

BIOMEDICAL PHOTONICS

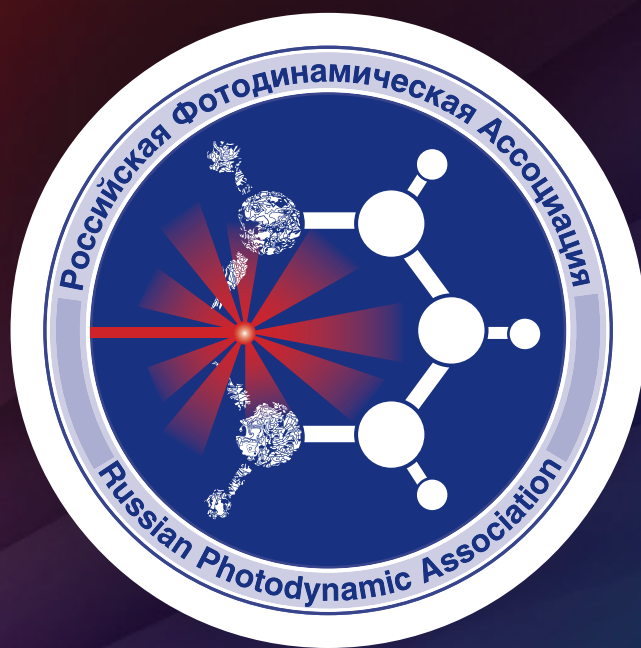
Том 13, № 3, 2024

В номере:

- Влияние фотобиомодуляционной терапии с использованием лазера (650 нм) на состояние десен после кюретажа
- Новый катионный хлорин как потенциальный агент для антимикробной фотодинамической терапии
- Результаты микрохирургической резекции глиобластом под эндоскопическим и флуоресцентным контролем
- Морфологическая оценка эффективности лечения инфицированных ран высокоинтенсивным импульсным широкополосным облучением
- Фотодинамическая терапия в профилактике ВПЧ–индуцированных рецидивов предрака и начального рака шейки матки

BMP

Российская Фотодинамическая Ассоциация



www.pdt-association.com

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.

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

Editorial staff:

Chief of the editorial staff	Ivanova-Radkevich V.I.
Science editor professor	Mamontov A.S.
Literary editor	Moiseeva R.N.
Translators	Kalyagina N.A.
Computer design	Kreneva E.I.
Desktop publishing	Shalimova N.M.

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.

BIOMEDICAL PHOTONICS

BIOMEDICAL PHOTONICS –

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

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

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

Редакция:

Зав. редакцией	Иванова-Радкевич В.И.
Научный редактор	проф. Мамонтов А.С.
Литературный редактор	Моисеева Р.Н.
Переводчики	Калягина Н.А.
Компьютерный дизайн	Кренева Е.И.
Компьютерная верстка	Шалимова Н.М.

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 содержа-
ние рекламных материалов.

В статьях представлена точка зрения авторов,
которая может не совпадать с мнением редак-
ции журнала.

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

Полное или частичное воспроизведение матери-
алов, 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 Москов-
ского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова
(Москва, Россия)

Странадко Е.Ф., доктор медицинских наук, профессор, руководитель Отде-
ления лазерной онкологии и фотодинамической терапии ФГБУ «Государствен-
ный 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)

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Влияние фотобиомодуляционной терапии с использованием лазера (650 нм) на состояние десен после кюретажа

D.T. Wahyuningtya, S.D. Astuti,
P. Widiyanti, E.M. Setiawatie, M.S. Amir,
D. Arifianto, A.K. Yaqubi, A. Apsari, Y. Susilo,
A. Syahrom

4

Новый катионный хлорин как потенциальный агент для антимикробной фотодинамической терапии

Н.В. Суворов, В.В. Щелкова, Е.В. Русанова,
З.Т. Багателья, Д.А. Дьяченко,
А.П. Афаниутин, Ю.Л. Васильев, Е.Ю. Дьячкова,
И.К. Сантана Сантос, М.А. Грин

14

Результаты микрохирургической резекции глиобластом под эндоскопическим и флуоресцентным контролем

А.Ю. Рында, В.Е. Олюшин, Д.М. Ростовцев,
Ю.М. Забродская, Г.В. Папаян

20

Морфологическая оценка эффективности лечения инфицированных ран высокоинтенсивным импульсным широкополосным облучением

В.С. Егоров, А.Ю. Филимонов, С.М. Чудных,
Х.А. Абдувосидов, И.А. Чекмарева, О.В. Паклина,
Л.М. Баранчугова, А.В. Кондратьев

31

Фотодинамическая терапия в профилактике ВПЧ-индуцированных рецидивов предрака и начального рака шейки матки

О.И. Трушина, Е.В. Филоненко,
Е.Г. Новикова, С.В. Мухтарулина

42

ORIGINAL ARTICLES

Effect of photobiomodulation therapy with low level laser on gingival in post-curettage patients

Wahyuningtya D.T., Astuti S.D., Widiyanti P.,
Setiawatie E.M., Guspiari K., Amir M.S.,
Arifianto D., Yaqubi A.K., Apsari A., Susilo Y.,
Syahrom A.

4

New cationic chlorin as potential agent for antimicrobial photodynamic therapy

Suvorov N.V., Shchelkova V.V., Rysanova E.V.,
Bagatelia Z.T., Diachenko D.A., Afaniutin A.P.,
Vasil'ev Yu.L., Diachkova E.Yu.,
Santana Santos I.C., Grin M.A.

14

Results of microsurgical resection of glioblastomas under endoscopic and fluorescent control

Rynda A.Yu., Olyushin V.E., Rostovtsev D.M.,
Zabrodskaya Yu.M., Papayan G.V.

20

Morphological evaluation of the effectiveness of treating infected wounds with high-intensity pulsed broadband irradiation

Egorov V.S., Filimonov A.Yu., Chudnykh S.M.,
Abduvosidov Kh.A., Chekmareva I.A., Paklina O.V.,
Baranchugova L.M., Kondrat'ev A.V.

31

Photodynamic therapy in the prevention of HPV-induced recurrences of precancer and initial cancer of the cervix

Trushina O.I., Filonenko E.V.,
Novikova E.G., Mukhtarulina S.V.

42

EFFECT OF PHOTOBIMODULATION THERAPY WITH LOW LEVEL LASER ON GINGIVAL IN POST-CURETTAGE PATIENTS

Wahyuningtya D.T.¹, Astuti S.D.¹, Widiyanti P.¹, Setiawatie E.M.¹, Guspiari K.¹, Amir M.S.¹,
 Arifianto D.¹, Yaqubi A.K.¹, Apsari A.², Susilo Y.³, Syahrom A.⁴

¹Airlangga University, Surabaya, Indonesia

²Hang Tuah University, Surabaya, Indonesia

³Soetomo University, Surabaya, Indonesia

⁴Universiti Teknologi Malaysia, Johor Bahru, Malaysia

Abstract

This research investigate how red laser treatment affects individuals who have had chemotherapy's ability to heal their wounds. The sixty individuals were split up into groups for treatment and control. On the third and fifth days, the treatment group had reduced signs of inflammation and enhanced recovery. The results point to possible advantages of red laser treatment for recovery after a cure. 60 patients were divided into 30 therapy groups and 30 control groups to investigate the role of photo biomodulation therapy in wound healing. The therapy groups had 60 seconds of light biomodulation therapy utilizing a 650 nm red laser at a dose of 3,5 J/cm². The gingival index, prostaglandin E2, human defensin 2, and interleukin-1 β levels in the laser-treated and control groups' saliva were measured. The level of significance was set at $p < 0.05$. The result of this study on day zero after curettage showed that subjects treated with 650 nm laser levels of prostaglandin E2, human defensin 2, and interleukin-1 β remained essentially the same as the control group subjects without therapy. On the third and fifth days after curettage, subjects treated with 650 nm laser showed lower levels of prostaglandin E2, human defensin 2, and interleukin-1 β . They exhibited substantial differences from the control group subjects without therapy. The gingival index on post-curettage patients showed no significant differences between laser therapy and control groups on day zero but significantly differed on the third and fifth days. Photobiomodulation therapy with a red laser can help the healing of post-curettage subjects according to the analysis' findings of the gingival index, prostaglandin E2, human defensin 2, and interleukin-1 β .

Key words: post curettage wound healing, 650 nm red laser, photo biomodulation, pro-inflammatory mediator.

For citations: Wahyuningtya D.T., Astuti S.D., Widiyanti P., Setiawatie E.M., Guspiari K., Amir M.S., Arifianto D., Yaqubi A.K., Apsari A., Susilo Y., Syahrom A. Effect of photobiomodulation therapy with low level laser on gingival in post-curettage patients, *Biomedical Photonics*, 2024, vol. 13, no. 3, pp. 4–13. doi: 10.24931/2413-9432-2024-13-3-4-13

Contacts: Astuti S.D., e-mail: suryanidyah@fst.unair.ac.id

ВЛИЯНИЕ ФОТОБИОМОДУЛЯЦИОННОЙ ТЕРАПИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛАЗЕРА (650 НМ) НА СОСТОЯНИЕ ДЕСЕН ПОСЛЕ КЮРЕТАЖА

D.T. Wahyuningtya¹, S.D. Astuti¹, P. Widiyanti¹, E.M. Setiawatie¹, K. Guspiari¹, M.S. Amir¹,
 D. Arifianto¹, A.K. Yaqubi¹, A. Apsari², Y. Susilo³, A. Syahrom⁴

¹Airlangga University, Surabaya, Indonesia

²Hang Tuah University, Surabaya, Indonesia

³Soetomo University, Surabaya, Indonesia

⁴Universiti Teknologi Malaysia, Johor Bahru, Malaysia

Резюме

Изучено влияние лазера, излучающего в красной области спектра, на способность к заживлению ран после химиотерапии. В исследовании участвовали 60 человек, которые были разделены на две группы: лечения и контрольная. Пациенты из группы лечения получали 60-секундную световую биомодуляционную терапию с использованием красного лазера с длиной волны 650 нм и световой дозой 3,5 Дж/см². Были измерены десневой индекс, уровни простагландина E2, человеческого дефензина 2 и интерлейкина-1 β в слюне пациентов из обеих групп. Принятый уровень значимости $p < 0,05$. Результаты исследования после кюретажа показали, что у пациентов, получивших воздействие лазером с длиной волны 650 нм, уровни простагландина E2, человеческого дефензина 2 и интерлейкина-1 β оставались практически такими же, как и у пациентов контрольной группы без терапии. На 3-й и 5-й дни после

кюретажа у пациентов группы лечения наблюдались более низкие уровни простагландина E2, человеческого дефензина 2 и интерлейкина-1 β , чем в контрольной группе. Десневой индекс у пациентов после кюретажа не выявил существенных различий между группами лечения и контрольной группой в день лечения, но значительно отличался на 3-й и 5-й дни. В эти сроки в группе лечения наблюдалось уменьшение признаков воспаления и ускорение выздоровления. Результаты указывают на возможные преимущества лечения лазером, излучающим в красной области спектра, для восстановления после химиотерапии. Фотобиомодуляционная терапия красным лазером может способствовать процессам заживления у пациентов после кюретажа согласно результатам анализа десневого индекса, простагландина E2, человеческого дефензина 2 и интерлейкина-1 β .

Ключевые слова: заживление ран после кюретажа, лазер 650 нм, фотобиомодуляция, провоспалительный медиатор.

Для цитирования: Wahyuningtya D.T., Astuti S.D., Widiyanti P., Setiawatie E.M., Guspiari K., Amir M.S., Arifianto D., Yaqubi A.K., Apsari A., Susilo Y., Syahrom A. Влияние фотобиомодуляционной терапии с использованием лазера (650 нм) на состояние десен после кюретажа // Biomedical Photonics. – 2024. – Т. 13, № 3. – С. 4–13. doi: 10.24931/2413-9432-2024-13-3-4-13

Contacts: Astuti S.D., e-mail: suryanidyah@fst.unair.ac.id

Introduction

Curettage is a type of periodontal therapy that makes use of a tool or hand instrument to remove plaque, classified deposits, and smooth cementum around degenerated teeth. This is because plaque and deposits combined with bacteria cause periodontal tissue damage and stimulate the inflammatory process in the gingival tissue, which can damage the alveolar bone and cause tooth mobility in severe cases. After curettage, the healing process is a series of natural processes that occur in body cells damaged by trauma or anatomical traces. This process begins somewhere between the second and fifth days after curettage therapy. A healthy vascular system will hasten to heal. If there is a bacterial infection in the process, the process will be delayed or will not occur at all. The increased dentistry using lasers over the last few decades has led to amazing technological advancements that can be used in dental care. The CO₂, Neodymium: Yttrium-Aluminum-Garnet (Nd: YAG), and Erbium: Yttrium-Aluminum-Garnet (EYAG) lasers are the ones most frequently used to treat peri-dental illness (Er: YAG) [1]. During treatments like gingivectomy, curettage, and the elimination of melanin pigmentation, it is frequently utilized to remove calculus, simplify bone surgery, and lessen soft tissue injury [2]. In addition to providing an antiseptic effect on non-vascularized tissues (such as bone and dentin) and overcoming antibiotic resistance in subgingival biofilms, lasers are hypothesized to enhance decontamination during treatment [3,4].

Oral disorders like tooth decay, periodontitis, and gingivitis affect 3.47 billion people worldwide, causing non-fatal impairment. Patient assessment of treatment requirements and clinical results is crucial for maintaining oral health. Healthy living, including dental health, improves the quality of life, labour productivity, and learning capacity [5]. The absence of clinically detectable inflammation determines periodontal health and bacterial plaque plays a role in the development and maintenance of inflammation. Risk factors like diabetes,

smoking, and hereditary variables can affect periodontal disease progression. Compliance with oral hygiene practices and periodontal maintenance can impact local bacterial infections [6].

The wound healing process consists of several phases from hemostasis, inflammation, cell movement, matrix-forming, and remodeling [7]. The wound healing process caused by periodontitis will differ from person to person, as many factors will influence the healing of wounds, including aging and medication use, tobacco use, and bacterial illnesses in which endotoxins can cause an extended rise of pro-inflammatory cytokines, interleukins-1 β (IL-1 β) and TNF-, thereby prolonging the inflammatory phase and other factors that can inhibit the wound healing process. Antibiotics are quite effective in the treatment of infections and can also prevent the onset of pain due to the wound healing process, even though the optimal dose has yet to be discovered [8].

Photo-biomodulation therapy (PBM) is a low-intensity light irradiation therapy used for medical and dermatological conditions [9]. It involves ingestion of photon energy by body tissues' natural chromophores. Near-infrared and red light are used for therapy in animals and patients, as haemoglobin and melanin absorb blue light at specific wavelengths [10].

Recent media interest has focused on photodynamic therapy (PDT), a minimally invasive therapeutic method, as a novel cancer treatment option. When a photosensitizer is exposed to certain light wavelengths, it combines with molecular oxygen to produce reactive oxygen species, which cause cell death in the target tissue [11]. Longer wavelengths of light (red and infrared) penetrate the tissue more effectively because the amount of light that is absorbed by the tissue reduces as the wavelength increases. The «network optical window» is the term for the 600 to 1200 nm wavelength range. The skin is more sensitive to light because the shorter wavelength (600 nm) penetrates less tissue and absorbs more energy. Longer wavelengths (850 nm) lack the energy to sufficiently create reactive oxygen species

and excite oxygen in the singlet state. The highest tissue permeability consequently occurs between 600 and 850 nm [12].

The 405 nm and 649 nm diode laser has been demonstrated in aPDT15 and PBM investigations to expedite the proliferative process of wound healing following molar extraction based on the results of histological and immunohistochemical testing [1]. In a different study, 'bio stimulators' were low-level lasers and light-emitting diodes (LEDs) with less power than surgical lasers. A sort of light therapy called photo-biomodulation therapy (PBMT) encourages the growth of epithelial cells, an anti-inflammatory response, pain alleviation, and the prevention of scarring, all of which are necessary for wound healing [13]. Laser is a non-invasive, effective, safe, and inexpensive medical device based on aPDT and PBMT therapy for response accelerators for healing dental and oral diseases. Laser parameters and dose influence therapy results. Low-level laser therapy (LLLT) has short-term advantages in lowering pocket depth, but medium-term effects are not significant. Long-term benefits are unknown due to methodological weaknesses and a lack of studies [14]. Research on LLLT for wound healing continues [15].

Wound healing in the oral cavity involves repairing palate and gingival tissue without scar tissue, influenced by early inflammation, reduced immune mediators, fewer blood vessels, bone marrow-derived cells, quick re-epithelialization, and fibroblast proliferation [16, 17]. Microbial infection of the oral cavity is a common risk factor for periodontal disease, which can lead to gingival inflammation and if not treated promptly, may affect the periodontium in general [18]. Bacteria that cause gingival inflammation are *Streptococcus*, *Haemophilus* and *Neisseria species* [8]. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella intermedia*, and *Selenomonas species* are among the most prevalent subgingival bacterial species [11,19]. The duration of the natural wound healing process is mainly caused by both local and systemic disorders [20].

Local and systemic factors, such as poor blood flow, infection, and foreign substances, affect wound healing. To accelerate healing, therapeutic mechanisms like photo-biomodulation laser therapy and non-invasive approaches are needed. This study aims to determine the method of laser diode therapy and the irradiation time in root canal treatment.

Materials and Methods

Ethical Approval

The Ethics Committee of the Faculty of Dentistry at Airlangga University has accepted this study with the ethical number [551/HRECC.FODM/IX/2021].

Light Source

LLLT is a therapeutic advance that uses low-level infrared light spectrum lasers. The effect is related to tissue bio-stimulation, with photoelectric, photo energetic, and photochemical reactions eliciting a therapeutic response [21]. Photo biomodulation, on the other hand, uses a 650 nm-wavelength diode laser to induce a quicker healing process, as well as to reduce pain and inflammation by stimulating the cell's response to light. The diode laser spectrum and power were tested with the Jasco CT-10 and Thorlabs S140C chromate detectors. The results of laser characterization showed that the laser spectrum was 650 ± 0.05 nm, the power value was stable at 12.02 ± 0.01 mW, and the beam area was 0.20 ± 0.03 with a stable temperature of 32 °C during therapy. Therapy was carried out at a distance of 1 cm from the wound with an energy density of 3.5 J/cm² and a long exposure time of 60 seconds.

Treatments

The study involved 60 patients from the Dental and Oral Hospital's Periodontology section, divided into 30 therapy and control groups. The therapy group received a 650-nm red laser photo biomodulation therapy for 60 seconds, followed by curettage. Saliva samples were collected and transferred to ELISA plates. The samples were then blocked with 10% ovalbumin and 100 mL of hBD-1 mouse monoclonal antibody. The study aimed to understand the effects of laser therapy on gingival and salivary index in patients with periodontal cancer.

The study focuses on the characterization of a 650 nm diode laser used for photo biomodulation therapy, with the control group not receiving any treatment. The second phase is an experimental study examining the impact of specific factors on other variables. This study looked at gingival index and pro-inflammatory mediators in response to different types of therapy, specifically the administration of 650 nm diode laser photo biomodulation therapy and wound healing with antibiotics, in order to assess the level of effectiveness of the red-light diode laser or its effect on the tissue wound healing process in post-curettage patients. The test group patients underwent conventional non-surgical treatment associated with a laser irradiation session to eliminate the bacterial biofilm from the root surface and stop the inflammatory process. Prostaglandin E2 (PGE2), interleukin-1 β (IL1 β), and human beta defensin 2 (HBD2) concentrations were evaluated using the enymed-linked immunosorbent assay and the gingival index.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Testing

By dilution, 120 l of Standard Solution into 120 l of standard diluent was used to create the standard and wash buffer. In deionized or distilled water, the wash buffer was diluted with 15 ml of the wash buffer concentrate before being mixed with 300 ml of water.

The sample well plate and standard well (not the blank, control well) each received 50 l of the standard, 40 l of the sample, 10 l of anti-PGE2 antibody (or anti-IL1 β antibody or anti-Human antibody defensins 2), and 50 l of streptavidin-HRP. The wells were sealed with sealer and incubated for 60 minutes at 37 °C before being rinsed three times with wash buffer. The next step is to add 50 l of each of the following solutions to each well: 50 liters each of the substrate solutions A and B, 10 minutes of incubation at 37°C, and 50 l of stop solution (blue color will turn yellow). An Elisa reader operating at a wavelength of 450 nm was used to measure the optical density (OD) following the addition of the Stop Solution. Fig. 1 shows the diluting procedure for the sample.

Measurement of Gingival Index

Starting points included the third and fifth days after curettage, as well as the zero-day before and after, for dental index testing. A gingival index score of post-curettage research subjects on day zero, third and fifth following laser therapy is how the gingival index examination was done. The gingival index (GI), a metric developed by Leo and Stillness, is employed to evaluate the presence and degree of gingivitis in a community, group, or person. The following criteria were used to determine the gingival state and the gingival index score: 0 indicates normal gingiva, 1 indicates a mild inflammation with mild discoloration and mild edoema but no bleeding on probing, and 2 indicates a significant inflammation with redness, edoema, and glossy skin; bleeding on probing. 3 = significant redness, edoema, ulceration, and a propensity for spontaneous bleeding; severe inflammation.

Data Analysis

This study gathered information on the gingival index, proinflammatory markers such as PGE2, IL 1 β , and HBD-2, as well as instrumentation tests using a diode laser. The Kolmogorov-Smirnov test was used to determine whether the data were normally distributed. Individual sample T-Test can be used to do statistical analyses if the data are regularly distributed. The interval/ratio data scale, unpaired independent data groups, normal distribution of group data, and the absence of outliers in group data are necessary preconditions for using the independent sample T-Test.

Results

IL 1 β protein testing was conducted to monitor inflammation during the wound healing process, both before extraction (day 0) and after extraction (day three and day five post-wound occurrence). In general, the observation results indicated a decrease in the levels of IL 1 β . The normality test, performed using Kolmogorov-Smirnov, demonstrated that the data exhibited a normal distribution for the control group (without photobiomodulation therapy) with a significance level

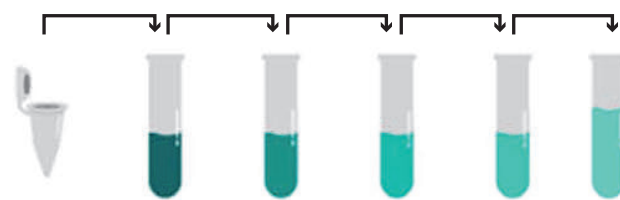


Рис. 1. Методика стандартного разведения.
 Fig. 1. Standard dilution.

(a) of 0.300, while for the photobiomodulation therapy group, it was 0.115. Table 1 shows that post-extraction on day 1, day 3, and day five significantly impacted IL 1 β levels ($p < 0.05$). All control group subjects exhibited higher IL 1 β levels when compared to the photobiomodulation therapy group.

Enzyme-linked immunosorbent assay PGE2 test results

PGE2 protein levels fell from day zero to day five, which are significant mediators in the etiology of periodontitis and indications of inflammation in the healing phase of wounds. The independent T-Test was used to compare the PGE2 levels in the control and treatment groups to see if there were any variations in the mean values between the two unrelated sample groups. On the first, third, and fifth days, T-Tests were performed on all data collected in the control and treatment groups. On the first, third, and fifth post-curettage days, the mean PGE2 values in the control and treatment groups are displayed in Table 1.

PGE2 levels were measured in post-curettage subjects using the expression test, and the results showed greater levels in the laser therapy group but no statistically significant difference from the control group. The levels of PGE2 were lower in the laser therapy group on the first, third-, and fifth days following curettage, which was substantially different from the levels in the control group. Figure 2 shows visually the amounts of prostaglandin E2 at the zero, first, third-, and fifth-days post-curettage in patients.

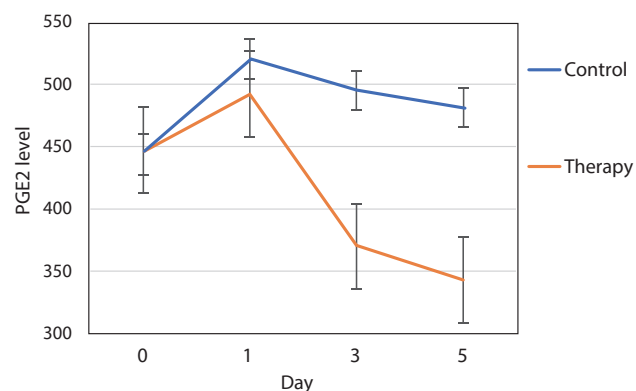


Рис. 2. Уровни простагландина E2 в контрольной группе и группе лечения.

Fig. 2. Prostaglandin E2 levels against the control and therapy groups.

Таблица 1

Работа тока у больных с признаками воспаления кист поджелудочной железы и без признаков воспаления кист поджелудочной железы

Table 1

Electric current work in patients with signs of inflammation of pancreatic cysts and without signs of inflammation of pancreatic cysts

Дни Days	Группа Group	N	Значение Average	SD	Независимый Т-тест Independent T Test
0	Контроль Control	30	444.17	10.54	p = 0.277
	Лечение Therapy	30	447.20	10.85	
1	Контроль Control	30	521.13	36.79	p = 0.030*
	Лечение Therapy	30	492.20	26.86	
3	Контроль Control	30	495.93	36.78	p = 0.031*
	Лечение Therapy	30	369.77	36.90	
5	Контроль Control	30	481.73	40.02	p = 0.001*
	Лечение Therapy	30	343.13	22.33	

*Различия статистически значимы

*There is a different meaning

Enzyme-Linked Immunosorbent assay test results in Human defensin 2

Human defensin 2 protein levels, crucial for wound healing, decreased from day zero to day five, indicating a decline in pathogenic bacteria colonization in the oral cavity. The amount of human defensin 2 proteins in the control and therapy groups were compared using the Independent T-Test to determine the average difference between the two groups of unrelated samples. T-Tests were run for the control and treatment groups on the first, third, and fifth days. Table 2 shows the distribution of the mean values of human defensin 2 in the control and treatment groups in post-curettage patients on the zero, first, third, and fifth days after curettage.

Based on the test results, the therapy group's expression of Human Defensin 2 had higher levels on day zero of the wound-healing process in post-curettage individuals, but it was not statistically different from the control group. On the first, third, and fifth days, there was a substantially different expression of defensin 2 in the 650 nm red laser therapy group compared to the control group. Human Defensin 2 levels in post-curettage patients are depicted graphically in Figure 3 at zero, first, third-, and fifth days following curettage.

Enzyme-Linked Immunosorbent assay test results Interleukin-1 β

Measurements of interleukin-1 β levels revealed a decrease from day zero to day fifth. Then the results of assessing interleukin-1 β protein levels in the control and therapy groups were compared using the Independent

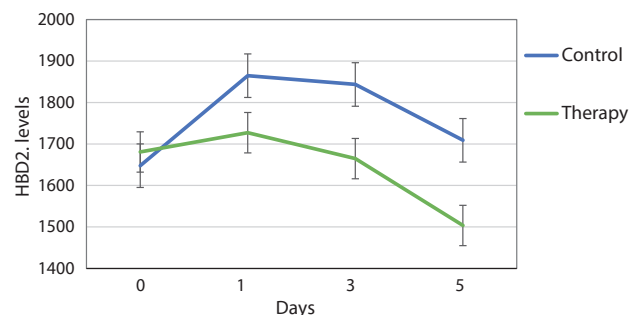


Рис. 3. Сравнение уровней дефензина 2 человека в контрольной группе и группе лечения в период с 0-го по 5-й дни.

Fig. 3. Comparison of Human defensin 2 levels against the control and therapy groups on zero-day to the fifth day.

T-Test to determine the average difference between the two groups of unrelated samples. T-Tests for the control and treatment groups were run on the first, third, and fifth days. Table 3 displays the distribution of interleukin-1 β in the control and treatment groups for post-curettage patients on the zero, first, third, and fifth days after curettage.

According to the test results, the therapy group's post-curettage subjects had greater levels of interleukin-1 β at day zero of the wound healing process than the control group, although this difference was not significant ($p=0.127$). On day first ($p=0.043$), third ($p=0.029$), and fifth ($p=0.027$), interleukin-1 β expression in the 650 nm red laser treatment group was substantially different from that of the control group. Human Defensin 2 levels in post-curettage patients are depicted graphically in Figure 4 at zero, first, third-, and fifth days following curettage.

Gingival Index Test Results
The gingival index examination was conducted on day zero, with further assessments after three days. The condition index was calculated using measurements of

fluid discharge, color, shape alterations, acute bleeding, and bleeding time. The study found that the control and therapy groups had mildly inflammatory gingival health on day zero, with the treatment group experiencing

Таблица 2
Сравнение результатов независимого выборочного Т-теста для уровней человеческого дефенсина 2 с контрольной группой и группой лечения в 1-й, 3-й и 5-й день после кюретажа

Table 2
Comparison of the results of the Independent Sample T-Test for levels of Human defensin 2 against the control group and the therapy group on day first, day third, and day fifth after curettage

Дни Days	Группа Group	N	Значение Average	SD	Независимый Т-тест Independent T Test
0	Контроль Control	30	1647.70	38.60	p = 0.687
	Лечение Therapy	30	1680.83	73.58	
1	Контроль Control	30	1864.77	32.51	p = 0.000*
	Лечение Therapy	30	1727.30	85.09	
3	Контроль Control	30	1843.60	38.79	p = 0.018*
	Лечение Therapy	30	1664.80	32.62	
5	Контроль Control	30	1709.00	43.12	p = 0.001*
	Лечение Therapy	30	1503.63	88.49	

*Различия статистически значимы
*There is a different meaning

Таблица 3
Сравнение результатов независимого выборочного Т-теста уровней интерлейкина-1β с контрольной группой и группой терапии на 0-й, 1-й, 3-й и 5-й дни после кюретажа

Table 3
Comparison of the results of the Independent Sample T-Test of interleukin-1β levels against the control group and the therapy group on the zero, first, third, and fifth days after curettage

Дни Days	Группа Group	N	Значение Average	SD	Независимый Т-тест Independent T Test
0	Контроль Control	30	1822.20	41.38	p = 0.127
	Лечение Therapy	30	1811.53	51.00	
1	Контроль Control	30	2223.97	88.53	p = 0.043*
	Лечение Therapy	30	1904.20	60.66	
3	Контроль Control	30	2086.90	91.59	p = 0.029*
	Лечение Therapy	30	1801.83	53.29	
5	Контроль Control	30	2000.30	87.03	p = 0.027*
	Лечение Therapy	30	1774.07	48.65	

*Различия статистически значимы
*There is a different meaning

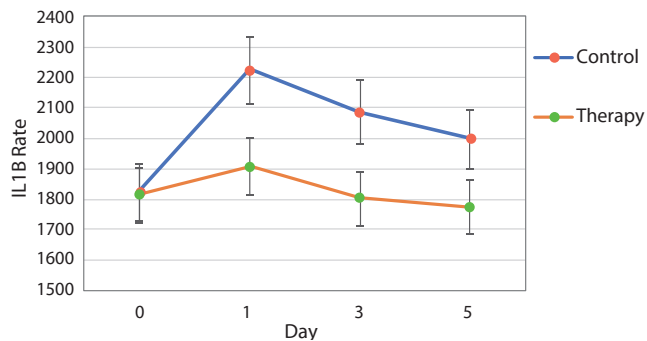


Рис. 4. Сравнение уровней интерлейкина-1 β в контрольной группе и группе лечения в период с 0-го по 5-й дни.

Fig. 4. Comparison of interleukin-1 β levels against the control and treatment groups on zero-day to the fifth day.

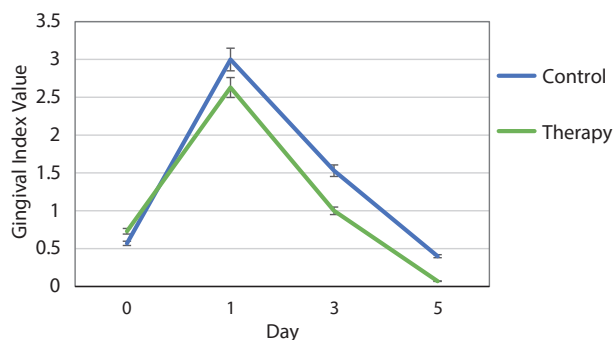


Рис. 5. Сравнение показателей десневого индекса в контрольной группе и группе лечения.

Fig. 5. Comparison of gingival index scores in the control group and the therapy group.

Таблица 4

Результаты U-теста Манна-Уитни на 0-й, 1-й, 3-й и 5-й дни после кюретажа

Table 4

Mann-Whitney U test results on zero, first, third, and fifth days after curettage

Дни Days	Группа Group	N	Значение Average	Критерий Манна-Уитни Mann-Whitney U
0	Контроль Control	30	0.57	p = 0.573
	Лечение Therapy	30	0.73	
1	Контроль Control	30	3.00	p = 0.000*
	Лечение Therapy	30	2.63	
3	Контроль Control	30	1.53	p = 0.001*
	Лечение Therapy	30	1.00	
5	Контроль Control	30	0.40	p = 0.002*
	Лечение Therapy	30	0.07	

*Различия статистически значимы

*There is a different meaning

severe inflammatory health. On day 3, the control group deteriorated, while the treatment group showed moderately inflammatory health, with an average score of 1. The treatment group had a lower gingival index score of 0.07 on the fifth day, compared to the control group's average gingival score of 0.4, which showed that both groups were in good health. Figure 5 depicts the evaluation of the gingival index in the laser treatment and control groups on the first, second, third-, and fifth days following curettage.

The average number of gingival indices varies, as seen in Figure 9, but the shape and distribution of the data are the same. The median difference's significance is not evident. Since the Gingiva Index measurement in the control and therapy groups contains interval data, the Mann-Whitney U method is utilized for the Non-Parametric Test. The findings of the Mann-Whitney U test in Table 4 indicate that there is a different interpretation of the gingival index on the zero, first, third-, and fifth days following curettage in the control group compared to the treatment group in post-curettage patients ($p < 0.05$).

Discussion

Photobiomodulation therapy (PBMT) is a therapeutic approach using low-level infrared light spectrum lasers to stimulate tissue [22]. It works by absorbing photons by molecular photo acceptors or chromophores [23]. Effective tissue penetration occurs between 650 and 1200 nanometers, with absorption and scattering stronger in the blue section [24]. Most LLLT in animals and patients uses red light and near-infrared [25].

This study aims to expedite healing and reduce pain and inflammation using photo biomodulation therapy using a diode laser with a characterization wavelength of 649 ± 0.05 . The red laser light's energy and wavelength are 12.02 ± 0.01 mW at 650 nm [26]. The low-power dose of 3.5 J/cm^2 is crucial for the therapy, and the laser diode power characteristic test ensures maximum power stability at 60 seconds. The therapy is suitable for patients with various conditions [27]. Periodontal disease, causing tooth loss in adults, is primarily caused by bacterial buildup near teeth. Gingivitis and periodontitis are two types. Root planning and scaling are interconnected processes [28].

Curettage is a periodontal treatment that involves a change in microbiota and decreased inflammation. If inflammation persists, curettage can be performed. The depth of periodontal pockets can be significantly increased, depending on the damage. With proper care and maintenance, most patients can regain a 4 mm to 5 mm pocket depth. The study involved 60 patients, with 30 in the therapeutic group and 30 in the control group. After curettage treatment, the therapeutic group received red laser irradiation on the first day, followed by the control group on the third and fifth days. Samples were collected at each visit.

The collected samples were then tested for PGE2, IL-1 β , and HBD-2 levels using an ELISA kit with 96 well plates. The ELISA kit used in this study has a sensitivity of 1.28 ng/L for PGE2, 10.07 pg/mL for IL-1 β , and 5.31 ng/L for HBD-2. One of the immunological techniques that aim to determine or measure levels of protein expression activity/response and immune reaction status from individual reactions/immune responses is the ELISA technique [30].

Wound healing involves fibrosis and regeneration, with fibrosis replacing damaged tissue with connective tissue [11, 31]. Laser biomodulation therapy enhances phagocytosis and lysosomal activity, activating Cytochrome Oxidase C and triggering downstream signaling cascades that promote protein synthesis, anti-inflammatory reactions, antioxidants, and cell proliferation [32].

Prostaglandin E2, a pro-inflammatory mediator, promotes the synthesis of inflammatory substances, particularly in periodontitis, particularly IL-1 β [33]. Periodontitis patients have higher PGE2 levels, which can be blocked with anti-inflammatory medications to slow disease progression and reduce bone resorption, with faster decline in therapy groups [34]. Then the levels of PGE2, IL-1 β , and HBD-2 in the samples were assessed using an ELISA kit with 96 well plates. The ELISA kit used in this study has a sensitivity of 1.28 ng/L for PGE2, 10.07 pg/mL for IL-1 β , and 5.31 ng/L for HBD-2.

The ELISA technique assesses immune response status and protein expression activity. The study found that IL-1 β concentration in gingival crevicular fluid (GCF) decreased after non-surgical periodontal therapy [35]. Laser phototherapy inhibited IL-1 β production, affecting

wound healing [36]. The study found differences in IL-1 β protein levels during post-curettage wound healing using red laser photo biomodulation therapy at a 650 nm wavelength. The therapy group showed a faster decline than the control group [37].

The study shows that red laser photo biomodulation therapy significantly enhances wound healing in post-curettage patients, with a lower gingival index and faster decline in inflammation compared to the control group, indicating a positive healing effect [38]. Laser therapy wavelengths, particularly 600-700 nm, can stimulate cell proliferation and differentiation, regenerate tissue, reduce inflammation, and alleviate pain in chromophore cells [39]. The study demonstrates that red laser photo biomodulation therapy at 650 nm can accelerate wound healing in post-curettage patients, with significant reductions in test parameters [40]. This therapy accelerates fibroblast proliferation, which produces collagen and influences the epithelialization process, ultimately determining the outcome of wound healing [41].

According to the findings of statistical tests, there was a difference in post-curettage wound healing time between patients receiving photo biomodulation therapy and patients who did not receive photo biomodulation therapy with a probability value (p-value) of 0.05 in each pro-inflammatory mediator test (IL-1 β , PGE2, and hB-2) and gingival index studies. If the P value is less than 0.05, the result is considered statistically significant. This value indicates that there is substantial evidence against the null hypothesis. As a result, the researcher discards the alternative hypothesis in favor of the null hypothesis. In comparison to patients who didn't get laser therapy, post-curettage patients who received a 650 nm diode laser showed faster-wound healing, according to the null hypothesis.

Conclusion

The findings of this study showed that levels of prostaglandin E2, human defensin 2, and interleukin-1 β in participants treated with a 650 nm laser on the first day after curettage were not statistically different from those in the control group of subjects who received no therapy. On the third and fifth day after curettage, subjects treated with 650 nm laser showed lower levels of Prostaglandin E2, Human Defensin 2, and interleukin-1 β and were distinct from the control group subjects without therapy. The results of the measurement of the gingival index on post-curettage patients on day zero showed that there was no significant difference between the control group and the laser therapy group, while on the third and fifth days there was a significant difference in the gingival index. Based on the examination of the gingival index, prostaglandin E2, human defensin 2, and interleukin-1 β , photo biomodulation therapy with a red laser can aid in the healing of post-curettage individuals.

REFERENCES

1. Astuti S. D. et al. An in-vivo study of photobiomodulation using 403 nm and 649 nm diode lasers for molar tooth extraction wound healing in wistar rats. *Odontology*, 2022, vol. 110 (2), pp. 240-253. doi: <https://doi.org/10.1007/s10266-021-00653-w>
2. Sağlam M. et al. Combined application of Er: YAG and Nd: YAG lasers in treatment of chronic periodontitis. A split-mouth, single-blind, randomized controlled trial. *Journal of periodontal research*, 2017, vol 52(5), pp. 853-862. doi: <https://doi.org/10.1111/jre.12454>
3. Astuti S.D. et al. The efficacy of photodynamic inactivation with laser diode on *Staphylococcus aureus* biofilm with various ages of biofilm. *Infectious disease reports*, 2020, vol. 12(S1), pp. 68-74. doi: <https://doi.org/10.4081/idr.2020.8736>
4. Astuti S.D. et al. Chlorophyll mediated photodynamic inactivation of blue laser on *Streptococcus mutans*. In *AIP Conference Proceedings*, 2016, vol. 1718(1), pp. 120001.
5. Daigo Y. et al. Wound healing and cell dynamics including mesenchymal and dental pulp stem cells induced by photobiomodulation therapy: an example of socket-preserving effects after tooth extraction in rats and a literature review. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, vol. 21(18), pp. 6850. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21186850>
6. de Paula Eduardo C. et al. Laser phototherapy in the treatment of periodontal disease. A review. *Lasers in medical science*, 2010, vol. 25 (6), pp. 781-792. doi: DOI 10.1007/s10103-010-0812-y
7. Erming S.A. et al. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Science translational medicine*, 2014, vol. 6 (265), pp. 265sr6-265sr6. doi: DOI: 10.1126/scitranslmed.3009337
8. Mardianto A.I. et al. Photodynamic Inactivation of *Streptococcus mutans* Bacteri with Photosensitizer *Moringa oleifera* Activated by Light Emitting Diode (LED). In *Journal of Physics: Conference Series*, 2020, vol. 1505 (1), pp. 012061
9. Sutherland J.C. et al. Biological Effects of Polychromatic Light. *Photochemistry and photobiology*, 2002, vol. 76 (2), pp. 164-170. doi: [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0760164BEOPL2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0760164BEOPL2.0.CO2)
10. Astuti S.D. et al. Photodynamic effectiveness of laser diode combined with ozone to reduce *Staphylococcus aureus* biofilm with exogenous chlorophyll of *Dracaena angustifolia* leaves. *Biomedical Photonics*, 2019, vol. 8 (2), pp. 4-13.
11. Correia J.H. et al. Photodynamic therapy review: Principles, photosensitizers, applications, and future directions. *Pharmaceutics*, 2021, vol. 13 (9), pp. 1332. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091332>
12. Astuti S.D. et al. Combination effect of laser diode for photodynamic therapy with doxycycline on a wistar rat model of periodontitis. *BMC oral health*, 2021, vol. 21(1), pp. 1-15.
13. Hung C.M. et al. Gingyo-san enhances immunity and potentiates infectious bursal disease vaccination. Evid. *Based Complementary Altern Med*, 2011. doi: <https://doi.org/10.1093/ecam/nep021>
14. Plaetzer K. et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *J Lasers Med Sci*, 2009, vol. 24 (2), pp. 259-268.
15. Ren C. et al. The effectiveness of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a meta-analysis. *J. Periodontal Res*, 2017, vol. 52 (1), pp. 8-20. doi: <https://doi.org/10.1111/jre.12361>
16. Gilowski L. et al. Amount of interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist in periodontitis and healthy patients. *Arch. Oral Biol*, 2014, vol. 59 (7), pp. 729-734. doi: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.04.007>
17. Harvey J.D. et al. Periodontal microbiology. *Dent. Clin*, 2017, vol. 61 (2), pp. 253-269. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cden.2016.11.005>
18. Iglesias-Bartolome R. et al. Transcriptional signature primes human oral mucosa for rapid wound healing. *Sci. Transl. Med*, 2018, Vol. 10 (451), pp. eaap8798. doi: 10.1126/scitranslmed. aap8798
19. Savitt E.D. et al. Distribution of certain subgingival microbial species in selected periodontal conditions. *J Periodontal Res*, 1984, vol. 19 (2), pp. 111-23. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1984.tb00800.x>
20. Ismiyatin K. et al. Different 650 nm laser diode irradiation times affect the viability and proliferation of human periodontal ligament fibroblast cells. *Dent. J (Majalah Kedokteran Gigi)*, 2019, vol. 52 (3), pp. 142-142.

ЛИТЕРАТУРА

1. Astuti S. D. et al. An in-vivo study of photobiomodulation using 403 nm and 649 nm diode lasers for molar tooth extraction wound healing in wistar rats // *Odontology*. – 2022. – Vol. 110 (2). – P. 240-253. doi: <https://doi.org/10.1007/s10266-021-00653-w>
2. Sağlam M. et al. Combined application of Er: YAG and Nd: YAG lasers in treatment of chronic periodontitis. A split-mouth, single-blind, randomized controlled trial // *Journal of periodontal research*. – 2017. – Vol 52(5). – P. 853-862. doi: <https://doi.org/10.1111/jre.12454>
3. Astuti S.D. et al. The efficacy of photodynamic inactivation with laser diode on *Staphylococcus aureus* biofilm with various ages of biofilm // *Infectious disease reports*. – 2020. – Vol. 12(S1). – P. 68-74. doi: <https://doi.org/10.4081/idr.2020.8736>
4. Astuti S.D. et al. Chlorophyll mediated photodynamic inactivation of blue laser on *Streptococcus mutans* // In *AIP Conference Proceedings*. – 2016. – Vol. 1718(1). – P. 120001.
5. Daigo Y. et al. Wound healing and cell dynamics including mesenchymal and dental pulp stem cells induced by photobiomodulation therapy: an example of socket-preserving effects after tooth extraction in rats and a literature review // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21(18). – P. 6850. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21186850>
6. de Paula Eduardo C. et al. Laser phototherapy in the treatment of periodontal disease. A review // *Lasers in medical science*. – 2010. – Vol. 25 (6). – P. 781-792. doi: DOI 10.1007/s10103-010-0812-y
7. Erming S.A. et al. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation // *Science translational medicine*. – 2014. – Vol. 6 (265). – P. 265sr6-265sr6. doi: DOI: 10.1126/scitranslmed.3009337
8. Mardianto A.I. et al. Photodynamic Inactivation of *Streptococcus mutans* Bacteri with Photosensitizer *Moringa oleifera* Activated by Light Emitting Diode (LED) // In *Journal of Physics: Conference Series*. – 2020. – Vol. 1505 (1). – P. 012061
9. Sutherland J.C. et al. Biological Effects of Polychromatic Light // *Photochemistry and photobiology*. – 2002. – Vol. 76 (2). – P. 164-170. doi: [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0760164BEOPL2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0760164BEOPL2.0.CO2)
10. Astuti S.D. et al. Photodynamic effectiveness of laser diode combined with ozone to reduce *Staphylococcus aureus* biofilm with exogenous chlorophyll of *Dracaena angustifolia* leaves // *Biomedical Photonics*. – 2019. – Vol. 8 (2). – P. 4-13.
11. Correia J.H. et al. Photodynamic therapy review: Principles, photosensitizers, applications, and future directions // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13 (9). – P. 1332. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091332>
12. Astuti S.D. et al. Combination effect of laser diode for photodynamic therapy with doxycycline on a wistar rat model of periodontitis // *BMC oral health*. – 2021. – Vol. 21(1). – P. 1-15.
13. Hung C.M. et al. Gingyo-san enhances immunity and potentiates infectious bursal disease vaccination. Evid // *Based Complementary Altern Med*. – 2011. doi: <https://doi.org/10.1093/ecam/nep021>
14. Plaetzer K. et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects // *J Lasers Med Sci*. – 2009. – Vol. 24 (2). – P. 259-268.
15. Ren C. et al. The effectiveness of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a meta-analysis // *J. Periodontal Res*. – 2017. – Vol. 52 (1). – P. 8-20. doi: <https://doi.org/10.1111/jre.12361>
16. Gilowski L. et al. Amount of interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist in periodontitis and healthy patients // *Arch. Oral Biol*. – 2014. – Vol. 59 (7). – P. 729-734. doi: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.04.007>
17. Harvey J.D. et al. Periodontal microbiology // *Dent. Clin*. – 2017. – Vol. 61 (2). – P. 253-269. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cden.2016.11.005>
18. Iglesias-Bartolome R. et al. Transcriptional signature primes human oral mucosa for rapid wound healing // *Sci. Transl. Med*. – 2018. – Vol. 10 (451). – P. eaap8798. doi: 10.1126/scitranslmed. aap8798
19. Savitt E.D. et al. Distribution of certain subgingival microbial species in selected periodontal conditions // *J Periodontal Res*. – 1984. – Vol. 19 (2). – P. 111-23. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1984.tb00800.x>
20. Ismiyatin K. et al. Different 650 nm laser diode irradiation times affect the viability and proliferation of human periodontal ligament fibroblast cells // *Dent. J (Majalah Kedokteran Gigi)*. – 2019. – Vol. 52 (3). – P. 142-142.

21. Politis C. et al. Wound healing problems in the mouth // *Front. Physiol.* 2016, vol. 7, pp. 507. doi: <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00507>
22. Popova C. et al. Correlation Between Healing Parameters and PGE2 Expression Levels in Non-Surgical Therapy of Chronic Periodontitis. *J of IMAB – Annual Proceeding Scientific Papers*, 2017, vol. 23 (4), pp. 1758-1764. doi: 10.5272/jimab.2017234.1758
23. Arjmand B. et al. Low-Level Laser Therapy: Potential and Complications. *J Lasers Med Sci*, 2021, vol. 12. doi: 10.34172/jlms.2021.42
24. Rosso M.P.D.O. et al. Photobiomodulation therapy (PBMT) in peripheral nerve regeneration: a systematic review. *J. Biomed. Eng.*, 2018, vol. 5 (2), pp. 44. doi: <https://doi.org/10.3390/bioengineering5020044>
25. Farivar S. et al. Biological effects of low-level laser therapy. *J Lasers Med Sci*, 2014, vol. 5 (2), pp. 58.
26. Suhariningsih D. et al. The effect of electric field, magnetic field, and infrared ray combination to reduce HOMA-IR index and GLUT 4 in diabetic model of *Mus musculus*. *Lasers in Medical Science*, 2020, vol. 35 (6), pp. 1315-1321.
27. Astuti S.D. et al. Effectiveness Photodynamic Inactivation with Wide Spectrum Range of Diode Laser to *Staphylococcus aureus* Bacteria with Endogenous Photosensitizer: An in vitro Study. *Journal of International Dental and Medical Research*, 2019, vol. 12 (2), pp. 481-486.
28. Ren C. et al. The effectiveness of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a meta-analysis. *J. Periodontal Res*, 2017, vol. 52 (1), pp. 8-20. doi: <https://doi.org/10.1111/jre.12361>
29. Setiawatie E.M. et al. An in vitro Anti-microbial Photodynamic Therapy (APDT) with Blue LEDs to activate chlorophylls of *Alfalfa Medicago Sativa L* on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J. Int. Dent. Medical Res*, 2016, vol. 9 (2), pp. 118-125.
30. Sidharthan S. et al. Gingival crevicular fluid levels of Interleukin-22 (IL-22) and human β Defensin-2 (hBD-2) in periodontal health and disease: A correlative study. *J Oral Biol Craniofac Res*, 2020, vol. 10 (4), pp. 498-503. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2020.07.021>
31. Tang E. et al. Laser-activated transforming growth factor- β 1 induces human β -defensin 2: implications for laser therapies for periodontitis and peri-implantitis. *J. Periodontal Res*, 2017, vol. 52 (3), pp. 360-367. doi: <https://doi.org/10.1111/jre.12399>
32. Muliani Izat W.O.A. et al. The Effectiveness of Sea Cucumber Extract (*Holothuroidea Sp*) on Interleukin-1 β (IL-1 β) Expression in Periodontitis (Research on Wistar Rats). (Doctoral dissertation, Hasanuddin University), 2020.
33. Genco R.J. et al. Periodontal disease and overall health: a clinician's guide. *Yardley, Pennsylvania, USA: Professional Audience Communications Inc.*, 2010, pp. 254-263.
34. Santosa B. et al. Elisa Method for Measurement of Metallothionein Protein in Rice. *Leaves Ir Bagendit*, 2020.
35. Sakurai Y. et al. Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase 2 in human gingival fibroblasts. *Eur. J. Oral Sci.*, 2000, vol. 108 (1), pp. 29-34. doi: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2000.00783.x>
36. Hanna R. et al. Phototherapy as a rational antioxidant treatment modality in COVID-19 management; new concept and strategic approach: a critical review. *Antioxidants*, 2020, vol. 9 (9), pp. 875. doi: <https://doi.org/10.3390/antiox9090875>
37. Ebrahimi P. et al. Effect of photobiomodulation in secondary intention gingival wound healing a systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health*, 2021, vol. 21 (1), pp. 1-16.
38. Astuti S.D. et al. Effectiveness of 650 nm red laser photobiomodulation therapy to accelerate wound healing post tooth extraction. *Biomedical Photonics*, 2024, vol. 13 (1), pp. 4-15. <https://doi.org/10.24931/2413-9432-2024-13-1-4-15>
39. Genco R.J. et al. Periodontal disease and overall health: a clinician's guide. *Yardley, Pennsylvania, USA: Professional Audience Communications Inc.*, 2010, pp. 254-263.
40. Avci P. et al. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Semin Cutan Med Surg*, 2013, vol. 32 (1), pp. 41.
41. Rasouli M. et al. The interplay between extracellular matrix and progenitor/stem cells during wound healing: Opportunities and future directions. *Acta Histochemica*, 2021, Vol. 123 (7), pp. 151785. doi: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151785>
21. Politis C. et al. Wound healing problems in the mouth // *Front. Physiol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 507. doi: <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00507>
22. Popova C. et al. Correlation Between Healing Parameters and PGE2 Expression Levels in Non-Surgical Therapy of Chronic Periodontitis // *J of IMAB – Annual Proceeding Scientific Papers*. – 2017. – Vol. 23 (4). – P. 1758-1764. doi: 10.5272/jimab.2017234.1758
23. Arjmand B. et al. Low-Level Laser Therapy: Potential and Complications // *J Lasers Med Sci*. – 2021. – Vol. 12. doi: 10.34172/jlms.2021.42
24. Rosso M.P.D.O. et al. Photobiomodulation therapy (PBMT) in peripheral nerve regeneration: a systematic review // *J. Biomed. Eng.* – 2018. – Vol. 5 (2). – P. 44. doi: <https://doi.org/10.3390/bioengineering5020044>
25. Farivar S. et al. Biological effects of low-level laser therapy // *J Lasers Med Sci*. – 2014. – Vol. 5 (2). – P. 58.
26. Suhariningsih D. et al. The effect of electric field, magnetic field, and infrared ray combination to reduce HOMA-IR index and GLUT 4 in diabetic model of *Mus musculus* // *Lasers in Medical Science*. – 2020. – Vol. 35 (6). – P. 1315-1321.
27. Astuti S.D. et al. Effectiveness Photodynamic Inactivation with Wide Spectrum Range of Diode Laser to *Staphylococcus aureus* Bacteria with Endogenous Photosensitizer: An in vitro Study // *Journal of International Dental and Medical Research*. – 2019. – Vol. 12 (2). – P. 481-486.
28. Ren C. et al. The effectiveness of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a meta-analysis // *J. Periodontal Res*. – 2017. – Vol. 52 (1). – P. 8-20. doi: <https://doi.org/10.1111/jre.12361>
29. Setiawatie E.M. et al. An in vitro Anti-microbial Photodynamic Therapy (APDT) with Blue LEDs to activate chlorophylls of *Alfalfa Medicago Sativa L* on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* // *J. Int. Dent. Medical Res*. – 2016. – Vol. 9 (2). – P. 118-125.
30. Sidharthan S. et al. Gingival crevicular fluid levels of Interleukin-22 (IL-22) and human β Defensin-2 (hBD-2) in periodontal health and disease: A correlative study // *J Oral Biol Craniofac Res*. – 2020. – Vol. 10 (4). – P. 498-503. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2020.07.021>
31. Tang E. et al. Laser-activated transforming growth factor- β 1 induces human β -defensin 2: implications for laser therapies for periodontitis and peri-implantitis // *J. Periodontal Res*. – 2017. – Vol. 52 (3). – P. 360-367. doi: <https://doi.org/10.1111/jre.12399>
32. Muliani Izat W.O.A. et al. The Effectiveness of Sea Cucumber Extract (*Holothuroidea Sp*) on Interleukin-1 β (IL-1 β) Expression in Periodontitis (Research on Wistar Rats) // (Doctoral dissertation, Hasanuddin University). – 2020.
33. Genco R.J. et al. Periodontal disease and overall health: a clinician's guide // *Yardley, Pennsylvania, USA: Professional Audience Communications Inc.* – 2010. – P. 254-263.
34. Santosa B. et al. Elisa Method for Measurement of Metallothionein Protein in Rice // *Leaves Ir Bagendit*. – 2020.
35. Sakurai Y. et al. Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase 2 in human gingival fibroblasts // *Eur. J. Oral Sci.* – 2000. – Vol. 108 (1). – P. 29-34. doi: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2000.00783.x>
36. Hanna R. et al. Phototherapy as a rational antioxidant treatment modality in COVID-19 management; new concept and strategic approach: a critical review // *Antioxidants*. – 2020. – Vol. 9 (9). – P. 875. doi: <https://doi.org/10.3390/antiox9090875>
37. Ebrahimi P. et al. Effect of photobiomodulation in secondary intention gingival wound healing a systematic review and meta-analysis // *BMC Oral Health*. – 2021. – Vol. 21 (1). – P. 1-16.
38. Astuti S.D. et al. Effectiveness of 650 nm red laser photobiomodulation therapy to accelerate wound healing post tooth extraction // *Biomedical Photonics*. – 2024. – Vol. 13 (1). – P. 4-15. <https://doi.org/10.24931/2413-9432-2024-13-1-4-15>
39. Genco R.J. et al. Periodontal disease and overall health: a clinician's guide // *Yardley, Pennsylvania, USA: Professional Audience Communications Inc.* – 2010. – P. 254-263.
40. Avci P. et al. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring // *Semin Cutan Med Surg*. – 2013. – Vol. 32 (1). – P. 41.
41. Rasouli M. et al. The interplay between extracellular matrix and progenitor/stem cells during wound healing: Opportunities and future directions // *Acta Histochemica*. – 2021. – Vol. 123 (7). – P. 151785. doi: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151785>

NEW CATIONIC CHLORIN AS POTENTIAL AGENT FOR ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY

Suvorov N.V.¹, Shchelkova V.V.^{2,3}, Rysanova E.V.², Bagatelia Z.T.⁴, Diachenko D.A.⁴,
Afaniutin A.P.⁵, Vasil'ev Yu.L.^{1,4}, Diachkova E.Yu.⁴, Santana Santos I.C.⁶, Grin M.A.¹

¹Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA-Russian Technological University, Moscow, Russia

²Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia

³N. Kosygin Russian State University, Moscow, Russia

⁴I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

⁵AveDent, Dental Clinic, Orel, Russia

⁶São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

Multiple drug resistance is a major global health security risk. Increasing resistance of bacteria to existing drugs puts on the agenda the search for alternative ways to combat antibiotic-resistant pathogens. One of these innovative methods is antimicrobial photodynamic therapy (APDT), which is equally effective against antibiotic-sensitive and antibiotic-resistant pathogens. The most effective photosensitizers (PS) for APDT are molecules containing positively charged groups in their composition. In this work, we have obtained a new cationic derivative of natural chlorin containing a pyridazine group in its composition, the introduction of which occurs using click chemistry approaches. The antimicrobial photoinduced cytotoxicity of the proposed cationic PS, as well as its uncharged precursor, was assessed against a number of gram-positive and gram-negative bacteria: *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*. It has been shown that cationic chlorin exhibits an increased bactericidal effect when irradiated with light ($\lambda = 660$ nm, $P_s = 70.73$ mW/cm²) compared to its base form. When microbial suspensions were incubated with 24 μ M cationic PS and subsequently irradiated, a significant bactericidal effect was observed against all of the aforementioned bacteria. As a result of microbiological studies, it was demonstrated that the proposed cationic PS exhibits high photoinduced antimicrobial activity.

Key words: antimicrobial PDT, antibiotic resistance, antimicrobial activity, chlorophyll, chlorin e6.

For citations: Suvorov N.V., Shchelkova V.V., Rysanova E.V., Bagatelia Z.T., Diachenko D.A., Afaniutin A.P., Vasil'ev Yu.L., Diachkova E.Yu., Santana Santos I.C., Grin M.A. New cationic chlorin as potential agent for antimicrobial photodynamic therapy, *Biomedical Photonics*, 2024, vol. 13, no. 3, pp. 14–19. doi: 10.24931/2413–9432–2024–13–3–14–19

Contacts: Suvorov N.V., e-mail: suvorov.nv@gmail.com

НОВЫЙ КАТИОННЫЙ ХЛОРИН КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ АГЕНТ ДЛЯ АНТИМИКРОБНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Н.В. Суворов¹, В.В. Щелкова^{2,3}, Е.В. Русанова², З.Т. Багателия⁴, Д.А. Дьяченко⁴,
А.П. Афанютин⁵, Ю.Л. Васильев^{1,4}, Е.Ю. Дьячкова⁴, И.К. Сантана Сантос⁶, Грин М.А.¹

¹Институт тонких химических технологий, РТУ МИРЭА, Москва, Россия

²Московский областной научно-исследовательский клинический институт
им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

³Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина, Москва, Россия

⁴Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

⁵Стоматологическая клиника АвеДент, Оре́л, Россия

⁶Инженерная школа Сан-Карлоса, Университет Сан-Паулу, Сан-Паулу, Бразилия

Резюме

Множественная устойчивость микроорганизмов к антибиотикам является одним из основных рисков для безопасности в области глобального здравоохранения. Нарастание резистентности бактерий к уже имеющимся препаратам поставили на повестку дня поиск альтернативных способов борьбы с антибиотикорезистентными возбудителями инфекций. Одним из таких инновационных методов

является антимикробная фотодинамическая терапия (АФДТ) одинаково эффективная против антибиотикочувствительных и антибиотикорезистентных возбудителей. Наиболее эффективными фотосенсибилизаторами (ФС) для АФДТ являются молекулы, содержащие положительно-заряженные группы в своем составе. В настоящей работе нами было получено новое катионное производное природного хлорина, содержащее пиридазиновую группу в своем составе, введение которой происходит с использованием подходов click-химии. Противомикробную фотоиндуцированную цитотоксичность предлагаемого катионного ФС, а также его незаряженного предшественника, оценивали в отношении ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий: *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*. Показано, что катионный хлорин обладает повышенным бактерицидным действием при облучении светом ($\lambda = 660$ нм, $P_s = 70,73$ мВт/см²) по сравнению со своей основной формой. При инкубировании микробных суспензий с раствором катионного ФС в концентрации 24 мкМ и последующим облучением наблюдался заметный бактерицидный эффект в отношении всех вышеперечисленных бактерий. В результате проведенных микробиологических исследований показано, что предлагаемый катионный ФС обладает высокой фотоиндуцированной антимикробной активностью.

Ключевые слова: антимикробная ФДТ, антибиотикорезистентность, противомикробная активность, хлорофилл, хлорин еб.

Для цитирования: Суворов Н.В., Щелкова В.В., Русанова Е.В., Багателья З.Т., Дьяченко Д.А., Афанютин А.П., Васильев Ю.Л., Дьячкова Е.Ю., Сантана Сантос И.К., Грин М.А. Новый катионный хлорин как потенциальный агент для антимикробной фотодинамической терапии // Biomedical Photonics. – 2024. – Т. 13, № 3. – С. 14–19. doi: 10.24931/2413-9432-2024-13-3-14-19

Контакты: Суворов Н.В., e-mail: suvorov.nv@gmail.com

Introduction

Multiple antibiotic resistance is a major global health security risk. According to the WHO, already in 2019, 1.27 million deaths worldwide were directly related to drug-resistant infections. If this problem is not addressed, it is predicted that by 2050 the number of such deaths will increase to 10 million annually [1, 2]. According to the Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, the number of nosocomial infections in Russia annually affects 2-2.5 million (1.5% of the population). The increasing bacterial resistance to existing drugs, coupled with poor bioavailability and lack of structures that could potentially form the basis of new antibiotics, have put the search for alternative ways to combat antibiotic-resistant pathogens on the agenda.

One such innovative method is antimicrobial photodynamic therapy (APDT) for localized infections [3-6], equally effective against antibiotic-sensitive and antibiotic-resistant pathogens. Antimicrobial photodynamic therapy (APDT) is based on the use of a photosensitizer (PS) drug and harmless visible light. Photosensitizers are capable, when exposed to light of a certain wavelength corresponding to their maximum absorption, to cause the formation of cytotoxic agents, in particular singlet oxygen, stimulating oxidative destruction of the main components (unsaturated lipids, protein channels and enzymes) of cell membranes – the life-supporting structures of microbial cells [7]. Photo-oxidative processes in the lipid bilayer of cell membranes lead to the formation of pores and disruption of cellular permeability barriers. The death of a microbial cell occurs as a result of the leakage of cellular metabolites, primarily potassium ions and protons, and dissipation of the membrane potential.

One of the main advantages of antimicrobial photodynamic therapy is the multiple nature of the

oxidative destruction of microbial target cells, which prevents the development of resistance to subsequent cycles of photodynamic effects. In addition, since the bactericidal effect of APDT is local in nature, it does not have a systemic detrimental effect on the saprophytic flora of the body. The use of APDT thus solves two main problems of modern antibiotic therapy: high resistance of pathogenic microorganisms to antibiotics and systemic toxicity [8-10].

To date, many PS have been synthesized for antimicrobial PDT, both based on tetrapyrrole compounds and using other dyes. Unlike synthetic dyes, derivatives of natural chlorins have a number of advantages. The main sources of such compounds are plants and algae containing chlorophyll. Such raw materials are easily accessible and cheap, and methods for extracting pigment from them are not labor-intensive. Thanks to the reduced pyrrole ring, chlorophyll A derivatives exhibit absorption in the near-IR region with high extinction values, which allows PDT of deep-lying zones [5].

The most effective photosensitizers for APDT are molecules containing positively charged groups in their composition. In the 90s, it was shown that there is a difference in susceptibility to APDT between gram-positive and gram-negative bacteria, which is associated with their structure: gram-positive bacteria have a cytoplasmic membrane surrounded by a porous cell wall consisting of peptidoglycan and lipoteichoic acid, which allows the photosensitizer to easily bind with it, and the membrane of gram-negative bacteria consists of outer and inner cytoplasmic membranes separated by a layer of peptidoglycan [11-13]. Neutral, anionic and cationic photosensitizer molecules bind equally well to gram-positive bacteria, while only cationic or neutral photosensitizers can bind to gram-negative bacteria. At the moment, a large number of cationic derivatives of natural chlorins containing both alkylammonium groups

and quaternized heteroaromatic fragments have been synthesized [14-18].

Previously, our research group obtained a derivative of natural chlorin, into which a residue of nicotinic acid was introduced with its subsequent quaternization [19]. This compound had both high photoinduced toxicity towards bacterial cells, as well as biofilms based on them. However, the complexity of the synthesis of this compound complicates its further implementation in practice. In this work, we have proposed an approach that makes it possible to introduce a heterocyclic fragment into the chlorin molecule using one stage inverse electron demand Diels-Alder reaction click-reaction, and also studied the photoinduced toxicity of the resulting compound and its cationic derivative against gram-positive and gram-negative bacteria.

Materials and Methods

Chemistry

Solvents were purified and prepared according to standard procedures. Silica gel 40/60 (Merck, Germany) was used for column chromatography. Absorption spectra were obtained on a Shimadzu spectrophotometer UV 1800 UV/VIS in 10 mm thick quartz cuvettes in chloroform and water. The NMR spectrum was recorded on Bruker DPX 300 spectrometer in CDCl_3 . The synthesis of photosensitizers **1** and **2** was carried out according to a previously described method [20]. Cationic derivative **3** was obtained by reacting compound **2** (25 mg; 0.033 mmol) with methyl iodide (145.5 mg; 1.025 mmol) in acetonitrile (1 ml) at 60°C for 2 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure. The target product was isolated using column chromatography (DCM/MeOH/AcOH, 450/10/1, v/v/v). The yield of compound **3** was 63.3% (19 mg). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 9.77 (H, s, 10-H), 9.60 (H, d, $J = 4.7$ Hz, 5'-H), 9.20 (H, s, 5-H), 8.71+8.72 (H, s, 20-H), 8.07 (H, d, $J = 4.7$ Hz, 6'-H), 7.62 (2H, m, o-Phe), 7.12 (H, m, p-Phe), 7.02 (H, m, o-Phe), 5.42 (H, d, $J = 18.8$ Hz, 15¹-CH₂^a), 4.46 (2H, m, 18-H, 17-H), 4.30 (3H, s 13²-CH₃), 3.81 (3H, s, 15³-CH₃), 3.80 (2H, k, $J = 7.7$ Hz, 8¹-CH₂), 3.71 (3H, s, 17⁴-CH₃), 3.62 (3H, s, 12-CH₃), 3.53 (3H, s, *N*-CH₃), 3.20 (3H, s, 7-CH₃), 2.95 (3H, s, 2-CH₃), 2.60 (H, m, 17²-CH₂^a), 2.28 (2H, m, 17¹-CH₂^a, 17¹-CH₂^b), 1.84 (H, m, 17¹-CH₂^b), 1.75 (3H, d, $J = 18.1$ Hz, 18-CH₃), 1.74 (3H, t, $J = 7.7$ Hz, 8²-CH₃), -1.33 (H, s, I – NH), -1.72 (H, s, III – NH). ESI-MS: m/z calc. for $\text{C}_{46}\text{H}_{49}\text{N}_6\text{O}_6$: 781.37, found: $[\text{M}+\text{H}]^+$, 782.38, $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 391.69. UV/VIS (CHCl_3), λ_{max} , nm (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 395 (180000), 497 (17500), 686 (44000). To prepare a water-soluble form of compounds **2** and **3**, 4% Kolliphor ELP solution in water was used. A weighed portion of the corresponding chlorin (1 mg) was dissolved in dichloromethane (2 ml) and added to 4% Kolliphor solution in water (3 ml). The resulting mixture was stirred in a flow of argon at a temperature of 41°C until the organic phase was completely removed. The resulting emulsion was passed through a syringe filter with a pore diameter of 200 nm.

Microbiology

The source of non-monochromatic LED red radiation was a single-band laser ($\lambda = 660$ nm, $P_s = 70.73$ mW/cm²). Exposure of the PS in the microbial suspension before irradiation is 30 min. The dose of light during irradiation is 20 J/cm².

To assess the antibacterial activity of PS, we used suspensions of daily microbial cultures of *S. aureus* ATCC 25923 ($n = 15$), *K. pneumoniae* ATCC 13883 ($n = 15$), *E. faecalis* ATCC 29212 ($n = 15$), *P. aeruginosa* ATCC 27853 ($n = 15$), which are common causative agents of inflammatory processes in the ear and upper respiratory tract. The concentration of the microbial suspension in the experiment was 3×10^3 CFU/ml. Control – test strains that were under equal conditions, but were not exposed to PS and irradiation. 200 μl of a suspension of microorganisms was added to the wells of a microplate and 2, 8 and 12 μl of 0.4 mM solution of PS **2** and **3** were injected, respectively. After exposure and irradiation, the microplates were incubated for 24 hours at $T = 37^\circ\text{C}$. To determine the survival rate of microorganisms, the method of surface inoculation using a spatula on solid nutrient media (Koch plate method) was used. After thermostating the control crops, we calculated and expressed the results obtained on solid media.

Formulas for calculating the number of viable microorganisms:

1. If the number of colonies exceeds 10:

$$M = a * 10n/V,$$

where a is the average number of colonies grown after sowing from a given dilution; 10 – dilution factor; n is the serial number of the dilution from which the sowing was made; V – volume of suspension taken for sowing, cm³.

2. If the number of colonies is less than 10, but more than 4:

$$M = c/V * n,$$

where c is the number of colonies counted in the dish, V is the volume of the suspension taken for inoculation, cm³, n is the serial number of the dilution from which the inoculation was made.

3. If there are from 1 to 3 colonies, then we accept as – “microorganisms are present in quantities less than $1 \times V$ per cm³” (V is the dilution factor).

The calculation data is included in Table 1. Statistical analysis of the obtained data was carried out using the SPSS application package Statistics 21.0 and Rstudio 4.2.2. Mean values, standard deviations, and medians were determined. When comparing groups, parametric (ANOVA) and nonparametric methods (Kruskal–Wallis, Mann–Whitney, Wilcoxon) estimates were used depending on the normality of the sample distribution, which was determined using the Shapiro–Wilk test. The results were considered statistically significant at a confidence level of at least 95%.

Results and discussion

Previously, we carried out a one-step functionalization of the chlorin e6 trimethyl ester molecule, which allowed us to introduce a pyridazine group into pyrrole A using the inverse electron demand Diels-Alder reaction (Fig. 1) [20]. It was shown that this reaction occurs in high yields without changing the properties of the original PS. In this work, the reaction of chlorin e6 trimethyl ester with 3-phenyl-1,2,4,5-tetrazine was carried out to obtain pyridazine-substituted derivative **2**. The resulting PS was reacted with methyl iodide to obtain quaternized derivative **3**. Thus, we

obtained chlorins containing heterocyclic fragments at the periphery of the macrocycle, in neutral and cationic form.

The resulting PS **2** and **3** are insoluble in water, so their water-soluble forms were prepared in the form of an emulsion in 4% Kolliphor ELP, which is a clinically approved solubilizer.

The antimicrobial effect of the obtained PS was assessed *in vitro* against bacteria *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* and *P. aeruginosa*. By counting the number of colonies, the probability of the effect of cationic and anionic PS on Gram “-” and “+” microorganisms were determined (Table 1).

Таблица 1
Таблица подсчета колоний

Table 1
Colony count table

Бактерия Bacteria	Концентрация ФС (мкМ) PS concentration (μM)	PS 2		PS 3		Контроль Control
		Среднее количество микроорганизмов Average number of microorganisms M±m	КОЕ/мл CFU/ml	Среднее количество микроорганизмов Average number of microorganisms M±m	КОЕ/мл CFU/ml	
<i>S. aureus</i>	4	77.5±16.9	7.6*10 ³	18.3±14.6	1.8*10 ³	Сливной рост Confluent growth 2*10 ⁶
	16	16.9±8.6	1.7*10 ³	3.7±4.4	4*10 ²	
	24	2.6±2.9	микроорганизмы присутствуют в количестве менее 1 на см ³ microorganisms are present in less than 1 per cm ³	0.8±1.4	микроорганизмы присутствуют в количестве менее 1 на см ³ microorganisms are present in less than 1 per cm ³	
<i>K. pneumoniae</i>	4	153.1±4.3	1.5*10 ⁴	114.4±17.8	1.1*10 ⁴	Сливной рост Confluent growth 6*10 ⁶
	16	20.1±2.5	2*10 ³	53.6±9.6	5.4*10 ³	
	24	0.4±1	микроорганизмы присутствуют в количестве менее 1 на см ³ microorganisms are present in less than 1 per cm ³	1.8±2.7	микроорганизмы присутствуют в количестве менее 1 на см ³ microorganisms are present in less than 1 per cm ³	
<i>E. faecalis</i>	4	149.3±4.2	1.5*10 ⁴	43.8±4.3	4.4*10 ³	Сливной рост Confluent growth 4*10 ⁶
	16	41.2±3.2	4.1*10 ³	9.1±1.6	9*10 ²	
	24	5.5±6.8	6*10 ²	0.5±1	микроорганизмы присутствуют в количестве менее 1 на см ³ microorganisms are present in less than 1 per cm ³	
<i>P. aeruginosa</i>	4	162.1±2.8	1.6*10 ⁴	114.4±7.81	1.4*10 ⁴	Сливной рост Confluent growth 5*10 ⁶
	16	17.6±4.8	1.8*10 ³	13.3±4.9	1.3*10 ³	
	24	1.8±2.5	микроорганизмы присутствуют в количестве менее 1 на см ³ microorganisms are present in less than 1 per cm ³	1.4±2.5	микроорганизмы присутствуют в количестве менее 1 на см ³ microorganisms are present in less than 1 per cm ³	

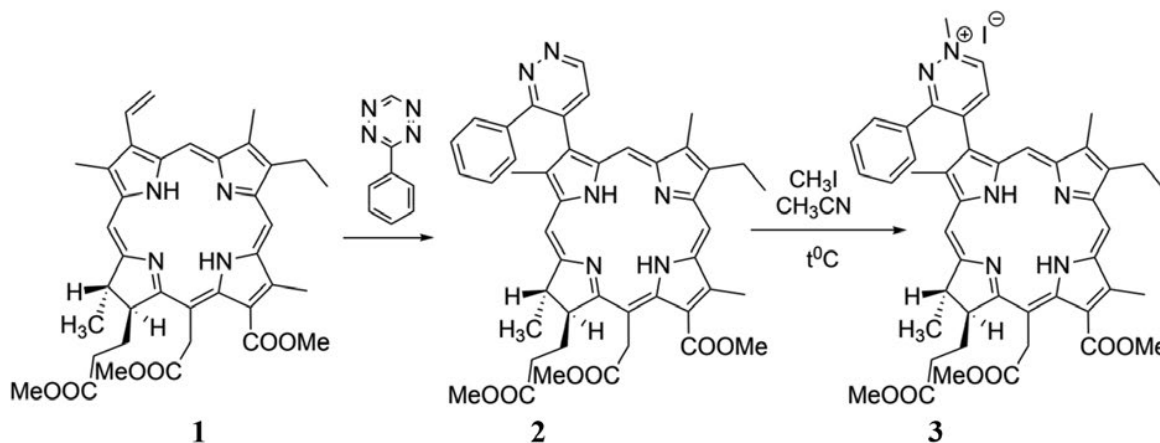


Рис. 1. Синтез пиридазин-замещенных производных хлорина.
Fig. 1. Synthesis of pyridazine-substituted chlorin derivatives.

Analysis of the data obtained showed that all PS have inhibitory properties towards the tested microorganisms. When a microbial suspension was incubated with 4 μM and 16 μM PS **2** and **3** followed by irradiation, a rather bacteriostatic effect was detected or a slight increase in microbial numbers from the initial concentration of microorganisms was observed, while in the control a stable confluent growth was observed. When using 24 μM PS, a noticeable bactericidal effect is observed. Negative dynamics of microorganisms is observed depending on the concentration of PS in the suspension of microorganisms. When comparing the difference between the use of PS **2** and **3**, a significant decrease in the number of colonies can be traced when exposed to cationic PS **3** compared to PS **2** in the case of gram-positive bacteria. When comparing the effectiveness against gram-negative bacteria, the cationic derivative **3** was more effective compared to the pyridazine-substituted derivative **2**, but the same significant difference in biological activity as in the case of gram-positive bacteria was not detected. The results obtained from the study of photoinduced cytotoxicity suggest the

high efficiency of PS **3** compared to similar chlorophyll *a* derivatives [21, 22].

Conclusions

Studies have shown that the proposed cationic photosensitizer, obtained using the tetrazine-alkene addition reaction starting from trimethyl ester of chlorin *e6*, has high photoinduced antimicrobial activity against both gram-positive and gram-negative bacteria. An additional advantage of the proposed PS is the ease of its preparation, and the raw materials for its synthesis are readily available. We are currently planning to conduct a study of the effectiveness of the resulting PS on bacteria in biofilms, as well as to carry out in vivo experiments on models of wound infections.

Acknowledgments

The work was carried out with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (government assignment №075-00701-24-07 dated 04/03/2024; FSFZ-2024-0013).

REFERENCES

- Macias J., Kahly O., Pattik-Edward R., Khan S., et al. Sepsis: A Systematic Review of Antibiotic Resistance and Antimicrobial Therapies, *Mod Res Inflamm*, 2022, vol. 11, no. 02, pp. 9–23. doi: 10.4236/mri.2022.112002.
- Murray C. J., Ikuta K. S., Sharara F., Swetschinski L., et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis, *Lancet*, 2022, vol. 399, no. 10325, pp. 629–655. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
- Hamblin M. R., Hasan T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease?, *Photochem Photobiol Sci*, 2004, vol. 3, no. 5, pp. 436–450. doi: 10.1039/b311900a.
- Dai T., Huang Y. Y., Hamblin M. R. Photodynamic therapy for localized infections-State of the art, *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2009, vol. 6, no. 3–4, pp. 170–188. doi: 10.1016/j.pdpdt.2009.10.008.
- Suvorov N., Pogorilyy V., Diachkova E., Vasil'ev Y., et al. Derivatives of natural chlorophylls as agents for antimicrobial photodynamic

ЛИТЕРАТУРА

- Macias J., Kahly O., Pattik-Edward R., Khan S., Qureshi A., Shaik A., et al. Sepsis: A Systematic Review of Antibiotic Resistance and Antimicrobial Therapies // *Mod. Res. Inflamm.* – 2022. – Vol. 11, № 02. – P. 9–23. doi: 10.4236/mri.2022.112002.
- Murray C.J., Ikuta K.S., Sharara F., Swetschinski L., Robles Aguilar G., et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis // *Lancet*. – 2022. – Vol. 399, № 10325. – P. 629–655. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
- Hamblin M.R., Hasan T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2004. – Vol. 3, № 5. – P. 436–450. doi: 10.1039/b311900a.
- Dai T., Huang Y.Y., Hamblin M.R. Photodynamic therapy for localized infections-State of the art // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* – 2009. – Vol. 6, № 3–4. – P. 170–188. doi: 10.1016/j.pdpdt.2009.10.008.
- Suvorov N., Pogorilyy V., Diachkova E., Vasil'ev Y., Mironov A., et al. Derivatives of natural chlorophylls as agents for antimicrobial photo-

- therapy, *Int J Mol Sci*, 2021, vol. 22, no. 12, p. 6392. doi: 10.3390/ijms22126392.
6. de Souza da Fonseca A., de Paoli F., Mencialha A. L. Photodynamic therapy for treatment of infected burns, *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2022, vol. 38, p. 102831. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.102831.
7. Huang L., Xuan Y., Koide Y., Zhiyentayev T., et al. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria, *Lasers Surg Med*, 2012, vol. 44, no. 6, pp. 490–499. doi: 10.1002/lsm.22045.
8. Bustamante V., Palavecino C. E. Effect of photodynamic therapy on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: A scoping review, *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2023, vol. 43, p. 103709. doi: 10.1016/j.pdpdt.2023.103709.
9. Jao Y., Ding S. J., Chen C. C. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of oral infections: A systematic review, *J Dent Sci*, 2023, vol. 18, no. 4, pp. 1453–1466. doi: 10.1016/j.jds.2023.07.002.
10. Hamblin M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes, *Curr Opin Microbiol*, 2016, vol. 33, pp. 67–73. doi: 10.1016/j.mib.2016.06.008.
11. Bertolini G., Rossi F., Valduga G., Jori G., et al. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol Lett*, 1990, vol. 71, no. 1–2, pp. 149–155. doi: 10.1111/j.1574-6968.1990.tb03814.x.
12. Nitzan Y., Gutterman M., Malik Z., Ehrenberg B. Inactivation of Gram-Negative Bacteria By Photosensitized Porphyrins, *Photochem Photobiol*, 1992, vol. 55, no. 1, pp. 89–96. doi: 10.1111/j.1751-1097.1992.tb04213.x.
13. Merchat M., Bertolini G., Giacomini P., Villanueva A., et al. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria, *J Photochem Photobiol B Biol*, 1996, vol. 32, no. 3, pp. 153–157. doi: 10.1016/1011-1344(95)07147-4.
14. Kustov A. V., Kustova T. V., Belykh D. V., Khudyaeva I. S., et al. Synthesis and investigation of novel chlorin sensitizers containing the myristic acid residue for antimicrobial photodynamic therapy, *Dye Pigment*, 2020, vol. 173, p. 107948. doi: 10.1016/j.dyepig.2019.107948.
15. Ryazanova O., Voloshin I., Dubey I., Dubey L., et al. Fluorescent Studies on Cooperative Binding of Cationic Pheophorbide-a Derivative to Polyphosphate, *Ann NY Acad Sci*, 2008, vol. 1130, no. 1, pp. 293–299. doi: 10.1196/annals.1430.033.
16. Miyatake T., Hasunuma Y., Mukai Y., Oki H., et al. Assemblies of ionic zinc chlorins assisted by water-soluble polypeptides, *Bioorganic Med Chem*, 2016, vol. 24, no. 5, pp. 1155–1161. doi: 10.1016/j.bmc.2016.01.054.
17. Kustov A. V., Belykh D. V., Smirnova N. L., Venediktov E. A., et al. Synthesis and investigation of water-soluble chlorophyll pigments for antimicrobial photodynamic therapy, *Dye Pigment*, 2018, vol. 149, pp. 553–559. doi: 10.1016/j.dyepig.2017.09.073.
18. Morshnev P. K., Kustov A. V., Drondel E. A., Khlydeev I. I., et al. The interaction of chlorin photosensitizers for photodynamic therapy with blood transport proteins, *J Mol Liq*, 2023, vol. 390, p. 123116. doi: 10.1016/j.molliq.2023.123116.
19. Brusov S. S., Koloskova Y. S., Grin M. A., Tiganova I. G., et al. New cationic purpurinimide for photodynamic inactivation of *Pseudomonas Aeruginosa* biofilms, *Russ Biother J*, 2014, vol. 13, no. 4, pp. 59–63.
20. Suvorov N. V., Cheskov D. A., Mironov A. F., and Grin M. A. Inverse electron demand Diels–Alder reaction as a novel method for functionalization of natural chlorins, *Mendelev Commun*, 2019, vol. 29, no. 2, pp. 206–208. doi: 10.1016/j.mencom.2019.03.031.
21. Garcia de Carvalho G., Pacheco Mateo R., Costa e Silva R., Maquera Huacho P. M., de Souza Rastelli A. N., et al. Chlorin-based photosensitizer under blue or red-light irradiation against multi-species biofilms related to periodontitis, *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2023, vol. 41, p. 103219. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.103219.
22. Yang W., Yoon Y., Lee Y., Oh H., et al. Photosensitizer-peptoid conjugates for photoinactivation of Gram-negative bacteria: structure-activity relationship and mechanistic studies, *Org Biomol Chem*, 2021, vol. 19, no. 29, pp. 6546–6557. doi: 10.1039/d1ob00926e.
- todynamic therapy // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, № 12. – P. 6392. doi: 10.3390/ijms22126392.
6. de Souza da Fonseca A., de Paoli F., Mencialha A.L. Photodynamic therapy for treatment of infected burns // *Photodiagnosis Photodyn Ther.* – 2022. – Vol. 38. – P. 102831. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.102831.
7. Huang L., Xuan Y., Koide Y., Zhiyentayev T., Tanaka M., et al. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria // *Lasers Surg. Med.* – 2012. – Vol. 44, № 6. – P. 490–499. doi: 10.1002/lsm.22045.
8. Bustamante V., Palavecino C.E. Effect of photodynamic therapy on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: A scoping review // *Photodiagnosis Photodyn Ther.* – 2023. – Vol. 43. – P. 103709. doi: 10.1016/j.pdpdt.2023.103709.
9. Jao Y., Ding S.J., Chen C.C. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of oral infections: A systematic review // *J. Dent. Sci.* – 2023. – Vol. 18, № 4. – P. 1453–1466. doi: 10.1016/j.jds.2023.07.002.
10. Hamblin M.R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2016. – Vol. 33. – P. 67–73. doi: 10.1016/j.mib.2016.06.008.
11. Bertolini G., Rossi F., Valduga G., Jori G., van Lier J. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on *Escherichia coli* // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1990. – Vol. 71, № 1–2. – P. 149–155. doi: 10.1111/j.1574-6968.1990.tb03814.x.
12. Nitzan Y., Gutterman M., Malik Z., Ehrenberg B. Inactivation of Gram-Negative Bacteria By Photosensitized Porphyrins // *Photochem. Photobiol.* – 1992. – Vol. 55, № 1. – P. 89–96. doi: 10.1111/j.1751-1097.1992.tb04213.x.
13. Merchat M., Bertolini G., Giacomini P., Villanueva A., Jori G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* – 1996. – Vol. 32, № 3. – P. 153–157. doi: 10.1016/1011-1344(95)07147-4.
14. Kustov A. V., Kustova T. V., Belykh D. V., Khudyaeva I.S., Berezin D.B. Synthesis and investigation of novel chlorin sensitizers containing the myristic acid residue for antimicrobial photodynamic therapy // *Dye. Pigment.* – 2020. – Vol. 173. – P. 107948. doi: 10.1016/j.dyepig.2019.107948.
15. Ryazanova O., Voloshin I., Dubey I., Dubey L., Zozulya V. Fluorescent Studies on Cooperative Binding of Cationic Pheophorbide-a Derivative to Polyphosphate // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – Vol. 1130, № 1. – P. 293–299. doi: 10.1196/annals.1430.033.
16. Miyatake T., Hasunuma Y., Mukai Y., Oki H., Watanabe M., et al. Assemblies of ionic zinc chlorins assisted by water-soluble polypeptides // *Bioorganic Med. Chem.* – 2016. – Vol. 24, № 5. – P. 1155–1161. doi: 10.1016/j.bmc.2016.01.054.
17. Kustov A. V., Belykh D. V., Smirnova N.L., Venediktov E.A., Kudayarova T. V., et al. Synthesis and investigation of water-soluble chlorophyll pigments for antimicrobial photodynamic therapy // *Dye. Pigment.* – 2018. – Vol. 149. – P. 553–559. doi: 10.1016/j.dyepig.2017.09.073.
18. Morshnev P.K., Kustov A. V., Drondel E.A., Khlydeev I.I., Abramova O.B., et al. The interaction of chlorin photosensitizers for photodynamic therapy with blood transport proteins // *J. Mol. Liq.* – 2023. – Vol. 390. – P. 123116. doi: 10.1016/j.molliq.2023.123116.
19. Brusov S.S., Koloskova Y.S., Grin M.A., Tiganova I.G., Pagina O.E., et al. New cationic purpurinimide for photodynamic inactivation of *Pseudomonas Aeruginosa* biofilms // *Russ. Biother. J.* – 2014. – Vol. 13, № 4. – P. 59–63.
20. Suvorov N. V., Cheskov D.A., Mironov A.F., Grin M.A. Inverse electron demand Diels–Alder reaction as a novel method for functionalization of natural chlorins // *Mendelev Commun.* – 2019. – Vol. 29, № 2. – P. 206–208. doi: 10.1016/j.mencom.2019.03.031.
21. Garcia de Carvalho G., Pacheco Mateo R., Costa e Silva R., Maquera Huacho P.M., de Souza Rastelli A.N., et al. Chlorin-based photosensitizer under blue or red-light irradiation against multi-species biofilms related to periodontitis // *Photodiagnosis Photodyn Ther.* – 2023. – Vol. 41. – P. 103219. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.103219.
22. Yang W., Yoon Y., Lee Y., Oh H., Choi J., et al. Photosensitizer-peptoid conjugates for photoinactivation of Gram-negative bacteria: structure-activity relationship and mechanistic studies // *Org. Biomol. Chem.* – 2021. – Vol. 19, № 29. – P. 6546–6557. doi: 10.1039/d1ob00926e.

РЕЗУЛЬТАТЫ МИКРОХИРУРГИЧЕСКОЙ РЕЗЕКЦИИ ГЛИОБЛАСТОМ ПОД ЭНДОСКОПИЧЕСКИМ И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ КОНТРОЛЕМ

А.Ю. Рында, В.Е. Олюшин, Д.М. Ростовцев, Ю.М. Забродская, Г.В. Папаян

Российский нейрохирургический институт им. проф. А.Л. Поленова – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Общая выживаемость (ОВ) и безрецидивная выживаемость (БРВ) у пациентов с глиобластомой напрямую зависит от радикальности резекции опухоли. Согласно данным ряда авторов эндоскопические операции под флуоресцентным контролем увеличивают частоту тотальной резекции. Однако до сих пор имеется мало данных о влиянии эндоскопической резекции с флуоресцентным контролем на показатели БРВ и ОВ пациентов с глиобластомой. Целью нашего исследования было изучение влияния интраоперационного эндоскопического и флуоресцентного контроля на показатели ОВ и БРВ у пациентов с глиобластомой. Проведен ретроспективный одноцентровый анализ у 20 пациентов с глиобластомой. 10 пациентам выполнена резекция опухоли с использованием операционного микроскопа с эндоскопическим и флуоресцентным контролем. У 5 пациентов в качестве фотосенсибилизатора использовали 5-аминолевулиновую кислоту (5-АЛК) в дозе 20 мг/кг, у 5 пациентов хлорин е6 в дозе 1 мг/кг. 10 пациентам выполнена резекция под эндоскопическим контролем, но без флуоресцентного контроля. Обе когорты пациентов были сопоставимы по возрасту, функциональному состоянию, локализации опухоли, методам адъювантного лечения и молекулярному статусу. Критериями оценки эффективности проводимого исследования в группах были: радикальность проведенного оперативного вмешательства по данным послеоперационной магнитно-резонансной томографии с контрастным усилением, а также медианы БРВ и ОВ. В группе комбинированного хирургического вмешательства под микроскопическим и флуоресцентным контролем с эндоскопом частота тотальной резекции опухоли была выше, чем в группе пациентов, перенесших только хирургическое вмешательство под микроскопом и эндоскопом без флуоресцентного контроля (100% против 60%; $p=0,002$). Медиана ОВ в первой группе составила 20,2 мес (95% ДИ 11,9–28,6) против 16,3 мес во второй группе (95% ДИ 11,0–20,9) ($p=0,003$), медиана БРВ 11,7 мес (95% ДИ 9,8–15,7) против 9,8 мес (95% ДИ 6,1–13,4) ($p=0,04$). соответственно. Как показал наш опыт, использование флуоресцентного контроля во время резекции опухоли у пациентов с глиобластомой при эндоскопической ассистенции положительно отражается на результатах лечения пациентов с глиобластомой и может быть рекомендовано для широкого внедрения в клиническую практику.

Ключевые слова: глиобластома, эндоскопия, флуоресцентная резекция, результаты, выживаемость, 5-АЛК, хлорин е6.

Для цитирования: Рында А.Ю., Олюшин В.Е., Ростовцев Д.М., Забродская Ю.М., Папаян Г.В. Результаты микрохирургической резекции глиобластом под эндоскопическим и флуоресцентным контролем // Biomedical Photonics. – 2024. – Т. 13, № 3. – С. 20–30. doi: 10.24931/2413–9432–2024–13–3–20–30

Контакты: Рында А.Ю., e-mail: artemii.rynda@mail.ru

RESULTS OF MICROSURGICAL RESECTION OF GLIOBLASTOMAS UNDER ENDOSCOPIC AND FLUORESCENT CONTROL

Rynda A.Yu., Olyushin V.E., Rostovtsev D.M., Zabrodskaya Yu.M., Papayan G.V.

Russian Neurosurgical Institute named after prof. A.L. Polenov – a branch of the National Medical Research Center named after V.A. Almazov Ministry of Health of Russia, St. Petersburg, Russia

Abstract

Overall survival and recurrence-free survival (RFS) in patients with glioblastoma directly depend on the radicality of tumor resection. According to a number of literature sources, it is known that endoscopic surgeries under fluorescence control increase the rate of total resection. However, until now, there is little data on whether endoscopic resection with fluorescence control affects RFS and overall survival of patients with glioblastoma. The aim of our study was to investigate the effect of intraoperative endoscopic and fluorescence control on overall survival and RFS in patients with glioblastoma. A retrospective single-center analysis was performed in 20 patients with glioblastoma. Ten patients underwent tumor resection using an operating microscope with endoscopic and fluorescence control. In 5 patients, 5-aminolevulinic acid

(5-ALA) (alases) at a dose of 20 mg/kg was used as a photosensitizer, in 5 patients, chlorin e6 (photoditazine) at a dose of 1 mg/kg. Ten patients underwent resection under endoscopic control, but without fluorescence control. Both cohorts of patients were comparable in age, functional status, tumor localization, adjuvant treatment methods, and molecular status. The criteria for assessing the effectiveness of the study in the groups were: the radicality of the surgical intervention according to postoperative magnetic resonance imaging with contrast enhancement, as well as the median RFS and OS in patients. In the group of combined surgery under microscopic and fluorescence control with an endoscope, the rate of total tumor resection was higher than in the group of patients who underwent only surgery under a microscope and an endoscope without fluorescence control (100% versus 60%; $p = 0.002$). Median OS (20.2 months (95% CI 11.9-28.6) versus 16.3 months (95% CI 11.0-20.9); ($p = 0.003$)) and median RFS (11.7 months (95% CI 9.8-15.7) versus 9.8 months (95% CI 6.1-13.4) ($p = 0.04$)), were also statistically significantly higher compared to the group of patients who received treatment to the same extent, but without fluorescence control. As our experience has shown, the use of fluorescence control during tumor resection in patients with glioblastoma with endoscopic assistance is certainly necessary, given the technical capabilities available, as it has a positive effect on the treatment results for this category of patients.

Key words: glioblastoma, endoscopy, fluorescent resection, results, survival, 5-ALA, chlorin e6.

For citations: Rynda A.Yu., Olyushin V.E., Rostovtsev D.M., Zabrodskaya Yu.M., Papayan G.V. Results of microsurgical resection of glioblastomas under endoscopic and fluorescence control, *Biomedical Photonics*, 2024, vol. 13, no. 3, pp. 20–30. doi: 10.24931/2413–9432–2024–13–3 –20–30

Contacts: Rynda A.Yu., e-mail: artemii.rynda@mail.ru

Несмотря на последние достижения в области нейроонкологии и развитие новых методов лечения [1 – 5], выживаемость пациентов с глиобластомой остается на низком уровне [6, 7]. Медиана общей выживаемости (ОВ) у данной категории пациентов находится в интервале от 11 до 17 мес [6, 7]. Хирургическая резекция является важным этапом в лечении пациентов с глиобластомой [8]. Доказано, что применение флуоресцентного контроля при хирургическом вмешательстве у пациентов с глиобластомой увеличивает показатели ОВ и БРВ, что подтверждается убедительными результатами проспективных рандомизированных нейрохирургических исследований [9 – 15].

Основной целью хирургического лечения является полное удаление опухолевой ткани при максимальном сохранении неврологических функций у пациента. В ряде исследований показано, что тотальность резекции существенно увеличивает медиану БРВ и медиану ОВ по сравнению с субтотальной резекцией у пациентов с глиобластомой [15 – 20]. При этом визуализация флуоресценции может быть затруднена из-за спадания краев пострезекционной полости и уменьшения освещенности с увеличением глубины резекционной полости [10, 12, 14]. Это может приводить к ограничениям при микрохирургической резекции под контролем флуоресценции: видимая флуоресценция опухолевой ткани зависит от плотности клеток и клеточного метаболизма, а также от адекватного воздействия на опухолевую ткань синего света [16, 18 – 20].

В нескольких научных работах было продемонстрировано, что использование эндоскопа с флуоресцентным контролем позволяло увеличить степень радикальности резекции, а согласно данным единичных публикаций и показатели ОВ у пациентов со злокачественными опухолями головного мозга [21 – 26]. Информация об использовании комбинированного подхода (эндоскоп и флуоресценция) достаточно ограничена, что актуализирует значимость проводимого нами исследования.

Также мало литературных данных, в которых оценивается влияние резекции глиобластомы под флуоресцентным контролем и эндоскопом на показатели ОВ и БРВ у пациентов [22, 24 – 30].

Материалы и методы

Исследование носило характер ретроспективного одноцентрового анализа эффективности флуоресцентного эндоскопического контроля при удалении первичных глиобластом у пациентов [31], которым была проведена рутинная микрохирургическая резекция под эндоскопическим контролем в период с 2014 по 2016 гг. на базе Российского нейрохирургического научно-исследовательского института им. проф. А.Л. Поленова. У пациентов оценивали тотальность резекции, показатели БРВ и ОВ.

Из 20 пациентов обеих групп было 13 (65%) мужчин и 7 (35%) женщин. Средний возраст составил 56,0 лет, 4 (20%) пациентов были старше 65 лет.

Всем 20 пациентам проведена предоперационная МРТ с контрастным усилением гадолинием. Всем пациентам проведен предоперационный клинико-диагностический перечень обследований, включая осмотр специалистами (невролог, терапевт, онколог, офтальмолог), лабораторно-инструментальные методы исследования (анализы крови, мочи, электроэнцефалограмма, электрокардиограмма). Подробные клинические характеристики пациентов обеих групп представлены в табл. 1.

Протокол исследования был рассмотрен местным комитетом по этике (протокол №4 от 17.12.2013). Все пациенты были проинформированы о ходе операции, письменное согласие было получено в рамках стандартной процедуры информированного согласия на операцию от всех пациентов.

Критерии включения и исключения

В исследование были включены только пациенты с первичной глиобластомой, локализация которой была четко определена, чтобы гарантировать, что тоталь-

ность резекции может быть достигнута у всех пациентов. Возраст пациентов был старше 18 лет. Пациенты, перенесшие биопсию или нуждающиеся в интраоперационном нейромониторинге, были исключены. Также были исключены пациенты без послеоперационной МРТ головного мозга с контрастным усилением, пациенты в тяжелом состоянии, пациенты с наличие признаков почечно-печеночной недостаточности, хронических вирусных инфекций (гепатит С, В, ВИЧ-инфекции), паци-

енты с эндокринными заболеваниями или нарушениями метаболического обмена.

Хирургический этап

Из 10 пациентов основной группы 5 пациентов в качестве индуктора флуоресценции получали перорально препарат 5-АЛК (аласенс) производства ГНЦ «НИОПИК», ФГУП (Россия), в дозе 20 мг/кг, за 8 ч до интраоперационного этапа операции. Удаление опухоли производили с использованием интраоперационного микроскопа

Таблица 1
Клиническая характеристика пациентов
Table 1
Clinical characteristics of patients

Признак Sign	Эндоскопический контроль Endoscopic control	Эндоскопический и флуоресцентный контроль Endoscopic and fluorescent control	Значение p value
Количество пациентов Number of patients	10	10	
Возраст / Age			
Границы / Age limits	33-73	41-68	0,8
Медиана / Median age	55,6	56,5	
Пол / Gender			
мужчины / men	7 (70%)	6 (60%)	0,7
женщины / women	3 (30%)	4 (40%)	
Предоперационный индекс Карновского / Preoperative Karnofsky index			
Границы / Index boundaries	70-100	70-100	0,9
Медиана / Median	85	83	
Предоперационный размер опухоли, см³ / Preoperative tumor size, cm³			
Медиана / Median	25,4	27,8	0,7
Границы / Size limits	3,4-37	4,2-44,5	
Преимущественная локализация опухоли / Predominant tumor location			
лобная доля / frontal lobe	3 (30%)	2 (20%)	0,6
теменная доля / parietal lobe	2(20%)	4 (40%)	
височная доля / temporal lobe	4(40%)	4 (40%)	
затылочная доля / occipital lobe	1 (10%)	0 (0%)	
Полушарие / Hemisphere			
правое / right	7 (70%)	4 (40%)	0,01
левое / left	3 (30%)	6 (60%)	
Характер опухоли по данным МРТ головного мозга с контрастным усилением гадолинием Character of the tumor according to MRI of the brain with gadolinium contrast enhancement			
кистозное / cystic	2 (20%)	1 (10%)	0,8
кистозно-солидное / cystic-solid	7 (70%)	8 (80%)	
солидное / solid	1 (10%)	1 (10%)	
MGMT метилирование после первой операции / MGMT methylation after first surgery			
положительный / positive	4 (40%)	3 (30%)	0,7
отрицательный / negative	6 (60%)	7 (70%)	

с флуоресцентным контролем (OPMI Pentero 800, Carl Zeiss, Германия).

5 пациентов основной группы получали в качестве индуктора флуоресценции внутривенно препарат хлорин е6 (фотодитазин), производства ООО «БЕТА-ГРАНД» (Россия), в дозе 1 мг/кг, растворенный в 200 мл 0,9% раствора натрия хлорида, за 2 ч до предполагаемой этапа операции. Удаление опухоли производили с использованием операционного микроскопа (LEICA OHS-1) с установкой «D-Light AF System» Karl Storz (Германия) и флуоресцентной приставки производства Russia Science Seoul, Korean Electrotechnology Research Institute (KERI), (г. Сеул, Республика Корея) (разработка Г.В. Папаяна).

Удаление опухоли в группе без флуоресцентного контроля проводили под контролем интраоперационного микроскопа (OPMI Pentero, Carl Zeiss, Германия).

Для эндоскопического контроля у всех пациентов обеих групп использовали эндоскоп (Karl Storz, Германия) со специальным источником света (D-light C; Karl Storz), и систему камер (Karl Storz). Эндоскоп использо-

вали после полного микроскопического удаления всей визуализируемой ткани.

Для группы с флуоресцентным контролем в эндоскопе использовали режим D-light, который позволял переключаться между режимами источника белого и синего света с помощью соответствующего полосового фильтра на пути передачи света (рис. 1). Длиннопропускной фильтр на окуляре эндоскопа блокирует возбуждающий свет, что позволяет обнаруживать сигналы флуоресценции опухолевых клеток. Система фильтров возбуждения и обнаружения позволяет передавать достаточно синего света, чтобы красная флуоресценция эндогенных флуорофоров и неспецифическая флуоресценция подавлялась, в результате чего нормальная ткань визуализировалась как синяя. Микроскопическую флуоресцентную ткань и эндоскопическую флуоресцентную ткань, не визуализируемую под микроскопом, полностью удаляли и использовали отдельно для гистопатологического исследования (рис. 2).

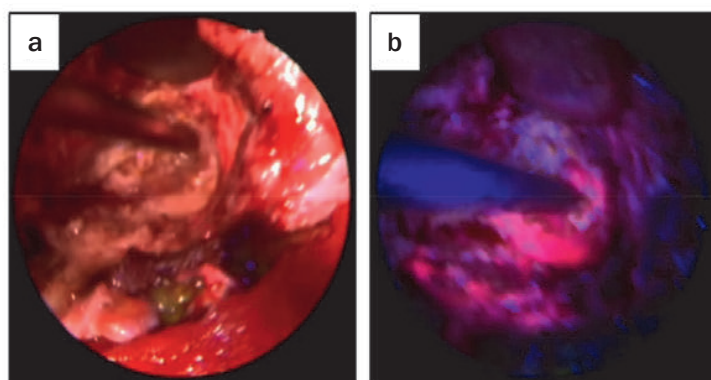


Рис. 1. Интраоперационная картина:
 а – изображение в эндоскопе при обычном освещении, без флуоресценции;
 б – изображение в эндоскопе в флуоресцентном режиме.
Fig. 1. Intraoperative picture:
 a – endoscope view under normal lighting, without fluorescence;
 b – endoscope view in fluorescent mode.

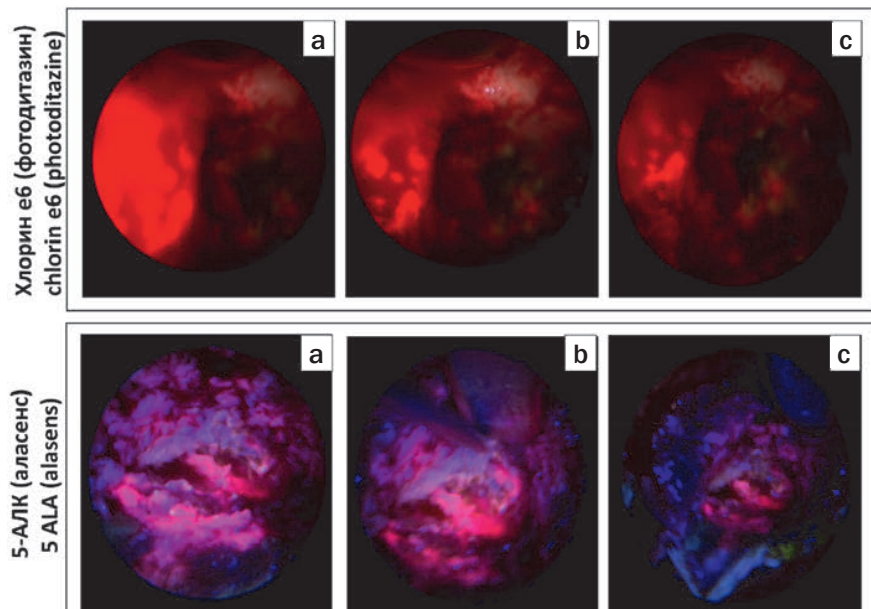


Рис. 2. Интраоперационная картина флуоресцентной диагностики в процессе резекции опухоли 5-АЛК и хлорином е6 (а, б, с – поэтапное удаление части опухолевой ткани накопившей флуоресцент).
Fig. 2. Intraoperative picture of fluorescent diagnostics during tumor resection with 5-ALA and chlorin e6 (a, b, c – step-by-step removal of part of the tumor tissue that has accumulated fluorescence).

Послеоперационная оценка

Всем пациентам было проведено МРТ в течение 24 ч после операции. Любое остаточное контрастирование более 0,2 см³ определяли как остаточную опухоль. Состояние работоспособности оценивали с использованием шкалы Карновского на момент выписки. Все включенные пациенты регулярно проходили клиническое обследование и МРТ с контрастированием каждые 3 мес. Наличие рецидива оценивали при последующем МРТ в соответствии с критериями оценки ответа по нейроонкологическим критериям (RANO) [8].

Послеоперационный период

Все пациенты в послеоперационном периоде получали стандартную адъювантную терапию (химиотерапия и лучевая терапия) по протоколу Stupp [32]. Лучевая терапия включала дистанционную фракционированную терапию на ложе удаленной опухоли с суммарной очаговой дозой 50-60 Гр за 25-30 фракций (по 1,8-2,0 Гр на фрак-

цию), в течение 5-6 нед. В качестве химиотерапии после первой операции пациенты получали темозоломид (в дозе 150-200 мг/м² с 1-го по 5-й день каждые 28 дней).

Пациентам в послеоперационном периоде проводили контрольное МРТ головного мозга каждые 3 мес в первые 12 мес или при появлении симптоматики, далее каждые 4 мес.

При выявлении рецидива по данным МРТ головного мозга при наличии показаний проводили повторное оперативное лечение или направляли пациента на повторную адъювантную терапию (химиотерапия и лучевую терапию). Схемы химиотерапии при рецидиве назначали онкологи по результатам гистологического исследования опухолевого материала, после повторных операций или по общепринятым схемам. Использовали следующие схемы химиотерапии: авастин + иринотекан; PCV (ломустин, винкристин, прокарбазин); ломустин + винкристин; темозоломид + авастин.

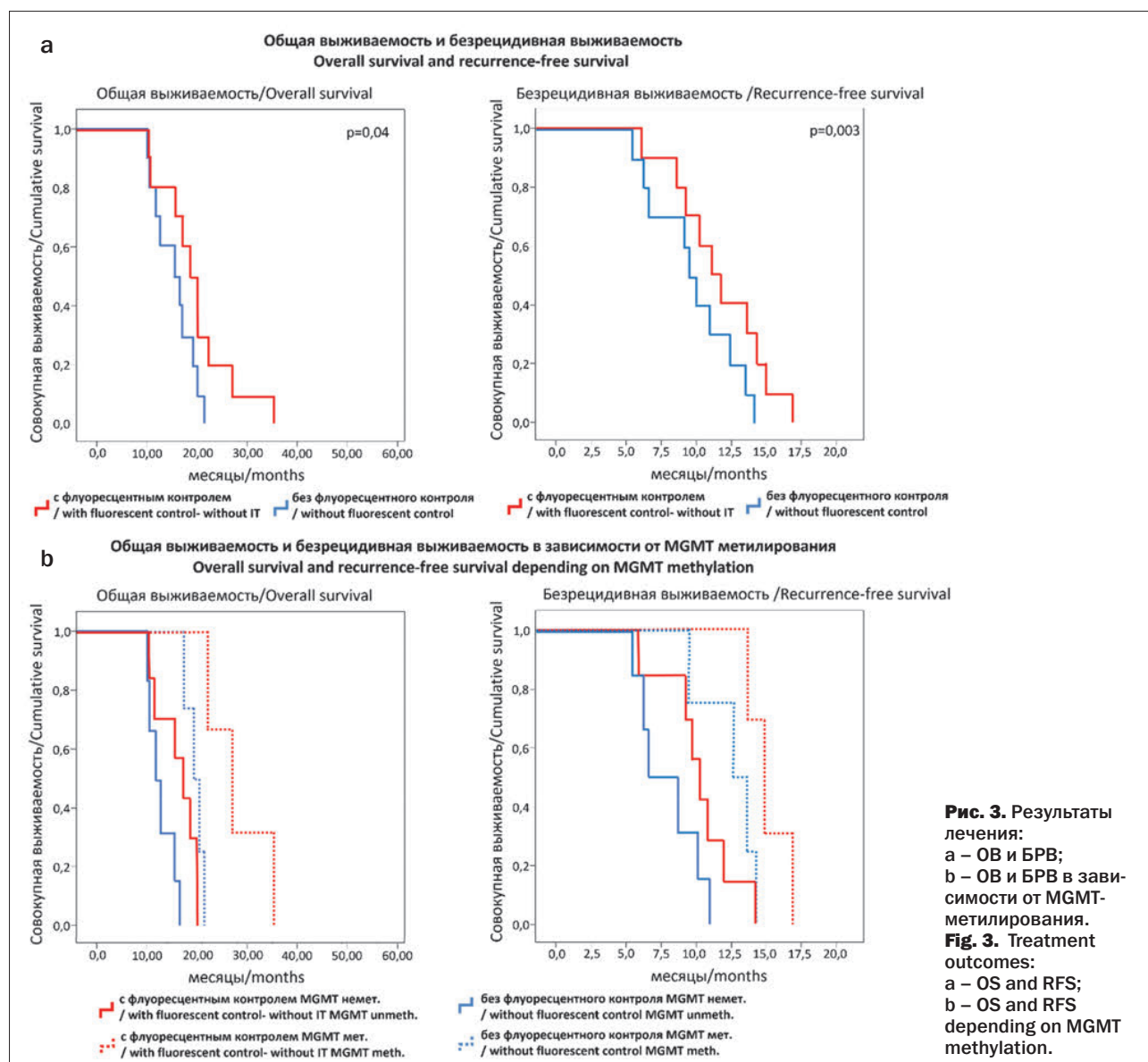


Рис. 3. Результаты лечения:
а – ОВ и БРВ;
б – ОВ и БРВ в зависимости от MGMT-метилирования.
Fig. 3. Treatment outcomes:
a – OS and RFS;
b – OS and RFS depending on MGMT methylation.

Критерии оценки эффективности проводимого исследования

Критериями оценки эффективности проводимого исследования в группах были: радикальность проведенного оперативного вмешательства по данным послеоперационной магнитно-резонансной томографии с контрастным усилением, значения медианы БРВ и медианы ОВ.

Статистический анализ

Весь анализ проводили с использованием SPSS (версия 20, IBM Corp.). Непрерывные переменные измеряли как средние или медианные значения и стандартное отклонение. Различия между обеими когортами анализировали с использованием непарного t-критерия. Описательную выживаемость анализировали с использованием метода Каплана-Мейера, р-значения < 0,05 считались значимыми.

Результаты

В раннем послеоперационном периоде ни у одного пациента не было выявлено осложнений, связанных с проведением эндоскопического или флуоресцентного контроля во время операции. Показатели индекса Кар-

новского у пациентов в каждой группе после операции было сопоставимо с дооперационными данными (p=0,9).

Тотальность резекции, БРВ и ОВ

По данным послеоперационной МРТ головного мозга с контрастным усилением гадолинием тотальной резекции удалось достичь у всех 10 (100%) пациентов, перенесших комбинированное хирургическое вмешательство под микроскопом и флуоресцентным контролем с эндоскопом, по сравнению с 6 (60%) пациентами, перенесших только хирургическое вмешательство под микроскопом и эндоскопом без флуоресцентного контроля (p=0,002). Медиана БРВ в когорте комбинированной резекции с применением флуоресцентного контроля с эндоскопом и микроскопа составила 11,7 мес (ДИ 95% 9,8–15,7) против 9,8 мес (ДИ 95% 6,1–13,4; p=0,04) в когорте резекций с применением микроскопа и эндоскопа, но без флуоресцентного контроля (рис. 3а).

Медиана ОВ в когорте комбинированной резекции с использованием флуоресцентного и эндоскопического контроля и микроскопа составила 20,2 мес (ДИ 95% 11,9–28,6) по сравнению с 16,3 месяца (ДИ 95% 11,0–20,9) в когорте резекции с использованием микроскопа и

Таблица 2
Результаты лечения пациентов в зависимости от клинических и гистологических данных
Table 2
Treatment results for patients depending on clinical and histological data

Пациент / Patient	Резекция с флуоресцентным контролем / Fluorescence-guided resection	Пол / Gender	Возраст / Age	Индекс Карновского / Karnofsky index KPS	Локализация опухоли (доля/сторона) / Tumor Location (lobe/side)	Характер опухоли по данным МРТ головного мозга с контрастным усилением гадолинием / Character of the tumor according to MRI of the brain with gadolinium contrast enhancement	Размер опухоли (см³) / Tumor volume (cm³)	MGMT метилирование / MGMT methylation	IDH мутация / IDH mutation	Тотальность резекции по данным МРТ / Totality of resection according to MRI data	Повторная резекция / Repeated resection	Общая доза ЛТ (Гр) / Total dose of RT (Gr)	Количество циклов TMZ / Number of TMZ cycles	Безрецидивная выживаемость, мес. / Recurrence-free survival, months	Вторая/третья линия лечения после рецидива / Second/third line of treatment after relapse	Общая выживаемость, мес. / Overall survival, months
1	да/ yes	ж/f	45	90	лобная правая/ frontal right	кистозно- солидное/ cystic-solid	33,1	мет/ meth	нет/no	да/yes	да/ yes	60	8	17,1	TM3+авастин/ TMZ+avastin	36,5
2	да/ yes	м/m	68	90	теменная левая/ parietal left	кистозно- солидное/ cystic-solid	4,2	мет/ meth	IDH1 (R132H)	да/yes	да/ yes	60	6	13,5	TM3/TMZ	22,4
3	да/ yes	ж/f	61	100	лобная левая/ frontal left	солидное/ solid	29,6	немет/ unmeth	нет/no	да/yes	нет/ no	60	5	8,8	авастин+ иринотекан/ avastin+ irinotecan	11,5
4	да/ yes	м/m	57	80	височная левая/ temporal left	кистозно- солидное/ cystic-solid	10,8	немет/ unmeth	IDH1/ IDH2	да/yes	да/ yes	60	7	14,5	TM3/TMZ	20,3

5	да/ yes	ж/f	49	80	теменная правая/ parietal right	кистозно- солидное/ cystic-solid	37,1	нет/ unmeth	нет/no	да/yes	да/ yes	90	6	10,7	TM3+авастин/ TMZ+avastin	17,7
6	да/ yes	ж/f	58	80	теменная левая/ parietal left	кистозно- солидное/ cystic-solid	42	мет/ meth	нет/no	да/yes	да/ yes	60	6	15,3	TM3/TMZ	27,9
7	да/ yes	м/m	41	70	височная левая/ temporal left	кистозное/ cystic	38,7	нет/ unmeth	нет/no	да/yes	нет/ no	60	5	11,8	TM3/TMZ	20,3
8	да/ yes	ж/f	60	70	височная правая/ temporal right	кистозно- солидное/ cystic-solid	44,5	нет/ unmeth	нет/no	да/yes	нет/ no	60	3	9,3	ломустин + винкристин/ lomustine + vincristine	18,4
9	да/ yes	м/m	67	90	теменная правая/ parietal right	кистозно- солидное/ cystic-solid	20,6	нет/ unmeth	нет/no	да/yes	да/ yes	60	7	10,1	PCV (ломустин, винкристин, прокарбазин)/ PCV	16,6
10	да/ yes	ж/f	59	80	височная левая/ temporal left	кистозно- солидное/ cystic-solid	17,4	нет/ unmeth	нет/no	да/yes	да/ yes	90	5	5,8	ломустин + винкристин/ lomustine + vincristine	10,7
11	нет/ no	ж/f	58	70	лобная правая/ frontal right	кистозно- солидное/ cystic-solid	35,5	нет/ unmeth	нет/no	нет/no	нет/ no	60	3	6,4	TM3+авастин/ TMZ+avastin	11,9
12	нет/ no	ж/f	44	90	теменная правая/ parietal right	кистозно- солидное/ cystic-solid	29,7	мет/ meth	нет/no	нет/no	нет/ no	90	6	13,8	авастин+ иринотекан/ avastin+ irinotecan	22,3
13	нет/ no	м/m	46	90	височная правая/ temporal right	кистозно- солидное/ cystic-solid	37	нет/ unmeth	нет/no	да/yes	да/ yes	60	5	11,1	PCV (ломустин, винкристин, прокарбазин)/ PCV	17,6
14	нет/ no	м/m	69	90	теменная левая/ parietal left	солидное/ solid	18,8	нет/ unmeth	нет/no	да/yes	да/ yes	60	7	10,2	TM3/TMZ	16,9
15	нет/ no	ж/f	73	80	височная правая/ temporal right	кистозное/ cystic	28,5	нет/ unmeth	нет/no	нет/no	нет/ no	60	5	8,3	TM3+авастин/ TMZ+avastin	13,3
16	нет/ no	ж/f	61	90	лобная левая/ frontal left	кистозно- солидное/ cystic-solid	33,9	мет/ meth	нет/no	да/yes	нет/ no	60	7	9,8	TM3/TMZ	18,9
17	нет/ no	ж/f	55	70	височная правая/ temporal right	кистозно- солидное/ cystic-solid	29,8	нет/ unmeth	IDH1 (R132H)	нет/no	да/ yes	60	9	5,3	TM3/TMZ	11,1
18	нет/ no	ж/f	60	80	височная левая/ temporal left	кистозно- солидное/ cystic-solid	17,6	мет/ meth	нет/no	да/yes	да/ yes	60	5	14,6	авастин+ иринотекан/ avastin+ irinotecan	20,1
19	нет/ no	м/m	57	100	затыл- лочная правая/ occipital right	кистозное/ cystic	3,4	нет/ unmeth	нет/no	да/yes	да/ yes	45	6	6,1	TM3+авастин/ TMZ+avastin	10,5
20	нет/ no	ж/f	33	90	лобная правая/ frontal right	кистозно- солидное/ cystic-solid	19,4	мет/ meth	нет/no	да/yes	да/ yes	60	5	12,5	ломустин + винкристин/ lomustine + vincristine	17,7

эндоскопа, но без флуоресцентного контроля ($p=0,003$) (табл. 2, рис. 3а).

Показана прямая связь между обнаружением ряда молекулярных маркеров, в частности показателя MGMT метилирования, и показателями БРВ и ОВ. Так, по данным нашего исследования пациенты обеих

групп с метилированным промоутером MGMT, имели лучшие показатели ОВ и БРВ, в сравнении с пациентами с неметилированным промоутером MGMT (рис. 3б).

В нашей работе не было выявлено связи между показателями возраста, пола, предоперационного

индекса Карновского, расположением и размером опухоли до операции, объемом проводимой адъювантной терапии (химиотерапии и лучевой терапии), и величинами показателей БРВ и ОВ. Частично это объясняется тем, что пациенты, которые были отобраны в исследование, были максимально сопоставимы по этим характеристикам, частично за счет небольшой выборки пациентов.

Морфологический анализ

Морфологическое исследование участков опухоли в зависимости от интенсивности флуоресценции показало, что существует прямая зависимость между плотностью опухолевых клеток, степенью анаплазии опухоли и интенсивностью флуоресценции во время операции. Чем ярче была флуоресценция опухолевой ткани, тем выше плотность опухолевых клеток, более злокачественный участок опухоли по данным морфологии (индекса Ki-67 и TP 53, уровень экспрессии VEGF). При этом в зоне некроза опухоли была отмечена либо очень слабая флуоресценция, либо её отсутствие. Чувствительность метода флуоресцентного контроля во время операции (зависимость интенсивности флуоресценции от степени анаплазии опухоли) была 100%, а специфичность (при сравнении флуоресцирующих и нефлуоресцирующих участков опухолевой ткани) достигала 85% (рис. 4).

Сравнение между собой полученных во время операции морфологических данных биоптатов пациентов, у которых в качестве индуктора флуоресценции были использованы препарат 5-АЛК и препарат хлорин е6,

не показало значимого отличия в специфичности и чувствительности выявления участков опухолевой ткани.

Морфологический анализ участков опухолевой ткани у пациентов группы с эндоскопическим контролем, но без флуоресцентного контроля показал, что чувствительность методики для выявления участков опухолевой ткани была 60% (анализ возможных участков воспринимающихся как опухолевая ткань, взятых во время операции под визуальным эндоскопическим контролем), а специфичность – 40% (сравнительный анализ между участками ткани взятыми во время операции, которые воспринимались при эндоскопическом контроле, как опухолевая ткань, и участков, которые воспринимались в эндоскопической картине как нормальная ткань мозга).

Обсуждение

В этом исследовании мы оценили влияние флуоресцентного контроля при комбинированной микрохирургической и эндоскопической резекции на медиану БРВ и медиану ОВ у пациентов с глиобластомой. Также была оценена чувствительность и специфичность методик. Наши результаты свидетельствуют о том, что медианы БРВ и ОВ были выше у пациентов с глиобластомой, если эндоскопическую резекцию дополняли флуоресцентным контролем. При этом использование флуоресцентного контроля позволяло увеличить чувствительность методики с 60 до 100%, а специфичность с 40 до 85%.

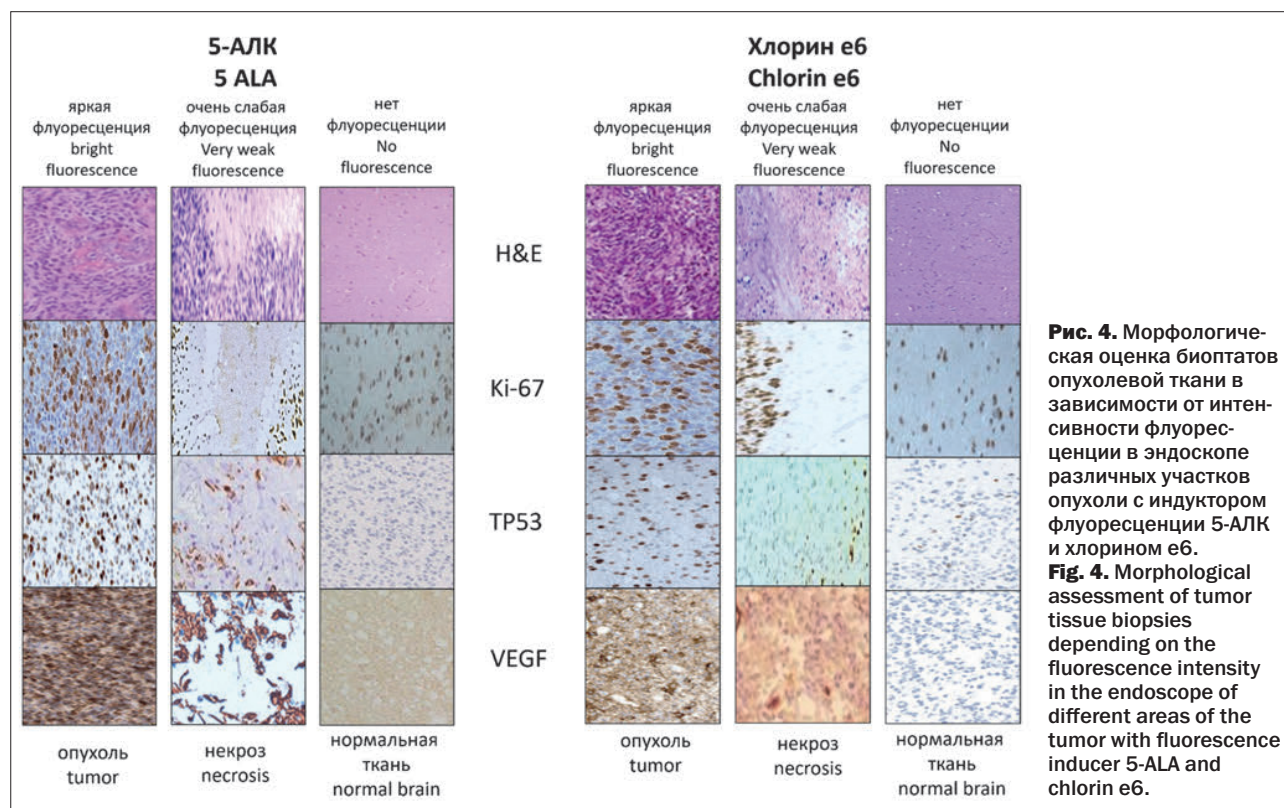


Рис. 4. Морфологическая оценка биоптатов опухолевой ткани в зависимости от интенсивности флуоресценции в эндоскопе различных участков опухоли с индуктором флуоресценции 5-АЛК и хлорином е6.
Fig. 4. Morphological assessment of tumor tissue biopsies depending on the fluorescence intensity in the endoscope of different areas of the tumor with fluorescence inducer 5-ALA and chlorin e6.

Влияние комбинированного подхода на радикальность резекции

Анализ литературных данных показывает, что использование эндоскопа во время операции позволяет хирургу значительно увеличить частоту тотальных резекций (95%) и достичь значительно большего удаления объема опухолевой ткани, не ограничиваясь контрастирующими частями опухоли по данным МРТ [18, 25]. А использование в дополнение к эндоскопу флуоресцентного контроля позволяет вывести радикальность резекции на более высокий уровень [26 – 28, 30, 33]. Кроме того, использование комбинации эндоскопа и флуоресцентного контроля при удалении глиобластомы представляется безопасной и осуществимой методикой, поскольку эндоскоп во флуоресцентном режиме позволяет идентифицировать опухолевую ткань с высокой чувствительностью (100%) и специфичностью (85%) [27, 28]. За счет значительного уменьшения расстояния между источником света и опухолевой тканью эндоскопический контроль и флуоресцентный контроль позволяет выявить опухолевую ткань, микроскопически недостаточно визуализируемую (расположенную по краям опухоли, в слепых зонах вокруг области краниотомии и глубоко в операционном поле с более плохой освещенностью). Это, в свою очередь, приводит к увеличению частоты тотальных резекций и делает возможной проведение супратотальной резекции [26, 30].

Так, в работе А.А. Potarov и соавт. [23] 17 пациентам была проведена микрохирургическая резекция с флуоресцентной эндоскопией с использованием 5-АЛК и использованием эндоскопического оборудования Karl Storz для определения остатков опухоли в полости резекции. Первичный диагноз опухоли включал злокачественные глиомы, метастазы и злокачественные опухоли основания черепа. В большинстве случаев подтверждена возможность контроля «заграничных» участков резекционной полости с помощью углового эндоскопа. Яркую флуоресценцию наблюдали не только в глиомах IV степени, но и в 3 из 4 метастазов. Авторы пришли к выводу, что использование эндоскопа для выполнения флуоресцентной навигации с 5-АЛК повышает эффективность диагностики для дифференциации нормальной ткани мозга и опухолевой ткани [23].

Наши результаты еще раз подчеркивают важность эндоскопического и флуоресцентного контроля при удалении глиобластом и показывают, что текущие ограничения стандартной хирургии под эндоскопическим контролем могут быть преодолены с помощью дополнения флуоресцентного контроля.

Влияние на общую выживаемость

В исследовании С. Bettag и соавт. [24] у 20 из 114 пациентов использовали дополнительный флуоресцентный и эндоскопический контроль во время операции, остальным пациентам выполняли удаление

опухоли под контролем операционного микроскопа и флуоресценции. Обе когорты были сопоставимы по возрасту, функциональному состоянию, локализации поражения, методам адъювантного лечения и молекулярному статусу. Полная тотальная резекция была достигнута у всех пациентов, у которых применяли эндоскопию, по сравнению примерно с 75,9% пациентов, у которых использовали только микроскоп ($p=0,003$). Медиана БРВ в когорте с применением эндоскопа составила 19,3 мес (ДИ 95% 10,8–27,7) по сравнению с 10,8 мес (ДИ 95% 8,2–13,4; $p=0,012$) в когорте с использованием только микроскопа. Медиана ОВ в группе с применением эндоскопа составила 28,9 мес (ДИ 95% 20,4–34,1) по сравнению с 16,8 мес (ДИ 95% 14,0–20,9) в группе с использованием только микроскопа ($p=0,001$) [24].

Наше исследование показало, что использование эндоскопического и флуоресцентного контроля способствовало увеличению частоты тотальности резекции и, тем самым, увеличило БРВ и ОВ у пациентов с глиобластомой.

Ограничения исследования

Наше исследование имеет несколько ограничений. Во-первых, это было ретроспективное исследование, и для подтверждения наших результатов необходимы дополнительные проспективные исследования. Во-вторых, когорта, в которой был применен комбинированный подход, немногочисленна и избирательна. В-третьих, вся исследуемая популяция является выборочной, поскольку в исследование включали только пациентов с достаточно четко расположенными глиобластомами. Тем не менее, обе когорты сопоставимы в отношении возможных факторов, которые могут искажать результаты, что позволяет нам предположить, что комбинированный подход превосходит стандартный микроскопический подход с эндоскопом с точки зрения частоты радикальности проводимого оперативного лечения и выживаемости у пациентов с глиобластомой.

Заключение

Это одно из первых исследований в нашей стране, сравнивающее резекцию глиобластомы под флуоресцентным контролем с помощью эндоскопа со стандартной резекцией с применением дополнительно к микроскопической резекции эндоскопа. Использование флуоресцентного контроля во время резекции опухоли при помощи эндоскопа, как показал наш опыт, повышает радикальность резекции и медианы ОВ и БРВ у пациентов с глиобластомой. Вместе с тем следует указать, что наблюдаемый нами эффект контрастирует с ограничениями в дизайне исследования. Следовательно, есть необходимость продолжить проведение дальнейшего исследования на большей группе пациентов, чтобы подтвердить наши выводы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рында А.Ю., Олюшин В.Е., Ростовцев Д.М. и соавт. Применение интраоперационной фотодинамической терапии в структуре комплексного лечения злокачественных глиом // Журнал «Вопросы нейрохирургии» имени Н.Н. Бурденко. – 2023. – Т. 87, №1. – С. 25-34. doi: 10.17116/neiro20238701125
2. Рында А.Ю., Олюшин В.Е., Ростовцев Д.М. и соавт. Результаты использования интраоперационного флуоресцентного контроля с хлорином Е6 при резекции глиальных опухолей головного мозга // Журнал «Вопросы нейрохирургии» имени Н.Н. Бурденко. – 2021. – Т. 85, №4. – С. 20-28. doi: 10.17116/neiro20218504120
3. Rynda A.Y., Rostovtsev D.M., Zabrodskaya Y.M. et al. Immunotherapy with autologous dendritic cells in the complex treatment of malignant gliomas – results. // J. Neurooncol. – 2024. – Vol.166. – P. 309-319. doi: 10.1007/s11060-023-04559-1
4. Rynda A.Y., Olyushin V., Rostovtsev D. Immunotherapy With Autologous Dendritic Cells in the Structure of Complex Treatment of Gliomas // Neurosurgery. – 2024. – Vol.70 (1). – P. 196. doi: 10.1227/neu.0000000000002809_1244
5. Rynda A.Yu., Rostovtsev D.M., Olyushin V.E. et al. Therapeutic pathomorphosis in malignant glioma tissues after photodynamic therapy with chlorin e6 (reports of two clinical cases) // Biomedical Photonics. – 2020. – Vol.9, №2. – P. 45-54. doi: 10.24931/2413-9432-2020-9-2-45-54
6. Ostrom Q.T., Cioffi G., Waite K. et al. CBTRUS Statistical Report: primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014-2018. // Neuro Oncol. – 2021. – Vol. 23. – P. III1-III105. doi: 10.1093/NEUONC/NOAB200
7. Poon M.T.C., Sudlow C.L.M., Figueroa J.D., Brennan P.M. Longer-term (≥ 2 years) survival in patients with glioblastoma in population-based studies pre- and post-2005: A systematic review and meta-analysis // Sci Rep. – 2020. – Vol. 10. – P. 11622. doi: 10.1038/s41598-020-68011-4
8. Karschnia P., Vogelbaum M.A., van den Bent M. et al. Evidence-based recommendations on categories for extent of resection in diffuse glioma // Eur. J. Cancer. – 2021. – Vol.149. – P. 23-33. doi: 10.1016/j.ejca.2021.03.002
9. Рында А.Ю., Олюшин В.Е., Ростовцев Д.М. и соавт. Сравнительный анализ флуоресцентной навигации в хирургии злокачественных глиом с использованием 5-АЛА и хлорина Е6 // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2022. – №1. – С. 5-14. doi: 10.17116/hirurgia20220115
10. Горайнов С.А., Потапов А.А., Охлопков В.А. и соавт. Метаболическая навигация в хирургии опухолей головного мозга: анализ серии 403 пациентов // Нейрохирургия. – 2022. – Т. 24, №4. – С. 46-58. doi: 10.17650/1683-3295-2022-24-4-46-58
11. Рында А.Ю., Забродская Ю.М., Олюшин В.Е. и соавт. Морфологическая оценка эффективности флуоресцентной навигации с хлорином е6 в хирургии злокачественных глиом // Архив патологии. – 2021. – Т. 83, №5. – С. 13-20. doi: 10.17116/patol20218305113
12. Goryaynov S.A., Buklina S.B., Khapov I.V. et al. 5-ALA-guided tumor resection during awake speech mapping in gliomas located in eloquent speech areas: Single-center experience // Front. Oncol. – 2022. – Vol.12. – P. 940951. doi: 10.3389/fonc.2022.940951
13. Рында А.Ю., Ростовцев Д.М., Олюшин В.Е. Флуоресцентно-контролируемая резекция астроцитарных опухолей головного мозга – обзор литературы // Российский нейрохирургический журнал имени профессора А.Л. Поленова. – 2018. – Т. X, №1. – С. 97-110.
14. Batalov A.I., Goryaynov S.A., Zakharova N.E. et al. Prediction of Intraoperative Fluorescence of Brain Gliomas: Correlation between Tumor Blood Flow and the Fluorescence // J. Clin. Med. – 2021. – Vol.10. – P. 2387. doi: 10.3390/jcm10112387
15. Рында А.Ю., Олюшин В.Е., Ростовцев Д.М. и соавт. Флуоресцентная диагностика с хлорином Е6 в хирургии глиом низкой степени злокачественности // Biomedical Photonics. – 2021. – Т. 10, № 4. – С. 35-43. doi: 10.24931/2413-9432-2021-10-4-35-43
16. Потапов А.А., Чобулов С.А., Никитин П.В. и соавт. Интраоперационная флуоресценция сосудов в структуре глиобластом головного мозга и их гистологическая характеристика // Журнал «Вопросы нейрохирургии» имени Н.Н. Бурденко. – 2019. – Т. 83, №6. – С. 21-34. doi: 10.17116/neiro20198306121
17. Рында А.Ю., Ростовцев Д.М., Олюшин В.Е., Забродская Ю.М. Флуоресцентно-контролируемая резекция глиальных опухолей с «Фотодитазин» // Вестник хирургии имени

REFERENCES

1. Rynda A.Yu., Olyushin V.E., Rostovtsev D.M., et al. Intraoperative photodynamic therapy in complex treatment of malignant gliomas. *Zhurnal Voprosy Neurokhirurgii Imeni N.N. Burdenko*, 2023, vol. 87(1), pp.25-34. (In Russian) doi:10.17116/neiro20238701125
2. Rynda A.Yu., Olyushin V.E., Rostovtsev D.M., et al. Intraoperative fluorescence control with chlorin E6 in resection of glial brain tumors. *Zhurnal Voprosy Neurokhirurgii Imeni N.N. Burdenko*, 2021, vol.85, no.4, pp. 20-28. (In Russian). doi:10.17116/neiro20218504120
3. Rynda A.Y., Rostovtsev D.M., Zabrodskaya Y.M., et al. Immunotherapy with autologous dendritic cells in the complex treatment of malignant gliomas – results. *J. Neurooncol.*, 2024, vol.166, pp.309-319. doi: 10.1007/s11060-023-04559-1
4. Rynda A.Y., Olyushin V., Rostovtsev D. Immunotherapy With Autologous Dendritic Cells in the Structure of Complex Treatment of Gliomas. *Neurosurgery*, 2024, vol.70 (1), pp.196. doi: 10.1227/neu.0000000000002809_1244
5. Rynda A.Yu., Rostovtsev D.M., Olyushin V.E., Zabrodskaya Yu.M. Therapeutic pathomorphosis in malignant glioma tissues after photodynamic therapy with chlorin e6 (reports of two clinical cases). *Biomedical Photonics*, 2020, vol.9(2), pp.45-54. (In Russian) doi: 10.24931/2413-9432-2020-9-2-45-54
6. Ostrom Q.T., Cioffi G., Waite K., et al. CBTRUS Statistical Report: primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014-2018. *Neuro Oncol.*, 2021, vol.23, pp. III1-III105. doi: 10.1093/NEUONC/NOAB200
7. Poon M.T.C., Sudlow C.L.M., Figueroa J.D., Brennan P.M. Longer-term (≥ 2 years) survival in patients with glioblastoma in population-based studies pre- and post-2005: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.*, 2020, vol.10, pp.11622. doi: 10.1038/s41598-020-68011-4
8. Karschnia P., Vogelbaum M.A., van den Bent M., et al. Evidence-based recommendations on categories for extent of resection in diffuse glioma. *Eur J Cancer.*, 2021, vol.149, pp.23-33. doi: 10.1016/j.ejca.2021.03.002
9. Rynda A.Yu., Olyushin V.E., Rostovtsev D.M., et al. Comparative analysis of 5-ALA and chlorin E6 fluorescence-guided navigation in malignant glioma surgery. *Pirogov Russian Journal of Surgery = Khirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova*, 2022, vol.1, pp.5-14. (In Russian) doi: 10.17116/hirurgia20220115
10. Goryaynov S.A., Potapov A.A., Okhlopov V.A., et al. Metabolic navigation during brain tumor surgery: analysis of a series of 403 patients. *Russian journal of neurosurgery*, 2022, vol.24(4), pp.46-58. doi:10.17650/1683-3295-2022-24-4-46-58
11. Rynda A.Yu., Zabrodskaya Yu.M., Olyushin V.E., et al. Morphological evaluation of the effectiveness of fluorescence navigation with chlorin e6 in surgery for malignant gliomas. *Arkhiv Patologii*, 2021, vol.83(5), pp.13-20. (In Russian) doi: 10.17116/patol20218305113
12. Goryaynov S.A., Buklina S.B., Khapov I.V., et al. 5-ALA-guided tumor resection during awake speech mapping in gliomas located in eloquent speech areas: Single-center experience. *Front. Oncol.*, 2022, vol.12, pp.940951. doi: 10.3389/fonc.2022.940951
13. Rynda A.Yu., Rostovtsev D.M., Olyushin V.E. Fluorescence-Guided Resection of Glioma – literature review. *Russian Neurosurgical Journal named after professor A.L. Polenov*, 2018, vol.X(1), pp. 97-110. (In Russian)
14. Batalov A.I., Goryaynov S.A., Zakharova N.E., et al. Prediction of Intraoperative Fluorescence of Brain Gliomas: Correlation between Tumor Blood Flow and the Fluorescence. *J. Clin. Med.*, 2021, vol.10, pp. 2387. doi: 10.3390/jcm10112387
15. Rynda A.Yu., Olyushin V.E., Rostovtsev D.M., et al. Fluorescent diagnostics with chlorin e6 in surgery of low-grade glioma. *Biomedical Photonics*, 2021, vol. 10, no. 4, pp. 35-43 (in Russian). doi: 10.24931/2413-9432-2021-10-4-35-43
16. Potapov A.A., Chobulov S.A., Nikitin P.V., et al. Intraoperative vascular fluorescence in cerebral glioblastomas and vascular histological features. *Zhurnal Voprosy Neurokhirurgii Imeni N.N. Burdenko*, 2019, vol.83(6), pp.21-34. (In Russian). doi: 10.17116/neiro20198306121
17. Rynda A.Yu., Rostovtsev D.M., Olyushin V.E., Zabrodskaya Yu.M. Fluorescence-guided resection of glioma using «photoditazin».

- И.И. Грекова. – 2017. – Т.176, №5. – С.10-15. doi: 10.24884/0042-4625-2017-176-5-10-15
18. Goryaynov S.A., Okhlopkov V.A., Golbin D.A. et al. Fluorescence Diagnosis in Neurooncology: Retrospective Analysis of 653 Cases // *Front. Oncol.* – 2019. – Vol.9. – P. 830. doi: 10.3389/fonc.2019.00830
19. Stummer W., Pichlmeier U., Meinel T. et al. ALA-Glioma Study Group. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial // *Lancet Oncol.* – 2006. – Vol.7(5). – P.392-401. doi: 10.1016/S1470-2045(06)70665-9
20. Горяйнов С.А., Потапов А.А., Пицхелаури Д.И. и соавт. Интраоперационная флуоресцентная диагностика и лазерная спектроскопия при повторных операциях по поводу глиом головного мозга // Журнал «Вопросы нейрохирургии» имени Н.Н. Бурденко. – 2014. – Т. 78, №2. – С.22-31.
21. Rynda A., Olyushin V., Rostovtsev D. Fluorescence navigation in glioma surgery using 5 ALA and chlorin E6 // *Neuro-Oncology.* – 2021. – Vol. 23, (2). – P. ii25. doi: 10.1093/neuonc/noab180.086
22. Rapp M., Kamp M., Steiger H.J., Sabel M. Endoscopic-assisted visualization of 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence in malignant glioma surgery: a technical note. // *World Neurosurg.* – 2014. – Vol.82. – P.e277-e279. doi: 10.1016/j.wneu.2013.07.002
23. Potapov A.A., Usachev D.J., Loshakov V.A. et al. First experience in 5-ALA fluorescence-guided and endoscopically assisted microsurgery of brain tumors // *Medical Laser Application.* – 2008. – Vol.23(4). – P. 202-208. doi: 10.1016/j.mla.2008.07.006
24. Bettag C., Schatlo B., Abboud T. et al. Endoscope-enhanced fluorescence-guided microsurgery increases survival in patients with glioblastoma // *Acta Neurochir (Wien).* – 2023. – Vol.165(12). – P. 4221-4226. doi: 10.1007/s00701-023-05862-6
25. Bettag C., Schregel K., Langer P., et al. Endoscope-assisted fluorescence-guided resection allowing supratotal removal in glioblastoma surgery // *Neurosurg Focus.* – 2021. – Vol.50. – P. E3. doi: 10.3171/2020.10.FOCUS20560.
26. Strickland B.A., Zada G. 5-ALA Enhanced Fluorescence-Guided Microscopic to Endoscopic Resection of Deep Frontal Subcortical Glioblastoma Multiforme // *World Neurosurgery.* – 2021. – Vol.148. – P.65. doi: 10.1016/j.wneu.2020.12.168
27. Sakata T., Tanikawa M., Yamada H. Minimally invasive treatment for glioblastoma through endoscopic surgery including tumor embolization when necessary: a technical note // *Front Neurol.* – 2023. – Vol.14. – P. 1170045. doi: 10.3389/fneur.2023.1170045
28. Ma R., Livermore L.J., Taylor L. et al. Endoscopic 5-Aminolevulinic Acid-Induced Fluorescence-Guided Intraparenchymal Brain Tumor Resection – Can the Endoscope Detect More Fluorescence Than the Microscope? // *World Neurosurgery.* – 2024. – Vol. 185. – P. e1268-e1279. doi: 10.1016/j.wneu.2024.03.067
29. Takeda J., Nonaka M., Li Y. et al. 5-Aminolevulinic acid fluorescence-guided endoscopic surgery for intraventricular tumors // *Surg Neurol Int.* – 2022. – Vol.13. – P. 302. doi: 10.25259/SNI_488_2022
30. McKinnon C., Voets N., Livermore L. et al. Endoscopic ipsilateral interhemispheric approach for resection of selected deep medial brain tumors // *World Neurosurg.* – 2020. – Vol.144. – P. 162-169. doi: 10.1016/j.wneu.2020.08.147
31. Louis D.N., Perry A., Wesseling P. et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary // *Neuro Oncol.* – 2021. – Vol.23(8). – P. 1231-1251. doi: 10.1093/neuonc/noab106
32. Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma // *N. Engl. J. Med.* – 2005. Vol. 352(10). – P. 987-996. doi: 10.1056/NEJMoa043330
33. Рында А.Ю., Олюшин В.Е., Ростовцев Д.М. и соавт. Пациенты с длительной выживаемостью при злокачественных глиомах после фотодинамической терапии // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2024. – Т.124, №6. – С.54-61. doi: 10.17116/jnevro202412406154
- Grekov's Bulletin of Surgery*, 2017, vol.176(5), pp.10-15. (In Russian). doi: 10.24884/0042-4625-2017-176-5-10-15
18. Goryaynov S.A., Okhlopkov V.A., Golbin D.A., et al. Fluorescence Diagnosis in Neurooncology: Retrospective Analysis of 653 Cases. *Front. Oncol.*, 2019, vol.9, pp.830. doi: 10.3389/fonc.2019.00830
19. Stummer W., Pichlmeier U., Meinel T., et al. ALA-Glioma Study Group. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.*, 2006, vol.7(5), pp.392-401. doi: 10.1016/S1470-2045(06)70665-9
20. Goriainov S.A., Potapov A.A., Pitskhelauri D.I., et al. Intraoperative fluorescence diagnostics upon recurrent operations for brain gliomas. *Zhurnal Voprosy Neurokhirurgii imeni N.N. Burdenko*, 2014, vol.78(2), pp.22-31. (In Russian).
21. Rynda A., Olyushin V., Rostovtsev D. Fluorescence navigation in glioma surgery using 5 ALA and chlorin E6. *Neuro-Oncology*, 2021, vol.23(2), pp. ii25. doi: 10.1093/neuonc/noab180.086
22. Rapp M., Kamp M., Steiger H.J., Sabel M. Endoscopic-assisted visualization of 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence in malignant glioma surgery: a technical note. *World Neurosurg.*, 2014, vol.82, ppe277–e279. doi: 10.1016/j.wneu.2013.07.002
23. Potapov A.A., Usachev D.J., Loshakov V.A., et al. First experience in 5-ALA fluorescence-guided and endoscopically assisted microsurgery of brain tumors. *Medical Laser Application*, 2008, vol.23(4), pp. 202-208. doi: 10.1016/j.mla.2008.07.006
24. Bettag C., Schatlo B., Abboud T. et al. Endoscope-enhanced fluorescence-guided microsurgery increases survival in patients with glioblastoma. *Acta Neurochir (Wien)*, 2023, vol.165(12), pp.4221-4226. doi: 10.1007/s00701-023-05862-6
25. Bettag C., Schregel K., Langer P., et al. Endoscope-assisted fluorescence-guided resection allowing supratotal removal in glioblastoma surgery. *Neurosurg Focus*, 2021, vol.50: pp. E3. doi: 10.3171/2020.10.FOCUS20560.
26. Strickland B.A., Zada G. 5-ALA Enhanced Fluorescence – Guided Microscopic to Endoscopic Resection of Deep Frontal Subcortical Glioblastoma Multiforme. *World Neurosurgery*, 2021, vol.148, pp. 65. doi: 10.1016/j.wneu.2020.12.168
27. Sakata T., Tanikawa M., Yamada H. Minimally invasive treatment for glioblastoma through endoscopic surgery including tumor embolization when necessary: a technical note. *Front Neurol.*, 2023, vol.14, pp.1170045. doi: 10.3389/fneur.2023.1170045
28. Ma R., Livermore L.J., Taylor L. et al. Endoscopic 5-Aminolevulinic Acid – Induced Fluorescence-Guided Intraparenchymal Brain Tumor Resection – Can the Endoscope Detect More Fluorescence Than the Microscope? *World Neurosurgery*, 2024, vol.185, pp. e1268-e1279. doi: 10.1016/j.wneu.2024.03.067
29. Takeda J., Nonaka M., Li Y., et al. 5-Aminolevulinic acid fluorescence-guided endoscopic surgery for intraventricular tumors. *Surg Neurol Int.*, 2022, vol.13, pp. 302. doi: 10.25259/SNI_488_2022
30. McKinnon C., Voets N., Livermore L., et al. Endoscopic ipsilateral interhemispheric approach for resection of selected deep medial brain tumors. *World Neurosurg.*, 2020, vol.144, pp.162-169. doi: 10.1016/j.wneu.2020.08.147
31. Louis D.N., Perry A., Wesseling P., et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro Oncol.*, 2021, vol.23(8), pp.1231-1251. doi: 10.1093/neuonc/noab106
32. Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J., et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.*, 2005, vol.352(10), pp. 987-996. doi: 10.1056/NEJMoa043330
33. Rynda A.Yu., Olyushin V.E., Rostovtsev D.M., et al. Patients with long-term survival in malignant gliomas after photodynamic therapy. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry.*, 2024, vol.124(6), pp. 54-61. (In Russian). doi: 10.17116/jnevro202412406154

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ИНФИЦИРОВАННЫХ РАН ВЫСОКОИНТЕНСИВНЫМ ИМПУЛЬСНЫМ ШИРОКОПОЛОСНЫМ ОБЛУЧЕНИЕМ

В.С. Егоров^{1,2}, А.Ю. Филимонов¹, С.М. Чудных^{1,2,3}, Х.А. Абдувосидов^{1,3,4},
И.А. Чекмарева^{5,6}, О.В. Паклина^{1,5}, Л.М. Баранчугова⁴, А.В. Кондратьев⁷

¹Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова ДЗМ,
Москва, Россия

²Российский университет медицины, Москва, Россия

³Тверской государственный медицинский университет, Тверь, Россия

⁴Российский биотехнологический университет, Москва, Россия

⁵НМИЦ Хирургии им. А.В. Вишневского, Москва, Россия

⁶Российский Университет дружбы народов, Москва, Россия

⁷Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана, Москва, Россия

Резюме

Целью исследования явилось изучение эффективности высокоинтенсивного импульсного широкополосного облучения инфицированных ран. Проведено морфологическое исследование препаратов ран 105 крыс линии Wistar, которым в эксперименте моделировали инфицированные раны (три группы животных). В 1-й группе для лечения ран использовали высокоинтенсивное импульсное широкополосное облучение, во 2-й группе – традиционное ультрафиолетовое облучение, и в 3-й применяли только антисептик. Оценку эффективности производили до лечения, на 7-е, 14-е и 21-е сутки лечения. До начала лечения картина ран соответствовала фазе острого воспаления. На 7-й день в 1-й группе морфологическая картина соответствовала фазе пролиферации. Во 2-й и 3-й группах отек и инфильтрация к этому сроку сохранялись. К 14-му дню в 1-й группе наблюдали признаки формирования грануляционной ткани и переход ран в стадию регенерации. Во 2-й группе уменьшалась инфильтрация, появлялись новые капилляры, увеличивалось количество фибробластов. В 3-й группе, воспалительные явления сохранялись. К 21-му дню в первой группе наблюдалось ремоделирование соединительной ткани с признаками образования нежного рубца. Во 2-й группе животных наблюдались явления ремоделирования соединительной ткани. В препаратах ран 3-й группы инфильтрация уменьшена, новые сосуды образуются с замедлением. Таким образом, использование высокоинтенсивного импульсного широкополосного облучения инфицированных ран в более ранние сроки купирует воспаление, активизирует местную иммунную реакцию и ускоряет репаративные процессы.

Ключевые слова: инфицированные раны, раневой процесс, высокоинтенсивное импульсное широкополосное облучение, ультрафиолетовое облучение, инфильтрация, ремоделирование соединительной ткани.

Для цитирования: Егоров В.С., Филимонов А.Ю., Чудных С.М., Абдувосидов Х.А., Чекмарева И.А., Паклина О.В., Баранчугова Л.М., Кондратьев А.В. Морфологическая оценка эффективности лечения инфицированных ран высокоинтенсивным импульсным широкополосным облучением // Biomedical Photonics. – 2024. – Т. 13, № 3. – С. 31–41. doi: 10.24931/2413–9432–2024–13–3–31–41

Контакты: Абдувосидов Х.А., e-mail: sogdiana99@gmail.com

MORPHOLOGICAL EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF TREATING INFECTED WOUNDS WITH HIGH-INTENSITY PULSED BROADBAND IRRADIATION

Egorov V.S.^{1,2}, Filimonov A.Yu.¹, Chudnykh S.M.^{1,2,3}, Abduvosidov Kh.A.^{1,3,4}, Chekmareva I.A.^{5,6}, Paklina O.V.^{1,5}, Baranchugova L.M.⁴, Kondrat'ev A.V.⁷

¹Moscow clinical scientific center n.a. A.S. Loginov, Moscow, Russia

²Russian university of medicine, Moscow, Russia

³Tver state medical university, Tver, Russia

⁴Russian biotechnological university, Moscow, Russia

⁵A.V. Vishnevsky national medical research center of surgery, Moscow, Russia

⁶Peoples' friendship university of Russia, Moscow, Russia

⁷Bauman Moscow state technical university, Moscow, Russia

Abstract

The objective of this study was to investigate the effectiveness of high-intensity pulsed broadband irradiation in treating infected wounds. A morphological study was conducted on wound specimens from 105 Wistar rats, in which infected wounds were experimentally induced (three groups). The first group was treated with high-intensity pulsed broadband irradiation, the second group received traditional ultraviolet irradiation, and the third group was treated only with antiseptics. Monitoring was performed before treatment, on the 7th, 14th, and 21st days of treatment. Non-parametric statistical methods were used for data analysis. Prior to treatment, the wounds exhibited signs of the acute inflammation phase. By the 7th day, the first group's wounds were in the proliferation phase. In the second and third groups, edema and infiltration persisted. By the 14th day, the first group's wounds showed signs of granulation tissue formation and transition to the regeneration stage. In the second group, there was a reduction in infiltration, the appearance of new capillaries, and an increase in fibroblasts. In the third group, inflammatory symptoms persisted. By the 21st day, the first group showed remodeling of connective tissue with signs of delicate scar formation. In the second group, signs of connective tissue remodeling were observed, while in the third group, there was reduced infiltration with slow formation of new vessels. Thus, the use of high-intensity pulsed broadband irradiation in the early stages effectively mitigates inflammation, activates local immune response, and accelerates reparative processes.

Keywords: infected wounds, wound healing process, high-intensity pulsed broadband irradiation, ultraviolet irradiation, infiltration, connective tissue remodeling.

For citations: Egorov V.S., Filimonov A.Yu., Chudnykh S.M., Abduvosidov Kh.A., Chekmareva I.A., Paklina O.V., Baranchugova L.M., Kondrat'ev A.V. Morphological evaluation of the effectiveness of treating infected wounds with high-intensity pulsed broadband irradiation, *Biomedical Photonics*, 2024, vol. 13, no. 3, pp. 31–41. doi: 10.24931/2413–9432–2024–13–3 –31–41

Contacts: Abduvosidov Kh.A., e-mail: sogdiana99@gmail.com

Введение

На сегодняшний день врачи многих специальностей применяют различные физические методы воздействия при лечении большого количества заболеваний, в том числе и воспалительных. Так, в хирургии широко применяют методы фототерапии, которые включают в себя лазерное и ультрафиолетовое облучение тканей.

В связи с высокой лекарственной устойчивостью микроорганизмов некоторые авторы предлагают искать альтернативные пути лечения инфицированных ран с применением физических методов воздействия [1, 2]. Чувствительность многих микроорганизмов к ультрафиолетовому излучению хорошо известна и тщательно охарактеризована. За последнее десятилетие противомикробная терапия, основанная на применении оптического излучения, достигла значительных успехов в борьбе с устойчивостью к антибиотикам среди различных штаммов микроорганизмов. Данный способ лечения включает методы с использованием противомикробных свойств синего света, противомикробную фотодинамическую терапию и бактерицидное ультрафиолетовое облучение. Фототерапия имеет преимущество перед традиционными антибиотиками, поскольку она быстро уничтожает микробные клетки и вероятность развития у микробов фоторезистентности низка. Как утверждают многие авторы, антимикробные подходы на основе оптического излучения имеют большие перспективы в отношении лечения устойчивых к антибиотикам инфекций и связанных с ними заболеваний [3, 4, 5].

По данным экспериментальных и клинических исследований использование технологий на основе высокоинтенсивного ультрафиолетового излучения сплошного спектра позволяет в кратчайшие сроки снизить контаминацию инфицированных ран, что дает возможность рекомендовать применение таких фототерапевтических устройств для лечения тяжелых инфекционных заболеваний, протекающих на фоне выраженных иммунодефицитных и аллергических явлений [6]. Воздействие импульсного высокоинтенсивного оптического облучения является высокоэффективным методом, обладающим мощнейшим биоцидным и иммуностимулирующим действием [7].

В настоящее время в литературных источниках имеется много работ, посвященных клинической, бактерицидной и иммунологической эффективности применения различных методов фототерапии, при этом редко встречаются исследования, где подробно описаны морфологические основы эффективности их применения, в том числе и ультрафиолетового облучения.

Наша работа посвящена изучению эффективности высокоинтенсивного импульсного широкополосного облучения при лечении инфицированных ран с помощью морфологических методов исследования.

Материалы и методы

Проведено морфологическое исследование препаратов ран 105 животных, которым в эксперименте моделировали инфицированные раны. Исследование было

одобрено Межвузовским комитетом по этике (выписка из протокола № 06-23 от 15.06.23) и проведено в условиях вивария ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России. Для эксперимента использованы половозрелые самцы крыс линии Wistar, массой тела 200–250 гр. Инфицированные раны моделировали в асептических условиях после обезболивания 2%-ым раствором ксилазина и золептила 100. Разрезали кожу в области холки диаметром 20 мм. Выполняли гемостаз, после чего в рану вносили триггер в виде марлевого шарика, смоченного смесью культур из контрольных штаммов *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* в равных объемах и разведениях, содержащей в 1 мл 10^9 микробных тел. Рану с триггером ушивали, на следующие сутки снимали швы, удаляли триггер и разделяли животных случайной выборкой на три группы. Ежедневно всем без исключения животным всех групп проводили туалет раны 0,1% раствором хлоргексидина.

Животным 1-й (основной) группы ($n=30$) в ходе лечения было выполнено высокоинтенсивное импульсное широкополосное облучение. Данную методику выполняли при помощи аппарата, на основе импульсной ксеноновой лампы типа ИНП 5/60, работающей в импульсно-периодическом режиме с частотой импульсов 5 Гц и средней электрической мощностью 100 Вт. Средняя мощность излучения лампы в УФ-С диапазоне спектра (200–280 нм) составляла 3 Вт, импульсная мощность УФ-С излучения – 24 кВт. Программное обеспечение использованного аппарата включало следующие режимы терапии: 1-й режим – 50 импульсов с длительностью цикла облучения 10 с; 2-й режим – 100 импульсов в течение 20 с; 3-й режим – 200 импульсов с длительностью 40 с. Учитывая обсемененность и обширность моделированных ран, для борьбы с инфекцией и купирования воспаления облучение ран в первые пять дней лечения проводили с использованием 3-го режима с расстоянием 5 см от раны, начиная с шестого дня лечения и последующие пять дней использован режим 2 на расстоянии 10 см от ран.

На раны животных 2-й группы ежедневно, в течение 10 дней быз-минутное традиционное ультрафиолетовое облучение аппаратом ОУФК-01 «Солнышко», на основе УФ-ртутной бактерицидной лампы типа ДКБУ-7, электрической мощностью 7 Вт, мощность УФ-С излучения (254 нм) лампы составляла 1,2 Вт.

И в 3-й контрольной группе животных лечение ран проводили только при помощи антисептика путем ежедневного туалета и наложением на рану повязки с 0,1%-ым раствором хлоргексидина.

Все манипуляции выполняли с соблюдением требований «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей» (Страсбург, 1986 г.), декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (Хельсинки, 2000 г.), а также

в соответствии с требованиями приказа №267 МЗ РФ от 19.06.2003 г. «Правила по обращению, содержанию, обезболиванию и умерщвлению экспериментальных животных».

Для контроля морфологической картины до начала лечения в каждой группе было выведено из эксперимента по 5 животных На 7-й, 14-й и 21-й дни в каждой группе выводили из эксперимента по 10 животных. Выводили животных при помощи передозировки внутримышечного наркоза (2%-ым раствором ксилазина и золептила 100). После эвтаназии иссекали мягкие ткани в области ран и фиксировали их в 10%-ом растворе формалина, с последующим приготовлением парафиновых блоков и гистологических препаратов по стандартной методике. Морфологическое исследование проведено на препаратах, окрашенных гематоксилином-эозином, толщиной среза 5 мкм.

Электронно-микроскопическое исследование выполнено на электронном микроскопе фирмы JEM 100 CX (JEOL, Япония) в трансмиссионном режиме при ускоряющем напряжении 80кВ. Биологический материал для этого фиксировали в растворе 2,5%-го глутаральдегида, затем в растворе 1%-го оксида осмия и заключали в смесь аралдитовых смол. Полутонкие срезы (1–1,5 мкм) окрашивали толуидиновым синим. Ультратонкие срезы контрастировали уранил ацетатом и цитратом свинца.

Для качественного и количественного исследования гистологические препараты предварительно были отсканированы на цифровом сканере PANNORAMIC 250 Flash (3DHISTECH Ltd. Венгрия) с последующим изучением их при помощи программы Pannoramic Viewer 1.15.4 (3DHISTECH Ltd. Венгрия),

Статистическая обработка полученных результатов проведена при помощи программ Microsoft Office Excel и Statistica 10.0.1011 (StatSoft, Tibco, USA). Анализ проведен при помощи непараметрических методов статистики, так как предварительное исследование показало неравную дисперсию исследованных нами признаков. Данные описательной статистики представлены в виде медианы и интерквартильного размаха в 25% и 75%. Сравнение трех групп проводили методом Краскелла-Уоллиса, при $p<0,05$ признак считали статистически значимо различным в трех группах. Далее выполняли парное сравнение между группами с использованием критерия Манна-Уитни и поправки Бонферрони. Признак считали статистически значимо различным между двумя группами при $p<0,0167$. Предварительное сравнение групп в динамике выполнено при помощи критерия Фридмана для связанных признаков с расчетом коэффициента конкордантности Кендалла (KK). Признак считали статистически значимо различным при $p<0,05$. Далее проводили последовательное парное сравнение признака внутри групп по методу Вилкоксона с поправкой Бонферрони. Признак считали статистически значимо различным между двумя группами при $p<0,0167$.

Результаты

В ранах животных всех групп до начала лечения наблюдали нейтрофильную и лимфоцитарную инфильтрацию с участками кровоизлияния (рис. 1а). Встречающиеся в препаратах сосуды и капилляры паралитически расширены или заполнены эритроцитами. Эндотелий сосудов набухший. Присутствующие в ранах коллаген-

новые волокна повреждены и набухшие. В области дна раны, среди жировой ткани, отмечено большое количество тучных клеток, находящихся в разной степени дегрануляции (рис. 1б,с). В мышечной ткани видны очаги кровоизлияния, ткань отека и содержит поврежденные сосуды с набухшим эндотелием. Края раны окаймлены утолщенным эпидермисом, с признаками отека.

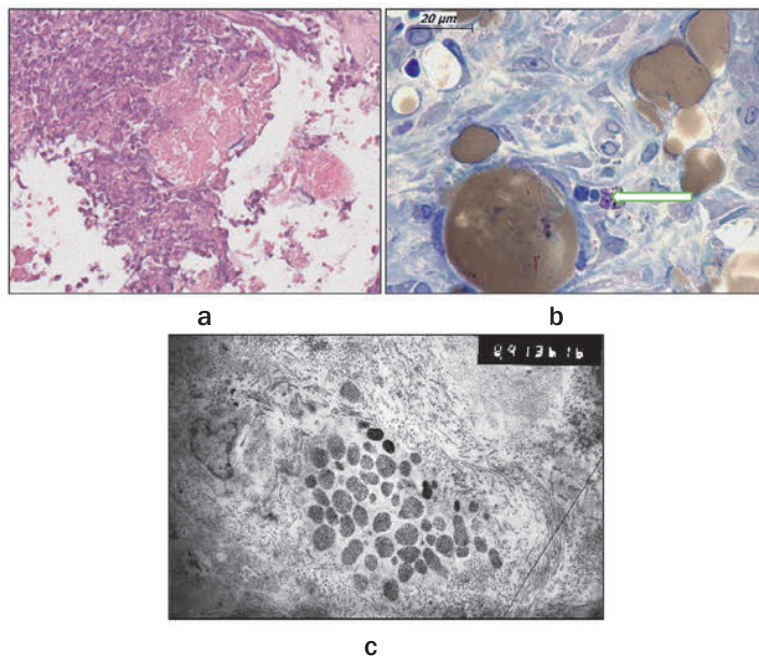


Рис. 1. Препараты ран животных до лечения: а – раневой дефект, некроз ткани, участки кровоизлияния; б – тучная клетка – стрелка; с – тучная клетка в состоянии дегрануляции; Увеличение: а – 200; б – 1000; с – электронограмма х8900. Окраска: а – гематоксилин-эозин; б – толуидиновый синий; с – уранил ацетат и цитрат свинца.
Fig. 1. Specimens of animal wounds before treatment: а – wound defect, tissue necrosis, areas of hemorrhage; б – mast cell – indicated by an arrow; с – mast cell in a state of degranulation. Magnification: а – 200x; б – 1000x; с – electron micrograph x8900. Staining: а – hematoxylin and eosin; б – toluidine blue; с – uranyl acetate and lead citrate.

Таблица 1
Количественный состав клеток в гистологических препаратах ран до начала лечения

Table 1
Quantitative composition of cells in histological wound specimens before treatment

Клеточный состав Cell composition	1-я группа Group 1	2-я группа Group 2	3-я группа Group 3	p – между исследуемыми группами p – between groups
Нейтрофилы Neutrophils	316 (274;346)	303 (276;345)	314 (261;364)	p=0,88
Лимфоциты Lymphocytes	62 (59;68)	59 (57;66)	65 (60;68)	p=0,051
Макрофаги Macrophages	0	0	0	
Дегранулирующие базофилы Degranulating basophils	11 (10;12)	12 (11;13)	11 (10;13)	p=0,049
Базофилы Basophils	0	0	0	
Плазмоциты Plasmacells	1 (1;1)	1 (1;1)	1 (1;1)	p=0,47
Фибробласты Fibroblasts	0	0	0	
Сравнение клеточного состава внутри групп в динамике Comparison within groups over time	p(H/N)<0.0001, KK=1; p(L/L)<0.0001, KK=1; p(M/M)<0.0001, KK=1; p(ДБ/ДБ)<0.0001, KK=0,98; p(Б/Б)<0.0001, KK=1; p(П/П)<0.0001, KK=0,58; p(Ф/Ф)<0.0001, KK=0,98	p(H/N)<0.0001, KK=1; p(L/L)<0.0001, KK=0,9; p(M/M)<0.0001, KK=0,78; p(ДБ/ДБ)<0.0001, KK=1; p(Б/Б)<0.0001, KK=0,92; p(П/П)<0.0001, KK=0,92; p(Ф/Ф)<0.0001, KK=1	p(H/N)<0.0001, KK=1; p(L/L)<0.0001, KK=0,93; p(M/M)<0.0001, KK=0,93; p(ДБ/ДБ)<0.0001, KK=0,98; p(Б/Б)<0.0001, KK=0,93; p(П/П)<0.0001, KK=0,81; p(Ф/Ф)<0.0001, KK=1	

При статистическом анализе количественного состава клеток до начала лечения достоверной разницы между группами не выявлено (табл. 1).

К 7-му дню лечения в препаратах животных всех групп сохранялся отек. Отмечена тенденция к уменьшению и трансформации инфильтрата. В 1-й группе участки инфильтрации приобрели вид слоистой структуры, появились гранулы гемосидерина. Гранулы пигмента расположены свободно в межклеточном пространстве и макрофагах, окрашивая последние в коричневый цвет (рис. 2a,b). В других группах уменьшение инфильтрата было менее значительно. Так, у 2-й группы животных наблюдали инфильтрацию в виде розеток вокруг мелких сосудов. В препаратах ран животных 3-й группы отмечали тромбированные кровеносные сосуды, как мелкие, так и более крупные. Нейтрофилы в ране были с признаками нетоза. Во всех группах отмечали деградацию тучных клеток (рис. 2c). В препаратах 1-й и 2-й групп животных появлялись молодые фибробласты, которые в 1-й группе животных выстраивались тяжами, ориентированными параллельно к поверхности раны

(рис. 2d), во 2-й группе животных такая ориентация клеток не определялась (рис. 2e).

Во всех группах к 7-ым суткам лечения количество нейтрофилов было существенно снижено по сравнению с предыдущим днем контроля (табл. 1, 2). Различия в количестве нейтрофилов в препаратах ран между группами (табл. 2) были статистически достоверны. Так, в 1-й группе их количество было достоверно меньше по сравнению со 2-й и 3-й группами ($p < 0,0001$ для обеих групп), а во 2-й группе количество нейтрофилов было достоверно меньше по сравнению с 3-й группой ($p < 0,0001$). Также в препаратах животных 1-й группы было снижено количество лимфоцитов по сравнению с предыдущим днем контроля и по сравнению с другими группами (табл. 1, 2). У животных всех групп в ранах появлялись макрофаги, которых было существенно больше в препаратах ран животных 1-й группы ($p < 0,0001$ по сравнению со 2-й и 3-й группами) и 2-й группы ($p < 0,0001$ по сравнению с 3-й группой). На 7-й день лечения ран в ответ на проводимую терапию в препаратах ран животных 1-й и 2-й групп было увеличено количество плазмочитов (табл. 1, 2; рис. 2f).

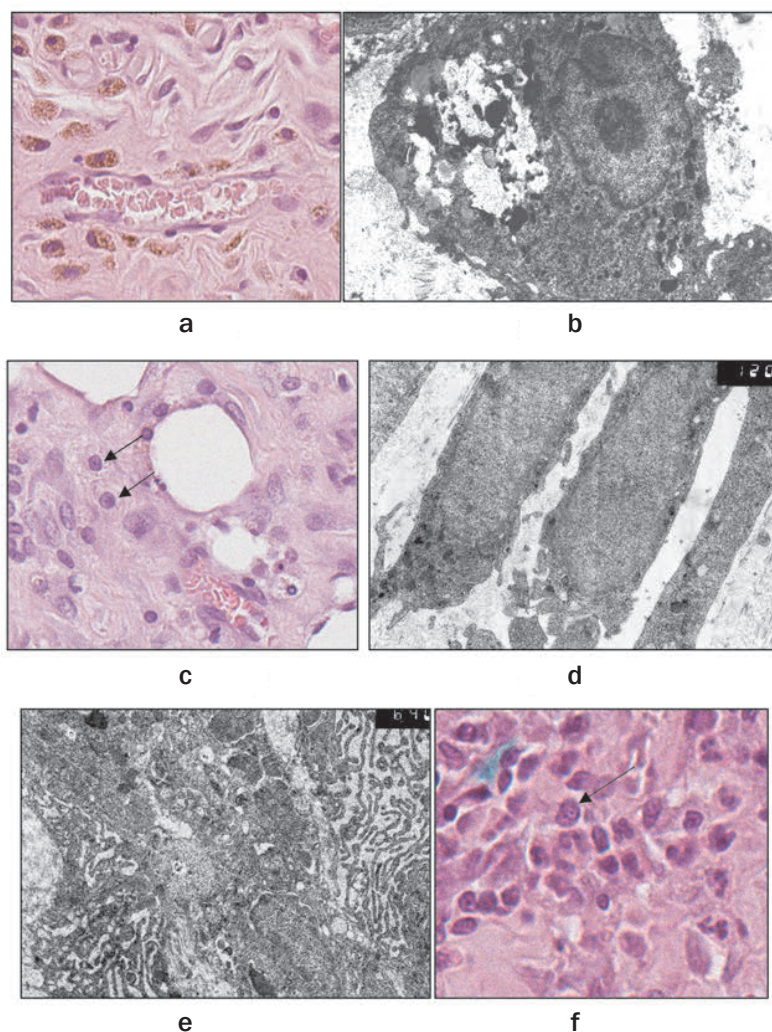


Рис. 2. Препараты ран животных на 7-й день лечения (a-d – 1-я группа; e-f – 2-я группа): а – в соединительной ткани гранулы гемосидерина коричневого цвета; б – функционально активный макрофаг, в центре клетки крупная фагосома с клеточным детритом; с – тучные клетки в состоянии полной дегрануляции; d – фибробласты ориентированные параллельно поверхности раны; е – функционально активные фибробласты без выраженной пространственной ориентации; f – в поле зрения плазмочит.
а, с, f увеличение: – 400, окраска – гематоксилин-эозин; б, d, е – электроннограммы, увеличение – 12000, окраска – уранил ацетат и цитрат свинца.
Fig. 2. Specimens of animal wounds on the 7th day of treatment (a-d: Group 1; e-f: Group 2): a – brown hemosiderin granules in connective tissue; b – functionally active macrophage. Large phagosome with cellular debris in the center; c – mast cells in a state of complete degranulation; d – fibroblasts aligned parallel to the wound surface; e – functionally active fibroblasts without distinct spatial orientation; f – plasma cell in the field of view.
Magnification: a, c, f – staining – hematoxylin and eosin, 400x; b, d, e – electron micrographs, staining – uranyl acetate and lead citrate, magnification – 12000x.

Таблица 2

Количественный состав клеток в гистологических препаратах ран на 7 день лечения

Table 2

Quantitative composition of cells in histological wound specimens on the 7th day of treatment

Клеточный состав Cell composition	1-я группа Group 1	2-я группа Group 2	3-я группа Group 3	p – между исследуемыми группами p – between groups
Нейтрофилы Neutrophils	64 (59;67)	82 (77;86)	176,5 (167;188)	p<0,0001 p(1-2) <0,0001 p(1-3) <0,0001 p(2-3) <0,0001
Лимфоциты Lymphocytes	13 (12;14)	60 (53;67)	73 (72;74)	p<0,0001 p(1-2) <0,0001 p(1-3) <0,0001 p(2-3) <0,0001
Макрофаги Macrophages	34 (30;36)	17 (16;18)	4 (2;6)	p<0,0001 p(1-2) <0,0001 p(1-3) <0,0001 p(2-3) <0,0001
Дегранулирующие базофилы Degranulating basophils	1 (1;1)	4 (3;5)	7 (6;8)	p<0,0001 p(1-2) <0,0001 p(1-3) <0,0001 p(2-3) <0,0001
Базофилы Basophils	6 (5;8)	1 (1;1)	0	p<0,0001 p(1-2) <0,0001 p(1-3) <0,0001 p(2-3) <0,0001
Плазмоциты Plasma cells	3,5 (2;6)	2 (2;2)	1 (1;1)	p<0,0001 p(1-2) <0,0001 p(1-3) <0,0001 p(2-3) <0,0001
Фибробласты Fibroblasts	13,5 (12;17)	2,5 (2;4)	0	p<0,0001 p(1-2) <0,0001 p(1-3) <0,0001 p(2-3) <0,0001
p – внутри каждой исследуемой группы между 7-ым днем контроля и днем до начала лечения p – within each group between Day 7 and pre-treatment	p(H/N)<0.0001 p(L/L)<0.0001 p(M/M)<0.0001 p(ДБ/ДБ)<0.0001 p(Б/Б)<0.0001 p(П/П)<0.0001 p(Ф/Ф)<0.0001	p(H/N)<0.0001 p(L/L)=0,62 p(M/M)<0.0001 p(ДБ/ДБ)<0.0001 p(Б/Б)<0.0001 p(П/П)<0.0001 p(Ф/Ф)<0.0001	p(H/N)<0.0001 p(L/L)<0.0001 p(M/M)<0.0001 p(ДБ/ДБ)<0.0001 p(П/П)=0,69	

Морфологическое исследование препаратов ран на 14-е сутки лечения показало, что в препаратах 1-й группы животных воспалительная инфильтрация тканей была минимальна. Фибробласты, ориентированные параллельно поверхности раны, находились в состоянии высокой функциональной активности (что подтверждается ультраструктурным анализом), синтезировали белки, в том числе коллаген (рис. 3а). Происходил рост новых сосудов к центру раны и перпендикулярно поверхности раны (рис. 3б). Вдоль сосудов группировались фибробласты (рис. 3с). Тучные клетки единичные, в состоянии частичной дегрануляции. (рис. 3д,е). Во 2-й группе инфильтрация уменьшилась, в некоторых препаратах заметно образование новых капилляров. В 3-й группе все еще сохранялся струп, под струпом инфильтрат и отек, были видны нейтрофилы и макрофаги (рис. 3ф). На отдельных участках инфильтрация распространялась до мышечной и

жировой ткани. Гистологических признаков ремоделирования соединительной ткани не было.

Количественный анализ показал, что нейтрофилов и лимфоцитов на 14-е сутки лечения становиться существенно меньше, чем на 7-е сутки (табл. 2, 3). Динамика количества макрофагов в каждой группе была разная. Так в 1-й группе их количество по сравнению с 7-ым днем лечения и по сравнению с другими группами было статистически значимо меньше ($p<0,0001$ для всех указанных показаний). У 2-й группы животных количество макрофагов сохранялось на одном уровне по сравнению с предыдущим днем контроля ($p=0,89$), но при этом было существенно меньше, чем в 3-й группе ($p<0,0001$). А в препаратах ран 3-й группы показатели макрофагов увеличились по сравнению с 7-ым днем лечения, что указывало на более позднюю реакцию организма на проводимое лечение. В то же время во всех группах было выявлено существенное

уменьшение количества дегранулирующих базофилов ($p < 0,0001$ для всех групп), при этом у 1-й и 2-й групп их содержание было повышено ($p < 0,0001$). Популяция

тучных клеток 1-ой и 2-й групп восстанавливали свою функциональную активность. Со стороны соединительнотканного компонента был отмечен рост содержания

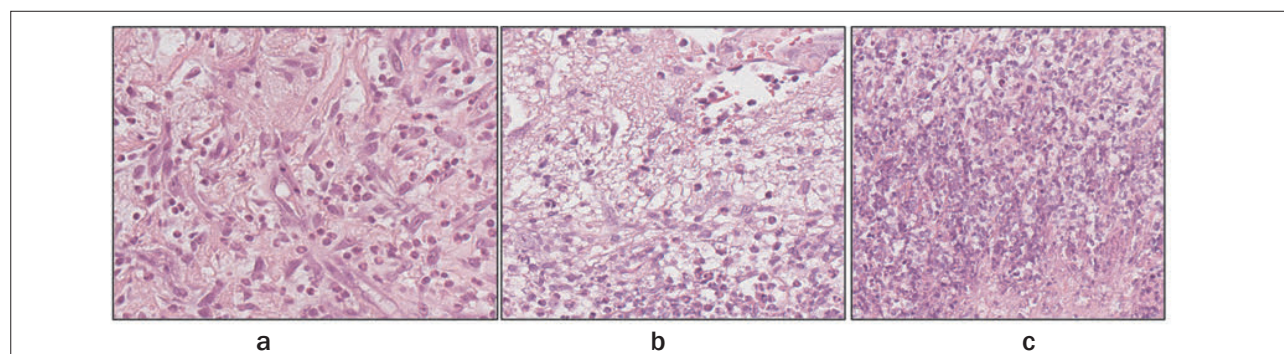
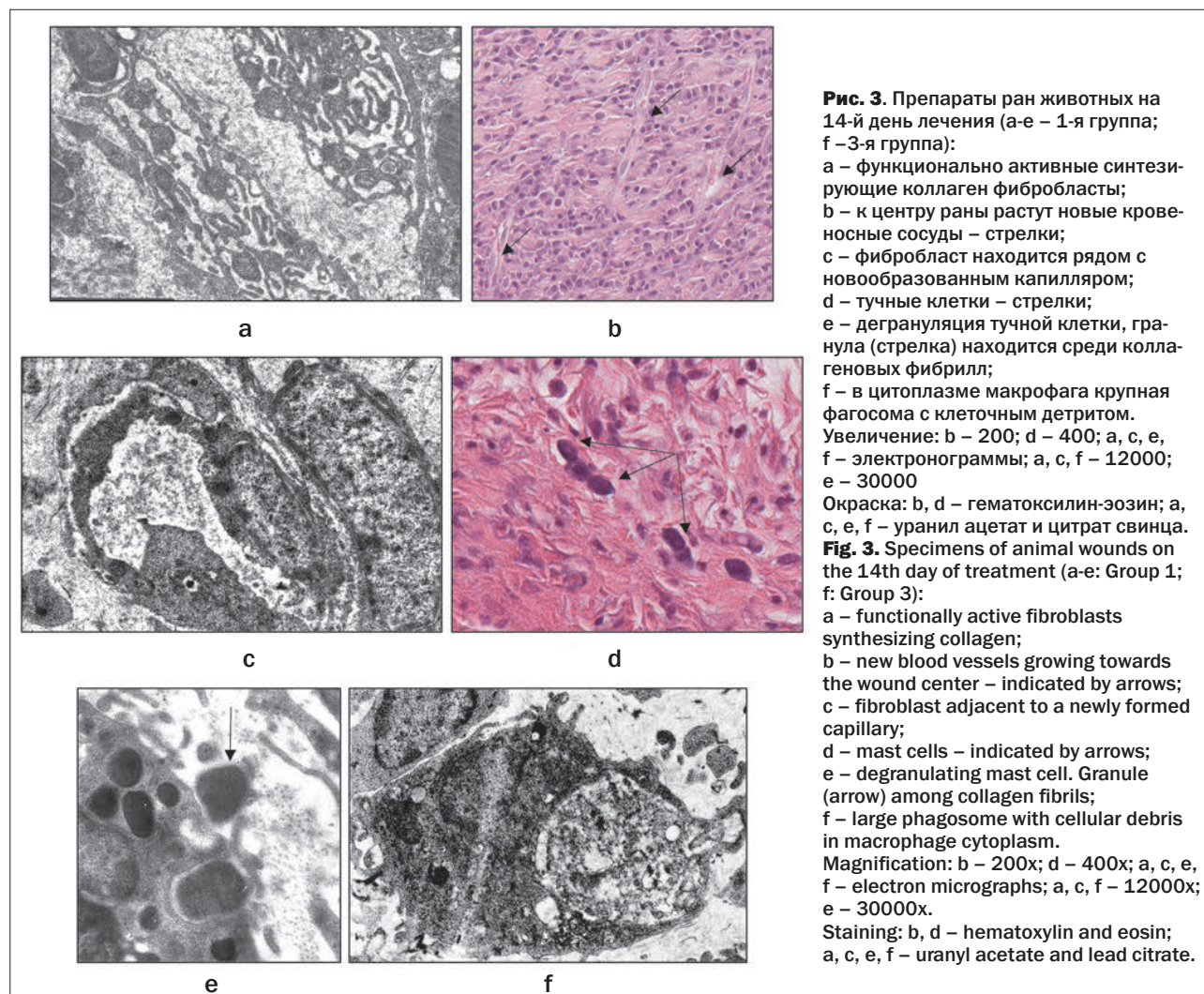


Таблица 3

Количественный состав клеток в гистологических препаратах ран на 14-й день лечения

Table 3

Quantitative composition of cells in histological wound specimens on the 14th day of treatment

Клеточный состав Cell composition	1-я группа Group 1	2-я группа Group 2	3-я группа Group 3	p – между исследуемыми группами p – between groups
Нейтрофилы Neutrophils	10,5 (7;14)	27 (25;34)	56 (49;61)	p<0,0001 p(1-2)<0,0001 p(1-3)<0,0001 p(2-3)<0,0001
Лимфоциты Lymphocytes	2 (2;2)	27 (25;29)	55 (51;60)	p<0,0001 p(1-2)<0,0001 p(1-3)<0,0001 p(2-3)<0,0001
Макрофаги Macrophages	6 (5;7)	17 (14;21)	33 (25;42)	p<0,0001 p(1-2)<0,0001 p(1-3)<0,0001 p(2-3)<0,0001
Дегранулирующие базофилы Degranulating basophils	0	1 (1;1)	2 (2;2)	p<0,0001 p(1-2)<0,0001 p(1-3)<0,0001 p(2-3)<0,0001
Базофилы Basophils	13 (12;15)	6 (5;8)	1 (1;1)	p<0,0001 p(1-2)<0,0001 p(1-3)<0,0001 p(2-3)<0,0001
Плазмоциты Plasmacells	2 (2;2)	1 (1;1)	1 (1;1)	p<0,0001 p(1-2)<0,0001 p(1-3)<0,0001 p(2-3)=0,7
Фибробласты Fibroblasts	45 (33;52)	17 (15;19)	5 (4;6)	p<0,0001 p(1-2) <0,0001 p(1-3) <0,0001 p(2-3) <0,0001
p – внутри каждой исследуемой группы между 14-ым и 7-ым днями p – within each group between Day 14 and Day 7	p(H/N)<0.0001 p(L/L)<0.0001 p(M/M)<0.0001 p(ДБ/ДВ)<0.0001 p(Б/В)<0.0001 p(П/Р)<0.0001 p(Ф/Ф)<0.0001	p(H/N)<0.0001 p(L/L)<0.0001 p(M/M)=0,89 p(ДБ/ДВ)<0.0001 p(Б/В)<0.0001 p(П/Р)<0.0001 p(Ф/Ф)<0.0001	p(H/N)<0.0001 p(L/L)<0.0001 p(M/M)<0.0001 p(ДБ/ДВ)<0.0001 p(Б/В)<0.0001 p(П/Р)=0,53 p(Ф/Ф)<0.0001	

фибробластов у 1-й и 2-й групп (табл. 2, 3). В препаратах ран 3-й группы появлялись единичные базофилы и фибробласты.

К 21-му дню лечения имела место значительная динамика морфологических признаков. Так при исследовании препаратов ран животных 1-й группы, у которых в лечении было применено высокоинтенсивное импульсное широкополосное облучение, наблюдалось ремоделирование соединительной ткани в пользу полного восстановления структуры. Во 2-й группе животных, у которых в лечении ран использовали традиционное ультрафиолетовое облучение, сохранялась макрофагальная реакция. В соединительной ткани под струпом присутствуют капилляры, хотя и в меньшем количестве, чем в 1-й группе. В препаратах ран животных 1-й и 2-й групп в соединительной ткани большое количество тучных клеток в неактив-

ном состоянии (табл. 4). В 3-й группе сохраняется примесь нейтрофилов (табл. 4), тромбоз мелких сосудов. Сохраняется отек, который выражен в соединительной и жировой ткани.

Обсуждение

Заживление ран представляет собой сложный биологический процесс с последовательно перекрывающимися физиологическими и морфологическими фазами. Для восстановления барьерной функции поврежденных кожных покровов необходима координация клеточных и молекулярных процессов. В начале раневого процесса в первую фазу воспаления клеточные элементы, такие как нейтрофилы и макрофаги, мигрируют в рану, мобилизуя местную и системную защиту. В следующей фазе, пролиферации, клетки соединительной ткани, фибробласты и кератиноциты,

Таблица 4

Количественный состав клеток в гистологических препаратах ран на 21-й день лечения

Table 4

Quantitative composition of cells in histological wound specimens on the 21st day of treatment

Клеточный состав Cell composition	1-я группа Group 1	2-я группа Group 2	3-я группа Group 3	p – между исследуемыми группами p – between groups
Нейтрофилы Neutrophils	0	6,5 (5;9)	23 (19;26)	p<0,0001 p(1-2) <0,0001 p(1-3) <0,0001 p(2-3) <0,0001
Лимфоциты Lymphocytes	0	3 (2;4)	14 (12;18)	p<0,0001 p(1-2) <0,0001 p(1-3) <0,0001 p(2-3) <0,0001
Макрофаги Macrophages	2 (2;2)	10 (8;13)	25 (23;27)	p<0,0001 p(1-2) <0,0001 p(1-3) <0,0001 p(2-3) <0,0001
Дегранулирующие базофилы Degranulating basophils	0	0	0	p<0,0001 p(1-2) <0,0001 p(1-3) <0,0001 p(2-3) <0,0001
Базофилы Basophils	19 (18;20)	9 (7;11)	2 (2;2)	p<0,0001 p(1-2) <0,0001 p(1-3) <0,0001 p(2-3) <0,0001
Плазмоциты Plasmacells	2 (2;2)	0	0	p<0,0001 p(1-2) <0,0001 p(1-3) <0,0001
Фибробласты Fibroblasts	66 (59;77)	34 (27;40)	14 (12;16)	p<0,0001 p(1-2) <0,0001 p(1-3) <0,0001 p(2-3) <0,0001
p – внутри каждой группы между 21-ым и 14-ым днем p – within each group between Day 21 and Day 14	p(H/N)<0.0001; p(L/L)<0.0001; p(M/M)<0.0001; p(B/B)<0.0001; p(P/P)=1 p(F/F)<0.0001	p(H/N)<0.0001 p(L/L)<0.0001 p(M/M)<0.0001 p(ДБ/ДБ)<0.0001 p(Б/Б)<0.0002 p(П/П)<0.0001 p(Ф/Ф)<0.0001	p(H/N)<0.0001 p(L/L)<0.0001 p(M/M)<0.0001 p(ДБ/ДБ)<0.0001 p(Б/Б)<0.0001 p(П/П)<0.0001 p(Ф/Ф)<0.0001	

начинают активно пролиферировать, запуская процесс ремоделирования соединительной ткани. Третьей фазой раневого процесса является фаза – регенерации или эпителизации, когда фибробласты начинают синтезировать коллаген, начинается организация нового матрикса [8].

Для анализа и оценки заживления ран применяют различные методы, в том числе планиметрию и морфологическое исследование. Метод планиметрии позволяет клинически оценить видимую характеристику раны и из-за наличия струпа часто не коррелирует с показателями заживления, визуализируемыми морфологией, что делает морфологическое исследование «золотым стандартом» оценки заживления ран [9].

В литературе имеются данные по эффективности применения фототерапии в лечении ран, в том числе инфицированных, но в основном исследования

касаются лазеро- или фотодинамической терапии, и авторы указывают на клиническую и бактерицидную и морфологическую эффективность их применения [10, 11, 12]. Работ, посвященных изучению эффективности применения ультрафиолетового облучения при лечении инфицированных ран, небольшое количество, при этом встречающиеся исследования показывают только бактерицидную эффективность [13, 14].

К. Narita и соавт. в эксперименте на мышах, смоделировав инфицированную *St. Aureus* (MRSA) рану, облучали ее двумя типами ламп с излучением в диапазоне 222 нм и 254 нм. Авторами выполняли бактериологическое, гистологическое и иммуногистохимическое исследование. При морфологическом исследовании авторами выявлено снижение воспалительной реакции при ультрафиолетовом облучении инфицированных ран в диапазоне 222 нм. В исследовании гистоло-

гический анализ проведен только на 5-й и 8-й дни, и дана оценка только нейтрофильной инфильтрации без статистической оценки полной морфологической картины [15].

V.V. Bagrov с соавт. показали бактерицидную, клиническую и морфологическую эффективность антибактериальной терапии в комбинации с высокоинтенсивным оптическим облучением инфицированных ран по сравнению с традиционным применением мази левомиколь. Гистологический анализ показал более ранний переход раневого процесса (14-е сутки) в фазу грануляции у животных, на раны которых воздействовали высокоинтенсивным оптическим облучением, по сравнению с ранами животных контрольной группы [16].

Таким образом, литературные данные о применении ультрафиолетового облучения инфицированных ран ограничены, и представлены в основном описанием бактерицидной эффективности. В имеющихся исследованиях морфологические признаки регенерации тканей представлены только на начальных стадиях раневого процесса, на стадиях воспаления и пролиферации, и нет данных о полной морфологической картине, происходящей в ране в ходе лечения с применением ультрафиолетового облучения вплоть до завершения регенеративных процессов.

В нашем исследовании, представлен качественный и количественный анализ морфологической картины при использовании высокоинтенсивного импульсного широкополосного облучения, традиционного ультрафиолетового облучения и классического местного применения антисептика.

Проведенное нами экспериментальное исследование лечения инфицированных ран показало, что до начала лечения морфологическая картина ран соответствовала фазе острого воспаления. На 7-й день в 1-й группе морфологическая картина соответствовала фазе пролиферации. Во 2-й и 3-й группах отек и инфильтрация сохранялись. К 14-му дню в 1-й группе наблюдали признаки формирования грануляционной ткани и переход ран в стадию регенерации. Во 2-й группе уменьшалась инфильтрация, появлялись новые капилляры, увеличивалось количество фибробластов. В 3-й группе воспалительные явления сохранялись. К 21-му дню в препаратах ран 1-й группы признаки воспаления отсутствовали, наблюдалось ремоделирование соединительной ткани с признаками образования нежного рубца. В препаратах 2-й группы признаки инфильтрации были минимальны, наблюдались явления ремоделирования соединительной ткани, в которой присутствовали новые капилляры. В препаратах ран 3-й группы животных инфильтрация была уменьшена, новые сосуды образовывались с замедлением.

Заключение

Морфологическое исследование показало, что использование высокоинтенсивного импульсного широкополосного облучения инфицированных ран в отличие от традиционного ультрафиолетового облучения и лечения ран антисептиками в более ранние сроки купирует воспалительную реакцию тканей, активизирует местную иммунную реакцию и ускоряет процессы ремоделирования соединительной ткани.

ЛИТЕРАТУРА

- Alcolea J.M., Hernández E., Martínez-Carpio P.A., et al. Treatment of Chronic Lower Extremity Ulcers with A New Er: Yag Laser Technology // *Laser Ther.* – 2017. – Vol. 26(3). – P. 211-222. <https://doi.org/10.5978/islsm.17-OR-17>;
- Aleksandrowicz H., Owczarczyk-Saczonek A., Placek W. Venous Leg Ulcers: Advanced Therapies and New Technologies // *Biomedicines.* – 2021. – Vol. 9(11). – P. 1569. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111569>
- Gupta A., Avci P., Dai T., et al. Ultraviolet Radiation in Wound Care: Sterilization and Stimulation // *Adv Wound Care (New Rochelle)*. – 2013. – Vol. 2(8). – P. 422-437. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0366>;
- Wang D., Kuzma M.L., Tan X., et al. Phototherapy and optical waveguides for the treatment of infection // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2021. – Vol. 179. – P. 114036. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114036>;
- Szigeti R., Kellermayer R. Tying the past to the present: time tested knowledge with state-of-the-art technology in the fight against emerging and drug resistant microbes // *Ther Adv Infect Dis.* – 2021. – Vol. 8. – P. 2049936121989552. <https://doi.org/10.1177/2049936121989552>
- Архипов В.П., Багров В.В., Бяловский Ю.Ю. и др. Организация доклинических исследований бактерицидного и ранозаживляющего действия импульсного фототерапевтического аппарата «Заря» // *Проблемы социальной гигиены, здравоохране-*

REFERENCES

- Alcolea J.M., Hernández E., Martínez-Carpio P.A., et al. Treatment of Chronic Lower Extremity Ulcers with A New Er: Yag Laser Technology. *Laser Ther.* 2017, vol. 26(3), pp. 211-222. <https://doi.org/10.5978/islsm.17-OR-17>;
- Aleksandrowicz H., Owczarczyk-Saczonek A., Placek W. Venous Leg Ulcers: Advanced Therapies and New Technologies. *Biomedicines*, 2021, vol. 9(11), pp. 1569. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111569>
- Gupta A., Avci P., Dai T., et al. Ultraviolet Radiation in Wound Care: Sterilization and Stimulation. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2013, vol. 2(8), pp. 422-437. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0366>;
- Wang D., Kuzma M.L., Tan X., et al. Phototherapy and optical waveguides for the treatment of infection. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021, vol. 179, pp. 114036. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114036>;
- Szigeti R., Kellermayer R. Tying the past to the present: time tested knowledge with state-of-the-art technology in the fight against emerging and drug resistant microbes. *Ther Adv Infect Dis.* 2021, vol. 8, pp. 2049936121989552. <https://doi.org/10.1177/2049936121989552>
- Arkhipov V.P., Bagrov V.V., Byalovsky Yu.Yu., et al. Organization of preclinical studies of the bactericidal and wound healing effects of the pulsed phototherapy apparatus «Zarya». *Problems of social hygiene, healthcare and the history of medicine,*

- ния и истории медицины. – 2021. – Т. 29, № 5. – С. 1156-1162. <https://doi.org/10.32687/0869-866X-2021-29-5-1156-1162>.
7. Давыдов А.И., Липатов Д.В., Камруков А.С. и др. Использование импульсного высокоинтенсивного оптического облучения и экзогенного монооксида азота в комплексном лечении больных гнойным воспалением придатков матки // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2007. – Т. 6, № 1. – С. 14-17.
8. Rhea L., Dunnwald M. Murine Excisional Wound Healing Model and Histological Morphometric Wound Analysis // J Vis Exp. – 2020. – Vol. 162. – P. 10.3791/61616. <https://doi.org/10.3791/61616>
9. Ansell D.M., Campbell L., Thomason H.A., et al. A statistical analysis of murine incisional and excisional acute wound models // Wound Repair Regen. – 2014. – Vol. 22(2). – P. 281-287. <https://doi.org/10.1111/wrr.12148>
10. Чепурная Ю.Л., Мелконян Г.Г., Гульмурадова Н.Т., Сорокин А.А. Влияние фотодинамической терапии на динамику раневого процесса у пациентов с гнойными заболеваниями пальцев и кисти // Biomedical Photonics. – 2021. – Vol. 10(2). – P. 4-17. <https://doi.org/10.24931/2413-9432-2021-10-2-4-17>
11. Soltan H.H., Afifi A., Mahmoud A., Refaat M., Al Balah O.F. Effects of silver nanoparticle and low-level laser on the immune response and healing of albino mice skin wounds // Biomedical Photonics. – 2024. – Vol. 13(1). – P. 16-27.
12. Зайцев А. Е., Асанов О. Н., Чекмарёва И. А. Анализ эффективности эрбиевого лазера при лечении трофических гнойных ран в эксперименте // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2023. – Т. 8, № 4. – С. 394-397. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2023.18093>
13. Dai T., Kharkwal G.B., Zhao J., et al. Ultraviolet-C light for treatment of Candida albicans burn infection in mice // Photochem Photobiol. – 2011. – Vol. 87(2). – P. 342-349. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.00886.x>
14. Dai T., Murray C.K., Vrahas M.S., Baer D.G., Tegos G.P., Hamblin M.R. Ultraviolet C light for Acinetobacter baumannii wound infections in mice: potential use for battlefield wound decontamination? // J Trauma Acute Care Surg. – 2012. – Vol. 73(3). – P. 661-667. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e31825c149c>
15. Narita K., Asano K., Morimoto Y., et al. Disinfection and healing effects of 222-nm UVC light on methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in mouse wounds // J Photochem Photobiol B. – 2018. – Vol. 178. – P. 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.030>
16. Bagrov V.V., Bukhtiyarov I.V., Volodin L.Y. et al. Preclinical Studies of the Antimicrobial and Wound-Healing Effects of the High-Intensity Optical Irradiation "Zarnitsa-A" Apparatus // Applied Sciences (Switzerland). – 2023. – Vol. 13(19). – P. 10794. <https://doi.org/10.3390/app131910794>.
7. Davydov A.I., Lipatov D.V., Kamrukov A.S., et al. The use of pulsed high-intensity optical irradiation and exogenous nitrogen monoxide in the complex treatment of patients with purulent inflammation of the uterine appendages. *Issues of gynecology, obstetrics and perinatology*, 2007, vol. 6 (1), pp. 14-17.
8. Rhea L., Dunnwald M. Murine Excisional Wound Healing Model and Histological Morphometric Wound Analysis. *J Vis Exp*, 2020, vol. 162, pp. 10.3791/61616. <https://doi.org/10.3791/61616>
9. Ansell D.M., Campbell L., Thomason H.A., et al. A statistical analysis of murine incisional and excisional acute wound models. *Wound Repair Regen*, 2014, vol. 22(2), pp. 281-287. <https://doi.org/10.1111/wrr.12148>
10. Chepurnaya Y.L., Melkonyan G.G., Gulmuradova N.T., Sorokin A.A. The effect of photodynamic therapy on the dynamics of the wound process in patients with purulent diseases of the fingers and hand. *Biomedical Photonics*, 2021, vol. 10(2), pp. 4-17. <https://doi.org/10.24931/2413-9432-2021-10-2-4-17>
11. Soltan H.H., Afifi A., Mahmoud A., Refaat M., Al Balah O.F. Effects of silver nanoparticle and low-level laser on the immune response and healing of albino mice skin wounds. *Biomedical Photonics*, 2024, vol. 13(1), pp. 16-27.
12. Zaitsev A. E., Asanov O. N., Chekmareva I. A. Analysis of the effectiveness of an erbium laser in the treatment of trophic purulent wounds in an experiment. *Medical Bulletin of the North Caucasus*, 2023, vol.8(4), pp. 394-397. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2023.18093>
13. Dai T., Kharkwal G.B., Zhao J., et al. Ultraviolet-C light for treatment of Candida albicans burn infection in mice. *Photochem Photobiol*, 2011, vol. 87(2), pp. 342-349. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.00886.x>
14. Dai T., Murray C.K., Vrahas M.S., Baer D.G., Tegos G.P., Hamblin M.R. Ultraviolet C light for Acinetobacter baumannii wound infections in mice: potential use for battlefield wound decontamination? *J Trauma Acute Care Surg*, 2012, vol. 73(3), pp. 661-667. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e31825c149c>
15. Narita K., Asano K., Morimoto Y., et al. Disinfection and healing effects of 222-nm UVC light on methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in mouse wounds. *J Photochem Photobiol B*, 2018, vol. 178, pp. 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.030>
16. Bagrov V.V., Bukhtiyarov I.V., Volodin L.Y. et al. Preclinical Studies of the Antimicrobial and Wound-Healing Effects of the High-Intensity Optical Irradiation "Zarnitsa-A" Apparatus. *Applied Sciences (Switzerland)*, 2023, vol. 13(19), pp. 10794. <https://doi.org/10.3390/app131910794>.

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ В ПРОФИЛАКТИКЕ ВПЧ-ИНДУЦИРОВАННЫХ РЕЦИДИВОВ ПРЕДРАКА И НАЧАЛЬНОГО РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

О.И. Трушина, Е.В. Филоненко, Е.Г. Новикова, С.В. Мухтарулина

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

Резюме

Фотодинамическая терапия (ФДТ) обладает противовирусной активностью и является эффективным методом профилактики цервикальных ВПЧ-ассоциированных рецидивов. В нашем исследовании была оценена эффективность профилактической противорецидивной ФДТ культи шейки матки на втором этапе после высокой ампутиации шейки матки у 65 пациенток с клиническим диагнозом carcinoma in situ и 35 – с диагнозом РШМ 1A1 ст. В качестве фотосенсибилизатора использовали аппликационно препарат на основе 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК) в виде 12%-го геля в дозе 0,1 мг/см². Облучение проводили через 4 ч (световая доза – 150 Дж/см²). Полная эрадикация ДНК ВПЧ была достигнута у 94% пациенток. В остальных 6% наблюдениях противовирусный эффект зарегистрирован в виде эрадикации одного или двух типов при множественном инфицировании ВПЧ с доминированием 16 и 18 штаммов, или значительном снижении вирусной нагрузки. Сроки наблюдения составили от 3 до 10 лет. Стойкий противовирусный эффект в течение всего периода наблюдения сохранялся у 93 (93%) женщин. Таким образом, ФДТ культи шейки матки с 5-АЛК обеспечивает выраженный противовирусный эффект на втором этапе лечения предопухолевой и начальной опухолевой патологии шейки матки за счет селективного накопления фотосенсибилизатора в инфицированных клетках с последующим их прямым фототоксическим и фотохимическим разрушением до базальных и парабазальных слоев эпителия, в которых происходит репликация вируса.

Ключевые слова: рак шейки матки, фотодинамическая терапия, вирус папилломы человека, 5-аминолевулиновая кислота.

Для цитирования: Трушина О.И., Филоненко Е.В., Новикова Е.Г., Мухтарулина С.В. Фотодинамическая терапия в профилактике ВПЧ-индуцированных рецидивов предрака и начального рака шейки матки // Biomedical Photonics. – 2024. – Т. 13, № 3. – С. 42–46. doi: 10.24931/2413–9432–2024–13–3–42–46

Контакты: Трушина О.И., e-mail: o.trushina@list.ru

PHOTODYNAMIC THERAPY IN THE PREVENTION OF HPV-INDUCED RECURRENCES OF PRECANCER AND INITIAL CANCER OF THE CERVIX

Trushina O.I., Filonenko E.V., Novikova E.G., Mukhtarulina S.V.

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

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) has antiviral activity and is an effective method for preventing cervical HPV-associated relapses. In our study, we assessed the effectiveness of prophylactic anti-relapse PDT of the cervical stump at the second stage after high amputation of the cervix in 65 patients with a clinical diagnosis of carcinoma in situ and 35 with a diagnosis of cervical cancer stage 1A1. As a photosensitizer, a drug based on 5-aminolevulinic acid (5-ALA) in the form of a 12% gel at a dose of 0.1 mg/cm² was used. Irradiation was performed after 4 hours (light dose – 150 J/cm²). Complete eradication of HPV DNA was achieved in 94% of patients. In the remaining 6% of observations, the antiviral effect was registered as eradication of one or two types in case of multiple HPV infection with dominance of strains 16 and 18, or a significant decrease in the viral load. The observation periods ranged from 3 to 10 years. A persistent antiviral effect was maintained throughout the observation period in 93 (93%) women. Thus, PDT of the cervical stump with 5-ALA provides a pronounced antiviral effect at the second stage of treatment of precancerous and initial tumor pathology of the cervix due to the selective accumulation of the photosensitizer in infected cells with their subsequent direct phototoxic and photochemical destruction to the basal and parabasal layers of the epithelium, in which virus replication occurs.

Key words: cervical cancer, photodynamic therapy, human papillomavirus, 5-aminolevulinic acid.

For citations: Trushina O.I., Filonenko E.V., Novikova E.G., Mukhtarulina S.V. Photodynamic therapy in the prevention of HPV-induced recurrences of precancer and initial cancer of the cervix, *Biomedical Photonics*, 2024, vol. 13, no. 3, pp. 42–46. doi: 10.24931/2413–9432–2024–13–3–42–46

Contacts: Trushina O.I., e-mail: o.trushina@list.ru

Введение

Проблема рака шейки матки (РШМ) в течение многих десятилетий остается в центре внимания ведущих отечественных и зарубежных онкологов. Неуклонный рост числа женщин со злокачественными новообразованиями шейки матки и выраженная тенденция к омоложению болезни, несомненно, свидетельствуют об актуальности поиска, разработки и внедрения новых подходов к профилактике, диагностике и лечению цервикальной предопухолевой и опухолевой патологии. В успешной реализации этих задач важная роль отводится этиологическому фактору цервикального канцерогенеза – вирусу папилломы человека (ВПЧ). ДНК этого вирусного агента обладает высоким онкогенным потенциалом и обнаруживается в 99,7% РШМ [1,2].

На протяжении последних двух десятилетий вопросам прогрессирования папилломавирусной инфекции (ПВИ) до инвазивного РШМ уделяется достаточно много внимания, тогда как не менее важное направление по профилактике рецидивов заболевания после органосохранного лечения начальной цервикальной онкопатологии остаётся мало изученным. Возобновление опухолевого процесса в шейке матки указывает в большей степени на персистенцию ВПЧ – ведущий фактор в стимуляции пролиферации эпителия [3,4]. Этот вирусный агент способен инициировать в течение первых трех лет после электрохирургической конизации рецидивы цервикальных интраэпителиальных неоплазий II-III (CIN) и начального РШМ (carcinoma in situ, РШМ 1A1 ст), частота которых по данным ряда авторов варьируется и составляет 15-75% [5,6]. Рецидивы заболевания у женщин моложе 40 лет встречается чаще (57,9%), чем в старшем возрасте [7]. Частота рецидивов повышается при вовлечении в процесс цервикального канала или в случае смешанной локализации процесса, особенно в возрасте 30-39 лет – 83,3% [8].

Причинами рецидивов предрака и начального РШМ шейки матки при условии отрицательного морфологического края резекции, являются: сохранение и персистенция латентных и субклинических форм ВПЧ в неизмененных тканях на границе с резекцией или деструкцией, зоне некроза мультифокальных очагов поражений; оседание ДНК ВПЧ вместе с дымом на слизистые шейки матки и влагалища; наличие дополнительных очагов ВПЧ-инфекции во влагалище и промежности у каждой четвертой женщины с цервикальными неоплазиями; реинфицирование; невозможность предотвратить экспрессию папилломавирусов в окружающие ткани [9,10,11,12,13].

Неэффективность противовирусной медикаментозной терапии, направленной на регулирование и нормализацию работы иммунной системы, обусловлена воздействием только на эпизодические формы

жизнедеятельности ВПЧ без разрушения интегрированных в клеточный геном штаммов вируса [14,15]. Методы абляции (радиочастотная, электро-крио-лазерная, аргонно-плазменная) не обеспечивают эрадикацию ВПЧ в силу недостаточной глубины деструкции, когда разрушается только поверхностный эпителий без санации активно размножающихся вирусных штаммов, расположенных в базальном слое [16]. Физические методы лечения также не обладают возможностью точечного разрушения папилломавирусов, воздействия на плоскоклеточно-цилиндрический стык эпителиев и очаги метаплазии в цервикальном канале [17,18]. Кроме того, сохранение ВПЧ ведет к реактивации латентной инфекции до субклинической и клинической форм. Именно пациентки с латентной формой инфекции представляют группу риска по развитию цервикальных рецидивов [19].

Таким образом, лечебные мероприятия противоопухолевого характера не обладают целенаправленным патогенетически обусловленным воздействием на ВПЧ, так как не учитывают особенности жизненного цикла и физического статуса вирусного генома, соответственно, риск ВПЧ-ассоциированных рецидивов CIN и начального РШМ остается достаточно высоким.

Вирусная концепция цервикального рака диктует необходимость пересмотра традиционных подходов к улучшению результатов лечения предопухолевой и начальной опухолевой патологии шейки матки, поиска новых эффективных патогенетически обоснованных методов воздействия на факторы риска злокачественной прогрессии ПВИ, что значительно снизит риск цервикальных рецидивов.

Материалы и методы

Одним из перспективных методов противовирусной терапии и, соответственно, профилактики цервикальных ВПЧ-ассоциированных рецидивов, является фотодинамическая терапия (ФДТ). Метод основан на избирательном накоплении фотосенсибилизатора (ФС) в вирусосодержащих клетках и взаимодействии этого лекарственного препарата с излучением света определенной длины волны, что инициирует серию фотофизических процессов, ведущих к разрушению данных клеток, накопивших препарат [20]. В связи с вышеописанным механизмом, является целесообразным дополнение хирургического лечения вирусассоциированных предрака и раннего рака шейки матки одним или несколькими курсами противовирусной ФДТ.

ФДТ культы шейки матки выполняли на втором этапе после высокой ампутации шейки матки 65 пациенткам с клиническим диагнозом carcinoma in situ и 35 – с диагнозом РШМ 1A1 ст. Средний возраст женщин составил $35,6 \pm 3,7$ лет. В качестве фотосенсиби-

лизатора использовали препарат на основе 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК). Среди факторов риска инфицирования ВПЧ выделены молодой возраст, начало половой жизни до 16 лет (40%), число половых партнеров больше 5 (53,5%), инфицированность бактериальной и другой вирусной флорой (18,2%), длительный прием оральных контрацептивов (5%), массовое курение и незащищенный секс (50%).

Идентификацию и дифференциацию ДНК ВПЧ во всех исследованиях выполняли качественными (ПЦР) и количественными (ПЦР RT, Hybrid Capture II, конкурентная ПЦР) методами детекции вирусного генома. Качественный метод выделил вирус-положительных женщин, установил частоту различных типов ПВИ, определил количество наблюдений с моно- и смешанной инфекцией, выявил возрастные изменения, а также применяли для оценки противовирусной эффективности ФДТ. Количественные методы исследования выполняли с целью изучения активности вирусного генома в стимуляции пролиферации эпителия, сопоставления значений концентрации вируса с тяжестью морфологических изменений, оценки и контроля противовирусной эффективности ФДТ в зависимости от генотипа, моно- или миксинфицирования.

Единицей измерения PCR RT являлся логарифм копий ДНК ВПЧ на 10^5 эпителиальных клеток ($\lg/10^5$ клеток), Hybrid Capture II – превышение клинически значимого порогового уровня (это порог оценивали как концентрация 100 тыс. генокопий/мл или 1 мг/мл), конкурентной ПЦР – вирусная нагрузка 16-го типа ВПЧ в различных концентрациях от – от 101 до 106 копий на пробирку.

Диагностический тест на идентификацию ДНК ВПЧ выполняли до хирургического лечения путем забора не только цервикального соскоба, но и материала из слизистых купола и стенок влагалища, в которых может также персистировать ВПЧ – сильнейший канцероген и ключевой фактор рецидивов заболевания.

Инфицирование высокоонкогенными генотипами ВПЧ являлось показанием к ФДТ культы шейки матки после органосохранного лечения с препаратом 5-АЛК, индуктором синтеза эндогенного протопорфирина IX (ППИХ). Лечение проводили на 6-8-ой день менструального цикла. Интервал времени между хирургическим этапом лечения и ФДТ составлял 3-4 нед. и зависел от сроков эпителизации в зоне лечебного воздействия.

Тестирование на ДНК ВПЧ проводили в течение первого года наблюдения через 3-6-12 мес. после ФДТ, второго года – 6-12 мес. и в последующие годы (при достижении полной эрадикации) – 1 раз в 3 года.

Противовирусную эффективность ФДТ оценивали по следующим критериям:

- полный эффект – полная эрадикация ДНК ВПЧ, отсутствие вирусной нагрузки;

- без эффекта – отсутствие эрадикации всех типов ДНК ВПЧ и/или снижение значений вирусной нагрузки.

При разработке методики противовирусной ФДТ культы шейки матки учитывали необходимость облучения не только покровного эпителия культы шейки матки, но и оставшейся части цервикального канала, а также сводов и стенок влагалища. Такой подход обеспечивает воздействие не только на зону резекции, но и на внешне неизмененные прилежащие ткани.

Препарат 5-АЛК в виде 12% геля в дозе 0,1 мг/см² наносили аппликационно на культю шейки матки с захватом сводов и верхней трети влагалища за 4 ч до облучения. Соблюдение светового режима при данной технологии не требуется.

В качестве источника светового излучения использовали диодный лазер «ЛФТ-630-01-БИОСПЕК» (Россия). Длина волны излучения соответствовала 635 нм, плотность энергии – 150 Дж/см².

ФДТ цервикального канала осуществляли гибким моноволоконным кварцевым световодом с цилиндрическим диффузором, дающим матрицу света на 360°, и длиной, соответствующей протяженности эндоцервикса (от 1 до 2 см). Фотодинамическое воздействие на влагалищную порцию культы шейки матки проводили дистанционно с использованием световода с линзой и диаметром светового пятна 2-3,5 см. Облучение проводили с одной позиции.

Реакция цервикального эпителия в зоне фотодинамического воздействия представляла собой незначительный отек и легкую гиперемию тканей с развитием на 2-3 сутки пленчатого некроза без существенного нарастания этих явлений в последующие дни. Процессы эпителизации завершались к 12-13-му дню лечения.

Локальное введение геля 5-АЛК ни в одном клиническом наблюдении не вызывало побочных и местных аллергических реакций, переносимость фармпрепарата была удовлетворительной. Кожная фототоксичность в виде фотодерматоза не имела место ни в одном наблюдении.

Результаты

Исследование общей распространенности типов ВПЧ, которая складывается из суммы частоты встречаемости вируса в виде монотипа и ассоциации его с другими типами, выявило значительную долю женщин (58,9%), инфицированных 16 типом ($p < 0,05$). Остальные типы по частоте распространенности распределились следующим образом: 18 – 12,8%, 31 – 10%, 45 – 7%, 33 – 4,5%, 35 – 3,8%, 56 – 2,6%, 58 – 0,2%. В незначительном количестве случаев идентифицированы 39, 48, 51, 52 типы (0,1%). Полученные данные совпадают с широкомасштабными эпидемиологическими исследованиями, в которых установлена ведущая роль в раз-

витии РШМ высокоонкогенных генотипов ВПЧ, среди которых типы 16 и 18 встречаются в 70% случаев.

Больных, инфицированных двумя и более типами ВПЧ оказалось достоверно больше (62,8%), чем одним типом (37,2%) ($p=0,000006$), при этом частота множественных типов вирусного генома не зависела от степени тяжести патологических изменений в шейке матки ($p<0,01$).

В возрастной категории до 40 лет, больных, инфицированных несколькими типами ВПЧ, было больше (75,6%), чем в группе женщин старшего возраста (24,4%). Данный факт можно связать с более высокой сексуальной активностью в репродуктивном возрасте. Частота встречаемости ВПЧ 16 типа была практически идентичной в группе женщин репродуктивного, пременопаузального и постменопаузального возрастов, соответственно в 88,2%, 86,7% и 86,3% наблюдений, что указывает на ведущую этиологическую роль 16 типа ВПЧ в индуцировании злокачественной трансформации в цервикальном эпителии независимо от возрастных особенностей.

Противовирусную эффективность ФДТ культы шейки матки оценивали во всех клинических наблюдениях ($n=100$). Полная эрадикация ДНК ВПЧ достигнута у 94% пациенток. В остальных 6% наблюдениях противовирусный эффект зарегистрирован в виде эрадикации одного или двух типов при множественном инфицировании ВПЧ с доминированием 16 и 18 штаммов, или значительном снижении вирусной нагрузки.

Сроки наблюдения составили от 3 до 10 лет. Полную эрадикацию ДНК ВПЧ после ФДТ культы шейки матки установили у 94 (94%) женщин. Стойкий противовирусный эффект в течение всего периода наблюдения сохранялся у 93 женщин (93%).

Во всех клинических наблюдениях, где отсутствовала полная эрадикация ВПЧ, проводили 2-ой курс ФДТ с положительным результатом лечения.

Рецидив заболевания был зарегистрирован только у одной пациентки (1%) через 2 года после завершения лечения преинвазивного РШМ, где имело место реинфицирование ВПЧ 16 типа от полового партнера.

Таким образом, ФДТ культы шейки матки с 5-АЛК обеспечивает выраженный противовирусный эффект на втором этапе лечения предопухолевой и начальной опухолевой патологии шейки матки за счет селективного накопления фотосенсибилизатора в инфицированных клетках с последующим их прямым фототоксическим и фотохимическим разрушением до базальных и парабазальных слоев эпителия, в которых происходит репликация вируса. Более высокие показатели эрадикации онкогенных типов ВПЧ в сравнении с методами терапевтического, хирургического и физического воздействий на вирусный геном, отсутствие реактивации инфекции на протяжении длительного периода наблюдения можно связать с аккумулярованием ВПЧ-инфицированными клетками эндогенного ППХ с последующей фотодинамической деструкцией не только клинических и субклинических, но и латентных форм жизнедеятельности ПВИ. Таргетное «точечное» разрушение мультифокальных очагов вирусного поражения, облучение не только влагалищной порции культы шейки матки, но и переходной зоны с цервикальным каналом на всем его протяжении, уничтожение клеток с интегрированной формой ВПЧ, когда противовирусные препараты не эффективны, воздействие на физический статус вируса и вирусную нагрузку, также минимизируют риск активации вирусного процесса, что предопределяет успех лечения.

Полученные данные противовирусной эффективности ФДТ представляют большой интерес в свете доказанной этиологической роли ВПЧ в развитии рака шейки матки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA Cancer J Clin.* – 2021. – Vol.7.
2. Клинышкова Т.В. Стратегии цервикального скрининга: современный взгляд // *Российский вестник акушера-гинеколога.* – 2023. – Т.23, № 4. – С. 20-26.
3. Gosvig C.F., Huusom L.D., Andersen K.K., Duun-Henriksen A.K., Frederiksen K., Iftner A. et al. Long-term follow-up of the risk for cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse in HPV-negative women after conization // *Int J Cancer.* – 2015. – Vol. 137(12). – P. 2927-2933.
4. Белоцерковцева Л.Д., Давыдов А.И., Шахламова М.Н., Панкратов В.В. Современные концепции лечения пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией, ассоциированной с папилломавирусной инфекцией // *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.* – 2018. – Т.17, №4. – С. 120-124.
5. Зароченцева Н.В., Джиджихия Л.К., Набиева В.Н. Рецидивы цервикальных интраэпителиальных неоплазий после приме-

REFERENCES

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2021, vol.7.
2. Klinyshkova T.V. Strategies of cervical screening: a modern view. *Russian bulletin of obstetrician-gynecologist*, 2023, vol. 23(4), pp. 20-26.
3. Gosvig C.F., Huusom L.D., Andersen K.K., Duun-Henriksen A.K., Frederiksen K., Iftner A. et al. Long-term follow-up of the risk for cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse in HPV-negative women after conization. *Int J Cancer*, 2015, vol. 137(12), pp. 2927-2933.
4. Belotserkovtseva L.D., Davydov A.I., Shakhlamova M.N., Pankratov V.V. Modern concepts of treatment of patients with cervical intraepithelial neoplasia associated with papillomavirus infection. *Issues of gynecology, obstetrics and perinatology*, 2018. – vol. 17(4), pp. 120-124.
5. Zarochentseva N.V., Djijikhiya L.K., Nabieva V.N. Recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after the use of excision treatment

- нения эксцизионных методов лечения // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2020. – Т.19, №2. – С. 68-77.
6. Kalliala I., Athanasiou A., Veroniki A.A., Salanti G., Efthimiou O., Raftis N. et al. Incidence and mortality from cervical cancer and other malignancies after treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review and meta-analysis of the literature // *Ann Oncol*. – 2020. – Vol. 31(2). – P. 213-27.
 7. Bruno M.T., Cassaro N., Garofalo S., Boemi S. HPV16 persistent infection and recurrent disease after LEEP // *Viro J*. – 2019. – Vol. 16(1). – P. 148.
 8. Chen L.M., Liu L., Tao X., He Y., Guo L.P., Zhang H.W. et al. Analysis of recurrence and its influencing factors in patients with cervical HSIL within 24 months after LEEP // *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. – 2019. – Vol. 54(8). – P. 534-40.
 9. Кулаков В.И., Прилепская В.И., Минкина Г.Н., Роговская С.И. Профилактика рака шейки матки // Руководство для врачей – Кулаков В.И. – 2007. – С. 57.
 10. Wu J., Jia Y., Luo M., Duan Z. Analysis of Residual/Recurrent Disease and Its Risk Factors after Loop Electrosurgical Excision Procedure for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia // *Gynecol Obstet Invest*. – 2016. – Vol. 81(4). – P. 296-301.
 11. Palmer J.E., Raveenscroft S., Eccles K., Crossley J., Dudding N., Smith J.H. et al. Does Hoffman S.R., Le T., Lockhart A., Sanusi A., Dal Santo L., Davis M. et al. Patterns of persistent HPV infection after treatment for cervical intraepithelial neoplasia (CIN): A systematic review // *Int J Cancer*. – 2017. – Vol. 141(1). – P. 8-23.
 12. Kong T.W., Son J.H., Chang S.J., Paek J., Lee Y., Ryu H.S. Value of endocervical margin and high-risk human papillomavirus status after conization for high-grade cervical intraepithelial neoplasia, adenocarcinoma in situ, and microinvasive carcinoma of the uterine cervix // *Gynecol Oncol*. – 2014. – Vol. 135(3). – P. 468-73.
 13. Zhang H., Zhang T., You Z., Zhang Y. Positive Surgical Margin, HPV Persistence and Expression of Both TPX2 and PD-L1 Are Associated with Persistence/Recurrence of Cervical Intraepithelial Neoplasia after Cervical Conization // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10(12).
 14. Poomtavorn Y., Tanprasertkul C., Sammor A., Suwannarurk K., Thaweekul Y. Predictors of Absent High-grade Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) in Loop Electrosurgical Excision Procedure Specimens of Patients with Colposcopic Directed Biopsy-Confirmed High-Grade CIN // *Asian Pac J Cancer Prev*. – 2019. – Vol. 20(3). – P. 849-54.
 15. Uijterwaal M.H., Kocken M., Berkhof J., Bekkers R.L., Verheijen R.H., Helmerhorst T.J., Meijer C.J. Posttreatment assessment of women at risk of developing high-grade cervical disease: proposal for new guidelines based on data from the Netherlands // *J Low Genit Tract Dis*. – 2014. – Vol. 18(4). – P. 338-43.
 16. Velentzis L.S., Brotherton J.M.L., Canfell K. Recurrent disease after treatment for cervical pre-cancer: determining whether prophylactic HPV vaccination could play a role in prevention of secondary lesions // *Climacteric*. – 2019. – Vol. 22(6). – P. 596-602.
 17. Santesso N., Mustafa R.A., Wiercioch W., Kehar R., Gandhi S., Chen Y., et al. Systematic reviews and meta-analyses of benefits and harms of cryotherapy, LEEP, and cold knife conization to treat cervical intraepithelial neoplasia // *Int J Gynaecol Obstet*. – 2016. – Vol. 132(3). – P. 266-71.
 18. D'Alessandro P., Arduino B., Borgo M., Saccone G., Venturella R., Di Cello A. et al. Loop Electrosurgical Excision Procedure versus Cryotherapy in the Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials // *Gynecol Minim Invasive Ther*. – 2018. – Vol. 7(4). – P. 45-51.
 19. Fernández-Montolí M.E., Tous S., Medina G., Castellarnau M., García-Tejedor A., de Sanjosé S. Long-term predictors of residual or recurrent cervical intraepithelial neoplasia 2-3 after treatment with a large loop excision of the transformation zone: a retrospective study // *BJOG*. – 2020. – Vol. 127(3). – P. 377-87.
 20. «Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия в онкологии». Под редакцией В.И. Чиссова, Е.В. Филоненко. Москва. – 2012. – С. 160-173.
 - methods. *Issues of gynecology, obstetrics and perinatology*, 2020, vol. 19(2), pp. 68-77.
 6. Kalliala I., Athanasiou A., Veroniki A.A., Salanti G., Efthimiou O., Raftis N. et al. Incidence and mortality from cervical cancer and other malignancies after treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review and meta-analysis of the literature. *Ann Oncol*, 2020, vol. 31(2), pp. 213-27.
 7. Bruno M.T., Cassaro N., Garofalo S., Boemi S. HPV16 persistent infection and recurrent disease after LEEP. *Viro J*, 2019, vol. 16(1), pp. 148.
 8. Chen L.M., Liu L., Tao X., He Y., Guo L.P., Zhang H.W. et al. Analysis of recurrence and its influencing factors in patients with cervical HSIL within 24 months after LEEP. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 2019, vol. 54(8), pp. 534-40.
 9. Kulakov V.I., Prilepskaya V.I., Minkina G.N., Rogovskaya S.I. Prevention of cervical cancer. *Handbook for doctors – Kulakov V.I.*, 2007, p. 57.
 10. Wu J., Jia Y., Luo M., Duan Z. Analysis of Residual/Recurrent Disease and Its Risk Factors after Loop Electrosurgical Excision Procedure for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Gynecol Obstet Invest*, 2016, vol. 81(4), pp. 296-301.
 11. Palmer J.E., Raveenscroft S., Eccles K., Crossley J., Dudding N., Smith J.H. et al. Does Hoffman S.R., Le T., Lockhart A., Sanusi A., Dal Santo L., Davis M. et al. Patterns of persistent HPV infection after treatment for cervical intraepithelial neoplasia (CIN): A systematic review. *Int J Cancer*, 2017, vol. 141(1), pp. 8-23.
 12. Kong T.W., Son J.H., Chang S.J., Paek J., Lee Y., Ryu H.S. Value of endocervical margin and high-risk human papillomavirus status after conization for high-grade cervical intraepithelial neoplasia, adenocarcinoma in situ, and microinvasive carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*, 2014, vol. 135(3), pp. 468-73.
 13. Zhang H., Zhang T., You Z., Zhang Y. Positive Surgical Margin, HPV Persistence and Expression of Both TPX2 and PD-L1 Are Associated with Persistence/Recurrence of Cervical Intraepithelial Neoplasia after Cervical Conization. *PLoS One*, 2015, vol. 10(12).
 14. Poomtavorn Y., Tanprasertkul C., Sammor A., Suwannarurk K., Thaweekul Y. Predictors of Absent High-grade Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) in Loop Electrosurgical Excision Procedure Specimens of Patients with Colposcopic Directed Biopsy-Confirmed High-Grade CIN. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2019, vol. 20(3), pp. 849-54.
 15. Uijterwaal M.H., Kocken M., Berkhof J., Bekkers R.L., Verheijen R.H., Helmerhorst T.J., Meijer C.J. Posttreatment assessment of women at risk of developing high-grade cervical disease: proposal for new guidelines based on data from the Netherlands. *J Low Genit Tract Dis*, 2014, vol. 18(4), pp. 338-43.
 16. Velentzis L.S., Brotherton J.M.L., Canfell K. Recurrent disease after treatment for cervical pre-cancer: determining whether prophylactic HPV vaccination could play a role in prevention of secondary lesions. *Climacteric*, 2019, vol. 22(6), pp. 596-602.
 17. Santesso N., Mustafa R.A., Wiercioch W., Kehar R., Gandhi S., Chen Y., et al. Systematic reviews and meta-analyses of benefits and harms of cryotherapy, LEEP, and cold knife conization to treat cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynaecol Obstet*, 2016, vol. 132(3), pp. 266-71.
 18. D'Alessandro P., Arduino B., Borgo M., Saccone G., Venturella R., Di Cello A. et al. Loop Electrosurgical Excision Procedure versus Cryotherapy in the Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Gynecol Minim Invasive Ther*, 2018, vol. 7(4), pp. 45-51.
 19. Fernández-Montolí M.E., Tous S., Medina G., Castellarnau M., García-Tejedor A., de Sanjosé S. Long-term predictors of residual or recurrent cervical intraepithelial neoplasia 2-3 after treatment with a large loop excision of the transformation zone: a retrospective study. *BJOG*, 2020, vol. 127(3), pp. 377-87.
 20. «Fluorescent diagnostics and photodynamic therapy in oncology». Edited by V.I. Chissov V.I., Filonenko E.V. Moscow, 2012, pp. 160-173.

ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ



«ФОТОДИТАЗИН®» концентрат для приготовления раствора для инфузий — лекарственное средство (ПУ № ЛС 001246 от 18.05.2012 г.)
«ФОТОДИТАЗИН®» гель — изделие медицинского назначения (ПУ № ФСР 2012/13043 от 03.02.2012 г.)
«ФОТОДИТАГЕЛЬ®» — косметическое средство (ДС ЕАЭС № RU Д-RU.HB42.B.06108/20 от 24.09.2020 г.)

Препараты применяются для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии злокачественных новообразований, а также патологий неонкологического характера в следующих областях медицины:

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

 www.fotoditazin.com
www.фотодитазин.рф

ООО «ВЕТА-ГРАНД»

123056, г. Москва, ул. Красина, д. 27, стр. 2
Тел.: +7 (499) 250-40-00, +7 (929) 971-44-46
E-mail: veta-grand@mail.ru



@FOTODITAZIN



@FOTODITAGEL_FDT

