

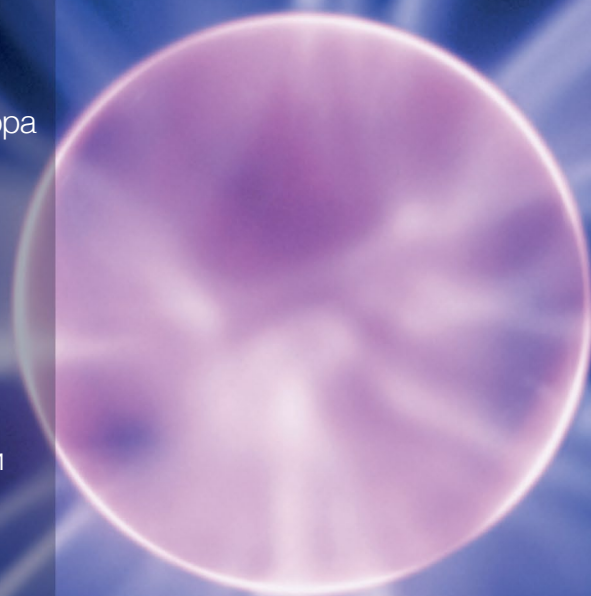
BIOMEDICAL

PHOTONICS

Том 8, № 1, 2019

В НОМЕРЕ:

- Разработка технологии получения наночастиц на основе PLGA и дипропоксикабактериопуринимида. Оценка физико-химических биологических свойств полученной системы доставки
- Солюбилизация гидрофобного фотосенсибилизатора бактериохлоринового ряда в мицеллах поверхностно-активных веществ
- Фотодинамическая терапия пациентов с внутрикожными метастазами диссеминированной меланомы кожи
- Повышение эффективности диагностики рака мочевого пузыря при использовании цистоскопии с гексильным эфиром 5-АЛК
- Лазерная флуоресцентная спектроскопия и оптическая тканевая оксиметрия в диагностике фиброза кожи
- Оптический спектроанализатор с расширенным динамическим диапазоном для фармакокинетических исследований флуоресцирующих препаратов в биотканях



BMP

ДИСТРИБЬЮЦИЯ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ
ТЕРАПИИ И ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ НА
ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И СТРАН СНГ



- + «ФОТОДИТАЗИН»[™]
- + «ФОТОСЕНС»[™]
- + «АЛАСЕНС»[™]
- + «ЛЕВУЛОН»[™]

Лицензия № ЛО-54-02-001917 от 22 декабря 2015 г. на осуществление фармацевтической деятельности.



ЗАО «Компания Витамакс»

Россия, 630001, г. Новосибирск, ул. Калинина, 57
Для писем: 630001, г. Новосибирск, а/я 310
Тел/факс: 8 (383)225-24-06, 225-53-14

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)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BIOMEDICAL PHOTONICS

FOUNDERS:

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

EDITOR-IN-CHIEF:

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

DEPUTY CHIEF EDITOR:

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

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

EDITORIAL BOARD:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BIOMEDICAL PHOTONICS –

research and practice, peer-reviewed, multidisciplinary journal.

The journal is issued 4 times per year.

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

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

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

The publisher «Agentstvo MORE». Moscow, Khokhlovskiy lane., 9

Editorial staff:

Chief of the editorial staff	Ivanova-Radkevich V.I.
Science editor professor	Mamontov A.S.
Literary editor	Moiseeva R.N.
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

Разработка технологии получения наночастиц на основе PLGA и дипропоксикариопурпуринида. Оценка физико-химических биологических свойств полученной системы доставки

М.Д. Сапельников, Е.Д. Никольская, Н.Б. Морозова, Е.А. Плотникова, А.В. Ефременко, А.В. Панов, М.А. Грин, Р.И. Якубовская 4

Солюбилизация гидрофобного фотосенсибилизатора бактериохлорина в мицеллах поверхностно-активных веществ

Е.А. Плотникова, В.О. Страмова, Н.Б. Морозова, А.Д. Плютинская, П.В. Островерхов, М.А. Грин, А.Ф. Миронов, Р.И. Якубовская, А.Д. Каприн 18

Фотодинамическая терапия пациентов с внутрикожными метастазами диссеминированной меланомы кожи

Д.А. Церковский, Н.А. Петровская, А.Н. Мазуренко 24

Повышение эффективности диагностики рака мочевого пузыря при использовании цистоскопии с гексильным эфиром 5-АЛК

А.Д. Каприн, А.А. Трушин, М.П. Головащенко, В.И. Иванова-Радкевич, В.И. Чиссов, Е.В. Филоненко 29

Лазерная флуоресцентная спектроскопия и оптическая тканевая оксиметрия в диагностике фиброза кожи

Ю.В. Чурсинова, Д.А. Куликов, Д.А. Рогаткин, И.А. Разницына, Д.В. Мосальская, М.А. Бобров, Е.Н. Петрицкая, А.В. Молочков 38

Оптический спектроанализатор с расширенным динамическим диапазоном для фармакокинетических исследований флуоресцирующих препаратов в биотканях

Г.А. Меерович, Е.В. Ахлюстина, Т.А. Савельева, К.Г. Линьков, В.Б. Лощенов 46

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

К истории развития лучевой терапии (часть I)

А.Д. Каприн, Ю.С. Мардынский, В.П. Смирнов, С.А. Иванов, А.А. Костин, С.А. Полихов, И.В. Решетов, А.С. Фатьянова, М.В. Денисенко, Т.В. Эпатова, С.В. Коренев, А.В. Терещенко, Е.В. Филоненко, М.М. Гафаров, Ю.С. Романко 52

ORIGINAL ARTICLES

Development of the technology for obtaining PLGA and dipropoxybacteriopurpurinimide-based nanoparticles. Evaluation of physicochemical and biological properties of the obtained delivery system

Sapelnikov M.D., Nikolskaya E.D., Morozova N.B., Plotnikova E.A., Efremenko A.V., Panov A.V., Grin M.A., Yakubovskaya R.I. 4

Solubilization of hydrophobic bacteriochlorin-based photosensitizer in micelles of surfactants

Plotnikova E.A., Stramova V.O., Morozova N.B., Plyutinskaya A.D., Ostroverkhov P.V., Grin M.A., Mironov A.F., Yakubovskaya R.I., Kaprin A.D. 18

Photodynamic therapy in patients with skin metastases of disseminated melanoma

Tzerkovsky D.A., Petrovskaya N.A., Mazurenko A.N. 24

Improving the efficiency of bladder cancer diagnostic cystoscopy with 5-ALA hexyl ester

Kaprin A.D., Trushin A.A., Golovachenko M.P., Ivanova-Radkevich V.I., Chissov V.I., Filonenko E.V. 29

Laser fluorescent spectroscopy and optical tissue oximetry in diagnostics of skin fibrosis

Chursinova Yu.V., Kulikov D.A., Rogatkin D.A., Raznitsyna I.A., Mosalskaya D.V., Bobrov M.A., Petritskaya E.N., Molochkov A.V. 38

Optical spectroanalyzer with extended dynamic range for pharmacokinetic investigations of photosensitizers in biotissue

Meerovich G.A., Akhlyustina E.V., Savelieva T.A., Linkov K.G., Loschenov V.B. 46

REVIEWS OF LITERATURE

The history of radiation therapy (part I)

Kaprin A.D., Mardynskiy Yu.S., Smirnov V.P., Ivanov S.A., Kostin A.A., Polikhov S.A., Reshetov I.V., Fatianova A.S., Denisenko M.V., Epatova T.V., Korenev S.V., Tereshchenko A.V., Filonenko E.V., Gafarov M.M., Romanko Yu.S. 52

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ PLGA И ДИПРОПОКСИКАРБИОПУРПУРИНИМИДА. ОЦЕНКА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЛУЧЕННОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ

М.Д. Сапельников¹, Е.Д. Никольская², Н.Б. Морозова³, Е.А. Плотникова³,
 А.В. Ефременко^{4,5}, А.В. Панов^{1,6}, М.А. Грин¹, Р.И. Якубовская³

¹МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия

²Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения (ВНЦМДЛ), Москва, Россия

³МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва, Россия

⁴Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

⁵МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁶ЗАО «Институт фармацевтических технологий», Москва, Россия

Резюме

В статье описан процесс разработки технологии получения наночастиц на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA), включающих дипропоксикарбиопурпуринимид (DPBPI) и предназначенных для фотодинамической терапии (ФДТ) злокачественных новообразований различного генеза. В работе подобраны технологические параметры, позволяющие оптимизировать метод получения наночастиц с заданными характеристиками, в результате был получен образец сферических частиц, обладающая средним диаметром частиц $222,6 \pm 2,8$ нм; ξ -потенциалом $-26,3 \pm 4,61$ мВ; индексом полидисперсности 0,144; общее содержание DPBPI в частицах PLGA-DPBPI составило 13,6%. В соответствии с разработанной методикой была осуществлена наработка партии наночастиц PLGA-DPBPI для дальнейших биологических исследований. В экспериментах *in vitro* на клетках немелкоклеточной карциномы легкого человека A549 для DPBPI, доставленного в клетки с помощью наночастиц PLGA-DPBPI, и эмульсии на основе кремофора EL (CrEL-DPBPI) было показано сходное внутриклеточное распределение (концентрирование в везикулярных клеточных структурах и диффузное распределение в цитоплазме), а также была показана высокая фотоиндуцированная активность и отсутствие темновой цитотоксичности в случае использования частиц PLGA-DPBPI. Изучение специфической активности наночастиц PLGA-DPBPI *in vivo* на модели саркомы мягких тканей мыши S37 показало селективное накопление DPBPI в опухолевой ткани и практически полное выведение DPBPI из организма в течение 48 ч, а также выраженную противоопухолевую эффективность при ФДТ.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, наночастицы, PLGA, фотосенсибилизатор, фотоиндуцированная активность, фотоиндуцированная противоопухолевая эффективность, дипропоксикарбиопурпуринимид.

Для цитирования: Сапельников М.Д., Никольская Е.Д., Морозова Н.Б., Плотникова Е.А., Ефременко А.В., Панов А.В., Грин М.А., Якубовская Р.И. Разработка технологии получения наночастиц на основе PLGA и дипропоксикарбиопурпуринимида. Оценка физико-химических и биологических свойств полученной системы доставки // Biomedical Photonics – 2019. – Т. 8, № 1. – С. 4–17. doi: 10.24931/2413-9432-2019-8-1-4-17.

Контакты: Сапельников М.Д., e-mail: maxsapelnikov@gmail.com

DEVELOPMENT OF THE TECHNOLOGY FOR OBTAINING PLGA AND DIPROPOXYBATERIOPURPURINIMIDE-BASED NANOPARTICLES. EVALUATION OF PHYSICO-CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE OBTAINED DELIVERY SYSTEM

Sapelnikov M.D.¹, Nikolskaya E.D.², Morozova N.B.³, Plotnikova E.A.³,
 Efremenko A.V.^{4,5}, Panov A.V.^{1,6}, Grin M.A.¹, Yakubovskaya R.I.³

¹Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "MIREA – Moscow Technological University", Moscow, Russia

²Russian research center for molecular diagnostics and therapy (RCMDT), Moscow, Russia

³P.A. Herzen Moscow Oncology Research Center – branch of FSBI NMRRC of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

⁴Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁵Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁶ZAO "Institute of pharmaceutical technologies", Moscow, Russia

Abstract

The article describes the process of developing a technology for producing nanoparticles based on a copolymer of lactic and glycolic acids (PLGA) containing dipropoxybacteriopurpurinimide (DPBPI) for photodynamic therapy of malignant tumors of various origins. Technological parameters for optimizing the method in order to obtain nanoparticles with specified characteristics are presented in this paper. As a result, the nanoparticles sample with an average particle diameter of 222.6 ± 2.8 nm; ξ -potential 26.3 ± 4.61 mV; polydispersity index 0.144; the total content of DPBPI in PLGA-DPBPI nanoparticles 13.6% were obtained. In accordance with the developed technique, the batch of PLGA-DPBPI nanoparticles was developed for further biological studies. In vitro experiments on A549 human non-small cell lung carcinoma for DPBPI, delivered as a part of PLGA-DPBPI nanoparticles, and an EL cremophor-based emulsion (CrEL-DPBPI) showed a similar intracellular distribution (concentrated in vesicular cell structures and diffusely distributed in cytoplasm), as well as high photo induced activity and the absence of dark cytotoxicity in case of PLGA-DPBPI nanoparticles. The study of the PLGA-DPBPI nanoparticles specific activity in vivo on the S37 mouse soft tissue sarcoma model showed the selective accumulation of DPBPI in tumor tissue and the almost complete elimination of DPBPI from the body within 48 hours, as well as significant antitumor efficacy in PDT.

Keywords: photodynamic therapy, nanoparticles, PLGA, photosensitizer, photoinduced activity, photoinduced antitumor efficacy, dipropoxybacteriopurpurinimide.

For citations: Sapelnikov M.D., Nikolskaya E.D., Morozova N.B., Plotnikova E.A., Efremenko A.V., Panov A.V., Grin M.A., Yakubovskaya R.I. Development of the technology for obtaining PLGA and dipropoxybacteriopurpurinimide-based nanoparticles. Evaluation of physicochemical and biological properties of the obtained delivery system, *Biomedical Photonics*, 2019, vol. 8, no. 1, pp. 4–17. (in Russian) doi: 10.24931/2413-9432-2019-8-1-4-17.

Contacts: Sapelnikov M.D., e-mail: maxsapelnikov@gmail.com

Введение

На сегодняшний день тема разработки и получения новых лекарственных форм (ЛФ) гидрофобных веществ, имеющих высокую фармакологическую активность, является актуальной. Одной из перспективных ЛФ, применяемой в указанных целях, являются наночастицы на основе биodeградируемых сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA). Данная форма позволяет влиять на процессы доставки и депонирования лекарственных средств в органах и тканях-мишенях [1, 2]. Частицы со средним диаметром около 200 нм эффективно накапливаются как в органах и тканях со злокачественными новообразованиями, так и подвергаются интернализации опухолевыми клетками [1]. Использование PLGA с терминальной карбоксильной группой и соотношением мономерных звеньев 50:50 позволяет получать частицы с меньшим диаметром по сравнению с другими соотношениями мономеров молочной и гликолевой кислот, данный эффект обусловлен его физико-химическими свойствами [3].

Одной из групп новых соединений, в отношении которых применение вышеуказанной ЛФ актуально, являются фотосенсибилизаторы (ФС), используемые для фотодинамической терапии (ФДТ) онкологических заболеваний. В частности, интерес представляют бактериохлорины с интенсивным поглощением в ближней ИК-области спектра, поскольку их терапевтическое окно поглощения (750–850 нм) расширяет возможности для диагностики и лечения злокачественных новообразований за счет проникновения в ткани на глубину до 20–25 мм и включения в используемые в настоящее время методы лечения более крупных и/или более глубокозалегающих в тканях опухолей.

Для большинства бактериохлоринов можно выделить общие недостатки, ограничивающие их применение в клинической практике [2]:

- низкая растворимость в воде, что приводит к ограничению применяемой дозы;
- недостаточный уровень селективности и накопления лекарственных веществ в опухолевых

тканях и, как следствие, снижение эффективности ФДТ;

- короткое время циркуляции и низкий уровень накопления ФС в органах и тканях-мишенях.

Таким образом, при получении новых форм для данной группы веществ важно учитывать вышеуказанные недостатки и подбирать оптимальную систему доставки, способную их преодолеть и повысить результативность метода ФДТ.

Идея терапевтического использования наночастиц на основе PLGA, содержащих дипропоксикабактериопурпуринимид (DPBPI), подразумевает избирательную доставку и контролируемое во времени высвобождение фотоактивной субстанции в опухолевой ткани, за счет чего снижается неспецифическая токсичность препарата, а также повышается его противоопухолевая эффективность. Кроме того, данная ЛФ позволяет обеспечивать длительное хранение препарата, а также быстрый и простой способ приготовления его потребительской формы.

Материалы и методы

Разработка технологии получения наночастиц PLGA-DPBPI

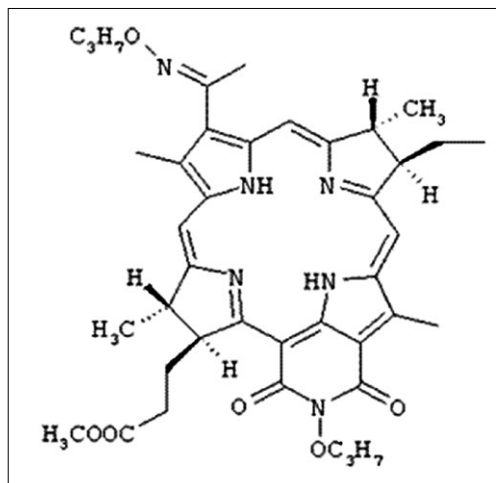
Используемые материалы

В работе использовали образец (DPBPI), полученный на кафедре химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии имени Н.А. Преображенского Российского технологического университета. Структурная формула

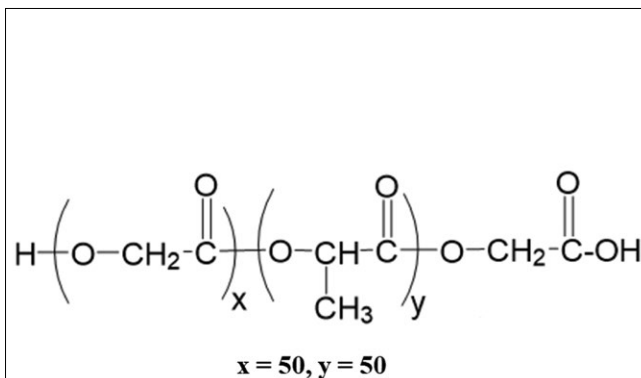
DPBPI приведена на рис. 1. Концентрацию DPBPI в образцах наночастиц и эмульсиях на основе кремофора определяли спектрофотометрически в длинноволновом максимуме поглощения ($\lambda = 802$ нм) с использованием коэффициента молярной экстинкции 30000 л/(моль·см) [4].

Метод получения наночастиц PLGA-DPBPI

В 2,0 мл хлористого метилена растворяли 3,0 мг DPBPI и 50,0 мг PLGA-COOH (вязкость – 0,17 дл/г в гексафторизопропанол, LACTEL® (Absorbable Polymers, США)) при перемешивании на магнитной мешалке 15 мин. Полученный раствор по каплям добавляли к 10,0 мл 1%-ого водного раствора поливинилового спирта (ПВС) в склянке Дрекселя на 150 мл и перемешивали с помощью магнитной мешалки Variomag Multipoint (Variomag, США) на скорости 1120 об/мин с помощью магнита 9*32 мм в течение 10 мин с закрытой пробкой. Затем эмульсию подвергали обработке гомогенизатором IKA Ultra Turrax T25 (IKA, Германия) (25000 rpm, 3 раза по 1 мин с интервалом в 1 мин). Из полученной эмульсии удаляли органический растворитель на ротационном испарителе (LABOROTA 4000-EFFICIENT (Heidolph, Германия)) при вакууме 0,9–1,0 кгс/м² и температуре водяной бани 35°C до полного удаления органического растворителя. Затем суспензию центрифугировали при 14000 об/мин в течение 30 мин при +4°C в целях отделения от избыточного количества ПВС. Надосадочную жидкость декантировали, а осадок, содержащий наночастицы, суспендировали в 2 мл дистиллированной воды. Оса-



а



б

Рис. 1. Химические структуры:

- а. Дипропоксикабактериопурпуринимид (DPBPI);
 б. Соплимер молочной и гликолевой кислот (PLGA-COOH 50/50)

Fig. 1. The chemical structures of:

- а. Dipropoxybacteriopurpurinimide (DPBPI);
 б. Copolymer of lactic and glycolic acids (PLGA-COOH 50/50)

док в виде суспензии подвергали обработке ультразвуком (Transsonic T420 (Transsonic, США)) в течение 1 мин, затем добавляли криопротектор (D-маннит, 5,0 мг) и лиофилизировали в течение 24 ч, предварительно последовательно заморозив в морозильной камере (-20°C) и морозильной установке (-70°C). Полученные частицы хранили при +4°C без доступа света.

В соответствии с указанной методикой была осуществлена наработка наночастиц PLGA-DPBPI для дальнейших биологических исследований.

Определение размеров и ξ -потенциала наночастиц PLGA-DPBPI

Размер частиц определяли методом динамического светорассеяния, а ξ -потенциал – электрофоретическим методом. Из испытуемого образца наночастиц PLGA-DPBPI готовили водную суспензию с концентрацией 1 мг/мл. Измерения проводили с помощью анализатора Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments, Великобритания) с использованием стандартизованного протокола исследования (SOP).

Определение содержания воды в лиофилизате наночастиц PLGA-DPBPI методом К.Фишера (полумикрометод)

Испытуемый образец лиофилизата наночастиц PLGA-DPBPI в количестве от 20,0 до 100,0 мг (точная навеска) помещают в сосуд титратора (Metrohm 852 KF Titrando, Швейцария), добавляют 5,0 мл метилового спирта. Проводят титрование титрующим раствором (реактивом Фишера). Реактив Фишера представляет собой раствор серы диоксида, йода и пиридина в метаноле. Прибор автоматически отводит на растворение (или на суспендирование) образца перед анализом 10 с. С учётом значения титра определяют содержание воды. Проводили не менее двух параллельных измерений. Конец титрования определяли потенциометрически.

Содержание воды X (в %) вычисляли по формуле 1:

$$X = [(a - b) \times T \times 100] / v, \quad (1)$$

где a – объём реактива Фишера, израсходованный на титрование в основном опыте, мл; b – объём реактива Фишера, израсходованный на титрование в контрольном опыте, мл; v – навеска наночастиц, г; T – титр реактива Фишера, г/мл.

Определение общего содержания DPBPI и его степени включения в наночастицы PLGA-DPBPI спектрофотометрическим методом

Точная навеска (4,0 мг) лиофилизата наночастиц PLGA-DPBPI была растворена в 5 мл хлороформа. На спектрофотометре Helios α (Thermo Electron, США) регистрировали электронные спектры поглощения полученного раствора в диапазоне длин волн 200–1000

нм. По значениям интенсивности абсорбции раствора при длине волны 802 нм определяли концентрацию DPBPI. Расчет общего содержания DPBPI в образце наночастиц (m_{DPBPI} , мг) проводили следующим образом.

По формуле 2 была рассчитана молярная концентрация DPBPI (в моль/л) в растворе хлороформа:

$$C_m = D_{802} / K, \quad (2)$$

где D_{802} – оптическая плотность раствора образца на длине волны 802 нм, K – коэффициент молярной экстинкции субстанции, равный 30000 л/(моль·см).

Затем, с учётом известной молекулярной массы DPBPI (696,84 г/моль), по формуле 3 была рассчитана массовая концентрация DPBPI (в г/л) в полученном растворе:

$$C = C_m \times M_{DPBPI}, \quad (3)$$

где C_m – молярная концентрация субстанции в растворе, моль/л; M_{DPBPI} – молярная масса субстанции, г/моль.

По формуле 4 была рассчитана масса DPBPI (мг) в растворе хлороформа.

$$m_{DPBPI} = C \times V, \quad (4)$$

где C – массовая концентрация субстанции, мг/мл; V – объём раствора хлороформа, мл.

Общее содержание DPBPI (W_{DPBPI} , мг/г) в полученной партии частиц ($m_{HЧ}$, мг) определяли по формуле 5.

$$W_{DPBPI} = (m_{DPBPI} / m_{HЧ}) \times 1000, \quad (5)$$

где m_{DPBPI} – масса DPBPI в растворе хлороформа, мг; $m_{HЧ}$ – масса исследуемого образца наночастиц PLGA-DPBPI, мг.

Количество включенного DPBPI или степень его включения (S , % масс.) в наночастицы определяли по формуле 6.

$$S = (m_{DPBPI} / m_{загр}) \times 100\%, \quad (6)$$

где m_{DPBPI} – масса DPBPI в растворе хлороформа, $m_{загр}$ – масса DPBPI, изначально загруженная для получения наночастиц

Анализ морфологии наночастиц PLGA-DPBPI методом сканирующей электронной микроскопии

Из испытуемого образца наночастиц PLGA-DPBPI готовили водную суспензию с концентрацией 1 мг/мл, которую наносили с помощью микродозатора на двусторонний углеродный скотч. Оставляли высушить примерно на 20 мин. Изображения образцов получали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JSM-7401F (JEOL, Япония).

Анализ морфологии наночастиц PLGA-DPBPI методом просвечивающей электронной микроскопии

Для проведения данного анализа 5–10 мкл водной суспензии исследуемых образцов наночастиц с кон-

центрацией 1 мг/мл наносили на свежеионизированные угольно-формваровые пленки-подложки, через 2 мин избыток жидкости удаляли фильтровальной бумагой и препараты контрастировали 1%-ым водным раствором ацетата уранила. Препараты анализированы на электронном микроскопе (JEOL 100CX, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Негативы (увеличение в 20000–50000 раз) сканировали с разрешением 1200 dpi (dots per inch – точек на 1 дюйм).

Исследования *in vitro*

Используемые материалы

Для проведения экспериментов *in vitro* в качестве биологической модели были использованы клетки немелкоклеточной карциномы легкого человека линии A549. Культивирование клеток проводили в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10%-ой эмбриональной бычьей сыворотки (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, США) и 2 мМ глутамина (ПанЭко, Россия) при температуре 37°C в 5%-ой атмосфере CO₂, далее называемой полной средой. Клетки пересеивали 2 раза в неделю. Жизнеспособность клеток, использованных в экспериментах, составляла не менее 95%.

*Подготовка образцов для проведения экспериментов *in vitro**

Наночастицы, нагруженные DPBPI (PLGA-DPBPI), суспендировали в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,4) до достижения концентрации 0,3 мМ по активному веществу, получая при этом суспензию (исследуемый образец). Положительный контроль получали путем растирания сухого порошка DPBPI в полиэтиленовом касторовом масле – кремофоре EL (CrEL), с дальнейшей обработкой ультразвуком на ультразвуковой бане в течение 20 мин и последующим разбавлением 50 мМ Na-фосфатным буфером (pH 7,4) до 10% CrEL. Концентрация DPBPI в составе эмульсии кремофора EL (CrEL-DPBPI) составляла 0,6 мМ. В экспериментах использовали свежеприготовленные суспензию PLGA-DPBPI и эмульсию CrEL-DPBPI.

Исследование накопления PLGA-DPBPI в клетках немелкоклеточной карциномы легкого человека A549

Для оценки внутриклеточной интернализации PLGA-DPBPI и CrEL-DPBPI, клетки линии A549 при достижении логарифмической фазы роста высевали на покровные стекла в 24-луночные планшеты (в концентрации 7,5·10⁴ кл/луночка) и инкубировали сутки при +37°C в 5%-ой атмосфере CO₂ до достижения конfluence 70%. Клетки инкубировали с исследуемым образцом и положительным контролем в концентрациях 4 и 8 мкМ в течение 2 ч. Внутриклеточное распределение (визуализировали флуоресценцию DPBPI) изучали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа (ЛСКМ) LSM710META

(Zeiss, Германия). Все конфокальные флуоресцентные изображения были получены с использованием масляноиммерсионного х63 объектива (C-Apochromat, числовая апертура 1,46). Латеральное разрешение составляло 0,3 мкм, аксиальное разрешение – 1,5 мкм. Флуоресценцию образцов возбуждали гелий-неоновым лазером (543 нм). Для регистрации флуоресценции использовали APD-детекцию с длинноволновым барьерным фильтром с границей 655 нм. Полученные изображения были обработаны в программе ImageJ.

*Исследование фотоиндуцированной цитотоксичности PLGA-DPBPI *in vitro**

Для изучения фотоиндуцированной цитотоксичности образца PLGA-DPBPI клетки A549 высевали в 96-луночные плоскодонные планшеты (плотность посева составляла 2,0·10⁴, 1,2·10⁴ и 0,7·10⁴ кл/луночка). Исследуемые образцы вносили в лунки через 24 ч с интервалом концентраций образцов от 14,0 мкМ до 0,010 мкМ, полученных путем двукратного разбавления. Оценку темновой цитотоксичности частиц PLGA-DPBPI проводили через 72 ч после внесения образца к клеткам A549 с плотностью 0,7·10⁴ кл/луночка. Для CrEL-DPBPI оценку темновой цитотоксичности проводили аналогичным образом через 5 и 8 ч.

Оценку фотоиндуцированной цитотоксичности образцов при различной плотности посева клеток A549 проводили после инкубации клеток с образцами в полной среде в тестируемых диапазонах концентраций в течение 2 ч с последующим облучением в течение 15 мин с помощью 500 Вт галогеновой лампы через водный фильтр толщиной 5 см и широкополосный фильтр (пропускание 680–1000 нм, световая доза составляла 13,5 Дж/см²).

Для оценки фотоиндуцированной цитотоксичности исследуемых образцов в зависимости от световой дозы облучения клетки с плотностью 0,7·10⁴ кл/луночка инкубировали с образцами в полной среде в течение 2 ч, затем трижды отмывали средой DMEM без сыворотки, добавляли к клеткам свежую полную среду и проводили облучение с помощью 500 Вт галогеновой лампы через водный фильтр толщиной 5 см и широкополосный фильтр (пропусканием 680–1000 нм) в течение 15 (13,5 Дж/см²), 30 (27,0 Дж/см²) или 45 (40,5 Дж/см²) мин.

После облучения клетки инкубировали в стандартных условиях в течение 3 ч, а затем окрашивали Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, США) и пропидий йодидом (PI) (Sigma-Aldrich, США). Hoechst 33342 (4 мкМ) и PI (6 мкМ) добавляли к клеткам за 15 мин до окончания инкубации. Результат фотодинамического воздействия анализировали при помощи эпи-флуоресцентной микроскопии, используя флуоресцентный микроскоп Axio Observer (Zeiss, Германия). Окрашенные клетки помещали в планшете на предметный

столик инвертированного микроскопа и с помощью цифровой камеры регистрировали флуоресцентные изображения свечения Hoechst 33342 ($\lambda_{\text{возб}}$ 359–371 нм, $\lambda_{\text{рег}} > 397$ нм) и PI ($\lambda_{\text{возб}}$ 530–585 нм, $\lambda_{\text{рег}} > 615$ нм) в клетках. Полученные изображения были обработаны в программе ImageJ, было получено общее число клеток и число погибших клеток для каждой выборки. В каждой выборке просчитывалось 300–400 клеток. По результатам измерений строили график зависимости процента выживших клеток от концентрации образцов. Для сравнения фотоиндуцированной цитотоксичности образцов рассчитывали величины LC_{50} и LC_{90} , соответствующие концентрациям PLGA-DPBPI и CrEL-DPBPI по активному веществу, при которых наблюдается 50 и 90% гибель клеток, соответственно.

Исследования *in vivo*

Используемые материалы

Для проведения экспериментов *in vivo* использовали мышей-гибридов первого поколения F1 (CBA x C57Bl/6J), самок (возраст 7–9 нед, вес тела 18–22 г), которых получали из питомника лабораторных животных «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России. Животные содержались в отдельных комнатах, в контролируемых условиях окружающей среды. Для экспериментов мышам прививали опухолевые клетки саркомы мягких тканей мыши линии S37 по $1 \cdot 10^6$ клеток подкожно в область икроножной мышцы с внешней стороны бедра. Штамм S37 поддерживали в асцитной форме на мышях самцах линии ICR (CD-1). Исследования проводили на 7 сутки после инокуляции опухоли, когда ее объем достигал 130–160 мм³.

Все манипуляции проводили в соответствии с национальными и международными правилами о гуманном обращении с животными [5, 6].

Подготовка образцов для проведения экспериментов *in vivo*

Для оценки распределения ФС в составе наночастиц в органах и тканях мышей, а также в целях изучения фотоиндуцированной противоопухолевой активности был использован образец PLGA-DPBPI с содержанием активного вещества 13,6 мг/г. Для получения потребительской формы навеска образца вносилась в 0,9%-ый раствор хлорида натрия с получением стабильной суспензии розового цвета.

Оценка распределения PLGA-DPBPI в тканях и органах животных

Изучение биораспределения DPBPI, входящего в состав наночастиц PLGA-DPBPI (доза 7,5 мг/кг по DPBPI, внутривенный путь введения), проводили *ex vivo* на мышях с развитой опухолью методом локальной флуоресцентной спектроскопии. Флуоресценцию регистрировали контактным способом на лазерном

спектральном анализаторе для флуоресцентной диагностики опухолей «ЛЭСА» (ООО «Биоспек», Россия).

Объектами исследования являлись опухолевая ткань, кожа и мышца, печень, почки, селезенка, сальник и кровь, полученные от трех животных на каждый интервал наблюдения (0,25, 2, 4, 24 и 48 ч). При возбуждении флуоресценции в красной области спектра (632,8 нм) интегральную интенсивность флуоресценции в спектральном диапазоне измерений (640–900 нм) нормировали на интегральную интенсивность сигнала обратного диффузного рассеяния в ткани возбуждающего лазерного излучения, определяя нормированную флуоресценцию (ФН) в тканях. Накопление PLGA-DPBPI в тканях оценивали по максимальным значениям ФН при длине волны, соответствующей максимуму флуоресценции DPBPI. В ходе исследования рассчитывали флуоресцентную контрастность (ФК) как отношение ФН в опухоли к ФН в коже.

Изучение эффективности фотодинамической терапии с использованием наночастиц PLGA-DPBPI

Фотодинамическую терапию проводили дистанционно на седьмой день роста опухоли саркомы S37 у мышей с введенными частицами PLGA-DPBPI в дозе 2,5 мг/кг по активному компоненту – DPBPI. Животным контрольной группы вводили внутривенно изотонический 0,9%-ый раствор хлорида натрия. В качестве анестезии применяли дроперидол (раствор для инъекций 2,5 мг/мл, ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия) в дозе 0,25 мг/мышь внутривентально. К моменту проведения ФДТ объем опухолей варьировал от 130 до 160 мм³. Для облучения использовали светодиодный источник с длиной волны 810 ± 21 нм (ФГУП ГНЦ НИОПИК, Россия): плотность мощности 100 мВт/см² и плотность энергии 150 Дж/см². Интервал между введением ФС и облучением составил 2 ч. За животными, у которых не было продолженного роста опухоли, наблюдали 90 сут после лечения. Оценка противоопухолевого эффекта проводили по средним значениям объема опухоли торможению роста опухоли, увеличению продолжительности жизни и критерию излеченности в контрольной и опытной группах [7]. Объем опухоли (в мм³) рассчитывали по формуле 7:

$$V = a \times b \times c, \quad (7)$$

где a – длина, b – ширина и c – высота опухолевого узла.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t -критерия Стьюдента. Для построения графиков и статистической обработки использовали программы OriginPro 8 SRO (OriginLab Corporation, USA), Excel (Microsoft) и Statistica 8 (StatSoft).

Результаты и обсуждение

Разработка технологии получения наночастиц PLGA-DPBPI и их физико-химические свойства

Получение частиц, содержащих DPBPI, проводили с использованием метода одинарных эмульсий [2]. В рамках разработки технологии проводили подбор оптимального состава полимерной композиции: концентрация поверхностно-активного вещества (ПВС) и соотношение органической фазы к водной (О/В). Параметры технологического процесса получения частиц и их характеристики представлены в табл. 1. Также в рамках разработки проводили подбор технологических параметров, таких как тип гомогенизации (с использованием погружного гомогенизатора, либо с применением ультразвукового (УЗ)), метод удаления органического растворителя (с использованием диффузии или вакуума), время центрифугирования суспензии частиц.

Как видно из табл. 1, увеличение концентрации ПВС приводит к увеличению среднего размера частиц и индекса полидисперсности (ПДИ) (образцы 3, 9). Уменьшение концентрации ПВС, напротив, снижает средний размер частиц (образцы 4, 10), но приводит к получению частиц с меньшим содержанием DPBPI за счет увеличения общей массы образца наночастиц PLGA-DPBPI, в связи с чем был выбран 1%-ый ПВС, позволяющий получать частицы меньшего диаметра без видимого снижения общего содержания препарата. Наиболее оптимальным соотношением О/В является 1:5, поскольку уменьшение соотношения до 1:2,5 приводило к резкому увеличению размера и увеличению полидисперсности системы (образец 6), а увеличение соотношения до 1:10 (образец 5) не способствовало существенному снижению размера, однако снижало общее содержание DPBPI в частицах. Использование УЗ-гомогенизатора

Таблица 1

Влияние технологических параметров на основные физико-химические характеристики полученных частиц PLGA-DPBPI

Table 1

The influence of technological parameters on the major physico-chemical characteristics of the obtained PLGA-DPBPI NPs

№ образца PLGA-DPBPI PLGA-DPBPI sample №	ПВС, % PVA, %	О/В O/W	Удаление растворителя Evaporation of organic solvent	Тип гомогенизатора Homogenizer type	t, мин t, min	W _{DPBPI} мг/г W _{DPBPI} mg/g	S, % масс. S, % w.	Средний диаметр, нм Mean diameter, nm	ξ-потенциал, мВ ξ-potential, mV	ПДИ PDI
1	1	1:5	Диффузия Diffusion	Погружной гомогенизатор Immersion homogenizer	15	9,6	28,7	485,1±2,3	-23,8±4,09	0,392
2	1	1:5			15	9,5	26,3	490,1±3,0	-24,6±2,87	0,230
3	2	1:5			15	13,4	35,1	761,3±4,5	-27,4±2,65	0,354
4	0,5	1:5			15	10,2	46,8	540,8±2,4	-20,1±3,42	0,325
5	1	1:10			15	8,1	72,6	523,2±2,2	-17,2±3,21	0,263
6	1	1:2,5			15	10,4	63,4	834,3±1,7	-14,4±2,86	0,368
7	1	1:5			30	13,6	86,1	222,6±2,8	-26,3±4,61	0,144
8	1	1:5	Вакуум Vacuum	УЗ-гомогенизатор US-homogenizer	30	16,9	36,4	261,5±3,2	-23,2±3,92	0,205
9	2	1:5		Погружной гомогенизатор Immersion homogenizer	30	15,6	25,2	340,2±2,4	-20,3±2,47	0,356
10	0,5	1:5			30	12,4	30,3	245,1±3,6	-19,2±4,06	0,232

О/В – соотношение органической фазы к водной; t – время центрифугирования

ПДИ – индекс полидисперсности

O/W – ratio of organic phase to water; t – centrifugation time

PDI – polydispersity index

способствовало незначительному увеличению размера частиц (образец 8), однако степень включения препарата оказалась намного ниже, в связи с чем использование погружного гомогенизатора являлось наиболее актуальным. Удаление растворителя для всех частиц проводили с использованием вакуума, поскольку применение диффузии при атмосферном давлении привело к получению частиц с широкими пиками распределения по размерам и образованием полидисперсной системы (образец 1). Увеличение времени центрифугирования суспензии частиц с 15 до 30 мин, в свою очередь, позволило также снизить средний размер частиц в образце с одновременным снижением ПДИ, что говорит о подборе оптимальных условий получения частиц с заданными характеристиками.

В результате были подобраны оптимальные параметры метода получения частиц PLGA-DPBPI (образец 7), позволяющие получать частицы с улучшенными физико-химическими характеристиками, такими, как максимальные значения общего содержания вещества и степени сорбции, монодисперсное распределение частиц по размерам (ПДИ меньше 0,250), средний диаметр частиц меньше 250 нм, чем и обусловлен их выбор для дальнейших экспериментов. В полученном лиофилизате наночастиц PLGA-DPBPI (образец 7) было определено содержание воды, которое составило не более 1,5%, что было учтено во всех расчетах. Полученные значения общего содержания DPBPI указаны в пересчете на безводное вещество.

Размер частиц и их сферическую форму подтверждали с помощью просвечивающей электронной ми-

кроскопии и сканирующей электронной микроскопии (рис. 2).

Таким образом, дальнейшие эксперименты по изучению эффективности интернализации опухолевыми клетками полученных частиц и их фотодинамической активности на моделях *in vitro* и *in vivo* были проведены с использованием PLGA-DPBPI-7.

Биологические свойства PLGA-DPBPI. Исследования *in vitro*

Исследование накопления PLGA-DPBPI в клетках аденокарциномы легкого A549

Методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (ЛСКМ) было установлено, что DPBPI, входивший в состав частиц PLGA-DPBPI, накапливается в цитоплазматической области клеток A549. При этом наблюдается концентрирование DPBPI в везикулярных клеточных структурах субмикронного размера, а также диффузное окрашивание цитоплазмы (рис. 3 //). Наблюдается частичная со-локализация наночастиц с липидными каплями (рис. 3ж, з), что характерно для циклоимидных производных бактериохлорина *p* [8].

Поскольку DPBPI обладает гидрофобными свойствами, в группе контроля в качестве солюбилизатора был выбран кремофор EL (CrEL), способный стабилизировать не агрегированную форму тетрапиррольных соединений в водных растворах и не токсичный для клеток *in vitro* в низких концентрациях [8–10]. Важно отметить, что CrEL используется в клинической практике [11].

В клетках, инкубируемых с CrEL-DPBPI, методом ЛСКМ обнаружено сходное с наночастицами внутриклеточное распределение DPBPI. (рис. 3 //). Таким

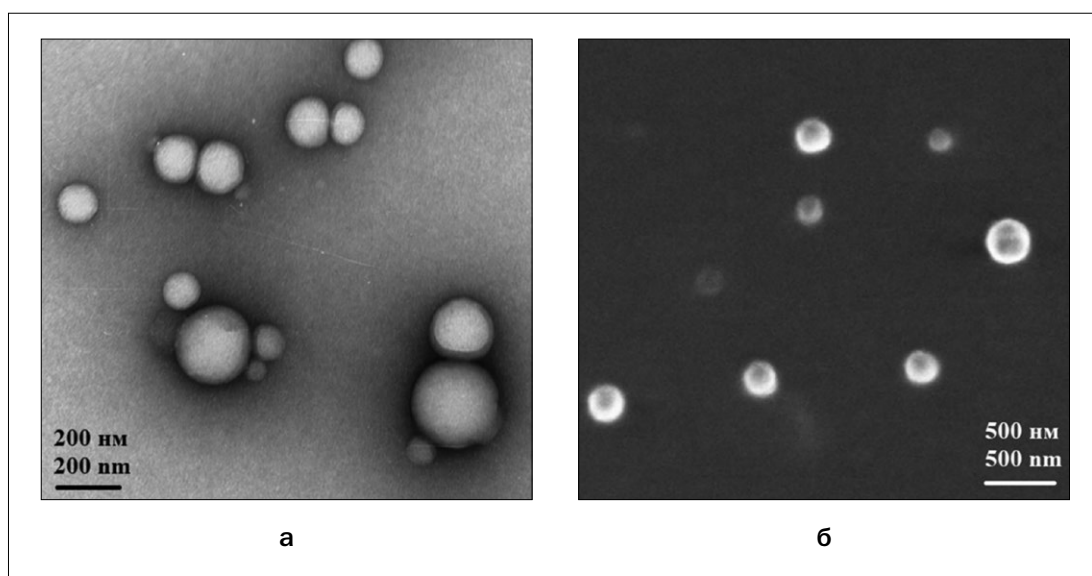


Рис. 2. Микрофотографии частиц PLGA-DPBPI, полученных методом просвечивающей электронной микроскопии (а) и сканирующей электронной микроскопии (б)

Fig. 2. TEM (a) and SEM (b) microphotographs of PLGA-DPBPI NPs

образом, включение DPBPI в состав наночастиц не блокирует его проникновение в клетки и не влияет на характер внутриклеточного распределения DPBPI.

Исследование фотоиндуцированной цитотоксичности PLGA-DPBPI

В экспериментах по изучению цитотоксичности PLGA-DPBPI было установлено, что образец PLGA-DPBPI не проявлял токсичности в отношении клеток A549 при высоких концентрациях и длительных временах инкубации (более 8 ч), в то время как применение DPBPI, входящего в состав CrEL-DPBPI (положительного контроля), было ограничено цитотоксичностью CrEL. Максимальные показатели для его использования составляют не более 5 ч с концентрацией не выше 14 мкМ (рис. 4).

При исследовании фотоиндуцированной цитотоксичности было показано, что частицы PLGA-DPBPI вызывают концентрационно-зависимую гибель клеток A549 (рис. 5). При различной плотности посева клеток ($0,7 \cdot 10^4$ кл/лунка; $2 \cdot 10^4$ кл/лунка, рис. 5а) отношение параметров LC_{50} и LC_{90} (концентрации, вызывающие гибель 50% и 90% клеток, табл. 2) PLGA-DPBPI к CrEL-DPBPI сохраняется и составляет $1,6 \pm 0,1$ (табл. 3). Уве-

личение световой дозы приводит к усилению фотодинамической активности обеих форм DPBPI (рис. 5, табл. 2). Проведение отмывки клеток A549 после 2 ч инкубации с PLGA-DPBPI или CrEL-DPBPI перед облучением не привело к снижению фотодинамического эффекта (рис. 5б). Следовательно, фотоиндуцированная гибель клеток происходит вследствие активации внутриклеточной концентрации PLGA-DPBPI или положительного контроля (рис. 5, табл. 2). Фотодинамический эффект PLGA-DPBPI может лимитироваться скоростью внутриклеточного высвобождения активного вещества из наночастиц, в связи с чем, была исследована фотоиндуцированная цитотоксичность соединений при различном времени облучения. Предварительно образцы были удалены из клеточной среды (проводили отмывку клеток через 2 ч инкубации с образцами). Увеличение времени облучения и, следовательно, световой дозы облучения привело к увеличению фотодинамического эффекта как для PLGA-DPBPI, так и для CrEL-DPBPI (рис. 5б, табл. 2). Отношение параметров LC_{50} и LC_{90} PLGA-DPBPI к CrEL-DPBPI варьируется в пределах $1,6 \div 2,4$ (табл. 3). При этом двукратное увеличение дозы (и двукратное увеличение времени облучения) способствовало снижению LC_{50} в

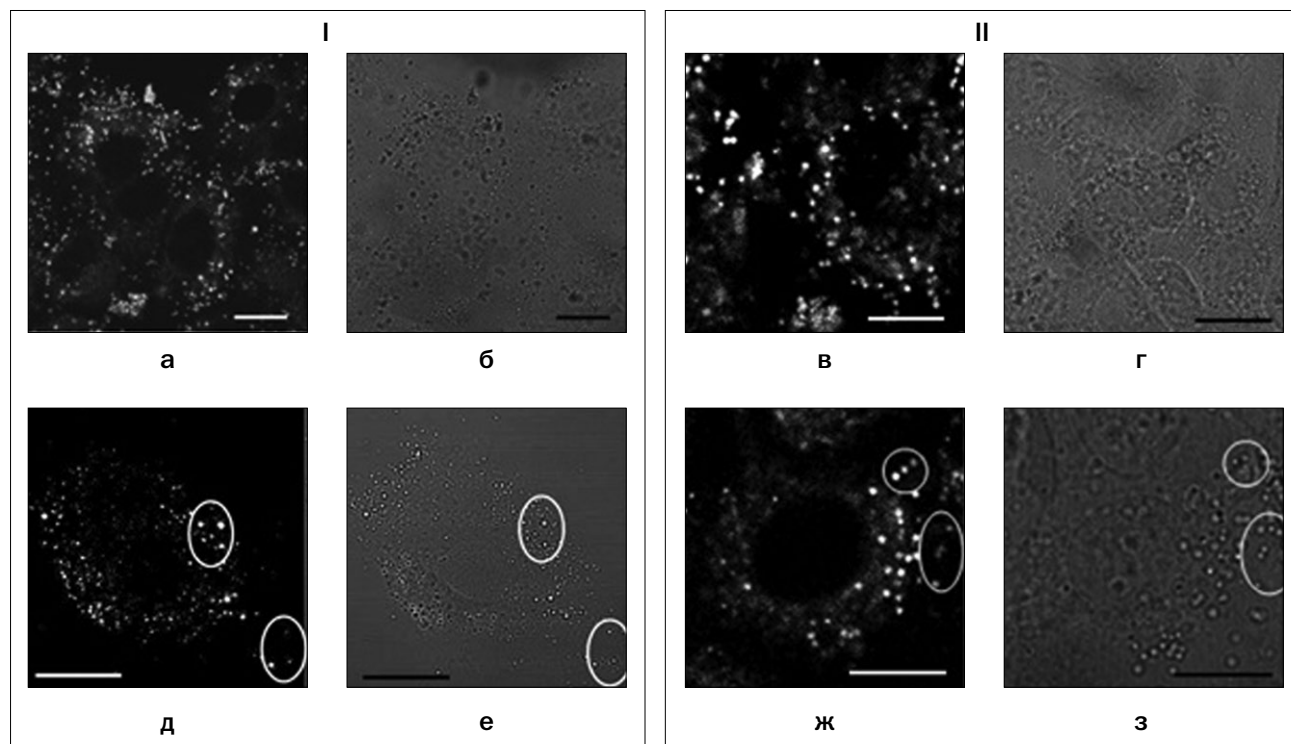


Рис. 3. Типичное внутриклеточное распределение DPBPI, входящего в состав CrEL-DPBPI (I) и PLGA-DPBPI (II), в клетках немелкоклеточной карциномы легкого человека линии A549, полученные методом ЛСКМ (а, в, д, ж) и в проходящем белом свете (б, г, е, з) после инкубации клеток с образцами в концентрации 4 мкМ в течение 2-х ч. На изображениях д-з показана со-локализация DPBPI с липидными каплями (области обведены овалами). Масштаб соответствует 15 мкм

Fig. 3. Typical intracellular distribution of DPBPI in CrEL-DPBPI (I) and PLGA-DPBPI (II) complexes inside A549 human non-small lung cancer cells. Images were obtained by LSCM (а, в, д, ж) and in transmitted white light (б, г, е, з) after incubation of cells with samples at the concentration of 4 μ M for 2 h. The co-localization of DPBPI with lipid drops (the areas are circled ovals) is shown in the images д-з. Scale bar is equal to 15 μ m

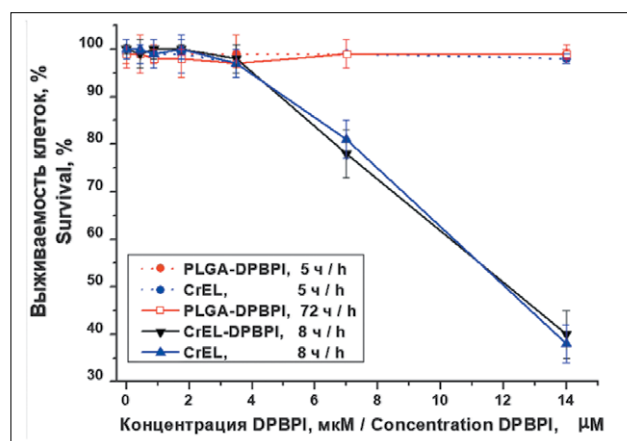


Рис. 4. Выживаемость клеток немелкоклеточной карциномы легкого человека линии A549 от концентрации PLGA-DPBPI, CrEL-DPBPI и CrEL при различном времени инкубации при изучении темновой цитотоксичности

Fig. 4. Survival of non-small cell lung carcinoma cells of the A549 line from the concentration of PLGA-DPBPI, CrEL-DPBPI and CrEL at different times of incubation in the study of dark cytotoxicity

2,53 раза для положительного контроля и в 1,75 раз для PLGA-DPBPI. Дальнейшее увеличение дозы (времени облучения) в 1,5 раза снизило LC_{50} в 1,49 раз для положительного контроля, тогда как для исследуемого образца значение LC_{50} снизилось в 1,7 раз.

Таким образом, применение DPBPI в составе наночастиц PLGA-DPBPI способствует накоплению DPBPI в цитоплазме опухолевых клеток A549 и вызывает фотоиндуцированную цитотоксичность, что подтверждает сохранение фотодинамических свойств DPBPI после включения его в состав полимерной формы.

При увеличении времени облучения и световой дозы фотоиндуцированная цитотоксичность PLGA-DPBPI возрастает линейно, в то время как для CrEL-DPBPI наблюдается тенденция к снижению.

Биологические свойства PLGA-DPBPI. Исследования in vivo

Распределение PLGA-DPBPI в тканях и органах животных

При анализе спектров флуоресценции, полученных *ex vivo* после внутривенного введения мышам DPBPI, установлено, что максимум флуоресценции для красителя в органах и тканях животных регистрировался при 817 ± 3 нм.

Исследованный препарат в виде наночастиц PLGA-DPBPI при внутривенном введении сравнительно быстро поступал в ткань опухоли S37, уровень ФН достигал максимального значения через 2 ч после введения и составлял $7,1 \pm 1,1$ отн. ед. (табл. 4). Через 48 ч средний уровень ФН в опухоли составлял 9,8% от максимального зарегистрированного значения.

В нормальной коже максимальное накопление DPBPI определялось в интервале времени от 0,25 до 2 ч после внутривенного введения красителя (величина ФН составила $2,6 \pm 0,3$ – $3,5 \pm 0,3$ отн. ед.), а через 24 ч DPBPI уже не определялась. Максимальная величина ФК относительно кожи регистрировалась в интервале времени от 2 до 4 ч после введения красителя и составляла 2,7–3,0 отн. ед.

В связи с этим при ФДТ облучение следует проводить через 2 ч после введения наночастиц PLGA-

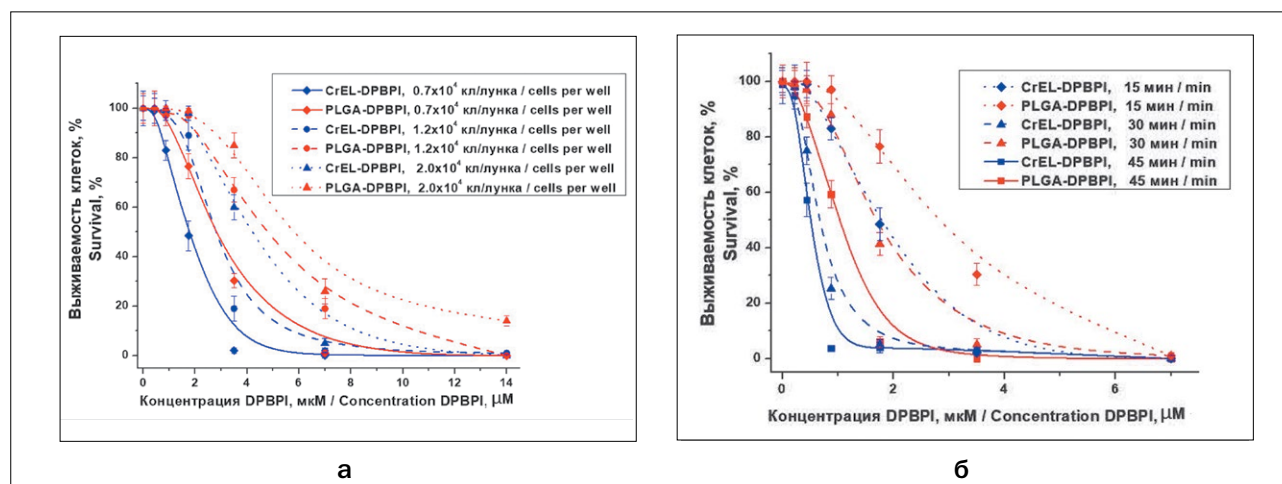


Рис. 5. Выживаемость клеток немелкоклеточной карциномы легкого человека линии A549 от концентрации CrEL-DPBPI и PLGA-DPBPI при изучении фотоиндуцированной цитотоксичности, где (а) – после 2 ч инкубации и облучения галогенной лампой в течение 15 мин ($13,5 \text{ Дж/см}^2$) при различной плотности клеток; (б) – после 2 ч инкубации, отмывки клеток от соединений во внешней среде и облучения галогенной лампой в течение различного времени облучения. Плотность клеток $0,7 \cdot 10^4$ кл/лунка

Fig. 5. Survival of non-small cell lung carcinoma cells of the A549 line from the concentration of CrEL-DPBPI and PLGA-DPBPI in the study of photoinduced cytotoxicity. (a) – after 2 hours of incubation and irradiation with a halogen lamp for 15 minutes ($13,5 \text{ J/cm}^2$) at different cell densities; (b) – after 2 hours of incubation, washing cells from compounds in the environment and irradiation with a halogen lamp for various irradiation times. The density of cells was $0,7 \cdot 10^4$ cells/well

DPBPI, когда накопление в опухоли и флуоресцентная контрастность достигают максимального значения.

В кровотоке DPBPI определялось в течение суток после введения. В мышечной ткани и сальнике были зарегистрированы невысокие значения нормированной флуоресценции ($4,3 \pm 0,4$ отн. ед. и $4,8 \pm 0,6$ отн. ед., соответственно), которые через сутки снижались на 71,4% и 83,3% от максимального зарегистрированного значения, соответственно. Через 48 ч в коже и сальнике ФН определялось на уровне фона. В основных внутренних органах максимальное накопление DPBPI зарегистрировано в печени и селезенке через 15 мин после введения, ФН составляла $31,3 \pm 1,4$ отн. ед. и $25,9 \pm 1,8$ отн. ед., соответственно. Через 24 ч после внутривенного введения красителя уровень нормированной флуоресценции в печени и селезенке снижался на 88,5% и 89,7% от максимального значения, соответственно, а через 48 ч отмечены только фоновые значения. В почках максимальные значения нормированной флуоресценции DPBPI регистрировались через 2 ч после введения ($12,0 \pm 0,2$ отн. ед.), а через 48 ч флуоресценция в почках определялась на уровне фона. Полученные данные свидетельствуют о быстрой элиминации фотосенсибилизатора из организма мышей и о преимущественном выведении соединения через выделительную систему печени.

Фотоиндуцированная противоопухолевая активность PLGA-DPBPI у мышей с саркомой S37

При проведении ФДТ с PLGA-DPBPI у облученных животных с саркомой S37 в течение 2-х ч развивался отек, который сохранялся до 4 сут. Гибели животных

от фототоксического шока после сеанса ФДТ отмечено не было.

Из представленных на рис. 6 и 7 данных видно, что фотосенсибилизатор обладает противоопухолевой эффективностью. При использовании PLGA-DPBPI в дозе 2,5 мг/кг (по действующему веществу) и интервале между облучением и введением в 2 ч, среднее значение объема опухоли в опытной группе увеличивалось медленно по отношению к объему опухоли контрольной группы, торможение роста опухоли (ТРО) на 22 сут после сеанса ФДТ составило 71%. Максимальное значение ТРО составило 78% на 11 сут. В течение 90 сут у 33% мышей не было выявлено продолженного роста опухоли.

Таким образом, воздействие ФДТ на перевивную опухоль S37 с применением PLGA-DPBPI позволяет достичь выраженного противоопухолевого эффекта при данной постановке эксперимента (УПЖ – 83%, КИ – 33%).

Заключение

Авторами была разработана технология получения наночастиц на основе PLGA, содержащих в своем составе DPBPI и обладающих оптимальными физико-химическими характеристиками, такими, как средний размер частиц, значение ξ – потенциала, степень включения и содержание субстанции в частицах. В экспериментах *in vitro* регистрировалось внутриклеточное накопление и распределение DPBPI в составе частиц PLGA-DPBPI в клетках A549, характер которого совпадал с распределением DPBPI в составе контрольной композиции (CrEL-DPBPI). Было показано

Таблица 2

Значения LC_{90} и LC_{50} для CrEL-DPBPI и PLGA-DPBPI при различной концентрации клеток (облучение галогенной лампой в течение 15 мин, $13,5 \text{ Дж/см}^2$) и времени облучения (плотность клеток $0,7 \cdot 10^4$ кл/лунка, с проведением отмывки)

Table 2

The values of LC_{90} and LC_{50} for CrEL-DPBPI and PLGA-DPBPI at various cells concentrations (halogen lamp exposure for 15 minutes (13.5 J/cm^2)) and irradiation time (cell density of $0.7 \cdot 10^4$ cells / well, with washing)

Концентрация клеток, кл/лунку Cells concentration, cells/well	LC_{90} , мкМ LC_{90} , μM		LC_{50} , мкМ LC_{50} , μM	
	PLGA-DPBPI	CrEL-DPBPI	PLGA-DPBPI	CrEL-DPBPI
$0,7 \cdot 10^4$	$4,7 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$
$1,2 \cdot 10^4$	$8,0 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,1$
$2 \cdot 10^4$	$8,5 \pm 0,1$	$5,3 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,1$
Время облучения, мин (световая доза, Дж/см ²) Exposure time, min (light dose, J/cm ²)	LC_{90} , мкМ LC_{90} , μM		LC_{50} , мкМ LC_{50} , μM	
	PLGA-DPBPI	CrEL-DPBPI	PLGA-DPBPI	CrEL-DPBPI
15 (13,5)	$4,7 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$
30 (27)	$2,5 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,05$	$1,6 \pm 0,1$	$0,67 \pm 0,05$
45 (40,5)	$1,6 \pm 0,1$	$0,67 \pm 0,05$	$0,96 \pm 0,05$	$0,45 \pm 0,03$

Таблица 3

Отношения $(LC_{90/2})/(LC_{90/1})^*$ и $(LC_{50/2})/(LC_{50/1})^*$ для CrEL-DPBPI (1) и PLGA-DPBPI (2) при различной концентрации клеток (облучение галогенной лампой в течение 15 мин (13,5 Дж/см²)) и времени облучения (плотность клеток 0,7·10⁴ кл/лунка, с проведением отмывки)

Table 3

$(LC_{90/2})/(LC_{90/1})^*$ and $(LC_{50/2})/(LC_{50/1})^*$ rates for CrEL-DPBPI (1) and PLGA-DPBPI (2) at various cell concentrations (halogen lamp exposure for 15 minutes (13.5 J/cm²)) and irradiation time (cell density of 0,7·10⁴ cells / well, with washing)

Концентрация клеток, кл/лунка Cells concentration, cells/well	$(LC_{90/2})/(LC_{90/1})$	$(LC_{50/2})/(LC_{50/1})$
0,7·10 ⁴	1,62	1,65
1,2·10 ⁴	2,05	1,68
2,0·10 ⁴	1,60	1,51
Время облучения, мин (световая доза, Дж/см ²) Exposure time, min (light dose, J/cm ²)	$(LC_{90/2})/(LC_{90/1})$	$(LC_{50/2})/(LC_{50/1})$
15 (13,5)	1,62	1,65
30 (27)	2,27	2,39
45 (40,5)	2,39	2,13

* (1) – CrEL-DPBPI; (2) – PLGA-DPBPI

Таблица 4

Интенсивность нормированной флуоресценции DPBPI в органах и тканях мышей с саркомой S37 после введения наночастиц PLGA-DPBPI в дозе 7,5 мг/кг

Table 4

The intensity of the normalized fluorescence of DPBPI in organs and tissues of mice with S37 sarcoma after administration of PLGA-DPBPI polymer particles at a dose of 7.5 mg / kg

Органы и ткани Organs and tissues	Контроль* (Фон) Control* (Background)	Нормированная флуоресценция (ФН), отн. ед. Normalized fluorescence (FN), rel. units				
		Сроки измерения нормированной флуоресценции после введения образца, ч The timing of the measurement of normalized fluorescence after the introduction of the sample, h				
		0,25	2	4	24	48
Опухоль Tumor	3,0±0,2	4,5±0,4	7,1±1,1	5,4±0,7	3,9±0,1	3,4±0,1
Кожа Skin	1,5±0,1	3,5±0,3	2,6±0,3	1,8±0,2	1,6±0,1	1,6±0,1
Мышца Muscle	2,7±0,1	4,1±0,5	4,3±0,4	3,9±0,3	3,1±0,4	2,8±0,1
Сальник Adipose tissue	3,0±0,3	4,2±0,2	4,8±0,6	3,2±0,2	3,2±0,2	3,1±0,1
Печень Liver	7,8±0,2	31,2±1,4	23,4±1,0	18,3±0,1	10,5±0,3	8,6±0,6
Почки Kidneys	7,6±0,2	10,8±0,2	12,0±0,2	9,8±1,2	8,3±0,1	7,8±0,2
Селезенка Spleen	9,4±0,3	25,9±1,8	20,7±1,0	17,0±0,9	11,1±0,6	10,2±0,5
Кровь Blood	4,0±0,5	22,3±0,2	7,7±0,1	6,1±0,1	4,2±0,1	3,9±0,1
ФК** FC**	-	1,3	2,7	3,0	2,4	2,1

* Контроль – мыши без воздействия (фон);

** ФК (флуоресцентная контрастность) = $FN_{\text{опухоль}} / FN_{\text{кожа}}$

* Control – mice without exposure (background);

** FK (fluorescent contrast) = $FN_{\text{tumor}} / FN_{\text{skin}}$, rel. units.

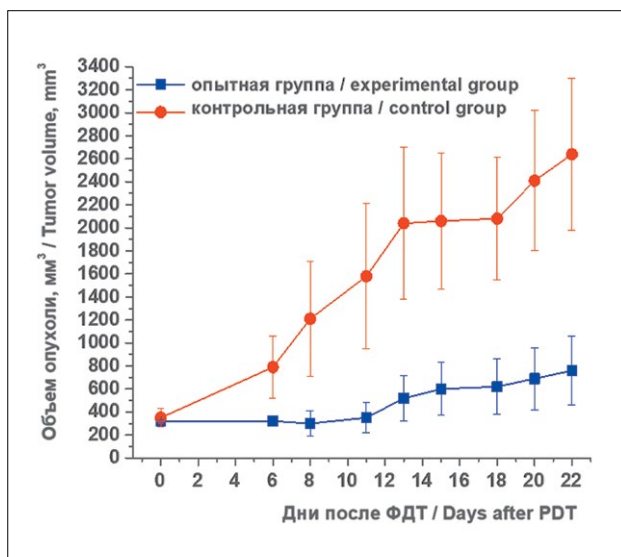


Рис. 6. Объем опухоли S37 у мышей после проведения ФДТ (150 Дж/см², время экспозиции 2 ч) после введения PLGA-DPBPI (в дозе 2,5 мг/кг) в контрольной и опытной группах
Fig. 6. S37 tumor volume in mice after PDT (150 J/cm², exposure time 2 h) after administration of PLGA-DPBPI (at a dose of 2.5 mg/kg) in the control and experimental groups

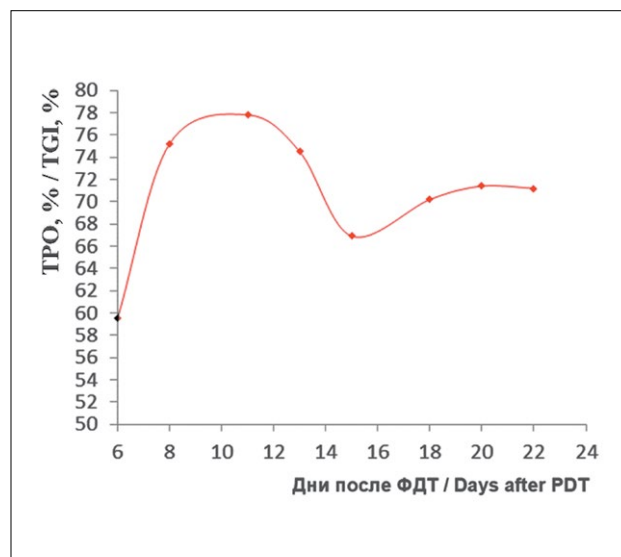


Рис. 7. Торможение роста опухоли (ТРО, %) на 6–22 сут после проведения ФДТ (150 Дж/см², время экспозиции 2 ч) с использованием PLGA-DPBPI (в дозе 2,5 мг/кг)
Fig. 7. Inhibition of tumor growth (TGI, %) on days 6–22 after PDT (150 J/cm², exposure time 2 hours) using PLGA-DPBPI (2.5 mg/kg)

отсутствие темновой цитотоксичности частиц при высоких концентрациях и длительных временах инкубации. Противоопухолевая эффективность частиц PLGA-DPBPI была сопоставима с эффектом CrEL-DPBPI, что подтверждает сохранение фотоиндуцированной активности DPBPI после включения его в состав полимерной матрицы. В экспериментах *in vivo* было показано накопление частиц в опухолевой ткани с ФК до 3,0 отн. ед., а также практически полное выведение

DPBPI из организма через 48 ч. Для кожи это значение составило 24 ч, что немаловажно с учетом специфики проведения процедуры фотодинамической терапии. Также была доказана противоопухолевая фотоиндуцированная активность использования PLGA-DPBPI при проведении ФДТ на модели саркомы мягких тканей S37, излеченность животных достигала 33%. Полученные данные позволяют сделать вывод о перспективности дальнейшего изучения частиц PLGA-DPBPI.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rejman J., Oberle V., Zuhorn I.S., Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis // *Biochem. J.* – 2004. – No. 377. – P. 159–169.
2. Сапельников М.Д., Панов А.В., Никольская Е.Д., Грин М.А. Разработка систем доставки высокоэффективных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии рака // *Биофармацевтический Журнал* – 2018. – Т. 10, № 1. – С. 14–25.
3. Nikolskaya E., Sokol M., Faustova M., et al. The comparative study of influence of lactic and glycolic acids copolymers type on properties of daunorubicin loaded nanoparticles and drug release // *Acta of Bioeng. and Biomech.* – 2018. – Vol. 20, No. 1. – P. 65–77.
4. Пантюшенко И.В., Грин М.А., Якубовская Р.И. и др. Новый высокоэффективный ИК-фотосенсибилизатор в ряду бактериохлорофилла А для фотодинамической терапии рака // *Вестник МИТХТ*. – 2014. – Т. 9, № 3. – С. 3–10.
5. Приложение А к Европейской конвенции об охране позвоночных животных, используемых для экспериментов и в других научных целях (ETS 123). – 13 с. Адрес доступа: <https://rm.coe.int/168007a6a8> (дата обращения 26.02.2019)

REFERENCES

1. Rejman J., Oberle V., Zuhorn I.S., Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis, *Biochem. J.*, 2004, no. 377, pp. 159–169.
2. Sapelnikov M.D., Panov A.V., Nikolskaya E.D., Grin M.A. Development of delivery systems for highly effective photosensitizers applicable for photodynamic therapy of cancer, *Biopharmaceuticheskiy zhurnal*, 2018, vol. 10, no 1, pp. 14–25. (in Russian)
3. Nikolskaya E., Sokol M., Faustova M., Zhunina O., Mollaev M., Yabbarov N., Tereshchenko O., Popov R., Severin E. The comparative study of influence of lactic and glycolic acids copolymers type on properties of daunorubicin loaded nanoparticles and drug release, *Acta of Bioeng. and Biomech.*, 2018, vol. 20, no. 1, pp. 65–77.
4. Pantyushenko I.V., Grin M.A., Yakubovskaya R.I., Plotnikova E.A., Morozova N.B., Tsygankov A.A., Mironov A.F. A novel highly effective IR photosensitizer in the bacteriochlorophyll A series for photodynamic therapy of cancer, *Vestnik MITHT*, 2014, vol. 9, no. 3, pp. 3–10. (in Russian)
5. *Prilozhenie A k Evropeyskoy konventsii ob ohrane pozvonochnykh zhivotnykh, ispol'zuemykh dlya eksperimentov i v drugih nauchnykh*

6. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными (статья №5 конвенции) / пер. с англ. М.С. Красильниковой и И.В. Белозерцевой. – Санкт-Петербург, 2014. – 102 с. Адрес доступа: <http://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Приложение-А-к-ETS.pdf> (дата обращения 26.02.2019)
7. Якубовская Р.И., Казачкина Н.И., Кармакова Т.А. и др. Методические рекомендации по изучению фотоиндуцированных противоопухолевых свойств лекарственных средств // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова и др. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 657–71.
8. Feofanov A., Grichine A., Karmakova T., Pljutinskaya A., Lebedeva V., Filyasova A., Yakubovskaya R., Mironov A., Egret-Charlier M., Vigny P. Near-infrared photosensitizer based on a cycloimide derivative of chlorin p6: 13,15-N-(3'-hydroxypropyl)cycloimide chlorin p6 // *Photochem. Photobiol.* – 2002. – No. 75. – P. 633–643.
9. Nazarova A., Ignatova A., Feofanov A., et al. 13,15-N-cycloimide derivatives of chlorin p6 with isonicotinyl substituent are photosensitizers targeted to lysosomes // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2007. – No. 6. – P. 1184–1196.
10. Efremenko A.V., Ignatova A.A., Borsheva A.A., et al. Cobalt bis(dicarbollide) versus closo-dodecaborate in boronated chlorin e6 conjugates: implications for photodynamic and boron-neutron capture therapy // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2012. – Vol. 11, No. 4. – P. 645–652.
11. Loi S., Rischin D., Michael M., et al. A randomized cross-over trial to determine the effect of Cremophor EL on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of carboplatin chemotherapy // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 54, No. 5. – P. 407–414.
- tselyah (ETS 123)* [Appendix A of the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS No. 123)], 13 p. Available at: <https://rm.coe.int/168007a6a8> (accessed 26.02.2019)
6. *Rukovodstvo po sodержaniyu i uhodu za laboratornymi zhivotnymi (stat'ya №5 konventsii)* [Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals (Article 5 of the Convention)], transl. by Krasilnischikova M.S., Belozertseva I.V. Saint-Petersburg, 2014. 102 p. Available at: <http://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Приложение-А-к-ETS.pdf> (accessed 26.02.2019)
7. Yakubovskaya R.I., Kazachkina N.I., Karmakova T.A., et al. *Methodical recommendations on the study of photoinduced antitumor properties of drugs*. In: Guide to conducting preclinical studies of medicines. Edited by A.N. Mironov. Moscow, Grif & Ko Publ., 2012, pp. 657–71. (in Russian)
8. Feofanov A., Grichine A., Karmakova T., Plyutinskaya A., Lebedeva V., Filyasova A., Yakubovskaya R., Mironov A., Egret-Charlier M., Vigny P. Near-infrared photosensitizer based on a cycloimide derivative of chlorin p6: 13,15-N-(3'-hydroxypropyl)cycloimide chlorin p6, *Photochem. Photobiol.*, 2002, no. 75, pp. 633–643.
9. Nazarova A., Ignatova A., Feofanov A., Karmakova T., Pljutinskaya A., Mass O., Grin M., Yakubovskaya R., Mironov A., Maurizot J.-C. 13,15-N-cycloimide derivatives of chlorin p6 with isonicotinyl substituent are photosensitizers targeted to lysosomes, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2007, no. 6, pp. 1184–1196.
10. Efremenko A.V., Ignatova A.A., Borsheva A.A., Grin M.A., Bregadze V.I., Sivaev I.B., Mironov A.F., Feofanov A.V. Cobalt bis(dicarbollide) versus closo-dodecaborate in boronated chlorin e6 conjugates: implications for photodynamic and boron-neutron capture therapy, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2012, vol. 11, no. 4, pp. 645–652.
11. Loi S., Rischin D., Michael M., Yuen K., Stokes K.H., Ellis A.G., Millward M.J., Webster L.K. A randomized cross-over trial to determine the effect of Cremophor EL on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of carboplatin chemotherapy, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2004, vol. 54, no. 5, pp. 407–414.

СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ ГИДРОФОБНОГО ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА БАКТЕРИОХЛОРИНОВОГО РЯДА В МИЦЕЛЛАХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Е.А. Плотникова¹, В.О. Страмова¹, Н.Б. Морозова¹, А.Д. Плютинская¹, П.В. Островерхов²,
М.А. Грин², А.Ф. Миронов², Р.И. Якубовская¹, А.Д. Каприн¹

¹МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦР» Минздрава РФ, Москва, Россия,

²МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия

Резюме

Целью настоящей работы являлось получение стабильной мицеллярной эмульсии перспективного фотосенсибилизатора (ФС) – метилового эфира *O*-пропилоксим-*N*-пропоксибактериопурпинимида, поглощающего в длинноволновой области спектра ($\lambda_{\max} = 800 \pm 2$ нм). В процессе работы были получены солюбилизаторы красителя на основе поверхностно-активных веществ (ПАВ): Kolliphor ELP, Poloxamer 407, Эмукол 268. По физико-химическим параметрам отобрана и охарактеризована наиболее перспективная мицеллярная эмульсия ФС для парентерального введения. Выбранная эмульсия на основе Kolliphor ELP остается стабильной в течение 4 мес, в течение которых остаются неизменными спектр флуоресценции и поглощения и диаметр мицелл.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, фотодинамическая терапия, бактериохлорин, солюбилизатор, эмульсия.

Для цитирования: Плотникова Е.А., Страмова В.О., Морозова Н.Б., Плютинская А.Д., Островерхов П.В., Грин М.А., Миронов А.Ф., Якубовская Р.И., Каприн А.Д. Солюбилизация гидрофобного фотосенсибилизатора бактериохлоринового ряда в мицеллах поверхностно-активных веществ // Biomedical Photonics. – 2019. – Т. 8, № 1. – С. 18–23. doi: 10.24931/2413–9432–2019–8–1–18–23.

Контакты: Плотникова Е.А., e-mail: plotnikovaekaterina62@gmail.com

SOLUBILIZATION OF HYDROPHOBIC BACTERIOCHLORIN–BASED PHOTOSENSITIZER IN MICELLES OF SURFACTANTS

Plotnikova E.A.¹, Stramova V.O.¹, Morozova N.B.¹, Plyutinskaya A.D.¹, Ostroverkhov P.V.²,
Grin M.A.², Mironov A.F.², Yakubovskaya R.I.¹, Kaprin A.D.¹

¹P.A. Herzen Moscow Oncology Research Center – branch of FSBI NMRRС of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

²Federal State Budget Educational Institution of Higher Education “MIREA – Moscow Technological University”, Moscow, Russia

Abstract

The aim of the paper was to obtain a stable micellar emulsion of potent photosensitizer (PS) – *O*-propyloxime-*N*-propoxybacteriopurpinimide methyl ester absorbing light in long-wave region of the spectrum ($\lambda_{\max} = 800 \pm 2$ nm). Solubilizers of the dye based on different surfactants (Kolliphor ELP, Poloxamer 407, Emuxol 268) were obtained. Taking into account the physical and chemical parameters, the most potent micellar emulsion for injection was selected and characterized. The emulsion based on Kolliphor ELP remains stable for 4 months, with no changes in the fluorescence spectrum and absorption, as well as the particle diameter.

Keywords: photosensitizer, photodynamic therapy, bacteriochlorin, solubilizer, emulsion.

For citations: Plotnikova E.A., Stramova V.O., Morozova N.B., Plyutinskaya A.D., Ostroverkhov P.V., Grin M.A., Mironov A.F., Yakubovskaya R.I., Kaprin A.D. Solubilization of hydrophobic bacteriochlorin–based photosensitizers in micelles of surfactants, *Biomedical Photonics*, 2019, vol. 8, no. 1, pp. 18–23. (in Russian) doi: 10.24931/2413–9432–2019–8–1–18–23.

Contacts: Plotnikova E.A., e-mail: plotnikovaekaterina62@gmail.com

Введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является динамично развивающимся методом лечения патологий различного характера, включая злокачественные новообразования. Обеспечивая высокую эффективность лечения, ФДТ получила широкое применение в клинической практике [1–3]. Преимуществами ФДТ являются малоинвазивность, селективность воздействия, многократное применение при необходимости, благоприятный косметический эффект, а также возможность использовать методику как в качестве самостоятельного способа лечения, так и в комплексе с другими методами противоопухолевой терапии [4–6].

На сегодняшний день основными препаратами, применяемыми в ФДТ, являются фотосенсибилизаторы (ФС) на основе порфиринов, хлоринов и фталоцианинов [7, 8], которые интенсивно поглощают в области 630–685 нм, где проницаемость биологических тканей незначительна. Данную группу ФС характеризует высокая активность в отношении опухолей небольшого объема. Следует отметить, что ФС фталоцианинового ряда продолжительно циркулируют в организме, что приводит к длительной кожной токсичности [9]. В связи с вышеперечисленными причинами исследователями ведется направленный поиск новых высокоэффективных красителей, в том числе среди соединений бактериохлоринового ряда, поглощающих в области 700–900 нм [10–13]. ФС данного ряда преимущественно являются гидрофобными соединениями, поэтому для того, чтобы их внутривенное введение стало возможным, необходима разработка лекарственной формы красителя в виде стабильной эмульсии [14].

Для получения инъекционных форм гидрофобных субстанций наиболее широко применяют следующие поверхностно-активные вещества (ПАВ): полиэтиленгликоль, кремофор, плуроники и их водные растворы. Соразтворители данного ряда являются фармацевтическими вспомогательными веществами, которые способствуют повышению растворимости и стабильности лекарственных средств, увеличивают биодоступность и, следовательно, эффективность лечения методом фотодинамической терапии [14–17].

Целью настоящей работы являлось получение стабильной мицеллярной эмульсии метилового эфира *O*-пропилоксим-*N*-пропоксибактериопурпуринимида,

Материалы и методы

Фотосенсибилизатор

Субстанция-фотосенсибилизатор представляет собой метиловый эфир *O*-пропилоксим-*N*-пропоксибактериопурпуринимида, поглощающий в области 800 ± 2 нм [18].

Получение коллоидных растворов ПАВ

Для получения коллоидных растворов ПАВ с концентрацией 4% (масса/объем) навески солюбилизаторов Kolliphor ELP (BASF, Германия), Poloxamer 407 (Sigma-Aldrich, США), Эмукол 268 (ФГУП «ГНЦ «НИО-ПИК», Россия) растворяли в воде для инъекций (ООО «Гротекс», Solopharm, Россия) и перемешивали в течение 10 мин до полного растворения. Перемешивание проводили на магнитной мешалке (ThermoScientific, Великобритания) при температуре 25, 40, 50, 60, 70 и 80°C. Далее коллоидный раствор подвергали обработке ультразвуком в течение 10 или 20 мин. Эффективность образования коллоидных растворов оценивали по характеру формирования мицелл методом динамического рассеяния света, определяя диаметр частиц в растворе. Анализ проводили на анализаторе размера частиц, ξ -потенциала частиц и плоских поверхностей Delsa™Nano C (BeckmanCoulter, США). Источником света служил диодный лазер, работающий при фиксированной длине волны 658 нм. Каждое измерение проводили по меньшей мере 3 раза, далее высчитывали среднее значение диаметра мицелл.

Получение солюбилизатов на основе ПАВ

Для получения эмульсии ФС на основе различных ПАВ (Kolliphor ELP, Poloxamer 407, Эмукол 268) навеску красителя растворяли в хлористом метиле (дихлорметан, ХЧ, ООО «Химмед», Россия) и добавляли небольшими порциями в 4%-ый раствор ПАВ, нагретый на магнитной мешалке до 42°C, что соответствует температуре кипения хлористого метилена, при постоянном перемешивании и барботации аргоном. Процесс про-

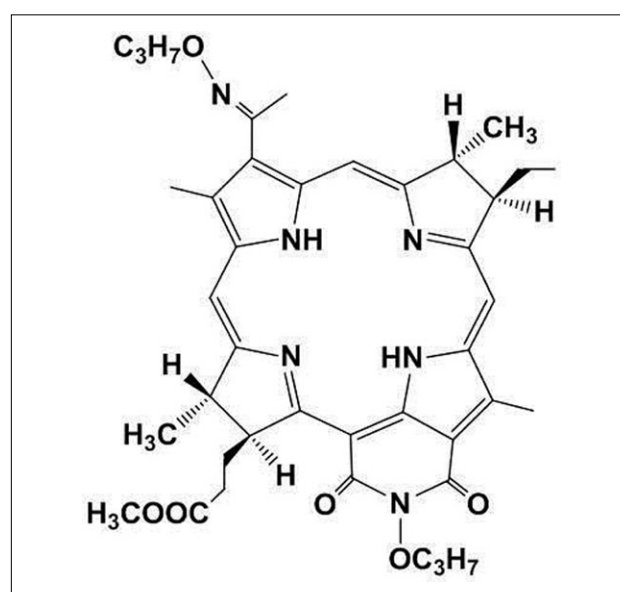


Рис. 1. Химическая формула фотосенсибилизатора
Fig. 1. Chemical formula of the photosensitizer

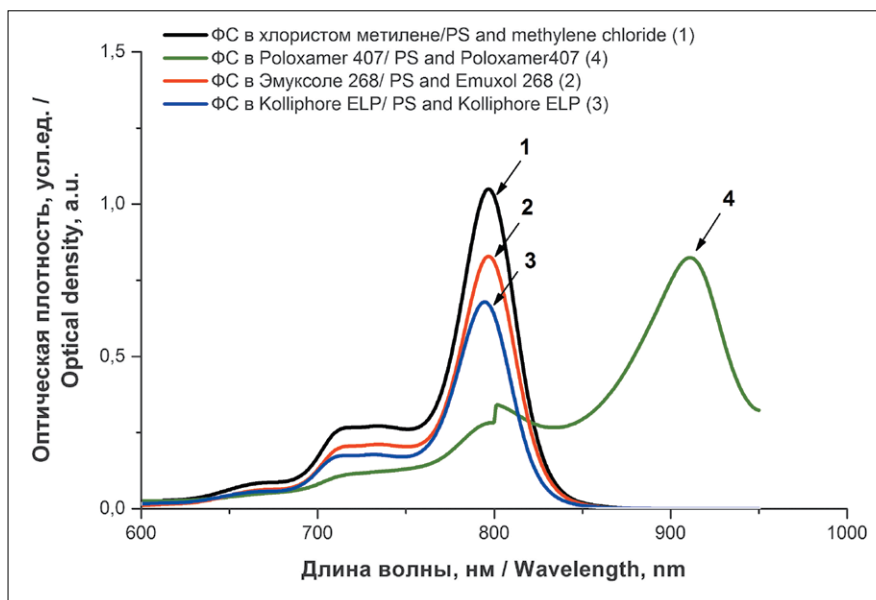


Рис. 2. Абсорбционные спектры ФС в хлористом метиле (1), в составе эмульсии на основе Kolliphor ELP (2), Poloxamer 407 (3) и Эмукол 268 (4)
Fig. 2. Absorption spectra of the PS in dichloromethane (1), in the emulsion based on Kolliphor ELP (2), Poloxamer 407 (3) and Emulcol 268 (4)

должали до полного испарения растворителя, затем охлажденную до комнатной температуры эмульсию подвергали стерилизации через мембранный фильтр Millipore (Corning, Германия) с размером пор 0,22 мкм.

Оценка стабильности солюбилизаторов на основе ПАВ

Оценка стабильности включала в себя анализ спектров поглощения и флуоресценции во времени и распределения по размерам частиц эмульсий фотосенсибилизатора на основе ПАВ.

Растворы ФС готовили *ex tempore* последовательным разведением исходных эмульсий с известными концентрациями. Спектры поглощения и флуоресценции регистрировали на спектрофотометре Genesys 2 (ThermoSpectronic, США) и на лазерном анализаторе для флуоресцентной диагностики опухолей ЛЭСА (ООО «БИОСПЕК», Россия), соответственно. Измерения проводили *ex tempore*, а также через 2, 4, 24 ч, 7 сут, 1 и 4 мес хранения в затемненных условиях. Флуоресценцию возбуждали He-Ne лазером при длине волны генерации 632,8 нм при оптическом разрешении 2 нм в диапазоне длин волн от 400 до 1000 нм. При математической обработке из регистрируемых спектров вычитали спектр фоновой флуоресценции растворителя и интегрировали в пределах от 300 до 900 нм. Концентрация активного вещества в растворе составляла 20 мкг/мл. В ходе исследований оценивали положение максимумов на спектрах поглощения и флуоресценции, оптическую плотность, интенсивность флуоресценции, а также характер изменения профиля спектров ФС.

Для определения размера частиц в растворе использовали метод динамического лазерного светорассеяния (DLS). Анализ проводили на анализаторе размера частиц, ξ -потенциала частиц и плоских поверхностей Delsa™Nano C. Перед проведением эксперимента эмульсии стерилизовали через мембранный фильтр Millipore с размером пор 0,22 мкм. Растворы для проведения исследований готовили *ex tempore* путем последовательных разведений исходных эмульсий до конечной концентрации активного вещества 40 мкг/мл. Каждое измерение проводили по меньшей мере 3 раза, далее высчитывали среднее значение диаметра пустых мицелл и мицелл с включенным фотосенсибилизатором.

Оценка фотостабильности фотосенсибилизатора

Растворы готовили *ex tempore* путем последовательных разведений исходной эмульсии в культуральной среде Игла MEM (НПП «ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки до конечной концентрации активного вещества 25 мкг/мл. В лунки плоскодонного 96-луночного микропланшета (Corning, США) вносили по 150 мкл раствора ФС. В качестве источника оптического излучения использовали галогеновую лампу мощностью 500 Вт с широкополосным фильтром KC-19 ($\lambda \geq 720$ нм) и водным фильтром толщиной 5 см. Плотность мощности составляла $18 \pm 1,0$ мВт/см², а световая доза – 5, 10, 20, 50 и 100 Дж/см². Мощность излучения контролировали с помощью измерителя ИМПО (НПО «Полюс», Москва). Интенсивность флуоресценции оце-

Таблица

Физико-химические свойства солюбилизаторов на основе различных ПАВ

Table

Physicochemical properties of solubilizers based on various surfactants

Название ПАВ Name of surfac- tant	$\omega_{\text{ПАВ}}\%$ $\omega_{\text{surfactants}}\%$	λ_{max}^f нм λ_{max}^f nm	ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	Диаметр частиц, нм Diameter of particles, nm		Стабильность Stability
				Без субстанции Without substance	С субстанцией With substance	
Kolliphor ELP	4	800±2	29285	10,7±0,3	10,5±0,40	4 мес 4 months
Emuxol 268	4	910±2	–	12,0±1,1	362±15 535 ±201	не стабилен not stable
Poloxamer 407	4	800±2	23492	28,5±2,0	27,5±2,5	2 ч 2 hours

нивали до и после облучения. При математической обработке из регистрируемых спектров вычитали спектр фоновой флуоресценции растворителя и интегрировали в пределах от 300 до 900 нм.

Результаты и обсуждение

Получение коллоидных растворов ПАВ

Для солюбилизации ФС в качестве соразтворителей использовали следующие поверхностно-активные вещества: Kolliphor ELP, Эмукол 268 и Poloxamer 407. Kolliphor ELP представляет собой неионный солюбилизатор, полученный путем смешивания касторового масла с окисью этилена в соотношении 1:35; Эмукол 268 – блоксополимер окиси этилена с окисью пропилен и пропиленгликолем; Poloxamer 407

– тройной блок-сополимер этиленоксида и пропиленоксида [19]. В процессе приготовления коллоидных растворов было установлено, что Kolliphor ELP эффективно образует мицеллы при комнатной температуре без применения ультразвука. Размер образующихся частиц при этом составляет 10,7±0,3 нм.

Наименьший размер частиц коллоидного раствора на основе Эмукол 268 наблюдали при нагревании до 40°C и обработке ультразвуком в течение 10 мин (12,0±1,1 нм). Образцы на основе Poloxamer 407, приготовленные при 40 и 50°C и обработке ультразвуком в течение 10 мин, имели диаметр частиц не более 30,0 нм. Таким образом, температура нагревания 40°C и время озвучивания 10 мин были выбраны наиболее оптимальными параметрами приготовления эмульсии.

Оценка физико-химических свойств солюбилизаторов на основе ПАВ

Анализ полученных данных показал, что интенсивность главной полосы поглощения солюбилизаторов на основе Kolliphor ELP (OD=0,810) и Poloxamer 407 (OD=0,635) оказалась наиболее высокой (рис. 2). Возможно, это связано с тем, что данные ПАВ имеют наиболее длинные гидрофобные участки, при этом объем гидрофобного ядра у Poloxamer 407 больше [20, 21]. Показано, что выбор того или иного солюбилизатора не влияет на вид электронного спектра поглощения субстанции (рис. 3). Максимум флуоресценции ФС в этих условиях регистрируется при 822±2 нм.

Солюбилизация субстанции в Эмукол 268 привела к ее моментальной агрегации, при этом наблюдалось расширение основной полосы поглощения и образование новой полосы с максимумом в области 910±2 нм, что соответствует образованию агрегированной формы красителя (рис. 2). Данные по определению диаметра частиц подтверждают агрегацию

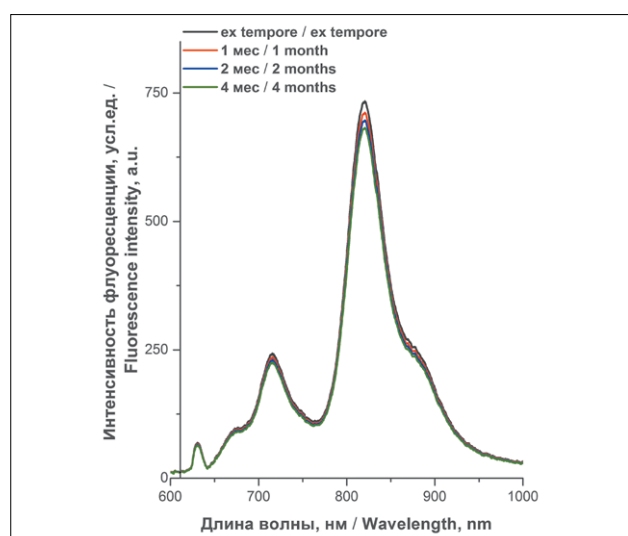


Рис. 3. Спектры флуоресценции ФС в составе эмульсии на основе 4% Kolliphor ELP во времени

Fig. 3. Fluorescence spectra of the PS in the 4% Kolliphor ELP-based emulsion in time

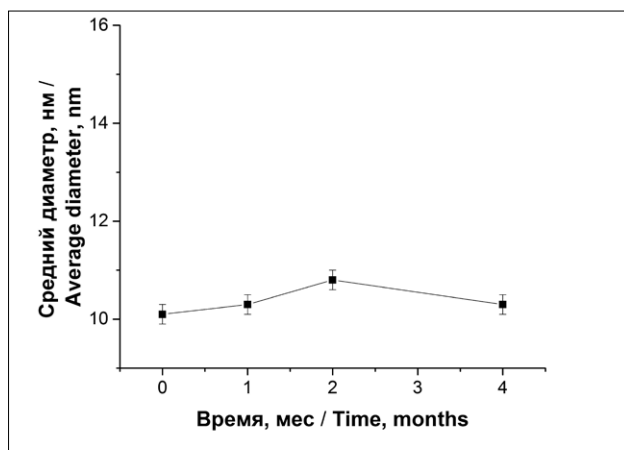


Рис. 4. Изменение диаметра частиц ФС в составе эмульсии на основе 4% Kolliphor ELP во времени

Fig. 4. Change in the diameter of the PS particles in the on 4% Kolliphor ELP-based emulsion in time

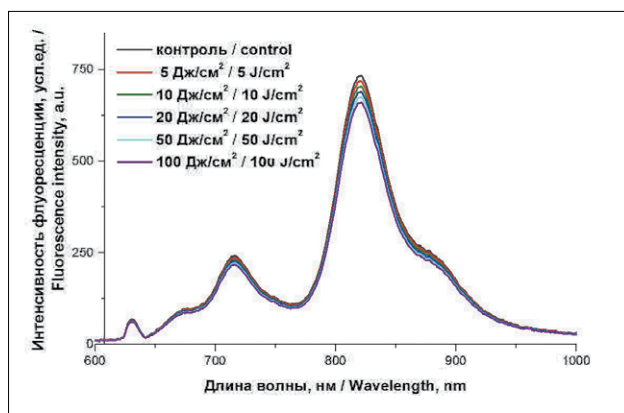


Рис. 5. Спектры флуоресценции ФС в составе эмульсии на основе 4% Kolliphor ELP до воздействия света и после облучения дозой света в 5, 10, 20, 50 и 100 Дж/см²

Fig. 5. Fluorescence spectra of the PS in the 4% Kolliphor ELP-based emulsion: before and after irradiation at a dose of 5, 10, 20, 50 and 100 J/cm²

красителя, диаметр мицелл солюбилизаторов превысил 5000 нм (см. табл.).

Солюбилизаторы на основе Kolliphor ELP и Poloxamer 407 оказались моодисперсными со средним диаметром частиц $10,5 \pm 0,40$ и $27,5 \pm 2,5$ нм, соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Титова В.А. Роль и место фотодинамической терапии в мульти-модальных программах лечения злокачественных опухолей // Biomedical Photonics. – 2012. – Т. 1, № 1. – С. 3–5.
2. Dabrowski J.M., Arnaut L.G. Photodynamic Therapy (PDT) of Cancer: From a Local to a Systemic Treatment // Photochem. Photobiol. Sci. – 2015. – Vol. 14(10). – P. 1765–1780.
3. Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., et al. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update // CA Cancer J Clin. – 2011. – Vol. 61(4). – P. 250–281.

Фотосенсибилизатор в составе эмульсии на основе Poloxamer 407 стабилен в течение 2 ч, по истечении которых происходит изменение формы электронного спектра с появлением высокоинтенсивного длинноволнового пика в области 895 ± 2 нм, а также исчезновение основной полосы поглощения в области 800 ± 2 нм, что свидетельствует об агрегации субстанции в растворе, в результате чего происходит затухание флуоресценции на 100%. Возможно, подобный эффект вызван тем, что большая гидрофильная часть из полиэтиленоксидных блоков Poloxamer 407 способна к гидратации, результатом которой является проникновение воды в ядра мицелл и их дальнейшая агрегация.

На основании полученных данных установлено, что солюбилизатор на основе Kolliphor ELP остается стабильным в течение 4 мес, при этом на протяжении всего срока наблюдения не происходит изменения спектра флуоресценции и поглощения и диаметра частиц (табл., рис. 3–4).

Оценка фотостабильности фотосенсибилизатора в составе эмульсии на основе Kolliphor ELP

Показано, что при облучении исследуемого ФС в составе эмульсии на основе Kolliphor ELP до 100 Дж/см² краситель не подвержен фотовыцветанию: изменений в профиле спектра и интенсивности флуоресценции не отмечено (рис. 5).

Заключение

На основании данных по растворимости и стабильности отобрана мицеллярная эмульсия ФС на основе Kolliphor ELP, характеризующаяся стабильностью как при хранении (4 мес), так и облучении (до 100 Дж/см²). Мицеллярная эмульсия метилового эфира О-пропилоксим-N-пропоксибактериопурпуринимида на основе Kolliphor ELP является перспективной субстанцией и представляет большой интерес для дальнейших исследований в области фотодинамической терапии злокачественных новообразований, поскольку применение данного красителя даст возможность проводить лечение пациентов с объемными и глубокозалегающими опухолевыми образованиями.

REFERENCES

1. Titova V.A. The role and place of photodynamic therapy in multimodal treatment programs for malignant tumors, *Biomedical Photonics*, 2012, vol. 1, no. 1, pp. 3–5. (in Russian)
2. Dabrowski J.M., Arnaut L.G. Photodynamic Therapy (PDT) of Cancer: From a Local to a Systemic Treatment, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2015, vol. 14(10), pp. 1765–1780.
3. Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B.C., Golab J. Photody-

4. Kimura M., Miyajima K., Kojika M., et al. Photodynamic Therapy (PDT) with Chemotherapy for Advanced Lung Cancer with Airway Stenosis // *Int J Mol Sci.* – 2015. – Vol. 16(10). – P. 25466–25475
5. Obaid G., Huang H.-C., Hasan T. Targeted Photodynamic Therapy – An Assimilation of Successes, Challenges and Future Directions. In: *Photodynamic Medicine: From Bench to Clinic.* – London: RSC, 2016. – P. 137–160.
6. Chilakamarthi U., Giribabu L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future // *The Chemical Record.* – 2017. – Vol. 17(8). – P. 775–802.
7. Филоненко Е.В., Серова Л.Г. Фотодинамическая терапия в клинической практике // *Biomedical Photonics.* – 2016. – Т. 5, № 2. – С. 26–37.
8. Ethirajan M., Chen Y., Joshi P., Pandey R.K. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy // *Chem Soc Rev.* – 2011. – Vol. 40(1). – P. 340–362.
9. Мачинская Е.А., Иванова-Радкевич В.И. Обзор механизмов селективного накопления фотосенсибилизаторов различной химической структуры в опухолевой ткани // *Biomedical photonics.* – 2013. – Т. 2, № 4. – С. 28–33.
10. Лукьянец Е.А. Поиск новых фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии // *Biomedical photonics.* – 2013. – Т. 2, № 3. – С. 3–16.
11. Staron J., Boron B., Karcz D., et al. Progress in Chemical Modifications of Chlorophylls and Bacteriochlorophylls or the Applications in Photodynamic Therapy // *Curr. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 22(26). – P. 3054–3074.
12. Suvorov N.V., Grin M.A., Popkov A.M., et al. Novel Photosensitizer Based on Bacteriopurpurinimide and Magnetite Nanoparticles // *Makrogeterotsikly.* – 2016. – Vol. 9(2). – P. 175–179.
13. Huang Y., Luo D., Hamblin M.R. Stable synthetic bacteriochlorins: potent light activated anti-cancer drugs // *Curr. Org. chem.* – 2015. – Vol. 19(10). – P. 948–957.
14. Kawakami K., Oda N., Miyoshi K., et al. Solubilization behavior of a poorly soluble drug under combined use of surfactants and cosolvents // *Eur J Pharm Sci.* – 2006. – Vol. 28(1–2). – P. 7–14.
15. Соснов А.В., Иванов Р.В., Балакин К.В. и др. Разработка систем доставки лекарственных средств с применением микро- и наночастиц // *Качественная клиническая практика.* – 2008. – № 2. – С. 4–12.
16. Гулякин И.Д., Оборотова Н.А., Печениников В.М. Солюбилизация гидрофобных противоопухолевых препаратов // *Химико-фармацевтический журнал.* – 2014. – Т. 48, № 3. – С. 46–50.
17. Zhang Z., Cui C., Wei F., Lv H. Improved solubility and oral bioavailability of Apigenin via Soluplus®/Pluronic F127 binary mixed micelles system // *Drug Dev Ind Pharm.* – 2017. – Vol. 43(8). – P. 1276–1282.
18. Пантюшенко И.В., Грин М.А., Якубовская Р.И. и др. Новый высоко-эффективный ИК-фотосенсибилизатор в ряду бактериохлорофилла а для фотодинамической терапии рака // *Вестник МИТХТ.* – 2014. – Т. 9, № 3. – С. 3–10.
19. Ластовой А.П., Авраменко Г.В. Исследование ассоциации тетраметилтрибензотетраазахлорина в бинарных смесях полярных растворителей и в коллоидных растворах НПАВ // *Макрогетероциклы.* – 2013. – Т. 6(1). – С. 98–105.
20. Varela-Moreira A., Shi A., Fens M., et al. Clinical application of polymeric micelles for the treatment of cancer // *Mater. Chem. Front.* – 2017. – Vol. 1(8). – P. 1485–1501.
21. Kabanov A.V., Batrakova E.V., Alakhov V.Y. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery // *J Control Release.* – 2002. – Vol. 82(2–3). – P. 189–212.
4. Kimura M., Miyajima K., Kojika M., Kono T., Kato H. Photodynamic Therapy (PDT) with Chemotherapy for Advanced Lung Cancer with Airway Stenosis, *Int J Mol Sci.* 2015, vol. 16(10), pp. 25466–25475.
5. Obaid G., Huang H.-C., Hasan T. Targeted Photodynamic Therapy – An Assimilation of Successes, Challenges and Future Directions. In: *Photodynamic Medicine: From Bench to Clinic.* London: RSC, 2016. pp. 137–160.
6. Chilakamarthi U., Giribabu L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future, *Chem Rec*, 2017, vol. 17(8), pp. 775–802.
7. Filonenko E.V., Serova L.G. Photodynamic therapy in clinical practice, *Biomedical Photonics*, 2016, vol. 5, no. 2, pp. 26–37. (in Russian)
8. Ethirajan M., Chen Y., Joshi P., Pandey R.K. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy, *Chem Soc Rev*, 2011, vol. 40(1), pp. 340–362.
9. Machinskaya E.A., Ivanova-Radkevich V.I. Review of the mechanisms of selective accumulation of photosensitizers of various chemical structures in tumor tissue, *Biomedical photonics*, 2013, vol. 2, no. 4, pp. 28–33. (in Russian)
10. Lukyanets E.A. Search for new photosensitizers for photodynamic therapy, *Biomedical photonics*, 2013, vol. 2, no. 3, pp. 3–16. (in Russian)
11. Staron J., Boron B., Karcz D., Szczygieł M., Fiedor L. Progress in Chemical Modifications of Chlorophylls and Bacteriochlorophylls or the Applications in Photodynamic Therapy, *Curr. Med. Chem.*, 2015, vol. 22(26), pp. 3054–3074.
12. Suvorov N.V., Grin M.A., Popkov A.M., Gagarina A.S., Mironov A.F., Majouga A.G. Novel Photosensitizer Based on Bacteriopurpurinimide and Magnetite Nanoparticles, *Makrogeterotsikly*, 2016, vol. 9(2), pp. 175–179.
13. Huang Y., Luo D., Hamblin M.R. Stable synthetic bacteriochlorins: potent light activated anti-cancer drugs, *Curr. Org. chem.*, 2015, vol. 19(10), pp. 948–957.
14. Kawakami K., Oda N., Miyoshi K., Funaki T., Ida Y. Solubilization behavior of a poorly soluble drug under combined use of surfactants and cosolvents, *Eur J Pharm Sci*, 2006, vol. 28(1–2), pp. 7–14.
15. Sosnov A.V., Ivanov R.V., Balakin K.V., Shobolov D.L., Fedotov Yu.A., Kalmykov Yu.M. Development of drug delivery systems using micro- and nanoparticles, *Kachestvennaya klinicheskaya praktika*, 2008, no. 2, pp. 4–12. (in Russian)
16. Gulyakin I.D., Oborotova N.A., Pechennikov V.M. Solubilization of hydrophobic anticancer drugs, *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*, 2014, vol. 48, no. 3, pp. 46–50. (in Russian)
17. Zhang Z., Cui C., Wei F., Lv H. Improved solubility and oral bioavailability of Apigenin via Soluplus®/Pluronic F127 binary mixed micelles system, *Drug Dev Ind Pharm*, 2017, vol. 43(8), pp. 1276–1282.
18. Pantyushenko I.V., Grin M.A., Yakubovskaya R.I., Plotnikova E.A., Morozova N.B., Tsygankov A.A., Mironov A.F. New highly effective bacteriochlorophyll a series IR-photosensitizer for photodynamic cancer therapy, *Vestnik MITKhT*, 2014, vol. 9, no. 3, pp. 3–10. (in Russian)
19. Lastovoi A.P., Avramenko G.V. Study of the association of tetramethyltribenzotetraazachlorin in binary mixtures of polar solvents and in colloidal solutions of nonionic surfactants, *Makrogeterotsikly*, 2013, Vol. 6(1), pp. 98–105. (in Russian)
20. Varela-Moreira A., Shi A., Fens M., Lammers T., Hennink W.E., Schiffelers R.M. Clinical application of polymeric micelles for the treatment of cancer, *Mater. Chem. Front.*, 2017, vol. 1(8), pp. 1485–1501.
21. Kabanov A.V., Batrakova E.V., Alakhov V.Y. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery, *J Control Release*, 2002, vol. 82(2–3), pp. 189–212.

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ПАЦИЕНТОВ С ВНУТРИКОЖНЫМИ МЕТАСТАЗАМИ ДИССЕМНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМЫ КОЖИ

Д.А. Церковский, Н.А. Петровская, А.Н. Мазуренко

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

Резюме

Целью работы была оценка непосредственных результатов применения фотодинамической терапии (ФДТ) у пациентов с внутрикожными метастазами меланомы кожи. В исследование было включено 50 пациентов с внутрикожными метастазами диссеминированной меланомы кожи, получавших лечение на базе отделения гипертермии и фотодинамической терапии. Среди них было 23 (46%) мужчины и 27 (54%) женщин; средний возраст пациентов составил $60,7 \pm 10,4$ лет. Облучение опухолей проводили через 3–4 ч после внутривенного введения фотосенсибилизатора хлоринового ряда (фотолон) в дозах 1,5–3 мг/кг с использованием полупроводникового лазера «УПЛ-ФДТ» (НТЦ «ЛЭМТ» БелОМО, Республика Беларусь, $\lambda = 660 \pm 5$ нм). Суммарная доза света варьировалась от 100 до 400 Дж/см²; плотность мощности – от 0,2 до 0,9 Вт/см²; мощность – от 0,25 до 1 Вт; длительность облучения одного очага зависела от размеров и локализации опухоли и составляла от 5 до 20 мин. Оценку противоопухолевой эффективности ФДТ осуществляли по критериям ВОЗ. Сроки наблюдения за пациентами составили от 3 до 23 мес. При контрольном наблюдении через 1–3 мес после проведенного лечения полная регрессия внутрикожных метастазов меланомы кожи достигнута у 9 (18%), частичная – у 28 (56%), стабилизация процесса – у 8 (16%) и прогрессирование – у 5 (10%) пациентов. Объективный эффект достигнут у 74% пациентов, лечебный – у 90%. Метод ФДТ может быть применен в лечении внутрикожных метастазов диссеминированной меланомы кожи в паллиативных целях и позволяет уменьшать объем опухоли, что существенно повышает качество жизни пациентов.

Ключевые слова: меланома кожи, внутрикожные метастазы, фотодинамическая терапия.

Для цитирования: Церковский Д.А., Петровская Н.А., Мазуренко А.Н. Фотодинамическая терапия пациентов с внутрикожными метастазами диссеминированной меланомы кожи // Biomedical photonics. – 2019 – Т. 8, № 1 – С. 24–28. doi: 10.24931/2413–9432–2019–8–1–24–28.

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

PHOTODYNAMIC THERAPY IN PATIENTS WITH SKIN METASTASES OF DESSIMINATED MELANOMA

Tzerkovsky D.A., Petrovskaya N.A., Mazurenko A.N.

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

Abstract

The aim of the study was to evaluate the immediate results of photodynamic therapy (PDT) in patients with intradermal metastases of skin melanoma. The study included 50 patients who received treatment at the department of hyperthermia and photodynamic therapy. The study included 23 (46%) men and 27 (54%) women with an average age of 60.7 ± 10.4 years. PDT of tumors was carried out 3–4 hours after intravenous administration of a chlorine-based photosensitizer (Photolon) in doses of 1.5–3 mg/kg using a semiconductor laser «UPL-PDT» (Lemt, Belarus, $\lambda = 660 \pm 5$ nm). The exposure doses varied from 100 to 400 J/cm²; power density – from 0.2 to 0.9 W/cm²; power – from 0.25 to 1 W and time of PDT of one focus was dependent on the size and location of the tumor and was 5 to 20 minutes. Evaluation of antitumor efficacy of PDT was carried out according to WHO criteria. The terms of follow-up of patients were between 3 and 23 months. At follow-up observation, 1–3 months after the treatment, complete regression of intradermal metastases of skin melanoma was achieved in 9 (18%) patients, partial – in 28 (56%), process stabilization in 8 (16%) and progression in 5 (10%) patients. The objective effect was achieved in 74% of patients, the therapeutic – in 90%. PDT can be used in the treatment of intradermal metastases of disseminated skin melanoma with palliative purposes and allows reducing the tumor volume, which significantly improves the quality of life of patients.

Keywords: skin melanoma, intradermal metastases, photodynamic therapy.

For citations: Tzerkovsky D.A., Petrovskaya N.A., Mazurenko A.N. Photodynamic therapy in patients with skin metastases of disseminated melanoma, *Biomedical Photonics*, 2019, vol. 8, no. 1, pp. 14–28 (in Russian) 10.24931/2413–9432–2019–8–1–24–28.

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

Введение

Меланома кожи является одной из агрессивных форм злокачественных опухолей, обладающих высокой потенциальной способностью к регионарному метастазированию, способностью к диссеминации по коже и множественному гематогенному метастазированию. В последнее время по всему миру отмечается значительное увеличение числа пациентов с данной патологией: среднегодовой темп прироста заболеваемости меланомой в мире составляет около 5% и может считаться одним из самых высоких среди всех злокачественных новообразований. Несмотря на то, что доля меланомы в структуре всех опухолевых заболеваний кожи составляет в среднем 4%, именно это заболевание является главной причиной смерти пациентов с онкологической патологией кожи. Средняя продолжительность жизни больных меланомой варьирует от 6 до 9 мес при показателях 5-летней выживаемости менее 18% [1].

На сегодняшний день одной из наиболее сложных проблем клинической онкологии является лечение диссеминированной меланомы, что связано с низкой чувствительностью этой опухоли к традиционно используемым химио-, гормоно- и иммунотерапии. Несмотря на определенные достижения в лекарственной терапии метастатической формы меланомы кожи и многообразие противоопухолевых препаратов, только незначительная их часть с относительным успехом используется в лечении данного заболевания.

Все указанное выше показывает, что проблема комбинированного лечения диссеминированной меланомы кожи еще далека от разрешения и остается весьма актуальной для клинической онкологии. Недостаточная эффективность существующих методов терапии диссеминированной меланомы кожи является основной предпосылкой для поиска и апробации новых направлений в этой области.

Одним из таких методов, подтвердивших свою эффективность и безопасность использования в клинических условиях, является фотодинамическая терапия (ФДТ).

ФДТ представляет собой метод локальной активации селективно накопившегося в опухолевой ткани фотосенсибилизатора (ФС) видимым красным цветом, что в присутствии кислорода тканей приводит к развитию фотохимических реакций I и II типов, результатом которых является разрушение опухолевых клеток [2].

ФДТ является результатом комбинированного взаимодействия трех компонентов – ФС, света и кислорода. В основе реализации противоопухолевого эффекта лежит избирательная лазерная фотодеструкция предварительно сенсибилизированной опухолевой ткани. Одной из основных мишеней для фотодинамического воздействия являются эндоте-

литы кровеносных сосудов и система макрофагальных клеток, облучение которых приводит к выработке медиаторов воспаления и цитокинов (лимфокины, тромбоксаны, простогландины), играющих весомую роль в сосудистом компоненте деструкции стромы опухоли [3]. Механизм ФДТ включает прямое цитотоксическое действие на опухоль, приводящее к некрозу и апоптозу опухолевой клетки, повреждению микрососудистого русла опухоли вследствие развивающегося сосудистого стаза, тромбоза и кровоизлияний. Результатом этих процессов является гипоксия и последующая гибель опухоли [4].

На данный момент опубликованы результаты ряда экспериментальных и клинических исследований, подтверждающих чувствительность меланомы кожи к ФДТ с использованием фотосенсибилизирующих агентов различных классов [1, 5–7].

Цель данной работы заключалась в изучении эффективности ФДТ с ФС хлоринового ряда у пациентов с внутрикожными метастазами меланомы кожи.

Материалы и методы

Пациенты

В исследование было включено 50 пациентов с внутрикожными метастазами диссеминированной меланомы кожи. Среди них было 23 (46%) мужчины и 27 (54%) женщин в возрасте от 27 до 82 лет, средний возраст больных составил $60,7 \pm 10,4$ лет. У 32 (64%) пациентов первичный очаг локализовался на нижних конечностях, у 14 (28%) – на верхних, у 4 (8%) – в области туловища. У всех пациентов диагноз был морфологически верифицирован и соответствовал на момент клинического осмотра IV-ой стадии (T1–4N0–2M1(a,b,c)) онкологического заболевания (по классификации AJCC, Клинические рекомендации ESMO по диагностике, лечению и наблюдению при меланоме кожи, 2002). Всем пациентам, включенным в исследование, ранее проводилось комбинированное лечение, включавшее хирургическое иссечение первичной опухоли, лучевую терапию, полихимиотерапию и гормонотерапию. На момент начала лечения у всех пациентов было выявлено прогрессирование заболевания (многочисленные метастатические очаги на кожных покровах). Применение метода ФДТ проводилось на фоне моно- или полихимиотерапии. Параметры воздействий подбирались индивидуально для каждого пациента в зависимости от общего статуса, локализации поражения, количества и размеров опухолевых очагов. Все пациенты, включенные в исследование, были проинформированы о методике проведения ФДТ, возможных ее побочных реакциях и осложнениях, сроках наблюдения и рекомендациях после проведенного лечения. Все пациенты подписали информированное согласие.

Фотосенсибилизатор

В качестве ФС использовали лекарственное средство фотолон (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь, регистрационное удостоверение П N015948/01 от 30.11.2012), представляющий собой комплекс тринатриевой соли хлорина e_6 с поливинилпирролидоном (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь). Фотолон растворяли в 200 мл физиологического раствора и вводили внутривенно, капельно, в течение 30 мин в дозах 1,5–3 мг/кг.

Сеанс ФДТ

Сеанс ФДТ проводили однократно в условиях затемненной палаты через 3–4 ч после внутривенного введения фотолон с использованием полупроводникового лазерного аппарата «УПЛ-ФДТ» (НТЦ «ЛЭМТ» БелОМО, Республика Беларусь, $\lambda=660$ нм). Непосредственно перед облучением опухолей с помощью измерителей мощности осуществляли калибровку лазерных аппаратов. Для защиты органов зрения пациентов и медицинского персонала применяли светозащитные очки. Непосредственно перед сеансом пациентам осуществлялась премедикация внутримышечным введением кеторолака 4,0. Облучение опухолей осуществляли дистанционно, перпендикулярно к поверхности патологического очага, с использованием световода с микролинзой (Полироник, Россия) одним, двумя или тремя полями. Световая доза излучения варьировалась от 100 до 400 Дж/см². Плотность мощности составляла от 0,2 до 0,9 Вт/см², мощность лазерного излучения от 0,25 до 1 Вт. Размер полей облучения варьировал от 0,5 до 2,0 см, число полей – от 3 до 17. Суммарное количество сеансов облучения составило 125. Длительность облучения одного очага зависела от размеров и локализации опухоли и составляла от 5 до 20 мин. С целью профилактики локального краевого рецидива облучению подвергались нормальные неизмененные ткани по периферии опухолевого очага на расстоянии 5–7 мм от его краев.

Критерии оценки эффективности

Для всех пациентов оценку противоопухолевой эффективности ФДТ в отношении внутрикожных метастазов меланомы осуществляли по критериям ВОЗ, основываясь на данных клинического исследования через 1–3 мес после проведенного лечения.

Критерии были следующими:

- полная регрессия (ПР) – 100% резорбция опухолевых очагов через 1 мес после проведения ФДТ, подтвержденная через 3 мес после проведенного лечения;
- частичная регрессия (ЧР) – уменьшение суммарного размера опухолевого очага на 50% и более с последующей стабилизацией, установленное

через 1 мес и подтвержденное через 3 мес после проведения сеанса ФДТ;

- стабилизация процесса – отсутствие увеличения размеров опухолевых узлов, появления новых узлов или других признаков прогрессирования заболевания в течение 3 мес;
- прогрессирование процесса – увеличение суммарного размера опухолевого узла на 25% и более, либо развитие новых опухолевых очагов.

Также оценивался объективный (сумма ПР и ЧР) и лечебный (сумма ПР, ЧР и стабилизации) эффекты.

Результаты и обсуждение

Оценку переносимости метода производили на основании общего состояния пациентов до сеанса ФДТ, после введения ФС, после светового воздействия и ежедневно до выписки пациента из стационара на протяжении 3–5 сут. Нежелательных реакций во время инфузии фотолон и проведения сеанса ФДТ отмечено не было.

Во время сеанса ФДТ у большинства пациентов наблюдались явления, характерные для фотодинамической реакции в целом, такие как зуд, чувство жжения и болезненность в зоне облучения. В случае развития выраженного болевого синдрома применяли ненаркотические анальгетики и/или снижали мощность лазерного излучения с сохранением световой дозы за счет пропорционального увеличения времени облучения. В ряде случаев у пациентов наблюдались симптомы кожной фототоксичности, которые были связаны с нарушением ими светового режима.

После сеанса ФДТ в опухолевых очагах развивались явления геморрагического некроза с последующим образованием струпа, который формировался в течение 4–12 сут. Во всех случаях он представлял собой плотную корочку темно-коричневого цвета, спаянную с подлежащими тканями, который самостоятельно отторгался через 3–6 нед после лечения (рис. 1).

На месте опухолевого очага формировался соединительнотканый рубец, представляющий собой гладкую ровную розоватую поверхность, иногда с небольшим углублением в центре.

Для профилактики кожной фототоксичности пациентам назначали антиоксиданты и светозащитные мази, что способствовало ранней эпителизации раневого дефекта и усилению роста соединительной ткани.

Нежелательных реакций и явлений, связанных с введением ФС, отмечено не было.

При оценке кожной фототоксичности, следует отметить, что у всех пациентов, которые соблюдали световой режим в течение 2–3 сут после сеанса ФДТ, избегая воздействия прямого солнечного света, нежелательных реакций в виде возникновения ожогов



Рис. 1. Меланома кожи теменной области (T3N0M0). Состояние после хирургического лечения (2014 г.). Прогрессирование: внутрикожные метастазы лобно-теменной области:

а – состояние до ФДТ;

б – состояние непосредственно после сеанса ФДТ с фотолоном;

в – состояние через 1 мес после ФДТ

Fig. 1. Melanoma of the skin of the parietal region (T3N0M0). Condition after surgical treatment (2014). Progression: intradermal metastasis of the fronto-parietal region:

a – before PDT;

б – immediately after the PDT session with photolon;

в – 1 month after PDT

кожи различной степени и развития гиперпигментации отмечено не было. В единичных случаях умышленного или неумышленного несоблюдения рекомендаций наблюдалась легкая гиперемия подвергшихся облучению солнечным светом участков кожи, проходящая в течение нескольких часов.

Сроки наблюдения за пациентами составили от 3 до 23 мес. При контрольном клиническом наблюдении через 1–3 мес после проведенного лечения ПР внутрикожных метастазов меланомы кожи достигнута у 9 (18%), ЧР – у 28 (56%), стабилизация процесса – у 8 (16%) и прогрессирование – у 5 (10%) пациентов. Объективный терапевтический эффект достигнут у 74% пациентов, лечебный – у 90%.

Результаты использования ФДТ в лечении пациентов с внутрикожными метастазами диссеминированной меланомы соответствуют имеющимся литературным данным. Так, в исследовании профессора М.А. Каплана и соавт. через 1–2 мес после проведения очаговой ФДТ ПР была достигнута у 7 (11,5%) пациентов с поражением кожи, ЧР – у 33 (54,1%) пациентов с поражением кожи и мягких тканей. Частота объектив-

ных ответов составила 65,6%. Стабилизация длительностью более 6–8 нед зарегистрирована в 13 (21,3%) очагах. Лечебный эффект был достигнут в 86,9% наблюдений. Вместе с тем, следует отметить, что коллеги использовали для облучения опухолевых очагов существенно большие световые дозы (600–900 Дж/см²) по сравнению с нашим исследованием [1].

Закключение

Таким образом, ФДТ выгодно отличается избирательностью поражения опухолевой ткани, отсутствием тяжелых местных и системных нежелательных реакций и возможностью повторения сеансов. Вместе с тем, следует отметить тот факт, что лечение пациентов с данной патологией можно осуществлять в амбулаторных условиях, что позволяет достигнуть хорошего экономического эффекта. Метод ФДТ в лечении внутрикожных метастазов диссеминированной меланомы кожи может быть использован в паллиативных целях, его применение позволяет уменьшать объем опухоли и существенно улучшать качество жизни пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каплан М.А., Кудрявцева Г.Т., Капинус В.Н. и др. Фотодинамическая терапия диссеминированной меланомы кожи с фотосенсибилизатором «Фотолон» // Сиб. онкол. журн. – 2011. – № 1. – С. 56–60.
2. Странадко Е.Ф. Исторический очерк развития фотодинамической терапии // Лазерная медицина. – 2002. – Т.6, вып. 1. – С. 4–8.
3. Mroz P., Yaroslavsky A., Kharkwal G.B. Cell death pathways in photodynamic therapy of tumors // Cancers. – 2011. – Vol. 3. – P. 2516–2539.

REFERENCES

1. Kaplan M.A., Kudryavtseva G.T., Kapinus V.N., Zakurdyayeva I.G., Borgul O.V. Photodynamic therapy of disseminated skin melanoma using Fotolon photosensitizer, *Sib. onkol. zhurn.*, 2011, no. 1. pp. 56–60.
2. Strnadko E.F. Historical essay on the development of photodynamic therapy, *Lazernaya medicina*, 2002, vol. 6, is. 1, pp. 4–8.
3. Mroz P., Yaroslavsky A., Kharkwal G.B. Cell death pathways in photodynamic therapy of tumors, *Cancers*, 2011, vol. 3, pp. 2516–2539.
4. Weiss A., den Bergh H.V., Griffioen A.W. Angiogenesis inhibition for the improvement of photodynamic therapy: The re-

4. Weiss A., den Bergh H.V., Griffioen A.W. Angiogenesis inhibition for the improvement of photodynamic therapy: The revival of a promising idea // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol. 1826. – P. 53–70.
5. Sharma K.V., Bowers N., Davids L.M. Photodynamic therapy-induced killing is enhanced in depigmented metastatic melanoma cells // *Cell Biol. Int.* – 2011. – Vol. 35. – P. 939–949.
6. Sparsa A., Bellaton S., Naves T., et al. Photodynamic treatment induces cell death by apoptosis or autophagy depending on the melanin content in two B16 melanoma cell lines // *Oncol. Rep.* – 2013. – Vol. 29. – P. 1196–1200.
7. Chang C.J., Yu J.S., Wei F.C. In vitro and In vivo photosensitizing applications of photofrin in malignant melanoma cells // *Chang Gung Med. J.* – 2008. – Vol. 31. – P. 260–267.
- vival of a promising idea, *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, vol. 1826, pp. 53–70.
5. Sharma K.V., Bowers N., Davids L.M. Photodynamic therapy-induced killing is enhanced in depigmented metastatic melanoma cells, *Cell Biol. Int.*, 2011, vol. 35, pp. 939–949.
6. Sparsa A., Bellaton S., Naves T., Jauberteau M.O., Bonnetblanc J.M. Photodynamic treatment induces cell death by apoptosis or autophagy depending on the melanin content in two B16 melanoma cell lines, *Oncol. Rep.*, 2013, vol. 29, pp. 1196–1200.
7. Chang C.J., Yu J.S., Wei F.C. In vitro and In vivo photosensitizing applications of photofrin in malignant melanoma cells, *Chang Gung Med. J.*, 2008, vol. 31, pp. 260–267.

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДИАГНОСТИКИ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЦИСТОСКОПИИ С ГЕКСИЛОВЫМ ЭФИРОМ 5-АЛК

А.Д. Каприн^{1,2}, А.А. Трушин³, М.П. Головащенко¹, В.И. Иванова-Радкевич²,
В.И. Чиссов³, Е.В. Филоненко¹

¹МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦР» Минздрава РФ, Москва, Россия

²Российский Университет дружбы народов, Москва, Россия

³ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет), Москва, Россия

Резюме

В работе отражены результаты клинического исследования, в котором изучена диагностическая эффективность флуоресцентной диагностики (ФД) немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря с использованием препарата для ФД злокачественных новообразований – гексильного эфира 5-аминолевулиновой кислоты (ГЭ 5-АЛК) в сравнении со стандартной цистоскопией. В исследование участвовали 110 пациентов. Исследование начинали с внутрипузырного введения 50 мл 0,2%-го раствора ГЭ 5-АЛК, время экспозиции составило 1 ч, после чего препарат удаляли из органа. В течение последующего часа проводили осмотр слизистой в двух режимах цистоскопии. Затем проводили трансуретральную резекцию всех подозрительных участков уротелия на опухолевое поражение в белом свете и из зон визуальной красной флуоресценции, а также у каждого пациента осуществляли контрольную «слепую» биопсию из визуально неизменной и нефлуоресцирующей слизистой. Результаты исследования свидетельствуют о высокой эффективности разработанной методики. Флуоресцентная диагностика по сравнению с результатами стандартной цистоскопии достоверно повысила чувствительность диагностики на 24,4% (с 75,1% до 99,5%), точность диагностики – на 15,8% (с 82,4% до 98,2%) и отрицательную прогностическую ценность – на 33,2% (с 65,8% до 99%) ($p \leq 0,05$). Дополнительно, в общей сложности у 37 (33,6%) больных, обнаружены 63 очага флуоресценции диаметром от 2,5 до 3,0 мм, на неизменных в белом свете участках слизистой оболочки, в 59 из которых морфологически подтвержден рак мочевого пузыря.

Ключевые слова: гексильный эфир 5-аминолевулиновой кислоты, рак мочевого пузыря, флуоресцентная диагностика.

Для цитирования: Каприн А.Д., Трушин А.А., Головащенко М.П., Иванова-Радкевич В.И., Чиссов В.И., Филоненко Е.В. Повышение эффективности диагностики рака мочевого пузыря при использовании цистоскопии с гексильным эфиром 5-АЛК // Biomedical Photonics. – 2019. – Т. 8, № 1. – С. 29–37. Doi: 10.24931/2413-9432-2019-8-1-29-37.

Контакты: Трушин А.А., e-mail: a.trooshin@gmail.com

IMPROVING THE EFFICIENCY OF BLADDER CANCER DIAGNOSTIC CYSTOSCOPY WITH 5-ALA HEXYL ESTER

Kaprin A.D.^{1,2}, Trushin A.A.³, Golovachenko M.P.¹, Ivanova-Radkevich V.I.²,
Chissov V.I.³, Filonenko E.V.¹

¹P.A. Herzen Moscow Oncology Research Center – branch of FSBI NMRRС of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

²Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia

³Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Abstract

This article presents the results of a clinical study that examined the diagnostic efficacy of fluorescent diagnostics (FD) of non-muscular-invasive bladder cancer using a photosensitizer of FD of malignant neoplasms – 5-aminolevulinic acid hexyl ester (5-ALA HE) compared with standard cystoscopy. The study involved 110 patients. The study began with intravesical administration of 50 ml of 0.2% solution of 5-ALA HE, the exposure time was 1 hour, after which the drug was removed from the organ. During the next hour, the mucous membranes were examined in two cystoscopy modes, followed by a standard transurethral resection of all urothelium sites with suspicion for tumor lesion based on white light and visible red fluorescence, and a control blind biopsy from the visually unchanged and non-fluorescent mucous tissue in each patient. The results of the study indicate the high effectiveness of the developed FD methodology with 5-ALA HE in detecting non-muscular-invasive bladder cancer during intravesical administration of the drug, due to selective accumulation of hexamethylbilan-induced PPIX in the tumor.

tissue compared with healthy mucosa. Compared with the results of standard cystoscopy, fluorescence diagnostics significantly increased diagnostic sensitivity by 24.4% (from 75.1% to 99.5%), diagnostic accuracy – by 15.8% (from 82.4% to 98.2%) and a negative predictive value – by 33.2% (from 65.8% to 99%) ($p \leq 0.05$). Additionally, a total of 37 (33.6%) patients was found to have 63 foci of fluorescence with a diameter of 2.5 to 3.0 mm. 59 of these were morphologically confirmed to contain cancer cells.

Key words: 5-aminolevulinic acid hexyl ester, bladder cancer, fluorescent diagnostics.

For citations: Kaprin A.D., Trushin A.A., Golovachenko M.P., Ivanova-Radkevich V.I., Chissov V.I., Filonenko E.V. Improving the efficiency of bladder cancer diagnostic cystoscopy with 5-ALA hexyl ester, *Biomedical Photonics*, 2019, vol. 8, no. 1, pp. 29–37. (in Russian) doi: 10.24931/2413–9432–2019–8–1–29–37.

Contacts: Trushin A.A., e-mail: a.trooshin@gmail.com

Введение

Число впервые выявленных случаев злокачественных новообразований в мире неуклонно растет, не является исключением и рак мочевого пузыря (РМП). Эта патология в общей структуре онкологической заболеваемости занимает 9-е место [1]. В России в 2017 г. на долю РМП пришлось 2,7%, составляя 70% среди всех неоплазий органов мочеполовой системы. РМП находится на втором месте по частоте встречаемости среди урологических заболеваний и на третьем – среди причин смертности от нее. Ежегодно в нашей стране регистрируют свыше 13 тыс. больных с установленным впервые в жизни диагнозом РМП, от которого умирают более 6 тыс. пациентов в год. За последние десять лет зарегистрирован прирост заболеваемости на 24,35%, среднегодовой прирост при этом составляет 2,15% [2].

Чрезвычайно важной задачей является раннее выявление опухолей мочевого пузыря, морфологическая структура которых более чем в 90% случаев представлена уротелиальным раком. На момент установления диагноза РМП 70–85% случаев приходится на немышечно-инвазивную опухоль (Ta, Tis, T1), которую диагностируют в РФ не более чем в 30% наблюдений, что значительно уступает лучшим мировым практикам, где этот показатель достигает 80% [3, 4].

Проблема выявления ранних форм заболевания РМП является актуальной темой современной онкоурологии и, очевидно, связана не только с несвоевременной диагностикой злокачественных опухолей, но и с неправильным стадированием, где частота ошибок достигает 73% [5]. Опухоли мочевого пузыря с инвазией не глубже слизисто-подслизистого слоя зачастую пропускают из-за невозможности визуализации всех очагов во время стандартной цистоскопии в белом свете в силу ее разрешающей способности [6]. Этот рутинный метод диагностики не позволяет в ряде случаев определить истинные границы поражения, получить достаточную информацию о количестве мультифокальных очагов, оценить глубину инвазии, визуализировать очаги *carcinoma in situ* (CIS),

а также не дает достаточно полной количественной и прогностической характеристик опухолям Ta и T1 [7].

Неадекватная оценка опухолевых поражений в уротелии после трансуретральной резекции (ТУР) может привести к ошибкам при выборе тактики лечения, а также обуславливает высокий риск рецидивных очагов Cis, Ta, T1, при этом у 81% больных рецидивы локализованы в области хирургического воздействия [8]. Кроме того, стандартная цистоскопия не позволяет удалить опухолевую ткань в полном объеме, при этом часто остаются ее остаточные фрагменты в хирургическом крае резекции, диагностируемые в 40–70% вторичных ТУР [9]. Эти рецидивы не являются истинными и в большей степени связаны с множеством не выявленных опухолевых зачатков, нечеткой визуализацией злокачественных изменений в крае резекции и ложноотрицательными результатами экспресс-биопсий, поскольку те берутся случайным способом [10].

Таким образом, ограничения в применении стандартной цистоскопии и малая ее информативность в диагностике интраэпителиальных опухолевых образований обусловили повышенный интерес к изучению эффективности различных диагностических подходов, способных распознать микроскопические опухоли, часто внешне не отличающиеся от окружающих здоровых тканей, что послужило началом поиска новых современных методик, способных улучшить возможности светового маркирования злокачественных новообразований, среди которых наиболее перспективным считается флуоресцентная диагностика (ФД). Данный метод основан на возможности распознавания с помощью специальной аппаратуры патологических тканей по индуцированной световым излучением характерной флуоресценции экзогенных или эндогенных флуорохромов, что позволяет уточнять границы опухолевого новообразования и обнаруживать очаги, невидимые невооруженным глазом в белом свете [11].

Эффективность метода зависит от уровня накопления и локализации красителя в отдельных струк-

турах опухолевого очага и окружающей ткани, что может быть достигнуто стимуляцией организма к продукции эндогенных фотоактивных соединений – порфиринов и, в частности, эндогенного фотоактивного протопорфирина IX (ППИХ) [12]. Индукция этой биологической субстанции визуализируется по высокому флуоресцентному контрасту между опухолью и окружающей тканью, что является важным для выявления и уточнения границ распространения опухоли, что одновременно повышает радикальность хирургического воздействия и уменьшает повреждение тканей, окружающих опухоль. Таким соединением, является 5-аминолевулиновая кислота (5-АЛК) – один из промежуточных продуктов синтеза гема – предшественника порфиринов, который в здоровых тканях быстро утилизируется, превращаясь в гем под действием феррохелатазы. В опухолевой ткани наблюдается дефицит этого фермента и при избыточном введении 5-АЛК происходит временное, но значительное повышение уровня порфиринов [13].

Продолжение исследований по улучшению физико-химических свойств порфиринов и диагностической способности ФД привело к разработке лекарственного препарата на основе 5-АЛК II поколения – гексильного эфира 5-АЛК (ГЭ 5-АЛК), подвергающегося в организме метаболической трансформации до 5-АЛК. Будучи более липофильными соединениями, чем 5-АЛК, эфиры лучше преодолевают биологические мембраны, что способствует их более быстрому и большему накоплению в клетках и включению в биосинтез как предшественников ППИХ [14].

Одним из перспективных направлений применения ГЭ 5-АЛК в качестве агента для ФД в онкоурологии является диагностика РМП на ранних стадиях, известная как флуоресцентная цистоскопия с применением синего света с использованием различных фотосенсибилизаторов для маркировки опухолей при внутривульварном введении [15, 16].

Целью исследования являлось повышение эффективности диагностики немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря (НМИРМП) с использованием гексильного эфира 5-АЛК при внутривульварном введении.

Материалы и методы

В исследование были включены 110 больных, более чем у половины из которых жалобы были связаны с предшествующей раку патологией мочевого пузыря и проявлялись прежде всего дизурией, ощущением дискомфорта в мочевом пузыре, а также макро- и микрогематурией. Исследуемая группа была представлена преимущественно лицами мужского пола в соотношении 3,7:1 в возрасте старше 60 лет.

На первом этапе всем больным проводили скрининговое обследование в амбулаторном режиме с

целью выявления первичных пациентов с НМИРМП. Существенными факторами, влияющими на отбор пациентов, являлись данные цистоскопии, эхографического и в некоторых случаях рентгенологического исследований, оценивающих количество и размеры опухолевых очагов, их локализацию.

Стандартную цистоскопию в режиме белого света и флуоресценции выполняли с использованием инструментария и аппаратуры производства фирмы «Karl Storz» (Германия), включая жесткий цистоскоп, оснащенный специальным фильтром с характеристиками пропускания, соответствующими максимуму возбуждения в синем диапазоне спектра флуоресценции ППИХ (380–440 нм), что позволяет визуализировать патологические изменения в уротелии на фоне окружающих здоровых тканей. Для эндо-хирургического вмешательства на слизистой мочевого пузыря применяли жесткий резектоскоп, оснащенный флуоресцентной оптикой, и имеющий наружный диаметр F26.

Для флуоресцентной диагностики использовали ГЭ 5-АЛК, представляющий собой гигроскопический мелкокристаллический порошок белого цвета без запаха, легко растворимый в воде и водно-солевых растворах.

Исследование начинали с внутривульварного введения 50 мл 0,2%-го раствора ГЭ 5-АЛК, время экспозиции составляло 1 ч, после чего раствор удаляли из мочевого пузыря. В течение последующего часа проводили ряд последовательных и преемственных этапов с включением стандартной и флуоресцентной цистоскопии, ТУР опухоли в условиях ФД. Во время цистоскопии в режиме белого света обращали внимание на объем органа, изменения в состоянии и цвете слизистой, в пределах которой проводили поиск патологических образований. При визуализации опухолевых очагов оценивали их локализацию, макроскопическое строение (характер строения ворсин), размеры, характер роста, количество, состояние окружающей слизистой оболочки, отношение к устьям мочеточников, выраженность сосудистого рисунка самой опухоли и подслизистого слоя.

Переход в режим флуоресценции давал возможность выявить следующие типы участков: I тип – подозрительные на рак в белом свете и не флуоресцирующие в синем свете; II тип – подозрительные на рак в белом свете и флуоресцирующие в синем свете; III тип – дополнительные очаги, флуоресцирующие в синем свете размерами от 2,5 до 3,0 мм в диаметре, но не видимые в обычном свете; IV тип – не флуоресцирующие и нормальные в белом свете участки неизменной слизистой. После окончания осмотра слизистой в двух режимах цистоскопии проводили стандартную ТУР всех подозрительных участков уротелии на опухолевое поражение в белом свете

и из зон визуальной красной флуоресценции, а также у каждого пациента осуществляли контрольную «слепую» биопсию из визуально неизменной и не флуоресцирующей слизистой. Электрорезекцию слизистой мочевого пузыря осуществляли в пределах слизистой или с удалением основания патологического очага с мышечной стенкой с целью определения глубины инвазии в случае подтверждения опухолевого характера изменений. После завершения всех этапов исследования выполняли повторный осмотр в синем свете для контроля радикальности ТУР. В случае обнаружения флуоресцирующих участков, их резецировали. Весь полученный гистологический материал подвергали плановому исследованию, результат которого являлся окончательным в диагностике внутрипузырной патологии, и позволял определять характер морфоструктурных изменений в слизистой мочевого пузыря. Среднее количество исследованных очагов у одного пациента составило 3,2.

Для маркировки очаговых образований слизистой мочевого пузыря, выявленных в процессе проведения цистоскопии в двух режимах диагностики, была применена классификация, разработанная в МНИОИ им П.А. Герцена: V(+) – опухоль определяется визуально при осмотре в белом свете, V(–) – опухоль при осмотре в белом свете не определяется; F(+) – очаг флуоресценции, F(–) – флуоресценция не определяется; T(+) – обнаружены элементы злокачественного новообразования, T(–) – не обнаружены элементы злокачественного новообразования. В зависимости от результатов стандартной и флуоресцентной цистоскопии, данных морфологического исследования рассчитывали истинноположительный (ИП), истинноотрицательный (ИО), ложноположительный (ЛП) и ложноотрицательный (ЛО) результаты.

Результаты

Суммарное количество исследованных очагов в двух режимах цистоскопии у всех пациентов составило 352: 179 (50,8%) с визуально определяемой патологией, подозрительной на опухолевый процесс; 173 (49,2%) неизменных в белом свете. Флуоресценцию регистрировали в 241 (68,5%) очаге, в остальных 111 (31,5%) флуоресценцию не наблюдали. Яркую флуоресценцию ГЭ 5-АЛК-индуцированного ПП IX визуализировали в 178 (99,4%) очагах (V(+)F(+)), представленных в белом свете ячеистой или шероховатой слизистой с гиперваскуляризацией, приподнятой по отношению к окружающим тканям, а также единичными или множественными папилломатозными разрастаниями. В большей части ворсинчатые образования имели микроскопические размеры – менее 0,5 см (79,6%), другая часть – до 3,0 см (12,5%) и более 5,0 см (7,9%). Дополнительно, в общей сложности у 37 (33,6%) больных, обнаружены 63 (36,4%) очага флуо-

Таблица 1

Результаты стандартной и флуоресцентной цистоскопии с ГЭ 5-АЛК при внутрипузырном введении

Table 1

Results of standard and fluorescent cystoscopy with 5-ALA HE with intravesical administration

Результаты стандартной цистоскопии и ФД Results of standard and fluorescent cystoscopy			
V(+)/F(+)	V(–)/F(+)	V(+)/F(–)	V(–)/F(–)
178 (73,8%)	63 (26,2%)	1 (0,9%)	110 (99,1%)
F(+) n=241		F(–) n=111	

«V(+)» – в белом свете определяется опухоль, «V(–)» – опухоль в белом свете не определяется, «F(+)» – участки флуоресцирующей ткани, «F(–)» – участки не флуоресцирующей ткани.

V(+) – tumor is detected in white light, V(–) – tumor is not detected in white light, F(+) – areas of fluorescent tissue, F(–) – areas of non-fluorescent tissue.

ресценции диаметром от 2,5 мм до 3,0 мм, неизменных в белом свете (V(–)F(+)), при этом максимальное количество таких очагов, найденных у одного пациента, составило 3. С точки зрения повышения эффективности диагностики опухолей мочевого пузыря метод ФД направлен на выявление именно этих зон, которые не могут быть обнаружены в белом свете, но с высокой вероятностью являются опухолями, следовательно, представляют значительный практический интерес. Флуоресценцию не определяли в одном очаге с клинической картиной гиперемии, крайне подозрительной на опухолевые изменения (0,9%) (V(+)F(–)), и во всех 110 (99,1%) участках контрольных биопсий (V(–)F(–)) (табл.1).

Гистологическое исследование всех биоптатов уротелия (n=241), резецированных в очагах яркой флуоресценции, верифицировало в 236 (97,9%) из них уротелиальный рак (T+), в остальных 5 (2,1%) – неспецифический воспалительный процесс. При этом, из 236 очагов F(+)T(+): было 177 очагов V(+) и 59 очагов V(–); а из 5 очагов F(+)T(–): было 1 очаг V(+) и 4 очагов V(–).

При исследовании 178 образцов тканей уротелия, представленных в белом свете очагами интенсивной гиперемии, крайне подозрительными на рак, в режиме синего света излучающих яркую флуоресценцию (V(+)F(+)), опухолевые изменения выявлены в 177 (99,4%) из них (T(+)). В одном (0,6%) биоптате, выполненном в очаге васкуляризации, подозрительном на рак, в режиме синего света принимающего вид ярко флуоресцирующего эпителия (V(+)F(+)), при гистологическом исследовании опухолевые изменения отсутствовали, имел место метапластический процесс (T(–)).

При гистологическом исследовании 63 очагов дополнительно выявленной красной флуоресценции, представленных в режиме белого света уротелием

Таблица 2

Сопоставление результатов стандартной и флуоресцентной цистоскопии с данными гистологического исследования

Table 2

Comparison of standard and fluorescent cystoscopy results with histological examination data

Гистологическое исследование Histological examination	V(+)/F(+)	V(+)/F(-)	V(-)/F(-)	V(-)/F(+)
T(+) n=236	177 (75,0%)	–	–	59 (25,0%)
T(-) n=116	1 (0,9%)	1 (0,9%)	110 (94,8%)	4 (3,4%)
n= 352	n=178	n=1	n=110	n=63

«V(+)» – в белом свете определяется опухоль, «V(-)» – опухоль в белом свете не определяется; «F(+)» – участки флуоресцирующей ткани, «F(-)» – участки не флуоресцирующей ткани. «T(+)» данные морфологического исследования подтверждают наличие РМП; «T(-)» данные морфологического исследования не подтверждают наличие РМП.

V(+) – tumor is detected in white light, V(-) – tumor is not detected in white light, F(+) – areas of fluorescent tissue, F(-) – areas of non-fluorescent tissue, T(+) – the presence of bladder cancer is confirmed by morphology, T(-) – the presence of bladder cancer is not confirmed by morphology.

без патологических изменений (V(-)F(+)), в 59 (93,6%) из них установлен переходноклеточный рак (T(+)). Во всех этих случаях опухолевый рост определялся в мультифокальных зачатках, не видимых в режиме белого света. В остальных 4 (6,4%) очагах дополнительной флуоресценции (V(-)F(+)), неизмененных при стандартной цистоскопии, диагностированы воспалительные изменения неспецифического характера – зернистый и glandулярный цистит (T(-)).

В одном очаге (0,9%) гиперваскуляризации, подозрительном на опухолевый процесс, но без явлений флуоресценции (V(+)/F(-)), гистологически диагностирован неспецифический воспалительный процесс по типу glandулярного цистита (T(-)) (табл. 2). Все данные гистологического исследования биоптатов, выполненных по результатам цистоскопического исследования в двух режимах визуализации были статистически значимыми ($p \leq 0,05$). (табл. 2.). Следует отметить, что в очагах с визуально неизменной слизистой флуоресценция была более интенсивной при опухолевых поражениях, чем в эпителии с неспецифическим воспалительным процессом.

Морфологическая структура опухолей во всех биоптатах уротелия была представлена переходноклеточным раком различной степени дифференцировки. Стадии Ta-T1 и Tis диагностированы, соответственно, в 156 (87,6%) и 21 (11,8%) очагах V(+)/F(+), при этом low grade (G1) – 51,1%, intermediate grade (G2) – 38,6%; high grade (G3) – 10,3%. В 9 (15,3%) дополнительно выявленных очагах со злокачественными изменениями в поверхностном эпителии (V(-)F(+)) установлены Ta-T1 стадии и в 50 (84,7%) – Tis, при этом степень дифференцировки опухолей соответствовала преимущественно G1 и G2. CIS практически в одинаковом проценте случаев обнаружена как в опухолях с экзофитным ростом, так и практически не определяемых в режиме белого света. В первом случае поверхностный эпителий в зоне локализации CIS сопровождался явлениями гиперемии

или воспаления, имел резко выраженный ячеистый или шероховатый вид (рис. 1), во втором – представлял собой практически неизмененный участок слизистой (рис. 2). Флуоресценция с ГЭ 5-АЛК дала возможность выявить интраэпителиальные злокачественные изменения более чем в 2 раза чаще по сравнению со стандартной цистоскопией, так как микроскопическая CIS может быть пропущена во время цистоскопии или рассмотрена как участок воспаления, если не была проведена биопсия. Эти очаги опухолевого роста более чем в половине наблюдений (54,6%) имели изолированный характер, в 32,6% были локализованы по краю папиллярных разрастаний и в меньшем проценте случаев в их структуре (12,8%).

При стандартной цистоскопии истинноположительными признаны 177 (97,6%) очагов с визуально определяемой опухолевой патологией. 2 очага (2,4%) трактованы как ложноположительные из-за отсутствия в исследуемом материале злокачественного процесса, однако эндоскопическая картина была крайне подозрительной на уротелиальный рак. Ложноотрицательный результат установлен в 59 (34,1%) очагах неизмененного в белом свете уротелия, но результат гистологического исследования свидетельствовал о немышечно-инвазивном РМП, обнаруженным только по ГЭ-АЛК-индуцированной флуоресценции ППХ. Истинноотрицательные случаи зарегистрированы в 4 (2,3%) образцах тканей без визуально определяемой патологии, но с явлениями флуоресценции, вызванной неспецифическим воспалением. К истинноотрицательным результатам также отнесены 110 (63,5%) контрольных биопсий (V(-)F(-)), ни в одном из которых опухолевые клетки не обнаружены (табл. 3).

К истинноположительным (ИП) результатам флуоресцентной цистоскопии отнесены 236 (97,9%) очагов ярко-красного свечения ГЭ 5-АЛК-индуцированного ППХ, представленных переходно-клеточным РМП: 177 (75,0%) клинически определяемых и 59 (25%) дополни-

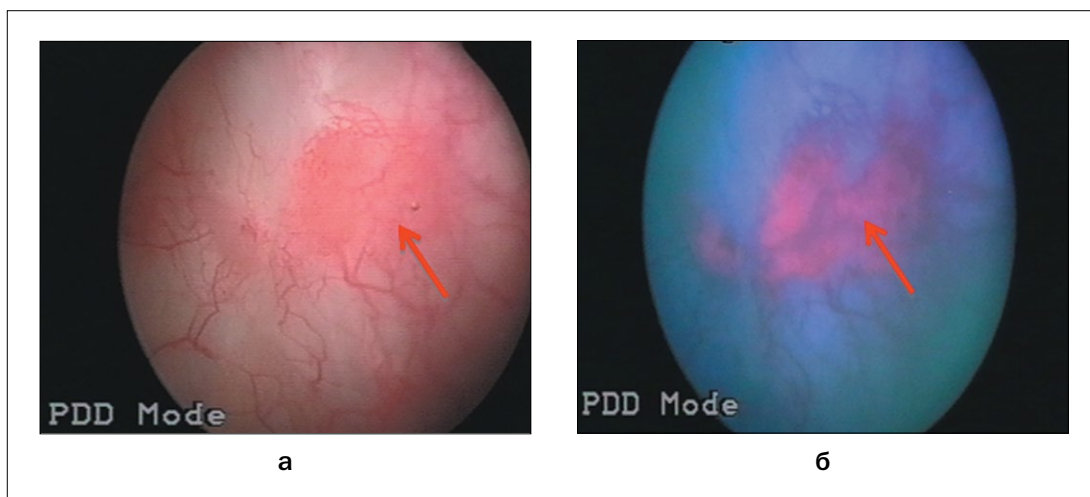


Рис. 1. Участок уротелия с картиной гиперемии подозрительного на рак характера (а), флуоресцирующий ярким свечением (б)
Fig. 1. An area of urothelium with hyperemia with cancer-like characteristics (a), with bright fluorescence (b)

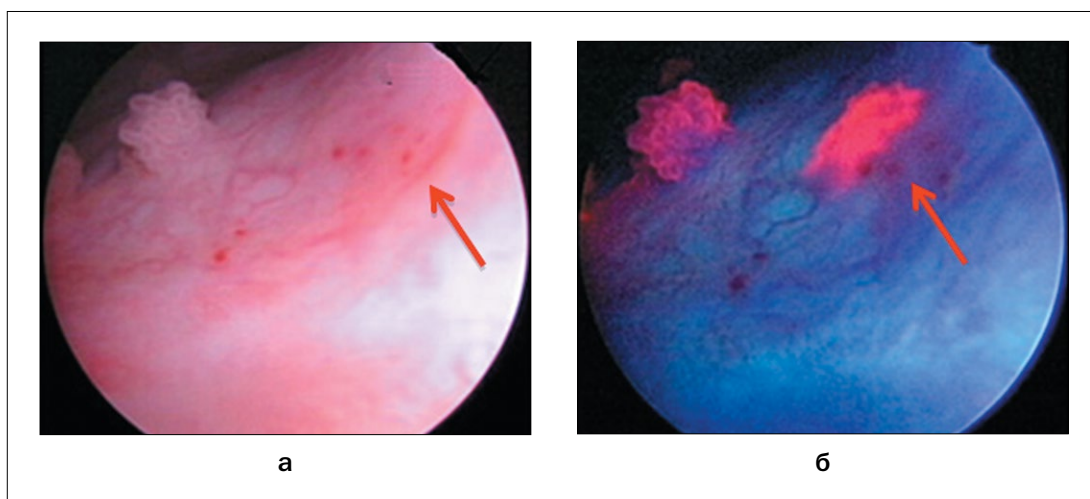


Рис. 2. Участок слизистой оболочки неизмененный в режиме белого света (а), флуоресцирующий ярким свечением (б)
Fig. 2. An area of the mucous membrane almost unchanged in the white light mode (a), with bright fluorescence (b)

тельно выявленных. В 5 (2,1%) участках флуоресценции опухолевый процесс не подтвержден, что свидетельствует о ложноположительном результате: в 4 образцах резецированного уротелия диагностированы воспалительные изменения по типу glandулярного и зернистого цистита, в одном – метаплазия. Истинноотрицательный результат установлен в 110 контрольных исследованиях ($n=110$), в каждом из которых отсутствовала флуоресценция и опухолевый процесс не был выявлен. В одном случае (0,9%) также имел место истинноотрицательный результат в очаге, подозрительном на рак, без явлений флуоресценции, в котором был выявлен неспецифический воспалительный процесс по типу glandулярного цистита. Ложноотрицательный результат не имел места ни в одном исследовании (табл. 4).

Чувствительность стандартной цистоскопии составила 74,7%, специфичность – 99,1%. Положительная прогностическая ценность соответствовала

99,4%, отрицательная прогностическая ценность – 65,8%. Показатель точности равнялся 82,8%.

Чувствительность флуоресцентной цистоскопии составила 100%, специфичность – 95,6%. Положительная прогностическая ценность соответствовала 97,9%, отрицательная прогностическая ценность – 100%, показатель точности – 98,5%. Полученные результаты оценки диагностических параметров цистоскопии в белом свете и в режиме флуоресценции приведены на рис. 3.

Как видно из данных, представленных на рис. 3б, проведение ФД позволило достоверно повысить чувствительность диагностики на 25,3% (с 74,7% до 100%), точность диагностики – на 15,7% (с 82,8% до 98,5%) и отрицательную прогностическую ценность – на 34,2% (с 65,8% до 100%) ($p \leq 0,05$).

Показатель чувствительности представляется как очень важный параметр на этапе предоперационной диагностики, поскольку характеризует возможность

Таблица 3
Оценка результатов цистоскопии в белом свете

Table 3
Evaluation of the results of cystoscopy in white light

Цистоскопия в белом свете Cystoscopy in white light	Всего Total	Морфологическое исследование Morphological examination		Оценка результатов Evaluation of results
		T(+)	T(-)	
V(+)	179	177 (97,6%)	2 (2,4%)	ИП 177; ЛП 2 TP 177; FP 2
V(-)	173	59 (34,2%)	114 (65,8%)	ЛО 59; ИО 114 FN 59; TN 114

«V(+)» – в белом свете определяется опухоль, «V(-)» – опухоль в белом свете не определяется. «T(+)» – морфологически подтверждена ткань опухоли, «T(-)» – морфологически подтверждена ткань мочевого пузыря.

ИП – истинноположительный. ИО – истинноотрицательный. ЛП – ложноположительный. ЛО – ложноотрицательный.

V(+) – tumor is detected in white light, V(-) – tumor is not detected in white light, T(+) – the presence of bladder cancer is confirmed by morphology, T(-) – the presence of bladder cancer is not confirmed by morphology.

TP – true positive. TN – true negative. FP – false positive. FN – false negative.

Таблица 4
Оценка результатов флуоресцентной цистоскопии

Table 4
Evaluation of the fluorescent cystoscopy results

Флуоресцентная цистоскопия Fluorescent cystoscopy	Всего Total	Морфологическое исследование Morphological examination		Оценка результатов Evaluation of results
		T(+)	T(-)	
F(+)	241	236 (97,9%)	5 (2,1%)	ИП 236; ЛП 5 TP 236; FP 5
F(-)	111	–	111 (100%)	ЛО 0; ИО 111 FN 0; TN 111

«F(+)» – участки флуоресцирующей ткани, «F(-)» – участки не флуоресцирующей ткани, «T(+)» – морфологически подтверждена ткань опухоли, «T(-)» – морфологически подтверждена ткань мочевого пузыря.

ИП – истинноположительный. ИО – истинноотрицательный. ЛП – ложноположительный. ЛО – ложноотрицательный.

F(+) – areas of fluorescent tissue, F(-) – areas of non-fluorescent tissue, T(+) – the presence of bladder cancer is confirmed by morphology, T(-) – the presence of bladder cancer is not confirmed by morphology.

TP – true positive. TN – true negative. FP – false positive. FN – false negative.

выявления опухолевых очагов, не детектируемых при проведении стандартной цистоскопии, и более полного хирургического удаления опухоли.

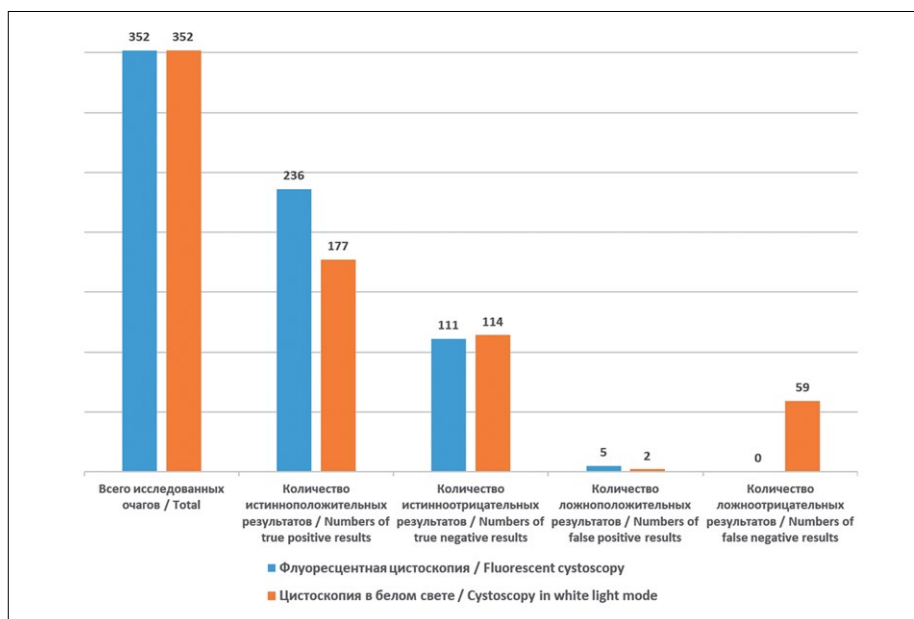
При проведении ФД отмечено большее количество ложноположительных результатов (5 очагов у 4 пациентов), чем при проведении стандартной цистоскопии (1 очаг у 1 пациента). Эти случаи ложного свечения уротелия имели место в очагах воспаления, что привело к некоторому снижению показателей специфичности и положительной прогностической ценности ФД (95,6% и 97,9%, соответственно) по отношению к таковым значениям при цистоскопии в белом свете (99,1% и 99,4%, соответственно) ($p \leq 0,05$).

Клинически значимой разницей в показателях диагностической эффективности флуоресцентной и стандартной цистоскопии была принята разница более 10%. Опираясь на это значение можно заключить, что эффек-

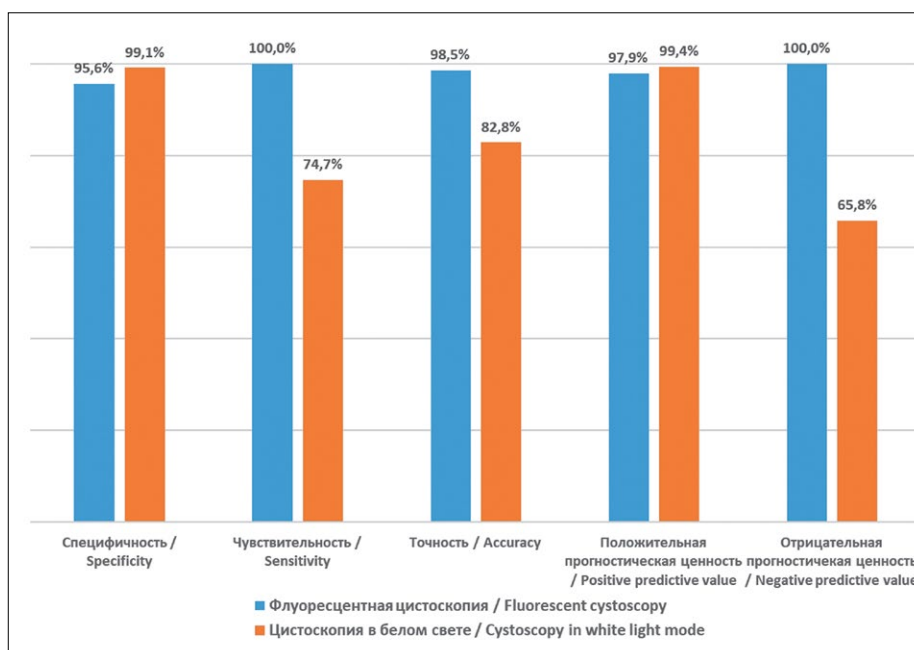
тивность метода ФД по показателям чувствительности, точности и отрицательной прогностической ценности достоверно выше эффективности цистоскопии в белом свете. В то же самое время разница в показателях специфичности и положительной прогностической ценности была достоверно менее 10% (3,5% и 1,5%, соответственно) и, следовательно, не считается клинически значимой.

Заключение

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о высокой эффективности разработанной методики ФД с ГЭ 5-АЛК в выявлении НМИРМП при внутривезикулярном введении препарата, обусловленным избирательным накоплением ГЭ 5-АЛК-индуцированного ППХ в опухолевой ткани по сравнению со здоровой слизистой. Высокий контраст между опухолью и окружающими тканями вследствие флуо-



а



б

Рис. 3. Показатели диагностической эффективности флуоресцентной и стандартной цистоскопии (а, б)
Fig. 3. Indicators of diagnostic efficiency of fluorescent and standard cystoscopy (a, б)

ресценции, позволил выявить 59 очагов опухоли дополнительно, что в 2,3 раза выше, чем при стандартной цистоскопии. Достоверное повышение чувствительности диагностики с 74,7% (при стандартной цистоскопии) до 100% достигнуто за счет обнаружения скрытых очагов мультифокального роста и уточнения истинных границ злокачественного процесса между измененным и неизмененным эпителием, делая их более чет-

кими и видимыми чем при стандартной цистоскопии. Такой подход с использованием флуоресценции при проведении первичной ТУР обуславливает радикальный объем лечения, что значительно понижает вероятность остаточных процессов в слизистой мочевого пузыря, соответственно снижая риск повторных выявлений злокачественного процесса, развития рецидивов и прогрессирования заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Antoni S., Ferlay J., Soerjomataram I., et al. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A global Overview and Trends // *Eur. urol.* – 2017. – Vol. 71(1). – P. 96–108.
2. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2018. – 250 с.
3. Леявин К.Б., Дворниченко В.В. Мышечно-неинвазивный рак мочевого пузыря: клинические и морфологические особенности, результаты лечения, анализ выживаемости // *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН.* – 2013. – Т. 93, № 5. – С. 53–59.
4. Morgan T.M., Keegan K.A., Clark P.E. Bladder cancer // *Curr Opin Oncol.* – 2011. – Vol. 23. – P. 275–282.
5. Schenkman E., Lamm D.L. Superficial bladder cancer therapy // *Scientific World Journal.* – 2004. – Vol 28, No. 4, Suppl. 1. – P. 387–99.
6. Волкова М.И., Матвеев В.Б., Медведев С.В. и др. Клинические рекомендации по диагностике и лечению больных раком мочевого пузыря. – Москва, 2014. – 32 р. URL <http://www.oncology.ru/association/clinical-guidelines/2014/25.pdf>
7. Мартов А.Г., Ергаков Д.В., Андронов А.С. Рецидивирование мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря: возможные эндоскопические пути решения проблемы // *Онкоурол.* – 2010. – № 1. – С. 6–13.
8. Van Rhijn B.W.G., Burger M., Lotan Y. Recurrence and Progression of disease in Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: From Epidemiology to Treatment Strategy // *Eur. Urol.* – 2009. – Vol. 56, No. 3. – P. 430–442.
9. Adiyat K.T., Katkooi D., Soloway C.T., et al. Complete transurethral resection of bladder tumor: are the guidelines being followed? // *Urology.* – 2010. – Vol. 75. – P. 365–367.
10. Mariappan P., Zachou A., Grigor K.M. Detrusor muscle in the first, apparently complete transurethral resection of bladder tumour specimen is a surrogate marker and is dependent on operator experience // *Eur. Urol.* – 2010. – Vol. 57(5). – P. 843–849.
11. Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия в онкологии. Монография / под ред. В.И. Чиссова, Е.В. Филоненко. – Москва: Триумф, 2012. – 269 с.
12. Stepp H.G., Baumgartner R., Beyer W., et al. Fluorescence imaging and spectroscopy of ALA –induced protoporphyrin IX preferentially accumulated in tumor tissue // *Proc. SPIE.* – 1995. – Vol. 2627. – P. 13–24.
13. Fotinos N., Campo M.A., Popowycz F., et al. 5-Aminolevulinic acid derivatives in photomedicine: Characteristics, application and perspectives // *Photochem Photobiol.* – 2006. – Vol. 82, No. 4. – P. 994–1015
14. Якубовская Р.И., Казачкина Н.И., Плютинская А.Д. Новый отечественный препарат гексасенс-лио для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии злокачественных новообразований // *Российский онкологический журнал.* – № 2. – 2009.
15. Слесаревская М.Н., Соколов А.В. Опыт применения флуоресцентной цистоскопии в диагностике поверхностного рака мочевого пузыря // *Урологические ведомости.* – 2014. – Т. IV. – № 1. – С. 3–7.
16. Ivanova-Radkevich V.I., Filonenko E.V., Slovokhodov E.K., et al. Organization of clinical trials of photosensitizer based on 5-aminolevulinic acid hexyl ester // *Indian Journal of Science and Technology.* – 2016. – Vol. 9(18). doi: 10.17485/ijst/2016/v9i18/93759

REFERENCES

1. Antoni S., Ferlay J., Soerjomataram I., Znaor A., Jemal A., Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A global Overview and Trends, *Eur.urol.*, 2017, vol. 71(1), pp. 96–108.
2. *Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2016 godu (zabolevaemost' i smertnost')* [Malignant neoplasms in Russia in 2016 (morbidity and mortality)], by Kaprin A.D., Starinskii V.V., Petrova G.V. as eds. Moscow, MNI OI im. P.A. Gertsena – filial FGU «NMIRC» Minzdrava Rossii Publ., 2018. 250 p.
3. Lelyavin K.B., Dvornichenko V.V. Muscle non-invasive bladder cancer: clinical and morphological features, results of treatment, survival analysis, *Byulleten VSNK SO RAMN*, 2013, vol. 93, no. 5, pp. 53–59.
4. Morgan T.M., Keegan K.A., Clark P.E. Bladder cancer, *Curr Opin Oncol*, 2011, vol. 23, pp. 275–282.
5. Schenkman E., Lamm D.L. Superficial bladder cancer therapy, *Scientific World Journal*, 2004, vol 28, no. 4, suppl. 1, pp. 387–99.
6. Volkova M.I., Matveev V.B., Medvedev S.V., Nosov D.A., Figurin K.M., Khmelevskiy E.V., Chernyaev V.A. *Klinicheskie rekomendacii po diagnostike i lecheniyu bolnykh rakom mochevogo puzrya* [Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of patients with bladder cancer]. Moscow, 2014. 32 p. URL: <http://www.oncology.ru/association/clinical-guidelines/2014/25.pdf>
7. Martov A.G., Ergakov D.V., Andronov A.S. Recurrence of muscular non-invasive bladder cancer: possible endoscopic solutions, *Onkourologiya*, 2010, no. 1, pp. 6–13.
8. Van Rhijn B.W.G., Burger M., Lotan Y. Recurrence and Progression of disease in Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: From Epidemiology to Treatment Strategy, *Eur. Urol.*, 2009, vol. 56, no. 3, pp. 430–442.
9. Adiyat K.T., Katkooi D., Soloway C.T., De los Santos R., Manoharan M., Soloway M.S. Complete transurethral resection of bladder tumor: are the guidelines being followed?, *Urology*, 2010, vol. 75, pp. 365–367.
10. Mariappan P., Zachou A., Grigor K.M. Detrusor muscle in the first, apparently complete transurethral resection of bladder tumour specimen is a surrogate marker and is dependent on operator experience, *Eur. Urol.*, 2010, vol. 57(5), pp. 843–849.
11. *Fluorescentnaya diagnostika i fotodinamicheskaya terapiya v onkologii. Monografiya* [Fluorescent diagnostics and photodynamic therapy in oncology. Monograph], by Chissov V.I., Filonenko E.V. as eds. Moscow, Triumf Publ., 2012. 269 p.
12. Stepp H.G., Baumgartner R., Beyer W., Knuechel R., Koerner T.O., Kriegmair M., Rick K., Steinbach P., Hofstetter A.G. Fluorescence imaging and spectroscopy of ALA –induced protoporphyrin IX preferentially accumulated in tumor tissue, *Proc. SPIE*, 1995, vol. 2627, pp. 13–24.
13. Fotinos N., Campo M.A., Popowycz F., Gurny R., Lange N. 5-Aminolevulinic acid derivatives in photomedicine: Characteristics, application and perspectives, *Photochem Photobiol*, 2006, vol. 82, no. 4, pp. 994–1015
14. Yakubovskaya R.I., Kazachkina N.I., Plyutinskaya A.D. The new Russian agent Hexasens-lio for fluorescence diagnosis and photodynamic therapy for malignancies, *Rossiyskiy onkologicheskii zhurnal*, no. 2, 2009.
15. Slesarevskaya M.N., Sokolov A.V. Experience of using fluorescent cystoscopy in the diagnosis of superficial bladder cancer, *Urologicheskie vedomosti*, 2014, vol. IV, no. 1, pp. 3–7.
16. Ivanova-Radkevich V.I., Filonenko E.V., Slovokhodov E.K., Smirnova I.P., Kuznetsova O.M., Lobaeva T.A., Gushchina Y.S., Khadasheva Z.S. Organization of clinical trials of photosensitizer based on 5-aminolevulinic acid hexyl ester, *Indian Journal of Science and Technology*, 2016, vol. 9(18). doi: 10.17485/ijst/2016/v9i18/93759

ЛАЗЕРНАЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ И ОПТИЧЕСКАЯ ТКАНЕВАЯ ОКСИМЕТРИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ФИБРОЗА КОЖИ

Ю.В. Чурсинова¹, Д.А. Куликов¹, Д.А. Рогаткин¹, И.А. Разницына^{1,2}, Д.В. Мосальская¹, М.А. Бобров¹, Е.Н. Петрицкая¹, А.В. Молочков¹

¹Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» (ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского), Москва, Россия

²Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ, Москва, Россия

Резюме

В современной медицинской практике нет эффективных мер борьбы с фиброзом. Одна из причин – поздняя диагностика, связанная с отсутствием доступных клинических биомаркеров и эффективных методов неинвазивного обнаружения этого процесса. Фиброзирующие заболевания кожи характеризуются фиброзом дермы, подлежащих тканей и представлены широким спектром нозологий. Наибольший интерес для изучения представляют склеродермия и рубцы кожи. На экспериментальной модели методами лазерной флуоресцентной спектроскопии и оптической тканевой оксиметрии изучены изменения кожи в рамках развития блеомицин-индуцированного фиброза. Выявлен достоверный рост показателей эндогенной флуоресценции порфиринов на 7 и на 21 сут, вызванный воспалением и гипоксией. Зафиксированы повышение интенсивности эндогенной флуоресценции коллагена и снижение показателей удельного потребления кислорода на 21 сут исследования, связанные с избыточным накоплением межклеточного матрикса. Синхронные измерения флуоресценции коллагена и удельного потребления кислорода позволили провести корреляцию с фазами фиброгенного ответа, описанного морфологически. Полученные результаты позволяют судить о выраженности воспаления и гипоксии в процессе развития фиброза. Объективный и количественный характер регистрируемых параметров дает возможность разработки критериев для диагностики фаз развития фиброза.

Ключевые слова: фиброз, лазерная флуоресцентная спектроскопия, оптическая тканевая оксиметрия, диагностика *in vivo*.

Для цитирования: Чурсинова Ю.В., Куликов Д.А., Рогаткин Д.А., Разницына И.А., Мосальская Д.В., Бобров М.А., Петрицкая Е. Н., Молочков А.В. Лазерная флуоресцентная спектроскопия и оптическая тканевая оксиметрия в диагностике фиброза кожи // Biomedical Photonics. – 2019. – Т. 8, № 1. – С. 38–45. doi: 10.24931/2413-9432-2019-8-1-38-45.

Контакты: Чурсинова Ю.В., e-mail: yu.chursinova@monikiweb.ru

LASER FLUORESCENT SPECTROSCOPY AND OPTICAL TISSUE OXIMETRY IN DIAGNOSTICS OF SKIN FIBROSIS

Chursinova Yu.V.¹, Kulikov D.A.¹, Rogatkin D.A.¹, Raznitsyna I.A.^{1,2}, Mosalskaya D.V.¹, Bobrov M.A.¹, Petritskaya E.N.¹, Molochkov A.V.¹

¹Moscow Regional Research and Clinical Institute ("MONIKI"), Moscow, Russia

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

Abstract

There are currently no effective measures to combat fibrosis in modern medical practice. One of the reasons for that is the late diagnosis associated with the lack of available clinical biomarkers and effective methods of non-invasive detection of the process. Fibrosis of the skin is characterized by fibrosis of the dermis, underlying tissues and is represented by a wide range of nosologies. Scleroderma and scars are of the greatest interest for the study. Skin changes in the development of bleomycin-induced fibrosis was studied in the experimental model using laser fluorescence spectroscopy and optical tissue oximetry. A significant increase in the rates of endogenous fluorescence of porphyrins, caused by inflammation and hypoxia, was detected at 7 and 21 days. An increased intensity of endogenous collagen fluorescence and a decreased specific oxygen uptake due to excess accumulation of the extracellular matrix were recorded on the 21st day after bleomycin treatment. Synchronous measurements of the collagen fluorescence and the specific oxygen uptake allowed to correlate the obtained data and the phases of the fibrogenic response described morphologically. The results allow to judge the severity of inflammation and hypoxia in the process of the fibrosis development. The objective and quantitative nature of the recorded parameters makes it possible to develop criteria for diagnosing the phases of fibrosis development.

Keywords: fibrosis, laser fluorescence spectroscopy, optical tissue oximetry, diagnostics *in vivo*

For citations: Chursinova Yu.V., Kulikov D.A., Rogatkin D.A., Raznitsyna I.A., Mosalskaya D.V., Bobrov M.A., Petritskaya E. N., Molochkov A.V. Laser fluorescence spectroscopy and optical tissue oximetry in the diagnosis of skin fibrosis, *Biomedical Photonics*, 2019, vol. 8, no. 1 pp. 38–45 (in Russ.). doi: 10.24931/2413–9432–2019–8–1–38–45.

Contacts: Chursinova Yu.V., e-mail: yu.chursinova@monikiweb.ru

Введение

Системный и органнй фиброз представляют собой одну из серьезных медицинских проблем, затрагивающих значительную долю населения земного шара [1]. Фиброз является ведущим процессом при развитии аутоиммунных состояний, таких как ревматоидный артрит, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, системная красная волчанка, а также при заболеваниях печени, почек, легочном альвеолите и сердечной недостаточности [2].

В отечественной медицинской школе избыточное накопление соединительной ткани в коже принято обозначать как склероз, являющийся конечным этапом фиброзирования тканей, с потерей функций органа [3]. Сегодня в периодических изданиях, всё чаще процессы накопления и дезорганизации соединительной ткани обозначаются фиброзом [4].

Фиброз кожи наиболее часто проявляется склеродермией, гипертрофическими и келоидными рубцами [5]. Фиброзные изменения при этом могут иметь различную степень тяжести: от косметических дефектов при рубцовой деформации до жизнеугрожающих состояний при системной склеродермии [6–8]. Патогенез фиброза кожи при разных заболеваниях имеет схожие черты и характеризуется пролиферацией фибробластов, миофибробластов, чрезмерным синтезом и накоплением соединительной ткани [9]. Активация фибробластов всегда является ключевым звеном в фиброзе кожи [10]. Известно, что хроническое воспаление, инфекция, аутоиммунные и аллергические реакции, а также повреждение кожи вследствие излучения или химического воздействия вызывают их неконтролируемую пролиферацию. Стойкая активация фибробластов при этом способствует избыточному синтезу межклеточного вещества, в основном состоящего из коллагена, эластина, не коллагенового гликопротеина и протеогликана [11]. Результатом чрезмерного синтеза волокон и осаждения межклеточного матрикса является фиброз кожи.

В научной литературе обсуждается точка зрения, описывающая фиброз не как исход повреждения тканей, но как динамически протекающий и обратимый процесс, связанный с воспалением и гипоксией [12, 13], своевременное воздействие на которые повышает терапевтические возможности [14]. Так обоснованный выбор метода лечения формирующихся гипертрофи-

ческих и келоидных рубцов опирается на понимание преобладающего в нем процесса (воспаление-гипоксия-фиброз). Исследования в этой области показывают, что реакция фиброзированных тканей на тот или иной вид лечения зависит от адекватности действующего лечебного фактора характеру патологического процесса, определяющего функциональное состояние ткани [15]. Клиницисту объективно определить активность и вклад отдельных процессов (воспаление-гипоксия-фиброз) в процессе осмотра не представляется возможным. Гистологическое исследование позволяет получить дополнительный объем объективной информации, однако процесс забора биологического материала (биопсия) может стать причиной последующего избыточного роста рубца [16]. Сегодня отсутствуют общепринятые алгоритмы выбора метода лечения рубцов, а тактика лечения конкретного пациента основана на личном опыте врача и традициях отдельных клинических школ и организаций [17].

Анализ современных исследований показал, что неинвазивные методы диагностики фиброза кожи, такие как ультразвуковое исследование, эластография, конфокальная микроскопия, оптическая когерентная томография, до сих пор не нашли своего широкого применения в повседневной медицинской практике. Прежде всего это связано с отсутствием критериев, достоверно характеризующих фиброз [18]. Поэтому с уверенностью можно говорить, что вопрос разработки способа быстрой, неинвазивной, количественной оценки фиброза остается актуальным для медицины. Мы полагаем, что оптические технологии могут иметь диагностический потенциал, который может стать основой принципиально нового подхода к комплексной оценке этого процесса. Например, известно, что избыток коллагена можно зафиксировать методом лазерной флуоресцентной спектроскопии, так как под воздействием света в УФ-диапазоне это вещество флуоресцирует [19], а в красном и зеленом спектре также можно обнаружить флуорофоры, ответственные за воспаление и гипоксию [20]. Методы оптической тканевой оксиметрии позволяют определить удельное потребление кислорода тканями, что характеризует активность пролиферативных процессов. Поэтому, предположительно, результаты лазерной флуоресцентной спектроско-

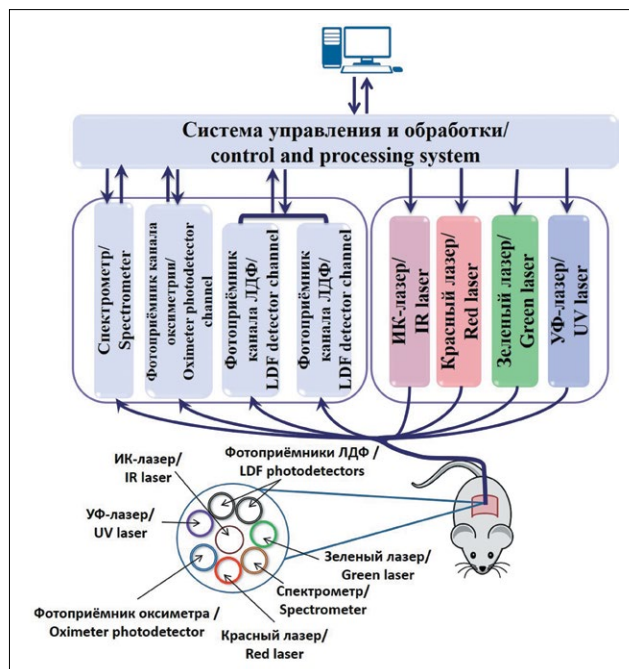


Рис. 1. Схема экспериментальной установки и расположение осветительных и приёмных волокон в оптоволоконном жгуте
Fig. 1. Experimental setup and location of illuminating and receiving optical fibers in the probe

пии и оптической тканевой оксиметрии в совокупности могли бы помочь в определении ведущего патологического процесса, что позволит персонализировано подойти к подбору терапии.

Целью нашей работы стало изучение диагностических возможностей оптических методов лазерной флуоресцентной спектроскопии и оптической тканевой оксиметрии при оценке фиброза кожи животных.

Материалы и методы

Исследование проводилось на беспородных белых мышах, самцах, в возрасте 6 нед, массой 25–30 г в количестве (N) 47 голов. Животные содержались в стандартных условиях вивария при температуре 21–23°C, влажности 50–65%, 14-часовом дневном освещении. Они получали сбалансированный гранулированный корм, не содержащий флуорофоры, доступ к питьевой воде был свободным.

Эксперимент выполнен с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС), Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123) Strasbourg, 1986).

Для создания фиброза использовалась релевантная модель фиброза кожи на животных, которая

используется при изучении склеродермии и рубцовых изменений кожи [21, 22]. Животные были разделены на 2 группы. Первой группе ($N=30$) вводились подкожные инъекции блеомцина (BLM) в дозировке 0,1 мл (концентрация 0,5 мг/мл). Второй (контрольной) группе ($N=17$) вводились подкожные инъекции 0,1 мл 0,9% NaCl (PBS). Всем животным инъекции проводились ежедневно в течение 21 сут в предварительно депилированную кожу межлопаточной области спины. Первые четыре инъекции осуществлялись в вершины предварительно обозначенного маркером квадрата размером 1 см², пятая – в центр квадрата.

На 0, 7, 14 и 21 сут проводились измерения интенсивности эндогенной флуоресценции, тканевой сатурации оксигемоглобина и объемного кровенаполнения кожи *in vivo*. Показания снимались с поверхности кожи непосредственно над экспериментальной областью (рис. 1). Все измерения проводились на многофункциональном лазерном диагностическом комплексе «ЛАКК-М» (ООО НПП «ЛАЗМА», Россия) [23].

На рис. 1 представлена принципиальная схема комплекса «ЛАКК-М». Комплекс работает в режимах «флуоресценция» и «микроциркуляция». В режиме «микроциркуляция» комплекс непрерывно измеряет насыщение гемоглобина кислородом и объем фракции гемоглобина в зондируемой области исследования. Вычисление данных показателей производится по методологии абсорбционной спектроскопии и основано на разнице в регистрируемых сигналах при зондировании биоткани в красном и зеленом спектральных диапазонах длин волн. Насыщение гемоглобина кислородом определяется на основе разных оптических свойств оксигенированных и дезоксигенированных фракций гемоглобина, содержащихся в крови диагностического объема. На основе данных показателей, усредненных по времени измерения (15 с), вычислялось удельное потребление кислорода клетками (U), характеризующее потребление кислорода на единицу объема циркулирующей в ткани крови по формуле [24]:

$$U = \frac{(S_p O_2 - S_t O_2)}{V_b},$$

где $S_t O_2$ – средняя тканевая сатурация оксигемоглобина, V_b – среднее объемное кровенаполнение. При этом сатурация оксигемоглобина ($S_p O_2$) в артериальной крови была принята равной 98%.

Режим работы «флуоресценция» реализует метод лазерной флуоресцентной спектроскопии. К поверхности исследуемого объема с помощью оптоволоконного зонда по осветительному волокну доставляется излучение от выбранного источника. Через приёмное волокно вторичное излучение доставляется к спектрометру.

Для возбуждения флуоресценции в различных частях спектра использовались маломощные лазеры

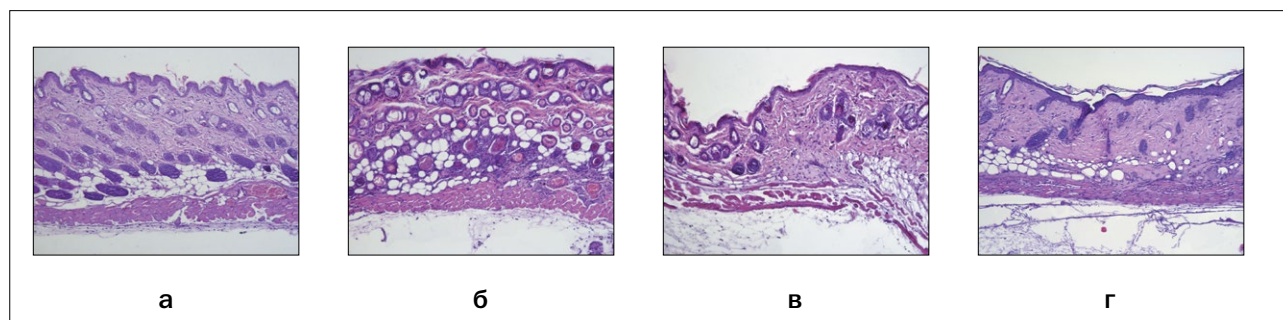


Рис. 2. Кожа мышей в группе BLM. Гистологические препараты, окраска гематоксилином и эозином (увеличение $\times 100$):

а – 0 сут, структура эпидермиса и дермы не изменена;

б – 7 сут, воспалительная инфильтрация долек жировой ткани лимфоцитами и гистиоцитами;

в – 14 сут, частичное замещение жировой ткани межклеточным матриксом, уменьшение воспалительной инфильтрации;

г – 21 сут, обширные очаги накопления межклеточного матрикса, обедненные клеточными элементами (гипоцеллюлярный фиброз), сглаженность коллагеновых волокон

Fig. 2. The skin of mice in the BLM group. Histological preparations, hematoxylin and eosin staining (magnification $\times 100$):

а – Day 0: the structure of epidermis and dermis is not changed;

б – Day 7: inflammation in the lobule of adipose tissue due to infiltration of lymphocytes and histiocytes;

в – Day 14: partial replacement of the adipose tissue by extracellular matrix, reduction of inflammatory infiltration;

г – Day 21: extensive foci of the extracellular matrix deposition, depleted of cellular elements (hypocellular fibrosis), smoothness of collagen fibers

с длинами волн $\lambda_e = 365$ и 535 нм. Выходная мощность на дистальном конце волоконно-оптического зонда составляет около 2–3 мВт для каждого источника света. Длины волн, на которых флуоресценция исследуемых флуорофоров достигает значений, наиболее эффективных для регистрации, далее обозначались λ_r . Для коллагена $\lambda_r = 445$ – 455 нм, для порфирина $\lambda_r = 600$ – 620 нм [19]. Отметим, что вклады коллагена и эластина в общий спектр трудноразделимы, поэтому далее считали, что флуоресценция в диапазоне длин волн $\lambda_r = 445$ – 455 нм отражает наличие обоих флуорофоров. В данной работе оценивалась динамика интенсивности на данных длинах волн (далее – «интенсив-

ность флуоресценции») при отслеживаемых равных мощностях лазерного излучения.

Образцы для гистологических исследований забирались на 0, 7, 14 и 21 сут. Выделялись фрагменты кожи из исследуемой области размером $1,0 \times 1,0$ см с последующей окраской гистологических препаратов гематоксилин-эозином. При изучении морфологической картины оценивалось состояние эпидермиса, воспалительные изменения в дерме, подкожно-жировой клетчатке и структура коллагеновых волокон.

Статистический анализ проводили в программе Microsoft Excel (Microsoft corp., USA). Гипотезы о наличии различий между группами проверяли с помо-

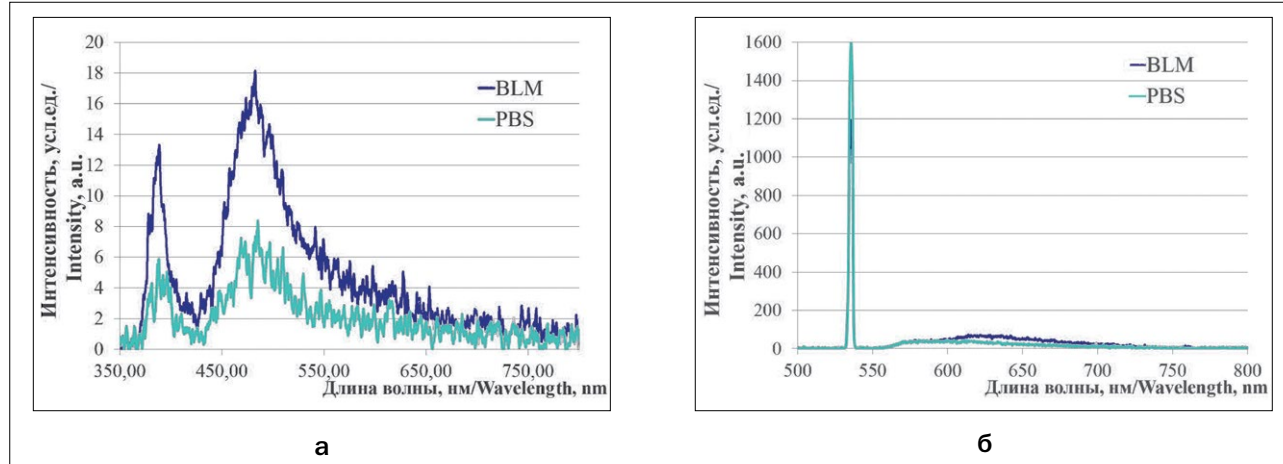


Рис. 3. Примеры спектров флуоресценции в области инъекций на 21 сут:

а – в УФ-диапазоне ($\lambda_e = 365$ нм);

б – в зеленом диапазоне ($\lambda_e = 535$ нм)

Fig. 3. Example of the fluorescence spectra at the injection site at day 21:

а – in the UV wavelength range ($\lambda_e = 365$ нм);

б – in the green wavelength range ($\lambda_e = 535$ нм)

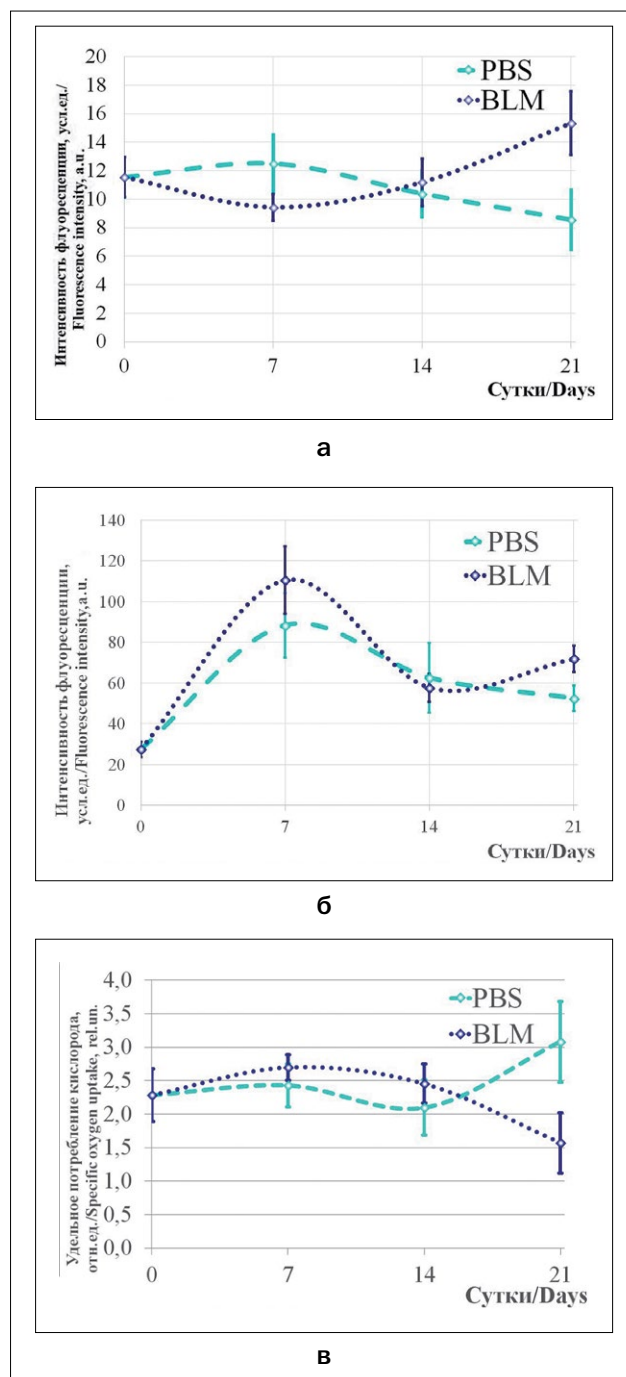


Рис. 4. Динамика показателей оптической диагностики в группах BLM (инъекция блеомицина) и PBS (инъекция физраствора):

а – интенсивности флуоресценции коллагена и эластина ($\lambda_e = 365$ нм, $\lambda_f = 445\text{--}455$ нм);

б – интенсивности флуоресценции порфирина ($\lambda_e = 535$ нм, $\lambda_f = 610$ нм);

в – удельного потребления кислорода тканями

Fig.4. Dynamics of optical diagnostic indicators in the BLM (bleomycin injection) and PBS (saline injection) groups:

а – fluorescence intensity of collagen and elastin ($\lambda_e = 365$ nm, $\lambda_f = 455$ nm);

б – fluorescence intensity of porphyrin ($\lambda_e = 535$ nm, $\lambda_f = 610$ nm);

в – specific oxygen uptake by tissues

стью сравнения средних арифметических значений и построения 95%-ых доверительных интервалов для средних арифметических значений.

На рис. 4а представлена динамика усредненной по группам интенсивности флуоресценции коллагена и эластина. Мы полагаем, что снижение интенсивности эндогенной флуоресценции коллагена на 7 сут по сравнению с 0 сут в группе BLM, вероятнее всего связано с отеком тканей за счет воспалительной экссудации, гистологически наиболее выраженной именно в это время. Повышение же интенсивности эндогенной флуоресценции коллагена и эластина на 21 сут в группе BLM вызвано их накоплением в области сформировавшегося фиброза, что также соответствует морфологической картине фиброза кожи. Принимая во внимание, что основным внеклеточным веществом соединительной ткани при фиброзе кожи является коллаген [25], вклад флуоресценции эластина в данном случае будет незначительным.

Установлено, что порфирины быстро реагируют на метаболические изменения в тканях. В частности, их синтез активно повышается в клетках, находящихся в состоянии хронической гипоксии и воспаления [26]. Динамика усредненной по группам интенсивности флуоресценции порфирина (рис. 4б) показывает достоверный рост показателей на 7 сут по сравнению с 0 сут эксперимента в обеих группах животных, что, вероятно, отражает воспалительные процессы, вызванные ежедневными подкожными инъекциями. Кроме того, на 21 сут эксперимента получены достоверные различия в группе BLM и PBS. Мы полагаем, что повышение интенсивности эндогенной флуоресценции порфиринов в коже с фиброзом в этот период вызвано гипоксией, возникшей прежде всего за счет нарушения перфузии в тканях [27].

Результаты измерения удельного потребления кислорода показывают достоверное снижение его показателей к 21 сут в группе BLM (рис. 4в), предположительно за счет образования гипоцеллюлярного фиброза с низкой метаболической активностью.

Достоверно известно, что воспаленная и пролиферирующая ткань имеет высокую потребность в кислороде. Наиболее ярко это выражено в структуре незрелых метаболически активных тканей рубца. Однако уже сформированный фиброз, в том числе за счет сокращения количества клеточных элементов, такую потребность уменьшает [28]. В нашем эксперименте мы подтвердили это гистологически, а результаты вычисления удельного потребления кислорода клетками и показатели эндогенной флуоресценции коллагена на 14 и 21 сут в группе BLM отразили данную зависимость (рис. 5).

Современная концепция позволяет делить фиброгенный ответ на четыре фазы, перекрывающие друг друга: 1 фаза – инициация ответа, вызванного первич-

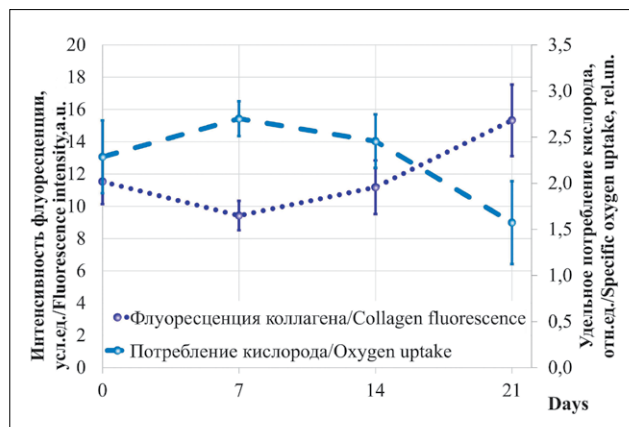


Рис. 5. Динамика интенсивности флуоресценции коллагена и эластина ($\lambda_e = 365$ нм, $\lambda_f = 445\text{--}455$ нм) и удельного потребления кислорода тканями.

Fig. 5. Dynamics of collagen and elastin fluorescence intensity ($\lambda_e = 365$ nm, $\lambda_f = 445\text{--}455$ nm) and specific oxygen uptake by tissues

ным повреждением, 2 фаза – активация эффекторных клеток, 3 фаза – выработка внеклеточного матрикса, 4 фаза – динамическое осаждение/недостаточная резорбция внеклеточного матрикса [4]. Результаты измерения флуоресценции коллагена и удельного потребления кислорода в совокупности с морфологической картиной кожи позволяют нам провести корреляцию с фазами фиброгенного ответа. Так, в 1 и 2 фазы (0–7 сут) наблюдается повышение потребления кислорода эффекторными клетками за счет первичного повреждения ткани и следующего за ним воспаления и гипоксии потребления. В 3 фазе (7–14 сут) нарастает флуоресценция коллагена, что подтверждается накоплением межклеточного матрикса, а уменьшение потребления кислорода – ослаблением процесса воспаления. 4 фаза (14–21 сут) сопровождается избыточным накоплением межклеточного матрикса с обеднением клеточными элементами и резким падением потребления кислорода. Однако стоит отметить, что временные границы на данном этапе выделены условно ввиду особенностей проведения эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wynn T.A., Ramalingam T.R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease // *Nature medicine*. – 2012. – Vol. 18. – № 7. – P. 1028–1040.
2. Wynn T.A. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis // *Journal of Experimental Medicine*. – 2011. – Vol. 208. – No. 7. – P. 1339–1350.
3. Струков А.И., Серов В.В. Патологическая анатомия. 6-е изд. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – С. 254–255.
4. Rockey D.C., Bell P.D., Hill J.A. Fibrosis—a common pathway to organ injury and failure // *New England Journal of Medicine*. – 2015. – Vol. 372. – No. 12. – P. 1138–1149.

Ряд исследователей придерживается мнения, что фиброз необратим, если ткань становится мало-клеточной и, как следствие, бедной биологически активными молекулами, необходимыми для деградации внеклеточного вещества соединительной ткани [29, 30]. Это соответствует периоду, когда увеличение удельного потребления кислорода сменяется его спадом, вследствие уменьшения количества клеток его потребляющих. При этом параллельно регистрируется рост флуоресценции коллагена, как основного биомаркера фиброза. Мы полагаем, что одновременное измерение флуоресценции коллагена и удельного потребления кислорода, позволит зафиксировать не только синхронный характер процессов воспаления и гипоксии в рамках фиброгенеза, но и предоставит новые возможности для диагностики фаз фиброза.

Заключение

Результаты исследования продемонстрировали возможность объективного неинвазивного динамического наблюдения за процессами воспаления и гипоксии в рамках развития фиброза кожи с применением методов лазерной флуоресцентной спектроскопии и оптической тканевой оксиметрии. Развитие предложенных подходов может быть реализовано путем разработки количественных критериев для четкой периодизации формирования фиброза. Объективность исследования также может быть повышена за счёт использования дополнительных методов, позволяющих параллельно оценить и сопоставить проявления изучаемых процессов на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях. Это, в свою очередь, расширит возможности практикующих врачей в диагностике фиброза, персонализации лечебной тактики, прогнозировании исхода заболевания.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-02-00564/18.

REFERENCES

1. Wynn T.A., Ramalingam T.R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease, *Nature medicine*, 2012, vol. 18, no. 7, pp. 1028–1040.
2. Wynn T.A. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis, *Journal of Experimental Medicine*, 2011, vol. 208, no. 7, pp. 1339–1350.
3. Strukov A.I., Serov V.V. *Patologicheskaya anatomiya. 6-e izd.* [Pathological anatomy. 6th ed.]. Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2015. pp. 254–255.
4. Rockey D.C., Bell P.D., Hill J.A. Fibrosis—a common pathway to organ injury and failure, *New England Journal of Medicine*, 2015, vol. 372, no. 12, pp. 1138–1149.

5. Andrews J.P., Marttala J., Macarak E., et al. Keloids: The paradigm of skin fibrosis—Pathomechanisms and treatment // *Matrix Biology*. – 2016. – Vol. 51. – P. 37–46.
6. Bijlard E., Kouwenberg C.A., Timman R., et al. Burden of keloid disease: A cross-sectional health-related quality of life assessment // *Acta dermato-venereologica*. – 2017. – Vol. 97, No. 2. – P. 225–229.
7. Bock O., Schmid-Ott G., Malewski P., Mrowietz U. Quality of life of patients with keloid and hypertrophic scarring // *Archives of dermatological research*. – 2006. – Vol. 297, No. 10. – P. 433.
8. Muangchan C., Harding S., Khimdas S., et al. Association of C-reactive protein with high disease activity in systemic sclerosis: Results from the Canadian Scleroderma Research Group // *Arthritis Care Res (Hoboken)*. – 2012. – Vol. 64, No. 9. – P. 1405–1414.
9. Habieli D.M., Hogaboam C. Heterogeneity in fibroblast proliferation and survival in idiopathic pulmonary fibrosis // *Frontiers in pharmacology*. – 2014. – Vol. 5, No. 2. – P. 1–6.
10. Wang W., Qu M., Xu L., et al. Sorafenib exerts an anti-keloid activity by antagonizing TGF- β /Smad and MAPK/ERK signaling pathways // *J Mol Med (Berl)*. – 2016. – Vol. 94, No. 10. – P. 1181–1194.
11. Driskell R.R., Lichtenberger B.M., Hoste E., et al. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair // *Nature*. – 2013. – Vol. 504. – P. 277–281.
12. Manresa M.C., Godson C., Taylor C.T. Hypoxia-sensitive pathways in inflammation-driven fibrosis // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. – 2014. – Vol. 307, No. 12. – P. R1369–R1380.
13. Iredale J.P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ // *The Journal of clinical investigation*. – 2007. – Vol. 117, No. 3. – P. 539–548.
14. Lokmic Z., Musyoka J., Hewitson T.D., Darby I.A. Hypoxia and hypoxia signaling in tissue repair and fibrosis // *Int Rev Cell Mol Biol*. – 2012. – Vol. 296. – P. 139–185.
15. Гуллер А.Е., Шехтер А.Б. Клинический тип и гистологическая структура кожных рубцов как прогностические факторы исхода лечения // *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*. – 2007. – № 4. – С. 19–31.
16. Monstrey S., Hoeksema H., Verbelen J., et al. Assessment of burn depth and burn wound healing potential // *Burns*. – 2008. – Vol. 34, No. 6. – P. 761–769.
17. Mustoe T.A., Cooter R.D., Gold M.H., et al. International Advisory Panel on Scar Management. International clinical recommendations on scar management // *Plast Reconstr Surg*. – 2002. – Vol. 110, No. 2. – P. 560–571.
18. Kang T., Abignano G., Lettieri G., et al. Skin imaging in systemic sclerosis // *Eur J Rheumatol*. – 2014. – Vol. 1, No. 3. – P. 111–116.
19. Smirnova O.D., Rogatkin D.A., Litvinova K.S. Collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of abnormal tissue changes // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. – 2012. – Vol. 5, No. 2. – P. 1250010.
20. Franco W., Gutierrez-Herrera E., Kollias N., Doukas A. Review of applications of fluorescence excitation spectroscopy to dermatology // *Br J Dermatol*. – 2016. – Vol. 174, No. 3. – P. 499–504.
21. Avouac J. Mouse model of experimental dermal fibrosis: the bleomycin-induced dermal fibrosis // *Methods Mol Biol*. – 2014. – Vol. 1142. – P. 91–8.
22. Li Y., Zhang J., Zhang W., et al. MicroRNA-192 regulates hypertrophic scar fibrosis by targeting SIP1 // *J Mol Histol*. – 2017. – Vol. 48, No. 5–6. – P. 357–366.
23. Rogatkin D.A., Lapaeva L.G., Petrinskaya E.N., et al. Multifunctional laser noninvasive spectroscopic system for medical diagnostics and metrological provisions for that // *Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering*. – 2009. DOI: 10.1117/12.831602
5. Andrews J.P., Marttala J., Macarak E., Rosenbloom J., Uitto J. Keloids: The paradigm of skin fibrosis—Pathomechanisms and treatment, *Matrix Biology*, 2016, vol. 51, pp. 37–46.
6. Bijlard E., Kouwenberg C.A., Timman R., Hovius S.E., Busschbach J.J., Mureau M.A. Burden of keloid disease: A cross-sectional health-related quality of life assessment, *Acta dermato-venereologica*, 2017, vol. 97, no. 2, pp. 225–229.
7. Bock O., Schmid-Ott G., Malewski P., Mrowietz U. Quality of life of patients with keloid and hypertrophic scarring, *Archives of dermatological research*, 2006, vol. 297, no. 10, pp. 433.
8. Muangchan C., Harding S., Khimdas S., Bonner A., Canadian Scleroderma Research group, Baron M., Pope J. Association of C-reactive protein with high disease activity in systemic sclerosis: Results from the Canadian Scleroderma Research Group, *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2012, vol. 64, no. 9, pp. 1405–1414.
9. Habieli D.M., Hogaboam C. Heterogeneity in fibroblast proliferation and survival in idiopathic pulmonary fibrosis, *Frontiers in pharmacology*, 2014, vol. 5, no. 2, pp. 1–6.
10. Wang W., Qu M., Xu L., Wu X., Gao Z., Gu T., Zhang W., Ding X., Liu W., Chen Y.L. Sorafenib exerts an anti-keloid activity by antagonizing TGF- β /Smad and MAPK/ERK signaling pathways, *J Mol Med (Berl)*, 2016, vol. 94, no. 10, pp. 1181–1194.
11. Driskell R.R., Lichtenberger B.M., Hoste E., Kretzschmar K., Simons B.D., Charalambous M., Ferron S.R., Herault Y., Pavlovic G., Ferguson-Smith A.C., Watt F.M. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair, *Nature*, 2013, vol. 504, pp. 277–281.
12. Manresa M.C., Godson C., Taylor C.T. Hypoxia-sensitive pathways in inflammation-driven fibrosis, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2014, vol. 307, no. 12, pp. R1369–R1380.
13. Iredale J.P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ, *The Journal of clinical investigation*, 2007, vol. 117, no. 3, pp. 539–548.
14. Lokmic Z., Musyoka J., Hewitson T.D., Darby I.A. Hypoxia and hypoxia signaling in tissue repair and fibrosis, *Int Rev Cell Mol Biol*, 2012, vol. 296, pp. 139–185.
15. Guller A.E., Shekhter A.B. Clinical type and histological structure of skin scars as prognostic factors of treatment outcome, *Annaly plasticheskoy, rekonstruktivnoy i ehsteticheskoy hirurgii*, 2007, no. 4, pp. 19–31. (in Russ.)
16. Monstrey S., Hoeksema H., Verbelen J., Pirayesh A., Blondeel P. Assessment of burn depth and burn wound healing potential, *Burns*, 2008, vol. 34, no. 6, pp. 761–769.
17. Mustoe T.A., Cooter R.D., Gold M.H., Hobbs F.D., Ramelet A.A., Shakespeare P.G., Stella M., Téot L., Wood F.M., Ziegler U.E. International Advisory Panel on Scar Management. International clinical recommendations on scar management, *Plast Reconstr Surg*, 2002, vol. 110, no. 2, pp. 560–571.
18. Kang T., Abignano G., Lettieri G., Wakefield R.J., Emery P., Del Galdo F. Skin imaging in systemic sclerosis, *Eur J Rheumatol*, 2014, vol. 1, no. 3, pp. 111–116.
19. Smirnova O.D., Rogatkin D.A., Litvinova K.S. Collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of abnormal tissue changes, *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2012, vol. 5, no. 2, p. 1250010.
20. Franco W., Gutierrez-Herrera E., Kollias N., Doukas A. Review of applications of fluorescence excitation spectroscopy to dermatology, *Br J Dermatol*, 2016, vol. 174, no. 3, pp. 499–504.
21. Avouac J. Mouse model of experimental dermal fibrosis: the bleomycin-induced dermal fibrosis, *Methods Mol Biol*, 2014, vol. 1142, pp. 91–98.
22. Li Y., Zhang J., Zhang W., Liu Y., Li Y., Wang K., Zhang Y., Yang C., Li X., Shi J., Su L., Hu D. MicroRNA-192 regulates hypertrophic scar fibrosis by targeting SIP1, *J Mol Histol*, 2017, vol. 48, no. 5–6, pp. 357–366.

24. Rogatkin D., Shumskiy V., Tereshenko S., Polyakov P. Laser-based non-invasive spectrophotometry – An overview of possible medical applications // *Photon Lasers Med.* – 2013. – Vol. 2, No. 3. – P. 225–240.
25. Ho Y.Y., Lagares D., Tager A.M., Kapoor M. Fibrosis—a lethal component of systemic sclerosis // *Nat Rev Rheumatol.* – 2014. – Vol. 10, No. 7. – P. 390–402.
26. Petritskaya E.N., Kulikov D.A., Rogatkin D.A., et al. Use of fluorescence spectroscopy for diagnosis of hypoxia and inflammatory processes in tissue // *Journal of Optical Technology.* – 2015. – Vol. 82, No. 12. – P. 810–814.
27. Van Hal T.W., van Bon L., Radstake T.A system out of breath: how hypoxia possibly contributes to the pathogenesis of systemic sclerosis // *International Journal of Rheumatology.* – 2011. – Vol. 2011. – P. 824972
28. Darby I.A., Hewitson T.D. Hypoxia in tissue repair and fibrosis // *Cell and tissue research.* – 2016. – Vol. 365, No. 3. – P. 553–562.
29. Issa R., Zhou X., Constandinou C.M., et al. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking // *Gastroenterology.* – 2004. – Vol. 126, No. 7. – P. 1795–1808.
30. Iredale J.P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ // *Journal of clinical investigation.* – 2007. – Vol. 117, No. 3. – P. 539–548.
23. Rogatkin D.A., Lapaeva L.G., Petrinskaya E.N., Sidorov V.V., Shumskiy V.I. Multifunctional laser noninvasive spectroscopic system for medical diagnostics and metrological provisions for that, *Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering*, 2009. DOI: 10.1117/12.831602
24. Rogatkin D., Shumskiy V., Tereshenko S., Polyakov P. Laser-based non-invasive spectrophotometry – An overview of possible medical applications, *Photon Lasers Med*, 2013, vol. 2, no. 3, pp. 225–240.
25. Ho Y.Y., Lagares D., Tager A.M., Kapoor M. Fibrosis—a lethal component of systemic sclerosis, *Nat Rev Rheumatol*, 2014, vol. 10, no. 7, pp. 390–402.
26. Petritskaya E.N., Kulikov D.A., Rogatkin D.A., Guseva I.A., Kulikova P.A. Use of fluorescence spectroscopy for diagnosis of hypoxia and inflammatory processes in tissue, *Journal of Optical Technology*, 2015, vol. 82, no. 12, pp. 810–814.
27. Van Hal T.W., van Bon L., Radstake T.A system out of breath: how hypoxia possibly contributes to the pathogenesis of systemic sclerosis, *International Journal of Rheumatology*, 2011, vol. 2011, p. 824972
28. Darby I.A., Hewitson T.D. Hypoxia in tissue repair and fibrosis, *Cell and tissue research*, 2016, vol. 365, no. 3, pp. 553–562.
29. Issa R., Zhou X., Constandinou C.M., Fallowfield J., Millward-Sadler H., Gaca M.D., Sands E., Suliman I., Trim N., Knorr A., Arthur M.J., Benyon R.C., Iredale J.P. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking, *Gastroenterology*, 2004, vol. 126, no. 7, pp. 1795–1808.
30. Iredale J.P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ, *Journal of clinical investigation*, 2007, vol. 117, no. 3, pp. 539–548.

ОПТИЧЕСКИЙ СПЕКТРОАНАЛИЗАТОР С РАСШИРЕННЫМ ДИНАМИЧЕСКИМ ДИАПАЗОНОМ ДЛЯ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ В БИОТКАНЯХ

Г.А. Меерович^{1,2}, Е.В. Ахлюстина², Т.А. Савельева^{1,2}, К.Г. Линьков¹, В. Б. Лощенов^{1,2}

¹Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук, Москва, Россия

²Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ, Москва, Россия

Резюме

В настоящее время наиболее перспективным методом для исследования фармакокинетики препаратов, обладающих выраженными флуоресцентными свойствами, является спектрально-флуоресцентный метод. В этой статье мы предлагаем алгоритм расширения динамического диапазона спектроанализатора путем автоматического мониторинга максимального значения спектральной плотности в регистрируемом спектре флуоресценции и автоматического контролируемого изменения времени накопления в зависимости от этого значения с последующей компенсацией выходного сигнала с учетом этого изменения, а также схемные решения, позволяющие реализовать этот алгоритм.

Тестирование спектроанализатора ЛЭСА-01-«Биоспек», модернизированного с использованием предложенного подхода, проводилось на дисперсиях фотосенсибилизатора на основе тетра-3-фенилтиофталочиамина гидроксиалюминия различной концентрации (от 0,01 мг/л до 50 мг/л), примерно соответствующих концентрациям, реализующихся в процессе исследования фармакокинетики в калибровочных образцах и тканях экспериментальных животных. Предложенные решения, реализующие алгоритм регистрации спектров флуоресценции с автоматическим изменением времени накопления в зависимости от уровня сигнала, обеспечили существенное расширение динамического диапазона спектроанализатора (до 3.5 порядков) и повышение точности при фармакокинетических исследованиях.

Ключевые слова: флуоресцентная диагностика, фармакокинетика, спектр, интенсивность, экспозиция.

Для цитирования: Меерович Г.А., Ахлюстина Е.В., Савельева Т.А., Линьков К.Г., Лощенов В. Б. Оптический спектроанализатор с расширенным динамическим диапазоном для фармакокинетических исследований флуоресцирующих препаратов в биотканях // Biomedical Photonics. – 2019. – Т. 8, № 1. – С. 46–51. doi: 10.24931/2413-9432-2019-8-1-46-51.

Контакты: Меерович Г.А., e-mail: meerovich@mail.ru

OPTICAL SPECTROANALYZER WITH EXTENDED DYNAMIC RANGE FOR PHARMACOKINETIC INVESTIGATIONS OF PHOTOSENSITIZERS IN BIOTISSUE

Meerovich G.A.^{1,2}, Akhlyustina E.V.², Savelieva T.A.^{1,2}, Linkov K.G.¹, Loschenov V.B.^{1,2}

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

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

Abstract

Currently, the most promising method for the study of pharmacokinetics of drugs with fluorescent properties is the spectral-fluorescent method. In this article, we propose an algorithm for expanding the dynamic range of the spectrum analyzer by automatically monitoring the maximum spectral density in the recorded fluorescence spectrum and automatically controlled changes in the accumulation time depending on this value, followed by compensation of the output signal with regard to this change, as well as hardware circuit solutions that allow this algorithm.

Testing of LESA-01-“Biospec” spectrum analyzer, upgraded using the proposed approach, was carried out on photosensitizer dispersions based on tetra-3-phenylthiophthalocyanine hydroxylaluminum of various concentrations (from 0.01 mg/l to 50 mg/l), approximately corresponding to the concentrations realized in the process of studying pharmacokinetics in calibration samples and tissues of experimental animals.

The proposed solutions that implement the algorithm for recording fluorescence spectra with automatic change of accumulation time depending on the signal level, ensured a significant expansion of the dynamic range of the spectrum analyzer (up to 3.5 orders of magnitude) and improved accuracy in pharmacokinetic studies

Keywords: fluorescence diagnostics, pharmacokinetics, spectrum, intensity, exposure.

For citations: Meerovich G.A., Akhlyustina E.V., Savelieva T.A., Linkov K.G., Loschenov V.B. Optical spectroanalyzer with extended dynamic range for pharmacokinetic investigations of photosensitizers in biotissue, *Biomedical Photonics*, 2019, vol. 8, no. 1, pp. 46–51. (in Russian) doi: 10.24931/2413–9432–2019–8–1–46–51.

Contacts: Meerovich G.A., e-mail: meerovich@mail.ru

Введение

Изучение фармакокинетики и биораспределения лекарственного вещества основано на оценке его концентрации в органах, тканях и биологических жидкостях организма в определенные моменты времени после введения [1]. Одним из важнейших требований при проведении таких исследований является широкий динамический диапазон метода измерения, который должен составлять не менее трех порядков.

В настоящее время наиболее перспективным методом для исследования фармакокинетики препаратов, обладающих выраженными флуоресцентными свойствами, является спектрально-флуоресцентный [1–4]. Он широко используется для оценки уровня и селективности накопления фотосенсибилизаторов (ФС), предназначенных для фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики, в биологических тканях.

Используемое для таких исследований спектроскопическое оборудование, как правило, включает в себя лазер, полихроматор, оптоволоконный зонд, содержащий осветительные световоды для доставки к биоткани возбуждающего излучения и приемные световоды для доставки излучения флуоресценции от биоткани на вход полихроматора, и матричный фотоприемник на выходе полихроматора, в частности, прибор с зарядовой связью (ПЗС) или КМОП («комплементарная структура металл-оксид-полупроводник»)–линейку. Система регистрации сигнала от каждой из ячеек линейки, пропорционального ее заряду, включает аналогово-цифровой преобразователь (АЦП), блок буферной памяти и персональный компьютер (ПК) [2, 5]. При проведении спектрально-флуоресцентного исследования излучение с выхода лазера вводится в осветительный световод оптоволоконного зонда. Выходя из дистального конца осветительного световода, это излучение облучает биологическую ткань, содержащую флуоресцирующий препарат, и инициирует флуоресценцию его молекул. Интенсивность характеристической полосы флуоресценции препарата в первом приближении пропорциональна его содержанию в биоткани. Приемные световоды оптоволоконного зонда доставляют излучение флуоресценции от биоткани на вход полихроматора, где происходит спектральное разложение этого излучения, после чего

оно попадает на линейку. Сигнал с выхода линейки поступает на АЦП и в блок буферной памяти. ПК из поступающих с выхода блока буферной памяти цифровых данных, соответствующих интенсивности сигнала из каждой ячейки фотоприемника, и номеров ячеек фотоприемника, которым поставлена в соответствии с результатами калибровки определенная длина волны, формирует спектральную кривую (зависимость интенсивности от длины волны), которая отображается на мониторе ПК.

Динамический диапазон спектроанализатора определяется, в основном, характеристиками линейки. При высоких уровнях световых потоков, падающих на ячейку линейки, может происходить зарядовое насыщение сигнала этой и прилегающих ячеек линейки; при низких уровнях сигнал, связанный с падающим световым потоком, может оказаться мало различимым на фоне аппаратных шумов устройства (в первую очередь, шумов линейки). Из-за этого динамический диапазон известных устройств не превышает, как правило, двух порядков.

В настоящей статье рассматривается возможность расширения динамического диапазона спектроанализатора для фармакокинетических исследований флуоресцирующих препаратов.

Материалы и методы

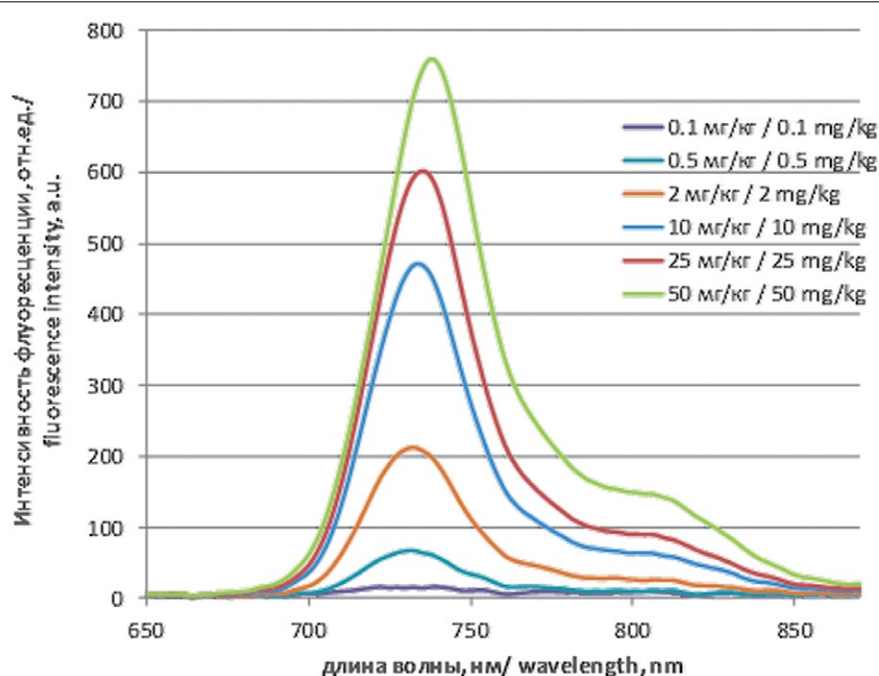
В качестве тест-объектов были использованы образцы липосомальных дисперсий тетра-3-фенилтиофталокцианина гидроксиалюминия в дистиллированной воде с концентрациями 0,01 мг/мл; 0,05 мг/мл; 0,1 мг/мл; 0,5 мг/мл; 2 мг/мл; 10 мг/мл; 25 мг/мл; 50 мг/мл в пробирках Эппендорфа. Контрольным образцом служила пробирка Эппендорфа с водой.

Исследования флуоресценции проводились с использованием лазерного электронного спектрального анализатора ЛЭСА-01-«Биоспек» (ООО «БИО-СПЕК», Россия).

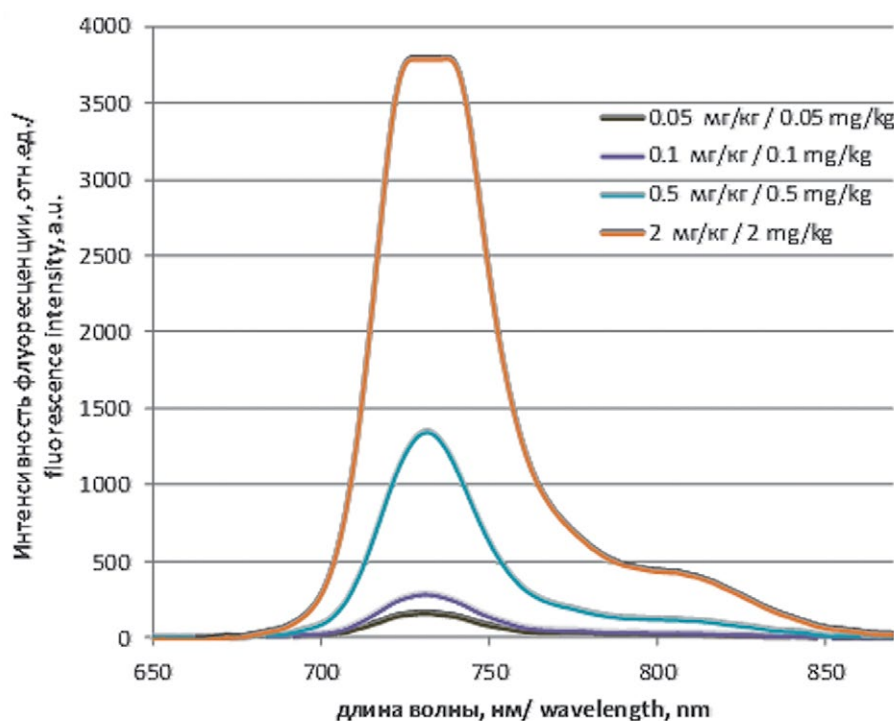
Результаты и обсуждение

Исследование зависимости выходного сигнала спектроанализатора от значения времени накопления

Результаты исследований спектров липосомальных дисперсий тетра-3-фенилтиофталокцианина гидроксиалюминия различных концентраций пока-



а



б

Рис. 1. Спектры флуоресценции дисперсий ФС разной концентрации при времени накопления:

а – при 12 мс;

б – при 300 мс.

Fig. 1. Fluorescence spectra of PS dispersions of various concentrations with an exposure time:

а – 12 ms;

б – 300 ms

зывают, что при небольших значениях времени накопления спектроанализатор ЛЭСА-01-«Биоспек» обеспечивает неискаженную регистрацию сигналов флуоресценции дисперсий с высокой концентрацией. Однако при этом сигналы флуоресценции дисперсий с низкой концентрацией практически неразличимы на фоне аппаратных шумов (рис. 1а).

При высоких значениях времени накопления спектроанализатор обеспечивает правильную регистрацию сигналов флуоресценции при низкой концентрации ФС. Однако при регистрации флуоресценции ФС с высокой концентрацией, когда интенсивность сигнала флуоресценции большая, может произойти зарядовое насыщение сигнала ячеек линейки, соответствующих области спектрального максимума флуоресценции (рис. 1б). Поэтому работа спектроанализатора становится некорректной вследствие аппаратного искажения формы спектра.

Расширение динамического диапазона интенсивности регистрируемых сигналов флуоресценции

Для расширения динамического диапазона интенсивности сигналов флуоресценции предложен следующий подход. Постоянно во время регистрации спектрального сигнала происходит автоматический мониторинг максимального и минимального значения спектральной плотности. В случае, если это значение выходит за пределы заданного диапазона, запускается алгоритм автоматической настройки экспозиции фотоприемника, обработки и записи сигналов линейки полихроматора.

На рис. 2 представлена усовершенствованная блок-схема регистрирующей системы спектроанализатора [5] со следующими обозначениями: 1 – лазер для возбуждения флуоресценции; 2 – оптоволоконный зонд, содержащий осветительные световоды для доставки к биоткани возбуждающего излучения и приемные световоды для доставки излучения флуоресценции от биоткани на вход полихроматора; 3 – биоткань; 4 – полихроматор; 5 – ПЗС или КМОП-линейка на выходе полихроматора; 6 – АЦП; 7 – блок буферной памяти; 8 – компаратор; 9 – задатчик опорного сигнала верхнего уровня; 10 – компаратор; 11 – задатчик опорного сигнала нижнего уровня; 12 – блок управления временем накопления; 13 – блок коррекции накопления; 14 – персональный компьютер (ПК).

Если сигнал всех ячеек линейки 5 меньше напряжения опорного сигнала, поступающего на опорный вход компаратора 8 из задатчика 9, или больше напряжения опорного сигнала, поступающего на опорный вход компаратора 10 из задатчика 11, совокупность сигналов, соответствующая спектру флуоресценции, из блока 7 буферной памяти без изменения поступает в цифровом виде на вход ПК 14 для построения и отображения спектра.

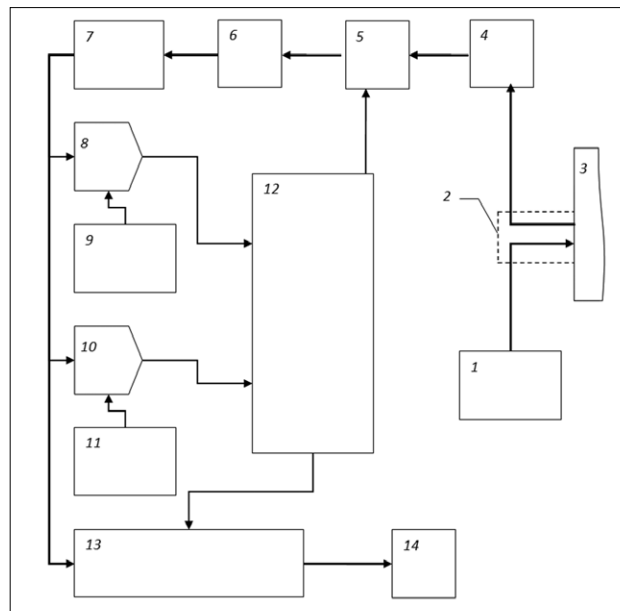


Рис. 2. Блок-схема спектроанализатора для спектрально-флуоресцентных исследований с расширенным динамическим диапазоном интенсивности сигналов флуоресценции
Fig. 2. Block-diagram of the spectra-analyzer for spectral-fluorescent studies with an extended dynamic range of intensity of fluorescence signals

Если сигнал от какой-нибудь из ячеек линейки 5 больше напряжения опорного сигнала, поступающего на вход компаратора 8 из задатчика 9, команда из компаратора 8 подается на блок 12 управления временем накопления, который подает на линейку 5 команду уменьшения длительности времени накопления. При уменьшенном времени накопления сигнал с выхода линейки 5, уменьшенный пропорционально времени накопления, поступает на вход блока буферной памяти 6, а с блока буферной памяти – на сигнальные входы компараторов. Если при уменьшенном времени накопления сигнал от любой из ячеек линейки меньше напряжения опорного сигнала, поступающего на вход компаратора 8 из задатчика 9, совокупность сигналов, соответствующая спектру флуоресценции, из блока буферной памяти подается на блок 13 коррекции накопления, где изменяется (увеличивается) обратно пропорционально времени накопления, затем поступает в цифровом виде на вход ПК для построения и отображения спектра. Аналогично, если сигнал от какой-нибудь из ячеек линейки меньше напряжения опорного сигнала, поступающего на вход компаратора 10 из задатчика 11, команда из компаратора 10 подается на блок 12 управления временем накопления, который в свою очередь подает на линейку команду увеличения длительности времени накопления. При увеличенном времени накопления сигнал с выхода линейки, увеличенный пропорционально времени накопления,

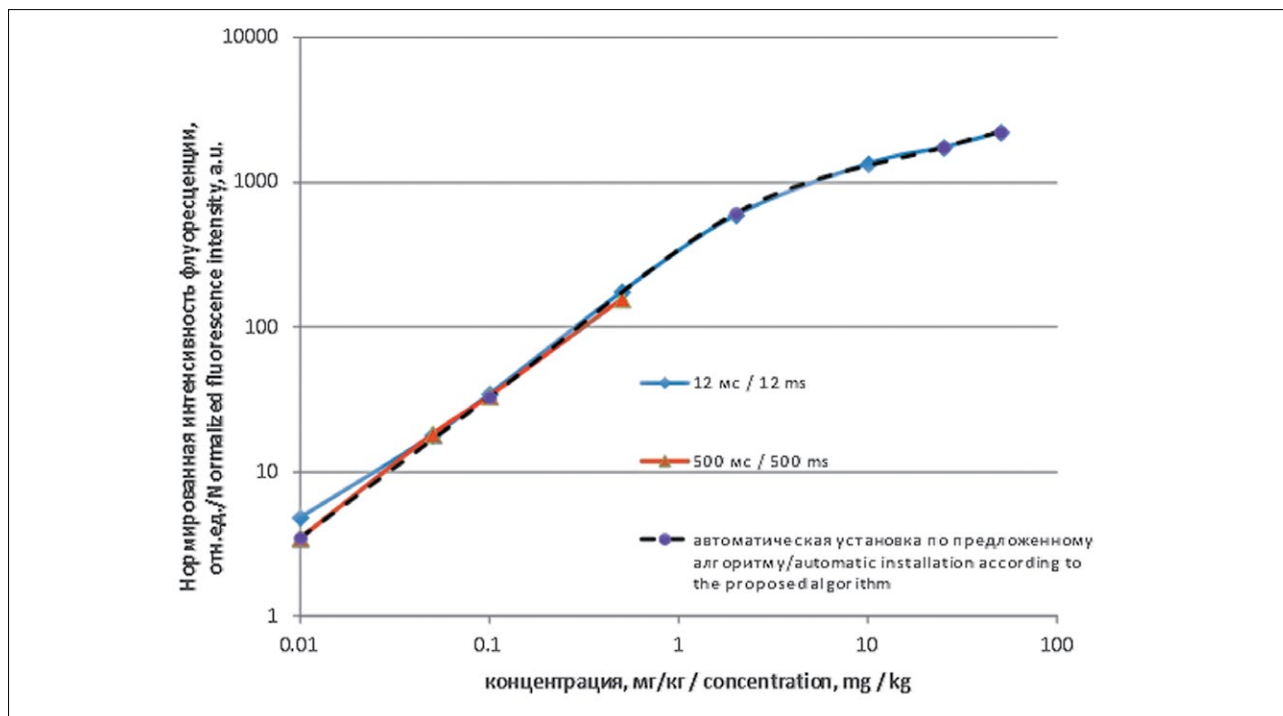


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции ФС от его концентрации при разных временах экспозиции
Fig. 3. Dependence of fluorescence intensity of PS on its concentration at various exposure times

поступает на вход блока буферной памяти, а с блока буферной памяти на сигнальные входы компараторов 8 и 10. Если при увеличенном времени накопления сигнал от всех ячеек линейки больше напряжения опорного сигнала, поступающего на вход компаратора 10 из задатчика 11, совокупность сигналов, соответствующая спектру флуоресценции, из блока буферной памяти подается на блок 12 коррекции накопления, где уменьшается обратно пропорционально времени накопления, после чего поступает в цифровой виде на вход ПК для построения и отображения спектра.

Таким образом, если значение сигнала из любой ячейки линейки выше верхней границы или ниже нижней границы заданного диапазона, время накопления прибора понижается (или, соответственно, повышается) в заданное количество раз. Если указанной корректировки экспозиции оказывается недостаточно для того, чтобы сигнал оказался в пределах допустимого диапазона интенсивностей, корректировка экспозиции осуществляется автоматически повторно до тех пор, пока сигнал не попадет в этот диапазон.

Тестирование спектроанализатора проводилось на дисперсиях фотосенсибилизатора на основе тетра-3-фенилтиофталогидроксиалюминия различной концентрации (от 0,01 мг/л до 50 мг/л), при-

мерно соответствующих концентрациям, реализующихся в процессе исследования фармакокинетики в калибровочных образцах и тканях экспериментальных животных.

При регистрации флуоресценции ФС с постоянным малым временем накопления происходит искажение зависимости в области малых значений концентрации, где в сигнале добавляется дополнительная положительная ошибка из-за аппаратного шума спектроанализатора (рис. 3, голубая кривая). При постоянном высоком значении времени накопления (рис. 3, красная кривая) появляется ошибка в области сигналов флуоресценции дисперсий с большими концентрациями. Более того, начиная с некоторых значений концентрации, зависящих от значения времени накопления, регистрацию сигналов ввиду зарядового насыщения части линейки проводить невозможно.

При работе спектроанализатора по предложенному алгоритму регистрации (с автоматическим изменением времени накопления в зависимости от уровня сигнала флуоресценции) регистрация спектральной информации проходила при высоких значениях отношения «сигнал-шум» и без искажения формы спектра (пунктирная кривая).

Это позволило при дальнейшей обработке сигнала построить корректную (неискаженную) зависимость интегральной интенсивности флуоресценции

дисперсий тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксисаляцинида от их концентрации в расширенном динамическом диапазоне значений, превышающем 3,5 порядка (Рис. 3, пунктирная кривая)

Заключение

Предложенный алгоритм регистрации спектров флуоресценции с автоматическим изменением времени накопления в зависимости от уровня сигнала обеспечил существенное расширение динамического диапазона спектроанализатора, обеспечил

повышение точности при фармакокинетических исследованиях. Кроме того, это позволило при фотодинамической терапии реализовать более точный контроль содержания ФС в опухоли непосредственно перед облучением, в процессе и после облучения, оптимальным образом выбрать время начала облучения и режим облучения в целом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-08-01112А).

ЛИТЕРАТУРА

1. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая // под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
2. Лощенов В.Б., Линьков К.Г., Савельева Т.А., Лощенов М.В., Модель С.С., Бородин А.В. Аппаратурное и инструментальное обеспечение флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии // Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. – 2013. – Т. 2, № 3. – С. 17–25.
3. Meerovich G.A., Tiganova I.G., Makarova E.A., Meerovich I.G., Romanova Ju.M., Tolordava E.R., Alekseeva N.V., Stepanova T.V., Koloskova Yu.S., Lukyanets E.A., Krivospitskaya N.V., Sipailo I.P., Baikova T.V., Loschenov V.B., Gonchukov S.A. Photodynamic inactivation of bacteria and biofilms using cationic bacteriochlorins // J. Phys.: Conf. Ser. – 2016. – Vol. 691. – 012011.
4. Меерович Г.А., Ахлюстина Е.В., Тиганова И.Г., Панов А.В., Тюкова В.С., Толордава Э.Р., Алексеева Н.В., Линьков К.Г., Романова Ю.М., Грин М.А., Миронов А.Ф., Лощенов В.Б., Каприн А.Д., Филоненко Е.В. Исследование фотосенсибилизатора для антибактериальной фотодинамической терапии на основе циклодекстриновой композиции метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил)-бактериопурпуримида // Biomedical Photonics. – 2017. – Т. 6, № 3. – С. 16–32.
5. Ахлюстина Е.В., Будько А.П., Ланцова А.В., Линьков К.Г., Лощенов В.Б., Меерович Г.А., Савельева Т.А. Устройство для спектрально-флуоресцентного исследования содержания флуорохромов. – Патент РФ № 2665628, 2018.

REFERENCES

1. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. CHast' pervaya* [A guide to preclinical drug research. Part One], ed. A.N. Mironov. Moscow, Grif and K Publ., 2012. 944 p.
2. Loschenov V.B., Linkov K.G., Savelieva T.A., Loschenov M.V., Model S.S., Borodkin A.V. Hardware and tool equipment for fluorescence diagnostics and photodynamic therapy, *Photodynamic therapy and photodyagnosis*, 2013, vol. 2, no. 3, pp. 17–25. (In Russian)
3. Meerovich G.A., Tiganova I.G., Makarova E.A., Meerovich I.G., Romanova Ju.M., Tolordava E.R., Alekseeva N.V., Stepanova T.V., Koloskova Yu.S., Lukyanets E.A., Krivospitskaya N.V., Sipailo I.P., Baikova T.V., Loschenov V.B., Gonchukov S.A. Photodynamic inactivation of bacteria and biofilms using cationic bacteriochlorins, *J. Phys. Conf. Ser.*, 2016, vol. 691, 012011.
4. Meerovich G.A., Akhlyustina E.V., Tiganova I.G., Panov V.A., Tyukova V.S., Tolordava E.R., Alekseeva N.V., Linkov K.G., Romanova Yu.M., Grin M.A., Mironov A.F., Loschenov V.B., Kaprin A.D., Filonenko E.V. Study of photosensitizer for antibacterial photodynamic therapy based on cyclodextrin formulation of 13³-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester, *Biomedical Photonics*, 2017, vol. 6, no. 3, pp. 16–32. (in Russian)
5. Akhlyustina E.V., Bud'ko A.P., Lantsova A.V., Lin'kov K.G., Loschenov V.B., Savelieva T.A. *Ustroystvo dlya spektral'no-floorescentnogo issledovaniya sodержaniya fluorohromov* [Device for spectral fluorescence study of the content of fluorochromes], Patent RF no. 2665628, 2018.

К ИСТОРИИ РАЗВИТИЯ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ (ЧАСТЬ I)

А.Д. Каприн¹, Ю.С. Мардынский², В.П. Смирнов³, С.А. Иванов², А.А. Костин¹,
С.А. Полихов³, И.В. Решетов⁴, А.С. Фатьянова⁴, М.В. Денисенко², Т.В. Эпатова²,
С.В. Корнев⁵, А.В. Терещенко⁶, Е.В. Филоненко⁷, М.М. Гафаров⁴, Ю.С. Романко^{2,4}

¹ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия

²МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия

³АО «НИИТФА», Москва, Россия

⁴ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

⁵ФГАОУ ВО «БФУ им. И. Канта», Калининград, Россия

⁶Калужский филиал ФГАУ НМИЦ «МНТК "Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Калуга, Россия

⁷МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва, Россия

Резюме

В 1903 г. на базе Института им. Морозовых Императорского Московского университета (ныне Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национального медицинского исследовательского центра радиологии» Минздрава России) открыли первое в России специализированное подразделение – отдел лучевой терапии онкологических заболеваний, в котором впервые в нашей стране были официально начаты научные исследования в области медицинской радиологии. К этому же периоду можно отнести первые исследования в области лучевой терапии.

В работе освещены основные этапы развития лучевой терапии в нашей стране и в мире; приведена информация о важнейших научных достижениях, имеющих общемировое значение и являющихся основополагающими для данного научного направления. Рассмотрена деятельность ведущих российских организаций в области лучевой терапии; названы имена ученых, врачей и других специалистов, внесших значительный вклад в ее развитие. Приведены основные литературные источники, актуальные в рассматриваемой области.

Данные статьи могут представлять интерес и быть полезными в работе ученых медико-биологического профиля, практикующих врачей-радиологов и радиотерапевтов, онкологов, слушателей факультетов последипломного образования, студентов медицинских факультетов, аспирантов, ординаторов и других специалистов.

Ключевые слова: история медицины, развитие лучевой терапии, радиотерапия, медицинская радиология, терапевтическая радиология, рентгенорадиология, рентгенотерапия, лечение злокачественных новообразований, радиологические методы в онкологии, лучевая терапия в онкологии, радиоактивность.

Для цитирования: Каприн А.Д., Мардынский Ю.С., Смирнов В.П., Иванов С.А., Костин А.А., Полихов С.А., Решетов И.В., Фатьянова А.С., Денисенко М.В., Эпатова Т.В., Корнев С.В., Терещенко А.В., Филоненко Е.В., Гафаров М.М., Романко Ю.С. К истории развития лучевой терапии (часть I) // Biomedical Photonics. – 2019. – Т. 8, № 1. – С. 52–62. doi: 10.24931/2413-9432-2019-8-1-52-62.

Контакты: Гафаров М.М., e-mail: maratgafarov93@mail.ru

THE HISTORY OF RADIATION THERAPY (PART I)

Kaprin A.D.¹, Mardinskiy Yu.S.², Smirnov V.P.³, Ivanov S.A.², Kostin A.A.¹, Polikhov S.A.³,
Reshetov I.V.⁴, Fatianova A.S.⁴, Denisenko M.V.², Epatova T.V.², Korenev S.V.⁵,
Tereshchenko A.V.⁶, Filonenko E.V.⁷, Gafarov M.M.⁴, Romanko Yu.S.^{2,4}

¹National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation (NMRR), Obninsk, Russia

²A. Tsyb Medical Radiological Research Centre – branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation (A. Tsyb MRRC), Obninsk, Russia

³Research Institute of Technical Physics and Automation (NIITFA), Moscow, Russia

⁴Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

⁵Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

⁶Kaluga branch of S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Kaluga, Russia

⁷P. Herzen Moscow Oncology Research Center – branch of FSBI NMRRC of the Ministry of Health of the Russian Federation (P.A. Herzen Moscow Oncology Research Center), Moscow, Russia

Abstract

In 1903, on the basis of Morozov Institute of the Moscow Imperial University (currently, P. Herzen Moscow Oncology Research Center, a branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of the Russian Federation), the first specialized unit in Russia was opened – department of radiation therapy of oncological diseases, in which scientific research in the field of medical radiology was officially launched in our country for the first time. The first studies in the field of radiation therapy can be attributed to this period.

The article presents a brief summary of the historical development of radiotherapy in the world and in Russia; provides information on the achievements of global importance, fundamental for this scientific field. The activities of leading Russian organizations in the field of radiation therapy are reviewed; names of scientists, doctors and other specialists who have made a significant contribution to its development are provided. The main literature sources relevant to the field are given.

The data in this article may be of interest and be useful for biomedical scientists, practicing radiologists and radiotherapists, oncologists, medical and graduate students, interns and other specialists.

Key words: history of medicine, development of radiation therapy, radiotherapy, medical radiology, therapeutic radiology, X-ray radiology, X-ray therapy, treatment of malignant neoplasms, radiological methods in oncology, radiation therapy in oncology, radioactivity.

For citations: Kaprin A.D., Mardinskiy Yu.S., Smirnov V.P., Ivanov S.A., Kostin A.A., Polikhov S.A., Reshetov I.V., Fatianova A.S., Denisenko M.V., Epatova T.V., Korenev S.V., Tereshchenko A.V., Filonenko E.V., Gafarov M.M., Romanko Yu.S. The history of radiation therapy (part I), *Biomedical Photonics*, 2019, vol. 8, no. 1, pp. 52–62. (in Russian) doi: 10.24931/2413–9432–2019–8–1–52–62.

Contacts: Gafarov M.M., e-mail: maratgafarov93@mail.ru

Введение

В 2018 г. исполнилось 115 лет со времени начала первых в России научных исследований в области медицинской радиологии на базе института им. Морозовых Императорского Московского университета. С 2014 г. это медицинское учреждение носит название «Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена (МНИОИ имени П.А. Герцена) – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации» (ФГБУ «НМИЦ радиологии» МЗ РФ). В 1903 г. в институте им. Морозовых было открыто первое в нашей стране специализированное радиологическое подразделение – отдел лучевой терапии онкологических заболеваний. На сегодняшний день МНИОИ им. П.А. Герцена вместе с двумя ведущими медицинскими научными организациями России – МНРЦ им. А.Ф. Цыба и НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – осуществляют свою деятельность в составе ФГБУ «НМИЦ радиологии» МЗ РФ.

История мирового становления и развития лучевой терапии ведет свой отсчет с конца XIX в., когда были проведены первые исследования по воздействию ионизирующей радиации на организм. Начало им положил ряд судьбоносных исторических событий, связанных с открытием искусственной и естественной радиоактивности, вызвавших настоящий переворот в науке, в том числе, в области физики,

медицины, биологии и др., и предопределивших ее дальнейшее развитие в различных сферах человеческой деятельности. В истории лучевой терапии навсегда сохранены имена ученых, стоявших у истоков открытия радиоактивности: Вильгельма Конрада Рентгена, Марии и Пьера Кюри, Анри Беккереля и других их последователей [1].

Всестороннее изучение свойств рентгеновских лучей было начато сразу после того, как они были обнаружены К. Рентгеном 8 ноября 1895 г. и заключалось в выявлении их физических свойств, а также влияния на различные биологические объекты [2–4]. Эти процессы ускорило открытие в 1896 г. естественной радиоактивности [5].

Еще в 1896 г. российский учёный И.Р. Тарханов, который одним из первых обосновал способность ионизирующего излучения вызывать функциональные и структурные изменения в клетках, тканях, органах и во всем организме, предвидел широкое распространение радиологических методов в медицине [6].

В этом же году J. Gillman (США) и V. Desreignes (Франция) предприняли попытку лечения злокачественных новообразований с помощью рентгеновского излучения [7]. Тогда же были описаны еще несколько случаев лечения онкологических больных с помощью рентгеновских лучей.

В 1897 г. L. Freund (Австрия) опубликовал данные о применении фракционированной рентгенотера-

пии для лечения обширного пигментного невуса у ребенка [8]. Данное сообщение и эту дату чаще всего и относят к началу рождения лучевой терапии, широко используемой в настоящее время в зарубежной и отечественной медицинской практике [9–11].

Существенный импульс развития лучевая терапия получила после открытия естественной радиоактивности А. Беккерелем, а затем радия и полония Марией и Пьером Кюри [5, 12]. В 1902 г. радий был с успехом использован в Вене для лечения рака глотки, а в 1904 г. в Нью-Йорке радиевые трубки были имплантированы непосредственно в опухоль [13, 14].

В Российской империи вышли публикации основоположника исследований по лучевой терапии злокачественных опухолей Д.Ф. Решетилло: руководство «Лечение лучами рентгена» в 1906 г. [15] и позднее, в 1910 г. – монография «Радий и его применение для лечения болезней кожи, злокачественных новообразований и некоторых болезней внутренних органов», которую можно считать первой фундаментальной работой, опубликованной на эту тему.

В 1911 г. Cl. Regaud (Франция) проводил опыты по стерилизации барана тремя фракциями ионизирующего излучения с интервалом 15 дней между ними. Работа L. Freund и серии экспериментов Cl. Regaud легли в основу фракционированной дистанционной лучевой терапии [8, 16]. В этот же период в 1910 г. в США О. Pasteau и Р. Degrais предложили метод брахитерапии путем доставки ампулы радия через уретру в простату [17, 18].

Cl. Regaud совместно с другими учеными Парижского Института Радия разработал различные методики использования источников радия, в том числе в качестве альтернативы хирургическим резекциям и для внутриместной терапии опухолей шейки матки и других локализаций [19].

В этом же институте в 1920 г. Н. Coutard с успехом использовал фракционную дистанционную лучевую терапию для лечения разнообразных опухолей головы и шеи. Ориентирами оценки дозы служили лучевые реакции кожи и слизистых. Н. Coutard предложил коллимацию при формировании пучков и использование металлических фильтров для формирования монохромного излучения [20].

Немаловажный вклад в развитие феномена отношения время-доза-эффект в лучевой терапии внесли работы Е. Quimby и М. Strandquist (США) [21, 22]. В рамках этого направления F. Ellis (Англия) предложил использовать понятие и формулу номинальной стандартной дозы, сравнивающей различные режимы лечения на основе общей дозы, числа фракций и общего времени лечения [23]. Работы в этом направлении для отдельных типов опухолей и нормальных тканей актуальны и по сей день, также как и используемая линейно-квадратичная модель, учитываю-

щая соотношение нерепарируемых и репарируемых радиационных повреждений для различных типов клеток.

Энергия первых рентгенотерапевтических установок не превышала 100 кэВ, что ограничивало их практическое применение. В 1913 г. W. Coolidge (США) разработал рентгеновские трубки, с энергией около 200 кэВ. Позднее терапия с их использованием получила название ортовольтной. Усовершенствование происходило в направлении монохромизации пучка. Для «ужесточения» рентгеновского излучения и улучшения дозного распределения широко использовали фильтры и методику многопольного облучения. Создание в начале 1920-х гг. аппаратов с возможностью ротации пучков вокруг опухоли существенно расширило возможности и эффективность лучевой терапии в онкологии. Значительная оптимизация рентгенотерапии была достигнута после разработки W. Coolidge в 1926 г. «каскадной» трубки, которая была установлена в Мемориальном госпитале Нью-Йорка [24, 25].

После того, как в 1930 г. Е. Lawrence и D. Sloan (США) создали линейный ускоритель и в 1940 г. D. Kerst (США) был изобретен бетатрон, а В.И. Векслером (СССР) и Е. McMillan (США) – синхротрон, лучевая терапия получила новый импульс дальнейшего совершенствования.

Прогресс лучевой терапии резко ускорился в 1950–1960 гг. Уже в 1956 г. Н. Kaplan лечил в Стэнфордском Университете пациентов фотонами энергией 6 МэВ [26]. В начале 1960-х гг. были созданы компактные линейные ускорители с возможностью ротационного облучения. Однако развитие лучевой терапии в этот период было связано в основном с использованием дистанционной гамма-терапии источниками кобальта-60 (^{60}Co) [27].

Следующий этап развития лучевой терапии (начало 1990-х гг.), связан с широким применением высокоэнергетических линейных ускорителей, как правило, до 20 МэВ [28, 29]. Внедрение этой техники позволило существенно улучшить технические параметры лучевой терапии и её переносимость больными.

Дальнейшая оптимизация лучевой терапии связана с совершенствованием диагностического оборудования, широким применением компьютерных (КТ), магнито-резонансных (МРТ), позитронно-эмиссионных (ПЭТ) томографов, позволивших освоить системы трехмерного планирования конформной лучевой терапии [30]. Одновременно происходило совершенствование дополнительных опций, сопровождающих лучевую терапию: появились фиксирующие устройства, системы, формирующие сложные по конфигурации поля облучения, и др. Использование оптимизированных систем конформного планирова-

ния лучевой терапии, подразумевающей максимальную равномерность дозы в мишени и минимальную лучевую нагрузку на окружающие опухоль ткани, явилось новым качественным шагом в совершенствовании лучевой терапии.

В 1978 г. впервые появилась возможность изменения интенсивности пучков по площади облучения, что позволило ещё больше оптимизировать пространственное распределение дозы при реализации, так называемой, лучевой терапии с модуляцией интенсивности облучения (IMRT). В последние годы (2000–2018 гг.) стали проводить лучевую терапию с учетом изменения положения опухоли в процессе облучения, определяемую как лучевую терапию с контролем образов (IGRT) [31, 32].

Основными источниками излучения в современной лучевой терапии остаются фотонное и электронное излучение ускорителей. С научно-практической точки зрения и перспектив развития метода наибольший интерес сегодня представляет адронная терапия (протонная, ионная, нейтронная) [33]. Протоны, ионы углерода, благодаря наличию пика Брэгга, обладают лучшими, чем фотонное излучение, возможностями для оптимизации пространственного распределения дозы, что особенно важно при близости опухоли к критическим, с точки зрения радиочувствительности, структурам [34].

Ионное и нейтронное излучение по сравнению с редкоионизирующими (фотонное, электронное) излучениями обладают многочисленными радиобиологическими преимуществами, что позволяет более эффективно воздействовать на медленно растущие, гипоксические, рецидивные и радиорезистентные опухоли.

Пионером в использовании пучка быстрых нейтронов для лечения злокачественных новообразований стал R. Stone (США), который начал исследования в 1938 г., через шесть лет после открытия нейтронов [35]. В то время не было известно, что различные виды излучений при одинаковых поглощенных дозах создают существенно различающиеся эффекты. Традиционные режимы облучения пациентов нейтронами привели к возникновению тяжелых лучевых повреждений, и после серии неудач в 1942 г. использование нейтронного излучения было прервано на длительный срок.

Возрождение интереса к нейтронной терапии произошло после исследований радиолога M. Catterall (Великобритания), осуществившей вместе с физиком D. Bewley (США) в 1970-х гг. в Хаммерсмите клинические испытания на циклотроне с энергией быстрых нейтронов 8 МэВ, итогом которых явилось пособие по применению быстрых нейтронов в онкологии [36]. В конце прошлого века нейтронная терапия стала развиваться и в нашей стране [37]. Было

доказано, что она наиболее эффективна при лечении радиорезистентных к редкоионизирующему излучению опухолей.

Первый положительный опыт нейтронозахватной терапии (НЗТ) связан с именем Н. Hatanaka (Япония), который в 1968 г. получил весьма обнадеживающие результаты при лечении глиом мозга [38].

Впервые о возможности использовать протоны для лучевой терапии сообщил Р. Вильсон (США) в статье, опубликованной в 1946 г. [39], а первым больным протонная терапия была проведена на ускорителях в Радиационной лаборатории в Беркли в 1954 г. и в Университете Уппсала (Швеция) в 1957 г.

Практические работы по использованию ионной лучевой терапии были начаты в Японии с 1994 г. в городе Чибэ. В Национальном радиологическом институте (NIRS) был создан первый в мире госпиталь, специализирующийся на ионной терапии [40].

Необходимо отметить, что основным ограничивающим фактором на пути широкого клинического использования данных технологий являлась их высокая стоимость и небольшое число специализированных медицинских источников адронов.

История развития лучевой терапии в нашей стране неразрывно связана с мировой историей данной дисциплины.

Важную роль в развитии отечественной радиологии сыграл МНИОИ им. П.А. Герцена [41], где, как ранее было отмечено, в 1903 г. было открыто первое в России специализированное подразделение – отдел лучевой терапии онкологических заболеваний. С этого момента в России начались первые официальные научные исследования в данной области. Отдел возглавил Д.Ф. Решетилло – крупный ученый, основоположник исследований возможностей лучевой терапии для лечения злокачественных опухолей. Под руководством Д.Ф. Решетилло уже на первых этапах развития метода лучевой терапии в онкологии изучалась эффективность метода дробного облучения [15].

Радиологи института стояли у истоков создания первых гамма-терапевтических установок с источниками радия и радия-мезотория и были активными участниками разработок и испытаний новых моделей этих аппаратов.

В 20–30-х гг. прошлого века радиологи исследовали эффективность дробно-протяженного метода лучевой терапии, различные аспекты общего воздействия радиации на организм больного при локальном облучении опухоли, распределении дозы во времени, оптимальные варианты сочетания излучений различных энергий при различных локализациях опухоли (Астрахан М.П., Домшляк М.П., Неворожкин Д.Б., Френкель С.Р. и др.).

В МНИОИ им. П.А. Герцена была начата разработка методов лучевого сочетанного и комбинированного

лечения рака молочной железы, шейки матки и других локализаций (Герцен П.А., Домшлак М.П., Нисневич Л.М., Савицкий А.И., Френкель С.Р.).

В 1939 г. в институте был установлен первый в СССР телерадиевый аппарат с источником в 4 г радия. В этот период за рубежом не было установок с большей активностью.

В послевоенные годы в МНИОИ им. П.А. Герцена возобновились исследования по развитию и совершенствованию лучевой терапии. Особое внимание уделялось развитию сочетанного метода с использованием различных источников, уровня доз и объемов облучения. Сочетание близкофокусной рентгенотерапии и дистанционной радиотерапии было опробовано для лечения рака полости рта, вульвы, шейки матки (Астрахан Д.Б., Волкова М.А., Киселева Е.С.).

В 60–70-е годы в институте проводились исследования с использованием ^{198}Au , ^{90}Y , ^{32}P , ^{131}I , а также испытания аппаратов для брахитерапии серии АГАТ, дистанционной лучевой терапии серии РОКУС, первого отечественного спирального ускорителя типа МИКРОТРОН (Квасов В.А., Рахманин Ю.А. и др.). Значительный вклад в решение проблем преодоления радиорезистентности новообразований при лучевой терапии внесли исследования А.В. Бойко, С.Л. Дарьяловой, А.В. Черниченко.

В последующий период в числе направлений работы МНИОИ им. П.А. Герцена в области лучевой терапии были:

- разработка и внедрение в широкую клиническую практику комплекса автоматизированных методов и средств радикальной лучевой терапии;
- разработка радиомодификаторов для повышения эффективности лучевой терапии злокачественных опухолей;
- разработка и внедрение в клиническую практику лазерных установок для лечения онкологических больных.

В 2014 г. МНИОИ им. П.А. Герцена вошел в состав ФГБУ «НМИЦ радиологии» МЗ РФ, генеральным директором которого был назначен академик РАН А.Д. Каприн.

Основанный в Санкт-Петербурге в 1918 г. Рентгенорадиологический институт (впоследствии известный как «Государственный рентгенологический и радиологический институт и ЦНИРРИ»; а ныне – ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. академика А.М. Гранова» МЗ РФ), стал первым в мире учреждением подобного рода [42]. В дальнейшем по его образцу были созданы рентгенорадиологические институты в Харькове (1920), Москве (1924) и других городах СССР.

Основателем первого в мире Рентгенорадиологического института стал профессор М.И. Неменов. В начальном периоде в работе института принимали

участие крупнейшие представители отечественной физики, клинической и теоретической медицины: И.В. Курчатов, Н.Н. Аничков, В.Г. Гаршин, А.А. Заварзин, Н.С. Купалов, Е.С. Лондон, Г.В. Мор, Г.А. Надсон, В.А. Оппель, Н.Н. Петров, П.В. Троицкий, Н.Я. Чистович и др., труды которых заложили основы отечественной рентгенорадиологии.

На базе Рентгенорадиологического института впервые в нашей стране были разработаны методы лечения рентгеновскими лучами и радием различных опухолей и неопухолевых заболеваний, а в 1937 г. было опубликовано первое отечественное руководство по клиническому применению радия для лечебных целей.

В этот и последующие периоды достижения института в области лучевой терапии связаны также с именами И.Н. Грекова, Ф.С. Гросманна, Л.И. Коротовой, Б.А. Конова, Н.Н. Петрова, А.С. Страшинина, Л.П. Симбирцевой, В.А. Шаак, А.М. Югенбург и многими другими.

В Институте в 1966 г. был создан медико-биологический отдел при фазотроне Физико-технического института им. А.Ф. Иоффе с задачей разработки методов адронной (протонной) терапии опухолевых и неопухолевых заболеваний, не поддающихся традиционным методам лучевой терапии. Успешное внедрение в клинику этого метода связано с именем профессора Б.А. Конова.

Как было упомянуто выше, в январе 1924 г. постановлением Совета народных комиссаров был создан Рентгеновский институт (впоследствии – Московский научно-исследовательский институт рентгенорадиологии; Московский научно-исследовательский институт диагностики и хирургии), ныне – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии» МЗ РФ (РНЦРР) [43].

Первым директором института стал академик П.П. Лазарев – основоположник отечественной биофизики, пионер исследований биологического действия ионизирующего излучения и создатель первых в мире ротационных рентгеновских установок.

Существенное место в работе института с момента его создания занимали вопросы совершенствования лучевой терапии опухолевых и неопухолевых заболеваний, в том числе гинекологических заболеваний (Иваницкая Е.П., Карлин М.И., Колосов М.А., Шапошникова Н.Е. и др.), заболеваний органов грудной клетки и брюшной полости (Корнев Н.И., Паньшин Г.А., Павлов А.С., Подляшук Л.Д., Переслегин И.А., Рудерман А.И., Саркисян Ю.Х., Цыбульский И.Б. и др.).

Большое внимание уделялось вопросам разработки рациональных методик лучевой терапии, оценки эффективности лучевого лечения и разработки мероприятий по предупреждению осложне-

ний после лучевой терапии (Паньшин Г.А., Титова В.А., Хмелевский Е.В. и др.).

Институт является одним из пионеров в разработке современных методов комбинированного и комплексного лечения злокачественных опухолей основных локализаций, дающих значительный экономический эффект.

В Научно-исследовательском институте онкологии, открытом на базе Ленинградской многопрофильной больницы им. И.И. Мечникова, ныне – ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова) [44] лучевая терапия злокачественных опухолей применяется с момента его основания в 1927 г., когда по заказу профессора Н.Н. Петрова в Париже были изготовлены радиевые препараты и иглы.

В период становления института лучевое лечение проводили сотрудники единого рентгеновского отделения, располагавшего двумя, а позднее – тремя, рентгенотерапевтическими аппаратами.

В 1945 г. в институте была организована специальная радиевая лаборатория, которую возглавила Н.Д. Перумова. Под её руководством был разработан методика фотодозиметрии гамма-лучей радия и проверена пригодность этого способа для фотодозиметрии лучей ^{60}Co . Эта методика позволила измерять дозы и исследовать гомогенность облучения в любых плоскостях облучаемого объёма ткани.

В 1967 г. была открыта лаборатория высоких энергий, оборудованная мощными мегавольтными установками для дистанционной лучевой терапии, которую возглавил А.П. Козлов. В лаборатории были разработаны компьютерные программы оптимального дозиметрического планирования мегавольтной лучевой терапии, применяемые во всех отечественных радиотерапевтических установках (гамма-аппаратах типа РОКУС, Агат С, Агат Р, ускорителях типа Б5М-25, ЛУЭ-25 и др., аппаратах для внутриволостного облучения АГАТ-В, АГАТ-ВУ).

В конце 60-х гг. в радиологическом отделении работали сотрудники бывшей радиевой лаборатории: Л.Е. Пакулина, Н.Д. Перумова, А.А. Станкевич, В.М. Углова и др. Главным научным направлением радиологического отделения являлось усовершенствование и разработка дистанционной и контактной лучевой терапии злокачественных опухолей. В 1965–66 гг. был разработан аппарат для внутриволостной гамма-терапии методом автолодинга.

В настоящее время в состав отделения входит стационар на 40 коек, где ведутся интенсивные успешные исследования, направленные на усовершенствование способов лечения распространенных опухолей пищевода, трахеи и бронхов с использованием методов эндоскопической хирургии, аргонплазменной коагуляции и внутриволостной брахитерапии. Соз-

дана новая медицинская технология лечения местнораспространенных злокачественных опухолей центральных бронхов и трахеи, активно апробируются различные варианты интенсивного, крупнофракционного предоперационного облучения при раке молочной железы, легкого, пищевода, кардиального отдела желудка и прямой кишки.

В связи с созданием новых профильных институтов и кафедр, онкологических диспансеров в СССР происходило бурное развитие технических, радиобиологических и методических аспектов лучевой терапии.

Значительный вклад в развитие лучевой терапии в нашей стране в предыдущие и последующие годы внесли Н.Н. Ажигалиев, Б.М. Алиев, С.Б. Балмуханов, Л.М. Гольдштейн, Я.Г. Диллон, М.П. Домшлак, К.И. Жолкивер, А.Н. Кишковский, А.В. Козлова, Г.В. Муравская, М.П. Побединский, А.Д. Подлящук, А.С. Павлов, И.А. Переслегин, А.И. Рудерман, С.Ф. Френкель и многие другие ученые.

Успехи в развитии отечественной радиотерапии связаны также с деятельностью ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ [45, 46].

В 1959 г. было принято решение о строительстве Института экспериментальной и клинической онкологии Академии медицинских наук СССР (ИЭ и КО АМН СССР) – впоследствии Российский онкологический научный Центр им. Н.Н. Блохина (РОНЦ им. Н.Н. Блохина). Первым руководителем всей службы лучевой терапии стал А.И. Рудерман, с которым работали Б.М. Алиев, Е.М. Иванова, М.М. Невинская, М.С. Старичиков и др.

Успешному развитию лучевой терапии в РОНЦ им. Н.Н. Блохина способствовало создание отделения медицинской физики и лаборатории радиобиологии, возглавляемой профессором С.П. Ярмоненко.

С 1980 по 1995 гг. отделение клинической лучевой терапии возглавлял профессор Б.М. Алиев. Его ученики стали заведующими отделений лучевой терапии в различных уголках СССР: в РОНЦ им. Н.Н. Блохина – С.И. Ткачев, Т.В. Юрьева, в Литве – Э.А. Алекнавичус, в Киргизии – Р.А. Аралбаев.

Отдел лучевой терапии РОНЦ им. Н.Н. Блохина с 1982 по 2001 гг. возглавлял профессор Г.В. Голдобенко – первый Президент Российской ассоциации терапевтических радиационных онкологов (РАТРО), увлеченный талантливый ученый, прекрасный врач и педагог. Под его руководством существенно расширились научные исследования в области оптимизации режимов фракционирования дозы облучения, использования радиопротекторов (гипоксические газовые смеси) и радиосенсибилизаторов (локальная гипертермия, искусственная гипергликемия и криолучевая терапия), были значительно расширены возможности использования лучевой терапии в детской онкологии.

С 2001 г. руководителем отдела был назначен профессор С.И. Ткачев.

В состав отдела лучевой терапии входило отделение протонной лучевой терапии, возглавляемое профессором А.И. Рудерманом (1976–1984 гг.), где трудились Б.В. Астрахан, Г.Д. Монзуль, Г.В. Макарова и др. Базой отделения были технические протонные ускорители ИТЭФ в Институте теоретической и экспериментальной физики имени А.И. Алиханова в Москве и Объединённом институте ядерных исследований в Дубне Московской области, где протонная лучевая терапия была проведена более чем 3000 онкологическим больным.

Уже с 2001 г. в отделе лучевой терапии РОНЦ им. Н.Н. Блохина первыми в России стали использовать объёмное 3D-планирование и конформную (3D CRT) лучевую терапию и её более совершенные варианты – лучевую терапию с модуляцией интенсивности (IMRT), объёмно-модулированную лучевую терапию (VIMAT), лучевую терапию с контролем по изображению (IGRT), лучевую терапию с контролем за движением опухоли, стереотаксическую радиохирургию (SRS) и стереотаксическую радиотерапию (SRT). Было продолжено изучение эффективности использования радиопротекторов и радиосенсибилизаторов, совершенствовалось и расширялось использование различных вариантов последовательности лучевого и лекарственного лечения онкологических больных.

В отделении радиохирургии, созданном в 1980 г. и возглавляемом до 1995 г. Н.С. Андросовым, а затем – М.И. Нечушкиным, совершенствовались методы контактной и сочетанной лучевой терапии в онкогинекологии (Кравец О.А.), онкопроктологии (Гладилина И.А.), онкоурологии (Петровский А.В.), гематологии (Макаров Е.С.).

С 2003 г. на базе отдела лучевой терапии РОНЦ им. Н.Н. Блохина стали регулярно проводить образовательные школы ESTRO для радиологов России и стран СНГ.

С 2006 г. отдел лучевой терапии и Ассоциация медицинских физиков России (президент – профессор В.А. Костылев) организуют и проводят образовательные курсы для врачей-радиологов и медицинских физиков России и стран СНГ. В.А. Костылев и Г.В. Голдобенко также организовали и возглавили Российскую Ассоциацию терапевтических радиационных онкологов (РАТРО) на первых этапах её становления. В последующие годы президентами РАТРО были Ю.С. Мардынский, А.В. Черниченко, а в настоящее время – А.Д. Каприн.

В отделе лучевой терапии успешно трудятся известные ученые С.Б. Алиева, Т.Н. Борисова, С.М. Иванов, С.В. Медведев, О.П. Трофимова. В 2015 г. отдел лучевой терапии возглавил А.В. Назаренко, продолжая развивать и совершенствовать использование

радиотерапии в комплексном лечении онкологических больных.

Активное участие в разработке новых и совершенствовании существующих методик лучевой, комбинированной и комплексной терапии злокачественных новообразований принимают институты онкологии и крупные онкологические диспансеры в Архангельске, Волгограде, Иркутске, Казани, Ростове-на-Дону, Томске, Уфе, Челябинске, Чите и др.

Физико-технические, радиобиологические и медицинские знания являются как известно, фундаментом лучевой терапии. Поэтому основными специалистами в данной области являются, соответственно, медицинские физики, радиобиологи, радиотерапевты, а также представители инженерно-технических специальностей, без которых немислимы создание и эксплуатация современного радиотерапевтического оборудования.

Вспоминая ученых и инженеров, которые обеспечивали развитие и совершенствование аппаратуры для лучевой терапии, прежде всего следует назвать три основные организации: ленинградский НИИ электрофизической аппаратуры им. Д.В. Ефремова, ныне – АО НИИЭФА (создание и производство ускорительной техники и ЛУЭ-15, ЛУЭР 20, ЛУЭР 20М), снежинский «Всероссийский НИИ приборостроения», ныне ФГУП «Российский Федеральный Ядерный Центр – Всероссийский научно-исследовательский институт технической физики имени академика Е. И. Забабахина» (создание и производство гамма-терапевтической аппаратуры на основе ^{60}Co и других радиоактивных элементов), и НПО «Агат» (производство гамма-терапевтических аппаратов «Рокус» и ускорителя «Микротрон»).

В этих учреждениях работали хорошо известные специалисты, внесшие в свое время существенный вклад в разработку и производство отечественных медицинских установок для лучевой терапии. К ним относятся В.М. Алешин, Е.А. Жуковский, С.П. Капица, В.А. Комар, А.Р. Мирзоян, А.Ф. Римман, А.Г. Сулькин, А.С. Штань, М.В. Хетеев и многие другие.

Современная лучевая терапия невозможна также и без медицинских физиков. Вклад советских и российских физиков в обеспечение качества лучевой терапии во 2-й половине XX века ничуть не уступает достижениям американских и европейских коллег. Это относится, прежде всего, к появлению и внедрению математических методов оптимизации распределения поглощенной дозы, многолепестковой коллимации, матричных детекторов для анализа распределения дозы фотонного и электронного излучения, конформной лучевой терапии, физико-технического обоснования и совершенствования адронной (протонной и нейтронной) терапии [47].

Большой вклад в развитии отечественной медицинской физики внесли С.М. Ватницкий, И.А. Ерма-

ков, Р.В. Синицын, А.М. Червяков, О.А. Стуковский. (ЦНИРРИ); А.И. Кронгауз, Р.С. Мильштейн, Э.Г. Чикирдин (МНИРРИ); Е.Б. Божанов, А.П. Козлов (НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова); В.А. Квасов (НИИ им. П.А. Герцена); О.Н. Денисенко (МРНЦ, г. Обнинск); М.А. Вайнберг, В.А. Костылев, Н.А. Лютова, Н.Н. Лебеденко, Т.Г. Ратнер (РОНЦ им. Н.Н. Блохина); И.Г. Тарутин, А.Г. Страх (НИИ онкологии им. Н.Н. Александрова, Белоруссия); Б.К. Никишин (КНИРРОИ, Украина) и многие другие.

Большинство технических решений было предложено, осуществлено этими специалистами и соответствовало передовым тенденциям развития терапевтической техники. К сожалению, по объективным причинам отечественным производителям не удалось сохранить высокий уровень и объём производства технических средств лучевой терапии.

В настоящее время мы наблюдаем возрождение внимания к отечественному медицинскому приборостроению и стремительно возрождающийся интерес к применению ионизирующего и неионизирующего излучения в различных отраслях науки и техники, и особенно в медицине.

Уникальный накопленный опыт сотрудничества МРНЦ им. А.Ф. Цыба и АО «НИИТФА» с ведущими физико-техническими учреждениями России послужил основой для реализации пилотного проекта по созданию и проведению клинических испытаний первого образца отечественного специализированного медицинского импортозамещающего комплекса лучевой терапии на базе инновационного оборудования – 6 МэВ ускорителя и конусно-лучевого томографа) в г. Обнинске.

Работа реализуется в рамках выполнения соглашения между Минобрнауки России и АО «НИИТФА» о предоставлении субсидии от 03.10.17 г. № 14.582.21.0011 «Создание и передача на клинические испытания образца импортозамещающего комплекса лучевой терапии на базе инновационного оборудования (6 МэВ ускорителя и конусно-лучевого томографа)». Уникальный идентификатор соглашения RFMEFI58217X0011.

Результаты работы МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиала «НМИЦ радиологии» МЗ РФ и АО «НИИТФА» свидетельствуют об актуальности и практической значимо-

сти проводимых в нём исследований. Они являются свидетельством эффективности использования синтеза фундаментальных и прикладных исследований для разработки новых медицинских радиологических технологий внедрения их в медицинскую практику.

Институт медицинской радиологии АМН СССР – крупнейший институт радиологического профиля был создан в Обнинске в 1962 г., с мощной экспериментальной базой и клиникой стал ведущим в стране учреждением по разработке высокотехнологических медицинских радиологических методов диагностики и лечения больных, базовым по проблеме «Медицинская радиология и радиационная медицина». Организатором и первым директором его являлся академик Г.А. Зедгенидзе [48, 49]. Сегодня это – Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба (директор – проф. РАН С.А. Иванов), являющийся с 2014 г. филиалом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» МЗ РФ (генеральный директор – акад. РАН А.Д. Каприн), включающего также Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена (директор – акад. РАН А.Д. Каприн) и Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина (директор – чл.-кор. РАН О.И. Аполихин).

Включение МРНЦ в состав объединенного Центра в лице ФГБУ «НМИЦ радиологии» МЗ РФ расширило возможности внедрения в клиническую практику результатов собственных фундаментальных исследований, открыв новые пути успешного решения актуальных проблем развития и качественного практического применения новых методов терапевтической радиологии [50].

Продолжение научных исследований в области медицинской радиологии, радиационной биологии и радиационной эпидемиологии, несомненно, будет способствовать укреплению национальной безопасности в сфере здравоохранения и здоровья граждан России.

Более подробному рассмотрению достижений МРНЦ им. А.Ф. Цыба и его месте в истории развития лучевой терапии будет посвящена II часть данной статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. L'Annunziata M.F. Radioactivity: Introduction and History. – Amsterdam: Elsevier, 2007. – 632 p.
2. Власов П.В. Открытие рентгеновских лучей // Вестник рентгенологии и радиологии. – 1995. – № 5. – С. 55–57.
3. Hellman S. Roentgen centennial lecture: discovering the past, inventing the future // Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys. – 1996. – Vol. 35, No. 1. – P.15–20.
4. Röntgen W. On a new kind of rays // Proceedings of the Würzburg Physico-Medical Society. – 1895.

REFERENCES

1. L'Annunziata M.F. Radioactivity: Introduction and History. Amsterdam, Elsevier, 2007. 632 p.
2. Vlasov P.V. Otkrytie rentgenovskih luchej [Discovery of X-Rays], Vestnik Rentgenologii i Radiologii, 1995, no. 5, pp. 55–57. (In Russian)
3. Hellman S. Roentgen centennial lecture: discovering the past, inventing the future, Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys., 1996, vol. 35, no. 1, pp. 15–20.
4. Röntgen W. On a new kind of rays, Proceedings of the Würzburg Physico-Medical Society, 1895.

5. Becquerel H. Sur les radiations invisibles émises par les sels d'uranium // *CR Acad Sci (Paris)*. – 1896. – 122. – P. 689–694.
6. Тарханов И.Р. Опыт над действием Рентгеновских X-лучей на животный организм // *Известия С.-Петербургской биологической лаборатории*. – 1896. – Т. 1, № 3. – С. 47–52.
7. Despeignes V. Observation concernant un cas de cancer de l'estomac traité par les rayons Röntgen. *Lyon médical* // *Gazette médicale et Journal de médecine réunis Société médicale des hôpitaux de Lyon*. – 1896. – P. 428–430.
8. Freund L. Ein mit Röntgen-strahlen behandelter Fall von Naevus pigmentosis piliferus // *Wien Med Wochens.* – 1897. – 10. – P. 428–33.
9. Connell P., Hellman S. Advances in radiotherapy and implications for the next century: a historical perspective // *Cancer Res.* – 2009. – Vol. 69, No. 2. – P. 383–392.
10. Основы лучевой диагностики и терапии: национальное руководство / Под ред. акад. С.К. Терновой. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 992 с.
11. Терапевтическая радиология: руководство для врачей / Под ред. А.Ф. Цыба, Ю.С. Мардынского. – М.: ООО «МК», 2010. – 552 с.
12. Curie P., Curie M. Les nouvelles substances radioactives et les rayons qu'elles émettent // *Rapports présentés au Congrès international de Physique*, Gauthier-Villars, Paris. – 1900. – Vol. III. – P. 79–114.
13. Wickham L., Degrais P. Radium as employed in the treatment of cancer, angiomas, keloids, local tuberculosis and other affections. – New York: Paul B. Hoeber, 1913.
14. Mould R.F. Priority for radium therapy of benign conditions and cancer // *Curr. Oncol.* – 2007. – Vol. 14, No. 3. – P. 118–122.
15. Решетилло Д.Ф. Лечение лучами рентгена. – М., 1906.
16. Regaud Cl. Influence de la durée d'irradiation sur les effets déterminés dans le testicule par le radium // *Compt. rend. Soc. biol.* – 1922. – No. 86. – P. 787–790.
17. Pasteau O., Degrais P. De l'emploi du radium dans le traitement des cancers de la prostate // *J. Urol. Med. Chir.* – 1913. – No. 4. – P. 341–366.
18. Ash D., Bottomley D.M., Carey B.M. Prostate brachytherapy // *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. – 1998. – No. 1. – P. 185–188.
19. Ferroux R., Monod O., Regaud Cl. Treatment of cancer of the neck of the uterus by radium at a distance; technique and first results // *J. de radiol. et d'électrol.* – 1926. – Vol. X. – P. 21–23 (also publ. in the *American Journal of Surgery*. – 1927. – Vol. 2, No. 1. – P. 96.)
20. Coutard H. Principles of X-ray therapy of malignant diseases // *Lancet*. – 1934. – No. 2. – P. 1–12.
21. Quimby E.H. Achievement in Radiation Dosimetry, 1937–1950 // *Br J Radiol.* – 1951. – Vol. 24, No. 277. – P. 2–5.
22. Strandquist M. Studies of the Cumulative Effects of Fractionated X-Ray Treatment // *Acta Radiol.* – 1944. – Suppl. 55. – P. 1–300.
23. Ellis F. Dose, time and fractionation: a clinical hypothesis // *Clin. Radiol.* – 1969. – No. 20. – P. 1–7.
24. Busch U. 100 years of the Coolidge tube // *Rofo*. – 2014. – Vol. 86, No. 1. – P. 85–86.
25. Coolidge W.D. The development of modern roentgen-ray generating apparatus // *Am. J. Roentgenology*. – 1930. – No. 24. – P. 605–620.
26. Kaplan H.S., Bagshaw M.A. The Stanford medical linear accelerator. III. Application to clinical problems of radiation therapy // *Stanford Med. Bull.* – 1957. – Vol. 15, No. 3. – P. 141–151.
27. Ginzton E.L., Nunan C.S. History of microwave electron linear accelerators for radiotherapy // *J. Radiation Oncology Eml. Phys.* – 1985. – Vol. 11. – P. 205–216.
28. Baker M. Medical linear accelerator celebrates 50 years of treating cancer // *Stanford Report*. – 2007. Available at: <https://news.stanford.edu/news/2007/april18/med-accelerator-041807.html> (accessed 22.05.2018)
5. Becquerel H. Sur les radiations invisibles émises par les sels d'uranium, *CR Acad Sci (Paris)*, 1896, 122, pp. 689–694. (In French)
6. Tarkhanov I.R. Opyt nad dejstviem Rentgenovskih X-luchej na zhivotnyj organism [Experience on the effect of X-rays on animal organism]. *Izvestiya. St.-Petersb. Biol. Lab.*, 1896, vol.1, no.3, pp. 47–52. (In Russian)
7. Despeignes V. Observation concernant un cas de cancer de l'estomac traité par les rayons Röntgen, *Lyon médical: Gazette médicale et Journal de médecine réunis Société médicale des hôpitaux de Lyon*, 1896, pp. 428–430. (in French)
8. Freund L. Ein mit Röntgen-strahlen behandelter Fall von Naevus pigmentosis piliferus, *Wien Med Wochens.*, 1897, no. 10, 428–33. (in German)
9. Connell P., Hellman S. Advances in radiotherapy and implications for the next century: A historical perspective, *Cancer. Res.*, 2009, vol. 69, no. 2, pp. 383–392.
10. *Osnovy luchevoj diagnostiki i terapii: natsional'noye rukovodstvo* [Fundamentals of radiation diagnosis and therapy: national manual], by acad. S.K. Ternovoy as eds. Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2012. 992 p. (in Russian).
11. *Terapevticheskaya radiologiya: rukovodstvo dlya vrachey* [Therapeutic radiology: a guide for physicians], by Tsyb A.F., Marydinsky Yu.S. as eds. Moscow, ООО "МК" Publ., 2010. 552 p. (in Russian)
12. Curie P., Curie M. Les nouvelles substances radioactives et les rayons qu'elles émettent, *Rapports présentés au Congrès international de Physique*, Gauthier-Villars, Paris, 1900, vol. III, pp. 79–114. (in French)
13. Wickham L., Degrais P. *Radium as employed in the treatment of cancer, angiomas, keloids, local tuberculosis and other affections*. New York, Paul B. Hoeber, 1913.
14. Mould R.F. Priority for radium therapy of benign conditions and cancer, *Curr. Oncol.*, 2007, vol. 14, no. 3, pp. 118–122.
15. Reshetillo D.F. *Lecheniye luchami rentgena* [Treatment with X-rays]. Moscow, 1906. (in Russian)
16. Regaud Cl. Influence de la durée d'irradiation sur les effets déterminés dans le testicule par le radium, *Compt. rend. Soc. biol.*, 1922, no. 86, pp. 787–790. (in French)
17. Pasteau O., Degrais P. De l'emploi du radium dans le traitement des cancers de la prostate, *J. Urol. Med. Chir.*, 1913, no. 4, pp. 341–366. (in French)
18. Ash D., Bottomley D.M., Carey B.M. Prostate brachytherapy, *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 1998, no. 1, pp. 185–188.
19. Ferroux R., Monod O., Regaud Cl. Treatment of cancer of the neck of the uterus by radium at a distance; technique and first results, *J. de radiol. et d'électrol.*, 1926, X, 21–23 (also publ. in the *American Journal of Surgery*, 1927, vol. 2, no. 1, pp. 96.).
20. Coutard H. Principles of X-ray therapy of malignant diseases, *Lancet*, 1934, no. 2, pp. 1–12.
21. Quimby E.H. Achievement in Radiation Dosimetry, 1937–1950, *Br J Radiol*, 1951, vol. 24, no. 277, pp. 2–5.
22. Strandquist M. Studies of the Cumulative Effects of Fractionated X-Ray Treatment, *Acta Radiol*, 1944, Suppl. 55, pp. 1–300.
23. Ellis F. Dose, time and fractionation: a clinical hypothesis, *Clin. Radiol.*, 1969, no. 20, pp. 1–7.
24. Busch U. 100 years of the Coolidge tube, *Rofo*, 2014, vol. 86, no.1, pp. 85–86. (in German)
25. Coolidge W.D. The development of modern roentgen-ray generating apparatus, *Am. J. Roentgenology*, 1930, no. 24, pp. 605–620.
26. Kaplan H.S., Bagshaw M.A. The Stanford medical linear accelerator. III. Application to clinical problems of radiation therapy, *Stanford Med. Bull.*, 1957, vol. 15, no. 3, pp. 141–151.
27. Ginzton E.L., Craig S. Nunan History of microwave electron linear accelerators for radiotherapy, *J. Radiation Oncology Eml. Phys*, 1985, vol. 11, pp. 205–216.

29. Черняев А.П. Ядерно-физические технологии в медицине // Физика элементарных частиц и атомного ядра. – 2012. – Т. 43, № 2. – С. 499–518.
30. Марусина М.Я., Казначеева А.О. Современное состояние и перспективы развития томографии // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. – 2007. – № 42. – С. 3–13.
31. Taylor A., Powell M.E.B. Intensity-modulated radiotherapy – what is it? // *Cancer Imaging*. – 2004. – Vol. 4, No. 2. – P. 68–73.
32. Матякин Г.Г., Чуприк-Малиновская Т.П., Насникова И.Ю., Емельянов И.В. Современные возможности лучевой терапии в онкологии // Кремлевская медицина. Клинический вестник. – 2011. – № 1. – С. 47–51.
33. Гулидов И.А., Мардынский Ю.С. Адронная лучевая терапия злокачественных новообразований // Вместе против рака: Врачам всех специальностей. – 2005. – № 3. – С. 33–37.
34. Brown A., Suit H. The centenary of the Bragg peak // *Radiother. Oncol.* – 2004. – No. 73. – P. 265–268.
35. Stone R., Laurence J., Aebersold P. Preliminary report on use of fast neutrons in treatment of malignant disease // *Radiology*. – 1940. – No. 35. – P. 322–327.
36. Catterall M., Bewley D. Fast neutrons in the treatment of cancer. – London: Academic Press and New York: Grune and Stratton, 1979. – P. 39.
37. Мардынский Ю.С., Гулидов И.А. Нейтроны в дистанционной лучевой терапии злокачественных новообразований // Вопросы онкологии. – 1993. – Т. 39, № 4–6. – С. 153–161.
38. Hatanaka H. Boron-neutron capture therapy for tumors // *Glioma*. – 1991. – P. 233–249.
39. Wilson R.R. Radiological use of fast protons // *Radiology*. – 1946. – Vol. 47, No. 5. – P. 487–491.
40. Kamada T., Tsujii H., Blakely E.A. et al. Carbon ion radiotherapy in Japan: an assessment of 20 years of clinical experience // *Lancet Oncol.* – 2015. – Vol. 16, No. 2. – P. e93–e100.
41. Каприн А.Д., Алексеев Б.Я., Бойко А.В., Дрошнева И.В. Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена: Из XX века – в век XXI // Лучевая диагностика и терапия. – 2013. – № 3. – С. 6–11.
42. 50 лет деятельности Центрального научно-исследовательского рентгенорадиологического института МЗ СССР / Под ред. К.Б. Тихонова. – Ленинград, 1970. – 66 с.
43. 80 лет Российскому научному центру рентгенорадиологии Минздрава РФ / Под ред. В.Н. Харченко, Н.И. Рожковой. – М., 2004. – 323 с.
44. Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова" Минздрава России). О Центре: [сайт]. URL: <https://www.niioncologii.ru/institute> (дата обращения: 22.05.2018)
45. Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России). О Центре: [сайт]. URL: <http://www.ronc.ru/> (дата обращения: 22.05.2018)
46. Монзуль Г.Д., Гладиллина И.А. Использование протонов в онкологии (35-летний клинический опыт ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН) // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2005. – Т. 45, № 6. – С. 670–674.
47. Тарутин И.Г. Мои друзья – медицинские физики // Медицинская физика. – 2016. – № 1. – С. 97–117.
48. Государственное учреждение медицинского радиологического научный центр Российской Академии медицинских наук. – Обнинск: МРПЦ РАМН, 2008. – 33 с.
28. Baker M. Medical linear accelerator celebrates 50 years of treating cancer, *Stanford Report*, 2007. Available at: <https://news.stanford.edu/news/2007/april18/med-accelerator-041807.html> (accessed 22.05.2018)
29. Chernyaev A.P. Nuclear-physical technologies in medicine, *Fizika ehlementarnykh chastic i atomnogo yadra*, 2012, vol. 43, no. 2, pp. 499–518. (in Russian)
30. Marusina M.Ya., Kaznacheeva A.O. Current state and prospects of tomography, *Nauchno-Tekhnicheskii Vestnik Informatsionnykh Tekhnologii, Mekhaniki i Optiki*, 2007, no. 42, pp. 3–13. (In Russian)
31. Taylor A., Powell M.E.B. Intensity-modulated radiotherapy – what is it? *Cancer Imaging*, 2004, vol. 4, no. 2, pp. 68–73.
32. Matjakin G.G., Chuprik-Malinovskaya T.P., Nasnikova I.Yu., Yemeljanov I.V. Modern possibilities of radiation therapy in oncology, *Kremlevskaya Medicina*, 2011, no. 1, pp. 47–51. (In Russian)
33. Gulidov I.A., Mardinskiy Yu.S. Hadron radiation therapy of malignant tumors, *Vmeste protiv raka: Vracham vseh spetsial'nostey*, 2005, no. 3, pp. 33–37.
34. Brown A., Suit H. The centenary of the Bragg peak, *Radiother. Oncol.*, 2004, no. 73, pp. 265–268.
35. Stone R., Laurence J., Aebersold P. Preliminary report on use of fast neutrons in treatment of malignant disease, *Radiology*, 1940, no. 35, pp. 322–327.
36. Catterall M., Bewley D. *Fast neutrons in the treatment of cancer*. London, Academic Press and New York, Grune and Stratton, 1979, p. 39
37. Mardinskiy Yu.S., Gulidov I.A. Application of neutrons for remote radiation therapy of malignant tumor, *Voprosy onkologii*, 1993, vol. 39, no. 4–6, pp. 153–161. (in Russian)
38. Hatanaka H. Boron-neutron capture therapy for tumors, *Glioma*, 1991, pp. 233–249.
39. Wilson R. R. Radiological use of fast protons, *Radiology*, 1946, vol. 47, no. 5, pp. 487–491.
40. Kamada T., Tsujii H., Blakely E.A., Debus J., De Neve W., Durante M., Jäkel O., Mayer R., Orecchia R., Pötter R., Vatnitsky S., Chu W.T. Carbon ion radiotherapy in Japan: an assessment of 20 years of clinical experience, *Lancet Oncol.*, 2015, vol. 16, no. 2, pp. e93–e100.
41. Kaprin A.D., Alekseev B.Ya., Boiko A.V., Droshneva I.V. P.A. Herzen Moscow oncology institute: of XX century – in the XXI century, *Luchevaya diagnostika i terapiya*, 2013, no. 3, pp. 6–11. (in Russian)
42. *50 let deyatel'nosti tsentral'nogo nauchno-issledovatel'skogo rentgenoradiologicheskogo instituta MZ SSSR* [50 years of activities of the Central Scientific Research Roentgenoradiological Institute of the MH USSR], by K.B. Tikhonov as ed. Leningrad, 1970. 66 p.
43. *80 let Rossiyskomu nauchnomu tsentru rentgenoradiologii Minzdrava RF* [80 years of the Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, MH RF]. by V.N. Kharchenko and N.I. Rozhkova as eds. Moscow, 2004. 323 p.
44. «N.N. Petrov National Medical Research Centre of Oncology» Ministry of public health of Russian Federation. About centre. [site]. Available at: <https://www.niioncologii.ru/institute> (Date of access: 22 May 2018)
45. «N.N.Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Ministry of Health of the Russian Federation. About center. [site]. Available at: <http://www.ronc.ru/> (Date of access: 22 May 2018)
46. Monzul G.D., Gladilina I.A. The use of protons in oncology (35-Year Practice of N.N. Blokhin Cancer Research Centre), *Radiatsionnaya biologiya, radioecologiya*. 2005, vol. 45, no. 6, pp. 670–674. (in Russian)
47. Tarutin I.G. My friends – medical physicists, *Meditsinskaya fizika*, 2016, no. 1, pp. 97–117. (In Russian)
48. *Gosudarstvennoye Uchrezhdeniye Meditsinskiy Radiologicheskii Nauchnyy Tsentr Rossiyskoy Akademii Meditsinskikh Nauk* [Medical Radiological Research Center of the Russian Academy of Medical Sciences]. Obninsk, MRRC RAMS Publ., 2008. 33 p. (in Russian)

49. Зедгенидзе Г.А. Тернистый путь в науку (автобиографические очерки). – Обнинск: НИИМР, 1992. – 282 с.
50. Каприн А.Д., Галкин В.Н., Жаворонков Л.П. и др. Синтез фундаментальных и прикладных исследований – основа обеспечения высокого уровня научных результатов и внедрения их в медицинскую практику // Радиация и риск. – 2017. – Т. 26, № 2. – С. 26–40.
49. Zedgenidze G.A. *Ternistyy put' v nauku (avtobiograficheskiye ocherki)* [The thorny way to the science (autobiographical sketches)]. Obninsk, NIIMR Publ., 1992. 282 p. (in Russian)
50. Kaprin A.D., Galkin V.N., Zhavoronkov L.P., Ivanov V.K., Ivanov S.A., Romanko Yu.S. Synthesis of basic and applied research is the basis of obtaining high-quality findings and translating them into clinical practice, *Radiatsiya i risk*, 2017, vol. 26, no. 2, pp. 26–40. (In Russian)

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 A4. 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 Автора 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.

Подаявая 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.



Levulon

Гель 12% 5-АЛК

Применение:

- в дерматологии
- при косметических дефектах кожи

ИНСТИТУТ БИОМЕДИЦИНСКОЙ ФАРМАЦЕВТИКИ

125009, г. Москва, ул. Тверская, д. 14/1, стр. 1, помещение I

тел.: +7 (915) 487-87-72, e-mail: ibmph@mail.ru



ФОТОДИТАЗИН® [fotoditazin]

фотосенсибилизатор хлоринового ряда

«ФОТОДИТАЗИН®» гель - РУ № ФСР 2012/130043 от 03.02.2012 г.

«ФОТОДИТАЗИН®» концентрат для приготовления раствора для инфузий - РУ № ЛС 001246 от 18.05.2012 г.



«ФОТОДИТАЗИН®» применяется для флюоресцентной диагностики и фотодинамической терапии онкологических заболеваний различных нозологических форм, а так же патологий не онкологического характера в следующих областях медицины:

- дерматология
- гинекология
- урология
- торакальная хирургия
- стоматология
- нейрохирургия
- офтальмология,
- травматология и ортопедия
- комбустиология
- гнойная хирургия
- ангиология

В соответствии с приказами МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РФ:

Приказ № 1629н от 29 декабря 2012 г.

«Об утверждении перечня видов высокотехнологичной медицинской помощи»

Приказ № 915н от 15 ноября 2012 г. «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи взрослому населению по профилю «онкология»

ООО «ВЕТА-ГРАНД»

123056, Россия, г.Москва, ул. Красина, д.27, стр.2

тел.: +7(499)253-61-81, +7(499)250-40-00

e-mail: fotoditazin@mail.ru



www.fotoditazin.com
www.фотодитазин.pdf