

BIOMEDICAL PHOTONICS

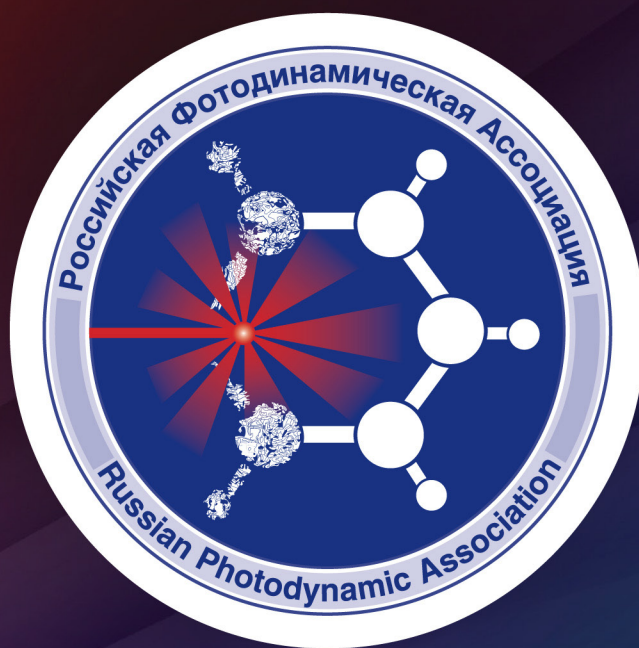
том 12, № 2, 2023

В НОМЕРЕ:

- Паллиативное хирургическое лечение с применением фотодинамической терапии больных со злокачественными новообразованиями желчевыводящей системы, осложненными обструктивной желтухой
- Импульсный режим воздействия полупроводникового лазера с длиной волны 445 нм в фонохирургии: экспериментальное исследование
- Применение видеокапилляроскопии для мониторинга микроциркуляции в коже при фотодинамической терапии
- Экспериментальные исследования *in vivo* противоопухолевой эффективности фотодинамической и радиодинамической терапии, их сочетанного применения
- Спектроскопическое исследование фотофизических свойств метиленового синего в биологических средах
- Фотодинамическая терапия при акне

BMP

Российская Фотодинамическая Ассоциация



www.pdt-association.com

BIOMEDICAL PHOTONICS

BIOMEDICAL PHOTONICS –

научно-практический, рецензируемый, мульти-дисциплинарный 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 и типография:

ООО «Группа Компаний Море».

г. Москва, ул. Воронцовская, д. 34, корп. 10, офис 47, 56

Редакция:

Зав. редакцией Иванова-Радкевич В.И.

Научный редактор проф. Мамонтов А.С.

Литературный редактор Моисеева Р.Н.

Переводчик Калягина Н.А.

Компьютерный дизайн Кренева Е.В.

Компьютерная верстка Цветкова А.И.

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:

Российская 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:

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

Романко Ю.С., доктор медицинских наук, профессор кафедры онкологии, радиотерапии и пластической хирургии им. Л.Л. Лёвшина Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова (Москва, Россия)

Странадко Е.Ф., доктор медицинских наук, профессор, руководитель отделения лазерной онкологии и фотодинамической терапии ФГБУ «Государственный научный центр лазерной медицины им. О.К.Скобелкина ФМБА России»

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

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

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

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

BIOMEDICAL PHOTONICS

FOUNDERS:

Russian 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:

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)

Romanko Yu.S., Dr. Sci. (Med.), professor of the department of Oncology, radiotherapy and plastic surgery named after L.L. Lyovshina in I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Stranadko E.Ph., Dr. Sci. (Med.), professor, chief of department of laser oncology and photodynamic therapy of State Research and Clinical Center of Laser Medicine named by O.K. Skobelcin of FMBA of Russia (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.

Publishing house and printing house:

LLC "Group of Companies More".

Moscow, Vorontsovskaya str., 34, building 10, office 47, 56

Editorial staff:

Chief of the editorial staff Ivanova-Radkevich V.I.

Science editor professor Mamontov A.S.

Literary editor Moiseeva R.N.

Translators Kalyagina N.A.

Computer design Kreneva E.V.

Desktop publishing Tsvetkova A.I.

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

Паллиативное хирургическое лечение с применением фотодинамической терапии больных со злокачественными новообразованиями желчевыводящей системы, осложненными обструктивной желтухой

А.Е. Цеймах, А.Н. Мищенко, В.А. Куртуков, Я.Н. Шойхет

4

Импульсный режим воздействия полупроводникового лазера с длиной волны 445 нм в фонохирургии: экспериментальное исследование

М.А. Рябова, Л.Б. Митрофанов, М.Ю. Улупов, В.А. Степанова, К.А. Стерхова

11

Применение видеокапилляроскопии для мониторинга микроциркуляции в коже при фотодинамической терапии

А.В. Гурyleва, А.С. Мачихин, Т.Г. Гришачева, Н.Н. Петрищев

16

Экспериментальные исследования in vivo противоопухолевой эффективности фотодинамической и радиодинамической терапии, их сочетанного применения

Д.А. Церковский, Д.И. Козловский, А.Н. Мазуренко, Н.Д. Адаменко, Ф.Ф. Боричевский

24

Спектроскопическое исследование фотофизических свойств метиленового синего в биологических средах

Д.В. Поминова, А.В. Рябова, И.Д. Романишкин, И.В. Маркова, Е.В. Ахлюстина, А.С. Скобельцин

34

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

Фотодинамическая терапия при акне

Е.В. Филоненко, В.И. Иванова-Радкевич

48

ORIGINAL ARTICLES

Palliative surgical treatment using photodynamic therapy for biliary cancer complicated by obstructive jaundice

Tseimakh A.E., Mitshenko A.N., Kurtukov V.A., Shoikhet Ia.N.

4

Pulsed exposure mode of the 445 nm semiconductor laser in phonosurgery: an experimental study

Ryabova M.A., Mitrofanova L.B., Ulupov M.Y., Stepanova V.A., Sterkhova K.A.

11

Videocapillaroscopic monitoring of microcirculation in rats during photodynamic therapy

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

16

Experimental in vivo studies of the antitumor efficacy of photodynamic and radiodynamic therapy and their combinations

Tzerkovsky D.A., Kozlovsky D.A., Mazurenko A.N., Adamenko N.D., Borichevsky F.F.

24

Spectroscopic study of methylene blue photophysical properties in biological media

Pominova D.V., Ryabova A.V., Romanishkin I.D., Markova I.V., Akhlustina E. V., Skobeltsin A.S.

34

REVIEWS OF LITERATURE

Photodynamic therapy of acne

Filonenko E.V., Ivanova-Radkevich V.I.

48

ПАЛЛИАТИВНОЕ ХИРУРГИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ЖЕЛЧЕВЫВОДЯЩЕЙ СИСТЕМЫ, ОСЛОЖНЕННЫМИ ОБСТРУКТИВНОЙ ЖЕЛТУХОЙ

А.Е. Цеймах¹, А.Н. Мищенко², В.А. Куртуков², Я.Н. Шойхет¹

¹Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул, Россия

²Городская больница №5, Барнаул, Россия

Резюме

Целью исследования было оценить эффективность паллиативного хирургического лечения с применением фотодинамической терапии (ФДТ) у больных злокачественными новообразованиями желчевыводящей системы, осложненными обструктивной желтухой. Представлены результаты исследования выживаемости, маркеров гемостаза, протеолиза и опухолевой инвазии после комплексного паллиативного лечения пациентов. У 10 пациентов основной группы проводилось паллиативное хирургическое лечение с применением ФДТ, у 20 пациентов группы сравнения выполнялось только паллиативное хирургическое лечение. В основной группе наблюдалось статистически значимое увеличение продолжительности жизни по сравнению с группой сравнения на 104 дня ($p=0,033$). Выявлено статистически значимое влияние маркера опухолевой инвазии фактора некроза опухоли α на выживаемость ($p=0,012$) и уменьшение его уровня после ФДТ с $43,53 \pm 33,99$ пг/мл до $28,33 \pm 26,12$ пг/мл ($p=0,041$). Таким образом, паллиативное лечение с применением ФДТ злокачественных новообразований желчевыводящих протоков, осложненных обструктивной желтухой, позволяет увеличить выживаемость пациентов за счет уменьшения глубины опухолевой инвазии.

Ключевые слова: злокачественные новообразования желчевыводящей системы, фотодинамическая терапия, выживаемость.

Контакты: Цеймах А.Е., e-mail: alevtsei@rambler.ru.

Для цитирования: Цеймах А.Е., Мищенко А.Н., Куртуков В.А., Шойхет Я.Н. Паллиативное хирургическое лечение с применением фотодинамической терапии больных со злокачественными новообразованиями желчевыводящей системы, осложненными обструктивной желтухой // Biomedical Photonics. – 2023. – Т. 12, № 2. – С. 4–10. doi: 10.24931/2413-9432-2023-12-2-4-10.

PALLIATIVE SURGICAL TREATMENT USING PHOTODYNAMIC THERAPY FOR BILIARY CANCER COMPLICATED BY OBSTRUCTIVE JAUNDICE

Tseimakh A.E.¹, Mitshenko A.N.², Kurtukov V.A.², Shoykhet Ia.N.¹

¹Altai State Medical University, Barnaul, Russia

²State hospital №5, Barnaul, Russia

Abstract

The article presents the results of a study of survival, markers of hemostasis, proteolysis and tumor invasion after complex palliative treatment of patients with histologically verified malignant tumors of the bile ducts complicated by obstructive jaundice in two comparable groups of patients. The aim of the study was to evaluate the effectiveness of palliative surgical treatment using photodynamic therapy in patients with malignant tumors of the biliary system complicated by obstructive jaundice. In 10 patients of the main group, palliative surgical treatment was performed using photodynamic therapy; in 20 patients of the comparison group, palliative surgical treatment was performed without the use of photodynamic therapy. In patients of the main group, a statistically significant increase in life expectancy was observed compared to the comparison group by 104 days ($p=0.033$). At the same time, a statistically significant effect of tumor necrosis factor α , a marker of tumor invasion, on survival ($p=0.012$) and a decrease in its level after photodynamic therapy by 15 pg/ml ($p=0.041$) was revealed. Thus, palliative treatment using photodynamic therapy of malignant tumors of the bile ducts, complicated by obstructive jaundice, can increase the survival rate of patients by reducing tumor invasion.

Key words: biliary cancer; photodynamic therapy; survival.

Contacts: Tseimakh A.E., e-mail: alevtsei@rambler.ru

For citations: Tseimakh A.E., Mitshenko A.N., Kurtukov V.A., Shoykhet Ia.N. Palliative surgical treatment using photodynamic therapy for biliary cancer complicated by obstructive, *Biomedical Photonics*, 2023, vol. 12, no. 2, pp. 4–10. doi: 10.24931/2413-9432-2023-12-2-4-10.

Введение

Рак билиарного тракта является редкой онкологической патологией, к которой относятся дистальная и проксимальная холангиокарцинома, рак желчного пузыря [1, 2, 3]. Структура заболеваемости и летальность при билиарном раке оценивается совместно с гепатоцеллюлярным раком [1]. Распространенность рака билиарного тракта совместно с гепатоцеллюлярным раком составляет 6,7 на 100 тыс. населения. Злокачественные новообразования (ЗНО) желчевыводящих протоков имеют одни из наиболее высоких показателей общей летальности (35,2%) и летальности на первом году с момента установления диагноза (66,8%) [1–5].

Несмотря на развитие методов лучевой и химиотерапии основным методом лечения больных билиарным раком остается хирургический. Однако на момент постановки диагноза 57,3% пациентов уже имеют запущенную IV стадию основного заболевания, а 80,3% пациентов имеют запущенный или местнораспространенный процесс [1, 2]. Таким образом, более 80% пациентов возможно проведение лишь паллиативного лечения, главным компонентом которого является устранение жизнеугрожающих осложнений основного заболевания, таких как обструктивная желтуха и холангит [4–6].

Одним из методов паллиативного лечения, дополняющим хирургическое лечение, является фотодинамическая терапия (ФДТ). ФДТ – это метод лечения пациентов с ЗНО, при котором проводится облучение опухоли светом определенной длины волны, переводящим молекулы избирательно накапливающегося в ткани опухоли специального вещества – фотосенсибилизатора, в возбужденное состояние в присутствии кислорода. Образующиеся в результате этого активные формы кислорода приводят опухолевые клетки к гибели путем апоптоза, некроза и аутофагии. Проведенные в предшествующие годы исследования эффективности ФДТ при раке билиарного тракта дали обнадеживающие результаты, говорящие о перспективности применения ФДТ в паллиативном лечении этих больных, увеличивающего выживаемость пациентов в среднем до 8 мес. при проведении локальной ФДТ производными гематопорфиринов [8–13].

Целью исследования являлась оценка эффективности паллиативного хирургического лечения с применением ФДТ у больных ЗНО желчевыводящей системы, осложненными обструктивной желтухой.

Материалы и методы

В открытое нерандомизированное сравнительное исследование выживаемости были включены 30 пациентов с гистологически верифицированной аденокарциномой желчевыводящих протоков, осложненной обструктивной желтухой, проходивших комплексное

лечение на базе краевого гепатологического центра КГБУЗ Городская больница №5, г. Барнаул (г. Барнаул, РФ) с 2016 по 2020 гг. Пациенты были поделены на две группы. Критериями включения в исследование были возраст старше 18 лет, гистологически верифицированный диагноз ЗНО желчевыводящих протоков, подписанное информированное согласие на оперативное лечение в период госпитализации. Критериями исключения были летальность во время пребывания в стационаре, наличие онкологического заболевания крови. В основную группу были включены 10 пациентов, которым проводили паллиативное хирургическое лечение с применением ФДТ. Группу сравнения составили 20 пациентов, которым было проведено паллиативное хирургическое лечение без применения ФДТ. Распределение пациентов в группы проводили без использования рандомизации: пациенты, подписавшие согласие на проведение ФДТ вследствие наличия противопоказаний к применению альтернативных методов лечения, были включены в основную группу. Отказавшиеся от проведения ФДТ пациенты были включены в группу сравнения. Дизайн исследования был одобрен Локальным Этическим Комитетом ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава РФ (выписка из протокола №11 от 27.11.2017). Сравнительная характеристика групп по полу, возрасту, рутинным лабораторным показателям воспаления, билирубинемии и печеночных ферментов представлена в табл. 1. Группы были сопоставимы по основным характеристикам.

Сравнительная характеристика групп по локализации ЗНО представлена в табл. 2. Статистически значимых различий выявлено не было.

Паллиативное хирургическое лечение включало в себя оперативное лечение жизнеугрожающих осложнений, прежде всего обструктивной желтухи: чрескожное чреспеченочное моно- и билобарное дренирование желчных протоков, стентирование желчных протоков под ультразвуковым и рентгенологическим контролем. Симптоматическое консервативное лечение включало в себя инфузионную, дезинтоксикационную, анальгетическую, гепатопротекторную, антибактериальную терапию [4, 5].

У всех пациентов основной группы проводили ФДТ по следующему алгоритму: флуоресцентная диагностика на лазерной электронно-спектральной установке «Биоспек» (ООО «Новые хирургические технологии», Россия), локальная и системная ФДТ на программном специализированном лазерном двухволновом аппарате «ЛАМИ-Гелиос» (ООО «Новые хирургические технологии», Россия) по ТУ 9444-001-53807582-2010. В качестве фотосенсибилизатора использовали препарат фотодитазин на основе хлорина е6 (ООО «БЕТА-ГРАНД», Россия). Системную ФДТ проводили через периферический доступ в кубиталь-

Таблица 1

Характеристика пациентов, включенных в исследование

Table 1

Characteristics of patients included in the study

Показатель Value	Основная группа Main group	Группа сравнения Comparison group	p
	M±SD	M±SD	
Возраст, лет Age, years	61,3±16,9	69,8±9,4	0,168
Число женщин Number of women	2	5	0,879
Число мужчин Number of men	8	15	0,879
Лейкоциты, *10 ⁹ /л Leukocytes, *10 ⁹ /L	8,87±3,16	9,71±2,16	0,487
Тромбоциты, *10 ⁹ /л Thrombocytes, *10 ⁹ /L	285,33±164,42	258,67±43,15	0,649
Общий билирубин, мкмоль/л Common bilirubin, μmol/L	197,32±173,09	115,00±56,19	0,210
АСТ, Ед/л AST, U/L	96,83±63,07	53,17±29,51	0,097
АЛТ, Ед/л ALT, U/L	98,99±73,51	58,22±41,79	0,206

Примечание: p – статистическая значимость различий между основной группой и группой сравнения.

Note: p - statistical significance of differences between the main group and the comparison group.

ную вену монохроматическим светом с длиной волны 662–665 нм со световой дозой 1200–1400 Дж/см², мощностью 0,7 Вт, плотностью мощности излучения 0,22 Вт/см² аппаратом для внутривенного облучения крови во время внутривенного введения фотосенсибилизатора в дозе 1–1,4 мг/кг массы тела. Локальную контактную ФДТ осуществляли путем облучения монохроматическим светом с длиной волны 662 нм, световой дозой 220 Дж/см² программным специализированным лазерным двухволновым аппаратом мощностью 0,7 Вт с плотностью мощности излучения 0,22 Вт/см² по истечении 5 ч с момента окончания системной ФДТ [6].

Доступ для проведения ФДТ осуществляли следующим образом: проводили чрескожное чреспеченочное наружное дренирование желчных протоков под ультразвуковым контролем. Затем через просвет общего желчного протока заводили проводник и низводили его в двенадцатиперстную кишку. По низведенному проводнику канюлировали большой дуоденальный сосочек и проводили эндоскопическую папиллосфинктеротомию на проводнике, после чего по проводнику проводили эндоскопическую баллонную дилатацию просвета интрамуральной

части холедоха и заведение DPOC направляющего катетера с его фиксацией. Затем по DPOC-катетеру в просвет холедоха заводили трансназальный гастроскоп, баллон раздувался в зоне бифуркации долевых протоков. Далее проводили транслюминальную ФДТ под видеоскопическим визуальным контролем. Целью проведения локальной ФДТ была нормализация оттока по внепеченочным желчным протокам за счет уменьшения объема опухолевой ткани в просвете желчных протоков с появлением как рентгеноскопически, так и визуально свободного просвета (уведомление о приеме и регистрации заявки приоритета № 2023105379).

Осложнения хирургического лечения оценивали по шкале Clavien-Dindo [14].

Определение концентрации фибриногена в плазме по Clauss (1957) проводили с использованием набора реагентов фирмы «Технология – Стандарт» (Россия).

Для определения концентрации тканевого активатора плазминогена (t-PA), ингибитора тканевого активатора плазминогена-1 (PAI-1), тканевого фактора (TF), ингибитора пути тканевого фактора (TFPI), фактора некроза опухоли-альфа (TNF-α) в сыворотке крови использовали стандартные наборы для иммуноферментного анализа TECHNOZYM (Technoclone Herstellung von Diagnostika und Arzneimitteln GmbH, Австрия), для измерения оптической плотности использовали универсальный автоматический фотометр для микропланшет Elx808 (BioTec Instruments, Inc., США).

Статистический анализ проводили с помощью пакета статистических программ SigmaPlot 14.0 (регистрационный номер 775400014). При проверке нормальности по критерию Шапиро–Уилка выявлено, что все изучаемые показатели кроме пола и возраста имели распределение, не соответствующее Гауссову распределению в обеих группах. Для анализа независимых выборок использовали непараметрический критерий Манна–Уитни, парных выборок – критерий Вилкоксона. Для сравнения несвязанных групп с нормальным распределением применяли параметрический критерий Стьюдента, относительных величин – z-критерий Фишера. Для оценки общей продолжительности жизни применяли метод кривых Каплана–Мейера, для сравнительного анализа выживаемости – лог-ранговый критерий. Для оценки влияния факторов на прогноз заболевания использовали множественный линейный регрессионный анализ. Критический уровень значимости результатов исследования принимали p<0,05.

Результаты и их обсуждение

У 1 пациента основной группы наблюдали послеоперационную острую геморрагическую анемию после проведенного чрескожного чреспеченочного

Таблица 2

Сравнительная характеристика больных по локализации и распространенности новообразования

Table 2

Comparative characteristics of patients by localization and prevalence of tumor

Локализация злокачественного новообразования Localisation of malignant tumor	Основная группа Main group		Группа сравнения Comparison group		p
	абс. abs.	%	абс. abs.	%	
Дистальная холангиокарцинома, в том числе: Distal cholangiocarcinoma including:	2	20,00	9	45,00	0,348
стадия IIIa по классификации TNM (8 редакция) stage IIIa according to the TNM classification (8th edition)	1	10,00	7	35,00	0,307
стадия IV по классификации TNM (8 редакция) stage IV according to the TNM classification (8th edition)	1	10,00	2	10,00	0,519
Проксимальная холангиокарцинома, в том числе Proximal cholangiocarcinoma including	5	50,00	6	30,00	0,503
тип II по классификации Bismuth-Corlette Bismuth-Corlette type II	2	20,00	1	5,00	0,519
тип IIIa/IIIb по классификации Bismuth-Corlette Bismuth-Corlette type IIIa/IIIb	2	20,00	5	25,00	0,879
тип IV по классификации Bismuth-Corlette Bismuth-Corlette type IV	1	10,00	0	0,00	
стадия IIIa по классификации TNM (8 редакция) stage IIIa according to the TNM classification (8th edition)	2	20,00	5	25,00	0,879
стадия IV по классификации TNM (8 редакция) stage IV according to the TNM classification (8th edition)	3	30,00	1	5,00	0,184
Аденокарцинома большого дуоденального сосочка, в том числе Adenocarcinoma of big duodenal ampulla including	3	30,00	3	15,00	0,628
стадия IIIa по классификации TNM (8 редакция) stage IIIa according to the TNM classification (8th edition)	2	20,00	2	10,00	0,849
стадия IV по классификации TNM (8 редакция) stage IV according to the TNM classification (8th edition)	1	10,00	1	5,00	0,796
Желчный пузырь Gallbladder	0	0,00	2	10,00	0,796
стадия IV по классификации TNM (8 редакция) stage IV according to the TNM classification (8th edition)	0	0,00	2	10,00	0,796

Примечание: p – статистическая значимость различий между основной группой и группой сравнения.

Note: p - statistical significance of differences between the main group and the comparison group.

монолобарного дренирования желчных протоков. Осложнений после ФДТ отмечено не было.

В группе сравнения у 2 пациентов было выявлено выпадение чрескожного чреспеченочного дренажа с развитием желчного перитонита, у 1 пациента наблюдали послеоперационную острую геморрагическую анемию после проведенного чрескожного чреспеченочного монолобарного дренирования желчных протоков. При сравнительном анализе группы были сопоставимы как по общему числу послеоперационных осложнений ($p=0,519$), так и при стратификации Clavien-Dindo: 1 (10,0%) осложнения IIIa степени в основной группе и 3 (15,0%) в группе сравнения ($p=0,849$) [7].

При проведении оценки продолжительности жизни в параллельно сравниваемых группах (табл. 3)

в основной группе по сравнению с контрольной установлена статистически значимая большая медиана выживания ($p = 0,033$) (рис. 1).

На современном этапе до сих пор мало исследований, посвященных паллиативной ФДТ при ЗНО желчевыводящих протоков, и результаты исследований значительно варьируют [8–13]. В исследованиях Haider и соавт. [8] медиана выживаемости пациентов, которым проводили ФДТ, составила 14 мес. (9 пациентов с дистальной холангиокарциномой, локальная ФДТ с фотосенсибилизатором на основе производного гематопорфирина в дозе 2 мг/кг массы тела с облучением монохроматическим светом с длиной волны 630 нм со световой дозой 180 Дж/см²). В мета-анализе Moole и соавт. [11] на основе 9 исследований эффективности локальной ФДТ с производными ге-

Таблица 3

Сравнительный анализ выживаемости больных

Table 3

Comparative analysis of survival of patients

Группа Group	Медиана выживания, дни Median survival, days	95% доверительный интервал 95% confidence interval	p
	Me (Q ₁ ; Q ₃)		
Основная Main	170 (1648;113)	25,235–365,235	0,033
Сравнения Comparison	66 (200;29)	33,13–98,87	

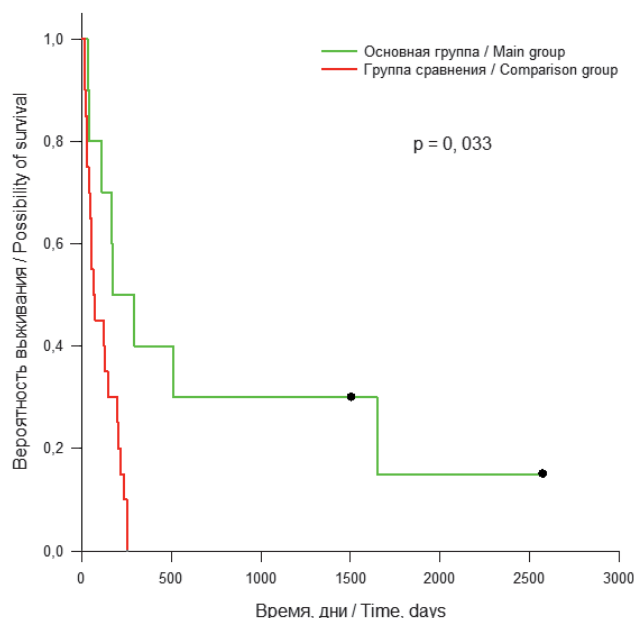


Рис. 1. Общая выживаемость пациентов основной группы и группы сравнения.

Fig. 1. Overall survival of patients in the main group and comparison group.

матопорфиринов получен показатель медианы выживаемости 7,6 мес. у пациентов с нерезектабельной холангиокарциномой после ФДТ. С другой стороны, в исследовании Pereira и соавт. [12] проводили сравнительный анализ между группой, получавшей паллиативное стентирование холедоха и химиотерапию, и группой пациентов, которым проводили комбинированное лечение, включавшее ФДТ и химиотерапию. После достижения медианы выживаемости в 8,4 мес. пациенты, которым не проводили ФДТ, жили дольше (46 пациентов с дистальной и проксимальной холангиокарциномой, раком желчного пузыря; локальная ФДТ с производным гематопорфирина в дозе 2 мг/кг массы тела; с облучением монохроматическим светом с длиной волны 630–635 нм и световой дозой 186 Дж/см²). Maswikiti и соавт. [13], выполнив метаанализ на основе 7 исследований совместного применения ФДТ производными гематопорфиринов и химиотерапии, приводят другие данные, заключающиеся в том, что пациенты, которым проводили комбинирован-

ную ФДТ и химиотерапию, жили в два раза дольше, чем пациенты, подвергнутые этим методам лечения в монорежиме. Значительные различия результатов исследований обусловлены высокой зависимостью результатов ФДТ от световой дозы, мощности, контроля подведения лазера к опухолевой ткани. При этом актуальным остается вопрос возможности улучшения отдаленных исходов у пациентов с нерезектабельной холангиокарциномой, в том числе за счет ФДТ, которая является безопасным методом лечения согласно данным мировой литературы и полученным нами данным.

Проведен анализ показателей воспаления, гемостаза и протеолиза в динамике. Выявлено статистически значимое уменьшение TNF-α после ФДТ с $43,53 \pm 33,99$ пг/мл до $28,33 \pm 26,12$ пг/мл ($p=0,041$) (рис. 2).

TNF-α известен, как значимый фактор неоваскулогенеза, являющегося главным компонентом опухолевой инвазии при канцерогенезе за счет стимуляции продукции циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2). В исследованиях показана прямая пропорциональная зависимость между концентрацией TNF-α и скоростью роста ЗНО, приводящая к снижению общей продолжительности жизни [14, 15].

Данные литературы были подтверждены нами в ходе проведения множественного линейного регрессионного анализа факторов, влияющих на выживаемость у пациентов с билиарным раком: было получено статистически значимое обратно пропорциональное влияние на выживаемость концентрации TNF-α до лечения (табл. 4).

Изменения системы гемостаза у онкологических пациентов – одна из ведущих проблем современной онкологии, при этом тромботические осложнения являются одной из ведущих причин летального исхода [15].

Полученные результаты подтверждают данные предыдущих исследований. ФДТ является безопасным методом выбора при паллиативном хирургическом лечении пациентов с билиарным раком. Особенно это актуально для пациентов с запущенной IV стадией заболевания, у которых ФДТ позволяет значительно увеличить продолжительность жизни при отсутствии побочных эффектов от терапии.

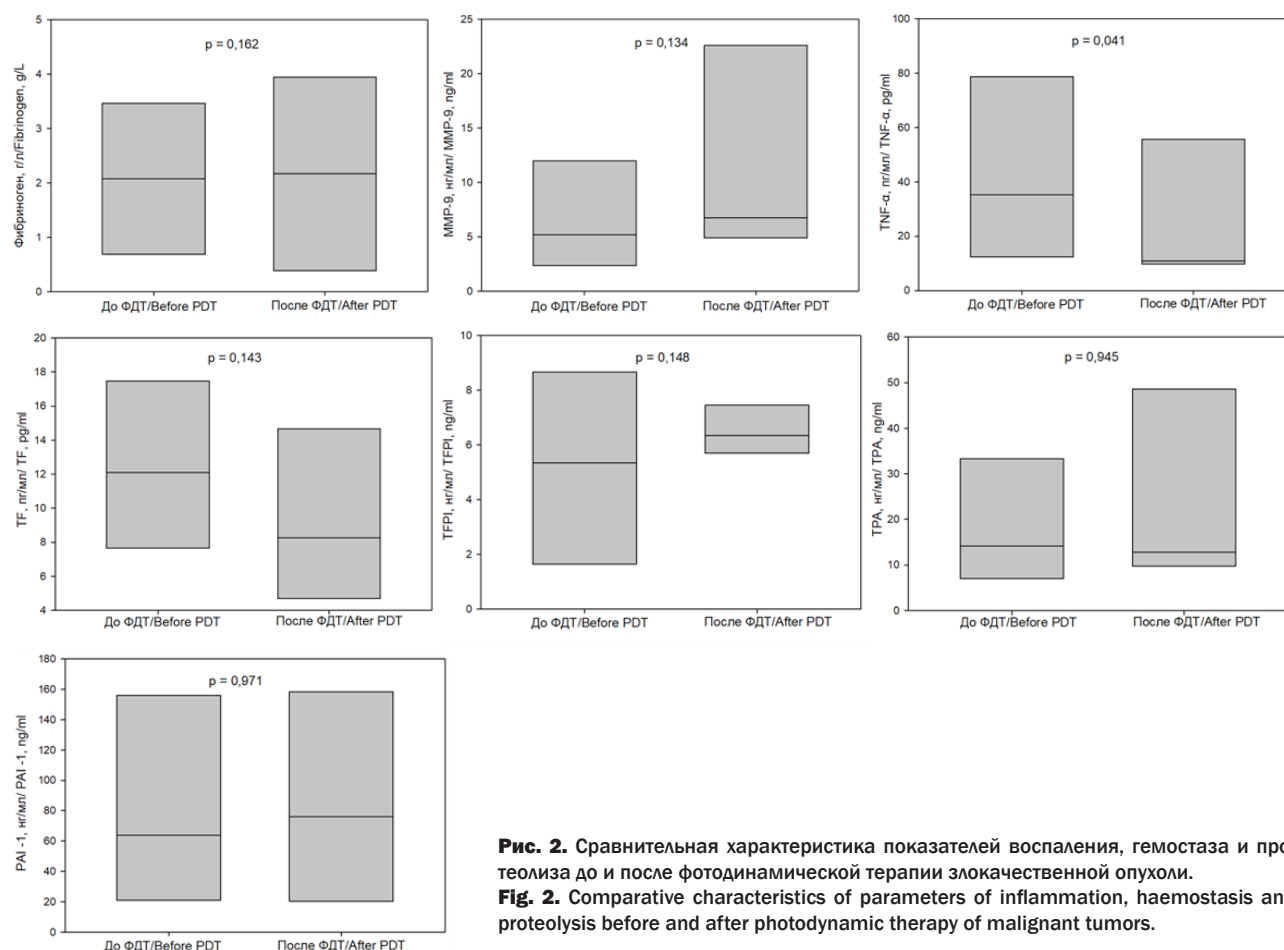


Рис. 2. Сравнительная характеристика показателей воспаления, гемостаза и протеолиза до и после фотодинамической терапии злокачественной опухоли.
Fig. 2. Comparative characteristics of parameters of inflammation, haemostasis and proteolysis before and after photodynamic therapy of malignant tumors.

Таблица 4

Модель множественного линейного регрессионного анализа для оценки влияния значения TNF-α, TPA, PAI-1, общего билирубина до лечения на медиану выживаемости у пациентов основной группы

Table 4

Model of multiple linear regression analysis to assess the effect of TNF-α, TPA, PAI-1, total bilirubin before treatment on the median survival in patients of the main group

Показатель Value	$\beta \pm \sigma$	p
Константа Constant	2003,485±393,260	<0,001
TNF-α	-17,074±5,659	0,012
TPA	-3,940±3,436	0,276
PAI-1	-3,525±2,721	0,222
Общий билирубин Common bilirubin	-1,260±1,021	0,243

Медиана выживаемости = 2003,485 - (17,074 – показатель TNF- α) - (3,940 – показатель TPA) - (3,525 – показатель PAI-1) - (1,260 – показатель общего билирубина)

Survival median = 2003,485 - (17,074 – value of TNF- α) - (3,940 – value of TPA) - (3,525 – value of PAI-1) - (1,260 – value of common bilirubin)

R = 0,777; R² = 0,603; F = 4,185; p = 0,027

Заключение

Таким образом, комплексное паллиативное лечение с применением ФДТ пациентов с ЗНО желчевыводящих протоков позволяет увеличить продолжи-

тельность их жизни, не оказывая значимых побочных эффектов. ФДТ может быть рекомендована для применения при паллиативном лечении билиарного рака.

ЛИТЕРАТУРА

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2020 году / под ред. А.Д. Каприна, В. В. Старинского, Г. В. Петровой – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России. – 2021. – С. 239.
2. Zhang X. et al. Comparison of current guidelines and consensus on the management of patients with cholangiocarcinoma: 2022 update // *Intractable Rare Dis Res.* – 2022. – Vol. 11(4). – P. 161-172.
3. Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России». Рак желчевыводящей системы. Клинические рекомендации. – 2020. – С. 51. Ссылка активна на 23.03.2023. https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/biliarnyj_rak.pdf
4. Zerem E., Imširović B., Kunosić S. et al. Percutaneous biliary drainage for obstructive jaundice in patients with inoperable, malignant biliary obstruction // *Clin Exp Hepatol.* – 2022. – №8(1). – P. 70-77.
5. Shah R., John S. Cholestatic Jaundice // In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. – 2022. – PMID: 29489239.
6. Цеймах А.Е., Лазарев А.Ф., Куртуков В.А. и соавт. Способ комплексного мини-инвазивного лечения механической желтухи, холангита, внутрипеченочных абсцессов опухолевого генеза с применением локальной и системной фотодинамической терапии. – Патент РФ №2704474. – 2019. [Tseimakh A.E et al. Method for complex mini-invasive treatment of obstructive jaundice, cholangitis, intrahepatic abscesses of tumor genesis using local and systemic photodynamic therapy. Patent RF, no. 2704474. – 2019. (In Russian)]
7. Dindo D., Demartines N., Clavien P.A. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey // *Annals of Surgery.* – 2004. – Vol. 240(2). – P. 205-213.
8. Haider H., Chapman C.G., Siddiqui U.D. Maximizing survival in hilar cholangiocarcinoma patients using multi-modality therapy: photodynamic therapy (pdt) with stenting, chemotherapy, and radiation // *Gastrointestinal Endoscopy.* – 2020. – Vol. 91(6). – P. 1-5. doi: 10.1016/j.gie.2020.03.2226
9. Lu Y. et al. Efficacy and safety of photodynamic therapy for unresectable cholangiocarcinoma: A meta-analysis // *Clinics and research in hepatology and gastroenterology.* – 2015. – Vol. 39(6). – P. 718-724. doi: 10.1016/j.clinre.2014.10.015.
10. Li Z. et al. Long-Term Results of ERCP- or PTCS-Directed Photodynamic Therapy for Unresectable Hilar Cholangiocarcinoma // *Surg Endosc.* – 2021. – Vol. 35(10). – P. 5655-64. doi: 10.1007/s00464-020-08095-1
11. Moole H. et al. Success of Photodynamic Therapy in Palliating Patients With Nonresectable Cholangiocarcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis // *World J Gastroenterol.* – 2017. – Vol. 23(7). – P. 1278-88. doi: 10.3748/wjg.v23.i7.1278
12. Pereira S.P. et al. PHOTOSTENT-02: Porfimer Sodium Photodynamic Therapy Plus Stenting Versus Stenting Alone in Patients With Locally Advanced or Metastatic Biliary Tract Cancer // *ESMO Open.* – 2018. – Vol. 3(5). – P. e000379. doi: 10.1136/esmoopen-2018-000379
13. Maswikiti E.P., Chen H. Photodynamic therapy combined with systemic chemotherapy for unresectable extrahepatic cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis // *Photodiagnosis Photodyn Ther.* – 2023. – Vol. 2 (41). – P. 103318. doi: 10.1016/j.pdpdt.2023.103318.
14. А. П. Момот, Л. П. Цывкина, И. А. Тараненко Современные методы распознавания состояния тромботической готовности // Москва: Издательство «Знание-М». – 2022. – С. 146.
15. Streiff M.B. et al. Cancer-Associated Venous Thromboembolic Disease, Version 2.2021 NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology // *Journal of the National Comprehensive Cancer Network.* – 2021. – Vol. 19(10). – P. 1181-1201

REFERENCES

1. Status of oncological care for the population of Russia in 2020 / ed. A.D. Kaprin, V.V. Starinskogo, G.V. Petrova - M.: *MSIOI named after P.A. Herzen, branch of the FSBI «NMICR» of the Russian Ministry of Health*, 2021, p. 239.
2. Zhang X. et al. Comparison of current guidelines and consensus on the management of patients with cholangiocarcinoma: 2022 update. *Intractable Rare Dis Res*, 2022, vol. 11(4), pp. 161-172.
3. Russian Oncology Association. Biliary cancer. Clinical guidelines. 2020. 51 p. Accessed March 23, 2023 (In Russian) https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/biliarnyj_rak.pdf
4. Zerem E., Imširović B., Kunosić S. et al. Percutaneous biliary drainage for obstructive jaundice in patients with inoperable, malignant biliary obstruction. *Clin Exp Hepatol*, 2022, vol. 8(1), pp. 70-77.
5. Shah R., John S. Cholestatic Jaundice. In: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*, 2022, PMID: 29489239.
6. Tseimakh A.E. et al. Method for complex mini-invasive treatment of obstructive jaundice, cholangitis, intrahepatic abscesses of tumor genesis using local and systemic photodynamic therapy. Patent RF, no. 2704474, 2019. (In Russian)
7. Dindo D., Demartines N., Clavien P.A. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Annals of Surgery*, 2004, vol. 240(2), pp. 205-213.
8. Haider H., Chapman C.G., Siddiqui U.D. Maximizing survival in hilar cholangiocarcinoma patients using multi-modality therapy: photodynamic therapy (pdt) with stenting, chemotherapy, and radiation. *Gastrointestinal Endoscopy*, 2020, vol. 91(6), pp. 1-5. doi: 10.1016/j.gie.2020.03.2226
9. Lu Y. et al. Efficacy and safety of photodynamic therapy for unresectable cholangiocarcinoma: A meta-analysis. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*, 2015, vol. 39(6), pp. 718-724. doi: 10.1016/j.clinre.2014.10.015.
10. Li Z. et al. Long-Term Results of ERCP- or PTCS-Directed Photodynamic Therapy for Unresectable Hilar Cholangiocarcinoma. *Surg Endosc*, 2021, vol. 35(10), p. 5655-5664. doi: 10.1007/s00464-020-08095-1
11. Moole H. et al. Success of Photodynamic Therapy in Palliating Patients With Nonresectable Cholangiocarcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *World J Gastroenterol*, 2017, vol. 23(7), pp. 1278-88. doi: 10.3748/wjg.v23.i7.1278
12. Pereira S.P. et al. PHOTOSTENT-02: Porfimer Sodium Photodynamic Therapy Plus Stenting Versus Stenting Alone in Patients With Locally Advanced or Metastatic Biliary Tract Cancer. *ESMO Open*, 2018, vol. 3(5), p. e000379. doi: 10.1136/esmoopen-2018-000379
13. Maswikiti E.P., Chen H. Photodynamic therapy combined with systemic chemotherapy for unresectable extrahepatic cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2023, vol 2 (41), p.103318. doi: 10.1016/j.pdpdt.2023.103318.
14. Momot A.P., Tsyvkina L.P., Taranenko I.A. Modern methods of recognition of the state of thrombotic readiness. *Moscow: Publishing house «Znanie-M»*, 2022, p. 146.
15. Streiff M.B. et al. Cancer-Associated Venous Thromboembolic Disease, Version 2.2021 NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 2021, vol. 19(10), pp. 1181-1201.

ИМПУЛЬСНЫЙ РЕЖИМ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПОЛУПРОВОДНИКОВОГО ЛАЗЕРА С ДЛИНОЙ ВОЛНЫ 445 НМ В ФОНОХИРУРГИИ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

М.А. Рябова¹, Л.Б. Митрофанов², М.Ю. Улупов¹, В.А. Степанова¹, К.А. Стерхова²

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Представлены результаты экспериментального исследования, посвященного выбору оптимального режима импульсного контактного лазерного воздействия полупроводникового лазера с длиной волны 445 нм в хирургии голосовых складок. Эндоларингеальная фонохирургия позволяет максимально сохранить анатомически и функционально значимые структуры гортани в сочетании с радикальностью вмешательства. С позиции мукоундулярной теории голосообразования волнообразные колебания голосовых складок возможны за счет подвижности покровного слоя голосовой складки относительно ее тела. Следовательно любая травматизация на уровне покровного слоя сопряжена с риском его избыточного рубцевания и потерей способности к волнообразному скольжению. Голосовые складки свиньи, по данным ряда авторов, имеют схожее строение с человеческими как по гистологическому строению (толщина слоев, соотношение коллагеновых и эластических волокон), так и по акустическим параметрам, что обосновывает рациональность их использования в качестве экспериментальной модели. В серии экспериментов с использованием лазера с длиной волны 445 нм проведены контактные импульсные воздействия на биологическую модель с длительностью импульсов 10, 20, 50 и 100 мс с последующей оценкой по данным гистологических срезов следующих параметров: глубина и ширина кратера абляции, ширина зоны бокового термического повреждения. Установлены наиболее оптимальные для фонохирургических вмешательств режимы импульсных воздействий лазера с длиной волны 445 нм.

Ключевые слова: фонохирургия, лазер с длиной волны 445 нм, дисфония, лазерная хирургия, ларингология.

Контакты: Степанова В.А., e-mail: valerii.stepanova15@gmail.com

Для цитирования: Рябова М.А., Митрофанова Л.Б., Улупов М.Ю., Степанова В.А., Стерхова К.А. Импульсный режим воздействия полупроводникового лазера с длиной волны 445 нм в фонохирургии: экспериментальное исследование // Biomedical Photonics. – 2023. – Т. 12, № 2. – С. 11–15. doi: 10.24931/2413–9432–2023–12–2–11–15.

PULSED EXPOSURE MODE OF THE 445 NM SEMICONDUCTOR LASER IN PHONOSURGERY: AN EXPERIMENTAL STUDY

Ryabova M.A.¹, Mitrofanova L.B.², Ulupov M.Y.¹, Stepanova V.A.¹, Sterkhova K.A.²

¹Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, Russia

²Almazov National Medical Research Centre, Russia, Saint-Petersburg, Russia

Abstract

The study presents the results of an experimental study devoted to the choice of the most optimal mode of pulsed contact laser exposure of semiconductor laser with a wavelength of 445 nm in phonosurgery, which implies maximum preservation of anatomically and functionally significant structures of the larynx combined with radical approach to the pathological process. From the standpoint of the mucoundular theory of voice formation, wave-like oscillations of the vocal folds are possible due to the mobility of the cover layer of the vocal fold (epithelium, superficial layer of the lamina propria) relative to its body (deep layer of the lamina propria, vocal muscle). Thus, any injury at the level of the integumentary layer is associated with the risk of its excessive scarring and loss of the ability to wave-like sliding. Pig vocal folds, according to a number of authors, have a structure similar to human ones in terms of both histological structure and acoustic parameters, which justifies the rationality of their use as an experimental model. In a series of experiments using a 445 nm laser, contact pulsed impacts on a biological model were carried out with pulse durations of 10, 20, 50, and 100 ms, followed by evaluation of the following parameters based on the data of histological sections: the depth and width of the ablation crater, the width of the zone of lateral thermal damage. Thus, the most optimal for phonosurgical interventions modes of pulsed laser exposures with a wavelength of 445 nm are described.

Key words: phonosurgery, laser 445 nm, dysphonia, laser surgery, laryngology

Contacts: Stepanova V.A., e-mail: valerii.stepanova15@gmail.com

For citations: Ryabova M.A., Mitrofanova L.B., Ulupov M.Y., Stepanova V.A., Sterkhova K.A. Pulsed exposure mode of the 445 nm semiconductor laser in phonosurgery: an experimental study, *Biomedical Photonics*, 2023, vol. 12, no. 2, pp. 11–15. doi: 10.24931/2413–9432–2023–12–2–11–15.

Введение

Доброкачественные новообразования гортани – наиболее часто встречаемая патология гортани, приводящая к стойкой дисфонии, которая обуславливает снижение качества жизни человека и зачастую утрату продуктивности его профессиональной деятельности. Лечение данной патологии возможно только с использованием хирургических техник.

Эндоларингеальная фонохирургия подразумевает собой максимальную сохранность анатомически и функционально значимых структур гортани в сочетании с радикальностью в отношении патологического процесса. Говоря о максимальной сохранности структур, в первую очередь имеется в виду покровный слой голосовой складки. С позиции биомеханики вибрационных колебаний, необходимых для возникновения голоса, структуру голосовых складок разделяют на так называемый «покровный слой» и «тело». Слизистая оболочка (эпителий и поверхностный слой собственной пластинки) являются «покровным слоем» и представляют собой единую морфофункциональную единицу, способную к самоподдерживающимся колебаниям относительно «тела», которое образовано глубоким слоем собственной пластинки, лежащим на голосовой мышце, средний же слой собственной пластинки обозначается как «переходная зона». Позднее были предложены несколько иные разделения, различия в которых в основном касаются положения промежуточного слоя собственной пластинки, но в любом случае, основная идея заключается в том, что «покров» и «тело» обладают разной биомеханикой [1]. Поверхностный слой собственной пластинки содержит наименьшее количество фибриллярных белков (коллагена и эластина), что определяет его высокую подвижность. Таким образом, любая травма на этом уровне и стимуляция активности фибробластов может приводить к избыточному рубцеванию и ограничению подвижности покровного слоя голосовой складки.

При фонохирургии доброкачественных поражений голосовых складок всегда необходимо учитывать, что хирургический разрез ткани, иссечение или абляция сами по себе могут вызывать избыточное рубцевание ткани как следствие ее заживления [2]. Перед хирургом всегда стоит задача свести к минимуму травмирование тканей голосовых складок во время операции, что подтверждает обоснованность поиска и внедрения в практику новых, более щадящих, методик фонохирургических вмешательств [3].

Материалы и методы

В экспериментальном исследовании была проведена оценка воздействия излучения полупроводникового лазера 445 нм на биологическую ткань. В качестве биологической модели использовались голосовые складки свиней *ex vivo* (*Sus scrofa domesti-*

cus), забор которых осуществлялся в течение 2 ч после гуманной гибели животных на скотобойне с последующим сохранением их при температуре 2°C для избегания деградации биологической ткани до проведения эксперимента.

Для лазерного облучения использовалась лазерная установка IPG Photonics (Россия) с длиной волны 445 нм. В качестве оптического волокна использовался многоцветный нестерильный волоконный инструмент IPG Surgical Fiber Reusable (Россия) с диаметром сердцевинки 400 мкм.

Эксперимент проводился после предварительного естественного согревания биологической ткани до комнатной температуры. В ходе эксперимента полупроводниковый лазер с длиной волны 445 нм использовался в импульсном режиме. Методика включала нанесение отдельных точечных лазерных воздействий в контактном режиме на максимальной мощности 13 Вт с длительностью отдельных импульсов 10, 20, 50 и 100 мс. Для каждого импульсного режима было выполнено 10 отдельных лазерных воздействий по медиальному краю одной голосовой складки. В эксперименте использовано 5 свиных гортаней, 4 из которых для экспериментальной части, 1 – в качестве контроля.

После завершения облучения образцы биологической ткани были препарированы (рис.1), материал фиксировался в 10% растворе забуференного нейтрального формалина в течение 48 ч (соотношение фиксатора и исследуемых образцов 10:1), затем биологический материал нарезался на пластины толщиной 5 мм и укладывался в гистологические кассеты. Далее проводились декальцинация срезов в кислотном растворе (соотношение декальцинатора и исследуемых образцов 50:1) и стандартная спиртовая проводка с заливкой в парафин по общепринятой методике [4]. Из блоков изготавливали срезы толщиной 2 мкм на световом микротоме Leica DM1000 (Германия) с последующей окраской их гематоксилином и эозином по стандартной методике. Гистологические срезы оцифровывали на сканирующем микроскопе Aperio AT2 (Германия).

Морфометрию производили с помощью анализатора изображения Aperio ImageScope 12.4.6.5003. За счет высокой плотности мощности в зоне контакта волокна с поверхностью ткани формируется очаг деструкции (абляции) ткани (кратер), диаметр и глубина которого были измерены в эксперименте, в результате чего получены диапазоны величин повреждения для каждой длительности импульсного воздействия. Зоной лазерного воздействия считали оптически пустую область, в которой происходило выпаривание нормальных гистологических структур, объективно отмечались как прерывание нормального многослойного плоского неороговевающего эпителия с формированием специфического кратера абляции, так и прилежащая к кратеру ткань (собственная пластин-

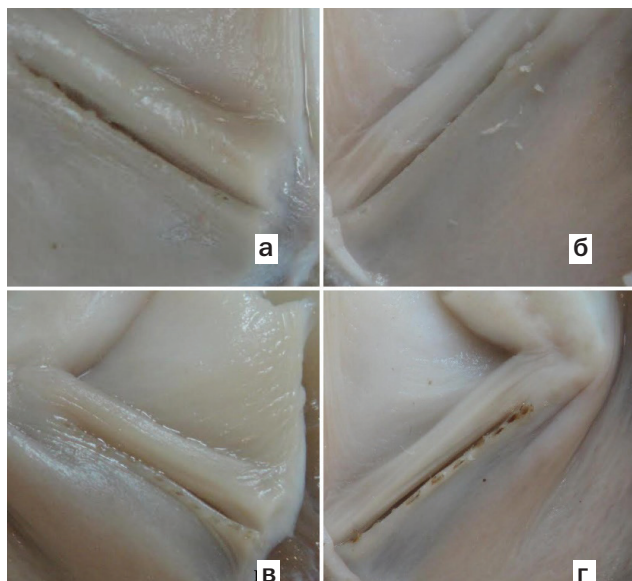


Рис. 1. Макроскопические препараты голосовых складок свиней после лазерного воздействия с длительностью импульса: а – 10 мс, б – 20 мс, в – 50 мс, г – 100 мс.

Fig. 1. Macroscopic preparations of the pig vocal folds after laser exposure: а – 10 ms, б – 20 ms, в – 50 ms, г – 100 ms.

ка голосовой складки, голосовая мышца) с признаками термического повреждения в виде нарушения ядерного строения и дезориентации хода эластических и коллагеновых волокон.

Статистическую обработку результатов проводили на платформе Jupyter notebook с использованием Python 3.9 с расчетом корреляции с использованием коэффициента (r) Спирмена.

Результаты и обсуждение

Золотыми стандартами фонохирургии являются вмешательства с использованием холодных микроинструментов и с использованием CO_2 -лазера. Говоря о классической «холодной» фономикрохирургии, несмотря на активное внедрение малоинвазивных методик (microflap, mini-microflap), стоит отметить, что в отношении многих доброкачественных поражений голосовых складок объем хирургии исчисляется микрометрами. Это обуславливает сложность в расчете точности самим хирургом своих действий с использованием микрохирургических ножниц, скальпеля и других инструментов. Поэтому связанная с «холодным» вмешательством травма ткани голосовых складок потенциально более выражена из-за больших размеров инструментов по сравнению с реально необходимыми размерами в микронном диапазоне для достижения радикальности операции.

Как было сказано выше, в отношении максимально бережного восстановления вибрационных колебаний голосовой складки при фонохирургии принципиально проводить вмешательство в пределах эпителия и поверхностного слоя собственной пластинки,

что в последующем позволит избежать избыточного рубцевания и нарушения подвижности покровного слоя складки относительно ее тела. По данным ряда публикаций поверхностный слой составляет порядка 30–40% от всей глубины собственной пластинки, толщина которой в среднем достигает 1 мм [5, 6, 7]. Глубина эпителия истинной голосовой складки при этом около 80–100 мкм [8] и, следовательно, глубина покровного слоя голосовой складки составляет в среднем 400–500 мкм. Во избежание связывания рубцовой ткани с телом голосовой складки и ограничения подвижности в этих пределах допускается проведение фонохирургического вмешательства.

Ряд исследователей считают, что у свиней можно выделить тенденцию к аналогичному трехслойному строению собственной пластинки голосовой складки с похожим соотношением коллагеновых и эластических волокон на протяжении всей глубины собственной пластинки. Толщина слизистой оболочки голосовых складок свиней в среднем составляет 0,9 мм [9]. По данным акустического анализа естественной фокации животных было обнаружено, что диапазон частот фокации у свиней наиболее близок к таковому у человека [10, 11].

Несмотря на анатомическое и гистологическое преимущество модели свиных голосовых складок и рациональность их использования в качестве научного образца для отработки хирургических методик из-за их легкой доступности на скотобойне, в настоящее время имеется небольшое количество публикаций, в которых эта модель оценивается с точки зрения лазерного воздействия, применяемого в фонохирургии у человека.

Ни в одной из доступных публикаций нами не обнаружено гистологической оценки точечных лазерных воздействий на голосовые складки лабораторных биологических моделей при использовании лазерного излучения с длиной волны 445 нм, что определяет актуальность выполненного экспериментального исследования.

При точечных лазерных импульсных воздействиях с длиной волны 445 нм нарастание длительности импульса приводит к увеличению глубины кратера абляции и толщины зоны бокового термического повреждения (рис. 2). При этом значимого увеличения ширины кратера абляции нами не отмечалось (рис. 3).

Данные статистического анализа проведенных измерений представлены в табл.

При расчете коэффициентов корреляции Спирмена для определения взаимосвязи между длительностью импульса и глубиной кратера абляции данный коэффициент составил 0,81, для толщины зоны бокового термического повреждения – 0,74, для ширины кратера абляции – 0,45 ($p < 0,05$). Из представленных данных следует, что взаимосвязь между длительностью импульса и каждым из оцениваемых параметров

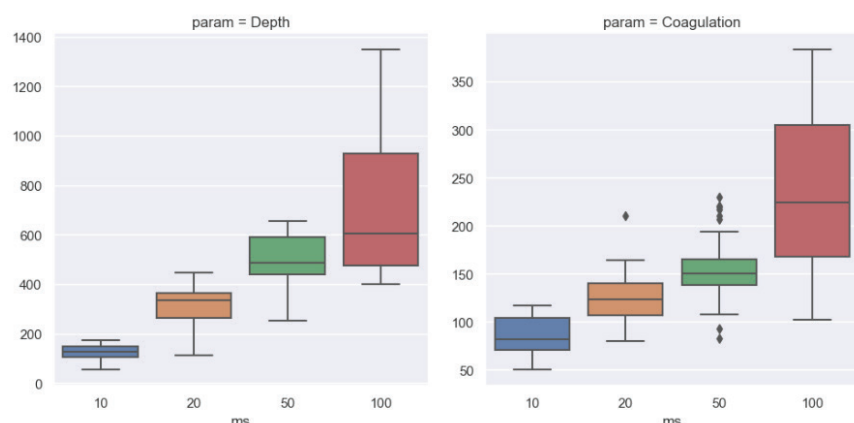


Рис. 2. Зависимость глубины кратера абляции (рис. а, ось у; мкм) и толщины зоны бокового термического повреждения в мкм (рис. б, ось у; мкм) от длительности импульса лазерного воздействия (ось х; мс).

Fig. 2. Dependence of the ablation crater depth (fig. a, y-axis; μm) and the thickness of the lateral thermal damage zone (fig. b, y-axis; μm) on the laser exposure pulse duration (x-axis; ms).

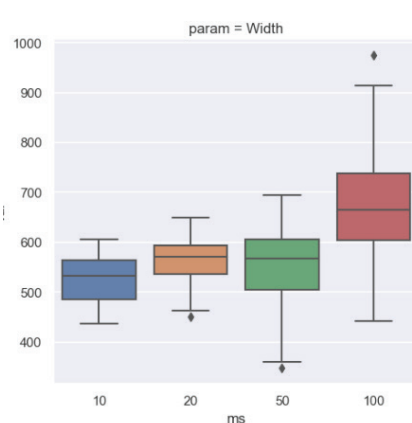


Рис. 3. Зависимость ширины кратера абляции (ось у; мкм) от длительности импульса лазерного воздействия (ось х; мс).

Fig. 3. Dependence of the ablation crater width (y-axis; μm) on the laser exposure pulse duration (x-axis; ms).

Таблица

Зависимость глубины, ширины кратера абляции и зоны бокового термического повреждения от длительности импульсного лазерного воздействия с длиной волны 445 нм.

Table

Dependence of the depth, width of the ablation crater and the zone of lateral thermal damage on the duration of pulsed laser exposure with wavelength of 445 nm.

Длительность импульсного воздействия, мс Duration of impulse exposure, ms	Результаты статистической обработки Results of statistical processing	Глубина кратера абляции, мкм The depth of the ablation crater, μm	Зона бокового термического повреждения, мкм The lateral thermal damage zone, μm	Ширина кратера абляции, мкм The width of the ablation crater, μm
10	Среднее значение (стандартное отклонение) Mean value (standard deviation)	124,8 (32,9)	85,2 (20,0)	526,6 (55,2)
	Мин; макс (min; max)	104; 148	71; 104	485; 563
20	Среднее значение (стандартное отклонение) Mean value (standard deviation)	312,5 (83,8)	126,8 (27,8)	564,0 (51,7)
	Мин; макс (min; max)	262; 365	107; 140	536; 593
50	Среднее значение (стандартное отклонение) Mean value (standard deviation)	498,6 (93,7)	152,4 (30,6)	548,7 (90,1)
	Мин; макс (min; max)	440; 592	138; 165	504; 604
100	Среднее значение (стандартное отклонение) Mean value (standard deviation)	730,3 (313,9)	235,7 (82,6)	673,4 (115,7)
	Мин; макс (min; max)	475; 926	168; 304	602; 737

есть и является статистически значимой. При этом для ширины абляционного кратера эта взаимосвязь характерна в меньшей степени, что объяснимо физическими свойствами лазерного излучения: при контактном режиме воздействия поглощение излучения в основном происходит вглубь биологической ткани.

На представленных гистологических срезах наглядно продемонстрировано увеличение глубины и ширины зоны бокового термического повреждения (рис. 4, а – г). Установлено, что при длительности импульса в 100 мс (рис. 4, г) зона повреждения преодолевает все слои собственной пластинки и большую

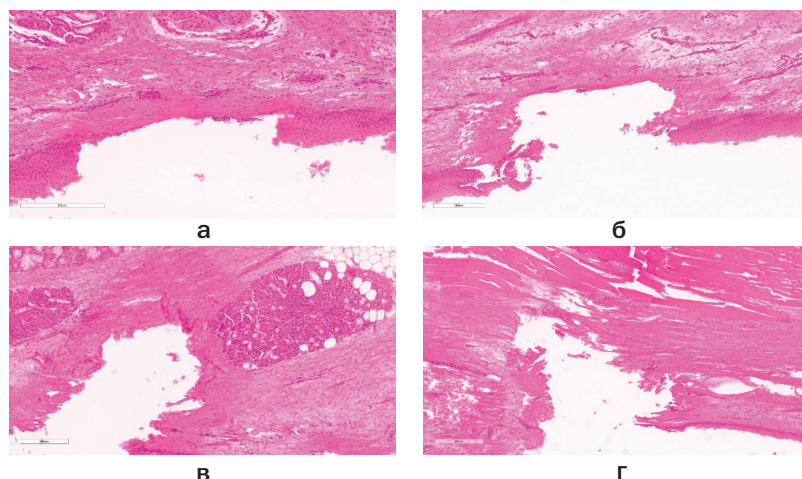


Рис 4. Микрофотографии гистологических срезов голосовых складок свиней после лазерного воздействия: а – длительность импульса 10 мс, масштаб 200 мкм; ареактивный (без воспалительного инфильтрата) язвенный дефект с некрозом всех слоев плоскоклеточного эпителия; б – длительность импульса 20 мс, масштаб 200 мкм; очаговый некроз $\frac{1}{4}$ собственной пластинки слизистой оболочки; в – длительность импульса 50 мс, масштаб 200 мкм; очаговый некроз голосовой складки с распространением на $\frac{2}{3}$ глубины собственной пластинки слизистой оболочки; г – длительность импульса 100 мс, масштаб 400 мкм; увеличение очага некроза за счет вовлечения большей площади эпителия и некроза $\frac{1}{3}$ мышечных волокон голосовой складки. Окраска гематоксилином и эозином.

Fig. 4. Micrographs of histological sections of the vocal folds of pigs after laser exposure, stained with hematoxylin and eosin: а – pulse duration 10 ms, scale 200 μ m; areactive (without inflammatory infiltrate) ulcerative defect with necrosis of all layers of the squamous epithelium; б – pulse duration 20 ms, scale 200 μ m; focal necrosis of the lamina propria and $\frac{1}{4}$ of the muscle fibers of the vocal fold; в – pulse duration 50 ms, scale 200 μ m; focal necrosis of the vocal fold extending to $\frac{2}{3}$ of the depth of the mucosal lamina propria; г – pulse duration 100 ms, scale 400 μ m; an increase in the focus of necrosis due to the involvement of a larger area of the epithelium and necrosis of $\frac{1}{3}$ of the muscle fibers of the vocal fold.

часть мышечных волокон голосовой складки.

Заключение

Таким образом, длительность импульса при проведении фонохирургических вмешательств должна быть выбрана непосредственно хирургом в зависимости от патологического образования голосовой складки. На наш взгляд, наиболее оптимальными режимами лазерного воздействия являются излучения с длительностью одиночного импульса 10 мс и 20 мс, при воздействии которых с большой вероятностью можно эффективно удалить эпителиальные или субэпителиальные образования в пределах поверхностного слоя собственной пластинки голосовой складки. В случаях объемных образований на широком основании может быть рекомендован режим с длительностью одиночного импульса 50 мс, в то время как длительность импульса 100 мс следует избегать при фонохирургическом вмешательстве, учитывая большую вероятность проникновения лазерного излучения на всю толщину собственной пластинки голосовой складки.

ЛИТЕРАТУРА

- Hirano M. Vocal mechanisms in singing: Laryngological and phoniatric aspects // *Journal of Voice*. – 1988. – Vol. 2(1). – P. 51-69.
- Allen J. Cause of Vocal Fold Scar // *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. – 2010. – Vol. 18. – P. 475-480.
- Карпищенко С.А., Рябова М.А., Улупов М.Ю. Лазерная хирургия в оториноларингологии на современном этапе // *Consilium medicum*. – 2014. – Т. 16, №11. – С. 73-76.
- Саркисов, Д. С. Микроскопическая техника / Д. С. Саркисов, Ю. Л. Перов. – М.: Медицина. – 1996. – С. 544.
- Nick J I Hamilton. The life-cycle and restoration of the human vocal fold // *Laryngoscope Investig Otolaryngol*. – 2023. – Vol. 8(1). – P. 168-176.
- Woodson G. Developing a Porcine Model for Study of Vocal Fold Scar // *Journal of Voice*. – 2012. – Vol. 26(6). – P. 706-710.
- Laszlo Peter Ujvary et al. Experimental model for controlled endoscopic subepithelial vocal fold injury in rats // *Acta Cir Bras*. – 2022. – Vol. 37(1). – P. e370106.
- Kaiser M.L. et al. Laryngeal epithelial thickness: a comparison between optical coherence tomography and histology // *Clinical Otolaryngology*. – 2009. – Vol. 34(5). – P. 460-466.
- Alipour F., Finnegan E.M. & Jaiswal S. Phonatory Characteristics of the Excised Human Larynx in Comparison to Other Species // *Journal of Voice*. – 2013. – Vol. 27(4). – P. 441-447.
- Schlegel P. et al. Objective Assessment of Porcine Voice Acoustics for Laryngeal Surgical Modeling // *Appl Sci (Basel)*. – 2021. – Vol. 11(10). – P. 4489.
- Connor M. P. et al. Effect of Vocal Fold Injection of Cidofovir and Bevacizumab in a Porcine Model // *JAMA Otolaryngology-Head & Neck Surgery*. – 2014. – Vol. 140(2). – P. 155.

REFERENCES

- Hirano M. Vocal mechanisms in singing: Laryngological and phoniatric aspects. *Journal of Voice*, 1988, vol. 2(1), pp. 51-69.
- Allen J. Cause of Vocal Fold Scar. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2010, vol. 18, pp. 475-480.
- Karpishchenko S.A., Ryabova M.A., Ulupov M.Yu. Laser surgery in otorhinolaryngology at the present stage. *Consilium medicum*, 2014, vol. 16(11), pp. 73-76.
- Sarkisov, D.S. Microscopic technique / D. S. Sarkisov, Yu.L. Perov. – M.: Medicine, 1996, p. 544.
- Nick J.I. Hamilton. The life-cycle and restoration of the human vocal fold. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*, 2023, vol. 8(1), pp. 168-176.
- Woodson G. Developing a Porcine Model for Study of Vocal Fold Scar. *Journal of Voice*, 2012, vol. 26(6), pp. 706-710.
- Laszlo Peter Ujvary et al. Experimental model for controlled endoscopic subepithelial vocal fold injury in rats. *Acta Cir Bras*, 2022, vol. 37(1), p. e370106.
- Kaiser M.L. et al. Laryngeal epithelial thickness: a comparison between optical coherence tomography and histology. *Clinical Otolaryngology*, 2009, vol. 34(5), pp. 460-466.
- Alipour F., Finnegan E.M. & Jaiswal S. Phonatory Characteristics of the Excised Human Larynx in Comparison to Other Species. *Journal of Voice*, 2013, vol. 27(4), pp. 441-447.
- Schlegel P. et al. Objective Assessment of Porcine Voice Acoustics for Laryngeal Surgical Modeling. *Appl Sci (Basel)*, 2021, vol. 11(10), p. 4489.
- Connor M.P. et al. Effect of Vocal Fold Injection of Cidofovir and Bevacizumab in a Porcine Model. *JAMA Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, 2014, vol. 140(2), p. 155.

ПРИМЕНЕНИЕ ВИДЕОКАПИЛЛЯРОСКОПИИ ДЛЯ МОНИТОРИНГА МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ В КОЖЕ ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

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

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

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

Резюме

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

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

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

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

VIDEOCAPILLAROSCOPIC MONITORING OF MICROCIRCULATION IN RATS DURING PHOTODYNAMIC THERAPY

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

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

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

Abstract

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

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

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

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

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

Введение

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Материалы и методы

Экспериментальные животные

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

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

Оборудование

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

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

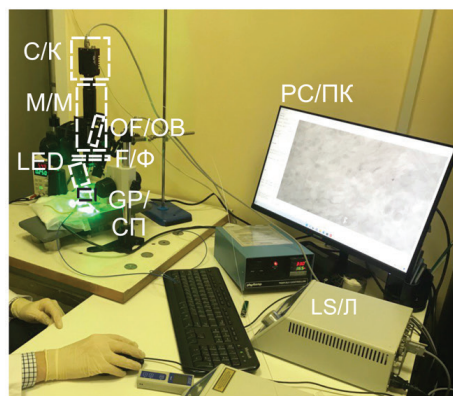
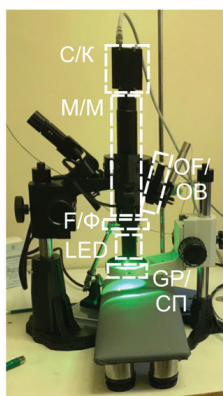
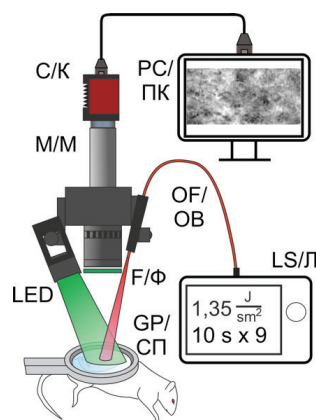


Рис. 1. Схема установки: К – камера, М – микроскоп, ПК – персональный компьютер, ОВ – оптическое волокно, Л – лазерный аппарат, Ф – оптический фильтр, СП – стеклянная пластина.

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

Протокол эксперимента

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

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

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

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

Алгоритм цифровой обработки данных ВКС

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

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

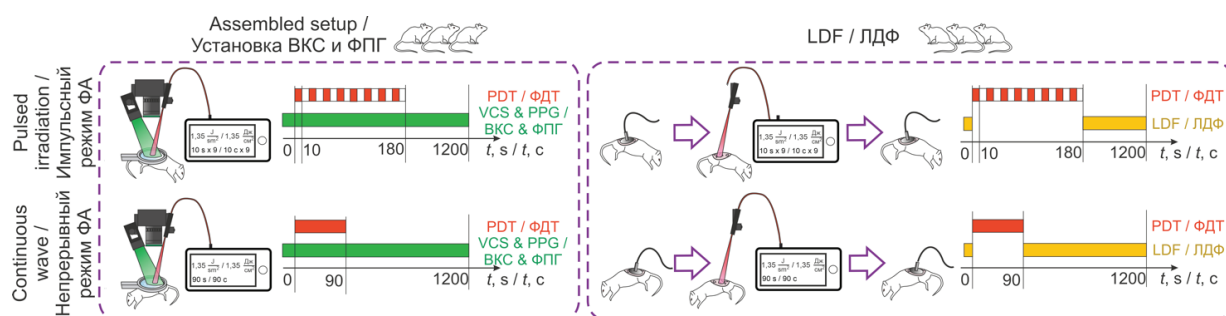


Рис. 2. Протокол эксперимента: ВКС – видеокапилляроскопия, ФПГ – фотоплетизмография, ЛДФ – лазерная доплеровская флоуметрия, ФДТ – фотодинамическая терапия, ФА – фотоактивация.

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

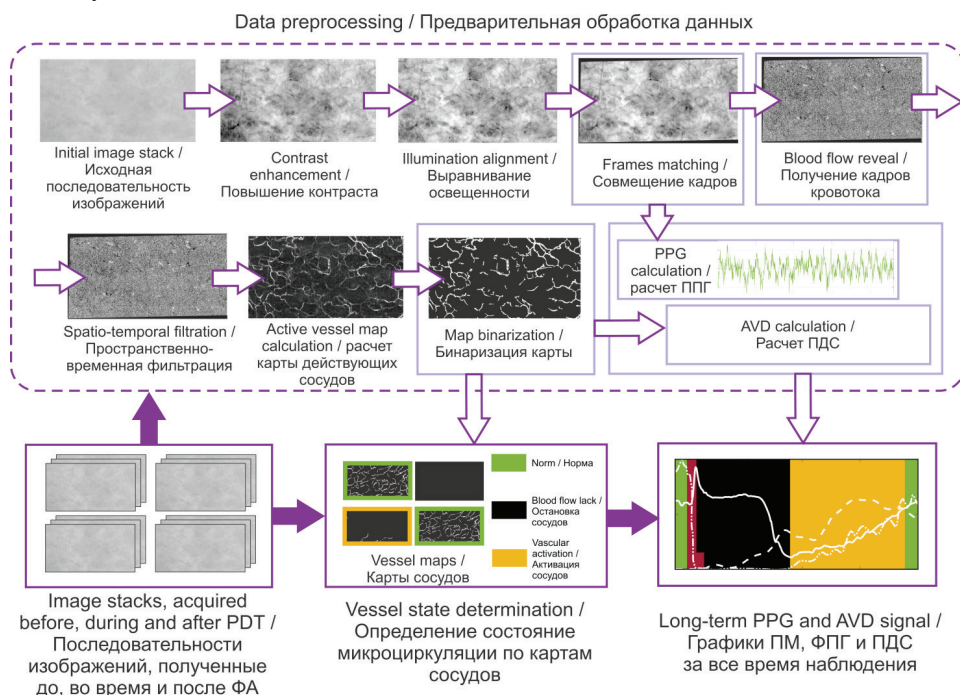


Рис. 3. Алгоритм цифровой обработки данных видеокапилляроскопии и фотоплетизмограмм. ППГ – фотоплетизмография, ПДС – плотность действующих сосудов, ПМЦ – показатель микроциркуляции, ФА – фотоактивация.

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

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

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

Результаты

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

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

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

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

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

Обсуждение

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

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

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

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

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

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

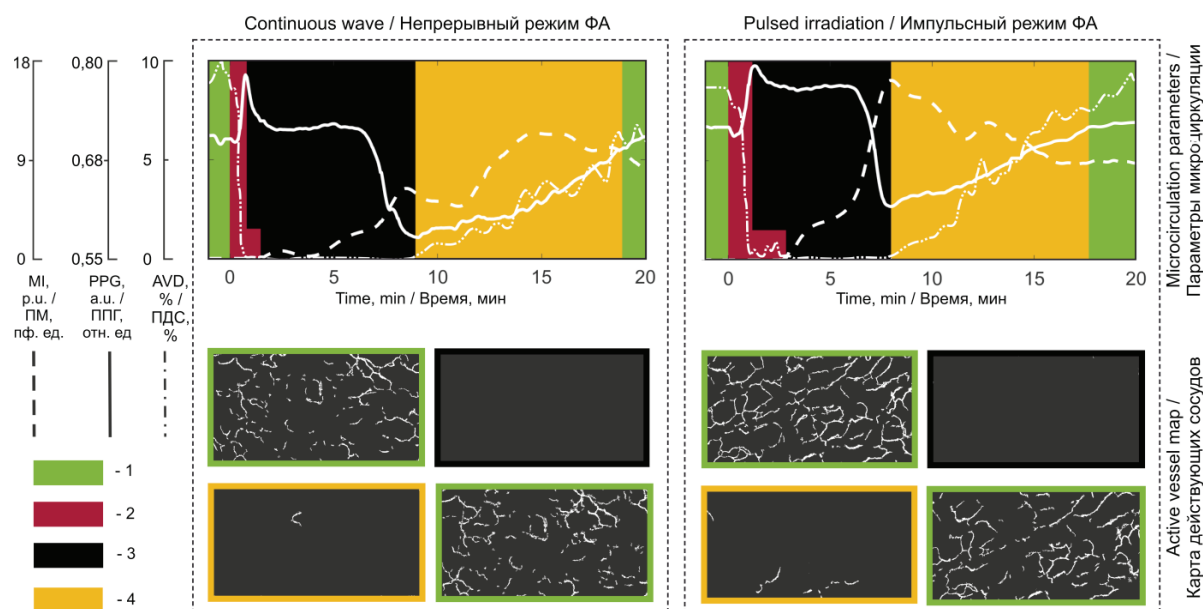


Рис. 4. Динамика морфометрических и гемодинамических параметров микроциркуляции, полученных методами видеокапилляроскопии, фотоплетизмографии и лазерной доплеровской флоуметрии. Периоды исследования: 1 - нормальное состояние сосудов относительно значений ФПГ, 2 - фотоактивации, 3 - остановка кровотока,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

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

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

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

Заключение

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

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

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

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

ЛИТЕРАТУРА

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

REFERENCES

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

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

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ *IN VIVO* ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ И РАДИОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ, ИХ СОЧЕТАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Д.А. Церковский¹, Д.И. Козловский¹, А.Н. Мазуренко¹, Н.Д. Адаменко², Ф.Ф. Боричевский³

¹Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, аг. Лесной, Республика Беларусь

²Витебский государственный университет им. П.М. Машерова, г. Витебск, Республика Беларусь

³Минская областная клиническая больница, аг. Лесной, Республика Беларусь

Резюме

В рамках пилотного исследования авторами изучена противоопухолевая эффективность фотодинамической терапии (ФДТ) в комбинации с радиодинамической терапией (РДТ) в эксперименте *in vivo* на модели подкожно перевитой лимфосаркомы Плисса (ЛСП) у крыс. Фотосенсибилизатор (ФС) на основе хлорина е6 вводили внутривенно в дозе 2,5 мг/кг массы тела. Сеанс РДТ проводили на установке для контактной лучевой терапии (КЛТ) однократно через 2,5–3 ч после окончания введения ФС с использованием γ -излучения (^{192}Ir) в разовой очаговой дозе 6 Гр. Сеанс ФДТ осуществляли однократно непосредственно после воздействия ионизирующим излучением с помощью полупроводникового лазера «PDT diode laser» (ООО «Imaf Axicon», Беларусь, $\lambda=660\pm 5$ нм) со световой дозой 100 Дж/см², плотностью мощности 0,2 Вт/см² и мощностью 0,353 Вт. Все крысы были разделены на 4 группы по 6–7 особей в каждой: интактный контроль (ИК), ФС + ФДТ, ФС + КЛТ, ФС + КЛТ + ФДТ. Критерии оценки противоопухолевой эффективности: средний объем опухолей (V_{cp} , см³), коэффициент абсолютного прироста опухоли (К, в относительных единицах (ОЕ)), показатель торможения роста опухоли (ТРО, %), частота полной регрессии опухоли (ПР, %), доля излеченных крыс (%), показатель увеличения продолжительности жизни (УПЖ, %). Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. На 18-е сут. эксперимента V_{cp} в группах составил 63,25 $\pm$ 2,76 см³; 29,03 $\pm$ 6,06 см³ ($p=0,0002$); 22,18 $\pm$ 5,94 см³ ($p < 0,0001$); 11,76 $\pm$ 3,29 см³ ($p=0,0000$), соответственно. Коэффициенты К – 4516,86 ОЕ; 2638,09 ОЕ; 2024,45 ОЕ; 979,00 ОЕ. Показатель ТРО – 54,10% (ФС + ФДТ); 64,93% (ФС + КЛТ); 81,41% (ФС + КЛТ + ФДТ). Показатель УПЖ – 48,57% (ФС + ФДТ); 60,00% (ФС + КЛТ); 97,71% (ФС + КЛТ + ФДТ). На 60-е и 90-е сутки эксперимента частота ПР и доля излеченных крыс были одинаковыми и составили в группах 0%; 16,7%; 14,3% и 28,6%, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности и актуальности дальнейших исследований в этом научном направлении.

Ключевые слова: экспериментальное исследование, крысы, перевивные опухоли, фотодинамическая терапия, радиодинамическая терапия, фотосенсибилизатор.

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

Для цитирования: Церковский Д.А., Козловский Д.И., Мазуренко А.Н., Адаменко Н.Д., Боричевский Ф.Ф. Экспериментальные исследования *in vivo* противоопухолевой эффективности фотодинамической и радиодинамической терапии, их сочетанного применения // Biomedical Photonics. – 2023. – Т. 12, № 2. – С. 24–33. doi: 10.24931/2413-9432-2023-12-2-24-33.

EXPERIMENTAL *IN VIVO* STUDIES OF THE ANTITUMOR EFFICACY OF PHOTODYNAMIC AND RADIODYNAMIC THERAPY AND THEIR COMBINATIONS

Tzerkovsky D.A.¹, Kozlovsky D.A.¹, Mazurenko A.N.¹, Adamenko N.D.², Borichevsky F.F.³

¹N.N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus, Lesnoy, Republic of Belarus

²Vitebsk State University named after P.M. Masherov, Vitebsk, Republic of Belarus

³Minsk Regional Clinical Hospital, Lesnoy, Republic of Belarus

Abstract

The authors studied the antitumor efficacy of photodynamic therapy (PDT) in combination with radiodynamic therapy (RDT) in an *in vivo* experiment. The study was approved by the Ethics Committee of the N.N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus (protocol dated February 25, 2022, № 180). The work was performed on 26 white non-linear rats weighing 200 $\pm$ 50 g. Pliss lymphosarcoma (PLS) was used as a tumor model, which was transplanted subcutaneously. Photosensitizer (PS) «Photolon» (RUE «Belmedpreparaty», Belarus) was administered intravenously at a dose of 2.5 mg/kg of body weight. The RDT session was performed by the contact method (CRT) once 2.5–3 times after the end of the infusion of the PS on the «microSelectron-HDR V3 Digital apparatus» (Elekta, Sweden) using γ -radiation (^{192}Ir) in a single focal dose 6 Gy. A PDT session was performed once immediately after exposure to ionizing radiation using a «PDT diode laser» (ООО Imaf Axicon, Belarus, $\lambda=660\pm 5$ nm) at an exposure dose of 100 J/cm² with a power density of 0.2 W/cm² and a power of 0.353 watts. All rats were divided into 4 groups of 6–7 animals each: intact control (IC), PS + PDT, PS + CRT, PS + CRT + PDT. The criteria for evaluating antitumor efficacy were: the average volume of tumors (V_{av} , cm³), the coefficient of absolute growth of tumors (K, in OE), the coefficient of tumor growth inhibition (TGI, %), the frequency of complete tumor regressions (CR, %), the proportion of cured rats (%), an increase in the

average duration of dead rats (%). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. On the 18th day of the experiment, V_{av} in groups was $63.25 \pm 2.76 \text{ cm}^3$; $29.03 \pm 6.06 \text{ cm}^3$ ($p = 0.0002$); $22.18 \pm 5.94 \text{ cm}^3$ ($p < 0.0001$); $11.76 \pm 3.29 \text{ cm}^3$ ($p = 0.0000$), respectively. Coefficients $K - 4516.86 \text{ OE}$; 2638.09 OE ; 2024.45 OE ; 979.00 OE . TGI coefficients – 54.10% (PS + PDT); 64.93% (PS + CRT); 81.41% (PS + CRT + PDT). An increase in the average duration of dead rats indicator – 48.57% (PS + PDT); 60.00% (PS + CRT); 97.71% (PS + CRT + PDT). On the 60th and 90th days of the experiment, the frequency of PR and the proportion of cured rats were the same and amounted to 0%; 16.7%; 14.3% and 28.6%, respectively. The results obtained indicate the prospects and relevance of further research in this scientific direction.

Key words: experimental research, rats, transplanted tumors, photodynamic therapy, radiodynamic therapy, photosensitizer.

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

For citations: Tzerkovsky D.A., Kozlovsky D.A., Mazurenko A.N., Adamenko N.D., Borichevsky F.F. Experimental *in vivo* studies of the anti-tumor efficacy of photodynamic and radiodynamic therapy and their combinations, *Biomedical Photonics*, 2023, vol. 12, no. 2, pp. 24–33. doi: 10.24931/2413–9432–2023–12-2-24–33.

Введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – метод лечения предопухолевых заболеваний и злокачественных новообразований (ЗНО), эффективность которого доказана и подтверждена результатами многочисленных доклинических исследований на клеточных культурах и лабораторных животных с перевивными опухолями, а также клинических, в том числе многоцентровых рандомизированных исследований, включающих значительное количество пациентов с различными нозологическими формами онкологической патологии [1, 2]. В основе ФДТ лежит использование специальных препаратов – фотосенсибилизаторов (ФС), активация которых в патологически измененных тканях реализуется за счет воздействия лазерным излучением с определенной длиной волны [3, 4, 5]. В последние годы в рамках научных проектов активно изучается возможность использования других физических факторов, таких как ультразвук (сонодинамическая терапия), гипертермия (термодинамическая терапия), электрические поля (электродинамическая терапия) и ионизирующее излучение (радиодинамическая терапия) в качестве путей запуска сложных физико-химических реакций на молекулярном и клеточном уровнях, приводящих к переходу молекул ФС в возбужденное состояние подобно ФДТ, с последующей деструкцией опухолевых клеток [6, 7, 8].

С целью повышения противоопухолевой эффективности ФДТ целесообразным является комбинированное и сочетанное применение метода с традиционными подходами к лечению ЗНО, в частности, с лучевой терапией (ЛТ) [9, 10]. Сочетанное применение ФДТ и РДТ дает возможность использования субтерапевтических режимов лазерного и ионизирующего излучений, применение которых приводит к увеличению эффекта каждого из методов терапии за счет синергетического воздействия со значительным уменьшением риска возникновения ряда нежелательных реакций, имеющих место при применении высоких доз указанных физических факторов в первую очередь ЛТ.

Материалы и методы

Лабораторные животные

Пилотное исследование выполнено на 26 белых нелинейных беспородных крысах-самцах, полученных из вивария РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, с массой тела $200 \pm 50 \text{ г}$, в возрасте 2,5–3 мес. Длительность карантина перед включением в эксперимент составляла 14 сут. Крыс содержали в стандартных условиях пищевого и питьевого рациона *ad libitum*, при 12-часовом режиме освещения, температуре $20\text{--}22^\circ\text{C}$ и влажности 50–60% в индивидуальных клетках по 6–7 особей в каждой. Условия содержания крыс в лаборатории, показатели влажности, температуры, освещенности в помещении соответствовали действующим санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию вивариев (Санитарные правила и нормы 2.1.2.12-18-2006 «Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев)», Постановление Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь, от 31.10.2006 г. № 131) и Межгосударственными стандартами: ГОСТ 33216-2014 («Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» и ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур», утвержденными Постановлением Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации, протокол от 22.12.2014 г., № 73-П).

Опухолевый штамм

В качестве опухолевого штамма использовали лимфосаркому Плисса (ЛСП), полученную в виде клеточной культуры (Российская коллекция клеточных культур, Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация).

Опухолевая модель

Клеточную культуру ЛСП инокулировали крысам подкожно и поддерживали пассивированием *in vivo*. Подкожная перевивка включала введение под кожу

левой паховой области 0,5 мл взвеси опухолевых клеток в 20% растворе Хенкса, полученных после взятия и гомогенизации кусочков опухоли от крысы-донора. ЛСП относится к числу быстрорастущих опухолей с коротким латентным периодом, в связи с этим, крыс с ЛСП включали в эксперимент на 6-е сут. после перевивки по достижению диаметра опухолевого узла 3–5 мм.

Этические аспекты

Экспериментальные исследования были проведены в соответствии с международным законодательством и действующими в Республике Беларусь нормативными правовыми актами по проведению экспериментальных исследований с лабораторными животными, а именно:

1. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (г. Страсбург, Франция, от 18.03.1986 г.) с изменениями в соответствии с положениями Протокола (СЕД № 170 от 02.12.2005 г.).

2. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях (от 22.09.2010 г.).

3. ТКП 125–2008 «Надлежащая лабораторная практика» (GLP) (постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 56 от 28.03.2008 г.).

Характер выполняемых исследований соответствовал принципам «3Rs», разработанным W.M. Russel и R.L. Berch (1959 г.), а именно:

1) «Reduction» – сокращение количества используемых лабораторных животных в эксперименте.

2) «Refinement» – усовершенствование методики проведения эксперимента за счет применения обезболивающих и нетравматических методов.

3) «Replacement» – замена (переход от исследований на животных к методам, не использующим живых существ).

Крыс перед облучением вводили в наркоз (нейролептаналгезия: 0,005% раствор фентанила + 0,25% раствор дроперидола в соотношении 2:1, внутримышечно по 0,2 мл на 100 г массы тела). После окончания периода наблюдения за крысами их умерщвление выполняли с помощью общепринятых методов эвтаназии (*aether pro narcosi*) с соблюдением гуманных методов обращения с лабораторными животными.

Выполнение исследования одобрено Комитетом по этике РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова (выписка из протокола от 25.02.2022 г. № 180).

Фото- и радиосенсибилизатор

В качестве лекарственного средства использовали инъекционную форму ФС на основе хлорина еб фотолон (РУП «Белмедпрепараты», г. Минск, Республика Беларусь, регистрационный номер 16/11/886 от 08.11.2016 г., 100 мг). Перед использованием поро-

шок ФС разводили 0,9% раствором хлорида натрия и вводили однократно путем внутривенной инфузии в хвостовую вену крысы в условиях затемненного помещения в дозе 2,5 мг/кг массы тела.

Радиодинамическая терапия

Облучение перевивных опухолей осуществляли контактным методом (контактная лучевая терапия, (КЛТ)) на аппарате «microSelectron-HDR V3 Digital» (Elekta, Швеция) с использованием γ -излучения (^{192}Ir). Источник имел высокую активность, составившую 5,2 Ci на момент начала экспериментов. Это обусловило необходимые для крыс, находящихся в состоянии медикаментозного сна, высокую мощность дозы и короткую продолжительность сеансов облучения. Для проведения КЛТ на область перевивной опухоли использовался аппликатор Leipzig, фиксировавшийся на поверхности опухоли с помощью мягких резиновых держалок. Облучение проводили однократно в разовой очаговой дозе (РОД) 6 Гр, что эквивалентно 10,8 Гр при $\alpha/\beta = 3$, через 2,5–3 ч после окончания инфузии. Расчет времени сеанса облучения проводили на системе планирования «Oncentra Brachy v4.5.2» (Elekta, Швеция) на пустой серии изображений с использованием алгоритма TG-43 без учета отражения и рассеивания излучения внутри аппликатора. Использовали методику КЛТ с нормализацией на точку, расположенную на расстоянии 5 мм от терапевтической поверхности аппликатора, в соответствии с размером мишени и рекомендациями GEC-ESTRO ACROP и другими. Используемая методика облучения позволила подвести запланированные РОД на мишень без переоблучения нормальных тканей.

Фотодинамическая терапия

Сеансы ФДТ осуществляли однократно непосредственно после воздействия ионизирующим излучением (КЛТ) с помощью полупроводникового лазера «PDT diode laser» (ООО «Imaf Axicon», г. Минск, Республика Беларусь) с длиной волны излучения 660 ± 5 нм. Облучение перевивных опухолей начинали через 2,5–3 ч после окончания инфузии ФС со световой дозой 100 Дж/см², плотностью мощности 0,2 Вт/см² и мощностью 0,353 Вт. Продолжительность воздействия составила 8 мин.

Дизайн экспериментального исследования

Все воздействия производили на 6-е сутки после перевивки ЛСП по достижению диаметра опухолевого узла не менее 3–5 мм. Все животные, 26 крыс-самцов включенных в исследование, были случайным образом распределены на 4 группы по 6–7 особей в каждой. В качестве интактного контроля (ИК) выступали крысы с перевивными опухолями, которым не вводили ФС и не осуществляли никакого облучения (табл. 1).

Таблица 1

Дизайн экспериментального исследования

Table 1

Experimental study design

Наименование группы Study groups	Число крыс в группе, n Number of rats in the group, n
ИК Intact control	6
ФС 2,5 мг/кг + КЛТ РОД 6 Гр PS 2.5 mg/kg + CRT SFD 6 Gy	7
ФС 2,5 мг/кг + ФДТ 100 Дж/см ² 0,2 Вт/см ² PS 2.5 mg/kg + PDT 100 J/cm ² 0.2 W/cm ²	6
ФС 2,5 мг/кг + КЛТ РОД 6 Гр + ФДТ 100 Дж/см ² 0,2 Вт/см ² PS 2.5 mg/kg + CRT SFD 6 Gy + PDT 100 J/cm ² 0.2 W/cm ²	7

* ФС – фотосенсибилизатор; КЛТ – контактная лучевая терапия;
РОД – разовая очаговая доза; ФДТ – фотодинамическая терапия.
* PS – photosensitizer; CRT – contact radiotherapy; SFD – single focal
dose; PDT – photodynamic therapy.

Критерии оценки противоопухолевой эффективности

Оценку противоопухолевой эффективности воздействий осуществляли по общепринятым в экспериментальной онкологии показателям, характеризующим динамику изменения среднего объема опухолей (V_{cp} , см³), по изменению коэффициента абсолютного прироста опухоли (K) и показателю торможения роста опухоли (ТРО, %). Динамику роста перевивных опухолей регистрировали, начиная с 6-х сут. после перевивки опухолевого штамма ЛСП в течение 2 нед с интервалом 2–3 сут.

Объем опухолей вычисляли по формуле Шрека (1):

$$V = \frac{1}{6} \pi \times d_1 \times d_2 \times d_3$$

где:

$d_{1,2,3}$ – три взаимно перпендикулярных диаметра опухоли (в см);

$\pi/6 = 0,52$ – постоянная величина;

V – объем опухоли (в см³).

Коэффициент абсолютного прироста опухоли (K) рассчитывали по формуле (2):

$$K = \frac{V_t - V_0}{V_0}$$

где:

V_0 – исходный объем опухоли (до начала воздействий);

V_t – объем опухоли на определенный срок наблюдения.

Значение показателя $K > 0$ (V на соответствующем сроке наблюдения превышал его исходное значение) расценивали как продолженный рост опухоли; $-1 < K < 0$ (V на соответствующем сроке наблюдения был меньше его исходного значения) как торможение

роста опухоли; $K = -1$ как полную регрессию опухоли.

Коэффициент торможения роста опухоли (ТРО) рассчитывали по формуле (3):

$$TPO\% = \frac{V_{контроля} - V_{опыта}}{V_{контроля}} \times 100$$

где:

$V_{контроль}$ – средний объем опухоли в контрольной группе (в см³);

$V_{опыт}$ – средний объем опухоли в основной группе (в см³).

Минимально значимым критерием, демонстрирующим эффективность лечения перевивных опухолей, считали $TPO > 50\%$.

Частоту полных опухолевых регрессий (ПР) оценивали через 60 сут. после окончания воздействий по отсутствию визуальных и пальпаторных признаков опухолевого роста.

Долю излеченных крыс в группах определяли через 90 сут. после окончания воздействий по отсутствию визуальных и пальпаторных признаков опухолевого роста.

Количественные критерии оценки ингибирующего эффекта на перевивных опухолях у крыс были следующими (табл. 2) [11].

Оценку противоопухолевого эффекта по увеличению продолжительности жизни проводили по окончании эксперимента и гибели всех крыс. Определяли среднюю продолжительность жизни (СПЖ, сут) в группах и вычисляли показатели увеличения продолжительности жизни (УПЖ, %) по формуле (4):

$$УПЖ\% = \frac{СПЖ_{опыта} - СПЖ_{контроля}}{СПЖ_{контроля}} \times 100$$

где:

УПЖ – показатель увеличения продолжительности жизни павших крыс (%);

СПЖ опыта – средняя продолжительность жизни павших крыс в опытных группах (сут);

СПЖ контроля – средняя продолжительность жизни павших крыс в контрольной группе (сут).

Статистическая обработка полученных данных

Статистическую обработку результатов (V_{cp} , K и ТРО) проводили с помощью пакетов прикладных программ Excel, Origin Pro (версия 7.0) и Statistica (версия 10.0). Данные представлены как $M \pm m$ (среднее значение $\pm$ ошибка среднего значения). Для оценки достоверности различий использовали U критерий Манна-Уитни. Общую выживаемость оценивали с использованием непараметрического метода Каплана-Майера. За точку 0 принимали дату перевивки опухоли, событием считали гибель крысы, окончанием наблюдения – гибель всех крыс в опытной группе. Сравнительный анализ данных проводили с помощью непараметри-

Таблица 2

Критерии оценки противоопухолевой эффективности по коэффициенту торможения роста опухоли и частоте полных регрессий

Table 2

Criteria for evaluating antitumor efficacy in terms of the coefficient of tumor growth inhibition and the frequency of complete regressions

Критерии противоопухолевой эффективности Criteria of antitumor efficacy	Значения эффективности Values efficiency
TPO < 20% TGI < 20%	0
TPO < 20–50% TGI < 20–50%	±
TPO < 51–80% TGI < 51–80%	+
TPO < 81–90% TGI < 81–90%	++
TPO < 91–100% + < 50% ПР TGI < 91–100% + CR < 50%	+++
TPO > 91–100% + > 50% ПР TGI > 91–100% + CR > 50%	++++

* ТРО – коэффициент торможения роста опухоли; ПР – полная регрессия.

* TGI – tumor growth inhibition; CR – complete regression.

ческого лог–ранк теста. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Прививаемость опухолевого штамма составила 100% (все 26 крыс на момент начала терапевтических воздействий, то есть на 6-е сут после перевивки, имели визуальные и пальпаторные признаки опухолевого роста).

Побочных реакций и осложнений, связанных с внутривенным введением ФС, проведением сеансов ФДТ и КЛТ, зарегистрировано не было.

В эксперименте оценивали противоопухолевую эффективность метода комбинированной терапии перевивных опухолей, включающего системное (внутривенное) введение ФС на основе хлорина еб с последующим однократным воздействием ионизирующим излучением в РОД 6 Гр и лазерным излучением со световой дозой 100 Дж/см² с плотностью мощности 0,2 Вт/см² в сравнении с каждым из компонентов метода (ФС + КЛТ, ФС + ФДТ) и ИК.

Как видно из табл. 3, в течение всего срока оценки показателей, характеризующих изменение динамики роста перевивных опухолей, отмечено его статистически значимое торможение как в группе комбинированной терапии, так и в группах с терапией в монорежиме (ФС + ФДТ и ФС + КЛТ), по сравнению с группой ИК ($p < 0,05$).

На 18-е сутки эксперимента $V_{ср.}$ в группе комбинированной терапии был статистически значимо меньше по сравнению с группами ИК (в 5,38 раза ;

$p = 0,00001$) и ФС + ФДТ (в 2,47 раза; $p = 0,025$) и имел тенденцию к уменьшению по сравнению с группой ФС + КЛТ (в 1,89 раза; $p = 0,15$).

Противоопухолевая эффективность воздействий по полуколичественной шкале оценки [11] представлена в табл. 4.

Показатели выживаемости крыс (табл. 5) свидетельствуют о высокой противоопухолевой эффективности разработанного метода комбинированной терапии: достигнуто статистически значимое УПЖ по сравнению с ИК и отмечена тенденция к оптимизации исследуемых показателей по сравнению с каждым из компонентов метода ($p = 0,12$ в группе ФС + ФДТ; $p = 0,24$ в группе ФС + КЛТ).

Таким образом, разработанный метод комбинированной терапии, включающий внутривенное введение ФС на основе хлорина еб в дозе 2,5 мг/кг массы тела с последующим через 2,5–3 ч однократным сеансом КЛТ в РОД 6 Гр и ФДТ со световой дозой 100 Дж/см² и плотностью мощности 0,2 Вт/см², продемонстрировал высокую противоопухолевую эффективность. На 18-е сут после сеанса лечения животных коэффициент К составил 979,00 ОЕ; величина ТРО по сравнению с ИК – 81,41%. На 60-е и 90-е сут частоты ПР и излеченности составили 28,6% и 28,6%, показатели СПЖ и УПЖ – $34,60 \pm 3,75$ сут и 97,71%, соответственно. Эффективность воздействия по полуколичественной шкале оценки составила «+++».

Обсуждение

Как было отмечено, в последние годы активно изучается возможность использования таких физических факторов как ультразвук, гипертермия, электрические поля и некоторые другие в качестве триггерных механизмов активации молекулы ФС в патологически измененных клетках и тканях [6–8]. Одним из наиболее актуальных направлений научных исследований в экспериментальной и клинической онкологии является РДТ – метод лечения ЗНО, основанный на комбинированном применении ФС, их производных и ионизирующего излучения с определенными параметрами. ФС, традиционно используемые для ФДТ, могут обладать радиосенсибилизирующими свойствами и в этом случае рассматриваться как радиосенсибилизирующие агенты, повышающую противоопухолевую эффективность ЛТ. Известно, что физиология опухолей характеризуется незначительным напряжением кислорода (гипоксия, аноксия), низким уровнем глюкозы и высоким содержанием лактата, интерстициальной гипертензией и внеклеточным ацидозом. Сосудистая сеть опухоли отличается выраженной пролиферацией эндотелиоцитов, что приводит к развитию дефектов структуры и функциональной несостоятельности микрокапилляров, в результате чего внутриопухолевый кровоток становится хаотичным

с наличием зон недостаточной васкуляризации. Гипоксические опухолевые клетки обладают повышенной устойчивостью к воздействию ионизирующего излучения и требуют использования высоких доз радиации, нивелирующих данный эффект, что может приводить к развитию лучевых реакций и повреждений окружающих опухоль нормальных тканей. Ключом к профилактике данной ситуации является применение радиосенсибилизаторов, модифицирующих противоопухолевую эффективность ЛТ (в частности, ФС), либо комбинации ЛТ с другими терапевтическими опциями (например, ФДТ) с использованием сниженных доз излучения [8, 9, 10, 12].

При интерпретации основных механизмов, лежащих в основе повреждения опухолевой клетки при

комбинированном применении ФС и ионизирующего излучения, авторы приходят к выводу, что ключевым звеном в реализации противоопухолевого эффекта РДТ является свободно-радикальное окисление, развивающееся вследствие воздействия излучения на находящуюся в клетке воду с последующим переводом молекулы ФС из основного состояния в возбужденное и образованием значительного количества свободных радикалов (активные формы кислорода – АФК) [13, 14]. Поглощая излучение, молекула ФС вступает в каскад реакций, что приводит к образованию в клетке гидроксильного радикала, супероксида аниона и синглетного кислорода, которые аккумулируются также вследствие лучевого радиолиза воды. В дальнейшем на уровне физико-химических процес-

Таблица 3

Данные о динамике роста перевивных опухолей в эксперименте на крысах с ЛСП

Table 3

Data on the growth dynamics of transplanted tumors in an experiment on rats with LSP

Наименование группы Groups	Сутки после перевивки Days after tumors transplantation					
	ИССЛЕДУЕМЫЕ КРИТЕРИИ: Средний объем, в см ³ (M±m) Коэффициент абсолютного прироста опухолей (K), в ОЕ Коэффициент торможения роста опухолей (TRO), в % Уровень значимости различий по отношению к интактному контролю RESEARCH CRITERIA: Vav., cm3 (M±m) Coefficient of absolute tumor growth (K), relative units (RU) Coefficient of tumor growth inhibition (TGI), % P vs. intact control					
	6	9	11	13	15	18
ИК IC	0,014±0,001	1,23±0,19	10,29±0,71	19,85±0,65	47,19±0,74	63,25±2,76
	–	86,86	734,00	1416,86	3369,71	4516,86
	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–
ФС + КЛТ PS + CRT	0,011±0,002	0,33±0,13	1,46±0,51	3,88±1,15	15,92±4,58	22,18±5,94
	–	29,00	131,73	351,73	1446,27	2024,45
	–	73,17	85,81	80,45	66,26	64,93
	>0,05	0,0018	0,00000	0,00000	0,00001	0,00002
ФС + ФДТ PS + PDT	0,011±0,002	0,62±0,20	3,02±0,62	7,76±2,01	22,69±5,43	29,03±6,06
	–	55,36	273,55	704,45	2061,73	2638,09
	–	49,59	70,65	60,91	51,92	54,10
	>0,05	0,046	0,000002	0,00007	0,0005	0,0002
ФС + КЛТ + ФДТ PS + CRT + PDT	0,012±0,001	0,17±0,03	1,15±0,46	3,88±1,13	11,14±3,42	11,76±3,29
	–	13,17	94,83	322,33	927,33	979,00
	–	86,18	88,82	80,45	76,39	81,41
	>0,05	0,00008	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000

* ФС – фотосенсибилизатор; КЛТ – контактная лучевая терапия; ИК – интактный контроль; ФДТ – фотодинамическая терапия.

* PS – photosensitizer; CRT – contact radiotherapy; IC – intact control; PDT – photodynamic therapy.

сов возникают летальные повреждения клеточных компонентов: цитоплазматических мембран, гранулярной эндоплазматической сети, митохондрий, ДНК и других. Обладая высоким окислительным потенциалом, АФК взаимодействуют с липидами мембран органелл опухолевой клетки с образованием продуктов окисления, дестабилизацией и последующим разрушением клетки в целом. Следствием вышеуказанных реакций на осуществленное комбинированное воздействие является окислительный стресс-синдром, индуцирующий апоптоз [15].

В доступных литературных источниках встречаются немногочисленные публикации, посвященные изучению радиодинамической активности ФС на основе протопорфирина IX, гематопорфирина и его производных в экспериментах *in vitro/in vivo*: глиомы с6 и U-373 MG, глиосаркома 9L; плоскоклеточная карци-

нома пищевода человека OE-21, аденокарцинома пищевода человека OE-33; карцинома мочевого пузыря человека RT4 и аденокарцинома толстого кишечника HT-29 [13, 14, 16–18]. Авторы сообщают о статистически значимом сокращении числа жизнеспособных опухолевых клеток и торможении роста перевивных опухолей в группах комбинированной терапии по сравнению с ЛТ в монорежиме.

Panetta J.V. и соавт. из Fox Chase Cancer Center (США) представили результаты применения РДТ с протопорфирином IX у мышей с ортотопической моделью карциномы предстательной железы человека PC 3. 5-АЛК, вызывающую образование эндогенного ФС протопорфирина IX, вводили перорально в дозе 100 мг/кг массы тела за 4 ч до начала облучения области подкожно перевитых опухолей. Облучение осуществляли в РОД 4 Гр однократно. Через 7 и 14 сут

Таблица 4

Критерии оценки противоопухолевой эффективности по коэффициенту торможения роста опухоли и частоте полных регрессий

Table 4

Criteria for evaluating antitumor efficacy in terms of the coefficient of tumor growth inhibition and the frequency of complete regressions

Наименование группы Groups	Критерии оценки эффективности противоопухолевой терапии Antitumor efficacy criteria		
	Показатель торможения роста опухолей (ТРО, %) Tumor growth inhibition coefficient TGI, %	Частота полных регрессий, % Frequency of complete regressions, %	Эффективность Efficacy
ИК IC	–	0,0	0
ФС + ФДТ PS + PDT	54,10	16,7	+++
ФС + КЛТ PS + CRT	64,93	14,3	+++
ФС + КЛТ + ФДТ PS + CRT + PDT	81,41	28,6	+++

* ФС – фотосенсибилизатор; КЛТ – контактная лучевая терапия; ИК – интактный контроль; ФДТ – фотодинамическая терапия.

* PS – photosensitizer; CRT – contact radiotherapy; IC – intact control; PDT – photodynamic therapy.

Таблица 5

Показатели выживаемости крыс после противоопухолевого лечения

Table 5

Rat survival rates after antitumor treatment

Наименование группы Groups	Критерии оценки эффективности Criteria for evaluating effectiveness		
	Средняя продолжительность жизни, сут Average life expectancy, days	Увеличение средней продолжительности жизни, % Increase in average life expectancy, %	p относительно ИК p vs. IC
ИК IC	17,50±2,16	–	–
ФС + ФДТ PS + PDT	26,00±3,48	48,57	0,058
ФС + КЛТ PS + CRT	28,00±3,86	60,00	0,034
ФС + КЛТ + ФДТ PS + CRT + PDT	34,60±3,75	97,71	0,0017

* ФС – фотосенсибилизатор; КЛТ – контактная лучевая терапия; ИК – интактный контроль; ФДТ – фотодинамическая терапия.

* PS – photosensitizer; CRT – contact radiotherapy; IC – intact control; PDT – photodynamic therapy.

от момента начала терапевтических воздействий по сравнению с группой ЛТ в монорежиме в группе РДТ средний объем опухолей был на $24 \pm 9\%$ и $21 \pm 8\%$ меньше, соответственно ($p < 0,05$) [19].

В более позднем исследовании D.M. Yang и соавт. (Fox Chase Cancer Center, США) доказали наличие радиосенсибилизирующих свойств у протопорфирина IX в эксперименте на линейных мышах C57BL/6 с перевитой подкожно опухолью мелкоклеточного рака легкого KP1. 5-АЛК вводили перорально в дозе 100 мг/кг массы тела за 4 ч до начала облучения подкожно перевитых опухолей, которое осуществляли однократно в РОД 4 Гр. Через 14 сут от момента начала лечения в группе РДТ было зарегистрировано торможение роста перевитых опухолей на 52,1%, 48,1% и 57,9% по сравнению с группой 5-АЛК ($p < 0,001$), ЛТ в монорежиме ($p < 0,001$) и ИК ($p < 0,001$), соответственно [20].

В исследовании Takahashi J. и соавт. (Health and Medical Research Institute, Япония) представлены результаты применения РДТ с протопорфирином IX глиобластом человека U251MG и U87MG у мышей BALB/c-nu/nu. 5-АЛК вводили перорально в дозах 60 и 120 мг/кг за 4 ч до начала облучения подкожно перевитых опухолей, которое проводили в РОД 2 Гр 5 раз в нед в течение 6 нед до достижения СОД 60 Гр. Авторы сообщают, что предложенная методика облучения оказывала выраженное угнетающее действие на рост обеих моделей перевитых опухолей в течение всего срока наблюдения (42 и 70 сут, соответственно), вызывая в опухолевой ткани развитие необратимых повреждений, зарегистрированных на основании морфологического исследования [12].

В экспериментах *in vivo* Y. Matsuyama и соавт. (Mie University Graduate School of Medicine, Япония) изучили влияние ионизирующего излучения на противоопухолевые свойства ФС акридин оранжевый (АО). В качестве объектов исследований авторы использовали линейных мышей C3H/HeSlc и BALB/cSlc-nu/nu с перевитыми опухолями следующих штаммов: остеосаркома мышей LM8, рак предстательной железы человека PC 3, рак молочной железы человека MDA-MB-231. АО вводили подкожно по периметру опухолей в дозе 1 мкг/мл. Облучение производили однократно в РОД 5 Гр. РДТ с АО продемонстрировала выраженный цитостатический эффект в отношении всех видов опухолей. Так, на 14-е сут после начала терапевтических воздействий средний объем опухолей LM8 в контрольной группе составил 890 мм^3 , АО – 780 мм^3 , ЛТ РОД 5 Гр – 120 мм^3 и АО + ЛТ РОД 5 Гр – 42 мм^3 ($p < 0,05$); для MDA-MB-231 – 1060 , 620 , 1010 и 29 мм^3 ($p < 0,05$), для PC 3 – 530 , 200 , 45 и 14 мм^3 ($p < 0,05$), соответственно [21].

И, наконец, С. Dupin и соавт. (Bordeaux Institute of oncology, Франция) представили опыт применения метода РДТ в эксперименте на иммунодефицитных

мышах RAGγ2C–/– с ортотопической моделью глиобластомы человека P3. В качестве фотосенсибилизирующего агента использовали 5-АЛК, которую вводили интраперитонеально в дозе 100 мг/кг массы тела. Облучение перевитых опухолей осуществляли 3 раза в неделю в следующих режимах: 3×2 Гр, 5×2 Гр и 5×3 Гр; 2,55 Гр/мин. На основании анализа полученных результатов по критерию выживаемости оптимальным воздействием было фракционированное облучение в режиме 5×3 Гр 3 раза в неделю (73–83 сут) vs. контроль (без воздействий) (15–24 сут), ЛТ 3×2 Гр (41–47 сут) и ЛТ 5×3 Гр (48–62 сут) ($p < 0,05$). В сравнительном аспекте отмечена тенденция к оптимизации показателей выживаемости в группе 5-АЛК + ЛТ 5×2 Гр (53–67 сут) к группе ЛТ 5×2 Гр ($p = 0,24$) [22].

Начаты несколько клинических испытаний на больших выборках пациентов с целью оценки безопасности и переносимости РДТ. Клиническое испытание «A Phase I Dose Finding Study Of Low-dose Radiation With Sensitization Using 5-aminolevulinic Acid In Advanced Malignancies», в основе которого лежит определение оптимальных доз ЛТ и ФС у пациентов с различными нозологическими формами ЗНО (солидные опухоли головы и шеи, грудной и брюшной полости, малого таза) начато Fox Chase Cancer Center (США) в июле 2020 г. В исследование планируется включение 130 пациентов. В качестве ФС используется 5-АЛК в 3 дозах. Облучение осуществляется фракционированно, курс терапии проводится однократно и составляет 21 день. В дальнейшем пациенты находятся под динамическим наблюдением в течение 56 сут с целью оценки частоты и степени выраженности нежелательных реакций, а также анализа предварительных данных о противоопухолевой эффективности метода [23].

Клиническое испытание «Phase I/II Dose Escalation Trial of Radiodynamic Therapy (RDT) With 5-Aminolevulinic Acid in Patients With First Recurrence of Glioblastoma» под руководством профессора Stummer W. (University Hospital Münster, Germany) начато в октябре 2022 г. Цель исследования – определение максимально переносимых доз ФС и ЛТ, оптимального числа сеансов РДТ. В исследование планируется включить 34 пациента с рецидивной формой глиобластомы (первый рецидив после комбинированного или комплексного лечения). В качестве ФС используется 5-АЛК. Облучение будет проводиться фракционированно. В качестве критериев противоопухолевой эффективности будут изучены показатели выживаемости пациентов (общая 6-месячная выживаемость, 6-месячная выживаемость без прогрессирования и другие) [24].

Анализ доступных литературных источников свидетельствуют о значительных перспективах данного направления в экспериментальной онкологии. Полученные в экспериментах *in vitro/in vivo* резуль-

таты позволяют сделать вывод о наличии у ряда ФС радиосенсибилизирующих свойств, что создает предпосылки для оптимизации и дальнейшего совершенствования комбинированной и комплексной терапии пациентов с ЗНО различных локализаций.

Заключение

ФДТ является методом терапии предопухолевых заболеваний и ЗНО, демонстрирующим высокую противоопухолевую эффективность в экспериментальной и клинической онкологии [25–27]. Тем не менее, с целью оптимизации применения ФДТ целесообразно ее комбинированное или сочетанное использование с рядом других методов терапии. Пилотные данные, полученные на основании анализа непосредственных и отдаленных результатов экспериментального исследования на моделях перевивных опухолей

у крыс, свидетельствуют о выраженной тенденции к более высокому противоопухолевому эффекту комбинированного лечения, включающего применение ФС с последующим проведением сеансов РДТ и ФДТ при однократном режиме облучения по сравнению с РДТ и ФДТ в монорежимах. Публикаций, посвященных изучению эффективности комбинированного применения ФС хлоринового ряда и указанных методов терапии, демонстрирующих положительные результаты, в доступных источниках литературы не представлено, что позволяет сделать вывод о необходимости и перспективности развития более глубоких исследований в данном направлении.

Работа выполнена при финансовой поддержке Национальной академии наук Беларуси (грант № 2021-61-284, задание 3.05.3).

ЛИТЕРАТУРА

1. Yanovsky R.L., Bartenstein D.W., Rogers G.S., Isakoff S.J., Chenet S.T. Photodynamic therapy for solid tumors: A review of the literature // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* – 2019. – Vol. 35. – P. 295–303. doi: 10.1111/phpp.12489.
2. Gunaydin G., Gedik M.E., Ayan S. Photodynamic therapy for the treatment and diagnosis of cancer – a review of the current clinical status // *Front. Chem.* 2021. – Vol. 9. – P. e686303. doi:10.3389/fchem.2021.686303.
3. Castano A.P., Mroz P., Hamblin M.R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity // *Nature Reviews Cancer.* – 2006. – Vol. 6(7). – P. 535–545. doi: 10.1038/nrc1894.
4. 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. Photodynamic therapy of cancer: an update // *CA-A Cancer J. Clin.* – 2011. – Vol. 61(4). – P. 250–281. doi: 10.3322/caac.20114.
5. Correia J.H., Rodrigues J.A., Pimenta S., Dong T., Yang Z. Photodynamic therapy review: principles, photosensitizers, applications, and future directions // *Pharmaceutics.* – 2021. – Vol. 13. – P. e1332. doi:10.3390/pharmaceutics13091332.
6. Yang M., Yang T., Mao C. Enhancement of photodynamic cancer therapy by physical and chemical factors // *Angew Chem Int Ed Engl.* – 2019. – Vol. 58(40). – P. 14066–14080. doi:10.1002/anie.201814098.
7. Hu H., Feng W., Qian X., Yu L., Chen Y., Li Y. Emerging nanomedicine-enabled/enhanced nanodynamic therapies beyond traditional photodynamics. // *Adv. Mater.* – 2021. – Vol. 33(12). – P. e2005062. doi: 10.1002/adma.202005062.
8. Rodrigues J.A., Correia J.H. Enhanced photodynamic therapy: a review of combined energy sources // *Cells.* – 2022. – Vol. 11(24). – P. 3995. doi: 10.3390/cells11243995.
9. Larue L., Mihoub A.B., Youssef Z., Colombeau L., Acherar S., André J.C., Arnoux P., Baros F., Vermandel M., Frochot C. Using X-rays in photodynamic therapy: an overview // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2018. – Vol. 17(11). – P. 1612–1650. doi: 10.1039/c8pp00112j.
10. He L., Yu X., Li W. Recent progress and trends in X-ray-induced photodynamic therapy with low radiation doses // *ACS Nano.* – 2022. – Vol. 16(12). – P. 19691–19721. doi: 10.1021/acsnano.2c07286.
11. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. чл.-корр. РАН проф. Р. У. Хабриева. – 2 изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина». – 2005. – С. 647–649.
12. Takahashi J., Nagasawa S., Doi M., Takahashi M., Narita Y., Yamamoto J., Ikemoto M.J., Iwahashi H. In vivo study of the efficacy and

REFERENCES

1. Yanovsky R.L., Bartenstein D.W., Rogers G.S., Isakoff S.J., Chenet S.T. Photodynamic therapy for solid tumors: A review of the literature. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 2019, vol. 35, pp. 295–303. doi: 10.1111/phpp.12489.
2. Gunaydin G., Gedik M.E., Ayan S. Photodynamic therapy for the treatment and diagnosis of cancer – a review of the current clinical status. *Front. Chem.* 2021, vol. 9, pp. e686303. doi:10.3389/fchem.2021.686303.
3. Castano A.P., Mroz P., Hamblin M.R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Reviews Cancer*, 2006, vol. 6(7), pp. 535–545. doi: 10.1038/nrc1894.
4. 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. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA-A Cancer J. Clin.* 2011, vol. 61(4), pp. 250–281. doi: 10.3322/caac.20114.
5. Correia J.H., Rodrigues J.A., Pimenta S., Dong T., Yang Z. Photodynamic therapy review: principles, photosensitizers, applications, and future directions. *Pharmaceutics*, 2021, vol. 13, p. e1332. doi:10.3390/pharmaceutics13091332.
6. Yang M., Yang T., Mao C. Enhancement of photodynamic cancer therapy by physical and chemical factors. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, vol. 58(40), pp. 14066–14080. doi:10.1002/anie.201814098.
7. Hu H., Feng W., Qian X., Yu L., Chen Y., Li Y. Emerging nanomedicine-enabled/enhanced nanodynamic therapies beyond traditional photodynamics. *Adv. Mater.* 2021, vol. 33(12), p. e2005062. doi: 10.1002/adma.202005062.
8. Rodrigues J.A., Correia J.H. Enhanced photodynamic therapy: a review of combined energy sources. *Cells*, 2022, vol. 11(24), p. 3995. doi: 10.3390/cells11243995.
9. Larue L., Mihoub A.B., Youssef Z., Colombeau L., Acherar S., André J.C., Arnoux P., Baros F., Vermandel M., Frochot C. Using X-rays in photodynamic therapy: an overview. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2018, vol. 17(11), pp. 1612–1650. doi: 10.1039/c8pp00112j.
10. He L., Yu X., Li W. Recent progress and trends in X-ray-induced photodynamic therapy with low radiation doses. *ACS Nano*, 2022, vol. 16(12), pp. 19691–19721. doi: 10.1021/acsnano.2c07286.
11. Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances / under the general editorship of the corresponding member of the Russian Academy of Medical Sciences prof. R. U. Khabrieva. – 2nd ed., reprint. and additional – M.: JSC "Publishing House «Medicine», 2005, pp. 647–649.
12. Takahashi J., Nagasawa S., Doi M., Takahashi M., Narita Y., Yamamoto J., Ikemoto M.J., Iwahashi H. In vivo study of the efficacy and

- safety of 5-aminolevulinic radiodynamic therapy for glioblastoma fractionated radiotherapy // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – P. 1-15. doi:10.3390/ijms22189762.
13. Kulka U., Schaffer M., Siefert A. Photofrin as a radiosensitizer in an in vitro cell survival assay // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – Vol. 311(1). – P. 98-103. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.09.170.
14. Schaffer M., Kulka U., Ertl-Wagner B., Schaffer P.M., Friso E., Hell R., Jori G., Hofstetter A., Dühmke E. Effect of Photofrin II as a radiosensitizing agent in two different oesophageal carcinoma cell lines // *J. Porphyrins Phthalocyanines*. – 2005. – Vol. 9. – P. 470-475. doi:10.1142/S1088424605000587.
15. Benayoun L., Schaffer M., Bril R., Gingis-Velitski S., Segal E., Nevelsky A., Satchi-Fainaro R., Shaked Y. Porfimer-sodium (Photofrin II) in combination with ionizing radiation inhibits tumor-initiating cell proliferation and improves glioblastoma treatment efficacy // *Cancer Biol. Ther.* – 2013. – Vol. 14(1). – P. 64-74. doi: 10.4161/cbt.22630.
16. Schaffer M., Schaffer P.M., Corti L., Gardiman M., Sotti G., Hofstetter A., Jori G., Dühmke E. Photofrin as a specific radiosensitizing agent for tumors: studies in comparison to other porphyrins, in an experimental in vivo model // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* – 2002. – Vol. 66. – P. 157-164. doi: 10.1016/s1011-1344(02)00237-3.
17. Rutkovskienė L., Plėšnienė L., Sendiulienė D., Stančius A., Liutkevičiūtė-Navickienė J. Sensitization of rat C6 glioma cells to ionizing radiation by porphyrins // *Acta Medica Lituan.* – 2011. – Vol. 18(2). – P. 56-62. doi:10.6001/actamedica.v18i2.1816.
18. Yamamoto J., Ogura S.I., Tanaka T., Kitagawa T., Nakano Y., Saito T., Takahashi M., Akiba D., Nishizawa S. Radiosensitizing effect of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in glioma cells in vitro // *Oncology Rep.* – 2012. – Vol. 27. – P. 1748-1752. doi: 10.3892/or.2012.1699.
19. Panetta J.V., Cvetkovic D., Chen X., Chen L., Charlie Ma C.M. Radiodynamic therapy using 15-MV radiation combined with 5-aminolevulinic acid and carbamide peroxide for prostate cancer in vivo // *Phys. Med. Biol.* – 2020. – Vol. 65(16). – P. 1-14. doi:10.1088/1361-6560/ab9776.
20. Yang D.M., Cvetkovic D., Chen L., Charlie Ma C.M. Therapeutic effects of in-vivo radiodynamic therapy (RDT) for lung cancer treatment: a combination of 15MV photons and 5-aminolevulinic acid (5-ALA) // *Biomed. Phys. Eng. Express*. – 2022. – Vol. 8(6). – P. 1-15. doi: 10.1088/2057-1976/ac9b5c.
21. Matsuyama Y., Nakamura T., Yoshida K., Hagi T., Iino T., Asanuma K., Sudo A. Radiodynamic therapy with acridine orange local administration as a new treatment option for primary and secondary bone tumours // *Bone Joint Res.* – 2022. – Vol. 11(10). – P. 715-722. doi: 10.1302/2046-3758.1110.BJR-2022-0105.R2.
22. Dupin C., Sutter J., Amintas S., Derieppe M.A., Lalanne M., Coulibaly S., Guyon J., Daubon T., Boutin J., Blouin J.M., Richard E., Moreau-Gaudry F., Bedel A., Vendrely V., Dabernat S. An orthotopic model of glioblastoma is resistant to radiodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid // *Cancers (Basel)*. – 2022. – Vol. 14(17). – P. 4244. doi: 10.3390/cancers14174244.
23. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04381806.
24. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT05590689.
25. Filonenko E.V., Ivanova-Radkevich V.I. Photodynamic therapy in the treatment of extramammary Paget disease // *Biomedical Photonics*. – 2022. – Vol. 11(3). – P. 24-34. doi: 10.24931/2413-9432-2022-11-3-24-34
26. Gilyadova A.V., Romanko Yu.S., Ishchenko A.A., Samoilova S.V., Shiryayev A.A., Alekseeva P.M., Efendiev K.T., Reshetov I.V. Photodynamic therapy for precancer diseases and cervical cancer (review of literature) // *Biomedical Photonics*. – 2021. – Vol. 10(4). – P. 59-67. doi: 10.24931/2413-9432-2021-10-4-59-67
27. Filonenko E.V., Ivanova-Radkevich V.I. Photodynamic therapy in the treatment of patients with mycosis fungoides // *Biomedical Photonics*. – 2022. – Vol. 11(1). – P. 27-36. doi: 10.24931/2413-9432-2022-11-1-27-37
- safety of 5-aminolevulinic radiodynamic therapy for glioblastoma fractionated radiotherapy. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, pp. 1-15. doi:10.3390/ijms22189762.
13. Kulka U., Schaffer M., Siefert A. Photofrin as a radiosensitizer in an in vitro cell survival assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, vol. 311(1), pp. 98-103. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.09.170.
14. Schaffer M., Kulka U., Ertl-Wagner B., Schaffer P.M., Friso E., Hell R., Jori G., Hofstetter A., Dühmke E. Effect of Photofrin II as a radiosensitizing agent in two different oesophageal carcinoma cell lines. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2005, vol. 9, pp. 470-475. doi:10.1142/S1088424605000587.
15. Benayoun L., Schaffer M., Bril R., Gingis-Velitski S., Segal E., Nevelsky A., Satchi-Fainaro R., Shaked Y. Porfimer-sodium (Photofrin II) in combination with ionizing radiation inhibits tumor-initiating cell proliferation and improves glioblastoma treatment efficacy. *Cancer Biol. Ther.*, 2013, vol. 14(1), pp. 64-74. doi: 10.4161/cbt.22630.
16. Schaffer M., Schaffer P.M., Corti L., Gardiman M., Sotti G., Hofstetter A., Jori G., Dühmke E. Photofrin as a specific radiosensitizing agent for tumors: studies in comparison to other porphyrins, in an experimental in vivo model. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 2002, vol. 66, pp. 157-164. doi: 10.1016/s1011-1344(02)00237-3.
17. Rutkovskienė L., Plėšnienė L., Sendiulienė D., Stančius A., Liutkevičiūtė-Navickienė J. Sensitization of rat C6 glioma cells to ionizing radiation by porphyrins. *Acta Medica Lituan.*, 2011, vol. 18(2), pp. 56-62. doi:10.6001/actamedica.v18i2.1816.
18. Yamamoto J., Ogura S.I., Tanaka T., Kitagawa T., Nakano Y., Saito T., Takahashi M., Akiba D., Nishizawa S. Radiosensitizing effect of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in glioma cells in vitro. *Oncology Rep.*, 2012, vol. 27, pp. 1748-1752. doi: 10.3892/or.2012.1699.
19. Panetta J.V., Cvetkovic D., Chen X., Chen L., Charlie Ma C.M. Radiodynamic therapy using 15-MV radiation combined with 5-aminolevulinic acid and carbamide peroxide for prostate cancer in vivo. *Phys. Med. Biol.*, 2020, vol. 65(16), pp. 1-14. doi:10.1088/1361-6560/ab9776.
20. Yang D.M., Cvetkovic D., Chen L., Charlie Ma C.M. Therapeutic effects of in-vivo radiodynamic therapy (RDT) for lung cancer treatment: a combination of 15MV photons and 5-aminolevulinic acid (5-ALA). *Biomed. Phys. Eng. Express*, 2022, vol. 8(6), pp. 1-15. doi: 10.1088/2057-1976/ac9b5c.
21. Matsuyama Y., Nakamura T., Yoshida K., Hagi T., Iino T., Asanuma K., Sudo A. Radiodynamic therapy with acridine orange local administration as a new treatment option for primary and secondary bone tumours. *Bone Joint Res.*, 2022, vol. 11(10), pp. 715-722. doi: 10.1302/2046-3758.1110.BJR-2022-0105.R2.
22. Dupin C., Sutter J., Amintas S., Derieppe M.A., Lalanne M., Coulibaly S., Guyon J., Daubon T., Boutin J., Blouin J.M., Richard E., Moreau-Gaudry F., Bedel A., Vendrely V., Dabernat S. An orthotopic model of glioblastoma is resistant to radiodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid. *Cancers (Basel)*, 2022, vol. 14(17), p. 4244. doi: 10.3390/cancers14174244.
23. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04381806.
24. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT05590689.
25. Filonenko E.V., Ivanova-Radkevich V.I. Photodynamic therapy in the treatment of extramammary Paget disease. *Biomedical Photonics*, 2022, vol. 11(3), pp. 24-34. doi: 10.24931/2413-9432-2022-11-3-24-34
26. Gilyadova A.V., Romanko Yu.S., Ishchenko A.A., Samoilova S.V., Shiryayev A.A., Alekseeva P.M., Efendiev K.T., Reshetov I.V. Photodynamic therapy for precancer diseases and cervical cancer (review of literature). *Biomedical Photonics*, 2021, vol. 10(4), pp. 59-67. doi: 10.24931/2413-9432-2021-10-4-59-67
27. Filonenko E.V., Ivanova-Radkevich V.I. Photodynamic therapy in the treatment of patients with mycosis fungoides. *Biomedical Photonics*, 2022, vol. 11(1), pp. 27-36. doi: 10.24931/2413-9432-2022-11-1-27-37

СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ

Д.В. Поминова^{1,2}, А.В. Рябова^{1,2}, И.Д. Романишкин¹, И.В. Маркова², Е.В. Ахлюстина²,
А.С. Скобельцин^{1,2}

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

²Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, Россия

Резюме

Проведено спектроскопическое исследование фотофизических свойств метиленового синего (МС) в водных растворах и биологических жидкостях. Зарегистрированы спектры поглощения и флуоресценции, а также времена жизни флуоресценции. По зависимости интенсивности и формы спектров от концентрации удалось установить диапазоны концентраций МС для исследований *in vitro* и *in vivo* при которых не наблюдается агрегация (до 0,01 мМ, что соответствует 3,2 мг/кг).

Исследовано фотообесцвечивание МС под действием лазерного излучения. Исследования фотодеградаций в биологических средах показали, что фотообесцвечивание более чем на 80% в плазме и культуральной среде наблюдается уже при дозе 5 Дж/см², в то время как в воде при такой концентрации при дозе 5 Дж/см² фотообесцвечивания еще не наблюдается, а при дозе 50 Дж/см² фотообесцвечивание МС составляет порядка 30%. Установлено, что в средах, содержащих белки и обладающих щелочным pH, фотообесцвечивание происходит существенно быстрее, чем в нейтральных водных средах. Ионная сила раствора не оказывает влияния на скорость фотообесцвечивания. Такое фотообесцвечивание вызвано фотодеградацией МС, а не переходом в лейкоформу.

Проведена оценка эффективности генерации синглетного кислорода и фотодинамической активности *in vitro*. В исследуемом диапазоне концентраций МС эффективность генерации синглетного кислорода достаточно низкая, так как положительно заряженный МС связывается с негативно заряженными мембранами клеток, что приводит к изменению типа фотодинамической реакции. Продemonстрировано возникновение в клетках других активных форм кислорода (АФК), отличных от синглетного кислорода. Генерация АФК и невысокий квантовый выход генерации синглетного кислорода свидетельствуют о склонности МС к механизму фотосенсибилизации I типа (перенос электрона с образованием полувосстановленных и полуокисленных радикалов MB^{•+}), а не к механизму II типа (перенос энергии к кислороду с образованием синглетного кислорода) в биологических средах и *in vivo*.

Ключевые слова: метиленовый синий, спектроскопия, флуоресценция, поглощение, фотообесцвечивание, АФК, синглетный кислород.

Контакты: Поминова Д.В., e-mail: pominovadv@gmail.com

Для цитирования: Поминова Д.В., Рябова А.В., Романишкин И.Д., Маркова И.В., Ахлюстина Е.В., Скобельцин А.С. Спектроскопическое исследование фотофизических свойств метиленового синего в биологических средах // Biomedical Photonics. – 2023. – Т. 12, № 2. – С. 34–47. doi: 10.24931/2413–9432–2023–12–2–34–47.

SPECTROSCOPIC STUDY OF METHYLENE BLUE PHOTOPHYSICAL PROPERTIES IN BIOLOGICAL MEDIA

Pominova D.V.^{1,2}, Ryabova A.V.^{1,2}, Romanishkin I.D.¹, Markova I.V.², Akhlyustina E.V.²,
Skobeltsin A.S.^{1,2}

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

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

Abstract

A spectroscopic study of the photophysical properties of methylene blue (MB) in aqueous solutions was carried out. Absorption and fluorescence spectra as well as fluorescence lifetime were recorded. The concentration dependence of the intensity and shape of the spectra allowed establishing the ranges of MB concentrations for *in vitro* and *in vivo* studies at which aggregation is not observed (up to 0.01 mM, which corresponds to 3.2 mg/kg).

Studies of photodegradation in biological media showed that photobleaching of more than 80% in plasma and culture media is observed already at a dose of 5 J/cm², while in water at this concentration and dose photobleaching is not yet observed, and at a dose of 50 J/cm² photobleaching of MB is about 30%. It was found that in media containing proteins and having an alkaline pH, photobleaching occurs significantly faster than in neutral aqueous media. The ionic strength of the solution has no effect on the photobleaching rate. Such photobleaching is caused by the photodegradation of MB rather than the transition to the leucoform.

The efficiency of singlet oxygen generation and photodynamic activity were evaluated *in vitro*. In the investigated range of MB concentrations, the efficiency of singlet oxygen generation is rather low, because positively charged MB binds to negatively charged cell membranes, which leads to a change in the type of photodynamic reaction. The emergence of other reactive oxygen species (ROS), different from singlet oxygen, in cells has been demonstrated. The generation of ROS and the low quantum yield of singlet oxygen generation indicate the tendency of MB to provide the type I photosensitization mechanism (electron transfer with the formation of semi-reduced and semi-oxidized MB[•] radicals) rather than to the type II mechanism (energy transfer to oxygen with the formation of singlet oxygen) in biological media and *in vivo*.

Keywords: methylene blue, spectroscopy, absorption, fluorescence, photobleaching.

Contacts: Pominova D.V., e-mail: pominovadv@gmail.com

For citations: Pominova D.V., Ryabova A.V., Romanishkin I.D., Markova I.V., Akhlustina E. V., Skobeltsin A.S. Spectroscopic study of methylene blue photophysical properties in biological media, *Biomedical Photonics*, 2023, vol. 12, no. 2, pp. 34–47. doi: 10.24931/2413-9432-2023-12-2-34-47.

Introduction

Photodynamic therapy (PDT) is a very promising therapeutic method for treatment of tumors and non-malignant diseases. The method is based on use of photosensitizer (PS), which is selectively localized in target tissue, and irradiation with light. The PS absorbs the light and can then transfer the energy to molecular oxygen and create singlet oxygen (type II photochemical reaction), which is extremely phototoxic, causing photodamage and subsequent cell death. Another way is the participation of PS in electron-transfer reactions initiating formation of hydroxyl radicals and hydroperoxides and radical-induced damage in biomolecules (type I photochemical reaction) [1, 2]. For the vast majority of clinically approved PS, singlet oxygen is the main cytotoxic agent that determines the mechanism of photodynamic effect and causes cell death in PDT [3]. The type I photochemical reaction may be preferable for therapy of tumors which are hypoxic [1]. However *in vivo* it is difficult to establish without doubt which of these mechanisms is more prevalent, both processes can ultimately lead to cell death [4], but the knowledge how these processes are affected by biological environments is important [5].

Due to the popularity of fluorescence diagnostic methods and PDT [6–9], there is interest in the study of various dyes that can be used as PS. One of the actively studied PS is methylene blue (MB) – a heterocyclic aromatic phenothiazine dye discovered in 1876 by Heinrich Caro. In the dry state MB appears as odorless dark blue crystals, soluble in water, chloroform, and alcohol. Its molecular weight is 319.85 g/mol [10]. In its oxidized state, MB is blue in color because the phenothiazine molecule strongly absorbs in the 600–700 nm region. In aqueous solutions, the wavelength $\lambda_{\max}$ of the absorption band maximum for monomer is given in various works as 668 nm, 664 nm [11], 660 nm [12, 13]; $\lambda_{\max}$ for dimer is 614 nm [12, 13], 605 nm [11]; $\lambda_{\max}$ for trimer is 580 nm [11]. In the UV region for the monomer $\lambda_{\max} = 292$ nm [13]. The oxidized form can be easily reduced to colorless leucomethylene blue (LMB) in the absence of oxygen [14] or by interaction with NAD(P)H [15, 16] or reduced

glutathione [17]. LMB predominantly absorbs in the UV region (256 nm).

MB redox properties are important because, depending on its form, it can be both an electron donor and an electron acceptor, changing rapidly from one state to another [18]. For example, MB interacts directly with the mitochondrial electronic circuit, donating electrons to complexes I and III and/or providing partial restoration of the Krebs cycle [19], whenever NADH is oxidized by MB or even resuscitation of the mitochondrial electronic circuit. The redox properties of MB are of great interest to researchers and make it possible to use it to treat various pathologies, for example, to treat methemoglobinemia by reducing iron to its divalent state [20–23], to relieve septic shock [24, 25], to treat lactoacidosis [26], and as an antidote for carbon monoxide poisoning [27] or cyanide [28, 29]. MB also increases oxygen consumption by tissues with aerobic glycolysis and tumors, while the effect of MB is approximately proportional to the enzymatic capacity of tissues [30], which is promising in terms of photodynamic therapy because the efficiency of singlet oxygen generation obviously depends on oxygen concentration.

The ability of MB to fluoresce is used to label tumors and other objects in order to visualize them [31]. For a long time, MB has been actively used for photodynamic therapy of neoplasms [32–36], photodynamic inactivation of pathogens [37–40], including antibiotic-resistant microflora [41–44].

The photophysical properties of MB in solutions are actively studied. Although its photochemical properties in isotropic solution are well established, its effect *in vivo* needs further study. Most of the results reported in the literature are obtained for MB in ethanol or water. Many papers report that efficient intersystem crossing is observed with quantum yields around 0.5 [2, 45], but it should be noted that this value was obtained in isotropic ethanol solutions [46]. The quantum yield and generation of $^1\text{O}_2$ decreases to values close to zero if MB dimerizes due to a fast nonradiative decay (3–4 ps) of the excited dimer population [47, 48], favoring electron transfer

reactions and consequent generation of radical species [45, 49, 50]. Dimerization could also lead to fluorescence quantum yield decrease [45, 50]. Another parameter which affects the singlet oxygen generation efficiency is the pH. According to literature data the production of singlet oxygen is approximately five times more efficient in alkaline than in acidic medium [51]. The ratio of monomer to dimer depends significantly on the solution composition as well as MB concentration [52, 53, 53–60]. According to literature data, in 20 μM aqueous solution only MB monomers are present, at higher concentration dimerization was observed, however at concentrations below ~ 20 ppm [61] or ~ 70 ppm [57] the existence of trimeric or tetrameric aggregates can be neglected.

The state of MB aggregation in aqueous solution is also sensitive to the ionic strength [52], it was shown that the increase of the inert salts concentration indicates the decreasing tendency of the MB molecules to undergo aggregation. The concentration of surfactant also influences the dimerization. The polarity of the solvent, concentration of surfactants [50], binding of molecules in membranes and interaction with surfaces [62] can cause the changes in ratio of monomer to dimer as well as the singlet oxygen production.

A large number of interrelated factors affecting the photophysical and photochemical properties of methylene blue make it difficult to study and implement in clinical practice, despite a number of unique properties that can be very useful for improving the effectiveness of photodynamic therapy. For clinical use, it is important to study the photophysical and photochemical properties of MB under conditions closest to real biological ones. In this regard, in this work, the absorption, fluorescence, photobleaching, and singlet oxygen generation efficiency of MB in biological media (serum and RPMI medium for cell cultivation) were studied using modern spectroscopic methods. The range of concentrations was chosen based on literature data on MB concentrations in blood after a typical daily dose: 19 μM after oral administration of 500 mg, 10 μM after intravenous administration of 100 mg [63, 64]. The data obtained for biological media were compared with aqueous solutions to determine the main mechanism of photodynamic activity.

Materials and methods

Materials

Methylene blue solution purchased in a pharmacy was used for the studies: Methylene blue, 1% aqueous solution, the active substance methylthioninium chloride (Samaramedprom, Russia). Spectroscopic studies were performed for aqueous MB solutions with concentrations in the range of 0.001–0.05 mM, which corresponds to 0.32–16 mg/kg.

Measurements were performed in distilled water (PanEco, Russia), blood serum (newborn calf blood se-

rum, PanEco, Russia), cell culture medium RPMI (PanEco, Russia) with 10% calf blood serum added, and saline (0.9% sodium chloride, infusion solution, Grotex, Russia). pH of the solutions was controlled using indicator paper (Johnson universal indicator paper, pH 1–11). For water and saline, the pH was 7, for cell culture medium RPMI—8, for plasma—9. To analyze the effect of pH on the spectroscopic properties of MB we also used water with pH adjusted to 8 using 1M NaOH solution.

Absorption spectroscopy

Absorption spectra in the range 200–1000 nm were recorded using a Hitachi U3400 spectrophotometer (Hitachi, Japan) in quartz cuvettes with optical path lengths of 1 cm (for water and NaCl) and 2 mm (for plasma and RPMI medium). To compare the results obtained with each other, all optical density values were multiplied by the corresponding coefficients (0.1 and 0.5 for the centimeter and 2-mm cuvette, respectively) and scaled to the optical density value for a 1-mm cuvette. The analysis of absorption spectra allows studying the transition of the basic form of MB into its reduced form (LMB) under the influence of external factors, photodegradation, and aggregation of MB.

To analyze aggregation, the absorption spectrum shape was approximated in the 500–800 nm range by two Gaussian peaks with maximums at wavelengths corresponding to dimers and monomers, then the ratio of areas under these peaks was considered as a characteristic of dimerization. A linear approximation of the baseline was performed to account for scattering.

Fluorescence spectra and lifetime measurements

The fluorescence spectra of MB aqueous solutions were measured using a LESA-01-Biospec fiber spectrometer (Biospec, Russia) equipped with a longpass edge filter (LP640) in the wavelength range of 650–850 with HeNe laser excitation, 15 mW power output from the fiber.

To investigate the lifetime of aqueous MB fluorescence solutions, a system of Hamamatsu streak camera and streak scope (C9300 and C10627-13) was used to carry out measurements with picosecond resolution.

Study of photobleaching in biological media

To study the laser effect on the solutions, irradiation was performed in 1×1 cm optical cuvettes. The surface of the solution was uniformly irradiated with an LED source with a power density of 100 mW/cm² and a wavelength near the MB absorption maximum of 664 nm. The light source was controlled using a programmable timer, which enabled studying the dependence of the effect on the light dose in increments of 0.5 to 5 J/cm². The irradiation was performed in cyclic mode, the fluorescence intensity was measured in pauses between irradiation windows when excited by a 632.8 nm laser. The MB photobleaching rate was estimated by the decrease in integral fluorescence intensity (area under the fluores-

cence peak in the wavelength range of 650–800 nm) as a function of light dose density. Fluorescence intensity was determined using a LESA-01-BIOSPEC fiber optic spectrometer (Biospec, Russia).

Assessment of photodynamic activity of MB in vitro

The photodynamic activity of MB was determined by measuring the oxygen content in erythrocyte solution with MB by the hemoglobin oxygenation level [65]. We measured the deoxygenation rate of PDT with MB on erythrocyte suspension with registration of MB fluorescence under 660 nm laser irradiation at a power density of 250 mW/cm² (10 min=150 J/cm²). As a result of the type II photosensitization mechanism, the formed ¹O₂ reacts irreversibly with biological molecules, resulting in a reduction of dissolved O₂ in the sample. We calculated the relative quantum yield of singlet oxygen generation for MB concentrations of 1–100 mg/kg by comparing with experimental data for aluminum phthalocyanine with the known quantum yield of singlet oxygen generation in aqueous medium from the literature ($\phi\Delta = 0.38$) [66].

Assessment of singlet oxygen generation efficiency in PDT with MB using the Singlet oxygen sensor green

Singlet oxygen sensor green (SOSG, Invitrogen, USA) reagent was dissolved in methanol to make a stock solution of 500 μ M. SOSG (with final concentration of 50 μ M) was added to 10 mg/l MB aqueous solution, irradiated with a 660 nm laser at a power density of 250 mW/cm². SOSG fluorescence was measured with a LESA-01-BIOSPEC fiber spectrometer in the range of 550–600 nm with 532 nm laser excitation. To quantify the generation of singlet oxygen, we compared it with the experimental data for the 1 mg/l of aluminum phthalocyanine.

Evaluating the efficiency of MB generation of reactive oxygen species in vitro

6-Carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (Carboxy-H2-DCFDA, Lumiprobe RUS Ltd, Russia) was used as an indicator of reactive oxygen species (ROS) is specific for hydrogen peroxide H₂O₂ and other ROS such as superoxide-anion O₂⁻, hydroxyl radical $\cdot$ OH, hydroperoxides ROOH, and peroxyxynitrites ONOO⁻, but with much lower sensitivity compared to H₂O₂ in living cells after PDT with MB. HeLa cells were grown on RPMI-1640 medium (PanEco, Russia) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, BioSera, Nuaille, France), 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) in standard conditions (37°C, 5% CO₂). Cells were subcultured every third day. For confocal microscopy, cells were seeded in a POC-R2 glass-bottomed Petri dish (PeCon GmbH, Erbach, Germany) at a density of 100 × 10³/cm² one day before the experiment. Twenty-four hours later, MB at a concentration of 20 mg/L was added to the cells 120 minutes before the microscopic examination. 30 minutes before the microscopic examination Carboxy-H2-DCFDA was added at a concentration of 25 μ M in FBS at 37°C, 5% CO₂. The cells

were washed three times with prewarmed phosphate-buffered saline, replaced with fresh culture medium, and examined with a laser scanning fluorescence microscope. Sensor fluorescence was excited with a 514 nm laser and detected in the 530–600 nm range. MB fluorescence was excited with a 633 nm laser and detected in the 650–730 nm range.

Results and discussion

Concentration effects on absorption, fluorescence, and fluorescence lifetime of MB in various biological media

Absorption spectra of aqueous solutions of MB as a function of concentration are shown in Fig. 1.

Characteristic peaks are observed in the red (664 nm—monomer, shoulder at 615 nm—aggregates) and ultraviolet (250, 290, and 320 nm) parts of the spectra. Additional peaks in the absorption spectra of MB in plasma and medium are associated with their absorption (415 nm—plasma, 560 nm—phenol red in culture medium). There was also strong absorption in the UV region for plasma and culture medium, which makes it impossible to analyze the MB absorption peaks in this range.

To analyze the aggregation, the absorption spectra were normalized by their maximum, to observe how the spectrum shape changes with increase in concentration, Fig. 2.

The shape of the absorption spectrum changes at concentrations above 0.01 mM (3.2 mg/kg) for water and NaCl and at 0.03 mM (9.6 mg/kg) for serum and RPMI media, which appears as a dimer peak of MB in the spectral region of 600–630 nm.

To quantify and compare aggregation in different solutions, the spectrum was decomposed and the relationship between the areas under the peaks corresponding to monomers and dimers was determined depending on the concentration, Fig. 3.

In water, the most rapid increase in aggregation with increasing concentration is observed. At the same time, at low MB concentrations, the degree of aggregation is higher in serum solutions.

Fluorescence spectra of MB in water as a function of concentration are shown in Fig. 4.

To analyze aggregation and reabsorption, the fluorescence spectra in water and biological media were normalized to the fluorescence maximum (694 nm), Fig. 5.

The obtained spectra show that at a concentration of 0.01 mM (3.2 mg/kg) there is a shift of the maximum to the long-wavelength region, which indicates the presence of aggregation as well as reabsorption at higher concentrations. The shape of the spectrum does not change in this case. More rapid shift of the fluorescence maximum to the long-wavelength region in case of serum confirms higher aggregation at low concentration.

Comparison of the MB fluorescence spectra registered in various biological media shows that the most intense fluorescence is observed in saline and in water, Fig. 6.

The decreased fluorescence intensity of MB in culture medium and in plasma may be due to both interaction with plasma proteins and more alkaline pH. At the same

time, the fluorescence intensity in culture medium is higher (pH = 8) than in pure plasma (pH = 9). The shape of the fluorescence spectrum did not change in the studied media. Analysis of the integral fluorescence intensity (estimated as the area under the fluorescence peak in the 650-800 nm range) shows that in all the studied media the dependence on concentration is nonlinear, a linear

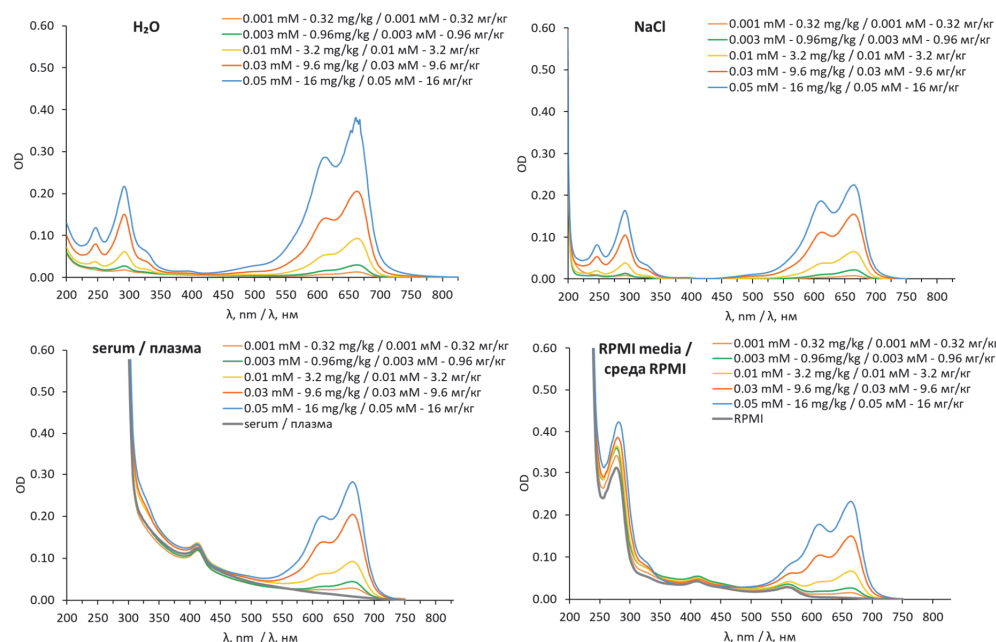


Рис. 1. Спектры поглощения МС в воде и биологических средах в зависимости от концентрации.

Fig. 1. Absorption spectra of MB in water and biological media depending on the concentration.

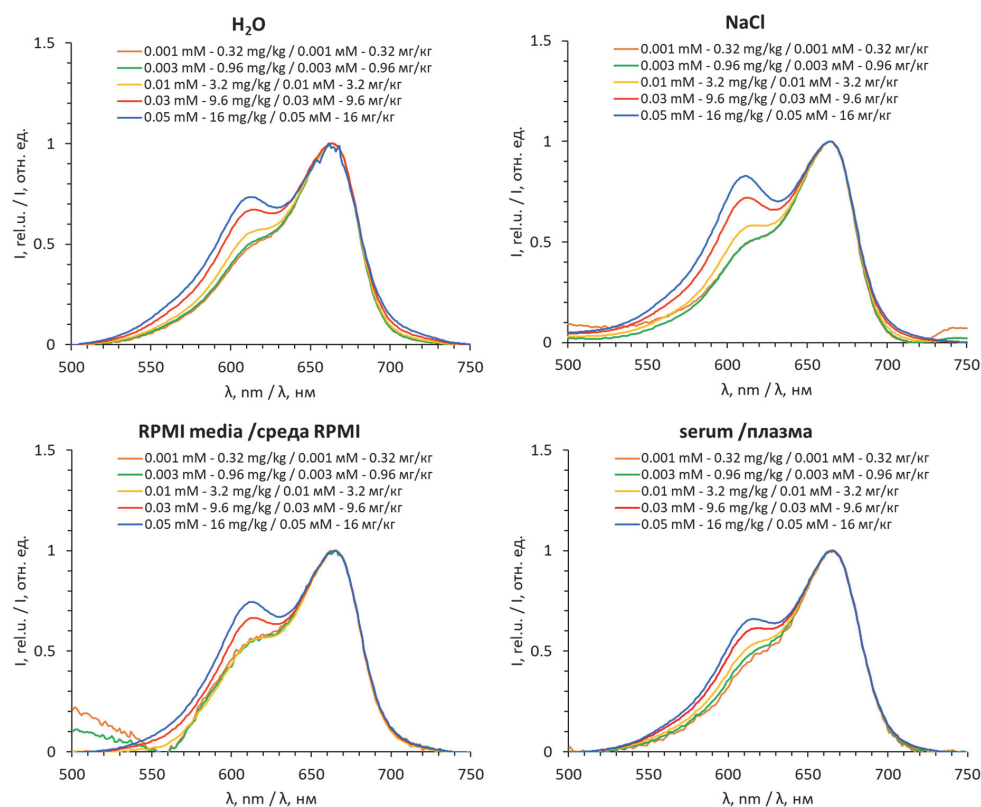


Рис. 2. Нормированные на максимум спектры поглощения МС в воде и биологических средах в зависимости от концентрации.

Fig. 2. Normalized by their maximum absorption spectra of MB in water and biological media as a function of concentration.

section is observed up to the concentration of 0.01 mM for all media, except for plasma, in which a deviation from the linear dependence is observed already at 0.003 mM, which presumably is associated with a large number of dimers in plasma at low concentrations. At concentrations of 0.01-0.03 mM, there is a sublinear section followed by saturation, which could be associated with re-

absorption of excitation in solution as well as with small penetration depth of laser irradiation in solution.

A study of the MB fluorescence lifetime depending on concentration was carried out. No significant differences in lifetime were observed for all investigated concentrations (Table 1), which may indicate that the aggregates formed at high concentrations of MB do not fluoresce.

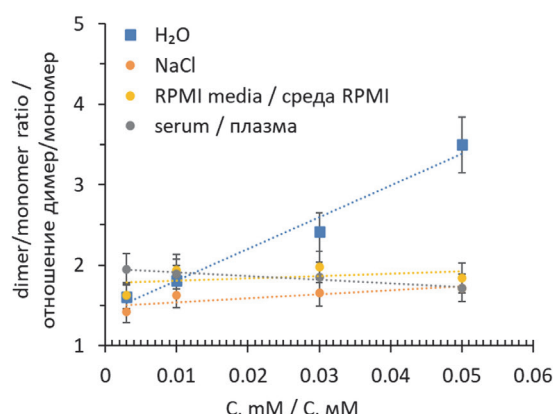


Рис. 3. Зависимость отношения площадей под пиками соответствующими димерам и мономерам (отношение димер/мономер) от концентрации.

Fig. 3. Dependence of the ratio of the areas under the peaks corresponding to dimers and monomers (dimer/monomer ratio) on concentration.

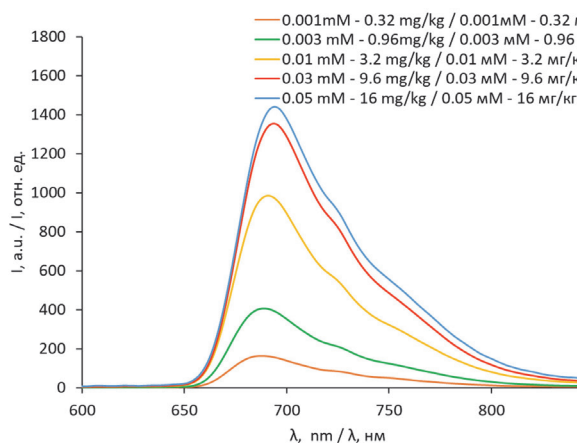


Рис. 4. Спектры флуоресценции МС в воде в зависимости от концентрации.

Fig. 4. Fluorescence spectra of MB in water as a function of concentration.

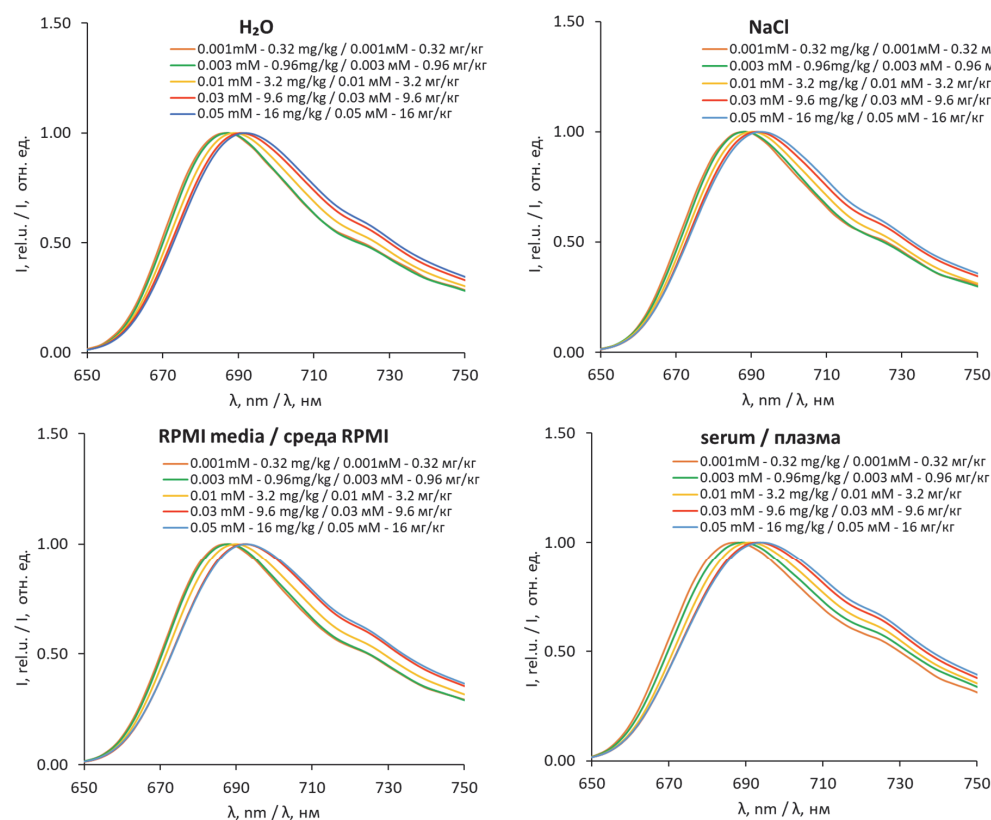


Рис. 5. Нормированные спектры флуоресценции МС в воде и биологических средах в зависимости от концентрации.

Fig. 5. Normalized spectra of MB fluorescence in water and biological media as a function of concentration.

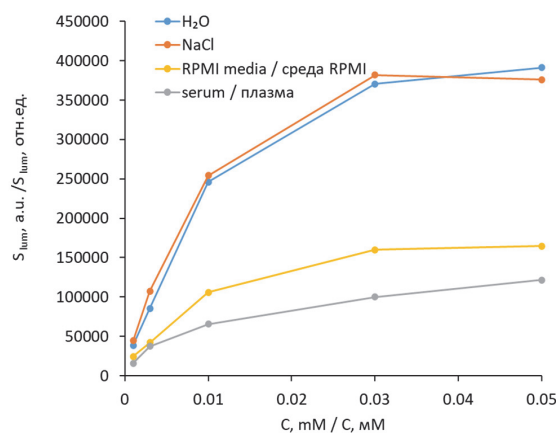
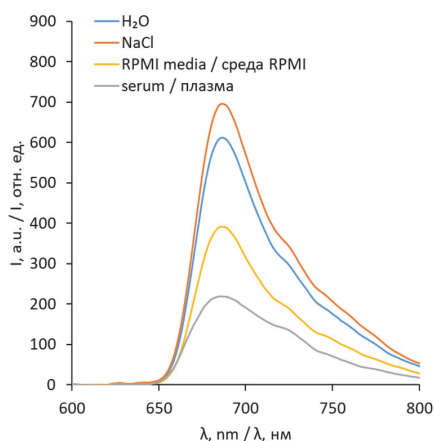


Рис. 6. Слева – спектры флуоресценции МС в различных биологических средах. Справа – зависимость интегральной интенсивности флуоресценции (площади под пиком флуоресценции в диапазоне 650–800 нм) от концентрации МС. **Fig. 6.** Left – fluorescence spectra of MB in various biological media. Right – the integral fluorescence intensity (area under the fluorescence peak in the range of 650–800 nm) dependence on MB concentration.

Таблица 1

Времена жизни флуоресценции МС в водных растворах в зависимости от концентрации.

Table 1

Fluorescence lifetime of MB in aqueous solutions as a function of concentration.

C, mM / C, mM	τ, ns / τ, ns
0.001	0.3687
0.003	0.3700
0.01	0.3696
0.03	0.3696
0.1	0.3707

Influence of laser exposure on absorption and fluorescence

We studied the dependence of MB fluorescence intensity in biological media on the light dose density for

MB concentration of 10 μM (3.2 mg/kg). The studies of photodegradation in biological media showed that photobleaching by more than 80% in plasma and culture medium was already observed at the dose of 5 J/cm², while in water at such concentration there was no photobleaching yet at the dose of 5 J/cm², and at the dose of 50 J/cm² the photobleaching of MB was about 30%, Fig. 7.

The results of previous studies also show that MB is photostable in water, the photodegradation of molecules when irradiated with doses up to 50 J/cm² does not exceed 40% [43], while for lower concentrations of MB photobleaching occurs more rapidly, which is presumably due to the large volume of the irradiated area at low concentrations, at high concentrations of the drug is absorbed most of the radiation in a thin layer due to high optical density. Due to the small amount of oxygen in the thin layer, the photobleaching rate at high concentrations slows down because it is limited by the oxygen diffusion rate.

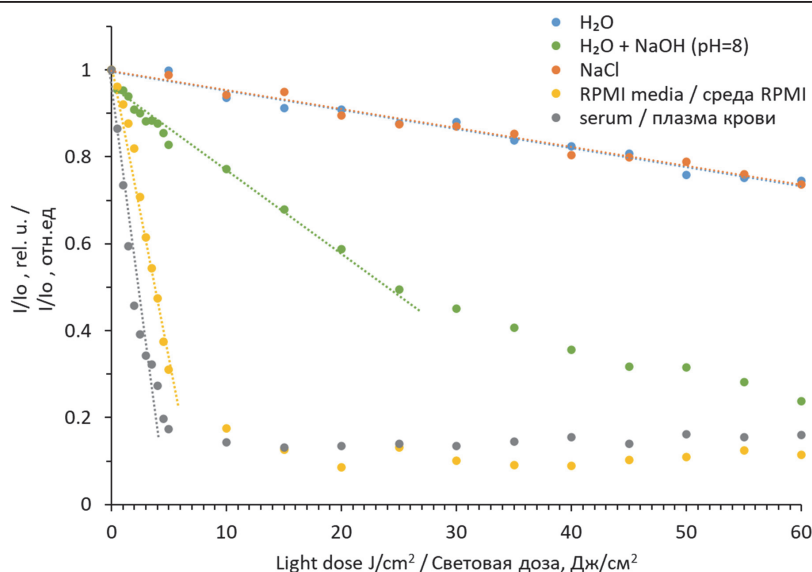


Рис. 7. Снижение интенсивности флуоресценции МС в зависимости от плотности дозы излучения за счет фотодеградации в различных средах.

Fig. 7. Decrease of MB fluorescence intensity as a function of radiation dose density due to photodegradation in different media.

The photobleaching rate in physiological solution is the same as in water, and in the RPMI medium is the same as in serum, indicating that the ionic strength of the solution has no effect on the photobleaching rate.

The higher rate of photobleaching in plasma and culture media may be due to a more alkaline pH: according to the published data, the efficiency of MC singlet oxygen generation is 5 times higher at pH 9 than at pH 7 [51].

However, based on a comparison of the photobleaching rate of an aqueous solution with the addition of NaOH to pH 8, we can conclude that the change in pH is not the only reason for the increased photobleaching rate.

The photobleaching rate in plasma as well as in water [43] depends on concentration, and at high concentrations is slower, Fig. 8.

The obtained dependencies indirectly indicate that photobleaching in plasma occurs due to interaction with

singlet oxygen; the rate of photobleaching is limited by the rate of oxygen diffusion in the medium.

To check the effect of interaction with plasma proteins on the spectroscopic properties of MB over time without laser exposure, the absorption spectrum of MB in plasma was recorded 30 minutes after preparation, and no change in the spectrum was observed. Absorption spectra recorded after photobleaching suggest that the photobleaching is caused by photodegradation of MB and is not related to the transition to the leucoform, Fig. 9.

Assessment of photodynamic activity and efficiency of singlet oxygen generation in vitro

The value of photodynamic activity determined by irreversible quenching of singlet oxygen which is equivalent to the quantum yield of singlet oxygen generation for MB in the concentration range of 1–100 mg/kg relative

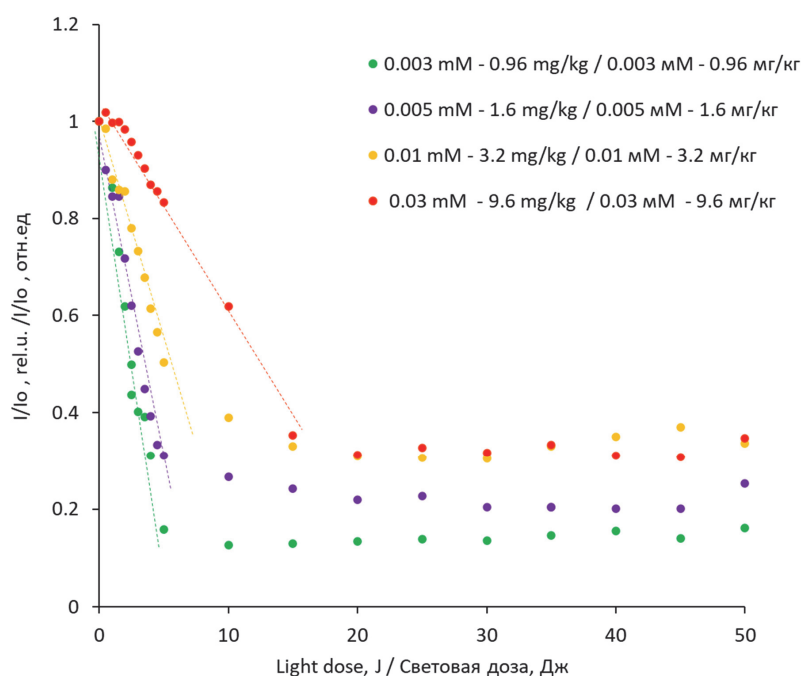


Рис. 8. Снижение интенсивности флуоресценции МС за счет фотодеградации в зависимости от плотности дозы излучения для различных концентраций МС в плазме.
Fig. 8. Decrease in MB fluorescence intensity due to photodegradation as a function of radiation dose density for different concentrations of MB in plasma.

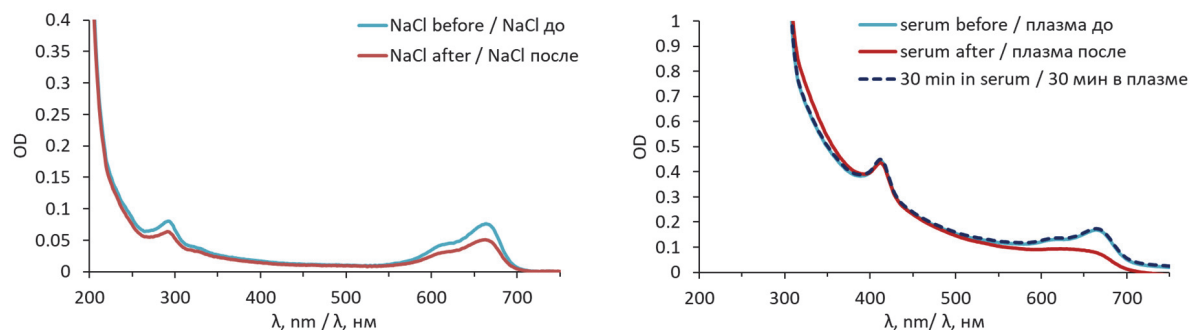


Рис. 9. Спектры поглощения МС до и после облучения в различных биологических средах.
Fig. 9. Absorption spectra of MB before and after irradiation in various biological media.

to aluminum phthalocyanine ($\Phi\Delta = 0.38$) was 0.0065 ± 0.0014 . In the investigated range of MB concentrations, the efficiency of singlet oxygen generation is rather low.

The measured quantum yield of singlet oxygen generation using the SOSG sensor in water demonstrated a similar value for the MB concentration of 10 mg/kg — $\Phi\Delta$ 0.0028. Thus, it is shown that the photodynamic reaction *in vitro* in the presence of erythrocytes for MB proceeds according to type I, when not singlet oxygen but other reactive oxygen species are formed. We assume that this is caused by the positively charged MB binding to negatively charged cell membranes, which leads to a change in the type of photodynamic reaction [36].

This is verified by the ROS generation test performed on the cell culture (Fig. 10).

After incubation with MB, cells show staining for ROS diffusely in the cytoplasm and brightly in some vesicles. After irradiation of cells with accumulated MB at 660 nm, 50 J/cm², the intensity of the ROS sensor in vesicles becomes brighter. In control cells without MB, the ROS sensor is not detected, even after irradiation.

The results on ROS generation and low quantum yield of singlet oxygen generation confirm the tendency of MB to shift from type II photosensitization mechanism (energy transfer to oxygen with formation of singlet oxygen) to type I mechanism (electron transfer with formation of MB⁺ semi-reduced and semi-oxidized radicals) [50].

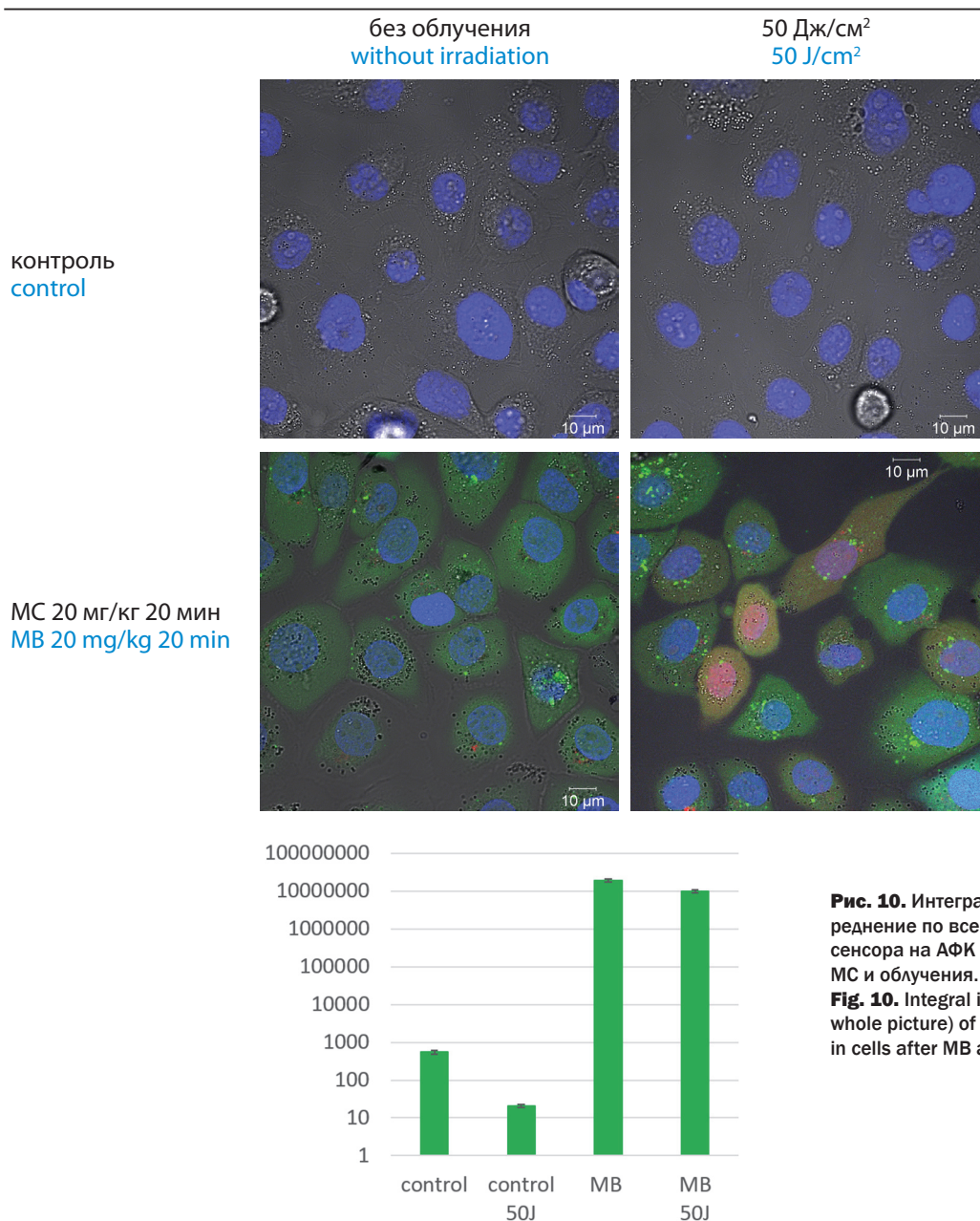


Рис. 10. Интегральная интенсивность (усреднение по всей картинке) флуоресценции сенсора на АФК в клетках после накопления МС и облучения.

Fig. 10. Integral intensity (averaging over the whole picture) of the ROS sensor fluorescence in cells after MB accumulation and irradiation.

Conclusion

Absorption and fluorescence spectra in water, saline, blood plasma and cell-culturing medium RPMI were measured for MB concentrations 0.001–0.05 mM, fluorescence lifetime was determined for different concentrations. The analysis of the spectrum shape indicates weak aggregation at concentrations above 0.01 mM (3.2 mg/kg), which manifests in the appearance of the MB dimer peak in the spectral region of 600–630 nm.

The obtained spectra of MB fluorescence in aqueous solutions show that at a concentration of 0.01 mM (3.2 mg/kg) there is a shift of the maximum to the long-wave region, indicating the presence of reabsorption and aggregation at higher concentrations. The shape of the spectrum in this case does not change. Comparison of MB fluorescence spectra recorded in various biological media shows that the most intense fluorescence is observed in saline and in water. The decrease of MB fluorescence intensity in the culture medium and in plasma may be due to both the interaction with plasma proteins and more alkaline pH. At the same time, the fluorescence intensity in culture medium is higher (pH 8) than in pure plasma (pH 9). The shape of the fluorescence spectrum does not change in the studied media. The analysis of integral fluorescence intensity dependence on MB concentration shows that in all the studied media it is non-linear, the linear section is observed up to the concentration of 0.01 mM for all the media, except for plasma, in which the deviation from linear dependence is observed up to 0.003 mM (presumably due to large number of dimers in plasma at low MB concentrations in comparison to water). At concentrations of 0.01–0.03 mM, the sub-linear section of the dependence begins followed by saturation, which could be associated with reabsorption of excitation in solution as well as with small penetration depth of laser irradiation in solution.

A concentration-dependent MB fluorescence lifetime study was performed. No differences in the lifetime were observed for all studied concentrations, which may indicate that the aggregates formed at high concentrations of MB do not fluoresce.

Studies of photodegradation in biological media showed that more than 80% photobleaching in plas-

ma and culture media is already observed at a dose of 5 J/cm², while in water at this concentration at a dose of 5 J/cm² there is no photobleaching yet, and at a dose of 50 J/cm² the photobleaching of MB is about 30%.

The photobleaching of MB under the effect of laser radiation was investigated. For lower concentrations of MB the photobleaching occurs more rapidly, which is presumably associated with a larger volume of irradiated area at low concentrations: at high concentrations of the drug most of the radiation is absorbed in a thin layer due to high optical density. The obtained relations indirectly indicate that photobleaching in plasma occurs due to interaction with singlet oxygen; the rate of photobleaching is limited by the diffusion rate of oxygen in the medium.

In media containing proteins with alkaline pH, photobleaching is significantly faster than in neutral aqueous media. The ionic strength of the solution has no effect on the photobleaching rate. The absorption spectra recorded after photobleaching suggest that the photobleaching is not due to the transition to the leucoform but is caused by the photodegradation of MB.

The efficiency of singlet oxygen generation and photodynamic activity were evaluated *in vitro*. In the investigated concentration range the efficiency of singlet oxygen generation is quite low. We assume that this is because the photodynamic reaction for MB proceeds according to type I, when not singlet oxygen is formed, but other reactive oxygen species. This is because the positively charged MB binds to negatively charged cell membranes, which leads to a change in the type of photodynamic reaction. It is demonstrated that in addition to the generation of singlet oxygen, the presence of other ROS in the cells is observed. After incubation with MB, cells show staining for ROS diffusely in the cytoplasm and brightly in some vesicles. After irradiation of cells with accumulated MB at 660 nm, 50 J/cm², the sensor intensity for ROS in vesicles becomes brighter. In control cells without MB the ROS sensor is not detected even after irradiation.

Acknowledgment

The study was funded by a grant from the Russian Science Foundation (project N 22-72-10117).

ЛИТЕРАТУРА

1. Baptista M. S., Indig G. L. Effect of BSA Binding on Photophysical and Photochemical Properties of Triarylmethane Dyes // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 1998. – Vol. 102(23). – P. 4678–4688. DOI: 10.1021/jp981185n.
2. Gabrielli D., Belisle E., Severino D., Kowaltowski A. J., Baptista M. S. Binding, Aggregation and Photochemical Properties of Methylene Blue in Mitochondrial Suspensions // *Photochemistry and Photobiology*. – 2004. – Vol. 79(3). – P. 227. DOI: 10.1562/BE-03-27.1.

REFERENCES

1. Baptista M. S., Indig G. L. Effect of BSA Binding on Photophysical and Photochemical Properties of Triarylmethane Dyes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 1998, Vol. 23 (102), pp. 4678–4688. doi: 10.1021/jp981185n.
2. Gabrielli D., Belisle E., Severino D., Kowaltowski A. J., Baptista M. S. Binding, Aggregation and Photochemical Properties of Methylene Blue in Mitochondrial Suspensions. *Photochemistry and Photobiology*, 2004. Vol. 3 (79), pp. 227. doi: 10.1562/BE-03-27.1.

3. Красновский А. А. Фотодинамическое действие и синглетный кислород // Биофизика. – 2004. – Т. 49, №2. – Р. 305-322.
4. Foote C. S. Mechanisms of Photosensitized Oxidation: There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems // *Science*. – 1968. – Vol. 162(3857). – P. 963-970. DOI: 10.1126/science.162.3857.963.
5. Balzani V., Scandola F. Photochemical electron transfer reactions in homogeneous solution под ред. J. S. Connolly // New York: Academic Press. – 1983. – P. 97-130.
6. Crous A., Abrahamse H. Photodynamic therapy of lung cancer, where are we? // *Frontiers in Pharmacology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 932098. DOI: 10.3389/fphar.2022.932098.
7. Mfouo-Tynga I. S., Mouinga-Ondeme A. G. Photodynamic Therapy: A Prospective Therapeutic Approach for Viral Infections and Induced Neoplasia. // *Pharmaceuticals*. – 2022. – Vol. 15(№10). – P. 1273. DOI: 10.3390/ph15101273.
8. Reshetov I. V., Korenev S. V., Romanko Yu. S. Modern aspects of photodynamic therapy of basal cell skin cancer. // *Biomedical Photonics*. – 2022. – Vol. 11(№3). – P. 35-39. DOI: 10.24931/2413-9432-2022-11-3-35-39.
9. Panaseykin Y. A., Kapinus V. N., Filonenko E. V., Polkin V. V., Sevrukov F. E., Isaev P. A., Ivanov S. A., Kaprin A. D. Photodynamic therapy treatment of oral cavity cancer in patients with comorbidities // *Biomedical Photonics*. – 2023. – Vol. 11(4). – P. 19-24. DOI: 10.24931/2413-9432-2022-11-4-19-24.
10. Marr H. E., Stewart J. M., Chiu M. F. The crystal structure of methylene blue pentahydrate // *Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry*. – 1973. – Vol. 29(4). – P. 847-853. DOI: 10.1107/S0567740873003432.
11. Hamann C. H., Hamnett A., Vielstich W. Electrochemistry / C. H. Hamann, A. Hamnett, W. Vielstich, 2-е изд., Weinheim: Wiley-VCH, 2007. – P.531.
12. Lewis G. N., Goldschmid O., Magel T. T., Bigeleisen J. Dimeric and Other Forms of Methylene Blue: Absorption and Fluorescence of the Pure Monomer // *Journal of the American Chemical Society*. – 1943. – Vol. 65(6). – P. 1150-1154. DOI: 10.1021/ja01246a037.
13. Tacconi N. R. de, Carmona J., Rajeshwar K. Reversibility of Photoelectrochromism at the TiO₂/Methylene Blue Interface // *Journal of The Electrochemical Society*. – 1997. – Vol. 144(7). – P. 2486. DOI: 10.1149/1.1837841.
14. Wales D. J., Parker R. M., Gates J. C., Gossel M. C., Smith P. G. R. An integrated bragg grating oxygen sensor using a hydrophobic sol-gel layer doped with an organic dye Munich, Germany: IEEE. – 2011. – P. 1-1. DOI: 10.1109/CLEOE.2011.5943057.
15. Sevcik P., Dunford H. B. Kinetics of the oxidation of NADH by methylene blue in a closed system // *The Journal of Physical Chemistry*. – 1991. – Vol. 95(6). – P. 2411-2415. DOI: 10.1021/j100159a054.
16. Engbersen J. F. J., Koudijs A., Van Der Plas H. C. Reaction of NADH models with methylene blue // *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*. – 2010. – Vol. 104(5). – P. 131-138. DOI: 10.1002/recl.19851040503.
17. Schirmer R. H., Adler H., Pickhardt M., Mandelkow E. "Lest we forget you — methylene blue ..." // *Neurobiology of Aging*. – 2011. – Vol. 32(12). – P. 2325.e7-2325.e16. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.12.012.
18. Brooks M. M. The Mechanism of Methylene Blue Action on Blood. // *Science*. – 1934. – Vol. 80(2062). – P. 15-16. DOI: 10.1126/science.80.2062.15.b.
19. Komlódi T., Tretter L. Methylene blue stimulates substrate-level phosphorylation catalysed by succinyl-CoA ligase in the citric acid cycle // *Neuropharmacology*. – 2017. – Vol. 123. – P. 287-298. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.05.009.
20. Herman M. I., Chyka P. A., Butler A. Y., Rieger S. E. Methylene blue by intraosseous infusion for methemoglobinemia // *Annals of Emergency Medicine*. – 1999. – Vol. 33(1). – P. 111-113. DOI: 10.1016/s0196-0644(99)70427-0.
21. Boylston M., Beer D. Methemoglobinemia: A Case Study. // *Critical Care Nurse*. – 2002. – Vol. 22(4). – P. 50-55. DOI: 10.4037/ccn2002.22.4.50.
3. Krasnovsky A. A. Photodynamic action and singlet oxygen. *Bio-physics*, 2004, Vol. 2 (49). pp. 305-322.
4. Foote C. S. Mechanisms of Photosensitized Oxidation: There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science*, 1968. Vol. 3857 (162), pp. 963-970. doi: 10.1126/science.162.3857.963.
5. Balzani V., Scandola F. Photochemical electron transfer reactions in homogeneous solution edited by J. S. Connolly. *New York: Academic Press*, 1983. pp. 97-130.
6. Crous A., Abrahamse H. Photodynamic therapy of lung cancer, where are we? *Frontiers in Pharmacology*, 2022, Vol.13, pp. 932098. doi: 10.3389/fphar.2022.932098.
7. Mfouo-Tynga I. S., Mouinga-Ondeme A. G. Photodynamic Therapy: A Prospective Therapeutic Approach for Viral Infections and Induced Neoplasia. *Pharmaceuticals*, 2022. Vol. 10 (15), pp. 1273. doi: 10.3390/ph15101273.
8. Reshetov I. V., Korenev S. V., Romanko Yu. S. Modern aspects of photodynamic therapy of basal cell skin cancer. *Biomedical Photonics*, 2022, Vol. 3 (11), pp. 35-39. doi: 10.24931/2413-9432-2022-11-3-35-39.
9. Panaseykin Y. A., Kapinus V. N., Filonenko E. V., Polkin V. V., Sevrukov F. E., Isaev P. A., Ivanov S. A., Kaprin A. D. Photodynamic therapy treatment of oral cavity cancer in patients with comorbidities. *Biomedical Photonics*, 2023, Vol. 4 (11), pp. 19-24. doi: 10.24931/2413-9432-2022-11-4-19-24.
10. Marr H. E., Stewart J. M., Chiu M. F. The crystal structure of methylene blue pentahydrate. *Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, 1973. Vol. 4 (29), pp. 847-853. doi: 10.1107/S0567740873003432.
11. Hamann C. H., Hamnett A., Vielstich W. Electrochemistry / C. H. Hamann, A. Hamnett, W. Vielstich, 2nd ed. *Weinheim: Wiley-VCH*, 2007, p. 531.
12. Lewis G. N., Goldschmid O., Magel T. T., Bigeleisen J. Dimeric and Other Forms of Methylene Blue: Absorption and Fluorescence of the Pure Monomer. *Journal of the American Chemical Society*, 1943, Vol. 6 (65). pp. 1150-1154. doi: 10.1021/ja01246a037.
13. Tacconi N. R. de, Carmona J., Rajeshwar K. Reversibility of Photoelectrochromism at the TiO₂/Methylene Blue Interface. *Journal of The Electrochemical Society*, 1997, Vol. 7 (144). pp. 2486. doi: 10.1149/1.1837841.
14. Wales D. J., Parker R. M., Gates J. C., Gossel M. C., Smith P. G. R. An integrated bragg grating oxygen sensor using a hydrophobic sol-gel layer doped with an organic dye Munich. *Germany: IEEE*, 2011, p. 1-1. doi: 10.1109/CLEOE.2011.5943057.
15. Sevcik P., Dunford H. B. Kinetics of the oxidation of NADH by methylene blue in a closed system. *The Journal of Physical Chemistry*, 1991, Vol. 6 (95), pp. 2411-2415. doi: 10.1021/j100159a054.
16. Engbersen J. F. J., Koudijs A., Van Der Plas H. C. Reaction of NADH models with methylene blue. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 2010, Vol. 5 (104), pp. 131-138. doi: 10.1002/recl.19851040503.
17. Schirmer R. H., Adler H., Pickhardt M., Mandelkow E. "Lest we forget you — methylene blue ..." // *Neurobiology of Aging*, 2011, Vol. 12 (32), pp. 2325.e7-2325.e16. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.12.012.
18. Brooks M. M. The Mechanism of Methylene Blue Action on Blood. *Science*, 1934. Vol. 2062 (80), pp. 15-16. doi: 10.1126/science.80.2062.15.b.
19. Komlódi T., Tretter L. Methylene blue stimulates substrate-level phosphorylation catalysed by succinyl-CoA ligase in the citric acid cycle. *Neuropharmacology*, 2017, Vol. 123, pp. 287-298. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.05.009.
20. Herman M. I., Chyka P. A., Butler A. Y., Rieger S. E. Methylene blue by intraosseous infusion for methemoglobinemia. *Annals of Emergency Medicine*, 1999, Vol. 1 (33), pp. 111-113. doi: 10.1016/s0196-0644(99)70427-0.
21. Boylston M., Beer D. Methemoglobinemia: A Case Study. *Critical Care Nurse*, 2002, Vol. 4 (22), pp. 50-55. doi: 10.4037/ccn2002.22.4.50.

22. Wendel W. B. The Control of Methemoglobinemia with Methylene Blue // *Journal of Clinical Investigation*. – 1939. – Vol. 18(2). – P. 179-185. DOI: 10.1172/JCI101033.
23. Tepaev R. F., Vishnevskiy V. A., Kuzin S. A., Sergey I. V., Gordeeva O. B., Pytal A. V., Murashkin N. N. Benzocaine-Induced Methemoglobinemia. A Clinical Case // *Pediatric pharmacology*. – 2018. – Vol. 15(5). – P. 396-401. DOI: 10.15690/pf.v15i5.1962.
24. Preiser J.-C., Lejeune P., Roman A., Carlier E., De Backer D., Leeman M., Kahn R. J., Vincent J.-L. Methylene blue administration in septic shock: A clinical trial // *Critical Care Medicine*. – 1995. – Vol. 23(2). – P. 259-264. DOI: 10.1097/00003246-199502000-00010.
25. Zhang H., Rogiers P., Preiser J.-C., Spapen H., Manikis P., Metz G., Vincent J.-L. Effects of methylene blue on oxygen availability and regional blood flow during endotoxic shock // *Critical Care Medicine*. – 1995. – Vol. 23(10). – P. 1711-1721. DOI: 10.1097/00003246-199510000-00016.
26. Tranquada R. E., Bernstein S., Grant W. J. Intravenous Methylene Blue in The Therapy of Lactic Acidosis. // *Archives of Internal Medicine*. – 1964. – Vol. 114(1). – P. 13-25. DOI: 10.1001/archinte.1964.03860070059003.
27. Bell M. A. Methylene Blue in Carbon Monoxide Poisoning. // *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. – 1933. – Vol. 100(18). – P. 1402. DOI: 10.1001/jama.1933.27420180002007b.
28. Wendel W. B. The Mechanism of the Antidotal Action of Methylene Blue in Cyanide Poisoning. // *Science*. – 1934. – Vol. 80(2078). – P. 381-382. DOI: 10.1126/science.80.2078.381.
29. Chen K. K. Nitrite and Thiosulfate Therapy in Cyanide Poisoning. // *Journal of the American Medical Association*. – 1952. – Vol. 149(2). – P. 113. DOI: 10.1001/jama.1952.02930190015004.
30. Barron E. S. G. The Catalytic Effect of Methylene Blue on the Oxygen Consumption of Tumors and Normal Tissues. // *Journal of Experimental Medicine*. – 1930. – Vol. 52(3). – P. 447-456. DOI: 10.1084/jem.52.3.447.
31. Park J., Mroz P., Hamblin M. R., Yaroslavsky A. N. Dye-enhanced multimodal confocal microscopy for noninvasive detection of skin cancers in mouse models // *Journal of Biomedical Optics*. – 2010. – Vol. 15(2). – P. 026023. DOI: 10.1117/1.3394301.
32. Wainwright M., Crossley K. B. Methylene Blue - a Therapeutic Dye for All Seasons? // *Journal of Chemotherapy*. – 2002. – Vol. 14(5). – P. 431-443. DOI: 10.1179/joc.2002.14.5.431.
33. Orth K., Russ D., Beck G., Rück A., Beger H. G. Photochemotherapy of experimental colonic tumours with intra-tumorally applied methylene blue. // *Langenbeck's Archives of Surgery*. – 1998. – Vol. 383(3-4). – P. 276-281. DOI: 10.1007/s004230050132.
34. König K., Bockhorn V., Dietel W., Schubert H. Photochemotherapy of animal tumors with the photosensitizer Methylene Blue using a krypton laser. // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. – 1987. – Vol. 113(3). – P. 301-303. DOI: 10.1007/BF00396390.
35. Tardivo J. P., Del Giglio A., Paschoal L. H. C., Ito A. S., Baptista M. S. Treatment of melanoma lesions using methylene blue and RL50 light source. // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2004. – Vol. 1(4). – P. 345-346. DOI: 10.1016/S1572-1000(05)00005-0.
36. Tardivo J. P., Del Giglio A., De Oliveira C. S., Gabrielli D. S., Junqueira H. C., Tada D. B., Severino D., De Fátima Turchiello R., Baptista M. S. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2005. – Vol. 2(3). – P. 175-191. DOI: 10.1016/S1572-1000(05)00097-9.
37. Wainwright M. Methylene blue derivatives — suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2000. – Vol. 16(4). – P. 381-394. DOI: 10.1016/S0924-8579(00)00207-7.
38. Wagner S. J. Virus inactivation in blood components by photoactive phenothiazine dyes // *Transfusion Medicine Reviews*. – 2002. – Vol. 16(1). – P. 61-66. DOI: 10.1053/tmrv.2002.29405.
39. Calderón M., Weitzel T., Rodríguez M. F., Ciapponi A. Methylene blue for treating malaria // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2017. – Vol. 2022(6). DOI: 10.1002/14651858.CD012837.
22. Wendel W. B. The Control of Methemoglobinemia with Methylene Blue. *Journal of Clinical Investigation*, 1939, Vol. 2 (18). pp. 179-185. doi: 10.1172/JCI101033.
23. Tepaev R. F., Vishnevskiy V. A., Kuzin S. A., Sergey I. V., Gordeeva O. B., Pytal A. V., Murashkin N. N. Benzocaine-Induced Methemoglobinemia. A Clinical Case. *Pediatric pharmacology*, 2018, Vol. 5 (15), pp. 396-401. doi: 10.15690/pf.v15i5.1962.
24. Preiser J.-C., Lejeune P., Roman A., Carlier E., De Backer D., Leeman M., Kahn R. J., Vincent J.-L. Methylene blue administration in septic shock: A clinical trial. *Critical Care Medicine*, 1995, Vol. 2 (23), pp. 259-264. doi: 10.1097/00003246-199502000-00010.
25. Zhang H., Rogiers P., Preiser J.-C., Spapen H., Manikis P., Metz G., Vincent J.-L. Effects of methylene blue on oxygen availability and regional blood flow during endotoxic shock. *Critical Care Medicine*, 1995, Vol. 10 (23), pp. 1711-1721. doi: 10.1097/00003246-199510000-00016.
26. Tranquada R. E., Bernstein S., Grant W. J. Intravenous Methylene Blue in The Therapy of Lactic Acidosis. *Archives of Internal Medicine*, 1964, Vol. 1 (114), pp. 13-25. doi: 10.1001/archinte.1964.03860070059003.
27. Bell M. A. Methylene Blue in Carbon Monoxide Poisoning. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 1933, Vol. 18 (100), pp. 1402. doi: 10.1001/jama.1933.27420180002007b.
28. Wendel W. B. The Mechanism of the Antidotal Action of Methylene Blue in Cyanide Poisoning. *Science*, 1934, Vol. 2078 (80), pp. 381-382. doi: 10.1126/science.80.2078.381.
29. Chen K. K. Nitrite and Thiosulfate Therapy in Cyanide Poisoning. *Journal of the American Medical Association*, 1952, Vol. 2 (149), pp. 113. doi: 10.1001/jama.1952.02930190015004.
30. Barron E. S. G. The Catalytic Effect of Methylene Blue on the Oxygen Consumption of Tumors and Normal Tissues. *Journal of Experimental Medicine*, 1930, Vol. 3 (52), pp. 447-456. doi: 10.1084/jem.52.3.447.
31. Park J., Mroz P., Hamblin M. R., Yaroslavsky A. N. Dye-enhanced multimodal confocal microscopy for noninvasive detection of skin cancers in mouse models. *Journal of Biomedical Optics*, 2010, Vol. 2 (15), pp. 026023. doi: 10.1117/1.3394301.
32. Wainwright M., Crossley K. B. Methylene Blue - a Therapeutic Dye for All Seasons? *Journal of Chemotherapy*, 2002, Vol. 5 (14), pp. 431-443. doi: 10.1179/joc.2002.14.5.431.
33. Orth K., Russ D., Beck G., Rück A., Beger H. G. Photochemotherapy of experimental colonic tumours with intra-tumorally applied methylene blue. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 1998, Vol. 34 (383), pp. 276-281. doi: 10.1007/s004230050132.
34. König K., Bockhorn V., Dietel W., Schubert H. Photochemotherapy of animal tumors with the photosensitizer Methylene Blue using a krypton laser. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1987, Vol. 3 (113), pp. 301-303. doi: 10.1007/BF00396390.
35. Tardivo J. P., Del Giglio A., Paschoal L. H. C., Ito A. S., Baptista M. S. Treatment of melanoma lesions using methylene blue and RL50 light source. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2004, Vol. 4 (1), pp. 345-346. doi: 10.1016/S1572-1000(05)00005-0.
36. Tardivo J. P., Del Giglio A., De Oliveira C. S., Gabrielli D. S., Junqueira H. C., Tada D. B., Severino D., De Fátima Turchiello R., Baptista M. S. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2005, Vol. 3 (2), pp. 175-191. doi: 10.1016/S1572-1000(05)00097-9.
37. Wainwright M. Methylene blue derivatives — suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2000, Vol. 4 (16), pp. 381-394. doi: 10.1016/S0924-8579(00)00207-7.
38. Wagner S. J. Virus inactivation in blood components by photoactive phenothiazine dyes. *Transfusion Medicine Reviews*, 2002, Vol. 1 (16), pp. 61-66. doi: 10.1053/tmrv.2002.29405.
39. Calderón M., Weitzel T., Rodríguez M. F., Ciapponi A. Methylene blue for treating malaria. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2017, Vol. 6 (2022). doi: 10.1002/14651858.CD012837.

40. Dewitt L. M. Preliminary Report of Experiments in the Vital Staining of Tubercles: Studies on the Biochemistry and Chemotherapy of Tuberculosis. IV // *Journal of Infectious Diseases*. – 1913. – Vol. 12(1). – P. 68-92. DOI: 10.1093/infdis/12.1.68.
41. Wainwright M., Phoenix D. A., Laycock S. L., Wareing D. R. A., Wright P. A. Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* // *FEMS Microbiology Letters*. – 1998. – Vol. 160(2). – P. 177-181. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb12908.x.
42. Pascual A., Henry M., Briolant S., Charras S., Baret E., Amalvict R., Huyghues Des Etages E., Feraud M., Rogier C., Pradines B. In Vitro Activity of Proverbblue (Methylene Blue) on *Plasmodium falciparum* Strains Resistant to Standard Antimalarial Drugs // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2011. – Vol. 55(5). – P. 2472-2474. DOI: 10.1128/AAC.01466-10.
43. Tiganova I. G., Meerovich G. A., Zulufova I. D., Akhlyustina E. V., Ovchinnikov R. S., Solovyev A. I., Romanishkin I. D., Kozlikina E. I., Nekhoroshev A. V., Glechik D. A., Parshin A. V., Parshin V. D., Romanova Y. M., Loschenov V. B. On the possibility of photodynamic inactivation of tracheobronchial tree pathogenic microbiota using methylene blue (in vitro study) // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2022. – Vol. 38. – P. 102753. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2022.102753.
44. Shen X., Dong L., He X., Zhao C., Zhang W., Li X., Lu Y. Treatment of infected wounds with methylene blue photodynamic therapy: An effective and safe treatment method // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2020. – Vol. 32. – P. 102051. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2020.102051.
45. Severino D., Junqueira H. C., Gugliotti M., Gabrielli D. S., Baptista M. S. Influence of Negatively Charged Interfaces on the Ground and Excited State Properties of Methylene Blue. // *Photochemistry and Photobiology*. – 2003. – Vol. 77(5). – P. 459-468. DOI: 10.1562/0031-8655(2003)0770459IONCIO2.0.CO2.
46. Murov S. L., Hug G. L., Carmichael I. Handbook of photochemistry / S. L. Murov, G. L. Hug, I. Carmichael, 2-е изд., New York: M. Dekker. – 1993. – P. 420.
47. Wang W., Zhang W., Sun H., Du Q., Bai J., Ge X., Li C. Enhanced photodynamic efficiency of methylene blue with controlled aggregation state in silica-methylene blue-acetate@tannic acid-iron(III) ions complexes // *Dyes and Pigments*. – 2019. – Vol. 160. – P. 663-670. DOI: 10.1016/j.dyepig.2018.08.068.
48. Dean J. C., Oblinsky D. G., Rafiq S., Scholes G. D. Methylene Blue Exciton States Steer Nonradiative Relaxation: Ultrafast Spectroscopy of Methylene Blue Dimer. // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2016. – Vol. 120(3). – P. 440-454. DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b11847.
49. Coronel A., Catalán-Toledo J., Fernández-Jaramillo H., Godoy-Martínez P., Flores M. E., Moreno-Villoslada I. Photodynamic action of methylene blue subjected to aromatic-aromatic interactions with poly(sodium 4-styrenesulfonate) in solution and supported in solid, highly porous alginate sponges. // *Dyes and Pigments*. – 2017. – Vol. 147. – P. 455-464. DOI: 10.1016/j.dyepig.2017.08.042.
50. Junqueira H. C., Severino D., Dias L. G., Gugliotti M. S., Baptista M. S. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2002. – Vol. 4(11). – P. 2320-2328. DOI: 10.1039/b109753a.
51. Bonneau R., Pottier R., Bagno O., Jousset-Dubien J. pH Dependence of Singlet Oxygen Production in Aqueous Solutions Using Thiazine Dyes as Photosensitizers. // *Photochemistry and Photobiology*. – 1975. – Vol. 21(3). – P. 159-163. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1975.tb06646.x.
52. Patil K., Pawar R., Talap P. Self-aggregation of Methylene Blue in aqueous medium and aqueous solutions of Bu4NBr and urea. // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2000. – Vol. 2(19). – P. 4313-4317. DOI: 10.1039/b005370h.
53. Zhao Z., Malinowski E. R. Determination of the Hydration of Methylene Blue Aggregates and Their Dissociation Constants Using Visible Spectroscopy. // *Applied Spectroscopy*. – 1999. – Vol. 53(12). – P. 1567-1574. DOI: 10.1366/0003702991946028.
40. Dewitt L. M. Preliminary Report of Experiments in the Vital Staining of Tubercles: Studies on the Biochemistry and Chemotherapy of Tuberculosis. IV. *Journal of Infectious Diseases*, 1913, Vol. 1 (12), pp. 68-92. doi: 10.1093/infdis/12.1.68.
41. Wainwright M., Phoenix D. A., Laycock S. L., Wareing D. R. A., Wright P. A. Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, Vol. 2 (160), pp. 177-181. doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb12908.x.
42. Pascual A., Henry M., Briolant S., Charras S., Baret E., Amalvict R., Huyghues Des Etages E., Feraud M., Rogier C., Pradines B. In Vitro Activity of Proverbblue (Methylene Blue) on *Plasmodium falciparum* Strains Resistant to Standard Antimalarial Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, Vol. 5 (55), pp. 2472-2474. doi: 10.1128/AAC.01466-10.
43. Tiganova I. G., Meerovich G. A., Zulufova I. D., Akhlyustina E. V., Ovchinnikov R. S., Solovyev A. I., Romanishkin I. D., Kozlikina E. I., Nekhoroshev A. V., Glechik D. A., Parshin A. V., Parshin V. D., Romanova Y. M., Loschenov V. B. On the possibility of photodynamic inactivation of tracheobronchial tree pathogenic microbiota using methylene blue (in vitro study). *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2022, Vol. 38, pp. 102753. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.102753.
44. Shen X., Dong L., He X., Zhao C., Zhang W., Li X., Lu Y. Treatment of infected wounds with methylene blue photodynamic therapy: An effective and safe treatment method. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2020, Vol. 32, pp. 102051. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.102051.
45. Severino D., Junqueira H. C., Gugliotti M., Gabrielli D. S., Baptista M. S. Influence of Negatively Charged Interfaces on the Ground and Excited State Properties of Methylene Blue. *Photochemistry and Photobiology*, 2003, Vol. 5 (77), pp. 459-468. doi: 10.1562/0031-8655(2003)0770459IONCIO2.0.CO2.
46. Murov S. L., Hug G. L., Carmichael I. Handbook of photochemistry / S. L. Murov, G. L. Hug, I. Carmichael, 2 ed. New York: M. Dekker, 1993, p. 420.
47. Wang W., Zhang W., Sun H., Du Q., Bai J., Ge X., Li C. Enhanced photodynamic efficiency of methylene blue with controlled aggregation state in silica-methylene blue-acetate@tannic acid-iron(III) ions complexes. *Dyes and Pigments*, 2019, Vol. 160, pp. 663-670. doi: 10.1016/j.dyepig.2018.08.068.
48. Dean J. C., Oblinsky D. G., Rafiq S., Scholes G. D. Methylene Blue Exciton States Steer Nonradiative Relaxation: Ultrafast Spectroscopy of Methylene Blue Dimer. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2016, Vol. 3 (120), pp. 440-454. doi: 10.1021/acs.jpcc.5b11847.
49. Coronel A., Catalán-Toledo J., Fernández-Jaramillo H., Godoy-Martínez P., Flores M. E., Moreno-Villoslada I. Photodynamic action of methylene blue subjected to aromatic-aromatic interactions with poly(sodium 4-styrenesulfonate) in solution and supported in solid, highly porous alginate sponges. *Dyes and Pigments*, 2017, Vol. 147, pp. 455-464. doi: 10.1016/j.dyepig.2017.08.042.
50. Junqueira H. C., Severino D., Dias L. G., Gugliotti M. S., Baptista M. S. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2002, Vol. 11 (4), pp. 2320-2328. doi: 10.1039/b109753a.
51. Bonneau R., Pottier R., Bagno O., Jousset-Dubien J. pH Dependence of Singlet Oxygen Production in Aqueous Solutions Using Thiazine Dyes as Photosensitizers. *Photochemistry and Photobiology*, 1975, Vol. 3 (21), pp. 159-163. doi: 10.1111/j.1751-1097.1975.tb06646.x.
52. Patil K., Pawar R., Talap P. Self-aggregation of Methylene Blue in aqueous medium and aqueous solutions of Bu4NBr and urea. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2000, Vol. 19 (2), pp. 4313-4317. doi: 10.1039/b005370h.
53. Zhao Z., Malinowski E. R. Determination of the Hydration of Methylene Blue Aggregates and Their Dissociation Constants Using Visible Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 1999, Vol. 12 (53), pp. 1567-1574. doi: 10.1366/0003702991946028.

54. Moreno-Villoslada I., Torres C., González F., Shibue T., Nishide H. Binding of Methylene Blue to Polyelectrolytes Containing Sulfonate Groups: Binding of Methylene Blue to Polyelectrolytes Containing // *Macromolecular Chemistry and Physics*. – 2009. – Vol. 210(13-14). – P. 1167-1175. DOI: 10.1002/macp.200900042.
55. Moreno-Villoslada I., Torres-Gallegos C., Araya-Hermosilla R., Nishide H. Influence of the Linear Aromatic Density on Methylene Blue Aggregation around Polyanions Containing Sulfonate Groups. // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2010. – Vol. 114(12). – P. 4151-4158. DOI: 10.1021/jp909105r.
56. Aznar A. J., Casal B., Ruiz-Hitzky E., Lopez-Arbeloa I., Lopez-Arbeloa F., Santaren J., Alvarez A. Adsorption of methylene blue on sepiolite gels: spectroscopic and rheological studies. // *Clay Minerals*. – 1992. – Vol. 27(1). – P. 101-108. DOI: 10.1180/claymin.1992.027.1.10.
57. Bergmann K., O'Konski C. T. A Spectroscopic Study of Methylene Blue Monomer, Dimer, and Complexes with Montmorillonite. // *The Journal of Physical Chemistry*. – 1963. – Vol. 67(10). – P. 2169-2177. DOI: 10.1021/j100804a048.
58. Lemin D. R., Vickerstaff T. The aggregation of direct dyes and of Methylene Blue 2B in aqueous solution. // *Transactions of the Faraday Society*. – 1947. – Vol. 43. – №0. – P. 491-502. DOI: 10.1039/TF9474300491.
59. Heger D., Jirkovský J., Klán P. Aggregation of Methylene Blue in Frozen Aqueous Solutions Studied by Absorption Spectroscopy. // *The Journal of Physical Chemistry A*. – 2005. – Vol. 109(30). – P. 6702-6709. DOI: 10.1021/jp050439j.
60. Braswell E. Evidence for trimerization in aqueous solutions of methylene blue. // *The Journal of Physical Chemistry*. – 1968. – Vol. 72(7). – P. 2477-2483. DOI: 10.1021/j100853a035.
61. Klika Z., Čapková P., Horáková P., Valášková M., Malý P., Macháň R., Pospíšil M. Composition, structure, and luminescence of montmorillonites saturated with different aggregates of methylene blue. // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2007. – Vol. 311(1). – P. 14-23. DOI: 10.1016/j.jcis.2007.02.034.
62. Zhikhoreva A. A., Belashov A. V., Serebryakov E. B., Semenova I. V., Vasyutinskii O. S. Photophysical properties of methylene blue in aqueous solution sprayed onto biological surfaces. // *Dyes and Pigments*. – 2022. – Vol. 208. – P. 110789. DOI: 10.1016/j.dye-pig.2022.110789.
63. Walter-Sack I., Rengelshausen J., Oberwittler H., Burhenne J., Mueller O., Meissner P., Mikus G. High absolute bioavailability of methylene blue given as an aqueous oral formulation. // *European Journal of Clinical Pharmacology*. – 2009. – Vol. 65(2). – P. 179-189. DOI: 10.1007/s00228-008-0563-x.
64. Peter C., Hongwan D., Küpfer A., Lauterburg B. H. Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue. // *European Journal of Clinical Pharmacology*. – 2000. – Vol. 56(3). – P. 247-250. DOI: 10.1007/s002280000124.
65. Ryabova A. V., Strattonnikov A. A., Loshchenov V. B. Laser spectroscopy technique for estimating the efficiency of photosensitisers in biological media. // *Quantum Electronics*. – 2006. – Vol. 36(6). – P. 562-568. DOI: 10.1070/QE2006v036n06ABEH013291.
66. Redmond R. W., Gamlin J. N. A Compilation of Singlet Oxygen Yields from Biologically Relevant Molecules. // *Photochemistry and Photobiology*. – 1999. – Vol. 70(4). – P. 391-475. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1999.tb08240.x.
54. Moreno-Villoslada I., Torres C., González F., Shibue T., Nishide H. Binding of Methylene Blue to Polyelectrolytes Containing Sulfonate Groups: Binding of Methylene Blue to Polyelectrolytes Containing ... // *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2009, Vol. 13-14 (210), pp. 1167-1175. doi: 10.1002/macp.200900042.
55. Moreno-Villoslada I., Torres-Gallegos C., Araya-Hermosilla R., Nishide H. Influence of the Linear Aromatic Density on Methylene Blue Aggregation around Polyanions Containing Sulfonate Groups. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2010, Vol. 12 (114), pp. 4151-4158. doi: 10.1021/jp909105r.
56. Aznar A. J., Casal B., Ruiz-Hitzky E., Lopez-Arbeloa I., Lopez-Arbeloa F., Santaren J., Alvarez A. Adsorption of methylene blue on sepiolite gels: spectroscopic and rheological studies. *Clay Minerals*, 1992, Vol. 1 (27), pp. 101-108. doi: 10.1180/claymin.1992.027.1.10.
57. Bergmann K., O'Konski C. T. A Spectroscopic Study of Methylene Blue Monomer, Dimer, and Complexes with Montmorillonite. *The Journal of Physical Chemistry*, 1963, Vol. 10 (67), pp. 2169-2177. doi: 10.1021/j100804a048.
58. Lemin D. R., Vickerstaff T. The aggregation of direct dyes and of Methylene Blue 2B in aqueous solution. *Transactions of the Faraday Society*, 1947, Vol. 0 (43), pp. 491-502. doi: 10.1039/TF9474300491.
59. Heger D., Jirkovský J., Klán P. Aggregation of Methylene Blue in Frozen Aqueous Solutions Studied by Absorption Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2005, Vol. 30 (109), pp. 6702-6709. doi: 10.1021/jp050439j.
60. Braswell E. Evidence for trimerization in aqueous solutions of methylene blue. *The Journal of Physical Chemistry*, 1968, Vol. 7 (72), pp. 2477-2483. doi: 10.1021/j100853a035.
61. Klika Z., Čapková P., Horáková P., Valášková M., Malý P., Macháň R., Pospíšil M. Composition, structure, and luminescence of montmorillonites saturated with different aggregates of methylene blue. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007, Vol. 1 (311), pp. 14-23. doi: 10.1016/j.jcis.2007.02.034.
62. Zhikhoreva A. A., Belashov A. V., Serebryakov E. B., Semenova I. V., Vasyutinskii O. S. Photophysical properties of methylene blue in aqueous solution sprayed onto biological surfaces. *Dyes and Pigments*, 2022, Vol. 208, pp. 110789. doi: 10.1016/j.dye-pig.2022.110789.
63. Walter-Sack I., Rengelshausen J., Oberwittler H., Burhenne J., Mueller O., Meissner P., Mikus G. High absolute bioavailability of methylene blue given as an aqueous oral formulation. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2009, Vol. 2 (65), pp. 179-189. doi: 10.1007/s00228-008-0563-x.
64. Peter C., Hongwan D., Küpfer A., Lauterburg B. H. Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2000, Vol. 3 (56), pp. 247-250. doi: 10.1007/s002280000124.
65. Ryabova A. V., Strattonnikov A. A., Loshchenov V. B. Laser spectroscopy technique for estimating the efficiency of photosensitisers in biological media. *Quantum Electronics*, 2006, Vol. 6 (36), pp. 562-568. doi: 10.1070/QE2006v036n06ABEH013291.
66. Redmond R. W., Gamlin J. N. A Compilation of Singlet Oxygen Yields from Biologically Relevant Molecules. *Photochemistry and Photobiology*, 1999, Vol. 4 (70), pp. 391-475. doi: 10.1111/j.1751-1097.1999.tb08240.x.

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ПРИ АКНЕ

Е.В. Филоненко¹, В.И. Иванова-Радкевич²

¹«Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

²Российский Университет дружбы народов, Москва, Россия

Резюме

Акне – одна из самых распространенных в мире кожных патологий. Ряд исследований показал, что фотодинамическая терапия (ФДТ) безопасна и эффективна при воспалительной и невоспалительной форме акне и может значительно улучшить состояние кожи при этом заболевании. Эффективность ФДТ против акне в основном обусловлена уменьшением количества кожного сала, вырабатываемого сальными железами, за счет снижения их активности в результате прямого фотодинамического повреждения сальных желез, эрадикацией *Cutibacterium acnes* и снижением уровня гиперкератоза. По сравнению с системной медикаментозной терапией лечение тяжелой формы акне методом ФДТ имеет следующие преимущества: быстрый результат, высокая эффективность, высокая селективность, отсутствие системных побочных реакций и лекарственной устойчивости, низкая частота рецидивов. Наиболее часто для ФДТ у больных акне применяют препараты на основе 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК) и ее метилового эфира (МЭ-АЛК). На данный момент не существует единых рекомендаций по режимам ФДТ для лечения этой кожной патологии. Различные исследования демонстрируют высокую эффективность ФДТ с широким диапазоном доз 5-АЛК (3–20%) и МЭ-АЛК (4–16%), световых доз (15–120 Дж/см²) и времени облучения (30–90 мин). Общая тенденция в исследованиях разных авторов сводится к тому, что щадящие низкоинтенсивные режимы ФДТ при акне демонстрируют такую же высокую эффективность при значительном снижении болевых ощущений в процессе облучения и местных кожных реакций (эритема, отек, гиперпигментация).

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, акне, 5-аминолевулиновая кислота, метиловый эфир 5-аминолевулиновой кислоты.

Контакты: Филоненко Е.В., e-mail: elena.filonenko@list.ru

Для цитирования: Филоненко Е.В., Иванова-Радкевич В.И. Фотодинамическая терапия при акне // Biomedical Photonics. – 2023. – Т. 12, № 2. – С. 48–56. doi: 10.24931/2413–9432–2023–12–2–48–56.

PHOTODYNAMIC THERAPY OF ACNE

Filonenko E.V.¹, Ivanova-Radkevich V.I.²

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

²RUDN University, Moscow, Russia

Abstract

Acne is one of the most common skin conditions in the world. A number of studies have shown that photodynamic therapy (PDT) is safe and effective for both inflammatory and non-inflammatory acne and can significantly improve skin conditions in this disease. The effectiveness of PDT against acne is mainly due to a decrease in the amount of sebum produced by the sebaceous glands due to a decrease in their activity as a result of direct photodynamic damage to the sebaceous glands, eradication of *Cutibacterium acnes*, and a decrease in the level of hyperkeratosis. Compared with systemic drug therapy, PDT treatment of severe acne has the following advantages: fast results, high efficiency, high selectivity, no systemic adverse reactions and drug resistance, and low recurrence rate. Most often for PDT in patients with acne, drugs based on 5-aminolevulinic acid (5-ALA) and its methyl ester (ME-ALA) are used. At the moment, there are no unified recommendations on PDT regimens for the treatment of this skin pathology. Various studies demonstrate the high efficiency of PDT with a wide range of doses of 5-ALA (3–20%) and ME-ALA (4–16%), light doses (15–120 J/cm²), and exposure time (30–90 min). The general trend in studies by different authors is that gentle low-intensity PDT regimens for acne demonstrate the same high efficiency with a significant reduction in pain during irradiation and local skin reactions (erythema, edema, and hyperpigmentation).

Key words: photodynamic therapy, acne, 5-aminolevulinic acid, 5-aminolevulinic acid methyl ester.

Contacts: Filonenko E.V., e-mail: elena.filonenko@list.ru

For citations: Filonenko E.V., Ivanova-Radkevich V.I. Photodynamic therapy of acne, *Biomedical Photonics*, 2023, vol. 12, no. 2, pp. 48–56. doi: 10.24931/2413–9432–2023–12–2–48–56.

Акне (обыкновенные угри) – хроническое воспалительное заболевание кожи, характеризующееся чрезмерным ростом микроорганизма *Cutibacterium acnes*, ранее известного как *Propionibacterium acnes* в сальных железах [1].

Эпидемиология

Акне ежегодно заболевают примерно 600 млн человек во всем мире, что ставит эту кожную патологию на восьмое место по распространенности в мире [1]. Акне встречается у 70–75% детей в препубертатном

возрасте – до 12 лет (обычно в 9–11 лет). До 80–85% подростков и молодых взрослых страдают от угрей. В старших возрастных группах процент снижается, но все равно почти каждый десятый взрослый после 25 лет страдает акне [2]. Хотя акне не является опасным для жизни заболеванием, в различных исследованиях сообщалось о серьезных психологических последствиях у пациентов, которые могут влиять на общительность, вызывать фобии и приводить к симптомам депрессии [1].

Этиология и патогенез

Акне может возникать на фоне себореи, которая характеризуется изменением химического состава кожного сала и его повышенным выделением сальными железами. Как следствие, угри возникают на участках кожного покрова, наиболее богатых сальными железами [2]. Патогенез акне включает четыре основных механизма: фолликулярный гиперкератоз (разрастание эпителия с утолщением рогового слоя каналов сальных желез), повышенная секреция кожного сала, колонизация *C. acnes* и локализованное воспаление. При этом считается, что именно колонизация *C. acnes* играет ключевую роль в развитии акне [3]. *C. acnes* является грамположительной, анаэробной, медленно растущей бактерией, которая метаболизирует триглицериды и вырабатывает цитокины, вызывающие воспалительные реакции [3, 4].

Классификация

Согласно классификации МКБ-10 выделяют следующие разновидности акне: L.70.0 Угри обыкновенные; L.70.1 Угри шаровидные; L.70.2 Угри осповидные; L.70.3 Угри тропические; L.70.4 Детские угри; L.70.5 Экскориированные акне; L.70.8 Другие угри и L.70.9 Угри неуточненные. Существует также классификация вульгарных угрей по типу поражения: невоспалительные акне (закрытые и открытые комедоны) и воспалительные акне (поверхностные: папулопустулезные; глубокие: индуративные, конглобатные; осложненные: узловатокистозные, абсцедирующие, флегмонозные, келоидные, рубцующиеся, осложненные синусовыми трактами) [2].

Степень тяжести акне по шкале Leeds учитывает поражения акне на лице, спине и груди и классифицирует их как воспалительные или невоспалительные. Баллы Leeds варьируются от 0 (наименее серьезное поражение) до 10 (наиболее серьезное поражение). Существуют модифицированные шкалы Leeds, максимальный балл по которым составляет 12 [5, 6]. Шкала оценки акне Pillsbury классифицирует степень тяжести акне от 1 (наименее тяжелая) до 4 (наиболее серьезная) [7, 8].

Терапия акне

Традиционная терапия акне включает местные и системные антибиотики, в частности, такие как тетрациклины и изотретиноин, а также ретиноиды [1]. Использование антибиотиков существенно ограничено ростом антибиотикорезистентности *C. acnes*, а использование ретиноидов – их серьезными побочными эффектами, связанными с тератогенностью, спонтанными абортами, раздражением кожи, хейлитом, фотосенсибилизацией, артралгией, гипертриглицеридемией, воспалительными заболеваниями кишечника, панкреатитом и депрессией [3, 9]. Терапия акне весьма продолжительна. По мнению Cunliffe и соавт. для полного разрешения акне легкой и средней степени тяжести необходимо 3–4 года лечения, в случае тяжелой степени акне может потребоваться 8–12 лет. По наблюдениям Cunliffe у 7% пациентов с манифестацией заболевания в подростковом возрасте проявления болезни могут продолжаться до 45–50 лет [10]. При длительном применении антибиотиков возможны разнообразные побочные эффекты, включая дисбактериоз и повышение вероятности заражения оппортунистическими патогенами. Длительное применение изотретиноина может вызвать сухость кожи и слизистых оболочек, повысить уровень липидов в крови, привести к нарушению функции печени, депрессии и суицидальной наклонности. Кроме того, указанный препарат обладает тератогенным действием и не может быть рекомендован у женщин детородного возраста [11]. Местное применение указанных препаратов может вызывать раздражение кожи. Немаловажно и то, что применение их требует соблюдения четкой схемы приема, и в реальной клинической практике часто наблюдается нарушение пациентом правил приема.

Низкая эффективность, побочные эффекты, длительность антибиотикотерапии и лечения ретиноидами являются предпосылками для поиска новых, безопасных и эффективных способов лечения акне. В этом контексте новой тенденцией в лечении акне становятся различные безопасные и эффективные физиотерапевтические процедуры. Одним из возможных альтернативных методов лечения может выступать фотодинамическая терапия (ФДТ) [1, 11].

ФДТ в лечении акне

ФДТ применяется при различных опухолевых и предопухолевых патологиях кожи [12 – 14]. Показано, что ФДТ безопасна и эффективна при воспалительной и невоспалительной форме акне и может значительно улучшить состояние кожи при этом заболевании. Более того, поскольку активные формы кислорода, вырабатываемые при ФДТ, не имеют какой-либо конкретной молекулярной мишени, ФДТ дает возможность легко обойти лекарственную

устойчивость микроорганизмов, что дает преимущество этой терапии перед лечением антибиотиками. Эффективность ФДТ против акне в основном обусловлена уменьшением количества кожного сала, вырабатываемого сальными железами, за счет снижения их активности в результате прямого фотодинамического повреждения сальных желез, эрадикацией *S. acne* и снижением уровня гиперкератоза [1, 15].

Первая редакция Европейских клинических рекомендаций по местной ФДТ (2002) содержала информацию о возможности применения метода для лечения бородавок и акне, причем как наиболее широко используемый препарат для ФДТ была указана 5-амнолевулиновая кислота (5-АЛК). Также рекомендации содержали указание на возможность применения для ФДТ как когерентных, так и не когерентных источников света [16]. К 2008 г. [17] методу ФДТ как способу лечения акне, бородавок и кожного лейшманиоза был присвоен уровень убедительности и доказательности клинических рекомендаций IB (сила рекомендации В, качество доказательств I). В последнем издании Европейских клинических рекомендаций по местной ФДТ тяжелая форма акне остается указана как показание к ФДТ с уровнем IB [11].

Guo и соавт., основываясь на почти 20-летнем опыте клинического применения ФДТ для лечения тяжелой формы акне, делают вывод, что по сравнению с системной медикаментозной терапией лечение тяжелой формы акне методом ФДТ имеет следующие преимущества: быстрый результат, высокая эффективность, высокая селективность, отсутствие системных побочных реакций и лекарственной устойчивости, низкая частота рецидивов [1]. Picone и соавт. [18] также указывают на то, что несомненным преимуществом ФДТ для лечения акне является отсутствие рубцов после лечения.

Интересно, что низкие концентрации фотосенсибилизатора, короткое время инкубации и низкие световые дозы (около 13 Дж/см²) при облучении синим светом обеспечивают кратковременный антимикробный и иммуномодулирующий эффекты, в то время как более высокие световые дозы (до 150 Дж/см²) красного света дополнительно вызывают деструкцию сальных желез. Дополнительным эффектом всех режимов ФДТ, приводящим к уменьшению обструкции фолликулов и уменьшению выделения кожного сала, является усиление обновления эпидермиса [4].

В последние годы было проведено несколько крупных клинических исследований эффективности и безопасности ФДТ при лечении акне, с использованием 5-АЛК и метилового эфира 5-АЛК (МЭ-АЛК). Несмотря на то, что сообщений о применении в клинической практике производных хлоринов для ФДТ пациентов с акне нами найдено не было, исследования *in vitro* и *in vivo* с использованием хлоринов также показали

удовлетворительные результаты [19]. Фталоцианины, насколько нам известно, до настоящего времени не исследовались для лечения этой кожной патологии.

Нами был проведен поиск опубликованных результатов исследований клинической эффективности ФДТ у больных акне за последние 10 лет по базе данных Pubmed. Мы включали в анализ только исследования, проведенные с участием 10 и более пациентов, которым ФДТ проводили в монорежиме с использованием стандартных источников и режимов облучения. Отдельные клинические случаи, представляющие интерес, дополнительно описаны ниже. Проведенный анализ позволил выявить 9 исследований, в которых представлены данные, полученные суммарно при лечении 368 пациентов с акне (табл.). В большинстве исследований для проведения ФДТ применяли 5% 5-АЛК в виде аппликации продолжительностью от 1 до 4 ч. В одном исследовании концентрация 5-АЛК была ниже (3,6%). В 3 исследованиях для ФДТ использовали МЭ-АЛК в стандартной концентрации 16% или в более низкой концентрации (4%). Для облучения чаще всего был использован красный свет. Световые дозы составляли от 15 до 120 Дж/см². Во всех исследованиях было показано общее улучшение течения акне после проведения ФДТ.

Основной задачей в развитии метода ФДТ в области лечения акне на данный момент является поиск режимов, снижающих болевые ощущения и развитие местных реакций в зоне проведения облучения при сохранении высокой эффективности лечения, достигнутой в предшествующих исследованиях.

Ряд исследований демонстрирует значительное снижение интенсивности болевых ощущений во время проведения сеанса облучения, других нежелательных явлений с сохранением высокой эффективности лечения при проведении низкоинтенсивной ФДТ. Так, в исследовании Chen и соавт. [21] ФДТ со световой дозой 120 Дж/см² и плотностью мощности 10 мВт/см² вызвала значительные болевые ощущения, жжение, эритему и отек, сохраняющиеся до 4 сут после ФДТ у 28% пациентов и временную пигментацию у 12% пациентов. Liu и соавт. [3] сообщили о развитии нежелательных явлений (умеренные болевые ощущения, эритема и отек, сохраняющиеся до 5 сут) у 92% пациентов после проведения ФДТ со световой дозой 127 Дж/см² и плотностью мощности 105 мВт/см². В исследовании Calzavara-Pinton и соавт. [22] световая доза была снижена до 37 Дж/см² при плотности мощности 10 мВт/см². О значительных болевых ощущениях или других нежелательных явлениях авторы исследования не сообщают. Только у 4% пациентов с типом кожи IV на месте лечения образовались участки гиперпигментации.

Болевые ощущения снижаются и при применении 5-АЛК и МЭ-АЛК в более низких концентрациях, чем

обычно. Dessinioti и соавт. [24] для проведения ФДТ использовали крем МЭ-АЛК с концентрацией в 4 раза ниже стандартной (4%). Побочные эффекты ограничивались легкой преходящей эритемой в местах лечения и продолжались несколько часов. Отеков, пустул, образования корок или стойкой эритемы не наблюдалось. Пациенты не сообщали о болевых ощущениях. При этом эффективность лечения была довольно высокая: непосредственно после проведения 2 курсов ФДТ количество очагов угревой сыпи снизилось в среднем на 35% от исходного уровня.

Многие исследователи отмечают, что применение для ФДТ акне 5-АЛК в высокой концентрации вызывает существенные побочные явления. Pollock и соавт. [27] сообщают о применении у 10 пациентов с акне 5-АЛК в концентрации 20% с аппликацией 3 ч. Несмотря на достаточно щадящий режим облучения (15 Дж/см^2 , 25 мВт/см^2) у пациентов наблюдались существенные болевые ощущения во время сеанса облучения и эритема. Эффективность лечения при этом была даже ниже, чем при использовании более низких концентраций 5-АЛК: после второго курса лечения в зоне облучения наблюдалось статистически значимое снижение количества воспалительных очагов угревой сыпи по сравнению с исходным уровнем, но не в сравнении с контрольными зонами. В результате проведенного лечения не было получено статистически значимого снижения количества *C. acnes* или уровня выделения кожного сала.

Некоторые исследователи рекомендуют сокращение времени аппликации 5-АЛК как способ снижения интенсивности болезненных ощущений при проведении облучения. Результаты одного недавнего мелко-масштабного исследования, в котором у пациентов с акне использовали 5% крем 5-АЛК, показали, что сокращение времени аппликации с 90 до 30 мин привело к практически полному отсутствию болезненных ощущений во время сеанса при сохранении прежней эффективности лечения [28]. Китайские дерматологи также приводят результаты исследований, демонстрирующие, что проведение ФДТ с концентрацией 5-АЛК 3–5% и более коротким временем аппликации (30 мин) может эффективно улучшить состояние при вульгарных угрях средней и тяжелой степени с минимальными болевыми ощущениями и другими нежелательными реакциями [29].

Использование вентилятора, охлаждение холодным воздухом и возможные короткие перерывы в освещении во время ФДТ также могут быть использованы для уменьшения боли, связанной с лечением. Обычно до и после ФДТ можно применять местную анестезию [30].

Отдельная перспективная область применения ФДТ у пациентов с акне – это проведение ФДТ после неэффективного лечения заболевания другими мето-

дами, в частности, после обострения заболевания на фоне лечения изотретионином. Несмотря на то, что широкомасштабных исследований эффективности ФДТ у этой группы пациентов не проводилось, в литературе описано несколько интересных клинических случаев. Liu J. и соавт. [31] сообщают об успешном лечении пациента с обострением акне после лечения изотретионином. Обострение акне развивается у небольшой части пациентов в начале перорального приема изотретиноина. Клинически это обычно проявляется болезненными, изъязвленными и геморрагическими поражениями. Традиционной терапией в данном случае является прием внутрь кортикостероидов. Но у отдельных пациентов такая терапия также может сопровождаться побочными эффектами, такими как нарушение обмена веществ, угнетение иммунной функции и другими нежелательными явлениями. Авторы сообщают о молодом мужчине с обострением акне после приема изотретиноина, которого лечили ФДТ (2-часовая аппликация 5% 5-АЛК, облучение $633 \pm 6 \text{ нм}$, 42 мВт/см^2 , $75,6 \text{ Дж/см}^2$, 7 курсов). Результат лечения был оценен как полное очищение кожи с отличным косметическим результатом. Picone и соавт. [18] сообщают о другом случае успешного излечения обострения акне на фоне приема изотретиноина. ФДТ проводили пациенту с язвенными и геморрагическими поражениями от угревой сыпи на лице и туловище с обострением заболевания после начала лечения изотретионином, не реагирующим на системный прием преднизолона в сочетании с местным применением клиндамицина и дезинфицирующих средств. Пациенту были проведены 6 курсов ФДТ с МЭ-АЛК (аппликация 16% мази) с облучением красным светом (630 нм, световая доза 39 Дж/см^2). При 6-месячном наблюдении у пациента не было обнаружено активных поражений, только рубцы, при этом во время и после каждого сеанса лечения не сообщалось ни о каких побочных эффектах.

Заключение

В последние годы активно развивается метод лечения акне – ФДТ, демонстрирующий высокую эффективность и удовлетворительный профиль безопасности. Для ФДТ акне применяют 5-АЛК и МЭ-АЛК. Оба препарата показывают высокую эффективность в отношении как воспалительных, так и не воспалительных поражений при легкой, средней и тяжелой формах акне, а также после неэффективного лечения акне другими методами, в частности, после обострения заболевания на фоне лечения изотретионином. Основным направлением развития ФДТ больных акне является поиск и отработка схем низкоинтенсивной ФДТ с целью минимизации болевых ощущений и местных реакций на облучение.

Таблица

Сводные данные о результативности применения фотодинамической терапии у больных акне

Table

Summary of the effectiveness of photodynamic therapy of acne

Авторы Authors	Число пациен- тов No. of patients	Фотосенсиби- лизатор Photosensitizer	Режим облучения Light wavelength	Количество курсов ФДТ Number of PDT courses	Эффективность ФДТ PDT efficiency	Нежелательные реакции Adverse reactions
Asayama- Kosaka et al., 2014 [20]	11	5% 5-АЛК, ап- пликация 2 ч 5% 5-ALA, application 2 h	Широкополосное облучение (600– 1100 нм), 15 Дж/см ² , 60 мВт/см ² Broadband irradiation (600–1100 nm), 15 J/cm ² , 60 mW/cm ²	Однократно Once	Средний балл GAGS снизился с 22,1±3,8 в начале исследования до 19,4 через 1 мес, до 16,3 через 3 мес после ФДТ The mean GAGS score decreased from 22.1±3.8 at baseline to 19.4 at 1 month and to 16.3 at 3 months after PDT Ten out of 11 patients experienced local side effects such as erythema (from minimal to mild severity). All adverse events resolved within a few days without post-inflammatory hyperpigmentation	У 10 из 11 пациентов наблюдались местные побочные эффекты: эритема (от минимальной до легкой степени тяжести). Все нежелательные явления прошли в течение нескольких дней без поствоспалительной гиперпигмен- тации
Chen et al., 2015 [21]	Группа ФДТ – 25 пациентов (группа срав- нения: только облучение PDT group - 25 patients (comparison group: only irradiation)	5% 5-АЛК, ап- пликация 1,5 ч 5% 5-ALA, application 1,5 h	633±10 нм, 120 Дж/см ² , 10 мВт/см ² 633±10 нм, 120 J/cm ² , 10 mW/cm ²	1 раз в нед в течение 3 нед 1 time per week, 3 weeks	Общий показатель эффективно- сти ФДТ составил 54,2% против 21,6% в контрольной группе через 2 нед после лечения; 75,0% против 43,5% через 4 нед; 83,3% против 56,5% через 6 нед, соот- ветственно The overall success rate in the PDT group was 54.2% vs. 21.6% in the control group 2 weeks after treatment, 75.0% vs. 43.5% after 4 weeks, and 83.3% vs. 56.5% after 6 weeks, respectively.	В группе ФДТ 7 пациентов испытывали жжение, боль, эритему и отек в тече- ние 1–4 сут после ФДТ. У 3 пациентов наблюдалась временная гиперпиг- ментация, у 2 –высыпания на коже. В контрольной группе у 2 пациентов наблюдались покраснение и сухость лица. In the PDT group, 7 patients experienced burning, pain erythema, and edema within 1–4 days after PDT. Three patients had transient hyperpigmentation. 2 patients developed skin rashes. In the control group, redness and dryness of the face were observed in 2 patients

Calzavara-Pinton et al., 2013 [22]	92	16% МЭ-АЛК, аппликация 3–4 ч 16% MAL, application 3–4 h	635±18 нм, 37 Дж/см ² , 10 мВт/см ² 635±18 нм, 37 J/cm ² , 10 mW/cm ²	От 2 до 4 курсов с интервалом 2–4 нед From 2 to 4 courses with an interval of 2–4 weeks	Общее улучшение течения акне было оценено как выраженное у 71 (77.2%) пациента, умеренное у 12 (13.0%) пациентов и слабое у 9 (9.8%) пациентов. У 67 (72.8%) пациентов косметический результат оценен как отличный The overall improvement in the course of acne was assessed as pronounced in 71 (77.2%) patients, moderate in 12 (13.0%) patients, and weak in 9 (9.8%) patients. In 67 (72.8%) patients, the cosmetic result was rated as excellent	У 4 пациентов с типом кожи IV на месте лечения образовались участки гиперпигментации In 4 patients with skin type IV, areas of hyperpigmentation formed at the treatment site
Liu et al., 2014 [3]	Группа ФДТ – 50 пациентов (2 группы сравнения: импульсное облучение и только облучение LED) PDT group – 50 patients (2 comparison groups: pulsed irradiation and LED irradiation only)	5% 5-АЛК, аппликация 1 ч 5% 5-ALA, application 1 h	633±6 нм, 127 Дж/см ² , 105 мВт/см ² 633±6 нм, 127 J/cm ² , 105 mW/cm ²	1 раз в неделю очищения очагов на 90% и более (в среднем количество курсов 3±1,5) 1 time per week, until the foci are cleared by 90% or more (on average, the number of courses is 3 ± 1.5)	Через 1 мес после начала лечения у 60% пациентов отмечено полное очищение кожи, у 32% – умеренное улучшение, у 8% – небольшое улучшение 1 month after the start of treatment, 60% of patients have complete skin cleansing, 32% have a moderate improvement, and 8% have a slight improvement	У 46 (92%) пациентов после каждого курса ФДТ были отмечены легкая или умеренная боль, эритема и отек, которые проходили в течение 5–7 сут. У 2 (4%) пациентов наблюдалась гиперпигментация, прошедшая через 1 мес In 46 (92%) patients after each course of PDT, mild or moderate pain, erythema and edema were noted, which disappeared within 5–7 days. In 2 (4%) patients, hyperpigmentation was observed, which disappeared after 1 month
Tao et al., 2016 [23]	125	3,6% 5-АЛК, аппликация 1,5 ч 3,6% 5-ALA, application 1,5 h	633 нм, 126 Дж/см ² , 66 мВт/см ² 633 нм, 126 J/cm ² , 66 mW/cm ²	1 раз в 2 нед, 3 курса 1 time in 2 weeks, 3 courses	Общие показатели эффективности составили 1,6%, 24,8%, 68,8%, 89,6% и 88,8% через 2, 4, 6, 8 и 12 нед после начала лечения, соответственно The overall success rates were 1.6%, 24.8%, 68.8%, 89.6% and 88.8% at 2, 4, 6, 8 and 12 weeks after the start of treatment, respectively	У 40 (32%) пациентов наблюдалось обострение угревой сыпи до 2 и 3 курса лечения, которое проходило после 3 курса лечения. Побочные явления были умеренными и обратимыми In 40 (32%) patients, an exacerbation of acne was observed before the 2nd and 3rd courses of treatment, which disappeared after the 3rd course of treatment. Side effects were moderate and reversible

Dessinioti et al., 2016 [24]	12	4% МЭ-АЛК, аппликация 1 ч 4% MAL, application 1 h	635 нм, 37 Дж/см ² 635 nm, 37 J/cm ²	1 раз в нед, 2 курса 1 time per week, 2 courses	Количество очагов угревой сыпи снизилось в среднем на 35% от исходного уровня на 1-й неделе после двух процедур и в среднем на 30% при 4-недельном наблюдении The number of acne lesions decreased by an average of 35% from baseline at week 1 after two treatments and by an average of 30% at a 4-week follow-up	Пациенты хорошо переносили ФДТ. Побочные эффекты ограничивались легкой проходящей эритемой в местах лечения и продолжались несколько часов. Отеков, пустул, образования корок или стойкой эритемы не наблюдалось. Пациенты не сообщали о болевых ощущениях The patients tolerated PDT well. Side effects were limited to mild transient erythema at the treatment sites and lasted several hours. Edema, pustules, crusting, or persistent erythema were not observed. Patients did not report pain
Hong et al., 2013 [25]	20 У каждого пациента 2 режима лечения (правая и левая сторона лица) 20 Each patient has 2 treatment regimens (right and left side of the face)	16% МЭ-АЛК, аппликация 3 ч 16% MAL, application 3 h	1-й режим: красный свет (длина волны не указана), 22 Дж/см ² , 34 мВт/см ² 2-й режим: импульсное облучение, 530-750 нм, 2,5 мс, длительность с задержкой 10 мс, 8-10 Дж/см ² 1 mode: red light (wavelength not specified), 22 J/cm ² , 34 mW/cm ² 2 mode: pulsed irradiation, 530-750 nm, 2.5 ms, duration with a delay of 10 ms, 8-10 J/cm ²	1 раз в 2 нед., 3 курса 1 time in 2 weeks, 3 courses	В результате воздействия обоих режимов количество очагов угревой сыпи уменьшилось. Результаты были чуть лучше при воздействии первого режима As a result of exposure to both regimens, the number of acne foci decreased. The results were slightly better when exposed to mode 1	Побочные явления были умеренными и обратимыми Side effects were moderate and reversible
Yew et al., 2016 [26]	15	5% 5-АЛК, аппликация 3 ч 5% 5-ALA, application 3 h	630 нм, 37 Дж/см ² , 38 мВт/см ² 630 nm, 37 J/cm ² , 38 mW/cm ²	Однократно Once	К концу 12-недельного наблюдения количество воспалительных поражений сократилось на 64,2%, невоспалительных поражений – на 24,3% In general, by the end of the 12-week follow-up, the number of inflammatory lesions decreased by 64.2%, the number of non-inflammatory lesions by 24.3%	Незначительные болевые ощущения Minor pain
Guo et al., 2023 [11]	18	5% 5-АЛК, аппликация 1-1,5 ч 5% 5-ALA, application 1-1.5 h	630 нм, 60 Дж/см ² 630 nm, 60 J/cm ²	1 раз в нед, 2 курса 1 time in 2 weeks, 2 courses	Показатель эффективности в течение 3 нед наблюдения увеличился с 27,78% до 55,56%, затем до 83,33% The success rate from 1 to 3 weeks of observation increased from 27.78% to 55.56%, and then to 83.33%	Побочные явления были умеренными и обратимыми Side effects were moderate and reversible.

ЛИТЕРАТУРА

1. De Annunzio S.R., Costa N.C.S., Mezzina R.D., Graminha M.A.S., Fontana C.R. Chlorin, Phthalocyanine, and Porphyrin Types Derivatives in Phototreatment of Cutaneous Manifestations: A Review // *Int J Mol Sci.* – 2019. – Vol. 20(16). – P. 3861. doi:10.3390/ijms20163861.
2. Баринова А.Н. Этиология, патогенез, классификация и клиническая картина вульгарных угрей. Современный взгляд на проблему // *Российский семейный врач.* – 2018. – Т. 22, № 3. – С. 14-22. doi 10.17816/RFD2018314-22
3. Liu L.H., Fan X., An Y.X., Zhang J., Wang C.M. & Yang, R.Y. Randomized trial of three phototherapy methods for the treatment of acne vulgaris in Chinese patients // *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine.* – 2014. – Vol. 30(5). – P. 246-253. <https://doi.org/10.1111/phpp.12098>
4. Mackay A.M. The evolution of clinical guidelines for antimicrobial photodynamic therapy of skin // *Photochem Photobiol Sci.* – P. 2022. – Vol. 21(3). – P. 385-395. doi:10.1007/s43630-021-00169-w
5. Chiang A., Hafeez F., Maibach H.I. Skin lesion metrics: role of photography in acne // *Journal of dermatological treatment.* – 2014. – Vol. 25(2). – P. 100-105.
6. O'Brien S.C., Lewis J.B., Cunliffe W.J. The Leeds revised acne grading system // *Journal of dermatological treatment.* – 1998. – Vol. 9(4). – P. 215-220.
7. Tan J. K. L. et al. Evaluation of essential clinical components and features of current acne global grading scales // *Journal of the American Academy of Dermatology.* – 2013. – Vol. 69(5). – P. 754-761.
8. Purdy, S. & Deberker D. Acne vulgaris // *BMJ clinical evidence.* – 2008. – P. 1714.
9. Yilmaz S. Toxicity Genotoxicity, and Carcinogenicity of tretinoin // *Current molecular pharmacology.* – 2023. – Vol. 16(1). – P. 83-90. <https://doi.org/10.2174/187446721566-6220520143124>
10. Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, et al. *Dermatologiya Fitzpatricka v klinicheskoy praktike* // Moscow: Izdatel'stvo Panfilova. – 2015. (In Russ.)
11. Guo, Y., Zeng, M., Yuan, Y., Yuan, M., Chen, Y., Yu, H., Liu, R., Ruan, Z., Xie, Q., Jiao, X., & Lu, T. Photodynamic therapy treats acne by altering the composition of the skin microbiota. *Skin research and technology: official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) and International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS)* // *International Society for Skin Imaging.* – 2023. – Vol. 29(1). – P. e13269. <https://doi.org/10.1111/srt.13269>
12. Filonenko E.V., Ivanova-Radkevich V.I. Photodynamic therapy of psoriasis // *Biomedical Photonics.* – 2023. – Vol. 12(1). – P. 28-36. doi: 10.24931/2413-9432-2023-12-1-28-36.
13. Filonenko E.V., Ivanova-Radkevich V.I. Photodynamic therapy in the treatment of extramammary Paget disease // *Biomedical Photonics.* – 2022. – Vol. 3. – P. 24-34. doi: 10.24931/2413-9432-2022-11-3-24-34.
14. Filonenko E.V., Ivanova-Radkevich V.I. Photodynamic therapy in the treatment of mycosis fungoides // *Biomedical Photonics.* – 2022. – Vol. 11(1). – P. 27-37 (in Russian). doi: 10.24931/2413-9432-2022-11-1-27-37.
15. Wen, X., Li, Y., & Hamblin, M. R. Photodynamic therapy in dermatology beyond non-melanoma cancer: An update // *Photodiagnosis and photodynamic therapy.* – 2017. – Vol. 19. – P. 140-152. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.06.010>
16. Morton C.A., Brown S.B., Collins S., Ibbotson S., Jenkinson H., Kurwa H., Langmack K., McKenna K., Moseley H., Pearse A.D., Stringer M., Taylor D.K., Wong G., Rhodes L.E. Guidelines for topical photodynamic therapy: Report of a workshop of the British Photodermatology Group // *The British Journal of Dermatology.* – 2002. – Vol. 146(4). – P. 552-567. doi: 10.1046/j.1365-2133.2002.04719.x.
17. Morton, C.A., McKenna, K.E., Rhodes, L.E. & British Association of Dermatologists Therapy Guidelines and Audit Subcommittee and the British Photodermatology Group Guidelines for topical photodynamic therapy: Update // *The British Journal of Dermatology.* – 2008. – Vol. 159(6). – P. 1245-1266. doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08882.x.
18. Picone V., Potestio L., Fabbrocini G., Monfrecola G. & Marasca C. A case of acne fulminans successfully treated with photodynamic

REFERENCES

1. De Annunzio S.R., Costa N.C.S., Mezzina R.D., Graminha M.A.S., Fontana C.R. Chlorin, Phthalocyanine, and Porphyrin Types Derivatives in Phototreatment of Cutaneous Manifestations: A Review. *Int J Mol Sci*, 2019, vol. 20(16), p. 3861. doi:10.3390/ijms20163861.
2. Barinova A.N. Etiology, pathogenesis, classification and clinical picture of vulgar acne. Modern view of the problem. *Russian Family Doctor*, 2018, vol. 22(3), pp. 14-22. doi 10.17816/RFD2018314-223.
3. Liu L.H., Fan X., An Y.X., Zhang J., Wang C.M. & Yang, R.Y. Randomized trial of three phototherapy methods for the treatment of acne vulgaris in Chinese patients. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 2014, vol. 30(5), pp. 246-253. <https://doi.org/10.1111/phpp.12098>
4. Mackay AM. The evolution of clinical guidelines for antimicrobial photodynamic therapy of skin. *Photochem Photobiol Sci*, 2022, vol. 21(3), pp. 385-395. doi:10.1007/s43630-021-00169
5. Chiang A., Hafeez F., Maibach H.I. Skin lesion metrics: role of photography in acne. *Journal of dermatological treatment*, 2014, vol. 25(2), pp. 100-105.
6. O'Brien S.C., Lewis J.B., Cunliffe W.J. The Leeds revised acne grading system. *Journal of dermatological treatment*, 1998, vol. 9(4), pp. 215-220.
7. Tan J. K. L. et al. Evaluation of essential clinical components and features of current acne global grading scales. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2013, vol. 69(5), pp. 754-761.
8. Purdy, S. & Deberker D. Acne vulgaris. *BMJ clinical evidence*, 2008, p. 1714.
9. Yilmaz S. Toxicity Genotoxicity, and Carcinogenicity of tretinoin. *Current molecular pharmacology*, 2023, vol. 16(1), pp. 83-90. <https://doi.org/10.2174/187446721566-6220520143124>
10. Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, et al. *Dermatologiya Fitzpatricka v klinicheskoy praktike*. Moscow: Izdatel'stvo Panfilova, 2015. (In Russ.)
11. Guo, Y., Zeng, M., Yuan, Y., Yuan, M., Chen, Y., Yu, H., Liu, R., Ruan, Z., Xie, Q., Jiao, X. & Lu, T. Photodynamic therapy treats acne by altering the composition of the skin microbiota. *Skin research and technology: official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) and International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS)*. *International Society for Skin Imaging*, 2023, vol. 29(1), p. e13269. <https://doi.org/10.1111/srt.13269>
12. Filonenko E.V., Ivanova-Radkevich V.I. Photodynamic therapy of psoriasis. *Biomedical Photonics*, 2023, vol. 12(1), pp. 28-36. doi: 10.24931/2413-9432-2023-12-1-28-36.
13. Filonenko E.V., Ivanova-Radkevich V.I. Photodynamic therapy in the treatment of extramammary Paget disease. *Biomedical Photonics*, 2022, vol. 3, pp. 24-34. doi: 10.24931/2413-9432-2022-11-3-24-34.
14. Filonenko E.V., Ivanova-Radkevich V.I. Photodynamic therapy in the treatment of mycosis fungoides. *Biomedical Photonics*, 2022, vol. 11(1), pp. 27-37. doi: 10.24931/2413-9432-2022-11-1-27-37.
15. Wen, X., Li, Y. & Hamblin M. R. Photodynamic therapy in dermatology beyond non-melanoma cancer: An update. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2017, vol. 19, pp. 140-152. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.06.010>
16. Morton C.A., Brown S.B., Collins S., Ibbotson S., Jenkinson H., Kurwa H., Langmack K., McKenna K., Moseley H., Pearse A.D., Stringer M., Taylor D.K., Wong G., Rhodes L.E. Guidelines for topical photodynamic therapy: Report of a workshop of the British Photodermatology Group. *The British Journal of Dermatology*, 2002, vol. 146(4), pp. 552-567. doi: 10.1046/j.1365-2133.2002.04719.x.
17. Morton, C.A., McKenna, K.E., Rhodes, L.E. & British Association of Dermatologists Therapy Guidelines and Audit Subcommittee and the British Photodermatology Group Guidelines for topical photodynamic therapy: Update. *The British Journal of Dermatology*, 2008, vol. 159(6), pp. 1245-1266. doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08882.x.
18. Picone V., Potestio L., Fabbrocini G., Monfrecola G. & Marasca C. A case of acne fulminans successfully treated with photodynamic

- therapy // *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*. – 2022. – Vol. 38(4). – P. 401-403. <https://doi.org/10.1111/phpp.12761>
19. Wang Y.Y., Ryu A.R., Jin S., Jeon Y.M., Lee M.Y. Chlorin e6-Mediated Photodynamic Therapy Suppresses P. acnes-Induced Inflammatory Response via NFκB and MAPKs Signaling Pathway // *PLoS ONE*. – 2017. – Vol. 12. – P. e0170599. doi: 10.1371/journal.pone.0170599.
 20. Asayama-Kosaka S, Akilov OE, Kawana S. Photodynamic Therapy with 5% delta-Aminolevulinic Acid is Safe and Effective Treatment of Acne Vulgaris in Japanese Patients // *Laser Ther.* – 2014. – Vol. 23. – P. 115-120.
 21. Chen X., Song H., Chen S., Zhang J., Niu G., Liu X. Clinical efficacy of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in the treatment of moderate to severe facial acne vulgaris // *Exp Ther Med.* – 2015. – Vol. 10(3). – P. 1194-1198. doi:10.3892/etm.2015.2638
 22. Calzavara-Pinton P.G., Rossi M.T., Aronson E., Sala R. & Italian Group For Photodynamic Therapy // A retrospective analysis of real-life practice of off-label photodynamic therapy using methyl aminolevulinate (MAL-PDT) in 20 Italian dermatology departments. Part 1: inflammatory and aesthetic indications // *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. – 2013. – Vol. 12(1). – P. 148-157. <https://doi.org/10.1039/c2pp25124h>
 23. Tao S.Q., Xia R.S., Li F., Cao L., Fan H., Fan Y. & Yang, L.J. Efficacy of 3.6% topical ALA-PDT for the treatment of severe acne vulgaris // *European review for medical and pharmacological sciences*. – 2016. – Vol. 20(2). – P. 225-231.
 24. Dessinioti C., Masouri S., Drakaki E., Katsambas A. & Antoniou, C. Short-contact, low-dose methyl aminolaevulinate photodynamic therapy for acne vulgaris // *The British journal of dermatology*. – 2016. – Vol. 175(1). – P. 215. <https://doi.org/10.1111/bjd.14460>
 25. Hong J.S., Jung J.Y., Yoon J.Y. & Suh D.H. Acne treatment by methyl aminolevulinate photodynamic therapy with red light vs. intense pulsed light // *International journal of dermatology*. – 2013. – Vol. 52(5). – P. 614-619. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2012.05673.x>
 26. Yew Y.W., Lai Y.C., Lim Y.L., Chong W.S. & Theng C. Photodynamic Therapy With Topical 5% 5-Aminolevulinic Acid for the Treatment of Truncal Acne in Asian Patients // *Journal of drugs in dermatology: JDD*. – 2016. – Vol. 15(6). – P. 727-732.
 27. Pollock B., Turner D., Stringer M.R., Bojar R.A., Goulden V., Stables G.I. & Cunliffe, W.J. Topical aminolaevulinic acid-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris: a study of clinical efficacy and mechanism of action // *The British journal of dermatology*. – 2004. – Vol. 151(3). – P. 616-622. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2004.06110.x>
 28. Zhang J., Zhang X., He Y. et al. Photodynamic therapy for severe facial acne vulgaris with 5% 5-aminolevulinic acid vs 10% 5-aminolevulinic acid: A split-face randomized controlled study // *J Cosmet Dermatol*. – 2020. – Vol. 19(2). – P. 368-374.
 29. Wang P., Wang B., Zhang L., Liu X., Shi L., Kang X., Lei X., Chen K., Chen Z., Li C., Zhang C., Tu P., Pan M. Ju Q., Man X., Lu Y., Yu N., Li Y., Zhu H., Zhang R., Wang, X. Clinical practice Guidelines for 5-Aminolevulinic acid photodynamic therapy for acne vulgaris in China // *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. – 2023. – Vol. 41. – P. 103261. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103261>
 30. Zeitouni N.C., Bhatia N., Ceilley R.I., Cohen J.L., Del Rosso J.Q., Moore, A.Y., Munavalli G., Pariser D.M., Schlesinger T., Siegel D.M., Willey A. & Goldman, M.P. Photodynamic Therapy with 5-aminolevulinic Acid 10% Gel and Red Light for the Treatment of Actinic Keratosis, Nonmelanoma Skin Cancers, and Acne: Current Evidence and Best Practices // *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*. – 2021. – Vol. 14(10). – P. E53-E65.
 31. Liu J., Shi L., Zhang L., Liu X., Zhang H., Zhang Y., Wang P., Zhang G., Zhou Z. & Wang X. Acute acne flare following isotretinoin administration successfully treated by 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy // *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. – 2022 – Vol. 39. – P. 102893. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.22.102893>
 - therapy. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 2022, vol. 38(4), pp. 401-403. <https://doi.org/10.1111/phpp.12761>
 19. Wang Y.Y., Ryu A.R., Jin S., Jeon Y.M., Lee M.Y. Chlorin e6-Mediated Photodynamic Therapy Suppresses P. acnes-Induced Inflammatory Response via NFκB and MAPKs Signaling Pathway. *PLoS ONE*, 2017, vol. 12, p. e0170599. doi: 10.1371/journal.pone.0170599.
 20. Asayama-Kosaka S, Akilov OE, Kawana S. Photodynamic Therapy with 5% delta-Aminolevulinic Acid is Safe and Effective Treatment of Acne Vulgaris in Japanese Patients. *Laser Ther*, 2014, vol. 23, pp. 115-120.
 21. Chen X., Song H., Chen S., Zhang J., Niu G., Liu X. Clinical efficacy of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in the treatment of moderate to severe facial acne vulgaris. *Exp Ther Med*, 2015, vol. 10(3), pp. 1194-1198. doi:10.3892/etm.2015.2638
 22. Calzavara-Pinton P.G., Rossi M.T., Aronson E., Sala R. & Italian Group For Photodynamic Therapy. A retrospective analysis of real-life practice of off-label photodynamic therapy using methyl aminolevulinate (MAL-PDT) in 20 Italian dermatology departments. Part 1: inflammatory and aesthetic indications. *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 2013, vol. 12(1), pp. 148-157. <https://doi.org/10.1039/c2pp25124h>
 23. Tao S.Q., Xia R.S., Li F., Cao L., Fan H., Fan Y. & Yang, L.J. Efficacy of 3.6% topical ALA-PDT for the treatment of severe acne vulgaris. *European review for medical and pharmacological sciences*, 2016, vol. 20(2), pp. 225-231.
 24. Dessinioti C., Masouri S., Drakaki E., Katsambas A. & Antoniou, C. Short-contact, low-dose methyl aminolaevulinate photodynamic therapy for acne vulgaris. *The British journal of dermatology*, 2016, vol. 175(1), pp. 215. <https://doi.org/10.1111/bjd.14460>
 25. Hong J.S., Jung J.Y., Yoon J.Y. & Suh D.H. Acne treatment by methyl aminolevulinate photodynamic therapy with red light vs. intense pulsed light. *International journal of dermatology*, 2013, vol. 52(5), pp. 614-619. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2012.05673.x>
 26. Yew Y.W., Lai Y.C., Lim Y.L., Chong W.S. & Theng C. Photodynamic Therapy With Topical 5% 5-Aminolevulinic Acid for the Treatment of Truncal Acne in Asian Patients. *Journal of drugs in dermatology: JDD*, 2016, vol. 15(6), pp. 727-732.
 27. Pollock B., Turner D., Stringer M.R., Bojar R.A., Goulden V., Stables G.I. & Cunliffe, W.J. Topical aminolaevulinic acid-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris: a study of clinical efficacy and mechanism of action. *The British journal of dermatology*, 2004, vol. 151(3), pp. 616-622. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2004.06110.x>
 28. Zhang J., Zhang X., He Y. et al. Photodynamic therapy for severe facial acne vulgaris with 5% 5-aminolevulinic acid vs 10% 5-aminolevulinic acid: A split-face randomized controlled study. *J Cosmet Dermatol*, 2020, vol. 19(2), pp. 368-374.
 29. Wang P., Wang B., Zhang L., Liu X., Shi L., Kang X., Lei X., Chen K., Chen Z., Li C., Zhang C., Tu P., Pan M. Ju Q., Man X., Lu Y., Yu N., Li Y., Zhu H., Zhang R., Wang, X. Clinical practice Guidelines for 5-Aminolevulinic acid photodynamic therapy for acne vulgaris in China. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2023, vol. 41, p. 103261. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103261>
 30. Zeitouni N.C., Bhatia N., Ceilley R.I., Cohen J.L., Del Rosso J.Q., Moore, A.Y., Munavalli G., Pariser D.M., Schlesinger T., Siegel D.M., Willey A. & Goldman, M.P. Photodynamic Therapy with 5-aminolevulinic Acid 10% Gel and Red Light for the Treatment of Actinic Keratosis, Nonmelanoma Skin Cancers, and Acne: Current Evidence and Best Practices. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, 2021, vol. 14(10), pp. E53-E65.
 31. Liu J., Shi L., Zhang L., Liu X., Zhang H., Zhang Y., Wang P., Zhang G., Zhou Z. & Wang X. Acute acne flare following isotretinoin administration successfully treated by 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2022, vol. 39, p. 102893. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.22.102893>



ЖИВАЯ
ЭНЕРГИЯ
СВЕТА



Фоторан е₆®

НОВЫЙ РОССИЙСКИЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

- ✓ Действующее вещество природного происхождения
- ✓ Быстрое накопление в патологической ткани – 1,5-3 часа
- ✓ Отсутствие аллергических реакций
- ✓ Длительное хранение без потери активности вещества – 3 года
- ✓ Отсутствие гепато и нефротоксичности, низкая фототоксичность
- ✓ Низкая стоимость

ПАРТНЁРЫ:



Национальный медицинский
исследовательский центр онкологии



Адигейский республиканский
онкологический диспансер



СККОД



ФБУЗ Челябинский областной клинический
центр онкологии и ядерной медицины

По вопросам
приобретения

+7 (495) 659-64-93
+7 (499) 726-26-98



ФОТОДИТАЗИН®

[fotoditazin]

ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОР ХЛОРИНОВОГО РЯДА



«ФОТОДИТАЗИН®» гель — РУ № ФСР 2012/13043 от 03.02.2012 г.

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

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

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

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“»

 www.fotoditazin.com
www.фотодитазин.рф

ООО «БЕТА-ГРАНД»

123056, г. Москва, ул. Красина, д. 27, стр. 2
Тел.: +7 (499) 253-61-81, +7 (499) 250-40-00
E-mail: fotoditazin@mail.ru

