-Биоспек (ООО «БИОСПЕК», Россия). У каждого пациента было взято от 2 до 11 образцов ткани для последующего гистологического анализа и сопоставления его

результатов с данными спектроскопического исследования. Каждому образцу ткани соответствовал ряд спектров (от 1 до 10). Таким образом, было проанализировано 77 образцов тканей и 876 спектров, из которых 335 были верифицированы гистологическим заключением. Точечная диаграмма всех верифицированных объектов изображена на рис. 2.

Работа с пропущенными данными

Особенность собранных данных заключается в том, что при ранних разработках и использованиях метода интраоперационной оптической спектроскопии не были еще осуществлены технические способы одновременной регистрации всех параметров. Можно было измерить только парно: общую концентрацию гемоглобина в тканях и степень его оксигенации или интенсивность флуоресценции и площадь под пиком отраженного сигнала. Этот факт приводил к появлению пропущенных данных.

Пропущенные данные – это пустые значения параметров у объектов. Их обработка является отдельным разделом статистики и самостоятельной научной работой. В данном исследовании рассматривались следующие стандартные способы их обработки: удаление, при котором выборка уменьшалась от 2 до 2,5 раз, что является нецелесообразным методом; обнуление данных приводило к появлению в точке 0 множества объектов, имеющих различные гистологические метки; усреднение по параметрам, при котором алгоритмы получили низкие метрики качества.

Эти неудовлетворительные результаты привели к созданию многоходовой стратегии обработки данных, которая включала в себя:

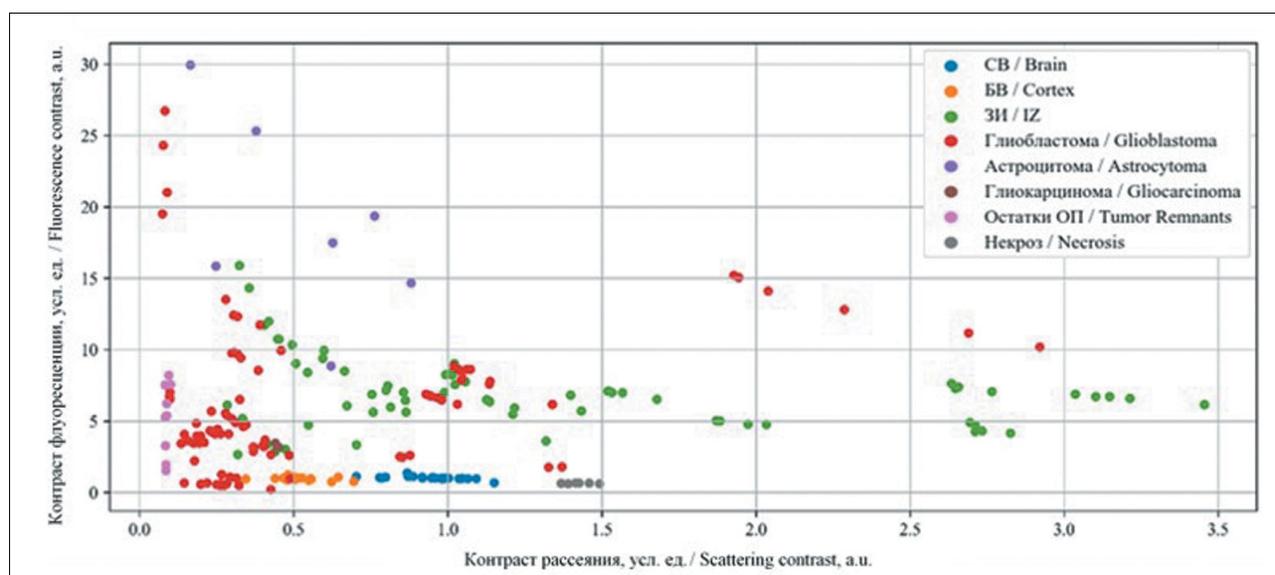


Рис. 2. Точечная диаграмма верифицированных данных, где СВ – серое вещество головного мозга, БВ – белое вещество головного мозга, ЗИ – зона инфильтрации, ОП – опухоль

Fig. 2. Scatter plot of verified data, where IZ – Infiltration Zone

1. Разделение данных на полные и неполные.
2. Разделение полных на обучающую и тестируемую выборку
3. Разделение неполных данных по диагнозам
4. Разделение данных по диагнозам на типы встречающихся тканей
5. Усреднение по каждому типу
6. Объединение обучающих данных и усредненных по типу.

Также встречались такие пациенты, которые имели только одну пару параметров. У таких пациентов недостающие параметры усреднялись по типам с параметрами всех пациентам с таким же диагнозом. Таким образом, в тестируемую выборку попали объекты с истинными параметрами, а обучающая выборка была максимально большой. Данная стратегия, в сравнении с другими способами обработки пропущенных данных, оправдала себя самыми высокими метриками качества, самым большим количеством успешных алгоритмов, сохранением большинства объектов и самой высокой степенью интерпретации.

Кластерный анализ

Для кластерного анализа были использован подход «обучение без учителя». В данной работе были рассмотрены следующие способы кластеризации: метод *k*-средних, спектральная кластеризация, метод максимального правдоподобия (EM-алгоритм), агломеративная кластеризация и плотностная кластеризация, итерации алгоритмов которых будут описаны далее.

Перед кластерным анализом данные были предварительно стандартизированы, что требуется перед такой обработкой. Это нужно для того, чтобы подобранные в алгоритмах веса не оперировались с параметрами разных порядков.

Метод *k*-средних. Один из самых распространенных методов применяемых для первичной обработки данных, особую популярность приобрел после работы Маккуина [5]. Он заключается в том, что выбирается *n*-случайных центров кластеризации. Затем сравнивается каждый объект с каждым центром и присваивается данный объект к тому кластеру, к центру которого этот объект ближе всего. В конце перечисляются центры.

Метод спектральной кластеризации. В этом методе определяются матрицы похожести объектов. Далее объединяются два ближайших объекта по матрице похожести так, чтобы внутри кластера объекты максимально отличались от объектов других кластеров [6]

EM-алгоритм. Метод заключается в максимизации правдоподобия. Он основан на том, что плотность вероятности распределения объектов в выборке представляет собой взвешенную сумму плотностей вероятности в каждом кластере. При этом все кла-

стеры выбираются из некоторого семейства распределений, часто которым выбираются семейства нормальных распределений [7].

Метод агломеративной кластеризации. В этом методе сортируются по возрастанию попарные расстояния между объектами и присваивается каждому свой кластер. Затем выбирается пара ближайших кластеров, объединяется в один. (Процесс поиска ближайших кластеров может происходить с использованием разных методов объединения). После перечисляются центры.

Метод плотностной кластеризации. В этом методе в окрестности объекта внутри определённого радиуса должно находиться определенное число других точек, если это условие не выполняется, то объект помечается как шум.

Из особенностей работы рассмотренных алгоритмов кластеризации можно сделать вывод, что такие методы, как *k*-средних и EM-алгоритм, могут получить на выходе модель разбиения данных на кластеры, с помощью которой можно предсказывать новые объекты.

Входные параметры подбирались таким образом, чтобы здоровые объекты максимально отделялись от остальной выборки в отдельный кластер, но при этом число кластеров не превышало 8 единиц. Это связано с тем, что число гистологически различающихся объектов не может превышать 8.

Метрики качества

Для того, чтобы оценить качество результатов кластеризации, используют различные метрики качества. Такие оценки не должны зависеть от самих значений меток, а только от самого разбиения выборки. К тому же, не всегда известны истинные метки объектов, поэтому также нужны оценки, позволяющие оценить качество кластеризации, используя только неразмеченную выборку.

Выделяют внешние и внутренние метрики качества. Внешние используют информацию об истинном разбиении на кластеры, в то время как внутренние метрики не используют никакой внешней информации и оценивают качество кластеризации, основываясь только на наборе данных. Оптимальное число кластеров обычно определяют с использованием внутренних метрик.

Adjusted Rand Index (ARI). Предполагается, что известны истинные метки объектов. Данная мера не зависит от самих значений меток, а только от разбиения выборки на кластеры. Пусть *n* – число объектов в выборке, тогда *a* – число пар объектов, имеющих одинаковые метки и находящихся в одном кластере, а *b* – число пар объектов, имеющих различные метки и находящихся в разных кластерах. Тогда Rand Index это:

$$RI = \frac{2(a + b)}{n(n - 1)}$$

То есть это доля объектов, для которых эти разбиения (исходное и полученное в результате кластеризации) "согласованы". Rand Index (RI) выражает схожесть двух разных кластеризаций одной и той же выборки. Чтобы этот индекс давал значения близкие к нулю для случайных кластеризаций при любом n и числе кластеров, необходимо нормировать его. Так определяется Adjusted Rand Index:

$$ARI = \frac{RI - E[RI]}{\max(RI) - E[RI]}$$

Эта мера симметрична, не зависит от значений и перестановок меток. Таким образом, данный индекс является мерой расстояния между различными разбиениями выборки. ARI принимает значения в диапазоне $[-1,1]$. Отрицательные значения соответствуют "независимым" разбиениям на кластеры; значения, близкие к нулю, – случайным разбиениям, а положительные значения говорят о том, что два разбиения схожи (совпадают при $ARI = 1$).

Adjusted Mutual Information (AMI). Данная мера очень похожа на ARI . Она также симметрична, не зависит от значений и перестановок меток. Определяется с использованием функции энтропии, интерпретируя разбиения выборки как дискретные распределения (вероятность отнесения к кластеру равна доле объектов в нём). Индекс AMI определяется как взаимная информация для двух распределений, соответствующих разбиениям выборки на кластеры. Интуитивно, взаимная информация измеряет долю информации, общей для обоих разбиений: насколько информация об одном из них уменьшает неопределенность относительно другого.

Аналогично ARI определяется индекс AMI , позволяющий избавиться от роста индекса AMI с увеличением числа классов. Он принимает значения в диапазоне $[-1,1]$. Значения, близкие к нулю, говорят о независимости разбиений, а близкие к единице – об их схожести (совпадении при $ARI = 1$).

Гомогенность, полнота, V-мера. Формально данные меры также определяются с использованием функций энтропии и условной энтропии, рассматривая разбиения выборки как дискретные распределения:

$$h = 1 - \frac{H(C|K)}{H(C)}$$

$$c = 1 - \frac{H(K|C)}{H(K)}$$

здесь K – результат кластеризации, C – истинное разбиение выборки на классы. Таким образом, h измеряет, насколько каждый кластер состоит из объектов

одного класса, а c – насколько объекты одного класса относятся к одному кластеру. Эти меры не являются симметричными. Обе величины принимают значения в диапазоне $[0,1]$, и большие значения соответствуют более точной кластеризации. Эти меры не являются нормализованными, как ARI или AMI , и поэтому зависят от числа кластеров. Случайная кластеризация не будет давать нулевые показатели при большом числе классов и малом числе объектов. В этих случаях предпочтительнее использовать ARI . Однако при числе объектов более 1000 и числе кластеров менее 10 данная проблема не так явно выражена и может быть проигнорирована.

Для учёта обеих величин h и c одновременно вводится V -мера, как их среднее гармоническое:

$$v = 2 \frac{hc}{h+c}$$

Она является симметричной и показывает, насколько две кластеризации схожи между собой.

Силуэт. В отличие от описанных выше метрик, данный коэффициент не предполагает знания истинных меток объектов, и позволяет оценить качество кластеризации, используя только саму (неразмеченную) выборку и результат кластеризации. Сначала силуэт определяется отдельно для каждого объекта. a – среднее расстояние от данного объекта до объектов из того же кластера, b – среднее расстояние от данного объекта до объектов из ближайшего кластера (отличного от того, в котором лежит сам объект). Тогда силуэтом данного объекта называется величина:

$$s = \frac{b-a}{\max(a,b)}$$

Силуэтом выборки называется средняя величина силуэта объектов данной выборки. Таким образом, силуэт показывает, насколько среднее расстояние до объектов своего кластера отличается от среднего расстояния до объектов других кластеров. Данная величина лежит в диапазоне $[-1,1]$. Значения, близкие к -1, соответствуют варианту кластеризации с высокой дисперсией, значения, близкие к нулю, говорят о том, что кластеры пересекаются и накладываются друг на друга, значения, близкие к 1, соответствуют "плотным" четко выделенным кластерам. Таким образом, чем больше силуэт, тем более четко выделены кластеры, и они представляют собой компактные, плотно сгруппированные облака точек.

С помощью силуэта можно выбирать оптимальное число кластеров k (если оно заранее неизвестно) – выбирается такое число кластеров, которое максимизирует значение силуэта. В отличие от предыдущих метрик, силуэт зависит от формы кластеров, и достигает больших значений на более выпуклых кластерах,

получаемых с помощью алгоритмов, основанных на восстановлении плотности распределения.

Для оценки качества кластеризации были вручную объединены кластеры таким образом, что здоровые объекты находились в отдельном кластере, а все остальные объекты были объединены в кластер патологии (не здоровых). Таким образом, полученные метрики будут оценивать, как хорошо используемый метод отличает здоровые объекты от больных.

Результаты и их обсуждение

Результаты анализа данных для отдельных пациентов

Пациент Г. Диагноз – астроцитома диффузная с выраженным полиморфизмом.

У пациента Г. была выборка из 12 объектов. Метрики качества представлены в табл. 1. Полученные модели на визуализации невозможно соотносить с реальными представлениями. Однако методы k-средних и агломеративная кластеризация смогли выделить здоровые ткани в отдельный кластер, но сама модель разбиения данных на кластеры получилась с очень широкими границами, которые допускают интенсивность флуоресценции выше 7,5, что не характерно для участка здорового мозга. Исходя из результатов анализа данных этого пациента, очевидно, что данные способы обработки стоит применять на достаточно больших выборках.

Для пациента Г. наилучшими оценками качества обладают методы плотностной кластеризации, k-средних и агломеративной кластеризации.

Пациент С. Диагноз – глиобластома IV Grade.

По табл. 2 видно, что одинаково хорошие результаты показали при разделении нормы и патологии на отдельные кластеры все алгоритмы, кроме плотностного метода. Это связано с его особенностями,

которые помечают часть объектов как шумовые, что сильно занижает его метрики качества. Однако этот метод выделяет в отдельные кластеры близко стоящие во времени объекты. Эта особенность может пригодиться в дальнейшем для усреднения таких объектов, чтобы те не вносили большие веса в измерениях.

У пациента С., в сравнении с пациентом Г., выборка составила 82 объекта, то есть была почти в 6 раз больше. Здоровые ткани хорошо выделялись в отдельный кластер, что видно на примере визуализации результатов агломеративной кластеризации (рис. 3а). Входные параметры кластеризации подбирались таким образом, чтобы здоровые ткани отделились от всех остальных.

Стоит также отметить, что полученные прямые границы в методе k-средних (рис. 3б) не релевантны сложной границе между кластерами, обнаруживаемой в эксперименте, что не проявляется у EM-алгоритма (рис. 3в). Тем не менее, EM-алгоритм не имел градиентного перехода между кластерами, что было бы характерно для зон инфильтрации и для диффузного характера глиобластом. К тому же, сложно интерпретировать получившуюся модель разбиения данных на кластеры, поскольку здоровые ткани оказались включены в большой кластер с характеристиками, которые отличаются от таковых для здоровых тканей.

Пациент Б. Диагноз – Глиобластома.

У пациента Б. была выборка из 59 объектов, метрики качества полученных моделей показаны в табл. 3. Наилучшими методами оказались EM-алгоритм, спектральная кластеризация, k-средних, агломеративная кластеризация. Однако значения этих метрик недостаточно высоки для использования полученных моделей разбиения данных на кластеры в связи с недостаточно большой выборкой.

Таблица 1
 Метрики качества пациента Г. на отложенной выборке

Table 1
 Quality metrics of held-out set for patient G.

Название Metric	AMI	ARI	Гомогенность Homogeneity	Полнота Completeness	V-мера V-measure	Силуэт Silhouette
EM-алгоритм EM-algorithm	0,4666	0,6409	0,5183	0,6468	0,5754	0,2609
СК SC	0,4666	0,6409	0,5183	0,6468	0,5754	0,3502
ПК DC	9,8715	0,0000	9,8715	1,0000	1,9743	0,3705
k-средних k-means	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,4551
АК AC	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,4551

СК – спектральная кластеризация, ПК – плотностная кластеризация, АК – агломеративная кластеризация
 SC – spectral clustering, DC – density-based clustering, AC – agglomerative clustering

Результаты анализа совокупности данных всех пациентов

Для начала был проведен анализ совокупности данных тех пациентов, которые были перед этим рассмотрены по отдельности.

Пациенты Б.+Г.+С.

Результаты обработки объединения пациентов Б., Г. и С. показаны на рис. 4 и в табл. 4. Высокие метрики качества и более ожидаемый характер модели здоровых тканей позволят сказать, что увеличение выборки положительно сказывается на комплексной оценке результатов.

Метод плотностей кластеризации получил аномально большое количество кластеров, свыше 10. При более детальном изучении этого явления было

установлено, что большинство кластеров состоят из близко-стоящих по времени регистрации объектов, то есть, весьма вероятно, эти спектры соответствовали одному небольшому участку ткани.

Оценка качества моделей Б.+Г.+С. на остальных пациентах

Так как после обработки совокупности данных трёх пациентов получились потенциально правдоподобные модели, они были взяты для измерения на них метрик качества, с помощью пациентов, на которых кластеризация не производилась.

Оценка качества предсказаний пациента Д. (127 объектов, 41 верифицированных), пациента Л. (30 объектов, 23 верифицированных) и оставшегося объединения 9 пациентов (422 объекта, 93 верифициро-

Таблица 2
Метрики качества пациента С. на отложенной выборке

Table 2
Quality metrics of held-out set for patient S.

Название Metric	AMI	ARI	Гомогенность Homogeneity	Полнота Completeness	V-мера V-measure	Силуэт Silhouette
EM-алгоритм EM-algorithm	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,2446
СК SC	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,2446
ПК DC	0,4464	0,4411	1,0000	0,4548	0,6252	0,1153
k-средних k-means	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,2446
АК AC	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,2446

СК – спектральная кластеризация, ПК – плотностная кластеризация, АК – агломеративная кластеризация
SC – spectral clustering, DC – density-based clustering, AC – agglomerative clustering

Таблица 3
Метрики качества пациента Б. на отложенной выборке

Table 3
Quality metrics of held-out set for patient B.

Название Metric	AMI	ARI	Гомогенность Homogeneity	Полнота Completeness	V-мера V-measure	Силуэт Silhouette
EM-алгоритм EM-algorithm	0,8133	0,9150	0,8710	0,8174	0,8434	0,4313
СК SC	0,8133	0,9150	0,8710	0,8174	0,8434	0,4313
ПК DC	0,3053	0,2838	0,7268	0,3192	0,4436	0,0815
k-средних k-means	0,8133	0,9150	0,8710	0,8174	0,8434	0,4313
АК AC	0,8133	0,9150	0,8710	0,8174	0,8434	0,4313

СК – спектральная кластеризация, ПК – плотностная кластеризация, АК – агломеративная кластеризация
SC – spectral clustering, DC – density-based clustering, AC – agglomerative clustering

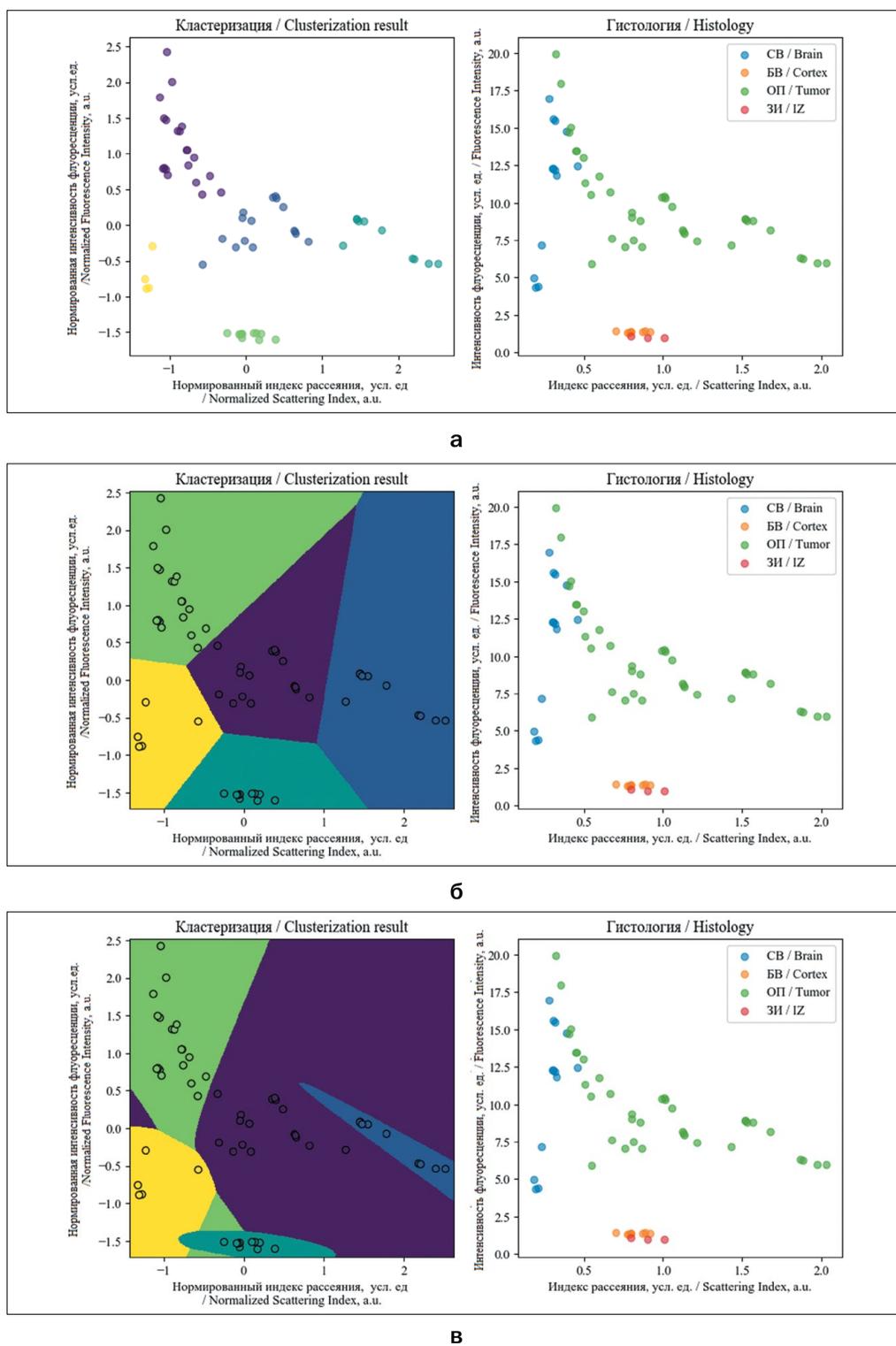


Рис. 3. Визуализация результатов пациента С. с применением различных методов кластеризации, в сравнении с реальным распределением объектов (справа), где СВ – серое вещество головного мозга, ББ – белое вещество головного мозга, ОП – опухоль, ЗИ – зона инфильтрации:

- а – агломеративная кластеризация;
- б – кластеризация k-средних;
- в – кластеризация EM-алгоритмом

Fig. 3. Reconstructive stage with the use of silicone endoprosthesis and acellular dermal matrix:

- а – agglomerative clusterization;
- б – k-means clusterization;
- в – EM-algorithm clusterization

Таблица 4
Метрики качества пациентов Б.+Г.+С. на отложенной выборке**Table 4**
Quality metrics of held-out set for patients B.+G.+S.

Название Metric	AMI	ARI	Гомогенность Homogeneity	Полнота Completeness	V-мера V-measure	Силуэт Silhouette
EM-алгоритм EM-algorithm	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,2366
СК SC	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,2366
ПК DC	0,0191	0,1026	0,0452	0,0544	0,0494	0,2397
k-средних k-means	0,6442	0,8291	0,8058	0,6548	0,7225	0,2366
АК AC	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,2397

СК – спектральная кластеризация, ПК – плотностная кластеризация, АК – агломеративная кластеризация
SC – spectral clustering, DC – density-based clustering, AC – agglomerative clustering

Таблица 5
Метрики качества предсказаний пациентов на полученных на пациентах Б., Г., С. моделях**Table 5**
Quality metrics of patient predictions based on models obtained from patients B., G. and S.

Пациент Patient	Название Metric	AMI	ARI	Гомогенность Homogeneity	Полнота Completeness	V-мера V-measure	Силуэт Silhouette
Д. D.	EM-алгоритм EM-algorithm	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,1420
	k-средних k-means	0,6860	0,8479	0,8091	0,6976	0,7449	0,1420
Л. L.	EM-алгоритм EM-algorithm	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,8165
	k-средних k-means	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,8165
Все All	EM-алгоритм EM-algorithm	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	-0,1452
	k-средних k-means	0,5468	0,7529	0,5587	0,7425	0,6376	-0,1452

ванных), на моделях, полученных на пациентах Б., Г., С. представлены в табл. 5.

Из полученных метрик видно, что на всех пациентах EM-алгоритм справился с задачей почти идеально, учитывая то, что в тестовой выборке встречались такие типы тканей, которые алгоритм не встречал, тогда как метод k-средних в большинстве случаев показал результат относительно хуже.

Заключение

Из визуализированных моделей и измеренных метрик качества можно выделить следующие наиболее универсальные модели: EM-алгоритм, метод k-средних, спектральная кластеризация и агломеративная кластеризация. Однако последние два не дают на выходе готовые модели, которыми можно оценить

новые данные, что исключает их в создании систем помощи принятия решений, но они подходят для пост-обработки данных.

Количество получаемых кластеров, превышающее количество различных меток, создает практические сложности в переборе и объединении кластеров для оценки моделей. Чувствительность к размеру выборки можно заметить на метриках качества и характере границ моделей у пациента С. и объединения пациентов Б.+Г.+С., у которых были 12 объектов и 41 объект, соответственно. В большинстве случаев и при достаточной выборке, почти все алгоритмы идеально справились с поставленной задачей на отдельных пациентах, а метод плотностной кластеризации, получив в среднем низкие метрики качества, проявил особенность в выявлении близко стоящих во

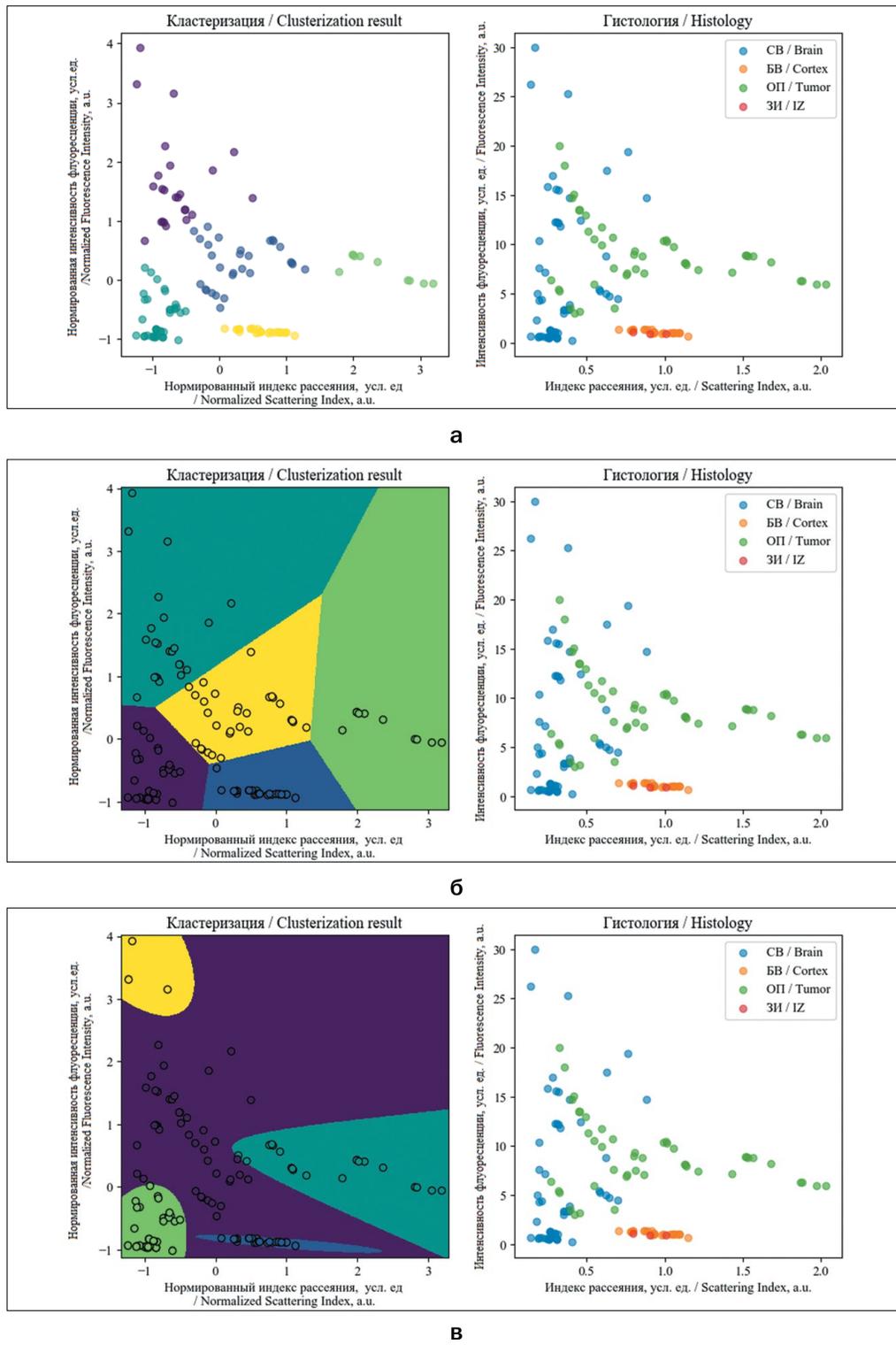


Рис. 4. Визуализация результатов пациентов Б.+Г.+С. с применением различных методов кластеризации, в сравнении с реальным распределением объектов (справа), где СВ – серое вещество головного мозга, ББ – белое вещество головного мозга, ОП – опухоль, ЗИ – зона инфильтрации:

- а – плотностная кластеризация;
- б – кластеризация k-средних;
- в – кластеризация EM-алгоритм

Fig. 4. Visualization of clustering results (left) compared to actual distribution (right) for patients B.+G.+S., where IZ – infiltration zone:

- а – density-based clustering;
- б – k-means clustering;
- в – EM-algorithm clustering

времени объектов, что может помочь в дальнейших исследованиях.

Приведенные недостатки, кроме отсутствия работоспособности на недостаточных выборках, можно нивелировать с помощью других методов машинного обучения, а именно обучение с учителем, где модели будут обучаться на конкретных ответах – метках класса, которыми будут являться гистологические заключения.

Результаты изучения спектроскопических данных позволяют численно, с помощью методов машинного обучения, выявить корреляции между несколькими параметрами, определяемыми по спектрам, и гистологическими заключениями о наличии признаков злокачественности тканей.

По сравнению со способом статистической обработки данных, представленным нами ранее для опи-

санного в статье метода интраоперационной регистрации комбинированных спектров [8], чувствительность повысилась в среднем с 88% до 90%, а специфичность с 82% до 91%.

Результаты, представленные в статье, были получены с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования "Технологический и диагностический центр для производства, исследования и аттестации микро и наноструктур" на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение RFMEFI60717X0183).

ЛИТЕРАТУРА

1. De Robles P., Fiest K.M., Frolkis A.D., et al. The worldwide incidence and prevalence of primary brain tumors: a systematic review and meta-analysis // *Neuro-Oncology*. – 2015. – Vol. 17(6). – P. 776–783. doi:10.1093/neuonc/nou283
2. Claes A., Idema A.J., Wesseling P. Diffuse glioma growth: a guerilla war // *Acta Neuropathol.* – 2007. – Vol. 114. – P. 443–458. doi:10.1007/s00401-007-0293-7
3. Sutter M., Eggspuehler A., Grob D., et al. The validity of multimodal intraoperative monitoring (MIOM) in surgery of 109 spine and spinal cord tumors // *Eur Spine J.* – 2007. – Vol. 16, Suppl. 2. – P. 197–208.
4. Savel'eva T.A., Loshchenov V.B., Goryainov S.A., et al. A spectroscopic method for simultaneous determination of protoporphyrin IX and hemoglobin in the nerve tissues at intraoperative diagnosis // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2015. – Vol. 85, No. 6. – P. 1549–1557.
5. MacQueen J. Some methods for classification and analysis of multivariate observations. In *Proc. 5th Berkeley Symp. on Math. Statistics and Probability*. – 1967. – P. 281–297
6. Jianbo S., Jitendra M. Normalized Cuts and Image Segmentation // *IEEE Transactions on PAMI*. – 2000. – Vol. 22(8). – pp. 888–905.
7. Jordan M.I., Xu L. Convergence results for the EM algorithm to mixtures of experts architectures: Tech. Rep. A.I. Memo No. 1458. – MIT, Cambridge, MA, 1993. – 33 p.
8. Potapov A.A., Goriainov S.A., Loshchenov V.B., et al. Intraoperative Combined Spectroscopy (Optical Biopsy) of Cerebral Gliomas // *N. N. Burdenko Journal of Neurosurgery*. – 2013. – Vol. 2. – P. 3–10.

REFERENCES

1. De Robles P., Fiest K.M., Frolkis A.D., Pringsheim T., Atta C., St Germaine-Smith C., Day L., Lam D., Jette N. The worldwide incidence and prevalence of primary brain tumors: a systematic review and meta-analysis, *Neuro-Oncology*, 2015, vol. 17(6), pp. 776–783. doi:10.1093/neuonc/nou283
2. Claes A., Idema A.J., Wesseling P. Diffuse glioma growth: a guerilla war, *Acta Neuropathol.*, 2007, vol. 114, pp. 443–458. doi:10.1007/s00401-007-0293-7
3. Sutter M., Eggspuehler A., Grob D., Jeszenszky D., Benini A., Porchet F., Mueller A., Dvorak J. The validity of multimodal intraoperative monitoring (MIOM) in surgery of 109 spine and spinal cord tumors, *Eur Spine J.*, 2007, vol. 16, suppl. 2, pp. 197–208.
4. Savel'eva T.A., Loshchenov V.B., Goryainov S.A., Shishkina L.V., Potapov A.A. A spectroscopic method for simultaneous determination of protoporphyrin IX and hemoglobin in the nerve tissues at intraoperative diagnosis, *Russian Journal of General Chemistry*, 2015, vol. 85, no. 6, pp. 1549–1557.
5. MacQueen J. Some methods for classification and analysis of multivariate observations. In *Proc. 5th Berkeley Symp. on Math. Statistics and Probability*. 1967. pp. 281–297
6. Jianbo S., Jitendra M. Normalized Cuts and Image Segmentation, *IEEE Transactions on PAMI*, 2000, vol. 22(8), pp. 888–905.
7. Jordan M.I., Xu L. Convergence results for the EM algorithm to mixtures of experts architectures: Tech. Rep. A.I. Memo No. 1458. MIT, Cambridge, MA, 1993. 33 p.
8. Potapov A.A., Goriainov S.A., Loshchenov V.B., Savel'eva T.A., Gavrillov A.G., Okhlopov V.A., Zhukov V.I., Zelenkov P.V., Gol'bin D.A., Shurkhaï V.A., Shishkina L.V., Grachev P.V., Kholodtsova M.N., Kuz'min S.G., Vorozhtsov G.N., Chumakova A.P. Intraoperative Combined Spectroscopy (Optical Biopsy) of Cerebral Gliomas, *N. N. Burdenko Journal of Neurosurgery*, 2013, vol. 2, pp. 3–10.

КОМБИНИРОВАННОЕ ЭНДОСКОПИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ БОЛЬНОГО РАКОМ ГОРТАНОГЛОТКИ С РАСПРОСТРАНЕНИЕМ НА ВЕРХНЮЮ ТРЕТЬ ПИЩЕВОДА

В.М. Легостаев, О.Ю. Бабенков, Г.В. Балицкий

Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону, Россия

Резюме

Авторы описывают клиническое наблюдение с полным клиническим эффектом после эндоскопического лечения больного раком гортаноглотки, вовлекающим верхнюю треть пищевода. Пациент получал лечение в объеме: конформная лучевая терапия СОД = 40 Гр, таргетная химиотерапия препаратом цетуксимаб, суммарной дозой 1800 мг. Через 1,5 мес после окончания лечения на видео-ларингоскопии была выявлена остаточная опухоль гортаноглотки с распространением на верхнюю треть пищевода. Результат гистологического исследования – плоскоклеточный рак, G2. С августа 2015 по февраль 2017 г. пациенту было проведено 8 курсов фотодинамической терапии в сочетании с аргонплазменной коагуляцией. На контрольной видеоларингоскопии, выполненной через 1 мес после последнего курса, зарегистрирована полная регрессия опухоли без рубцовой деформации или сужения просвета пищевода.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, опухоль гортаноглотки, фотодитазин.

Для цитирования: Легостаев В.М., Бабенков О.Ю., Балицкий Г.В. Комбинированное эндоскопическое лечение больного раком гортаноглотки с распространением на верхнюю треть пищевода // *Biomedical Photonics*. – 2018. – Т. 7, № 4. – С. 35–40. doi: 10.24931/2413–9432–2018–7–4–35–40.

Контакты: Легостаев В.М., e-mail: oncoendo@aaanet.ru

COMBINED ENDOSCOPIC TREATMENT OF A PATIENT WITH CANCER OF THE HYPOPHARYNX TO THE UPPER THIRD OF THE ESOPHAGUS WITH COMPLETE CLINICAL AND ENDOSCOPIC EFFECT

Legostaev V.M., Babenkov O.Y., Balitskiy G.V.

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Abstract

We present a clinical case with a complete endoscopic and clinical effect after endoscopic treatment of a patient with laryngeal cancer involving the upper third of the esophagus. The patient was treated as follows: conformal radiation therapy TFD = 40 gr, targeted chemotherapy using Cetuximab (total dose of 1800 mg). 1.5 months after the end of the treatment, a residual laryngopharyngeal tumor with a spread into the upper third of the esophagus was found during videolaryngoscopy examination. The result of the following histological examination was G2 squamous cell carcinoma. From August 2015 to February 2017, the patient underwent 8 photodynamic therapy sessions in combination with argon plasma coagulation. A control videolaryngoscopy, carried out 1 month after the final session, showed complete tumor regression without cicatricial deformity and narrowing of the esophageal lumen.

Keywords: photodynamic therapy, laryngopharyngeal tumor, fotoditazin.

For citations: Legostaev V.M., Babenkov O.Y., Balitskiy G.V. Combined endoscopic treatment of a patient with cancer of the hypopharynx to the upper third of the esophagus, *Biomedical Photonics*, 2018, vol. 7, no. 4, pp. 35–40. (in Russ.) doi: 10.24931/2413–9432–2018–7–4–35–40.

Contacts: Legostaev V.M., e-mail: oncoendo@aaanet.ru

Введение

Гортаноглотка – анатомически сложная область, играющая важную роль в процессах дыхания и пищеварения организма, что и обусловило появление термина, все ещё бытующего в литературе, – «перекрест

дыхательного и пищеварительного путей» [1]. Распространенность рака гортаноглотки в Российской Федерации в 2016 г. составила 11,7 человек на 100 000 населения, рака пищевода – 9,2 на 100 000 населения.

В 2016 г. рак гортаноглотки I и II стадий был диагностирован лишь в 3,2% и 13,5% наблюдений, соответственно. Аналогичные показатели при раке пищевода существенно выше и составляют 6,2% при I стадии и 24,2% при II. Эту разницу можно объяснить, тем, что в случае рака пищевода дисфагия проявляется намного раньше, чем при раке гортаноглотки, вследствие сужения диаметра просвета органа.

Среднероссийский показатель несвоевременной диагностики рака гортаноглотки составляет 43,1%, уступая при этом лишь раку поджелудочной железы (60,5%). Эти цифры напрямую коррелируют с высоким процентом летальности в первый год с момента установления диагноза, которые при раке гортаноглотки и пищевода составляют 41,0% и 58,5% соответственно. Поиск способов улучшения ранней диагностики и лечения рака глотки и пищевода является актуальной задачей современной медицины [2].

В России отмечена следующая тенденция применения различных методов лечения злокачественных новообразований: удельный вес хирургического метода как самостоятельного вида лечения продолжает расти. В 2016 г. он составил 54,3% (в 2015 г. – 53,7%), при этом, доля комбинированного или комплексного лечения продолжает падать – 31,2% (в 2015 г. – 31,3%), а доля только лучевого метода составляет 9,8% (в 2015 г. – 10,1%). При раке гортаноглотки показатель частоты применения лучевого метода в качестве самостоятельного вида лечения в 2016 г. составил 17,1%. Комбинированный или комплексный метод использовали при раке гортаноглотки в 50,8%, при раке пищевода – в 49,1%. Процент применения химиолучевого метода в качестве самостоятельного вида лечения рака гортаноглотки оказался на порядок выше, чем при раке пищевода и составил 15,7% против 1,4% соответственно [3].

В последние годы наряду с общепринятыми методами лечения злокачественных новообразований (хирургический, лучевой, лекарственный и их комбинации) в онкологии все чаще стала применяться фотодинамическая терапия (ФДТ). Этот метод лечения основан на взаимодействии фотосенсибилизатора (ФС) и светового излучения, имеющего длину волны, соответствующую максимуму поглощения применяемого ФС. В результате инициируются фотохимические процессы в клетках злокачественной опухоли, впоследствии приводящие к ее гибели [4].

Появление методов прямого деструктивного воздействия на злокачественные новообразования, таких как электрорезекция, аргон-плазменная коагуляция, лазерная и криодеструкция, радиочастотная абляция, существенно расширило возможности хирургов, позволяя более безопасно и

эффективно выполнять циторедуктивные операции. Однако ни один из этих методов не обладает системным воздействием у онкологических больных из-за существенных ограничений и противопоказаний к применению. В отличие от вышеперечисленных методов воздействия на опухоль ФДТ обладает целым рядом преимуществ, среди которых:

1. Прямое селективное цитотоксическое (апоптоз, некроз) воздействие на клетки злокачественного новообразования, накопившие фотосенсибилизатор [5–7].
2. Селективное повреждение эндотелия кровеносных сосудов злокачественного новообразования [10,11].
3. Активация противоопухолевого иммунитета вследствие селективного повреждения клеточных мембран и сосудов злокачественного новообразования [8,9].
4. ФДТ крайне редко осложняется перфорациями, кровотечениями, формированием свищей и рубцовых стенозов [10].
5. Фотосенсибилизаторы последнего поколения нетоксичны, благодаря чему количество курсов ФДТ неограниченно.

Показания к применению эндоскопической ФДТ:

1. Основной органосохраняющий метод малоинвазивного лечения злокачественных новообразований Tis-T1N0M0 стадии для полной эрадикации опухоли.
2. Восстановление проходимости дыхательного и желудочно-кишечного трактов.
3. Циторедукция и стабилизация опухолевого роста.
4. Метод выбора при лечении злокачественных новообразований, когда исчерпаны возможности других методов лечения [10].

По данным Ростовского научно-исследовательского онкологического института (РНИОИ), в случаях, когда другие противоопухолевого лечения были исчерпаны, эндоскопическая ФДТ позволила в 81,8% случаев добиться полного или частичного (уменьшение опухолевого очага более чем на 50%) эффекта [10].

Абсолютных противопоказаний к проведению ФДТ нет. Относительными противопоказаниями к применению эндоскопической ФДТ является тяжелое общесоматическое состояние и нестабильная гемодинамика пациента.

В отделении внутрипросветной диагностики РНИОИ успешно применяется метод эндоскопической фотодинамической терапии (ФДТ) в сочетании с аргон-плазменной коагуляцией (АПК) злокачественных новообразований гортаноглотки и пищевода пациентов при невозможности проведения им хирургического или комбинированного лечения.

Пациент К., 59 лет, был направлен в РНИОИ с диагнозом рак гортаноглотки T2N0M0, стадия 2, клиниче-

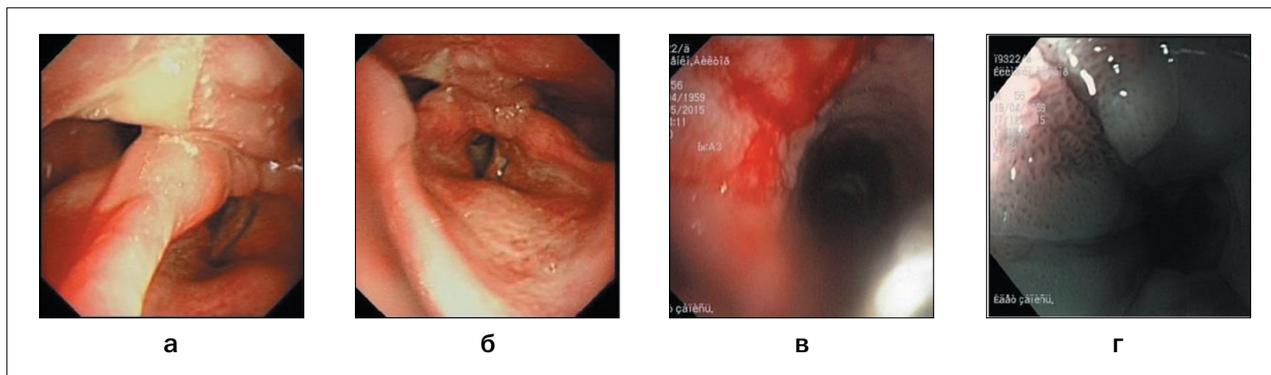


Рис. 1. Результаты видеоларингоскопии и видеоэзофагоскопии:
 а, б – резидуальная опухоль задней стенки гортаноглотки;
 в – рак устья пищевода с вовлечением его верхней трети (г – осмотр в режиме узкоспектральной эндоскопии)

Fig. 1. Results of videolaryngoscopy and videoesophagoscopy:
 а, б – residual tumor of the hypopharynx posterior wall;
 в – cancer of the mouth of the esophagus with the involvement of its upper third (г – narrow-band imaging endoscopy examination)

ская группа 2. Заключение гистологического исследования – умеренно дифференцированный плоскоклеточный рак без ороговения, G2. Сопутствующие заболевания: ишемическая болезнь сердца, стабильная стенокардия, постинфарктный кардиосклероз (2005 г.), хроническая сердечная недостаточность, миокардиодистрофия, артериальная гипертензия 3 стадии, язвенная болезнь желудка в стадии ремиссии.

По результатам компьютерной томографии грудной клетки, брюшной полости, ультразвукового исследования органов шеи и брюшной полости данных о наличии регионарных и отдаленных метастазов опухоли не выявлено. В апреле 2015 г. пациенту выполнено комбинированное химиолучевое лечение (конформная лучевая терапия РОД = 2,4 Гр x 5 фракций в неделю, СОД = 40 Гр), также проведена таргетная химиотерапия препаратом цетуксимаб в суммарной дозе препарата 1800 мг.

Через 1,5 мес после лечения пациенту была выполнена контрольная видеоларингоскопия (ВЛС): слизистая черпаловидных хрящей отечная, гиперемированная, над черпаловидными хрящами по задней стенке гортаноглотки визуализируется опухолевый инфильтрат размером 2x2,5 см с изъязвлением треугольной формы 0,8 см. Инфильтрат распространяется по задней стенке глотки, дорзальнее черпаловидных хрящей гортани, его нижний край визуализируется в области нижней трети левого гортановидного синуса (рис. 1а, б).

Жалобы на дисфагию у пациента отсутствовали, однако, учитывая данные раннее проведенного нами исследования о частом вовлечении пищевода при раке ротогортаноглотки [11], было решено выполнить видеоэзофагоскопию (ВЭС). При осмотре в узкоспектральном режиме в области устья пищевода и сразу же за ним циркулярно на протяжении 4 см слизистая пищевода имеет патологически измененный рельеф и атипичный сосу-

дистый рисунок, имеющий характерные признаки неоплазии (рис. 1в, г). Патологические изменения более выражены на латеральных стенках пищевода. Выполнена биопсия. Результат гистологического исследования: плоскоклеточный рак, G2.

С апреля по июнь 2015 г. пациенту был проведен второй этап химиолучевого лечения: РОД = 2,4 Гр и 1 Гр x 5 фракций в неделю (СОД = 60 Гр на первичный очаг и 50 Гр – на региональные лимфоузлы), цетуксимаб в суммарной дозе 3400 мг. При контрольной ВЛС через 1,5 мес опухоль в гортаноглотке не обнаружена, однако при осмотре в узкоспектральном режиме обнаружена резидуальная опухоль в устье пищевода и его верхней трети, подтвержденная морфологически (рис. 2а, б).

В связи с исчерпанными возможностями химиолучевой терапии медицинским консилиумом было принято решение о назначении пациенту ФДТ пораженной области.

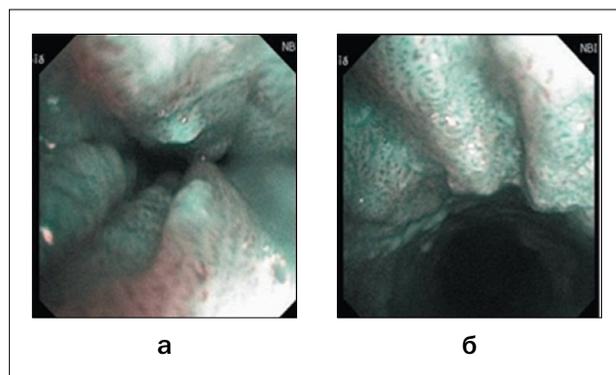


Рис. 2. Остаточная опухоль пищевода (осмотр в узкоспектральном режиме эндоскопии):
 а – устье пищевода;
 б – верхняя треть пищевода

Fig. 2. Residual esophageal tumor (narrow-band imaging endoscopy examination):
 а – the mouth of the esophagus;
 б – upper third of the esophagus

Все сеансы ФДТ проводили через 2 ч после внутривенного, капельного введения препарата фотодитазин (ООО «БЕТА-ГРАНД», Россия, регистрационное удостоверение №ЛС 001246 от 18.05.2012) в дозе 1 мг/кг массы тела с использованием видеогастроскопа GIF N-180 EXERA II (Olympus, Япония) под общим интубационным наркозом при искусственной вентиляции легких. Эндоскоп с установленным на его дистальный конец прозрачным колпачком был введен в гортаноглотку, через его инструментальный канал был введен кварцевый световод с цилиндрическим диффузором длиной 2 см. Световод позиционирован на расстоянии 1 мм от опухоли. Затем, с использованием источника лазерного излучения ($\lambda=662$ нм) (Лакта-Милон, Россия) поверхность опухоли была облучена светом. Мощность лазерного излучения составила 1000 мВт, плотность энергии 200 Дж/см². Облучение выполнено с 4 позиций в гортаноглотке, а также с 6 полей в пищеводе. Время облучения в каждой точке составило 4 мин.

В течение первой недели после ФДТ у пациента сохранялся умеренно выраженный болевой синдром в области гортаноглотки, купированный приемом нестероидных противовоспалительных средств (нимесулид).

Спустя 10 дней после ФДТ выполнена контрольная ВЛС: выявлен некроз опухоли с фибринозными наложениями, гиперемия и отек окружающей слизистой оболочки (рис. 3а, б).

Всего в течение года пациенту было выполнено 7 курсов ФДТ под общим наркозом с интервалом 1,5–2 мес, при этом трижды ФДТ проводили в сочетании с аргоно-плазменной коагуляцией экзофитного компонента опухоли (0,8 см) с помощью электрохирургического блока ERBE VIO 300 D. Через 3 нед после каждого курса ФДТ выполняли контрольные эндоскопические исследования гортаноглотки и пищевода. В ходе каждого осмотра

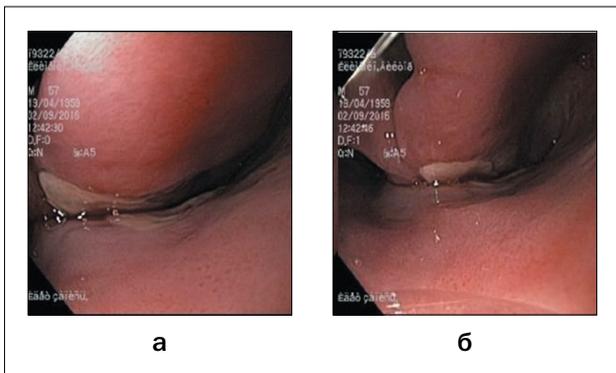


Рис. 3. Результаты видеоларингоскопии, выполненной после 1-го курса ФДТ:

а, б – фаза некроза опухоли гортаноглотки

Fig. 3. Results of videolaryngoscopy performed after the 1st PDT session:

а, б – necrosis phase of the hypopharynx tumor

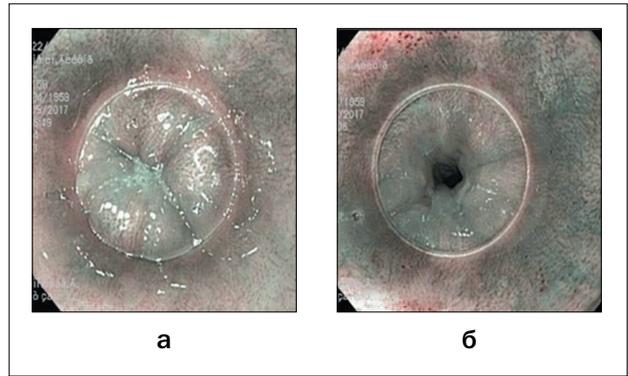


Рис. 4. Результаты узкоспектральной эндоскопии, выполненной после 7 курсов ФДТ:

а – полная регрессия опухолевой инфильтрации устья пищевода;

б – полная регрессия опухолевой инфильтрации верхней трети пищевода

Fig. 4. Results of narrow-band imaging endoscopy performed after 7 PDT sessions:

а – complete regression of tumor infiltration of the mouth of the esophagus;

б – complete regression of tumor infiltration of the upper third of the esophagus



Рис. 5. Рецидив рака пищевода в области его устья (осмотр в режиме NBI)

Fig. 5. Recurrence of cancer in the mouth of the esophagus (NBI examination)

констатировали положительную динамику в виде постепенного уменьшения размеров резидуальной опухоли.

После 7-го курса был получен полный эндоскопический эффект в виде исчезновения инфильтрации слизистой гортаноглотки, устья и верхней трети пищевода (рис. 4а, б).

Спустя 2 мес в устье пищевода на 7 ч в положении пациента на левом боку выявлен участок шероховатой слизистой диаметром около 1 см, с признаками неоплазии. После биопсии получен гистологический результат – плоскоклеточный рак G2 (рис. 5).

Был проведен 8-й курс ФДТ с АПК. На контрольной ВЛС через 1 мес выявлена полная регрессия опухоли без рубцовой деформации и сужения просвета пищевода (рис. 6). На данный момент длительность безрецидивного периода составляет 3 мес. Пациент жалоб не отмечает. Проводится динамическое наблюдение.

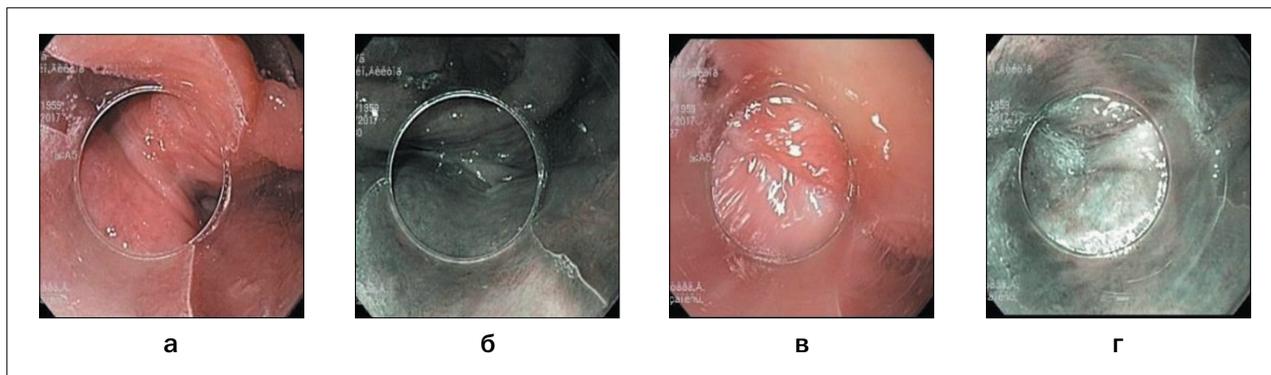


Рис. 6. Результаты контрольной видеоларингоскопии, выполненной после 8 курсов ФДТ (б, г – осмотр в режиме NBI):
 а, б – полная регрессия опухолевой инфильтрации гортаноглотки;

Fig. 6. Results of control videolaryngoscopy performed after 8 PDT sessions esophagus (б, г – NBI examination):
 а, б – complete regression of the hypopharynx tumor infiltration;
 в, г – complete regression of the tumor in the mouth of the esophagus

Закключение

Описанное клиническое наблюдение свидетельствует о том, что фотодинамическая терапия резидуальных опухолей гортаноглотки и пищевода в соче-

тании с аргоноплазменной коагуляцией показывает высокую эффективность и может служить методом выбора лечения у пациентов с злокачественными новообразованиями данной локализации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пачес А.И., Олшанский В.О., Любаев В.Л., Туок Т.Х. Злокачественные опухоли полости рта, глотки и гортани. – М.: Медицина, 1988. – 304 с.
2. Руководство по онкологии / под ред. В.И. Чиссова, С.Л. Дарьяловой. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. – 904 с.
3. Состояние онкологической помощи населению России в 2016 году / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. – 236 с.
4. Акопов А.Л., Казаков Н.В., Русанов А.А., Карлсон А. Механизмы фотодинамического воздействия при лечении онкологических больных // Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. – 2015. – Т. 4, № 2. – С. 9–16. <https://doi.org/10.24931/2413-9432-2015-4-2-9-16>
5. Agarwal R., Korman N.J., Mohan R.R., et al. Apoptosis is an early event during phthalocyanine photodynamic therapy-induced ablation of chemically induced squamous papillomas in mouse skin // *J. Photochem Photobiol.* – 1996. – Vol. 63, No. 4. – P. 547–552.
6. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics // *Brit. J. Cancer.* – 1972. – Vol. 26. – P. 239–257.
7. Oleinick N.L., Morris L., Varnes M.E. The peripheral benzodiazepine photosensitizer Pc4 // *J. Photochem. and Photobiol.* – 2002. – Vol.75(6). – P. 652–661.
8. Krosli G., Korbek M. Potentiation of photodynamic therapy by immunotherapy: the effect of schizophyllan (SPG) // *Cancer Lett.* – 1994. – Vol. 84. – P. 43–49.
9. Coutier S., Bezdetnaya L., Marchal S., et al. Foscan (mTHPC) photosensitized macrophage activation: enhancement of

REFERENCES

1. Paches A.I., Ol'shanskij V.O., Lyubaev V.L., Tuok T.H. *Zlokachestvennye opuholi polosti rta, glotki i gortani* [Malignant tumors of oral cavity, pharynx and larynx]. Moscow, Meditsina Publ., 1988. 304 p.
2. *Rukovodstvo po onkologii* [Guide to Oncology] by eds V.I. Chissov, S.L. Dar'yalova. Moscow, ООО "Meditsinskoe informacionnoe agentstvo" Publ., 2008. 904 p.
3. *Sostoyanie onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossii v 2016 godu* [Evaluation of the oncological help to the population of Russia in 2016] by eds Kaprin A.D., Starinskiy V.V. Moscow, MNI OI im. P.A. Gertsena – filial FGBU «NMIRC» Minzdrava Rossii Publ., 2017. 236 p.
4. Akopov A.L., Kazakov N.V., Rusanov A.A., Karlson A. The mechanisms of photodynamic action for treating of cancer patients, *Photodynamic therapy and photodiagnosis*, 2015, vol. 4, no. 2, pp. 9–16. (in Russian) <https://doi.org/10.24931/2413-9432-2015-4-2-9-16>
5. Agarwal R., Korman N.J., Mohan R.R., Feyes D.K., Jawed S., Zaim M.T., Mukhtar H. Apoptosis is an early event during phthalocyanine photodynamic therapy-induced ablation of chemically induced squamous papillomas in mouse skin, *J. Photochem Photobiol.*, 1996, vol. 63, no. 4, pp. 547–552.
6. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Brit. J. Cancer*, 1972, vol. 26, pp. 239–257.
7. Oleinick N. L., Morris L., Varnes M. E. The peripheral benzodiazepine photosensitizer Pc4, *J. Photochem. and Photobiol.*, 2002, vol. 75(6), pp. 652–661.
8. Krosli G., Korbek M. Potentiation of photodynamic therapy by immunotherapy: the effect of schizophyllan (SPG), *Cancer Lett.*, 1994, vol. 84, pp. 43–49.
9. Coutier S., Bezdetnaya L., Marchal S., Melnikova V., Belitchenko I., Merlin J.L., Guillemin F. Foscan (mTHPC) photosensitized mac-

- phagocytosis, nitric oxide release and tumour necrosis factor-alpha-mediated cytolytic activity // *Br. J. Cancer*. – 1999. – Vol. 81. – P. 37–42.
10. Legostaev V.M., Babenkov O.Yu., Maldonado G.M., et al. Endoscopic photodynamic therapy of malignant tumors as a method of choice with exhausted possibilities of other methods of treatment / *Materials XLIX International Scientific and Practical Conference "Application of Lasers in Medicine and Biology" and "2nd Gamaleia's Readings"*. – Kharkiv, 2018. – 42–47 p.
 11. Кравченко А.Б., Легостаев В.М., Бабенков О.Ю., Носов В.А. Скрининговая эзофагоскопия у пациентов, направленных на эндоскопическое исследование дыхательных путей / Всероссийская молодежная конференция «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии». Сборник тезисов. – Ростов-на-Дону, 2016. – С. 60.
10. Legostaev V.M., Babenkov O. Yu., Maldonado G. M., Islamova E.F., Balitsky G.V. Endoscopic photodynamic therapy of malignant tumors as a method of choice with exhausted possibilities of other methods of treatment in *Materials XLIX International Scientific and Practical Conference "Application of Lasers in Medicine and Biology" and "2nd Gamaleia's Readings"*. Kharkiv, 2018. 42–47 p.
 11. Kravchenko A.B., Legostaev V.M., Babenkov O.Yu., Nosov V.A. Skringovaya ehzofagoskopiya u patsientov, napravlennykh na endoskopicheskoe issledovanie dyhatel'nyh putej [Screening esophagoscopy in patients aimed at endoscopic examination of the respiratory tract] in *Vserossiyskaya molodezhnaya konferenciya «Aktualnye voprosy eksperimentalnoi i klinicheskoy onkologii. Sbornik tezisov. Rostov-na-Donu, 2016. p. 60*

ПРОФЕССОРУ ВИКТОРУ БОРИСОВИЧУ ЛОЩЕНОВУ – 65 ЛЕТ

В январе этого года отметил свое 65-летие директор ООО «Биоспек», заведующий лабораторией лазерной биоспектроскопии в Центре естественно-научных исследований ИОФ РАН, заместитель главного редактора журнала *Biomedical photonics*, профессор Виктор Борисович Лощенов.

Виктор Борисович родился в 1953 году в селе Юрты Иркутской области. Окончил электромеханический факультет Московского Энергетического Института в 1976 году. В 1981 году успешно защитил кандидатскую, а в 2006 году – докторскую диссертацию на тему «Фотодинамическая терапия и флуоресцентная диагностика онкологических заболеваний: разработка и внедрение в клиническую практику». В 2007 году Виктору Борисовичу присуждено звание профессора по специальности лазерная физика. С 1982 года В.Б. Лощенов работает над разработкой и созданием современной медицинской диагностической аппаратуры.

Виктор Борисович Лощенов внес неоспоримый вклад в развитие биомедицинской фотоники в России и в мире в целом. Являясь новой междисциплинарной областью, связывающей фундаментальные исследования по взаимодействию света с биологическими тканями с инновационными технологиями синтеза флуоресцирующих диагностических и обладающих фотоцитотоксическим действием терапевтических лекарственных препаратов и прикладными исследованиями по взаимодействию фотосенсибилизаторов с излучением в биологических тканях, она стала платформой для разработки новых лекарственных препаратов (фотосенсибилизаторов), медицинских приборов, а также для создания Школы подготовки специалистов по медицинской биофотонике.

С 1985 года Виктор Борисович возглавляет лабораторию лазерной биоспектроскопии в Центре естественно-научных исследований ИОФ РАН. Кроме разработок в области онкологии, данная лаборатория занимается направлениями диагностики и лечения атеросклероза, доброкачественных образований кожи, ряда офтальмологических заболеваний. В последнее время особое внимание уделяется использованию нанотехнологий в медицине для прецизионной фототерапии, что позволит расширить области применения в стоматологии, лечении артритов и резистентных к антибиотикам воспалений.

Лощенов В.Б. является генеральным директором ООО «Биоспек» с момента его основания в 1993 году



на базе лаборатории лазерной биоспектроскопии. Компания является наиболее заметным и успешным предприятием на российском рынке оборудования для ФД и ФДТ злокачественных новообразований и ряда других заболеваний. На основе лазерно-спектроскопических и видео-флуоресцентных методов созданы приборы для диагностики и лечения онкологических заболеваний различной локализации, которые используются более чем в 50 ведущих научных центрах и клиниках 15 городов РФ и в клиниках 17 зарубежных стран.

Под руководством профессора Лощенова В.Б. защищены около 20 диссертаций. В руководимой лаборатории выполнено более 40 (включая 7 докторских) диссертаций по разработанным методам и на созданном оборудовании. Лощенов Виктор Борисович имеет более 500 научных публикаций, в том числе более 60 патентов. Неоднократно выступал на международных и российских конференциях и семинарах с приглашенными докладами и был председателем секций. В 1981 году был удостоен звания лауреата премии Ленинского Комсомола в области науки, в 2001 году – звания лучший менеджер РАН.

Редколлегия журнала «Biomedical photonics», коллеги и друзья от всего сердца поздравляют Виктора Борисовича, желают крепкого здоровья, благополучия, а также профессиональных и творческих успехов!

ПРОФЕССОРУ ЕВГЕНИЮ АНТОНОВИЧУ ЛУКЬЯНЦУ – 80 ЛЕТ

21 июля 2018 г. отметил свой 80-летний юбилей известный ученый в области синтеза макрогетероциклических соединений, лауреат государственных наград и премий, профессор Евгений Антонович Лукьянец.

Евгений Антонович родился на Украине. В 1961 г. стал выпускником химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. В 1964 г. защитил диссертацию кандидата химических наук, в 1979 г. – диссертацию доктора химических наук. С 1980 года Евгений Антонович является профессором по специальности органическая химия.

С декабря 1964 г. Е.А. Лукьянец работает в Научно-исследовательском институте органических полупродуктов и красителей (НИОПИК). В 1967 г. возглавил лабораторию синтеза функциональных красителей, стал главным химиком предприятия с 1983 г. Под его руководством и при непосредственном участии в институте были начаты исследования в области функциональных красителей для различных современных областей техники и медицины, а также разработаны оригинальные методы синтеза макрогетероциклических соединений – широкого круга замещенных фталоцианинов, их конденсированных и аза-аналогов, производных тетраазпорфина (порфиразина) и тетрабензопорфиринов и других соединений. К успехам лаборатории Евгения Антоновича относится создание ряда веществ с уникальными свойствами, которые впоследствии стали успешно применяться в лазерной технике, электронике и микроэлектронике, области записи информации, технологиях тонкого органического синтеза, экологии и медицине. Другой областью интересов Е.А. Лукьянца являлись исследования органических люминофоров (производных бензоксазола, кумарина, родамина, феноксазина, феналенона), на основе которых были созданы красители для лазерной техники.

На протяжении долгого времени основные исследования Евгения Антоновича посвящены синтезу и модификации соединений, предназначенных для фотодинамической терапии и диагностики злокачественных и ряда других заболеваний. В



результате были разработаны новые эффективные фотосенсибилизаторы, два из которых – сульфированный фталоцианин алюминия (фотосенс) и 5-аминолевулиновая кислота (аласенс) – разрешены к медицинскому применению на территории РФ и успешно используются в лечении онкологических пациентов.

Е.А. Лукьянец является автором более 600 научных публикаций и патентов, под его руководством подготовлено около 20 кандидатских диссертаций. Евгений Антонович – обладатель двух наград в области новых технологий – Государственной премии Украины (1974) и Премии Совета Министров СССР (1982), имеет несколько орденов и медалей. В 2008 году заслуги профессора были отмечены Международным обществом порфиринов и фталоцианинов вручением награды имени Р.П. Линстеда за достижения в химии фталоцианинов.

Коллектив редакции журнала «Biomedical photonics», коллеги и друзья сердечно поздравляют Евгения Антоновича, искренне желают крепкого здоровья и долгих лет активной жизни, а также новых профессиональных успехов и достижений!

ТРЕБОВАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ СТАТЕЙ

Настоящие правила разработаны в соответствии с «Едиными требованиями к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», которые разработаны Международным комитетом редакторов медицинских журналов (International Committee of Medical Journal Editors).

Представленные в работе данные должны быть оригинальными. Не допускается направление в Редакцию работ, которые уже напечатаны или посланы для публикации в другие редакции. Ответственность за предоставление материалов, полностью или частично опубликованных в другом печатном издании, несет Автор. Все направленные в Редакцию Журнала рукописи проходят проверку системой «Антиплагиат», в соответствии с требованиями Журнала оригинальность статьи должна быть не менее 70%.

Статьи в Редакцию Журнала подают через форму на сайте Журнала www.pdt-journal.com. Для этого Автору, ответственному за контакты с Редакцией, необходимо пройти процедуру регистрации, после чего появляется техническая возможность направить статью в Редакцию через специальную форму. Формат загружаемого файла doc. или docx.

Метаданные необходимо дополнительно внести в отдельную электронную форму.

Дополнительно отдельными файлами просим загрузить рисунки (в том числе графики), используемые в статье, в формате tiff, eps, cdr. с коэффициентом сжатия не менее 8 с разрешением 300 dpi при размере не менее 6 x 9 см, jpg. или jpeg.

Текст статьи набирается в текстовом редакторе (Microsoft Word) кеглем 12 пунктов через 1,5 интервала, желательно шрифтом Times New Roman Cyr, перенос слов не делается. Размеры полей: верхнее и нижнее – 20 мм, левое – 30 мм, правое – 20 мм. Абзацный отступ – 10 мм.

Рекомендуемый объем статьи, включая таблицы и литературу – в пределах 12–15 страниц формата А4. Все страницы должны быть пронумерованы (нумерация страниц начинается с титульной).

Оригинальные статьи согласно общепринятым международным правилам должны содержать следующие разделы: титульная страница, вступление, материалы и методы (можно по отдельности), результаты, обсуждение, заключение, литература.

Титульная страница должна содержать:

- название статьи (выравнивание по центру, заглавные буквы);
- инициалы и фамилию каждого автора (выравнивание по центру);

- названия организаций, в которых работают авторы (если автор работает и выполнял исследования в нескольких организациях, желательно указывать названия всех организаций), города и страны (выравнивание по центру, названия организаций должны быть даны в соответствии с данными портала e-library, в случае нескольких организаций перед названием каждой указывается порядковый номер в формате верхнего индекса и после фамилии каждого автора также верхним индексом обозначается его принадлежность к определенной организации или организациям);
- резюме статьи в неструктурированном виде (без выделения отдельных разделов) объемом 150–200 слов;
- ключевые слова (5–10 слов);
- контактную информацию для общения читателей с ответственным автором для публикации в свободном доступе (e-mail);
- ссылку на статью для цитирования.

На английском языке необходимо продублировать: фамилию и инициалы автора(ов), название статьи, аннотацию, ключевые слова.

В тексте следует использовать только общепринятые сокращения (аббревиатуры). Не следует применять сокращения в названии статьи. Полный термин, вместо которого вводится сокращение, следует расшифровывать при первом упоминании его в тексте (не требуют расшифровки стандартные единицы измерения и символы).

При представлении результатов статистического анализа данных обязательным является указание использованного программного пакета и его версии, названий использованных статистических методов, приведение описательной статистики и точных уровней значимости при проверке статистических гипотез. Для основных результатов исследования рекомендуется рассчитывать доверительные интервалы.

Единицы измерения физических величин, гематологические, биохимические и другие показатели величин, применяемые в медицине, должны представляться в единицах метрической системы (Международной системы единиц – СИ). При названии различных соединений необходимо использовать терминологию ИЮПАК.

Таблицы, рисунки и текст должны дополнять друг друга, а не дублировать.

Используемый в статье иллюстративный материал (фотографии, рисунки, чертежи, диаграммы) должен быть контрастным, рисунки – четкими. На микрофо-

тографиях необходимо указать метод окраски, увеличение. Все подписи, используемые в схемах, графиках и т.д., а также названия рисунков должны быть продублированы на английском языке через “/”.

Таблицы и рисунки нумеруются в соответствии с порядком их цитирования в тексте. Каждая таблица должна иметь краткое название и иметь ссылки в тексте. Заголовки граф должны точно соответствовать их содержанию. Использованные в таблице сокращения подлежат расшифровке в конце таблицы.

Библиография должна быть приведена в конце статьи и оформлена в соответствии с ГОСТ Р 7.0.5–2008, в самом же тексте следует указывать только номер ссылки в квадратных скобках цифрами. Ссылки нумеруются в порядке цитирования. В список литературы не включают неопубликованные работы. Не допускаются ссылки на диссертации, тезисы, сборники конференций и авторефераты диссертаций.

За точность библиографии несет ответственность Автор.

Пример оформления списка литературы:

1. Миронов А.Ф. Фотодинамическая терапия – новый эффективный метод диагностики и лечения злокачественных опухолей // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 8. – С. 32–40.
2. Кармакова Т.А., Филоненко Е.В., Феофанов А.В. и соавт. Динамика накопления и распределение АЛК-индуцированного протопорфирина IX в ткани базальноклеточного рака // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 26.
3. Фут К. Свободные радикалы в биологии // пер. с англ. – М.: Мир, 1979. – Т. 2. – С. 96 – 150.
4. Castano A.P. et al. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization // Photodiag. Photodynam. Ther. – 2004. – Vol. 1. – P. 279–293.

Все статьи, поступающие в редакцию, проходят многоступенчатое рецензирование, замечания

рецензентов направляются Автору без указания имен рецензентов. После получения рецензий и ответов Автору редколлегия принимает решение о публикации (или отклонении) статьи.

Редакция оставляет за собой право отклонить статью с направлением автору мотивированного отказа в письменной форме. Очередность публикации статей устанавливается в соответствии с редакционным планом издания журнала.

Редакция журнала оставляет за собой право сокращать и редактировать материалы статьи. Небольшие исправления стилистического, номенклатурного или формального характера вносятся в статью без согласования с автором. Если статья перерабатывалась автором в процессе подготовки к публикации, датой поступления считается день поступления окончательного текста.

Публикация статей в журнале бесплатная.

Подавая статью в Редакцию Журнала, Автор подтверждает, что Редакции передается бессрочное право на оформление, издание, передачу Журнала с опубликованным материалом Автора для целей реферирования статей из него в любых Базах данных, распространение Журнала/авторских материалов в печатных и электронных изданиях, включая размещение на выбранных либо созданных Редакцией сайтах в сети Интернет, в целях доступа к публикации любого заинтересованного лица из любого места и в любое время, перевод статьи на любые языки, издание оригинала и переводов в любом виде и распространение по территории всего мира, в том числе по подписке. Автор гарантирует, что статья является оригинальным произведением и использование Редакцией предоставленного им авторского материала не нарушит прав третьих лиц.

Примечание. Представление статьи для публикации в журнале подразумевает согласие Автора(ов) с опубликованными правилами.