

# АЛЬМАНАХ КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

44 (2) • Февраль 2016

ISSN 2072-0505

Оптимизация лазерной технологии  
удаления пленок вторичной катаракты

«Умные» лазерные скальпели  
для роботизированной хирургии

Ускорительные  
и радионуклидные технологии  
в клинической медицине

Изучение биофизических свойств  
костной ткани для медико-  
биологических приложений

Возможности оптимизации клинических  
исходов фотодинамической терапии  
с использованием оптической  
визуализации

Функциональные исследования  
системы микроциркуляции крови  
методом лазерной доплеровской  
флоуметрии

Люминесцентная диагностика  
опухолей с применением  
апконвертирующих наночастиц

Практическое применение  
импедансной реографии  
в кардиологии – новые подходы

ТЕМА НОМЕРА:

КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ  
МЕДИЦИНСКОЙ БИОФИЗИКИ



# IX СЪЕЗД ОНКОЛОГОВ И РАДИОЛОГОВ СТРАН СНГ И ЕВРАЗИИ

15-17 ИЮНЯ 2016 ГОДА  
МИНСК, РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ

[www.cis-oncology2016.org](http://www.cis-oncology2016.org)



**РНПЦ ОНКОЛОГИИ  
И МЕДИЦИНСКОЙ РАДИОЛОГИИ  
им. Н.Н. АЛЕКСАНДРОВА**



## **АДИОР**

Ассоциация Директоров  
Центров и Институтов Онкологии  
и Рентгенорадиологии  
стран СНГ и Евразии

# АЛЬМАНАХ КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Научно-практический журнал  
Издается с 1998 г.  
Периодичность – 8 выпусков в год  
Учредитель – ГБУЗ МО «Московский  
областной научно-исследовательский  
клинический институт  
им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ)

Том 44 • № 2 • Февраль 2016

## ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

**Палеев Филипп Николаевич**, д-р мед. наук, проф., проф. РАН  
Москва, Российская Федерация

## Заместитель главного редактора

**Молочков Антон Владимирович**, д-р мед. наук, проф.  
Москва, Российская Федерация

## Ответственный редактор

**Парпара Олеся Анатольевна**  
Москва, Российская Федерация

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

**Агафонов Борис Валентинович**, канд. мед. наук, проф.

Москва, Российская Федерация

**Де Херт Стефан**, д-р, проф.

Гент, Бельгия

**Калинин Ариан Павлович**, чл.-кор. РАН, д-р мед. наук, проф.

Москва, Российская Федерация

**Краснопольский Владислав Иванович**, академик РАН,

д-р мед. наук, проф.

Москва, Российская Федерация

**Круглов Евгений Ефимович**, д-р мед. наук, проф.

Москва, Российская Федерация

**Кушлинский Николай Евгеньевич**, чл.-кор. РАН,

д-р мед. наук, проф.

Москва, Российская Федерация

**Майр Йоханнес**, д-р, проф.

Базель, Швейцария

**Онопrienко Геннадий Алексеевич**, чл.-кор. РАН,

д-р мед. наук, проф.

Москва, Российская Федерация

**Палеев Николай Романович**, академик РАН, д-р мед. наук, проф.

Москва, Российская Федерация

**Райниш Уолтер**, д-р, проф.

Гамильтон, Канада

**Шабалин Владимир Николаевич**,

академик РАН, д-р мед. наук, проф.

Москва, Российская Федерация

**Шахова Наталия Михайловна**, д-р мед. наук, проф.

Нижний Новгород, Российская Федерация

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

**Белоусова Елена Александровна**, д-р мед. наук, проф.  
Москва, Российская Федерация

**Ватазин Андрей Владимирович**, д-р мед. наук, проф.  
Москва, Российская Федерация

**Вишнякова Мария Валентиновна**, д-р мед. наук  
Москва, Российская Федерация

**Волошин Виктор Парфентьевич**, д-р мед. наук, проф.  
Москва, Российская Федерация

**Герасименко Марина Юрьевна**, д-р мед. наук, проф.  
Москва, Российская Федерация

**Древаль Александр Васильевич**, д-р мед. наук, проф.  
Москва, Российская Федерация

**Егоров Виктор Иванович**, д-р мед. наук  
Москва, Российская Федерация

**Котов Сергей Викторович**, д-р мед. наук, проф.  
Москва, Российская Федерация

**Куликов Дмитрий Александрович**, канд. мед. наук  
Москва, Российская Федерация

**Мазурин Валентин Сергеевич**, д-р мед. наук, проф.  
Москва, Российская Федерация

**Овезов Алексей Мурадович**, д-р мед. наук  
Москва, Российская Федерация

**Рогаткин Дмитрий Алексеевич**, д-р техн. наук  
Москва, Российская Федерация

**Руденко Михаил Владимирович**, канд. мед. наук, проф.  
Москва, Российская Федерация

**Рябцева Алла Алексеевна**, д-р мед. наук, проф.  
Москва, Российская Федерация

**Урсова Наталия Игоревна**, д-р мед. наук, проф.  
Москва, Российская Федерация

**Федорова Светлана Ивановна**, канд. мед. наук  
Москва, Российская Федерация

**Шатохина Светлана Николаевна**, д-р мед. наук, проф.  
Москва, Российская Федерация

Подписной индекс 81988  
Объединенный каталог «Пресса России»

Журнал индексируется в системе  
Российского индекса научного цитирования  
(РИНЦ): [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)

© 2016 ГБУЗ МО МОНИКИ  
им. М.Ф. Владимирского  
[www.monikiweb.ru](http://www.monikiweb.ru)

ISSN 2072-0505

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе  
по надзору в сфере связи, информационных тех-  
нологий и массовых коммуникаций. Свидетель-  
ство ПИ № ФС77-34730 от 23.12.2008.

«Альманах клинической медицины» с 2001 г. вхо-  
дит в Перечень ведущих российских рецензируе-  
мых научных журналов, в которых должны быть  
опубликованы основные научные результаты  
диссертаций на соискание ученых степеней док-  
тора и кандидата наук, Высшей аттестационной  
комиссии (ВАК)

Редакция не несет ответственности за содержа-  
ние рекламных публикаций.

Полная или частичная перепечатка или размно-  
жение каким-либо способом статей и иллюстра-  
ций допускается только с письменного разреше-  
ния редакции журнала «Альманах клинической  
медицины».

**Адрес редакции:**  
129110, Москва, ул. Щепкина, 61/2, корп. 8  
Тел.: +7 (495) 688 32 41  
E-mail: [o\\_parpara@monikiweb.ru](mailto:o_parpara@monikiweb.ru)

ТЕМА НОМЕРА:  
КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ  
МЕДИЦИНСКОЙ БИОФИЗИКИ

Альманах клинической медицины.  
2016 Февраль; 44 (2)

НАУЧНЫЙ РЕДАКТОР ВЫПУСКА  
Рогаткин Дмитрий Алексеевич, д-р техн. наук

## Содержание

### Оригинальные статьи

Баум О.И., Романов О.Г., Гамидов А.А., Федоров А.А.,  
Романов Г.С., Желтов Г.И., Соболев Э.Н.

**Оптимизация лазерной технологии удаления пленок  
вторичной катаракты** ..... 130

Белоусов А.В., Белянов А.А., Черняев А.П.

**Ошибки аппроксимации радиальной дозовой функции  
кобальтовых источников для брахитерапии  
полиномами 3–5-й степени** ..... 140

Гамаюнов С.В., Скребцова Р.Р., Корчагина К.С., Сапунов Д.А.,  
Шахова М.А., Шахова Н.М.

**Возможности оптимизации клинических исходов  
фотодинамической терапии с использованием  
оптической визуализации** ..... 148

Гибизова В.В., Аненкова К.А., Масленникова А.Д.,  
Федорова К.В., Сергеева И.А., Петрова Г.П.

**Определение фундаментальных физических параметров  
белков сыворотки крови для развития методов  
диагностики злокачественных новообразований** ..... 158

Гусева И.А., Куликова П.А., Быченков О.А., Рогаткин Д.А.,  
Куликов Д.А., Чурсинова Ю.В., Бобров М.А.

**Исследование воздействия ионизирующего излучения  
на ткани методом лазерной флуоресцентной  
спектроскопии *in vivo*** ..... 165

Дмитриев А.К., Коновалов А.Н., Картунов В.Н., Ульянов В.А.

**«Умные» лазерные скальпели  
для роботизированной хирургии** ..... 172

Думлер А.А., Подтаев С.Ю., Степанов Р.А., Фрик П.Г.

**Практическое применение импедансной реографии  
в кардиологии – новые подходы** ..... 179

Котляр К.Е., Глазков А.А., Ковалева Ю.А., Дроздова Г.А.,  
Куликов Д.А.

**Оценка состояния микроциркуляторного русла кожи  
и сетчатки глаза с помощью оптических методов  
диагностики у больных сахарным диабетом** ..... 186

Матвейчук И.В., Розанов В.В., Литвинов Ю.Ю.

**Изучение биофизических свойств костной ткани  
для медико-биологических приложений** ..... 193

Меллер А.Е., Мотовилова Т.М., Пантелеева О.Г.,  
Кузнецов С.С., Стройкова К.И., Кондратьева О.А.,  
Кириллин М.Ю., Шахова Н.М.

**Неинвазивная диагностика неопухолевой патологии  
с использованием оптической  
когерентной томографии** ..... 203

Молочков А.В., Кильдюшевский А.В., Молочкова Ю.В.

**Экстракорпоральная фотохимиотерапия типичного  
и атипичного красного плоского лишая** ..... 213

Петрицкая Е.Н., Рогаткин Д.А., Русанова Е.В.

**Сравнительная характеристика антибактериального  
действия препаратов серебра и наносеребра *in vitro*** ..... 221

Рочева В.В., Шолина Н.В., Деревяшкин С.П., Генералова А.Н.,  
Нечаев А.В., Хоченков Д.А., Семчишен В.А., Хайдуков Е.В.,  
Степанова Е.В., Панченко В.Я.

**Люминесцентная диагностика опухолей  
с применением апконвертирующих наночастиц** ..... 227

Сергунова В.А., Черняев А.П., Козлов А.П., Близнюк У.А.,  
Борщевская П.Ю., Козлова Е.К., Черныш А.М.

**Наноструктура мембран эритроцитов  
при интоксикации крови. Исследование  
с помощью атомной силовой микроскопии** ..... 234

Лекция, обзор

Гудебская В.А.

**Клиническая эффективность робот-ассистированной  
лапароскопической миомэктомии** ..... 242

Лапитан Д.Г., Рогаткин Д.А.

**Функциональные исследования системы  
микроциркуляции крови методом лазерной  
доплеровской флоуметрии в клинической медицине:  
проблемы и перспективы** ..... 249

Черняев А.П., Варзарь С.М.

**Ускорительные и радионуклидные технологии  
в клинической медицине** ..... 260

# ALMANAC OF CLINICAL MEDICINE

The scientific and practical journal

Published since 1998

Founded and published by Moscow Regional  
Research and Clinical Institute (MONIKI),  
Moscow, Russian Federation

Publication frequency: 8 issues per year

Volume 44 • Number 2 • February 2016

## EDITOR-IN-CHIEF

**Paleev Filipp Nikolaevich**, MD, PhD, Prof. of Russ. Acad. Sci.  
*Moscow, Russian Federation*

## Deputy Chief Editor

**Molochkov Anton Vladimirovich**, MD, PhD, Prof.  
*Moscow, Russian Federation*

## Managing Editor

**Parpara Olesya Anatol'evna**  
*Moscow, Russian Federation*

## EDITORIAL COUNCIL

**Agafonov Boris Valentinovich**, MD, PhD, Prof.  
*Moscow, Russian Federation*

**De Hert Stefan**, MD, PhD, Prof.  
*Ghent, Belgium*

**Kalinin Arian Pavlovich**, Corr. member of Russ. Acad. Sci.,  
MD, PhD, Prof.  
*Moscow, Russian Federation*

**Krasnopolskiy Vladislav Ivanovich**, Member of Russ. Acad. Sci.,  
MD, PhD, Prof.  
*Moscow, Russian Federation*

**Kruglov Evgeniy Efimovich**, MD, PhD, Prof.  
*Moscow, Russian Federation*

**Kushlinskii Nikolay Evgen'evich**, Corr. member of Russ. Acad. Sci.,  
MD, PhD, Prof.  
*Moscow, Russian Federation*

**Mayr Johannes**, MD, PhD, Prof.  
*Basel, Switzerland*

**Onoprienko Gennadiy Alekseevich**, Corr. member of Russ. Acad. Sci.,  
MD, PhD, Prof.  
*Moscow, Russian Federation*

**Paleev Nikolay Romanovich**, Member of Russ. Acad. Sci.,  
MD, PhD, Prof.  
*Moscow, Russian Federation*

**Reinisch Walter**, MD, PhD, Prof.  
*Hamilton, Canada*

**Shabalin Vladimir Nikolaevich**, Member of Russ. Acad. Sci.,  
MD, PhD, Prof.  
*Moscow, Russian Federation*

**Shakhova Nataliya Mikhaylovna**, MD, PhD, Prof.  
*Nizhniy Novgorod, Russian Federation*

## EDITORIAL BOARD

**Belousova Elena Aleksandrovna**, MD, PhD, Prof.  
*Moscow, Russian Federation*

**Vatazin Andrey Vladimirovich**, MD, PhD, Prof.  
*Moscow, Russian Federation*

**Vishnyakova Mariya Valentinovna**, MD, PhD  
*Moscow, Russian Federation*

**Voloshin Viktor Parfent'evich**, MD, PhD, Prof.  
*Moscow, Russian Federation*

**Gerasimenko Marina Yur'evna**, MD, PhD, Prof.  
*Moscow, Russian Federation*

**Dreval' Aleksandr Vasil'evich**, MD, PhD, Prof.  
*Moscow, Russian Federation*

**Egorov Viktor Ivanovich**, MD, PhD  
*Moscow, Russian Federation*

**Kotov Sergey Viktorovich**, MD, PhD, Prof.  
*Moscow, Russian Federation*

**Kulikov Dmitriy Aleksandrovich**, MD, PhD  
*Moscow, Russian Federation*

**Mazurin Valentin Sergeevich**, MD, PhD, Prof.  
*Moscow, Russian Federation*

**Ovezov Aleksey Muradovich**, MD, PhD  
*Moscow, Russian Federation*

**Rogatkin Dmitriy Alekseevich**, PhD  
*Moscow, Russian Federation*

**Rudenko Mikhail Vladimirovich**, MD, PhD, Prof.  
*Moscow, Russian Federation*

**Ryabtseva Alla Alekseevna**, MD, PhD, Prof.  
*Moscow, Russian Federation*

**Ursova Nataliya Igorevna**, MD, PhD, Prof.  
*Moscow, Russian Federation*

**Fedorova Svetlana Ivanovna**, MD, PhD  
*Moscow, Russian Federation*

**Shatokhina Svetlana Nikolaevna**, MD, PhD, Prof.  
*Moscow, Russian Federation*

Subscription index 81988  
in the united Pressa Rossii catalogue

The journal is indexed by Russian Index of Scientific  
Citation (RISC): [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)

© 2016 MONIKI  
[www.monikiweb.ru](http://www.monikiweb.ru)

ISSN 2072-0505

The journal is registered by Federal Service for Supervision in the Sphere of Telecom, Information Technologies and Mass Communications. Registration certificate ПИ № ФС77-34730 was issued on December 23, 2008.

Since 2001 the Almanac of Clinical Medicine is included in the List of leading referred journals, recommended by VAK (Higher Attestation Committee) for publication of scientific results of dissertations for the degrees of doctors and candidates of sciences.

Editorial board and the editors are not responsible for claims made in the advertisements published in the journal.

All articles published in this journal are protected by copyright, which covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article. No material published in this journal may be reproduced photographically or stored on microfilm, in electronic data base, on video discs, etc., without first obtaining written permission from the publisher (respectively of the copyright owner if other than MONIKI).

## Editorial Office

Almanac of Clinical Medicine, MONIKI,  
61/2-8 Shchepkina ul., Moscow, 129110,  
Russian Federation. Tel.: +7 (495) 688 32 41  
E-mail: [o\\_parpara@monikiweb.ru](mailto:o_parpara@monikiweb.ru)

## TOPIC OF THE ISSUE:

### CLINICAL ASPECTS OF MEDICAL PHYSICS

## Almanac of Clinical Medicine. 2016 February; 44 (2)

SCIENCE EDITOR  
Rogatkin Dmitriy Alekseevich, PhD (in Engineering)

## Content

### Articles

*Baum O.I., Romanov O.G., Gamidov A.A., Fedorov A.A.,*

*Romanov G.S., Zheltov G.I., Sobol E.N.*

**Optimization of laser surgery of the secondary cataract** ..... 130

*Belousov A.V., Belyanov A.A., Chernyaev A.P.*

**Errors in fitting radial dose function of Cobalt sources for brachytherapy with 3-5 degree polynomials** ..... 140

*Gamayunov S.V., Skrebtsova R.R., Korchagina K.S.,*

*Sapunov D.A., Shakhova M.A., Shakhova N.M.*

**The ways to optimize clinical outcomes of photodynamic therapy by optical imaging techniques** ..... 148

*Gibizova V.V., Anenkova K.A., Maslennikova A.D.,*

*Fedorova K.V., Sergeeva I.A., Petrova G.P.*

**Determination of fundamental physical parameters of blood serum proteins for development the methods for cancer diagnosis** ..... 158

*Guseva I.A., Kulikova P.A., Bychenkov O.A., Rogatkin D.A.,*

*Kulikov D.A., Chursinova Yu.V., Bobrov M.A.*

**An *in vivo* study of the effects of ionizing radiation on tissues by laser fluorescence spectroscopy** ..... 165

*Dmitriev A.K., Konovalov A.N., Kortunov V.N., Ul'yanov V.A.*

**"Smart" laser scalpels for robotic surgery** ..... 172

*Dumler A.A., Podtaev S.Yu., Stepanov R.A., Frick P.G.*

**Practical implementation of impedance reography in cardiology – new approaches** ..... 179

*Kotliar K.E., Glazkov A.A., Kovaleva Yu.A., Drozdova G.A.,*

*Kulikov D.A.*

**Assessment of the skin and retinal microvasculature with the optical methods of diagnostics in patients with diabetes mellitus** ..... 186

*Matveychuk I.V., Rozanov V.V., Litvinov Yu.Yu.*

**Evaluation of biophysical properties of the bone tissue for biomedical applications** ..... 193

*Meller A.E., Motovilova T.M., Panteleeva O.G., Kuznetsov S.S., Stroykova K.I., Kondrat'eva O.A., Kirillin M.Yu., Shakhova N.M.*

**Non-invasive diagnostics of non-tumor disorders with optical coherence tomography** ..... 203

*Molochkov A.V., Kil'dyushevskiy A.V., Molochkova Yu.V.*

**Extracorporeal photochemotherapy in the treatment of typical and atypical lichen planus rubrum** ..... 213

*Petritskaya E.N., Rogatkin D.A., Rusanova E.V.*

**Comparative characteristics of antibacterial effect of silver and nanosilver *in vitro*** ..... 221

*Rocheva V.V., Sholina N.V., Derevyashkin S.P., Generalova A.N., Nechaev A.V., Khochenkov D.A., Semchishen V.A., Khaydukov E.V., Stepanova E.V., Panchenko V.Ya.*

**Luminescence diagnostics of tumors with upconversion nanoparticles** ..... 227

*Sergunova V.A., Chernyaev A.P., Kozlov A.P., Bliznyuk U.A., Borshchegovskaya P.Yu., Kozlova E.K., Chernysh A.M.*

**The nanostructure of erythrocyte membranes under blood intoxication: an atomic force microscopy study** ..... 234

Lecture, review

*Gudebskaya V.A.*

**Clinical efficacy of the robot-assisted laparoscopic myomectomy (a review of the literature)** ..... 242

*Lapitan D.G., Rogatkin D.A.*

**Functional studies on blood microcirculation system with laser Doppler flowmetry in clinical medicine: problems and prospects** ..... 249

*Chernyaev A.P., Varzar' S.M.*

**Accelerative and radionuclide technologies in clinical medicine** ..... 260

## Дорогие читатели!



Методы биофизики, биохимии, медицинской физики, материаловедения, компьютерных технологий и многих других инженерно-технических и естественных наук составляют неотъемлемый арсенал технологического и методологического оснащения современной клинической медицины. Медицина, физика и другие точные науки на протяжении всей своей истории всегда были неразрывно связаны друг с другом. Такие великие физики, как Фуко, Пуазейль, Гельмгольц, Томас Юнг и другие, были по образованию врачами. Первоначально скорее даже медицина задавала вектор развития физики, нежели наоборот. Первое же рождение новых методов диагностики и лечения в медицине, ставшее возможным благодаря усилиям именно профессиональных физиков, а не врачей, произошло только в конце XVIII века с появлением и развитием теории электричества на основе работ Б. Франклина, Ш. Дюфе, Ш.О. Кулона, А. Вольта, Л. Гальвани, а также других физиков, точнее, биофизиков того времени. С этого момента появляется такой метод врачевания, как электролечение, и многие профессиональные физики и врачи Европы начинают посвящать часть своего времени его изучению и обоснованию. Не является исключением здесь и Россия. Первые упоминания применения физических методов лечения в медицине в России относятся к городу Богородицк Тульской губернии и к Старо-Екатерининской больнице в Москве (ныне наш МОНИКИ), когда в ней

в 1793 г., спустя всего два года с публикации открытия «животного электричества» Л. Гальвани, была применена «электрическая динамо-машина с лечебной целью». Теоретическим обоснованием этому, наиболее вероятно, послужили труды одного из самых талантливых современников и фаворитов Императрицы Екатерины II, ученого, философа, агронома, экономиста, публициста, режиссера театра, а также управляющего по предписанию Екатерины II Богородицкой и Бобриковской волостями Андрея Тимофеевича Болотова. В 1792–1793 гг. он собственноручно пишет и издает за свои средства монографии «Краткий электрический лечебник» и «История моего электризования и врачевания разных болезней оным». А в 1808 г. появляется уже первое официально зарегистрированное медико-физическое общество в России (а возможно, и в мире) при Московском Императорском Университете (ныне МГУ им. М.В. Ломоносова). Оно называлось «Высочайше утвержденное при Московском Императорском Университете Общество соревнования врачебных и физических наук», позднее – просто «Российское медико-физическое общество». Его основным организатором и первым председателем стал заслуженный профессор анатомии и хирургии Ф. Керестури. Тогда же увидел свет и первый отечественный журнал по медицинской физике – «Российский медико-физический журнал», изданный секретарем общества, надворным советником медицины, профессором Иваном Венсовичем. Цель создания журнала и общества, как написано в первом выпуске журнала, – «новейшие медико-физические открытия...» и помощь врачам в борьбе с заблуждениями и догмами «...мнимой трансцендентальной медицины».

С тех пор прошло много времени, и уже ни у кого нет сомнений в необходимости тесной кооперации врачей, физиков и специалистов из других областей науки и техники в целях развития клинической медицины. Сегодня их совместными усилиями интенсивно во всем мире развиваются лучевые методы диагностики и лечения онкологических заболеваний, лазерные медицинские технологии, роботхирургия, нанотехнологии в медицине, разрабатываются новые материалы для имплантатов, изучаются микроструктурные биофизические свойства твердых и мягких тканей человека и т.д.

Данный выпуск журнала «Альманах клинической медицины» представляет собой небольшой срез последних и наиболее передовых совместных работ российских врачей, биофизиков и медицинских физиков в этом направлении. Безусловно, один номер журнала не может вместить все направления и разработки российских ученых (так, не вошли в номер известные работы по высокоинтенсивному направленному ультразвуковому разрушению опухолей), но основные современные тенденции почерпнуть из представленного можно.

Хочется выразить надежду, что предлагаемый вашему вниманию выпуск журнала, посвященный современной биофизике, будет интересен практикующим врачам самых разных специальностей и что они смогут почерпнуть из него для себя много полезной информации и идей на будущее.

Главный редактор журнала  
«Альманах клинической медицины»

Директор ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского,  
доктор медицинских наук, профессор, профессор РАН

Ф.Н. Палеев



# Оптимизация лазерной технологии удаления пленок вторичной катаракты

Баум О.И.<sup>1</sup> • Романов О.Г.<sup>2</sup> • Гамидов А.А.<sup>3</sup> • Федоров А.А.<sup>3</sup> • Романов Г.С.<sup>4</sup> • Желтов Г.И.<sup>5</sup> • Соболев Э.Н.<sup>1</sup>

**Актуальность.** Работа посвящена теоретическому и экспериментальному исследованию термомеханического воздействия лазерного излучения с длиной волны 1,06 мкм на ткани глаза при лазерной операции по удалению вторичной катаракты (зрачковой мембраны). Актуальность обусловлена частотой осложнений после проведения лазерных глазных вмешательств, связанных с выбором энергетических и временных параметров лазерного облучения. Именно с ними сопряжено возникновение таких трудно учитываемых факторов, как нестационарные поля термонапряжений и давления, опосредованно вызывающие нежелательные осложнения при удалении пленок вторичной катаракты. **Цель** – минимизировать

побочные действия и оптимизировать существующую технологию лазерного удаления пленок вторичной катаракты. **Материал и методы.** Воздействие осуществляли с помощью лазера инфракрасного диапазона (Nd:YAG-лазер, 1064 нм). Воздействовали на образцы капсулы нормального хрусталика, а также образцы с различными формами помутнений после хирургии катаракты с различными оптическими характеристиками и толщиной. Проводили морфометрическое исследование. Построена теоретическая модель процессов, протекающих в сплошной среде при действии на нее импульсного лазерного излучения. **Результаты** численного моделирования на основе впервые представленной теоретической

модели находятся в удовлетворительном согласии с экспериментальными данными по развитию деформаций, полученными на аутопсийном материале – задней капсуле человека с различными оптическими характеристиками и толщиной (от тонких прозрачных пленок до более толстых непрозрачных образцов). **Заключение.** Проведенное исследование позволяет оптимизировать технологию лазерного лечения вторичных катаракт, меняя параметры облучения в процессе воздействия.

**Ключевые слова:** лазер, вторичная катаракта, теоретическая модель, термонапряжения

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-130-139

**К** числу наиболее распространенных осложнений катарактальной хирургии относятся так называемые пленчатые помутнения в области зрачка, чаще всего подразумевающие наличие послеоперационного снижения прозрачности капсулы хрусталика, иначе – вторичной катаракты. Развитие данных помутнений связано с сохраняющейся способностью к пролиферации остаточных клеток эпителия хрусталика. При этом формирующиеся на внутренней поверхности капсулы помутнения могут иметь мягкую либо плотную структуру, что имеет значение при дальнейшем выборе параметров лазерного воздействия.

Метод лазерной фотодеструкции тканей, вошедший в широкую клиническую практику

и сегодня ставший основой для современной лазерной реконструктивной хирургии [1, 2], представляет собой достойную альтернативу традиционным хирургическим вмешательствам при лечении пациентов с пленчатыми помутнениями в области зрачка. Это связано с меньшей инвазивностью лазерной хирургии и возможностью неоднократного ее проведения в амбулаторных условиях. Тем не менее лазерный метод не лишен недостатков, что сопряжено с высоким риском развития целого ряда осложнений. К ним можно отнести глазную гипертензию, кровотечение из сосудов глаза, повреждение роговицы и сетчатки, грыжу стекловидного тела, дислокацию и повреждение искусственного хрусталика [3, 4, 5].



Проблеме фотодеструктивного действия лазеров на анатомические структуры глаза и искусственные внутриглазные элементы посвящены многочисленные работы отечественных и зарубежных авторов [6–13]. Одним из наиболее часто встречающихся осложнений при использовании лазерного излучения является повреждение оптической части интраокулярной линзы [8, 10, 11], чаще именуемое дистантным повреждением интраокулярной линзы. Безопасные для глаза уровни облучения, определяемые нормативными документами, как отмечают авторы, имеют вероятностный характер, что не означает невозможности развития повреждений [8]. Совершенствование офтальмологической лазерной техники, к сожалению, также не исключает возможности развития осложнений, связанных с лазерным воздействием. В связи с этим проведение дальнейших исследований, направленных на обеспечение максимально щадящего характера лазерной деструкции пленчатых помутнений в области зрачка, сохраняет свою актуальность.

Различного рода осложнения после проведения лазерных глазных вмешательств часто связаны с выбором энергетических и временных параметров лазерного облучения, которые обуславливают возникновение таких трудно учитываемых факторов, как нестационарные поля термонапряжений и давления. Опосредованно они могут вызывать нежелательные осложнения при удалении пленок вторичной катаракты. Таким образом, цель данного исследования – минимизация побочных действий и оптимизация существующей технологии лазерного удаления пленок вторичной катаракты, а также изучение физических процессов, происходящих под воздействием регулярных последовательностей лазерных импульсов, и их возможное влияние на гетерогенные структуры глаза при проведении лазерной дисцизии капсулы хрусталика в численном эксперименте.

В предыдущей работе коллектива авторов [14] было проведено исследование процессов нагрева и разрушения двух типов часто встречающихся в хирургической практике пленок катаракты (твердой и мягкой форм) под воздействием последовательностей лазерных импульсов с целью изучения их возможного влияния на гетерогенные

**Баум Ольга Игоревна** – канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр., отделение перспективных лазерных технологий<sup>1</sup>

✉ 142092, г. Москва, Троицк, ул. Пионерская, 2, Российская Федерация.  
Тел.: +7 (916) 542 92 02.  
E-mail: baumolga@gmail.com

**Романов Олег Геннадьевич** – канд. физ.-мат. наук, доцент, заведующий кафедрой компьютерного моделирования<sup>2</sup>

**Гамидов Алибек Абдулмуталимович** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., лаборатория новых лазерных технологий<sup>3</sup>

**Федоров Анатолий Александрович** – канд. мед. наук, заведующий лабораторией фундаментальных исследований в офтальмологии<sup>3</sup>

**Романов Геннадий Степанович** – канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр.<sup>4</sup>

**Желтов Георгий Иванович** – д-р физ.-мат. наук, гл. науч. сотр.<sup>5</sup>

**Соболь Эмиль Наумович** – д-р физ.-мат. наук, заведующий лабораторией биофотоники<sup>1</sup>

структуры глаза при лазерной абляции зрачковых мембран. Было показано, что эффективный коэффициент поглощения излучения зрачковыми мембранами определяется в основном процессами рассеяния света. Найден основной механизм абляции пленок – разрушение под действием давления выделяющихся газов, происходящее после окончания лазерных импульсов.

Данная работа является продолжением начатых исследований. На основе оптических свойств, порогов и удельной энергии лазерного разрушения пленок вторичных катаракт, исследованных ранее [14], мы предприняли попытку описать кинетику воздействия импульсно-периодического лазерного излучения, порождающего волны термонапряжений и давления, приводящие к возникновению деформаций и флуктуации плотности биологического материала твердой и мягкой форм пленок катаракты.

## Материал и методы

В исследовании были использованы образцы аутопсийного материала – образцы капсулы нормального хрусталика, а также образцы с различными формами помутнений после хирургии катаракты с различными оптическими характеристиками и толщиной (от тонких прозрачных пленок до более толстых непрозрачных образцов), полученные из глазного банка ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней» (Москва). Морфометрическая структура использованных образцов представлена в разделе «Гистологическое исследование образцов», макрофотографии – в разделе «Лазерное воздействие на пленки задней капсулы хрусталика».

Подход к решению поставленных задач, основанный на комбинации известных экспериментальных оптических методов, в частности, лазерного воздействия с различными параметрами (длиной волны излучения, длительностью и частотой следования импульсов, количества серий облучения и количества импульсов в каждой серии), осуществляли с помощью инфракрасного диапазона (Nd:YAG-лазер, 1064 нм). Лазерное воздействие осуществляли сериями из 1–50 импульсов длительностью 8 нс каждый, с энергией импульса 1–20 мДж при диаметре лазерного пятна от 20 мкм до 1 мм.

<sup>1</sup> ФГБНУ «Институт проблем лазерных и информационных технологий» РАН; 142092, г. Москва, Троицк, ул. Пионерская, 2, Российская Федерация

<sup>2</sup> Белорусский государственный университет; 220030, г. Минск, пр. Независимости, 4, Республика Беларусь

<sup>3</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней»; 119021, г. Москва, ул. Россолимо, 11, Российская Федерация

<sup>4</sup> ГНУ «Институт тепло- и массообмена имени А.В. Лыкова Национальной академии наук Беларуси»; 220072, г. Минск, ул. П. Бровки, 15, Республика Беларусь

<sup>5</sup> Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси; 220072, г. Минск, пр. Независимости, 68, Республика Беларусь



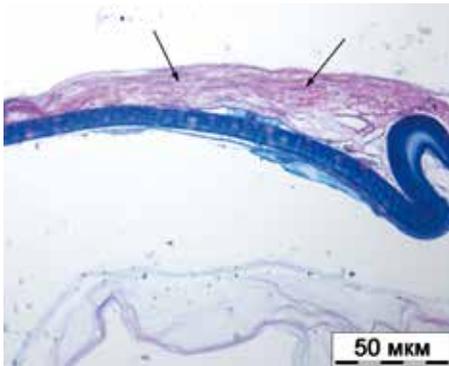
**Рис. 1.** Морфологическая картина неизменной задней капсулы хрусталика с результатами морфометрических измерений ее толщины. Полутоновый срез. Окраска метиленовым синим и основным фуксином



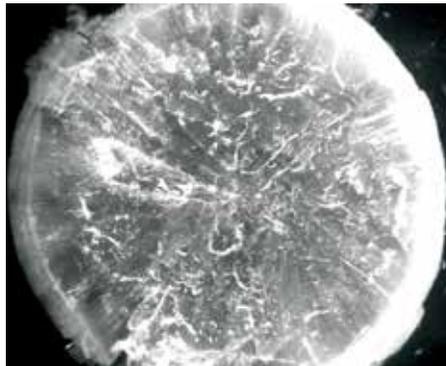
**Рис. 2.** Морфологическая картина капсулы хрусталика при псевдорегенераторной форме вторичной катаракты. Стрелками указаны гипертрофированные мигрирующие клетки экваториальной зоны. Полутоновый срез. Окраска метиленовым синим и основным фуксином



**Рис. 3.** Морфологическая картина капсулы хрусталика при гиалоподобной форме вторичной катаракты. Разволокнения капсулы отмечены черными стрелками, между ними находятся микрополости в ткани капсулы с более бледной окраской. Полутоновый срез. Окраска метиленовым синим и основным фуксином



**Рис. 4.** Морфологическая картина капсулы хрусталика при «твердой» (фиброзной) форме вторичной катаракты. В верхней половине рисунка видны напластования фиброзной ткани на внутренней поверхности задней капсулы (черные стрелки). С наружной поверхности (нижняя половина рисунка) находятся фрагменты стекловидного тела. Полутоновый срез. Окраска метиленовым синим и основным фуксином



**Рис. 5.** Макропрепарат изолированного образца капсулы хрусталика с помутнениями («твердая» форма), случай А



**Рис. 6.** Макропрепарат изолированного образца капсулы хрусталика с помутнениями («мягкая» форма), случай Б

Морфометрическое исследование опытных образцов капсулы хрусталика и их фоторегистрацию проводили на Фотомикроскопе III («Ортон», Германия) с помощью программно-аппаратного комплекса МЕКОС-ФДММ («МЕКОС», Москва, Россия).

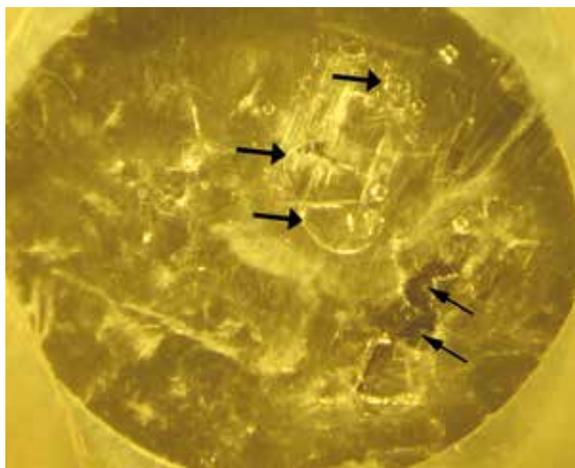
Гистологическое исследование образцов. Проведено сравнительное морфологическое и морфометрическое исследование методом полутоновых срезов образцов капсулы нормального хрусталика, а также образцов с различными формами помутнений после экстракции катаракты.

Для сравнения приведен рисунок (рис. 1) с интактным образцом неизменной здоровой задней капсулы хрусталика человека.

На рис. 2 и 3 даны морфологические варианты «мягких» (рыхлых) пленок вторичных катаракт. Псевдорегенераторная, или пролиферативная, форма представлена многослойным напластованием гипертрофированных клеточных компонентов на поверхности капсулы хрусталика (см. рис. 2). Изменения капсулы хрусталика при гиалоподобной форме имеют вид отечной рыхлой бесструктурной ткани без четких границ с наличием в ней микрощелевидных пространств и разволокнений, что придает им внешнее сходство со стекловидным телом (см. рис. 3). Для «твердых», так называемых фиброзных пленок вторичных катаракт характерны процессы фиброплазии с образованием неравномерной по толщине бесклеточной соединительной ткани



**Рис. 7.** Макропрепарат изолированного образца капсулы хрусталика с помутнениями («твердая» форма) после лазерного воздействия. Стрелками указаны участки сквозных микроперфораций. Потемнения вокруг этих участков соответствуют зонам несквозного разрежения ткани капсулы



**Рис. 8.** Макропрепарат изолированного образца капсулы хрусталика с помутнениями («мягкая» форма) после лазерного воздействия. Крупные, неправильной формы дефекты отмечены заостренными стрелками (они находятся в правой нижней четверти препарата). Разноразмерные пузырьки воздуха отмечены тупыми стрелками (они находятся в верхней половине препарата)

на внутренней поверхности капсулы хрусталика (рис. 4).

Морфометрия показала, что характерный размер заметных неоднородностей структуры пленок вторичных катаракт – порядка микрона.

Лазерное воздействие на пленки задней капсулы хрусталика

Внешний вид изолированных образцов «мягкой» и «твердой» пленок вторичных катаракт изображен на рис. 5 и 6.

Результаты лазерного воздействия на препараты «твердой» и «мягкой» форм катаракты представлены на рис. 7 и 8. При лазерной деструкции твердых образцов капсулы наблюдаются точечные сквозные микроперфорации с радиальными лучами по краю дефектов на фоне темной зоны несквозного разрежения задней капсулы. Вокруг зоны абляции имеется кольцеобразная зона модифицированной ткани (потемневшие участки) – это участки несквозного разрежения ткани капсулы, достигающие 100–200 микрон от края

микроперфорации (см. рис. 7). Для картины лазерных разрушений в мягких образцах капсулы характерно наличие крупных дефектов неправильной формы и присутствие пузырьков воздуха в зоне воздействия (см. рис. 8).

Теоретическая модель

Процессы, протекающие в сплошной среде при действии на нее импульсного лазерного излучения, могут быть описаны уравнениями движения среды в форме Эйлера или Лагранжа [15]. Форма Лагранжа более предпочтительна, так как позволяет описывать движение многослойных сред, свойства которых меняются при переходе через поверхности раздела. Именно таким представлением мы будем руководствоваться ниже.

Запишем уравнения Лагранжа для трехмерного движения сплошной среды [16]. Уравнение непрерывности в переменных Лагранжа имеет вид:

$$V = V_0 \Delta, \quad (1)$$

где  $\Delta = \frac{\partial(x_e, y_e, z_e)}{\partial(x_1, y_1, z_1)}$  – якобиан перехода от эйлеровых

координат  $(x_e, y_e, z_e)$  к лагранжевым координатам  $(x_1, y_1, z_1)$ ;  $V_0 = 1/\rho_0$ ,  $V = 1/\rho$  – начальный и текущий удельные объемы. В явном виде уравнение непрерывности записывается следующим образом:

$$V = V_0 \left[ \frac{\partial x_e}{\partial x_1} \left( \frac{\partial y_e}{\partial y_1} \frac{\partial z_e}{\partial z_1} - \frac{\partial y_e}{\partial z_1} \frac{\partial z_e}{\partial y_1} \right) - \frac{\partial y_e}{\partial x_1} \left( \frac{\partial x_e}{\partial y_1} \frac{\partial z_e}{\partial z_1} - \frac{\partial x_e}{\partial z_1} \frac{\partial z_e}{\partial y_1} \right) + \frac{\partial z_e}{\partial x_1} \left( \frac{\partial x_e}{\partial y_1} \frac{\partial y_e}{\partial z_1} - \frac{\partial x_e}{\partial z_1} \frac{\partial y_e}{\partial y_1} \right) \right]. \quad (2)$$

Уравнения движения в форме Лагранжа имеют вид:

$$\left( X - \frac{\partial^2 x_e}{\partial t^2} \right) \frac{\partial x_e}{\partial x_1} + \left( Y - \frac{\partial^2 y_e}{\partial t^2} \right) \frac{\partial y_e}{\partial x_1} + \left( Z - \frac{\partial^2 z_e}{\partial t^2} \right) \frac{\partial z_e}{\partial x_1} = \frac{1}{\rho} \frac{\partial P}{\partial x_1}; \quad (3)$$

$$\left( X - \frac{\partial^2 x_e}{\partial t^2} \right) \frac{\partial x_e}{\partial y_1} + \left( Y - \frac{\partial^2 y_e}{\partial t^2} \right) \frac{\partial y_e}{\partial y_1} + \left( Z - \frac{\partial^2 z_e}{\partial t^2} \right) \frac{\partial z_e}{\partial y_1} = \frac{1}{\rho} \frac{\partial P}{\partial y_1}; \quad (4)$$

$$\left( X - \frac{\partial^2 x_e}{\partial t^2} \right) \frac{\partial x_e}{\partial z_1} + \left( Y - \frac{\partial^2 y_e}{\partial t^2} \right) \frac{\partial y_e}{\partial z_1} + \left( Z - \frac{\partial^2 z_e}{\partial t^2} \right) \frac{\partial z_e}{\partial z_1} = \frac{1}{\rho} \frac{\partial P}{\partial z_1}, \quad (5)$$

$\vec{F} = \vec{X}i + \vec{Y}j + \vec{Z}k$  – вектор силы, отнесенный к единице массы (в дальнейшем полагается равной нулю, то есть  $X = Y = Z = 0$ ).

С учетом явного вида уравнений изменения эйлеровых координат:

$$u_{x_e} = \frac{\partial x_e}{\partial t}, \quad u_{y_e} = \frac{\partial y_e}{\partial t}, \quad u_{z_e} = \frac{\partial z_e}{\partial t} \quad (6)$$



система (3) – (5) запишется в виде:

$$\frac{\partial u_{x_e}}{\partial t} \frac{\partial x_e}{\partial x_1} + \frac{\partial u_{y_e}}{\partial t} \frac{\partial y_e}{\partial x_1} + \frac{\partial u_{z_e}}{\partial t} \frac{\partial z_e}{\partial x_1} = -\frac{1}{\rho} \frac{\partial P}{\partial x_1}, \quad (7)$$

$$\frac{\partial u_{x_e}}{\partial t} \frac{\partial x_e}{\partial y_1} + \frac{\partial u_{y_e}}{\partial t} \frac{\partial y_e}{\partial y_1} + \frac{\partial u_{z_e}}{\partial t} \frac{\partial z_e}{\partial y_1} = -\frac{1}{\rho} \frac{\partial P}{\partial y_1}, \quad (8)$$

$$\frac{\partial u_{x_e}}{\partial t} \frac{\partial x_e}{\partial z_1} + \frac{\partial u_{y_e}}{\partial t} \frac{\partial y_e}{\partial z_1} + \frac{\partial u_{z_e}}{\partial t} \frac{\partial z_e}{\partial z_1} = -\frac{1}{\rho} \frac{\partial P}{\partial z_1}. \quad (9)$$

Разрешая данную систему уравнений относительно  $\frac{\partial u_i}{\partial t}$  с учетом явного вида уравнения непрерывности (2), получаем следующую систему уравнений движения:

$$\begin{aligned} \frac{\partial u_{x_e}}{\partial t} = -V_0 \left[ \frac{\partial P}{\partial x_1} \left( \frac{\partial y_e}{\partial y_1} \frac{\partial z_e}{\partial z_1} - \frac{\partial y_e}{\partial z_1} \frac{\partial z_e}{\partial y_1} \right) - \frac{\partial y_e}{\partial x_1} \left( \frac{\partial P}{\partial y_1} \frac{\partial z_e}{\partial z_1} - \frac{\partial P}{\partial z_1} \frac{\partial z_e}{\partial y_1} \right) + \right. \\ \left. + \frac{\partial z_e}{\partial x_1} \left( \frac{\partial P}{\partial y_1} \frac{\partial y_e}{\partial z_1} - \frac{\partial P}{\partial z_1} \frac{\partial y_e}{\partial y_1} \right) \right], \quad (10) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial u_{y_e}}{\partial t} = -V_0 \left[ \frac{\partial x_e}{\partial x_1} \left( \frac{\partial P}{\partial y_1} \frac{\partial z_e}{\partial z_1} - \frac{\partial P}{\partial z_1} \frac{\partial z_e}{\partial y_1} \right) - \frac{\partial P}{\partial x_1} \left( \frac{\partial x_e}{\partial y_1} \frac{\partial z_e}{\partial z_1} - \frac{\partial x_e}{\partial z_1} \frac{\partial z_e}{\partial y_1} \right) + \right. \\ \left. + \frac{\partial z_e}{\partial x_1} \left( \frac{\partial x_e}{\partial y_1} \frac{\partial P}{\partial z_1} - \frac{\partial x_e}{\partial z_1} \frac{\partial P}{\partial y_1} \right) \right], \quad (11) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial u_{z_e}}{\partial t} = -V_0 \left[ \frac{\partial x_e}{\partial x_1} \left( \frac{\partial y_e}{\partial y_1} \frac{\partial P}{\partial z_1} - \frac{\partial y_e}{\partial z_1} \frac{\partial P}{\partial y_1} \right) - \frac{\partial y_e}{\partial x_1} \left( \frac{\partial x_e}{\partial y_1} \frac{\partial P}{\partial z_1} - \frac{\partial x_e}{\partial z_1} \frac{\partial P}{\partial y_1} \right) + \right. \\ \left. + \frac{\partial P}{\partial x_1} \left( \frac{\partial x_e}{\partial y_1} \frac{\partial y_e}{\partial z_1} - \frac{\partial x_e}{\partial z_1} \frac{\partial y_e}{\partial y_1} \right) \right]. \quad (12) \end{aligned}$$

Имея в виду, что динамические нагрузки в задачах рассмотренного вида не превышают десятков и сотен бар, мы будем пользоваться для аппроксимации уравнения состояния уравнением Ми – Грюнайзена [17] в его двучленном виде:

$$P = P_X + P_T = \rho_0 u_0^2 \left( 1 - \frac{V}{V_0} \right) + \Gamma \frac{C_V (T - T_0)}{V}, \quad (13)$$

где  $P_T$  – тепловая и  $P_X$  – холодная компоненты давления  $P$ ,  $\Gamma = \frac{u_0^2 \beta}{C_V}$  – коэффициент Грюнайзена,  $\beta$  – коэффициент объемного расширения,  $C_V$  – теплоемкость,  $u_0$  – скорость звука в среде.

Изменение температуры среды находится из решения уравнения теплопроводности:

$$\rho C_V \frac{\partial T}{\partial t} = k_T \left( \frac{\partial^2 T}{\partial x_e^2} + \frac{\partial^2 T}{\partial y_e^2} + \frac{\partial^2 T}{\partial z_e^2} \right) + Q_S. \quad (14)$$

Величина  $Q_S$  в уравнении (14) определяется источником энерговыделения:  $Q_S = I(x_e, y_e, z_e, t) \kappa$ , где  $I(t, x_e, y_e, z_e) = I_0 f_t(t) f_{xyz}(x_e, y_e, z_e)$  – интенсивность светового пучка в момент  $t$  в точке пространства с координатой  $(x_e, y_e, z_e)$ ,  $\kappa$  – коэффициент поглощения среды; степенно-экспоненциальная функция  $f_t(t) = (t/\tau_p) \exp[-t/\tau_p]$ , где  $\tau_p$  – длительность лазерного импульса.

Совместное решение системы уравнений (1) – (14) позволяет рассчитать пространственно-временные зависимости давления, температуры, плотности и скорости движения, оценить вклад теплового и акустического механизмов в изменение физических параметров сплошной среды. Численное моделирование системы (1) – (13) проводилось с использованием адаптированной на многомерный вариант методики конечно-разностной аппроксимации уравнений движения и уравнения состояния, изложенной R.D. Richtmayer и K.W. Morton [18] для одномерной задачи, уравнение теплопроводности (14) решалось по трехслойной явной схеме [19].

Для определения функции распределения интенсивности гауссова светового пучка в одно- временно поглощающей и рассеивающей среде (в пленке вторичной катаракты) использовался следующий закон ослабления светового пучка, учитывающий изменение его амплитуды и пространственной формы [20]:

$$I(x_e, y_e, z_e) = I_0 \exp \left[ -\frac{y_e^2 + z_e^2}{r_0^2(x)} \right] \exp [-(k_{abs} + k_{scat})x], \quad (15)$$

где  $k_{abs}$  и  $k_{scat}$  – коэффициенты поглощения и рассеяния соответственно; радиус светового пучка изменяется по мере проникновения в среду по закону:  $r_0^2(x) = r_0^2(x=0) \exp[k_{scat}x]$ , экспоненциально расширяясь вследствие рассеяния и сохраняя гауссову форму в поперечном сечении. С использованием выражения (15) функция энерговыделения  $Q_S$  в уравнении (14) имеет вид:

$$\begin{aligned} Q_S(t, x_e, y_e, z_e) = \\ = I_0 (t/\tau_p) \exp[-t/\tau_p] \exp \left[ -\frac{y_e^2 + z_e^2}{r_0^2(x)} \right] \exp [-(k_{abs} + k_{scat})x]. \quad (16) \end{aligned}$$

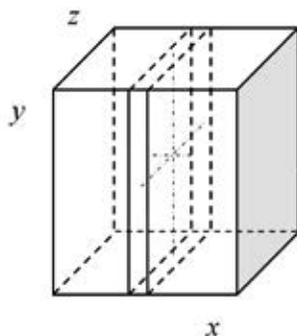
Численный эксперимент

Для определения допустимых режимов лазерного воздействия и возможной минимизации побочных эффектов рассматривались возникающие температурные поля и давления, а также

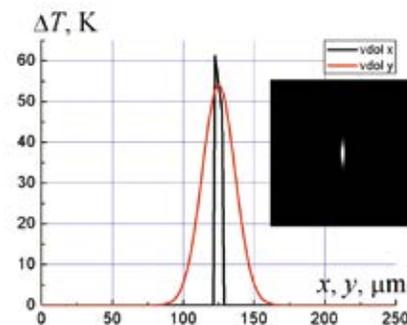


флуктуации плотности, приводящие к разрушению биологических пленок при лазерном воздействии короткими импульсами.

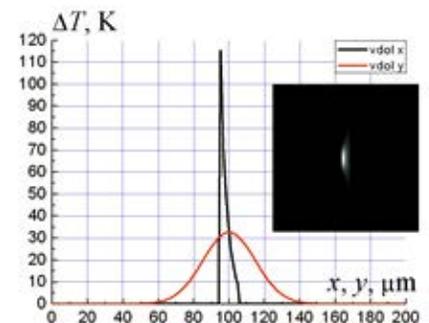
Предположения для численного эксперимента: полагаем, что катаракта в исходном состоянии характеризуется достаточно крупномасштабными неоднородностями, позволяющими предположить, что лазерный пучок почти не искажается и остается направленным (тогда как для предельно малых включений, к примеру, при вторичной катаракте, стремится к сферической форме, по Релею). Данное предположение было подтверждено гистологическими исследованиями, проведенными в данной работе (см. пункт «Гистологическое исследование»). Энергия лазерного импульса равна 2 мДж, длительность одиночного лазерного импульса – 8 нс, коэффициент поглощения –  $1 \text{ см}^{-1}$ . Расчетная область включает в себя две стеклянные поверхности, расположенные перпендикулярно оси  $x$ , и зажатую между ними пленку вторичной катаракты. Лазерное облучение производится слева направо вдоль оси  $x$ . Сечения трехмерной области, вдоль которых рисуются зависимости, представлены на рис. 9. Для теоретического моделирования оптические характеристики рассматриваемых тканей были определены в наших ранних исследованиях [14] методом Монте-Карло на основе измерений трех оптических сигналов с помощью интегрирующей сферы, спектроскопии комбинационного рассеяния, измерения интенсивности рассеяния (вперед и назад) лазерного излучения различных длин волн при использовании оптоволоконной системы с теоретическими методами решения нелинейных задач теории теплопроводности, термоупругости и акустики.



**Рис. 9.** Геометрия расчетной области. Штрих-пунктиром, проходящим через центр рассматриваемой области, намечены сечения, вдоль которых рисуются зависимости



**А**



**Б**

**Рис. 10.** Геометрия области нагрева (в момент времени  $t = 60 \text{ с}$ ) для случаев тонкой плотной пленки (**А**) и толстой пористой пленки (**Б**)

Рассматриваются два случая:

(А) «Твердая» форма – случай тонкой плотной пленки: толщина пленки (помутневшей задней капсулы хрусталика) составляет 5 мкм для плотной пленки. Расчетная область  $250 \times 250 \times 250 \text{ мкм}$ , толщина пленки 5 мкм, коэффициент рассеяния  $500 \text{ см}^{-1}$ , радиус лазерного пучка 15 мкм.

(Б) «Мягкая» форма – случай более толстой пористой пленки: толщина пленки 10 мкм для рыхлой (пористой) пленки с большим коэффициентом рассеяния. При многоимпульсном облучении плотной пленки она становится рыхлой и менее прозрачной из-за увеличения коэффициента рассеяния [14]. Расчетная область  $200 \times 200 \times 200 \text{ мкм}$ , толщина пленки 10 мкм, коэффициент рассеяния  $2500 \text{ см}^{-1}$ , радиус лазерного пучка 10 мкм.

На рис. 10 изображена геометрия области нагрева для двух рассматриваемых пленок. Из-за различных коэффициентов рассеяния тонкой плотной пленки и более толстой пористой пленки и из-за различных их толщин нагрев происходит по-разному, при этом присутствует существенная неоднородность нагрева для случая толстой пористой пленки вдоль и поперек оси нагрева (совпадающей с осью лазерного излучения). Это приводит к неоднородности возникающего поля давлений.

Пространственные зависимости давления, плотности и проекций скоростей в направлениях  $x$  и  $y$  в различные моменты времени для двух рассматриваемых случаев представлены на рис. 11 (случай А) и рис. 12 (случай Б). Пространственные зависимости давления, плотности и проекций скоростей в плоскости  $(x, y)$  в различные моменты времени для двух рассматриваемых случаев даны на рис. 13 (случай А) и рис. 14 (случай Б).

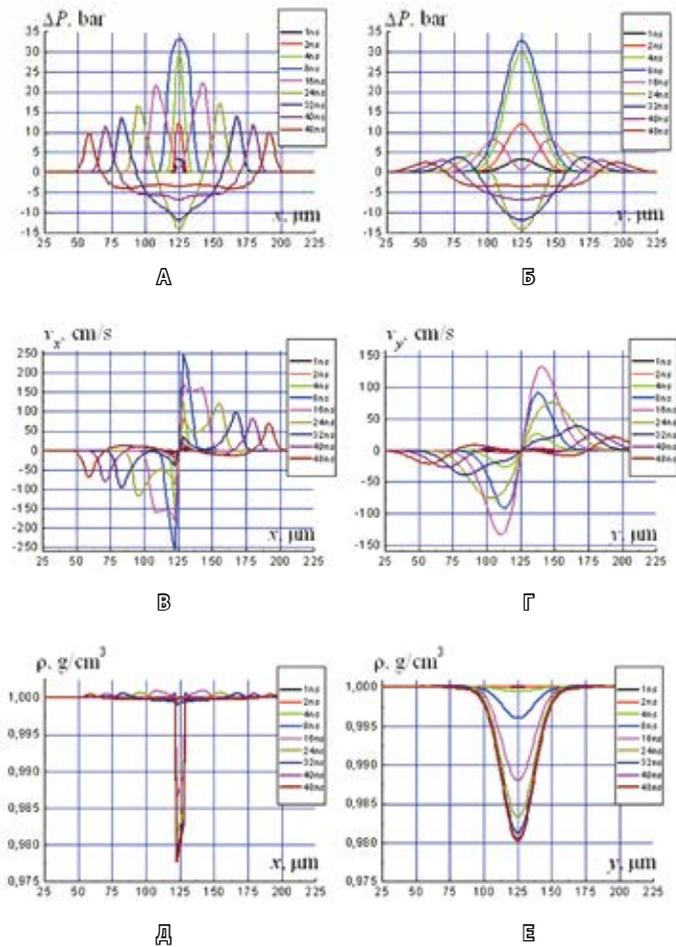


Рис. 11. Зависимости давления (А, Б), плотности (В, Г) и проекций скоростей (Д, Е) в направлениях x (А, В, Д) и y (Б, Г, Е) в различные моменты времени для случая тонкой плотной пленки

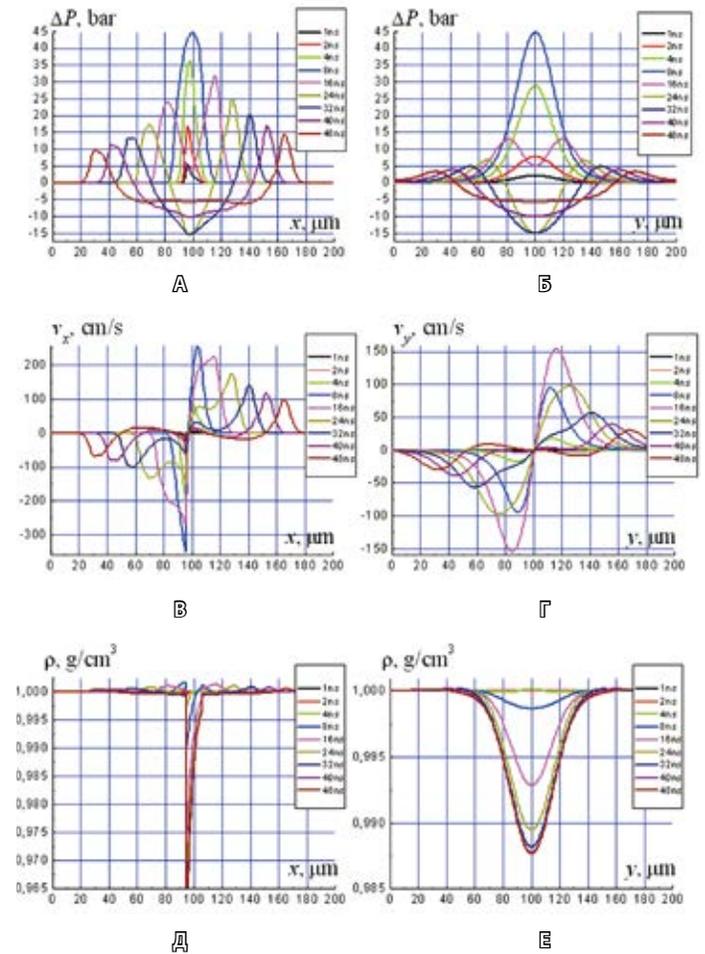


Рис. 12. Зависимости давления (А, Б), плотности (В, Г) и проекций скоростей (Д, Е) в направлениях x (А, В, Д) и y (Б, Г, Е) в различные моменты времени для случая толстой пористой пленки

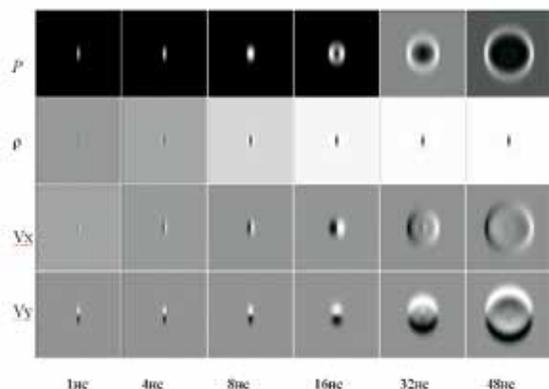
## Результаты и обсуждение

Морфометрия пленок вторичных катаракт не выявила заметных неоднородностей структуры, характерный размер заметных неоднородностей структуры пленок вторичных катаракт – порядка микрона (см. рис. 1–4). Это позволило применить рассматриваемую теоретическую модель и рассматривать модельную среду как однородную.

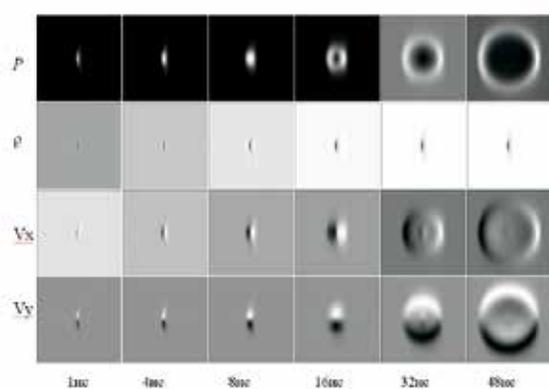
Макропрепараты изолированных образцов капсулы хрусталика с помутнениями («твердая» форма) после лазерного воздействия (см. рис. 7) показывают наличие точечных сквозных микроперфораций, соответствующих сильному возрастанию давления и уменьшению плотности образца вдоль оси воздействия, что приводит к разрыву и подтверждается численными расчетами (см. рис. 11). Вокруг зоны абляции

видна кольцеобразная зона модифицированной ткани – участки несквозного разрезания ткани капсулы, достигающие 100–200 микронов от края микроперфорации, что также подтверждается численным моделированием. Диаметр таких микроперфораций составляет  $50 \pm 20$  микронов.

Макропрепарат изолированного образца капсулы хрусталика с помутнениями («мягкая» форма) после лазерного воздействия (см. рис. 8) дает сквозные микроперфорации неправильной формы в несколько раз больше размера, характерного для тонкой плотной пленки, за счет своего пористого строения и более сильного уменьшения плотности при большем давлении; их протяженность составляет  $160 \pm 40$  микронов. Неправильная форма дефектов говорит о неравномерном распределении термомеханических свойств из-за пористой структуры.



**Рис. 13.** Зависимости давления, плотности и проекций скоростей в плоскости  $(x, y)$  в различные моменты времени для случая тонкой плотной пленки



**Рис. 14.** Зависимости давления, плотности и проекций скоростей в плоскости  $(x, y)$  в различные моменты времени для случая толстой пористой пленки

По приведенным на рис. 11 и 12 данным можно проследить, что давление на оси пучка достигает 35 бар для случая тонкой плотной пленки (случай А) и 45 бар для случая толстой пористой пленки (случай Б). Волна распространяется быстрее для случая Б, но при этом быстрее уменьшается ее интенсивность: так, волна давления с амплитудой 10 бар уходит в сторону на 60 мкм для случая А, тогда как для случая Б волна с амплитудой 5 бар уходит на 75 мкм. Это подтверждают графики скорости в направлениях  $x$  и  $y$  в различные моменты для двух рассматриваемых случаев. Изменения плотности при этом сильнее для случая А по сравнению со случаем Б.

Такое поведение подтверждается экспериментальными данными, которые показывают, что вокруг сквозного отверстия в пленке на расстоянии 50–100 мкм от его края имеются несквозные («рваные») повреждения.

С ростом рассеяния давление уменьшается, но качественно картина не меняется. Для случая А давление падает до 10 бар за время 48 нс, и расстояние, на которое распространяется волна давления за это время, составляет 60 мкм. Для

случая Б давление падает до 10 бар за время 16 нс, и расстояние, на которое распространяется волна давления за это время, составляет всего 20 мкм.

Из проведенных исследований (см. рис. 11 и 12) видно, что уровни значений давления в отрицательной фазе распространяются на большие расстояния с достаточно слабым затуханием. При этом «отрицательное давление» может приводить к существенным повреждениям на расстоянии в несколько миллиметров от края лазерного пятна. Особенно это выражено для тонкой плотной пленки. Этим же выводам соответствует и экспериментальное исследование результатов лазерной деструкции твердых образцов капсулы аутопсийных глаз человека (случай А), указывающих на наличие точечных сквозных микроперфораций с радиальными лучами по краю дефектов на фоне темной зоны несквозного разрезания задней капсулы (см. рис. 7), в то время как для картины лазерных разрушений в мягких образцах капсулы (случай Б) характерно наличие крупных дефектов неправильной формы и присутствие пузырьков воздуха в зоне воздействия (см. рис. 8).

Исследование толстой пористой пленки (случай Б – «мягкой формы» катарактальной пленки) [14] показало наличие большого числа исходных дефектов структуры, так что значение эффективного коэффициента рассеяния для численного моделирования было положено в 5 раз больше, чем для тонкой плотной пленки (случай А – «твердой формы» вторичной катаракты).

Для «твердой» пленки эффективный коэффициент рассеяния изначально меньше, но с ростом числа импульсов он линейно увеличивается и достигает уровня, характерного для мягких пленок из-за возникновения дополнительных рассеивающих центров. Это подтверждается и тем, что общая пороговая энергия разрушения (энергия импульса, умноженная на число импульсов) для «твердой» пленки в несколько раз больше, чем для «мягкой» пленки.

## Заключение

Уровни значений давления в отрицательной фазе распространяются на достаточно большие расстояния с достаточно слабым затуханием. При этом существующее «отрицательное давление» может приводить к существенным повреждениям на расстоянии в несколько миллиметров от края лазерного пятна.

Вокруг сквозного отверстия в тонкой плотной пленке вторичной катаракты, так называемой твердой формы, на расстоянии 50–100 мкм от края лазерных микроперфораций имеются несквозные



(«рваные») повреждения, и с ростом рассеяния (переход к случаю более толстой пористой пленки вторичной катаракты, так называемой мягкой форме) давление уменьшается, но качественно картина не меняется. Для «твердой» пленки вторичной катаракты эффективный коэффициент рассеяния изначально меньше, но с ростом числа импульсов он линейно увеличивается и достигает уровня, характерного для «мягких» пленок вторичной катаракты из-за возникновения дополнительных рассеивающих центров.

#### Финансирование

Ряд этапов данной работы выполнен при поддержке грантов РФФИ № 14-02-90005 Бел\_а, РФФИ № 15-29-04810 офи\_м, РФФИ № 15-29-03811 офи\_м, БРФФИ Ф14Р-016.

Проведенное исследование позволяет оптимизировать технологию лазерного лечения вторичных катаракт, меняя параметры облучения (плотность мощности) в процессе воздействия. Показано, что с целью увеличения безопасности лазерной процедуры целесообразно при воздействии на «мягкую» пленку вторичной катаракты уменьшать энергию лазерных импульсов и их количество по сравнению с режимом, применяемым для воздействия на «твердую» пленку вторичной катаракты. ©

## Литература

1. Краснов ММ. Лазерная микрохирургия глаза. Вестник офтальмологии. 1973;(1): 3–11.
2. Aron-Rosa D, Aron JJ, Griesemann M, Thyzel R. Use of the neodymium-YAG laser to open the posterior capsule after lens implant surgery: a preliminary report. J Am Intraocul Implant Soc. 1980;6(4):352–4.
3. Гамидов АА, Большунов АВ. Современные технологии лазерной хирургии зрочковых мембран при артрафакии. Вестник офтальмологии. 2007;(6):46–51.
4. Khanzada MA, Jatoi SM, Narsani AK, Dabir SA, Gul S. Is the Nd:YAG laser a safe procedure for posterior capsulotomy? Pak J Ophthalmol. 2008;24(2):73–8.
5. Steinert RF, Puliafito CA, Kumar SR, Dudak SD, Patel S. Cystoid macular edema, retinal detachment, and glaucoma after Nd:YAG laser posterior capsulotomy. Am J Ophthalmol. 1991;112(4):373–80.
6. Гамидов АА, Сосновский ВВ, Боев ВИ, Бузыкканова МА. Изучение факторов риска повреждения ИОЛ лазерным излучением. Вестник офтальмологии. 2006;(5):28–31.
7. Иванов АН. Результаты неодимового ИАГ-лазерного воздействия при выраженной экссудативной реакции после имплантации интраокулярной линзы. Вестник офтальмологии. 2002;(3):13–5.
8. Желтов ГИ. Проблемы безопасности при работе с лазерами. В: Большунов АВ, ред. Вопросы лазерной офтальмологии. М.: Апрель; 2013. с. 15–31.
9. Гамидов АА, Большунов АВ. Лазерная микрохирургия пленчатых мембран в области иридо-хрусталиковой диафрагмы. В: Большунов АВ, ред. Вопросы лазерной офтальмологии. М.: Апрель; 2013. с. 106–30.
10. Birngruber R, Hillenkamp F, Gabel VP. Theoretical investigations of laser thermal retinal injury. Health Phys. 1985;48(6):781–96.
11. Chofflet J, Amar JP, Deidier D. Retrospective study of complications of 329 YAG laser capsulotomies. Fortschr Ophthalmol. 1991;88(6):806–8.
12. Fankhauser F, Kwasniewska S. Laser in ophthalmology. Basic, diagnostic and surgical aspects. Hague: Kugler Publications; 2003. 450 p.
13. Katzen LE, Fleischman JA, Trokel SL. The YAG laser: an American experience. J Am Intraocul Implant Soc. 1983;9(2):151–6.
14. Gamidov AA, Bolshunov AV, Yuzhakov AV, Shcherbakov EM, Baum OI, Sobol EN. Optical transmission and laser ablation of pathologically changed eye lens capsule. Quantum Electronics. 2015;45(2):180–4. doi: http://dx.doi.org/10.1070/QE2015v045n02ABEH015641.
15. Зельдович ЯБ, Райзер ЮП. Физика ударных волн и высокотемпературных гидродинамических явлений. М.: Наука; 1966. 688 с.
16. Кочин НЕ, Кибель ИА, Розе НВ. Теоретическая гидромеханика. Ч. I. М.: Физматгиз; 1963. 584 с.
17. Канель ГИ, Разоренов СВ, Уткин АВ, Фортвов ВЕ. Ударно-волновые явления в конденсированных средах. М.: Янус-К; 1996. 408 с.
18. Richtmayer RD, Morton KW. Difference methods for initial-value problems. New York: Interscience Publishers / John Wiley and Sons; 1967. 405 p.
19. Саульев ВК. Интегрирование уравнений параболического типа методом сеток. М.: Физматлит; 1960. 324 с.
20. Welch AJ. The thermal response of laser irradiated tissue. IEEE Journal of Quantum Electronics. 1984;QE-20(12):1471–81.

## References

1. Krasnov MM. Lazernaya mikrokhirurgiya glaza [Laser microsurgery of the eye]. Vestnik oftal'mologii. 1973;(1):3–11 (in Russian).
2. Aron-Rosa D, Aron JJ, Griesemann M, Thyzel R. Use of the neodymium-YAG laser to open the posterior capsule after lens implant surgery: a preliminary report. J Am Intraocul Implant Soc. 1980;6(4):352–4.
3. Gamidov AA, Bol'shunov AV. Sovremennye tekhnologii lazernoy khirurgii zrachkovykh membran pri artifakii [Current technologies of laser surgery of papillary membranes in pseudophakia]. Vestnik oftal'mologii. 2007;(6):46–51 (in Russian).
4. Khanzada MA, Jatoi SM, Narsani AK, Dabir SA, Gul S. Is the Nd:YAG laser a safe procedure for posterior capsulotomy? Pak J Ophthalmol. 2008;24(2):73–8.
5. Steinert RF, Puliafito CA, Kumar SR, Dudak SD, Patel S. Cystoid macular edema, retinal detachment, and glaucoma after Nd:YAG laser posterior capsulotomy. Am J Ophthalmol. 1991;112(4):373–80.
6. Gamidov AA, Sosnovskiy VV, Boev VI, Buzykanova MA. Izuchenie faktorov riska povrezhdeniya IOL lazernym izlucheniem [Study of risk factors of laser irradiation-induced intraocular lens damage]. Vestnik oftal'mologii. 2006;(5):28–31 (in Russian).
7. Ivanov AN. Rezul'taty neodimievogo IAG-lazernogo vozdeystviya pri vyrazhennoy ekssudativnoy reaktsii posle implantatsii intraokulyarnoy linzy [The results of neodim/YAG-laser treatment in advanced exudative reaction after intraocular lens implantation]. Vestnik oftal'mologii. 2002;(3):13–5 (in Russian).
8. Zheltov GI. Problemy bezopasnosti pri rabote s lazerami [Safety issues while working with lasers]. In: Bol'shunov AV, editor. Voprosy lazernoy oftal'mologii [Issues of laser ophthalmology]. Moscow: April; 2013. p. 15–31 (in Russian).



9. Gamidov AA, Bol'shunov AV. Lazernaya mikrokhirurgiya plenchatykh membran v oblasti irido-khristalikovoy diafragmy [Laser microsurgery of fibrous membranes in the iris-lens diaphragm area]. In: Bol'shunov AV, editor. Voprosy lazernoy oftal'mologii [Issues of laser ophthalmology]. Moscow: Aprel'; 2013. p. 106–30 (in Russian).
10. Birngruber R, Hillenkamp F, Gabel VP. Theoretical investigations of laser thermal retinal injury. *Health Phys.* 1985;48(6):781–96.
11. Chofflet J, Amar JP, Deidier D. Retrospective study of complications of 329 YAG laser capsulotomies. *Fortschr Ophthalmol.* 1991;88(6):806–8.
12. Fankhauser F, Kwasniewska S. Laser in ophthalmology. Basic, diagnostic and surgical aspects. Hague: Kugler Publications; 2003. 450 p.
13. Katzen LE, Fleischman JA, Trokel SL. The YAG laser: an American experience. *J Am Intraocul Implant Soc.* 1983;9(2):151–6.
14. Gamidov AA, Bolshunov AV, Yuzhakov AV, Shcherbakov EM, Baum OI, Sobol EN. Optical transmission and laser ablation of pathologically changed eye lens capsule. *Quantum Electronics.* 2015;45(2):180–4. doi: <http://dx.doi.org/10.1070/QE2015v045n02ABEH015641>.
15. Zel'dovich YaB, Rayzer YuP. Fizika udarnykh voln i vysokotemperaturnykh gidrodinamicheskikh yavleniy [The physics of the shock waves and high temperature hydrodynamic phenomena]. Moscow: Nauka; 1966. 688 p. (in Russian).
16. Kochin NE, Kibel' IA, Roze NV. Teoreticheskaya gidromekhanika [Theoretical hydromechanics]. Pt. I. Moscow: Fizmatgiz; 1963. 584 p. (in Russian).
17. Kanel' GI, Razorenov SV, Utkin AV, Fortov VE. Udarno-volnovye yavleniya v kondensirovannykh sredakh [Shock-wave phenomena in condensed media]. Moscow: Yanus-K; 1996. 408 p. (in Russian).
18. Richtmyer RD, Morton KW. Difference methods for initial-value problems. New York: Interscience Publishers / John Wiley and Sons; 1967. 405 p.
19. Saul'ev VK. Integrirovaniye uravneniy parabolicheskogo tipa metodom setok [Integrating of parabolic type equations by a grid method]. Moscow: Fizmatlit; 1960. 324 p. (in Russian).
20. Welch AJ. The thermal response of laser irradiated tissue. *IEEE Journal of Quantum Electronics.* 1984;QE-20(12):1471–81.

## Optimization of laser surgery of the secondary cataract

Baum O.I.<sup>1</sup> • Romanov O.G.<sup>2</sup> • Gamidov A.A.<sup>3</sup> • Fedorov A.A.<sup>3</sup> • Romanov G.S.<sup>4</sup> • Zheltov G.I.<sup>5</sup> • Sobol E.N.<sup>1</sup>

**Background:** This is a theoretical and experimental study of the thermomechanical effects of laser radiation with a wavelength of 1.06 microns on the eye tissues during a laser surgery on the secondary cataract (pupillary membrane). Its relevance is related to the rates of complications after laser surgery of the eye associated with the choice of energy and time parameters of the laser irradiation. These parameters are related to the occurrence of such factors as unstable fields of thermal stress and pressure that are difficult to take into account and indirectly lead to adverse events when removing the secondary cataract. **Aim:** To minimize side effects and to optimize the existing technology of laser removal of the secondary cataract. **Materials and methods:** Samples of a normal lens capsule and of lens capsules with various types of opacities taken during a cataract surgery, with various optic characteristics and thickness, were treated with an infrared laser (Nd:YAG laser, 1064 nm). We

performed morphometric measurements and built up a theoretical model of the processes in a continuous medium under the effects of impulse laser irradiation. **Results:** The results of numerical modelling with this newly developed theoretical model are in satisfactory agreement with the experimental data on development of deformities obtained with the autopsy materials (posterior capsule of the human lens with various optical characteristics and thickness, from thin transparent membranes to more thick opaque samples). **Conclusion:** This study would allow for optimization of the technology of laser treatment for secondary cataracts by changing the irradiation parameters during the procedure.

**Key words:** laser, secondary cataract, theoretical model, thermal stress

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-130-139

**Baum Ol'ga I.** – PhD (in Physics and Mathematics), Senior Research Fellow, Advanced Laser Technologies Department<sup>1</sup>

✉ 2 Pionerskaya ul., Troitsk, Moscow, 142190, Russian Federation. Tel.: +7 (916) 542 92 02. E-mail: baumolga@gmail.com

**Romanov Oleg G.** – PhD (in Physics and Mathematics), Associate Professor, Head of Chair of Computer Modelling<sup>2</sup>

**Gamidov Alibek A.** – MD, PhD, Senior Research Fellow, Laboratory of New Laser Technologies<sup>3</sup>

**Fedorov Anatoliy A.** – MD, PhD, Leading Research Fellow<sup>3</sup>

**Romanov Gennadiy S.** – PhD (in Physics and Mathematics), Senior Research Fellow<sup>4</sup>

**Zheltov Georgiy I.** – PhD (in Physics and Mathematics), Professor, Principal Research Fellow<sup>5</sup>

**Sobol Emil N.** – PhD (in Physics and Mathematics), Head of Laboratory of Biophotonics<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Laser and Information Technologies of the Russian Academy of Sciences; 2 Pionerskaya ul., Troitsk, Moscow, 142092, Russian Federation

<sup>2</sup>Belarusian State University; 4 Nezavisimosti pr., Minsk, 220030, Republic of Belarus

<sup>3</sup>State Research Institute of Eye Diseases of Russian Academy of Sciences; 11 Rossolimo ul., Moscow, 119021, Russian Federation

<sup>4</sup>A.V. Luikov Heat and Mass Transfer Institute of the National Academy of Sciences of Belarus; 15 P. Brovka ul., Minsk, 220072, Republic of Belarus

<sup>5</sup>B.I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus; 68 Nezavisimosti pr., Minsk, 220072, Republic of Belarus



# Ошибки аппроксимации радиальной дозовой функции кобальтовых источников для брахитерапии полиномами 3–5-й степени

Белоусов А.В.<sup>1</sup> • Белянов А.А.<sup>2</sup> • Черняев А.П.<sup>1,2</sup>

**Белоусов Александр Витальевич** – канд. физ.-мат. наук, доцент кафедры физики ускорителей и радиационной медицины физического факультета<sup>1</sup>  
✉ 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1/2, физический факультет МГУ, Российская Федерация.  
Тел.: +7 (495) 939 49 46.  
E-mail: belousovav@physics.msu.ru

**Белянов Александр Александрович** – мл. науч. сотр. кафедры физики ускорителей и радиационной медицины физического факультета<sup>1</sup>

**Черняев Александр Петрович** – д-р физ.-мат. наук, профессор, заведующий кафедрой физики ускорителей и радиационной медицины физического факультета<sup>1</sup>, заведующий лабораторией пучковых технологий и медицинской физики<sup>2</sup>

**Актуальность.** Качество лучевой терапии может быть гарантировано только при высокой точности определения поглощенной дозы, а следовательно, высокой точности аппроксимации радиальной дозовой функции. Полиномы 3–5-й степени обеспечивают требуемую точность, однако неопределенность их коэффициентов может приводить к существенным погрешностям. **Цель** – исследование погрешности вычисления радиальной дозовой функции кобальтового источника с учетом неопределенности коэффициентов в зависимости от степени аппроксимационного полинома. **Материал и методы.** Вычисления выполнены с помощью программного комплекса GEANT4.9.6. Геометрия и материалы источника соответствуют модели BEBIGCo0.A86. Спектральный состав источника соответствует данным NuDat 2.6. Статистическая обработка

проведена нелинейным методом наименьших квадратов. **Результаты.** Вычислены значения радиальной дозовой функции кобальтового источника для брахитерапии в заданной геометрии. Проведено сравнение точностей полиномиальных аппроксимаций степеней 3–5, а также возможных неопределенностей результатов вычислений радиальной дозовой функции. **Заключение.** Для достижения неопределенности аппроксимирующей радиальной дозовой функции в 25% и менее на радиусе 10 см оптимальным выбором при аппроксимации радиальной дозовой функции представляются полиномы 3-й степени.

**Ключевые слова:** аппроксимация, брахитерапия, кобальт, радиальная дозовая функция

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-140-147

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1, Российская Федерация

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт ядерной физики имени Д.В. Скобельцына Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1/2, Российская Федерация



Согласно протоколу рабочей группы № 43 Американской ассоциации медицинских физиков (AAPM TG 43) [1], перед введением в клиническую практику новых источников для брахитерапии необходимо определить их дозиметрические характеристики. Набор этих характеристик приведен в том же протоколе и его более поздней версии TG 43U1 [2]. Там же указывается, что эти данные должны быть получены в эксперименте, а также определены с помощью компьютерного моделирования методом Монте-Карло и опубликованы в рецензируемом журнале. Набор этих данных необходим для составления плана лечения с помощью компьютерных систем дозиметрического планирования. В частности, одним из вводимых в систему параметров является радиальная дозовая функция  $g(r)$ . Подробности определения данного параметра можно найти в протоколе AAPM TG 43 [1].

В соответствии с TG43, радиальная дозовая функция аппроксимируется полиномами 5-го порядка. При этом точность определения коэффициентов данной функции должна быть такова, чтобы погрешность аппроксимации была не хуже 2%. В большинстве работ [3–6], даже если приводятся коэффициенты аппроксимации, не указывается точность аппроксимации, а также точность определения коэффициентов аппроксимации и возможная неопределенность функции аппроксимации. Встречаются работы, в которых предлагается аппроксимировать радиальную дозовую функцию полиномами меньшего порядка [7–8]. Повышение степени полинома, как правило, увеличивает точность аппроксимации, однако при этом возрастают возможные погрешности самой аппроксимации, связанные с неопределенностью коэффициентов. Кроме того, существенно (в разы) возрастают ошибки аппроксимации вне области, для которой вычислялись кривые. В идеальном случае система планирования должна содержать набор аппроксимирующих функций, а выбор конкретной функции при составлении плана должен осуществляться медицинским физиком в соответствии с поставленной врачом задачей. Например, для менее удаленных от источника опухолей более критична точность аппроксимационной функции, а для более удаленных – уменьшение неопределенности в вычислении кривой.

Вообще в малом количестве опубликованных работ приводятся сведения о функциях аппроксимации, обычно ограничиваются табличными значениями радиальной дозовой функции.

Естественно, эти функции можно построить самим, однако это затрудняет анализ данных литературы, особенно если не полностью указаны условия компьютерного моделирования, например, размер области, в которой определялась поглощенная доза. Нет также единого стандарта по сетке, на которой определяется радиальная дозовая функция. В отчете рабочей группы AAPM по дозиметрии высокоэнергетичных источников для брахитерапии [9] рекомендовано определять поглощенную дозу на расстояниях 2,5, 5, 7,5, 10, 15 мм и с шагом 10 мм от 20 до 100 мм. При этом отмечается, что за счет быстрого спада дозы, примерно пропорционального обратному квадрату расстояния, на больших расстояниях мощность дозы клинически не значима, а в тех случаях, когда требуется ее определить, пользователя отсылает к оригиналу публикации.

Цели настоящей работы – моделирование распределения поглощенной дозы вокруг модельного источника для брахитерапии на основе  $^{60}\text{Co}$  на сетках с различным шагом; вычисление радиальной дозовой функции и параметров ее аппроксимации полиномами 3–5-й степени; определение оптимальных условий для вычисления и аппроксимации.

## Материал и методы

Для вычисления распределения поглощенной дозы вокруг источника использовался программный пакет GEANT4.9.6. Геометрия и материалы источника соответствуют модели BEBIGCo0. A86, подробные сведения можно найти в работе [8]. Источник размещался в центре водного фантома в виде куба со стороной 80 см, размеры которого достаточны для обеспечения полного рассеяния фотонов. Спектральный состав источника соответствует данным NuDat 2.6 [10]. Поглощенная энергия рассчитывалась на сетке цилиндрических элементарных объемов – вокселей<sup>1</sup> – в плоскости, перпендикулярной оси источника и проходящей через его центр. Толщина плоскости – 1 мм, ширина цилиндрического слоя – 0,1 мм. Всего смулировано  $2 \times 10^9$  первичных фотонов, в 10 независимых экспериментах, для оценки статистической погрешности. Поглощенная в вокселе доза рассчитывалась как отношение поглощенной энергии к массе вокселя.

Значения радиальной дозовой функции рассчитывались согласно [2] с учетом, что в центральной плоскости (рис. 1)  $\theta_0 = \pi/2$

$$g(r) = \frac{D(r) G_L(r_0)}{D(r_0) G_L(r)}, \quad (1)$$

<sup>1</sup> От англ. *Volume + Pixel* – Прим. ред.

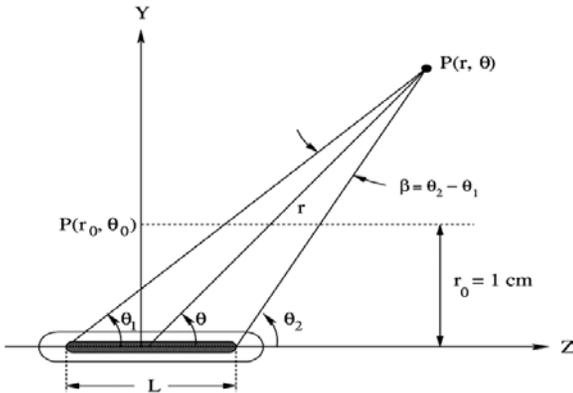


Рис. 1. Геометрия источника

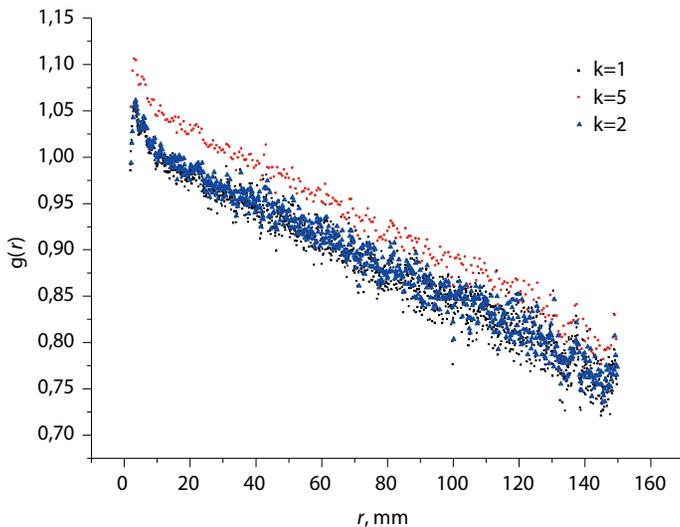


Рис. 2. Радиальная дозовая функция, рассчитанная при разных объемах вокселей

где  $D(r)$  – значение поглощенной дозы на расстоянии  $r$  от источника,  $D(r_0)$  – значение поглощенной дозы на расстоянии  $r_0 = 1$  см от источника,  $G_L(r)$  – геометрическая функция

$$G_L(r) = \frac{2 \arctg(2r/L)}{rL}, \quad (2)$$

где  $L$  – длина активной части источника.

Значения радиальной дозовой функции аппроксимировались полиномами 3-, 4- и 5-й степени методом наименьших квадратов. Для оценки качества аппроксимации использовались следующие критерии: скорректированный коэффициент множественной детерминации  $R_{adj}^2$ ; максимальное отклонение  $\max R_i$  результатов компьютерного эксперимента  $g_{exp}(r)$  от результатов аппроксимации  $g_{fit}(r)$  по всем точкам

$$R_i = \left| \frac{g_{fit}(r_i) - g_{exp}(r_i)}{g_{exp}(r_i)} \right|, \quad (3)$$

среднее значение отклонения

$$\bar{R} = \sum_{i=1}^{i=N} R_i / N, \quad (4)$$

среднеквадратичное отклонение

$$\langle R \rangle = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=N} R_i^2}{N}}, \quad (5)$$

а также

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^{i=N} (g_{fit}(r_i) - g_{exp}(r_i))^2}{N - p}. \quad (6)$$

Количество вокселей, в которых производились вычисления, равнялось 1500, а радиальная дозовая функция определялась в диапазоне от 2 до 100 мм от источника.

Использовались два подхода. В первом значении радиальной дозовой функции вычислялось во всех точках с различной толщиной области от 0,1 до 1 мм с шагом 0,1 мм путем суммирования поглощенной энергии во всех соседних вокселях. Соответствующее значение приписывалось точке посередине объединенных вокселей. Согласно второму подходу, поглощенная энергия определялась на фиксированных расстояниях от центра источника: 2,5, 5, 7,5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 и 100 мм. Ширина цилиндрического вокселя составляла 0,1, 0,2, 0,4 и 0,6 мм.

Для детального исследования роли геометрии проводились четыре типа аппроксимации: 1) без учета погрешностей; 2) с учетом статистической погрешности вычисления поглощенной дозы в каждом вокселе; 3) без учета статистической погрешности, но с учетом неопределенности положения точки, которой приписывается определяемая поглощенная доза; неопределенность составляет  $k\Delta r/2$ , где  $\Delta r = 0,1$  мм, а  $k$  – число соседних вокселей, по которым проводится усреднение; 4) с учетом погрешностей обоих видов.

Ошибки аппроксимации оценивались согласно стандартному выражению

$$\Delta g_{fit}(r) = \sqrt{\sum_k \left( \frac{\partial g_{fit}(r)}{\partial a_k} \Delta a_k \right)^2}, \quad (7)$$

где  $a_k$  – коэффициенты аппроксимации полиномом требуемой степени, а  $\Delta a_k$  – погрешности



Таблица 1. Параметры качества аппроксимации радиальной дозовой функции без учета погрешностей

Параметр	Размер вокселя, мм									
	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
$R_{adj}^2$	0,995	0,995	0,995	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996
	0,995	0,996	0,996	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997
	0,995	0,997	0,997	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998
$\max R_i, \%$	12,696	6,725	8,869	8,575	9,268	8,485	7,662	4,276	7,800	7,935
	11,828	6,904	8,646	8,363	8,356	7,802	7,806	5,089	7,097	7,494
	12,496	6,721	8,737	8,573	9,207	8,405	7,437	5,976	7,760	7,896
$\bar{R}, \%$	3,680	1,527	4,629	4,636	4,641	4,620	4,619	0,856	4,612	4,647
	3,609	1,541	4,599	4,607	4,576	4,634	4,641	0,900	4,615	4,612
	3,606	1,533	4,569	4,638	4,604	4,582	4,609	0,878	4,567	4,633
$\langle R \rangle, \%$	4,052	1,166	4,793	4,774	4,766	4,734	4,715	1,298	4,704	4,726
	3,980	1,185	4,766	4,748	4,705	4,751	4,739	1,387	4,710	4,694
	3,978	1,196	4,737	4,778	4,732	4,700	4,705	1,368	4,662	4,713
$\chi^2, \times 10^{-3}$	1,311	0,179	2,024	2,013	2,010	1,986	1,974	0,106	1,977	1,993
	1,269	0,180	2,005	1,996	1,967	2,004	1,999	0,114	1,991	1,980
	1,267	0,177	1,986	2,021	1,992	1,972	1,982	0,110	1,951	2,007

Здесь и в табл. 2–7 в каждой ячейке первое значение соответствует полиному 3-й степени, второе – 4-й и третье – 5-й

Таблица 2. Параметры качества аппроксимации радиальной дозовой функции с учетом неопределенности положения точки

Параметр	Размер вокселя, мм									
	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
$R_{adj}^2$	0,958	0,973	0,978	0,982	0,983	0,985	0,987	0,985	0,987	0,989
	0,958	0,973	0,978	0,982	0,984	0,985	0,988	0,985	0,988	0,989
	0,958	0,974	0,978	0,982	0,984	0,985	0,988	0,985	0,988	0,990
$\max R_i, \%$	9,445	6,454	5,721	4,216	4,953	3,993	3,364	4,954	3,476	3,444
	9,022	6,193	5,713	3,864	4,423	4,090	3,375	5,127	3,079	3,067
	9,450	6,516	5,482	4,192	4,962	4,461	3,491	5,432	3,826	3,664
$\bar{R}, \%$	1,405	1,120	1,004	0,918	0,872	0,795	0,753	0,777	0,718	0,672
	1,402	1,118	0,999	0,912	0,866	0,794	0,745	0,774	0,717	0,674
	1,396	1,114	0,992	0,899	0,856	0,778	0,724	0,758	0,696	0,650
$\langle R \rangle, \%$	1,858	1,459	1,312	1,191	1,133	1,082	0,986	1,098	0,962	0,903
	1,859	1,456	1,306	1,187	1,129	1,080	0,980	1,097	0,961	0,893
	1,854	1,452	1,301	1,184	1,24	1,076	0,969	1,093	0,950	0,883
$\chi^2, \times 10^{-4}$	2,487	1,581	1,382	1,158	1,054	0,976	0,802	0,872	0,790	0,689
	2,477	1,567	1,367	1,146	1,042	0,970	0,788	0,874	0,787	0,672
	2,458	1,547	1,344	1,127	1,021	0,958	0,759	0,869	0,760	0,644

**Таблица 3.** Параметры качества аппроксимации радиальной дозовой функции с учетом неопределенности поглощенной дозы

Параметр	Размер вокселя, мм									
	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
$R_{adj}^2$	0,994	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,997	0,996	0,997	0,989
	0,995	0,996	0,997	0,997	0,997	0,996	0,997	0,996	0,997	0,989
	0,996	0,997	0,997	0,998	0,998	0,997	0,998	0,997	0,998	0,989
$\max R_i, \%$	3,370	3,269	3,272	3,303	3,196	3,250	3,292	3,278	3,406	6,756
	2,822	2,716	2,704	2,747	2,648	2,769	2,693	2,854	2,876	6,721
	2,299	2,370	2,155	2,211	2,130	2,349	2,105	2,865	2,392	6,712
$\bar{R}, \%$	0,480	0,415	0,388	0,369	0,360	0,356	0,348	0,333	0,328	5,644
	0,455	0,387	0,362	0,350	0,326	0,324	0,325	0,317	0,302	5,646
	0,424	0,358	0,326	0,302	0,287	0,287	0,266	0,270	0,258	5,618
$\langle R \rangle, \%$	0,632	0,562	0,533	0,518	0,507	0,510	0,495	0,523	0,490	5,670
	0,591	0,515	0,484	0,466	0,450	0,460	0,434	0,485	0,430	5,667
	0,548	0,472	0,431	0,411	0,392	0,413	0,363	0,449	0,370	5,635
$\chi^2, \times 10^{-3}$	0,031	0,026	0,026	0,025	0,024	0,025	0,024	0,027	0,024	2,556
	0,026	0,021	0,020	0,019	0,019	0,020	0,017	0,023	0,018	2,570
	0,022	0,017	0,016	0,015	0,014	0,016	0,012	0,020	0,013	2,561

**Таблица 4.** Параметры качества аппроксимации радиальной дозовой функции с учетом неопределенности поглощенной дозы и неопределенности положения точки

Параметр	Размер вокселя, мм									
	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
$R_{adj}^2$	0,994	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,997	0,997
	0,995	0,996	0,996	0,996	0,997	0,996	0,997	0,996	0,997	0,997
	0,996	0,997	0,997	0,997	0,998	0,997	0,98	0,997	0,998	0,998
$\max R_i, \%$	3,370	3,111	3,128	3,147	3,042	3,059	3,150	3,002	3,406	2,986
	2,822	2,531	2,543	2,560	2,471	2,524	2,538	2,855	2,876	2,392
	2,299	2,631	1,984	2,002	1,942	2,511	1,957	3,456	2,392	1,841
$\bar{R}, \%$	0,480	0,424	0,400	0,382	0,369	0,370	0,361	0,356	0,328	0,338
	0,455	0,397	0,372	0,358	0,340	0,338	0,336	0,334	0,302	0,312
	0,424	0,361	0,334	0,308	0,299	0,295	0,272	0,280	0,258	0,253
$\langle R \rangle, \%$	0,632	0,566	0,539	0,521	0,509	0,514	0,499	0,528	0,490	0,494
	0,591	0,519	0,487	0,468	0,454	0,465	0,437	0,487	0,430	0,422
	0,548	0,472	0,434	0,414	0,397	0,417	0,367	0,450	0,370	0,347
$\chi^2, \times 10^{-5}$	3,100	2,578	2,595	2,472	2,400	2,473	2,345	2,694	2,356	2,347
	2,627	2,082	2,032	1,924	1,840	1,966	1,727	2,254	1,781	1,666
	2,207	1,665	1,552	1,453	1,366	1,555	1,176	1,922	1,289	1,087

**Таблица 5.** Погрешности аппроксимации полиномами 3–5-й степени на радиусе 10 см, %

Тип аппроксимации	Размер вокселя, мм									
	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
1	0,87	1,12	1,33	1,50	1,67	1,81	1,90	2,12	2,25	2,31
	3,34	4,25	4,95	5,57	6,15	6,63	6,89	7,75	8,28	8,23
	13,1	16,1	18,4	20,4	22,4	23,8	24,4	27,4	29,5	28,7
2	2,35	2,63	2,89	3,06	3,27	3,40	3,41	3,91	3,75	3,76
	9,83	11,03	12,14	12,82	13,68	14,21	14,29	16,50	15,71	15,68
	42,1	47,1	51,7	54,5	58,3	60,5	60,6	70,6	66,3	66,2
3	10,16	14,25	17,5	19,9	22,7	24,4	26,5	28,1	30,8	30,6
	42,5	59,6	73,3	83,5	95,0	102	111	117	130	129
	13,36	256	315	358	408	434	475	502	557	553
4	10,2	858	990	1149	1276	1382	1514	1623	30,3	32,3
	42,3	3624	4178	4852	5390	5816	6386	6847	126,4	136
	13,4	15606	17984	20898	23245	24953	27483	29479	540	585

**Таблица 6.** Параметры качества аппроксимации радиальной дозовой функции на фиксированном радиусе без учета погрешностей

Параметр	Размер вокселя, мм			
	0,1	0,2	0,4	0,6
$R_{adj}^2$	0,976	0,994	0,995	0,985
	0,988	0,997	0,997	0,994
	0,995	0,997	0,998	0,994
$\max R_i, \%$	2,047	0,744	0,745	16,70
	1,116	0,575	0,784	13,91
	0,813	0,546	0,269	13,18
$\bar{R}, \%$	0,837	0,384	0,383	2,399
	0,586	0,243	0,286	1,964
	0,331	0,226	0,120	1,982
$\langle R \rangle, \%$	1,010	0,434	0,430	5,183
	0,669	0,300	0,341	4,323
	0,426	0,276	0,137	4,164
$\chi^2, \times 10^{-5}$	12,54	2,155	2,148	169
	5,898	1,140	1,012	129
	2,525	1,062	0,874	121

**Таблица 7.** Параметры качества аппроксимации радиальной дозовой функции на фиксированном радиусе с учетом всех погрешностей

Параметр	Размер вокселя, мм			
	0,1	0,2	0,4	0,6
$R_{adj}^2$	0,978	0,994	0,994	0,985
	0,989	0,997	0,997	0,993
	0,995	0,997	0,998	0,996
$\max R_i, \%$	1,926	0,725	0,760	16,89
	1,051	0,583	0,839	14,07
	0,768	0,534	0,382	12,96
$\bar{R}, \%$	0,837	0,387	0,381	2,38
	0,579	0,245	0,292	1,97
	0,337	0,226	0,124	1,98
$\langle R \rangle, \%$	1,015	0,433	0,430	5,25
	0,670	0,301	0,351	4,37
	0,428	0,277	0,154	4,11
$\chi^2, \times 10^{-5}$	12,67	1,690	2,148	173
	5,966	0,816	0,922	132
	2,590	0,686	0,720	131

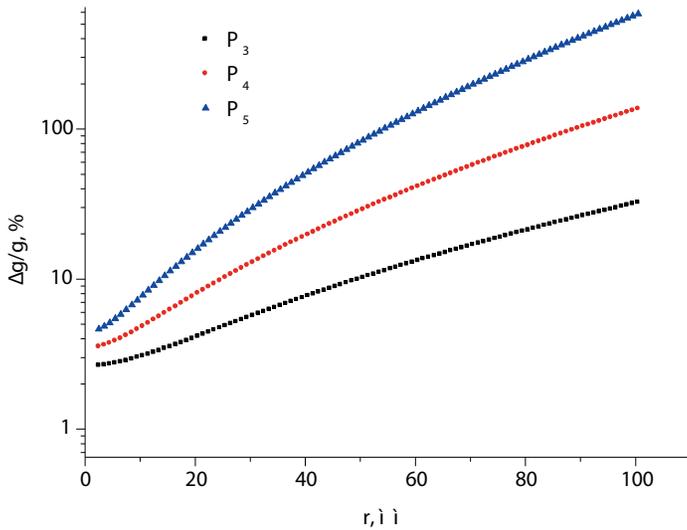
определения данных коэффициентов методом наименьших квадратов. Для удобства сравнения строятся кривые  $\Delta g_{fit} / g_{fit}$ .

## Результаты

На рис. 2 представлена зависимость радиальной дозовой функции от расстояния до центра источника при определении поглощенной дозы в слоях толщиной 0,1 мм ( $k=1$ ) и 1 мм ( $k=10$ ). Увеличение размера области интереса приводит

к существенному сглаживанию кривой, однако при этом – и к заметному искажению формы кривой на малых расстояниях.

Из сводных данных (табл. 1–4), рассчитанных по формулам (3–6) указанными выше способами и характеризующих качество аппроксимации полиномами, следует, что увеличение области, в которой определяется поглощенная доза, свыше 0,5 мм приводит к слабым изменениям качества аппроксимации полиномами 3–5-й степени. Учет



**Рис. 3.** Типичный вид погрешности аппроксимации экспериментальных данных полиномами 3–5-й степени

обоих типов погрешностей приводит к заключению о том, что погрешность определения поглощенной дозы играет большую роль, чем погрешность области определения. Увеличение степени полинома улучшает качество аппроксимации.

Вместе с тем кроме качества аппроксимации данной кривой набора экспериментальных точек важную роль играет и погрешность определения коэффициентов аппроксимации выбранными полиномами. На рис. 3. изображены типичные кривые погрешностей аппроксимации, рассчитанные по формуле (7), а в табл. 5 приведены максимальные погрешности. Ясно видно, что с точки зрения минимизации возможной погрешности аппроксимации оптимально использование полиномов 3-й степени. Кроме того, поскольку минимальная возможная ошибка аппроксимации с учетом всех видов погрешностей составляет порядка 10%, тогда как ошибка качества аппроксимации при тех же условиях – порядка 3%, оптимальным представляется разбиение на минимально возможные воксели. И это несмотря на то обстоятельство, что увеличивается статистическая погрешность определения поглощенной дозы в вокселях.

Параметры, характеризующие качество аппроксимации радиальной дозовой функции, определенной на фиксированных радиусах при различных размерах вокселя, представлены в табл. 6 и 7. Анализ данных показал: без учета погрешностей оптимальным среди рассмотренных является размер вокселя 0,2 мм при аппроксимации полиномами 3-й и 4-й степени и 0,4 мм для полиномов 5-й степени. Учет погрешностей

приводит к аналогичным выводам. Что касается оценки погрешностей аппроксимации, во всех случаях наименьшая погрешность свойственна полиномам 3-й степени при максимальном отклонении данных аппроксимации от расчетных около 2% и средних отклонениях порядка 1% и достигается при минимальном размере вокселя. Сама погрешность аппроксимации составляет около 25% на радиусе 10 см без учета аппроксимации и 140% с учетом погрешностей аппроксимации. Таким образом, погрешность аппроксимации, оцениваемая по формуле (7), оказывает решающее влияние на выбор степени полинома аппроксимации. Минимальной погрешностью аппроксимации с приемлемым качеством обладают полиномы 3-й степени. При этом качество аппроксимации по полному набору данных оптимальнее, чем по фиксированному набору радиусов. Несмотря на несколько большее максимальное отклонение кривой аппроксимации (3% против 2%), средняя ошибка меньше (0,48% против 0,86%). Авторы считают целесообразным при определении качества аппроксимации полностью указывать следующий набор данных: размер вокселя, статистическую погрешность определения поглощенной дозы во всех вокселях, условия определения коэффициентов аппроксимации (с учетом погрешностей или без), а также приводить оценки возможных погрешностей аппроксимации.

## Заключение

В настоящей работе детально исследована зависимость качества аппроксимации радиальной дозовой функции кобальтовых источников для брахитерапии, определенная по данным компьютерного эксперимента полиномами 3-й степени. Показано, что качество аппроксимации существенным образом зависит не только от статистической погрешности определения поглощенной дозы, которая в теории может быть сделана сколь угодно малой величиной, но и от размера области, в которой определяется поглощенная доза. Качество аппроксимации повышается с уменьшением размера области. Это свидетельствует о том, что выбранной статистики достаточно для определения радиальной дозовой функции. Качество аппроксимации с учетом погрешностей определения функции выше при определении по полному набору данных, а не на фиксированном радиусе.

Оптимальным выбором для аппроксимации радиальной дозовой функции представляются полиномы 3-й степени, по крайней мере в том случае,



если необходимо достичь неопределенности аппроксимирующей функции в 25% и менее на радиусе 10 см. При определении радиальной дозовой функции, рассчитанной по конкретным радиусам, целесообразно указывать в публикациях размер области. Требуется также приводить не только параметры аппроксимации, но и погрешности их определения с четким указанием всего набора

сведений, однозначно определяющих способ и условия вычисления параметров. При вычислении поглощенной дозы на системах планирования с предустановленными аппроксимирующими функциями в виде полиномов 5-й степени необходимо иметь в виду, что на расстояниях более 10 см от источника неопределенность вычисления поглощенной дозы может достигать  $10^2$ – $10^5\%$ . ©

## Литература / References

- Nath R, Anderson LL, Luxton G, Weaver KA, Williamson JF, Meigooni AS. Dosimetry of interstitial brachytherapy sources: recommendations of the AAPM Radiation Therapy Committee Task Group No. 43. American Association of Physicists in Medicine. *Med Phys.* 1995;22(2):209–34. doi: <http://dx.doi.org/10.1118/1.597458>.
- Rivard MJ, Coursey BM, DeWerd LA, Hanson WF, Huq MS, Ibbott GS, Mitch MG, Nath R, Williamson JF. Update of AAPM Task Group No. 43 Report: A revised AAPM protocol for brachytherapy dose calculations. *Med Phys.* 2004;31(3):633–74. doi: <http://dx.doi.org/10.1118/1.1646040>.
- Bahreyni Toossi MT, Ghorbani M, Mowlavi AA, Meigooni AS. Dosimetric characterizations of GZP6 (60)Co high dose rate brachytherapy sources: application of superimposition method. *Radiol Oncol.* 2012;46(2):170–8. doi: [10.2478/v10019-012-0005-3](http://dx.doi.org/10.2478/v10019-012-0005-3).
- Tabrizi SH, Asl AK, Azma Z. Monte Carlo derivation of AAPM TG-43 dosimetric parameters for GZP6 Co-60 HDR sources. *Phys Med.* 2012;28(2):153–60. doi: [10.1016/j.ejmp.2011.04.004](http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmp.2011.04.004).
- Papagiannis P, Angelopoulos A, Pantelis E, Sakelliou L, Karaiskos P, Shimizu Y. Monte Carlo dosimetry of 60Co HDR brachytherapy sources. *Med Phys.* 2003;30(4):712–21. doi: <http://dx.doi.org/10.1118/1.1563662>.
- Selvam TP, Bhola S. Technical note: EGSnrc-based dosimetric study of the BEBIG 60Co HDR brachytherapy sources. *Med Phys.* 2010;37(3):1365–70. doi: <http://dx.doi.org/10.1118/1.3326948>.
- Granero D, Pérez-Calatayud J, Ballester F. Technical note: Dosimetric study of a new Co-60 source used in brachytherapy. *Med Phys.* 2007;34(9):3485–8. doi: <http://dx.doi.org/10.1118/1.2759602>.
- Ballester F, Granero D, Pérez-Calatayud J, Casal E, Agramunt S, Cases R. Monte Carlo dosimetric study of the BEBIG Co-60 HDR source. *Phys Med Biol.* 2005;50(21):N309–16.
- High Energy Brachytherapy Source Dosimetry (HEBD) Working Group. Dose Calculation for Photon-Emitting Brachytherapy Sources with Average Energy Higher than 50 keV: Full Report of the AAPM and ESTRO. AAPM One Physics Ellipse College Park, MD 20740-3846; 2012. 229 p.
- <http://www.nndc.bnl.gov/nudat2/>

## Errors in fitting radial dose function of Cobalt sources for brachytherapy with 3-5 degree polynomials

Belousov A.V.<sup>1</sup> • Belyanov A.A.<sup>2</sup> • Chernyaev A.P.<sup>1,2</sup>

**Background:** Providing quality insurance for radiation therapy implies high level of precision for determining absorbed dose, and therefore high level of precision for fitting radial dose function. 3-5 degree polynomials provide required precision, however, uncertainty of their coefficients may cause substantial errors. **Aim:** To investigate dependence of errors of calculating radial dose function with consideration of uncertainty of coefficients from different degrees of fitting polynomial. **Materials and methods:** Calculations were performed with software package GEANT4.9.6. Geometry and materials of the source correspond to the model BEBIGCo0.A86. Spectral structure of the source corresponds to the NuDat 2.6 database.

Statistical processing was done using nonlinear least-square method. **Results:** Values of the radial dose function of Cobalt source for brachytherapy were calculated for given geometry. Conducted comparison of precisions of 3 to 5 degree polynomial approximations and possible uncertainties of results of radial dose function calculations. **Conclusion:** With required precision of 25% and higher at the radius of 10 cm the optimal choice for radial dose approximation is the 3<sup>rd</sup> degree polynomial.

**Key words:** approximation, brachytherapy, cobalt, radial dose function

doi: [10.18786/2072-0505-2016-44-2-140-147](http://dx.doi.org/10.18786/2072-0505-2016-44-2-140-147)

**Belousov Aleksandr V.** – PhD (in Physics and Mathematics), Associate Professor, Chair of Physics of Accelerators and Radiation Medicine, Faculty of Physics<sup>1</sup>

✉ Faculty of Physics MSU, 1 Leninskie gory, Moscow, 119991, Russian Federation.  
Tel.: +7 (495) 939 49 46.  
E-mail: [belousovav@physics.msu.ru](mailto:belousovav@physics.msu.ru)

**Belyanov Aleksandr A.** – Junior Research Fellow, Chair of Physics of Accelerators and Radiation Medicine, Faculty of Physics<sup>1</sup>

**Chernyaev Aleksandr P.** – PhD (in Physics and Mathematics), Professor, Head of the Chair of Physics of Accelerators and Radiation Medicine, Faculty of Physics<sup>1</sup>, Head of the Laboratory of Beam Technologies and Medical Physics<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie gory, Moscow, 119991, Russian Federation

<sup>2</sup> Skobeltsyn Institute of Nuclear Physics, Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie gory, Moscow, 119991, Russian Federation



# Возможности оптимизации клинических исходов фотодинамической терапии с использованием оптической визуализации

Гамаюнов С.В.<sup>1</sup> • Скребцова Р.Р.<sup>2</sup> • Корчагина К.С.<sup>3</sup> • Сапунов Д.А.<sup>4</sup> • Шахова М.А.<sup>5</sup> • Шахова Н.М.<sup>6</sup>

**Актуальность.** Фотодинамическая терапия (ФДТ) – современный, минимально инвазивный метод лечения широкого спектра заболеваний, включая злокачественные новообразования. Одним из направлений развития ФДТ является индивидуализация режимов воздействия, что может быть реализовано при эффективном мониторинге лечения. Существует много подходов с использованием методов визуализации, наиболее перспективным считается внедрение оптических методов. **Цель** – анализ факторов, влияющих на клинические исходы ФДТ немеланомных опухолей кожи, и оценка перспективности оптических методов визуализации для планирования и мониторинга ФДТ. **Материал и методы.** Ретроспективно оценены различные аспекты результатов ФДТ у 855 пациентов с немеланомными опухолями кожи. ФДТ проводилась с использованием препаратов хлоринового ряда при их системном применении. В качестве источника света использовали лазер с излучением на длине волны 662 нм, режимы воздействия: плотность мощности составила в среднем 0,3 Вт/см<sup>2</sup>, доза лазерного облучения – 200 Дж/см<sup>2</sup> при базальноклеточном раке и 300 Дж/см<sup>2</sup> при плоскоклеточном раке. Клиническая оценка результатов проводилась

по ответу опухоли на лечение в соответствии с критериями оценки ответа солидных опухолей (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors – RECIST) по наличию/отсутствию рецидивов при наблюдении в отдаленном периоде и по наличию/отсутствию косметических дефектов. В качестве методов неинвазивного оптического наблюдения использованы флуоресцентная визуализация и оптическая когерентная томография. **Результаты.** Установлено, что клиническими предикторами неудачных исходов лечения являются рецидивный характер опухоли, плоскоклеточный тип опухоли, выраженный экзофитный или инфильтративный компонент. С использованием метода флуоресцентной визуализации показана связь между клиническими исходами ФДТ и параметрами флуоресценции фотосенсибилизатора. Наилучшие клинические исходы достигнуты у 147 пациентов с сочетанием высокой флуоресцентной контрастности ( $FC > 1,2$ ) и высокой степени выгорания препарата ( $\Delta I/I_0 > 25\%$ ): количество полных ответов опухоли составило 94% (138/147), рецидивы возникли только у 3 (2%) пациентов при сроках наблюдения от 6 до 53 месяцев. Клиническими предикторами косметических неудач ФДТ выступают рецидивный характер

опухоли и стадия более T2. Максимально уязвимые зоны – наружное ухо и крылья носа, что связано с вовлечением в фотодинамическую реакцию хряща, расположенного непосредственно под тонкой кожей (по результатам исследования методом оптической когерентной томографии). **Заключение.** При наличии клинических предикторов неэффективности ФДТ целесообразна коррекция режимов светового воздействия, которую оптимально проводить с использованием методов объективного контроля границ опухоли, накопления и выгорания фотосенсибилизатора. Динамический неинвазивный контроль процедуры ФДТ при помощи флуоресцентной визуализации и оптической когерентной томографии перспективен для реализации индивидуального подхода с получением оптимальных онкологических и функциональных результатов.

**Ключевые слова:** фотодинамическая терапия, фотосенсибилизаторы хлоринового ряда, базальноклеточный рак, плоскоклеточный рак, флуоресцентная визуализация, оптическая когерентная томография

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-148-157



**Ф**отодинамическая терапия (ФДТ) – современный, минимально инвазивный метод лечения, который прочно вошел в клиническую практику и продемонстрировал эффективность при широком спектре заболеваний, в том числе при злокачественных новообразованиях [1–7]. К основным преимуществам ФДТ наряду с высокой онкологической эффективностью относят минимальную токсичность для здоровых тканей и незначительные системные эффекты, благодаря чему обеспечиваются органосохранность и хорошие функциональные результаты. Большинство авторов, показывая успехи ФДТ, прогнозируют более широкое внедрение метода в клиническую практику, при этом говорят о возможности и необходимости оптимизации технологии [1–3, 5, 6]. Одним из направлений развития ФДТ считается индивидуализация режимов воздействия, что может быть реализовано только при эффективном мониторинге лечения [1, 2, 5]. Большая роль в развитии такого мониторинга отводится методам визуализации, существует множество подходов с использованием различных средств [8–10]. Наиболее перспективным признано внедрение оптических методов, поскольку они позволяют осуществлять неинвазивный контроль эффективности фотодинамической реакции в реальном времени, а также обладают дополнительными преимуществами эргономичности и экономической целесообразности [11–14].

Известно, что ФДТ представляет собой многофакторный метод – в процессе участвуют три компонента (фотосенсибилизатор, свет и кислород), механизм ФДТ реализуется за счет фотодинамических реакций двух основных типов, главными фотодинамическими эффектами являются прямое цитотоксическое влияние на клетки, повреждение сосудов опухоли и иммунные реакции [1, 2, 5, 6]. Такое разнообразие компонентов, реакций и эффектов ФДТ служит основанием для споров исследователей по поводу объектов и методов наблюдения. В большинстве работ предпочтение отдается ФДТ-ассоциированной флуоресцентной визуализации, которая реализует принцип

тераностики и позволяет оценить уровень накопления препарата в опухоли, уточнить границы опухолевого поражения и контролировать степень выгорания фотосенсибилизатора [15–18]. Ряд работ демонстрирует перспективность мультимодального подхода с использованием комбинации флуоресцентной визуализации, спектроскопии и методов контроля микроциркуляции [19–23].

Несомненно, кроме контроля фотодинамических реакций исследователей интересует клинический результат, для чего используется стандартный подход по оценке ответа опухоли на лечение [24]. Вместе с онкологической эффективностью важным представляется функциональный результат. Для некоторых локализаций, например, для опухолей кожи лица, таковым выступает косметический результат, что становится одним из актуальных аспектов для обсуждения [25, 26].

Целью нашей работы был анализ факторов, влияющих на клинические исходы ФДТ немеланомных опухолей кожи, и оценка перспективности оптических методов визуализации для планирования и мониторинга ФДТ.

## Материал и методы

Работа выполнена на базе Нижегородского областного онкологического диспансера. Исследование носило ретроспективный характер, были оценены различные аспекты результатов ФДТ у пациентов с немеланомными опухолями кожи, всего проанализировано 855 случаев. ФДТ проводилась с использованием препаратов хлоринового ряда при их системном применении. Доза препарата рассчитывалась в соответствии с массой тела пациента и составляла 1 мг/кг. В качестве источника излучения использовали лазерный диодный модуль Лахта-Милон (ЗАО «Милон Лазер», Санкт-Петербург, Россия) с излучением на длине волны 662 нм. Для доставки света к опухоли применялись сертифицированные световоды с микро- и макролинзами (производства ООО «Полироник», Москва, Россия). Плотность мощности в среднем равнялась 0,3 Вт/см<sup>2</sup>,

**Гамаюнов Сергей Викторович** – канд. мед. наук, заместитель главного врача по хирургической помощи<sup>1</sup>

**Скребцова Регина Равиленна** – врач-онколог (хирург)<sup>2</sup>

**Корчагина Ксения Сергеевна** – онколог, аспирант кафедры патологической анатомии<sup>3</sup>

**Сапунов Дмитрий Александрович** – врач-отоларинголог<sup>4</sup>

**Шахова Мария Андреевна** – ассистент кафедры ЛОР-болезней<sup>5</sup>

**Шахова Наталия Михайловна** – д-р мед. наук, вед. науч. сотр., лаборатория биофотоники<sup>6</sup>  
✉ 603950, г. Нижний Новгород, ул. Ульянова, 46, Российская Федерация.  
Тел.: +7 (831) 436 80 10.  
E-mail: natalia.shakhova@gmail.com

<sup>1</sup> Бу «Республиканский клинический онкологический диспансер» Минздрава Чувашии; 428020, г. Чебоксары, ул. Гладкова, 31, Российская Федерация

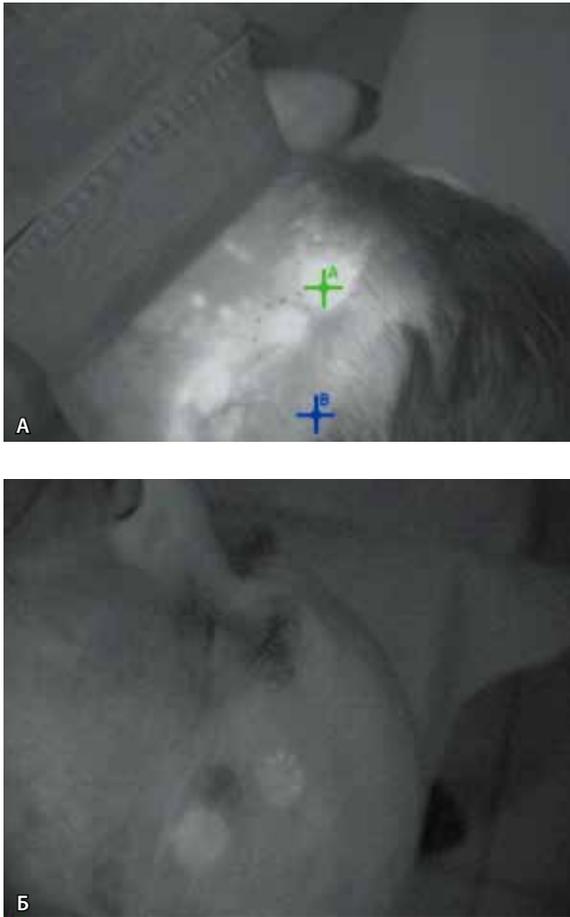
<sup>2</sup> ГБУЗ НО «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер»; 603126, г. Нижний Новгород, ул. Родионова, 190, Российская Федерация

<sup>3</sup> ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; 127473, г. Москва, ул. Делегатская, 20–1, Российская Федерация

<sup>4</sup> ГБУЗ НО «Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко»; 603126, г. Нижний Новгород, ул. Родионова, 190, Российская Федерация

<sup>5</sup> ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России; 603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1, Российская Федерация

<sup>6</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики Российской академии наук»; 603950, г. Нижний Новгород, ул. Ульянова, 46, Российская Федерация



**Рис. 1.** Примеры флуоресцентной визуализации накопления фотосенсибилизатора, точка А соответствует  $I_t(0)$ , точка В –  $I_N(0)$ : **А** – базальноклеточный рак кожи затылочной области, хорошее накопление (отношение  $I_t(0)/I_N(0) > 1,2$ ), видны отсеы опухоли; **Б** – мультицентричный базальноклеточный рак кожи лица, оба очага – слабое накопление (отношение  $I_t(0)/I_N(0) < 1,2$ )

минимальная плотность –  $0,28 \text{ Вт/см}^2$ , максимальная –  $0,32 \text{ Вт/см}^2$ . Доза лазерного облучения составляла  $200 \text{ Дж/см}^2$  при базальноклеточном раке и  $300 \text{ Дж/см}^2$  при плоскоклеточном раке.

Клиническая оценка результатов проводилась по ответу опухоли на лечение через 2 месяца после ФДТ в соответствии с критериями оценки ответа солидных опухолей (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors – RECIST) [24] по наличию/отсутствию рецидивов при наблюдении в отдаленном периоде и по наличию/отсутствию косметических дефектов.

В качестве методов неинвазивного оптического наблюдения в работе использованы флуоресцентная визуализация и оптическая когерентная томография. Изучение параметров флуоресценции проводилось бесконтактным

неинвазивным методом с применением коммерческой флуоресцентной визуализирующей системы Флуовизор (ООО «Аткус», Россия). Для оптической когерентной томографии использована установка «ОКТ-1300У» (ИПФ РАН, ООО «Биомедтех», Н. Новгород, Россия). Исследование одобрено локальным этическим комитетом ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России, протокол № 14 от 03 декабря 2013 г., и локальным этическим комитетом НООД, протокол № 1 от 18 мая 2015 г.

Дизайн исследования включал три сценария. Первый сценарий предполагал анализ результатов ФДТ с оценкой влияния клинических характеристик опухоли: морфология, количество очагов, первичный или рецидивный характер. В группу вошли данные 482 пациентов, наблюдение составило от 2 до 64 месяцев (медиана – 35 месяцев).

Второй сценарий включал анализ взаимосвязи клинических исходов (ответ опухоли, рецидивы) и данных флуоресцентного имиджинга. В исследовании участвовали 464 пациента, наблюдение составило от 6 до 53 месяцев (медиана – 28 месяцев). В данную группу вошли пациенты только с первичными опухолями, чтобы исключить влияние предшествующего лечения на клинические исходы. В качестве фотосенсибилизатора использовался препарат хлоринового ряда Фотодитазин (ООО «Вета Гранд», Россия). Флуоресцентные данные изучались через 2 часа после внутривенного введения фотосенсибилизатора (максимальное накопление фотосенсибилизатора в соответствии с фармакодинамикой препарата) и после лазерного воздействия. Программное обеспечение Флуовизора позволяет измерить уровень флуоресценции в любой заданной области изображения, выбираемой вручную, в относительных условных единицах. Этот показатель косвенно отражает концентрацию препарата. Измерение интенсивности флуоресценции в опухоли  $I_t(0)$  и здоровой коже  $I_N(0)$  проводили перед сеансом лазерного воздействия, флуоресцентную контрастность (FC) рассчитывали как отношение  $I_t(0)/I_N(0)$ , что определяет селективность накопления препарата в опухолевых тканях относительно здоровых. Для классификации опухолей по селективности накопления в них фотосенсибилизатора в сравнении со здоровой тканью было выделено три группы: «отсутствие флуоресцентной контрастности» (no-FC;  $FC = 1$ ), «низкая флуоресцентная контрастность» (low-FC;  $1 < FC \leq 1,2$ ), «высокая флуоресцентная контрастность» (high-FC;  $FC > 1,2$ ) (рис. 1). Степень выгорания препарата (dFC) изучали непосредственно после лазерного



воздействия. Для этого повторно определяли среднее значение интенсивности флуоресценции опухоли  $I_i(1)$  и соответствующей поверхности неизменной здоровой кожи  $I_N(1)$ . Степень выгорания определяли как изменение флуоресцентной контрастности после лазерного воздействия, выраженное в процентах по отношению к исходному значению:  $dFC = (1 - FC(1)/FC(0)) \times 100\%$ . В зависимости от степени выгорания фотосенсибилизатора  $\Delta I_i/I_N$  также выделили три группы: «отсутствие фотобличинга» ( $\Delta I_i/I_N \leq 0$ ), «низкая степень фотобличинга» ( $0 < \Delta I_i/I_N \leq 25\%$ ), «высокая степень фотобличинга» ( $\Delta I_i/I_N > 25\%$ ).

По третьему сценарию проанализированы косметические результаты ФДТ у 564 пациентов с карциномой кожи головы и шеи, при помощи оптической когерентной томографии проведена небольшая серия (11 пациентов) визуализаций особенностей кожи «трудных» локализаций. У данной группы пациентов использовались различные препараты хлоринового ряда: Фотодитазин («Вета Грант», Россия) и Радахлорин («РАДА-ФАРМА», Россия) в дозе 1 мг/кг и Фотолон («Белмедпрепараты», Белоруссия) в дозе 1,2 мг/кг. Дозы светового воздействия зависели от стадии опухоли и ее размеров и составляли от 100 до 350 Дж/см<sup>2</sup> при плотности мощности 0,3 Вт/см<sup>2</sup>. Учитывая данные экспериментальных исследований [27, 28] и клинический опыт, доза светового воздействия для Фотолона была на 40% меньше, чем для Радахлорина и Фотодитазина.

## Результаты

Клинические исходы фотодинамической терапии в зависимости от характеристик опухоли. На первой стадии работы получено: в группе исследованных пациентов преобладали первичные опухоли – 312 (65%) случаев против 170 (35%) случаев рецидивного рака кожи; на долю единичных фокусов пришлось 79% (380 случаев), множественных очагов – 21% (102 случая); по морфологическому типу чаще встречался базальноклеточный рак, чем плоскоклеточный, – в 88% (423 случая) и 12% (59 случаев) соответственно. Полный ответ опухоли после одного сеанса ФДТ отмечен у 85,4% пациентов. Частичный ответ (уменьшение опухоли более чем на 30%) зарегистрирован у 11,8% больных, отсутствие эффекта (стабилизация и прогрессирование) наблюдали только у 14 пациентов, что составило 2,8%. В отдаленном периоде рецидив возник у 9,97% (48 случаев): 40 пациентам проведен повторный сеанс ФДТ с достижением

полного ответа, 8 выполнено хирургическое или лучевое лечение. При анализе влияния клинических характеристик опухоли на отдаленные результаты установлено, что только у 6% пациентов с первичной опухолью возникли рецидивы, в то время как у 17,7% больных (30 из 170 случаев) с рецидивной опухолью после ФДТ опять возник рецидив заболевания. Отдаленные результаты лечения базальноклеточного рака значительно лучше, чем у пациентов с плоскоклеточной карциномой (6% рецидивов против 10,2%). Значительную роль в рецидивировании опухоли после ФДТ играют размеры очага: при диаметре опухоли менее 20 мм рецидивы возникли в 6,7% случаев, в то время как при увеличении диаметра (более 50 мм) рецидивы зарегистрированы в 17,4% наблюдений. При анализе рецидивов установлено: у 32 пациентов было продолжение роста по периферии очага (предположительно, связано с неадекватным размером поля лазерного воздействия), а у 16 отмечено продолжение роста в центре опухоли (может быть обусловлено неадекватным выбором дозы света).

Следовательно, нами показано, что рецидивный характер, плоскоклеточный тип опухоли,

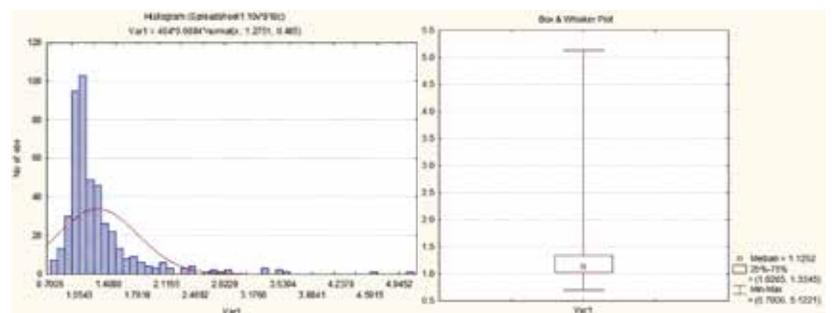


Рис. 2. Гистограмма распределения флуоресцентной контрастности (FC) и распределение вероятностей FC. Показано, что преобладают случаи низкой FC

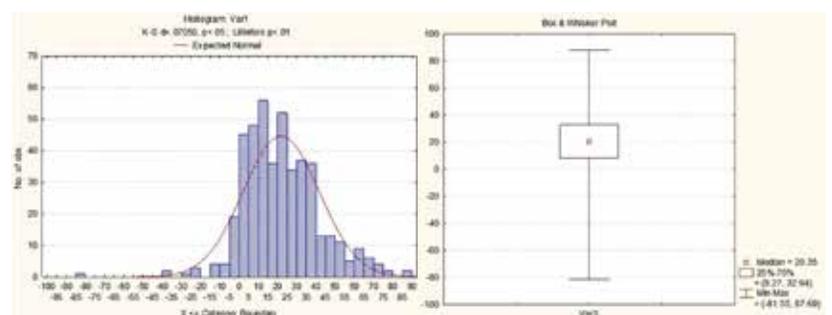
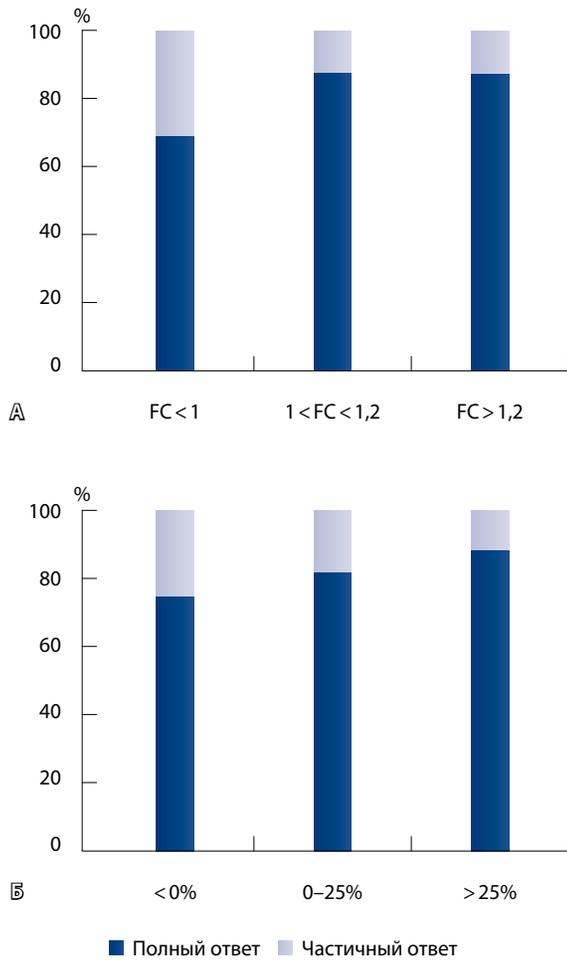


Рис. 3. Гистограмма распределения степени выгорания фотосенсибилизатора (dFC) и распределение вероятностей dFC. Показано, что преобладают случаи слабого выгорания фотосенсибилизатора

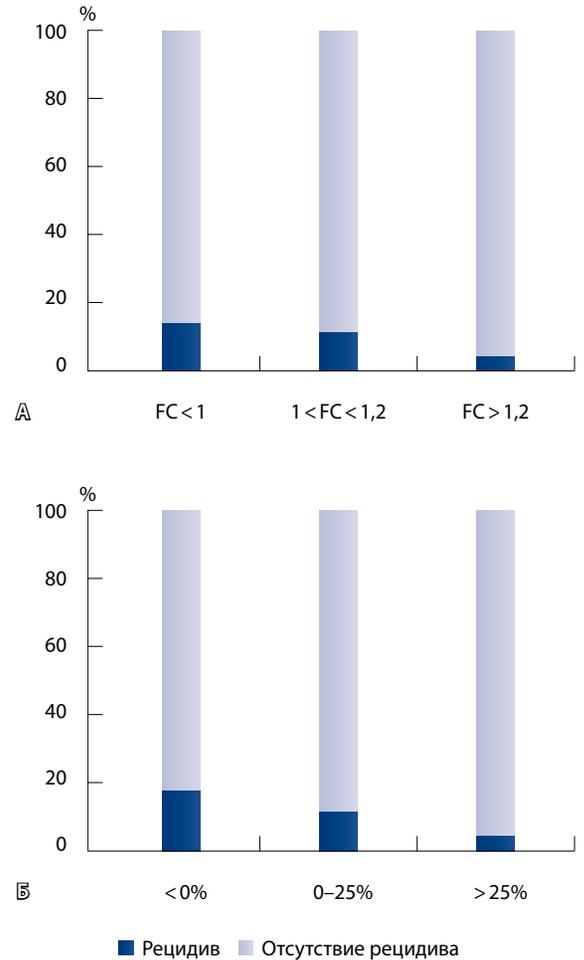


**Рис. 4.** Зависимость частоты полного ответа опухоли от флуоресцентной контрастности (А – FC, критерий  $\chi^2$  Пирсона:  $p=0,00012$ ) и степени выгорания фотосенсибилизатора (Б – dFC, критерий  $\chi^2$  Пирсона:  $p=0,09589$ )

выраженный экзофитный или инфильтративный компонент выступают предикторами неудачных исходов лечения. В этих случаях целесообразна коррекция режимов светового воздействия, которую оптимально проводить с использованием методов объективного контроля границ опухоли, накопления и выгорания фотосенсибилизатора. Применение флуоресцентного мониторинга было реализовано нами на следующем этапе работы.

Клинические исходы фотодинамической терапии в зависимости от параметров флуоресценции фотосенсибилизатора

Результаты по распределению флуоресцентной контрастности и степени выгорания фотосенсибилизатора у пациентов исследованной группы



**Рис. 5.** Зависимость частоты рецидивирования опухоли от флуоресцентной контрастности (А – FC, критерий  $\chi^2$  Пирсона:  $p=0,0149$ ) и степени выгорания фотосенсибилизатора (Б – dFC, критерий  $\chi^2$  Пирсона:  $p=0,01215$ )

и данные описательной статистики отражены на рис. 2 и 3.

При анализе ответа опухоли на проведение ФДТ в зависимости от FC выявлено, что в отсутствие флуоресцентной контрастности частота полных ответов (CR) составила всего 69% по сравнению с высокой (87,3%) и низкой (87,6%) FC (рис. 4а). Что касается ответа опухоли на ФДТ в зависимости от степени выгорания фотосенсибилизатора, установлено: частота полных ответов несколько ниже в отсутствие выгорания (75%), чем при высокой (88,3%) и низкой (81,9%) степени выгорания (рис. 4б).

Изучение частоты рецидивов опухоли после ФДТ в зависимости от FC показало: в отсутствие флуоресцентной контрастности и при низкой FC рецидивы опухоли обнаруживаются значительно

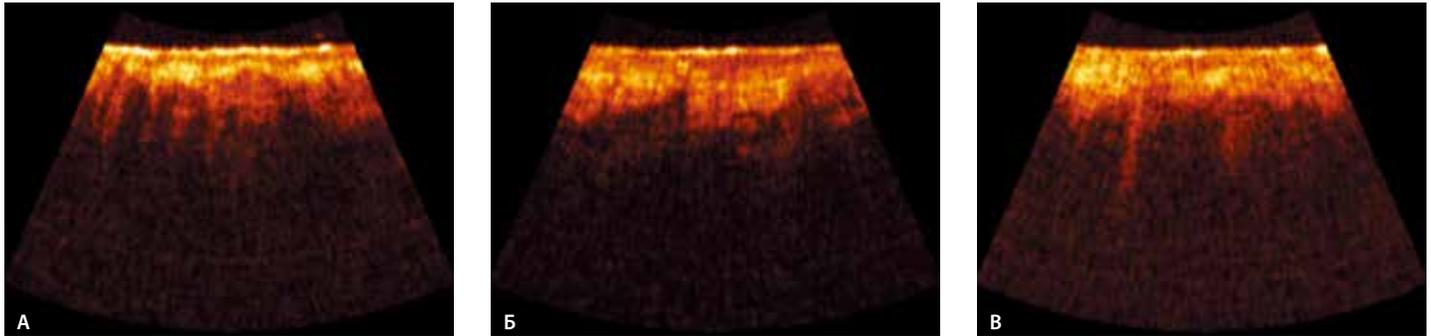


Рис. 6. Изображения кожи козелка (А) и завитка (Б) наружного уха, кожи крыла носа (В), полученные методом оптической когерентной томографии

чаще (14,3 и 11,6%), чем при высокой (4,6%) (рис. 5а). При анализе частоты рецидивов в зависимости от степени выгорания фотосенсибилизатора оказалось, что большинство случаев рецидивирования зарегистрировано в отсутствие выгорания препарата (17,6%), несколько меньше при низкой степени (11,8%), а наименьшее число рецидивов возникло при высокой степени выгорания фотосенсибилизатора (4,7%) (рис. 5б).

Наилучшие клинические исходы ФДТ достигнуты у 147 пациентов с сочетанием высокой флуоресцентной контрастности и высокой степени выгорания препарата: количество полных ответов опухоли в этой группе было равно 94% (138/147), рецидивы возникли только у 3 пациентов, что составило 2% при сроках наблюдения от 6 до 53 месяцев.

Таким образом, установлено наличие связи между клиническими исходами ФДТ и параметрами флуоресценции фотосенсибилизатора.

Косметические результаты фотодинамической терапии

В 324 (57,4%) случаях из 564 опухоль имела так называемую трудную локализацию: нос и носогубная складка – 142 случая; веки, угол глаза и параорбитальная зона – 83, наружное ухо и околоушная зона – 45; мультифокальная опухоль с локализацией хотя бы одного очага в указанных зонах – 54 наблюдения. В 31 (9,6%) случае «трудных» локализаций после ФДТ зарегистрированы косметические дефекты, большинство из которых (21 случай) возникли при рецидивных опухолях; степень выраженности дефектов оценена как тяжелая, отнесена в разряд осложнений. При первичных опухолях косметические дефекты зарегистрированы в 10 случаях, тяжелая степень отмечена лишь у 2 пациентов, имевших запущенную стадию (T2+) заболевания. Во всех случаях косметические дефекты касались

повреждения хряща наружного уха или крыльев носа.

Для изучения особенностей наиболее уязвимых в плане косметических осложнений зон (крыло носа, завиток и козелок ушной раковины) проведена оптическая когерентная томография этих участков, обследовано 11 пациентов, получено 88 изображений (рис. 6). Известно, что эти зоны покрыты тонкой кожей, толщина которой варьирует от 0,5 до 4,5 мм; непосредственно под кожей находится хрящ, связанный с ней фасциальными прослойками, которые организуют взаимопроникновение тканей. Особенностью всех представленных изображений является небольшая глубина информативного зондирования, около 0,5 мм. На изображениях визуализируется тонкий эпидермис с участками ороговения, степень выраженности границы эпидермис/дерма различная, граница дерма/хрящ размыта, хрящ не визуализируется, так как он практически прозрачен для оптической когерентной томографии. При анализе изображений одинаковых зон у разных пациентов при сохранении общих признаков (малая глубина информативного зондирования, отсутствие четких границ между слоями) четко прослеживаются индивидуальные особенности (рис. 7).

В целом анализ показал, что более половины опухолей кожи головы имеют «трудную» локализацию, опасную с точки зрения возникновения косметических осложнений. Клиническими предикторами косметических неудач выступают рецидивный характер опухоли и стадия более T2. Максимально уязвимыми в отношении развития выраженных косметических дефектов являются наружное ухо и крылья носа. Полученные методом оптической когерентной томографии изображения подтверждают знания о гистологии кожи этих зон, демонстрируют, что хрящ находится на глубине, которая подвергается лазерному

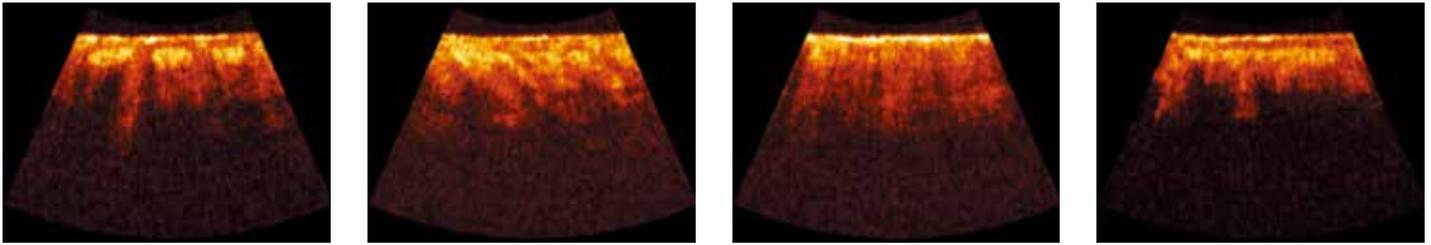


Рис. 7. Изображения кожи козелка наружного уха разных пациентов, полученные методом оптической когерентной томографии

воздействию при ФДТ с использованием длины волны 662 нм, что, вероятно, и служит основной причиной косметических осложнений ФДТ.

### Обсуждение и заключение

В нашей работе предикторами неудачных исходов ФДТ оказались рецидивный характер опухоли и плоскоклеточный тип, что полностью совпадает с опубликованными ранее данными других исследователей [29, 30]. В этих случаях целесообразна коррекция режимов светового воздействия, но для ее реализации необходим эффективный мониторинг ФДТ в реальном времени [1, 5]. Мы также продемонстрировали наличие связи между параметрами флуоресценции фотосенсибилизатора и клиническими результатами. В нашем исследовании отдаленные результаты в большей степени, чем непосредственные, реагировали на показатели флуоресценции, причем степень фотобличинга фотосенсибилизатора была зарегистрирована при полном ответе на ФДТ. В то же время экспериментальные исследования по изучению влияния степени фотобличинга [16] демонстрируют отсутствие значительных корреляций между степенью выгорания препарата и ответом опухоли. Тем не менее большинство авторов отводят фотобличингу заметную роль в возможности дозиметрии ФДТ в реальном времени, а в качестве предиктора неэффективности лечения называют неэффективное выгорание [17, 18, 20, 31, 32].

При анализе косметических результатов отмечено интересное наблюдение: в большинстве зарегистрированных случаев косметических дефектов (23 из 31) в качестве фотосенсибилизатора применялся Фотолон – препарат, представляющий собой молекулярный комплекс хлорина еб с низкомолекулярным поливинилпирролидоном. Как показано в экспериментальных исследованиях, поливинилпирролидон повышает контрастность накопления препарата в опухоли относительно здоровой кожи, но снижает контрастность по отношению к подлежащим тканям, способствует преодолению гистогематологического барьера [27, 28]. Проведенное нами исследование не позволяет на данном этапе сделать статистически обоснованные выводы, но в качестве обсуждения можно предположить, что кроме общепризнанных факторов (рецидивный характер, стадия опухоли) на косметический результат ФДТ могут влиять особенности фармакокинетики фотосенсибилизатора. Оптическая когерентная томография перспективна для получения данных об индивидуальных особенностях кожи в зоне ФДТ, что будет способствовать персонализации лечения с целью профилактики косметических осложнений. Предположительно, в ряде локализаций целесообразно использовать лазер другого диапазона для оптимизации глубины воздействия [33].

По нашему мнению, динамический неинвазивный контроль процедуры ФДТ с использованием флуоресцентной визуализации и оптической когерентной томографии позволит реализовать индивидуальный подход с получением оптимальных онкологических и функциональных результатов. ©

#### Благодарности

Авторы выражают признательность персоналу клиник, в которых проводились исследования, и сотрудникам ИПФ РАН за сопровождение работ. За финансовую поддержку исследований авторы благодарны РФФИ (грант № 15-32-20250) и Минобрнауки России (ФЦП, проект RFMEFI60414X0027).

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Литература

1. Celli JP, Spring BQ, Rizvi I, Evans CL, Samkoe KS, Verma S, Pogue BW, Hasan T. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization. *Chem Rev.* 2010;110(5):2795–838. doi: 10.1021/cr900300p.
2. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J,



- Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(4):250–81. doi: 10.3322/caac.20114.
3. Гельфонд МЛ, Арсеньев АИ, Левченко ЕВ, Гельфонд ВМ, Мамонтов ОЮ, Моисеенко ВМ, Балдуева ИА, Новик АВ, Нехаева ТЛ, Данилова АБ, Данилов АО, Сенчик КЮ, Трунов ВА, Кульвелис ЮВ, Суханова ТЕ. Фотодинамическая терапия в комбинированном лечении злокачественных новообразований: настоящее и будущее. *Лазерная медицина.* 2012;16(2):25–30.
  4. Странадко ЕФ, Титова ВА, Петровский ВЮ. Фотодинамическая терапия: полимодальные программы лечения рака различных локализаций. *Лазерная медицина.* 2012;16(3):4–7.
  5. Allison RR, Moghissi K. Oncologic photodynamic therapy: clinical strategies that modulate mechanisms of action. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013;10(4):331–41. doi: 10.1016/j.pdpdt.2013.03.011.
  6. Allison RR, Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc.* 2013;46(1):24–9. doi: 10.5946/ce.2013.46.1.24.
  7. Azzouzi AR, Lebdaï S, Benzaghout F, Stief C. Vascular-targeted photodynamic therapy with TOOKAD® Soluble in localized prostate cancer: standardization of the procedure. *World J Urol.* 2015;33(7):937–44. doi: 10.1007/s00345-015-1535-2.
  8. Galbán S, Brisset JC, Rehemtulla A, Chen-evert TL, Ross BD, Galbán CJ. Diffusion-weighted MRI for assessment of early cancer treatment response. *Curr Pharm Biotechnol.* 2010;11(6):701–8. doi: 10.2174/138920110792246627.
  9. Fei B, Wang H, Wu C, Chiu SM. Choline PET for monitoring early tumor response to photodynamic therapy. *J Nucl Med.* 2010;51(1):130–8. doi: 10.2967/jnumed.109.067579.
  10. Madar-Balakirski N, Tempel-Brami C, Kalchenko V, Brenner O, Varon D, Scherz A, Salomon Y. Permanent occlusion of feeding arteries and draining veins in solid mouse tumors by vascular targeted photodynamic therapy (VTP) with Tookad. *PLoS One.* 2010;5(4):e10282. doi: 10.1371/journal.pone.0010282.
  11. Lee TK, Baron ED, Foster TH. Monitoring Pc 4 photodynamic therapy in clinical trials of cutaneous T-cell lymphoma using noninvasive spectroscopy. *J Biomed Opt.* 2008;13(3):030507. doi: 10.1117/1.2939068.
  12. Khurana M, Moriyama EH, Mariampillai A, Wilson BC. Intravital high-resolution optical imaging of individual vessel response to photodynamic treatment. *J Biomed Opt.* 2008;13(4):040502. doi: 10.1117/1.2965545.
  13. Standish BA, Lee KK, Jin X, Mariampillai A, Munce NR, Wood MF, Wilson BC, Vitkin IA, Yang VX. Interstitial Doppler optical coherence tomography as a local tumor necrosis predictor in photodynamic therapy of prostatic carcinoma: an in vivo study. *Cancer Res.* 2008;68(23):9987–95. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1128.
  14. Mallidi S, Watanabe K, Timerman D, Schoenfeld D, Hasan T. Prediction of tumor recurrence and therapy monitoring using ultrasound-guided photoacoustic imaging. *Theranostics.* 2015;5(3):289–301. doi: 10.7150/thno.10155.
  15. Tyrrell JS, Campbell SM, Curnow A. The relationship between protoporphyrin IX photobleaching during real-time dermatological methyl-aminolevulinic acid photodynamic therapy (MAL-PDT) and subsequent clinical outcome. *Lasers Surg Med.* 2010;42(7):613–9. doi: 10.1002/lsm.20943.
  16. Baran TM, Foster TH. Fluence rate-dependent photobleaching of intratumorally administered Pc 4 does not predict tumor growth delay. *Photochem Photobiol.* 2012;88(5):1273–9. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01171.x.
  17. Anbil S, Rizvi I, Celli JP, Alagic N, Hasan T. A photobleaching-based PDT dose metric predicts PDT efficacy over certain BPD concentration ranges in a three-dimensional model of ovarian cancer. *Proc SPIE 8568, Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXII*, 856805 (March 13, 2013). doi: 10.1117/12.2010840. Доступно на: <http://dx.doi.org/10.1117/12.2010840>
  18. Гамаюнов СВ, Гребенкина ЕВ, Ермилина АА, Каров ВА, König K, Корчагина КС, Скребцова РР, Терехов ВМ, Терентьев ИГ, Турчин ИВ, Шахова НМ. Флюоресцентный мониторинг фотодинамической терапии рака кожи в клинической практике. *Современные технологии в медицине.* 2015;7(2):75–83. doi: <http://dx.doi.org/10.17691/stm2015.7.2.10>
  19. Kruijt B, de Bruijn HS, van der Ploeg-van den Heuvel A, de Bruijn RW, Sterenberg HJ, Amelink A, Robinson DJ. Monitoring ALA-induced PpIX photodynamic therapy in the rat esophagus using fluorescence and reflectance spectroscopy. *Photochem Photobiol.* 2008;84(6):1515–27. doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00379.x.
  20. Sunar U, Rohrbach D, Rigual N, Tracy E, Keymel K, Cooper MT, Baumann H, Henderson BH. Monitoring photobleaching and hemodynamic responses to HPPH-mediated photodynamic therapy of head and neck cancer: a case report. *Opt Express.* 2010;18(14):14969–78. doi: 10.1364/OE.18.014969.
  21. Maas AL, Carter SL, Wileyto EP, Miller J, Yuan M, Yu G, Durham AC, Busch TM. Tumor vascular microenvironment determines responsiveness to photodynamic therapy. *Cancer Res.* 2012;72(8):2079–88. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3744.
  22. Mallidi S, Spring BQ, Chang S, Vakoc B, Hasan T. Optical Imaging, Photodynamic Therapy and Optically Triggered Combination Treatments. *Cancer J.* 2015;21(3):194–205. doi: 10.1097/PPO.000000000000117.
  23. Yan X, Hu H, Lin J, Jin AJ, Niu G, Zhang S, Huang P, Shen B, Chen X. Optical and photoacoustic dual-modality imaging guided synergistic photodynamic/photothermal therapies. *Nanoscale.* 2015;7(6):2520–6. doi: 10.1039/c4nr06868h.
  24. Shanbhogue AK, Karnad AB, Prasad SR. Tumor response evaluation in oncology: current update. *J Comput Assist Tomogr.* 2010;34(4):479–84. doi: 10.1097/RCT.0b013e3181db2670.
  25. Странадко ЕФ, Волгин ВН, Рябов МВ. Фотодинамическая терапия базально-клеточного рака кожи с применением фотогема. *Клиническая дерматология и венерология.* 2008;(6):28–33.
  26. Lee Y, Baron ED. Photodynamic therapy: current evidence and applications in dermatology. *Semin Cutan Med Surg.* 2011;30(4):199–209. doi: 10.1016/j.sder.2011.08.001.
  27. Shirmanova MV, Gavrina AI, Aksenova NA, Glagolev NN, Solovieva AB, Shakhov BE, Zagaynova EV. Comparative study of tissue distribution of chlorin e6 complexes with amphiphilic polymers in mice with cervical carcinoma. *J Anal Bioanal Tech.* 2014;S1:008. doi: 10.4172/2155-9872.S1-008.
  28. Sliakhtsin SV, Trukhachova TV, Petrov PT, Isaakov GA, Istomin YP. Investigation of tissue biodistribution and plasma pharmacokinetics of Photolon® (Fotolon®) in intact and tumor-bearing rats. Evaluation of the ability of the photosensitizer to pass through intact histohemogenous barriers. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2008;5 Suppl 1:S6–S7. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1572-1000\(08\)70019-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1572-1000(08)70019-X).
  29. Странадко ЕФ, Волгин ВН, Ламоткин ИА, Рябов МВ, Садовская МВ. Фотодинамическая терапия базально-клеточного рака кожи с фотосенсибилизатором фотодитазином. *Российский биотерапевтический журнал.* 2008;7(4):7–11.
  30. Капинус ВН, Каплан МА, Спиченкова ИС, Шубина АМ, Ярославцева-Исаева ЕВ. Фотодинамическая терапия с фотосенсибилизатором Фотолон плоскоклеточного рака кожи. *Лазерная медицина.* 2012;16(2):31–4.
  31. Mackenzie GD, Dunn JM, Selvasekar CR, Mosse CA, Thorpe SM, Novelli MR, Bown SG, Lovat LB. Optimal conditions for successful ablation of high-grade dysplasia in Barrett's oesophagus using aminolaevulinic acid photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2009;24(5):729–34. doi: 10.1007/s10103-008-0630-7.
  32. Liu B, Farrell TJ, Patterson MS. Comparison of noninvasive photodynamic therapy dosimetry methods using a dynamic model of ALA-PDT of human skin. *Phys Med Biol.* 2012;57(3):825–41. doi: 10.1088/0031-9155/57/3/825.
  33. Taub AF. Cosmetic clinical indications for photodynamic therapy. *J Cosmet Dermatol.* 2012;25(5):218–24.



## References

1. Celli JP, Spring BQ, Rizvi I, Evans CL, Samkoe KS, Verma S, Pogue BW, Hasan T. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization. *Chem Rev*. 2010;110(5):2795–838. doi: 10.1021/cr900300p.
2. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(4):250–81. doi: 10.3322/caac.20114.
3. Gel'fond ML, Arsen'ev AI, Levchenko EV, Gel'fond VM, Mamontov OYu, Moiseenko VM, Baldueva IA, Novik AV, Nekhaeva TL, Danilova AB, Danilov AO, Senchik KYu, Trunov VA, Kul'velis YuV, Sukhanova TE. Fotodinamicheskaya terapiya v kombinirovannom lechenii zlokachestvennykh novoobrazovaniy: nastoyashchee i budushchee [Photodynamic therapy in the combined treatment of malignant neoplasms: present state and future perspectives]. *Lazernaya meditsina [Laser Medicine]*. 2012;16(2):25–30 (in Russian).
4. Stranadko EF, Titova VA, Petrovskiy VYu. Fotodinamicheskaya terapiya: polimodal'nye programmy lecheniya raka razlichnykh lokalizatsiy [Photodynamic therapy: polymodal treatment programs for cancer of different localizations]. *Lazernaya meditsina [Laser Medicine]*. 2012;16(3):4–7 (in Russian).
5. Allison RR, Moghissi K. Oncologic photodynamic therapy: clinical strategies that modulate mechanisms of action. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013;10(4):331–41. doi: 10.1016/j.pdpdt.2013.03.011.
6. Allison RR, Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc*. 2013;46(1):24–9. doi: 10.5946/ce.2013.46.1.24.
7. Azzouzi AR, Lebdaï S, Benzaghoul F, Stief C. Vascular-targeted photodynamic therapy with TOOKAD® Soluble in localized prostate cancer: standardization of the procedure. *World J Urol*. 2015;33(7):937–44. doi: 10.1007/s00345-015-1535-2.
8. Galbán S, Brisset JC, Rehemtulla A, Chenevert TL, Ross BD, Galbán CJ. Diffusion-weighted MRI for assessment of early cancer treatment response. *Curr Pharm Biotechnol*. 2010;11(6):701–8. doi: 10.2174/138920110792246627.
9. Fei B, Wang H, Wu C, Chiu SM. Choline PET for monitoring early tumor response to photodynamic therapy. *J Nucl Med*. 2010;51(1):130–8. doi: 10.2967/jnumed.109.067579.
10. Madar-Balakirski N, Tempel-Brami C, Kalchenko V, Brenner O, Varon D, Scherz A, Salomon Y. Permanent occlusion of feeding arteries and draining veins in solid mouse tumors by vascular targeted photodynamic therapy (VTP) with Tookad. *PLoS One*. 2010;5(4):e10282. doi: 10.1371/journal.pone.0010282.
11. Lee TK, Baron ED, Foster TH. Monitoring Pc 4 photodynamic therapy in clinical trials of cutaneous T-cell lymphoma using noninvasive spectroscopy. *J Biomed Opt*. 2008;13(3):030507. doi: 10.1117/1.2939068.
12. Khurana M, Moriyama EH, Mariampillai A, Wilson BC. Intravital high-resolution optical imaging of individual vessel response to photodynamic treatment. *J Biomed Opt*. 2008;13(4):040502. doi: 10.1117/1.2965545.
13. Standish BA, Lee KK, Jin X, Mariampillai A, Munce NR, Wood MF, Wilson BC, Vitkin IA, Yang VX. Interstitial Doppler optical coherence tomography as a local tumor necrosis predictor in photodynamic therapy of prostatic carcinoma: an in vivo study. *Cancer Res*. 2008;68(23):9987–95. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1128.
14. Mallidi S, Watanabe K, Timerman D, Schoenfeld D, Hasan T. Prediction of tumor recurrence and therapy monitoring using ultrasound-guided photoacoustic imaging. *Theranostics*. 2015;5(3):289–301. doi: 10.7150/thno.10155.
15. Tyrrell JS, Campbell SM, Curnow A. The relationship between protoporphyrin IX photobleaching during real-time dermatological methyl-aminolevulinic acid photodynamic therapy (MAL-PDT) and subsequent clinical outcome. *Lasers Surg Med*. 2010;42(7):613–9. doi: 10.1002/lsm.20943.
16. Baran TM, Foster TH. Fluence rate-dependent photobleaching of intratumorally administered Pc 4 does not predict tumor growth delay. *Photochem Photobiol*. 2012;88(5):1273–9. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01171.x.
17. Anbil S, Rizvi I, Celli JP, Alagic N, Hasan T. A photobleaching-based PDT dose metric predicts PDT efficacy over certain BPD concentration ranges in a three-dimensional model of ovarian cancer. *Proc. SPIE 8568, Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXII*, 85680S (March 13, 2013). doi: 10.1117/12.2010840. Available from: <http://dx.doi.org/10.1117/12.2010840>
18. Gamayunov SV, Grebenkina EV, Ermilina AA, Karov VA, König K, Korchagina KS, Skrebtsova RR, Terekhov VM, Terentiev IG, Turchin IV, Shakhova NM. Flyuoresstentnyy monitoring fotodinamicheskoy terapii raka kozhi v klinicheskoy praktike [Fluorescent monitoring of photodynamic therapy for skin cancer in clinical practice]. *Sovremennye tekhnologii v medicine [Modern Technologies in Medicine]*. 2015;7(2):75–81. <http://dx.doi.org/10.17691/stm2015.7.2.10> (in Russian).
19. Kruijt B, de Bruijn HS, van der Ploeg-van den Heuvel A, de Bruin RW, Sterenborg HJ, Amelink A, Robinson DJ. Monitoring ALA-induced PpIX photodynamic therapy in the rat esophagus using fluorescence and reflectance spectroscopy. *Photochem Photobiol*. 2008;84(6):1515–27. doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00379.x.
20. Sunar U, Rohrbach D, Rigual N, Tracy E, Keymel K, Cooper MT, Baumann H, Henderson BH. Monitoring photobleaching and hemodynamic responses to HPPH-mediated photodynamic therapy of head and neck cancer: a case report. *Opt Express*. 2010;18(14):14969–78. doi: 10.1364/OE.18.014969.
21. Maas AL, Carter SL, Wileyto EP, Miller J, Yuan M, Yu G, Durham AC, Busch TM. Tumor vascular microenvironment determines responsiveness to photodynamic therapy. *Cancer Res*. 2012;72(8):2079–88. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3744.
22. Mallidi S, Spring BQ, Chang S, Vakoc B, Hasan T. Optical Imaging, Photodynamic Therapy and Optically Triggered Combination Treatments. *Cancer J*. 2015;21(3):194–205. doi: 10.1097/PPO.0000000000000117.
23. Yan X, Hu H, Lin J, Jin AJ, Niu G, Zhang S, Huang P, Shen B, Chen X. Optical and photoacoustic dual-modality imaging guided synergistic photodynamic/photothermal therapies. *Nanoscale*. 2015;7(6):2520–6. doi: 10.1039/c4nr06868h.
24. Shanbhogue AK, Karnad AB, Prasad SR. Tumor response evaluation in oncology: current update. *J Comput Assist Tomogr*. 2010;34(4):479–84. doi: 10.1097/RCT.0b013e3181db2670.
25. Stranadko EF, Volgin VN, Ryabov MV. Fotodinamicheskaya terapiya bazal'no-kletchnogo raka kozhi s primeneniem fotogema [Photodynamic therapy with photogem for basal-cell carcinoma of the skin]. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya [Clinical Dermatology and Venereology]*. 2008;6(6):28–33 (in Russian).
26. Lee Y, Baron ED. Photodynamic therapy: current evidence and applications in dermatology. *Semin Cutan Med Surg*. 2011;30(4):199–209. doi: 10.1016/j.sder.2011.08.001.
27. Shirmanova MV, Gavrina AI, Aksenova NA, Glagolev NN, Solovieva AB, Shakhov BE, Zagaynova EV. Comparative study of tissue distribution of chlorin e6 complexes with amphiphilic polymers in mice with cervical carcinoma. *J Anal Bioanal Tech*. 2014;5:1:008. doi: 10.4172/2155-9872.S1-008.
28. Sliakhtsin SV, Trukhachova TV, Petrov PT, Isaakov GA, Istomin YP. Investigation of tissue bio-distribution and plasma pharmacokinetics of Photolon® (Fotolon®) in intact and tumor-bearing rats. Evaluation of the ability of the photosensitizer to pass through intact histohematogenous barriers. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2008;5 Suppl 1:S6–S7. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1572-1000\(08\)70019-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1572-1000(08)70019-X).
29. Stranadko EF, Volgin VN, Lamotkin IA, Ryabov MV, Sadovskaya MV. Fotodinamich-



eskaya terapiya bazal'no-kletochnogo raka kozhi s fotosensibilizatorom fotoditazinom [The basal cell cancer of skin photodynamic therapy with photoditazin]. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal. 2008;7(4):7–11 (in Russian).

30. Kapinus VN, Kaplan MA, Spichenkova IS, Shubina AM, Yaroslavtseva-Isaeva EV. Fotodinamicheskaya terapiya s fotosensibilizatorom Fotolon ploskokletochnogo raka kozhi [Photodynamic

therapy of cutaneous squamous cell carcinoma with photosensitizer photolon]. Lazernaya meditsina [Laser Medicine]. 2012;16(2):31–4 (in Russian).

31. Mackenzie GD, Dunn JM, Selvasekar CR, Mosse CA, Thorpe SM, Novelli MR, Bown SG, Lovat LB. Optimal conditions for successful ablation of high-grade dysplasia in Barrett's oesophagus using aminolaevulinic acid photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.*

2009;24(5):729–34. doi: 10.1007/s10103-008-0630-7.

32. Liu B, Farrell TJ, Patterson MS. Comparison of noninvasive photodynamic therapy dosimetry methods using a dynamic model of ALA-PDT of human skin. *Phys Med Biol.* 2012;57(3):825–41. doi: 10.1088/0031-9155/57/3/825.

33. Taub AF. Cosmetic clinical indications for photodynamic therapy. *J Cosmet Dermatol.* 2012;25(5):218–24.

## The ways to optimize clinical outcomes of photodynamic therapy by optical imaging techniques

Gamayunov S.V.<sup>1</sup> • Skrebtsova R.R.<sup>2</sup> • Korchagina K.S.<sup>3</sup> • Sapunov D.A.<sup>4</sup> • Shakhova M.A.<sup>5</sup> • Shakhova N.M.<sup>6</sup>

**Background:** Photodynamic therapy (PDT) is a modern minimally invasive technique for treatment of a wide range of diseases, including malignancies. One of directions for PDT development is the individualization of exposure modes that can be achieved with effective treatment monitoring. There are a number of approaches employing imaging techniques, the most promising of them being optical ones. **Aim:** To analyze factors affecting clinical outcomes of PDT in non-melanoma skin tumors, and to evaluate the prospects of optical imaging techniques for PDT planning and monitoring. **Materials and methods:** We retrospectively analyzed various aspects of the results PDT obtained in 855 patients with non-melanoma skin tumors. PDT was performed with systemic chlorine photosensitizers. As a source of irradiation, the laser at a wavelength of 662 nm was used following exposure modes: mean power density 0.3 W/cm<sup>2</sup>, the laser irradiation dose of 200 J/cm<sup>2</sup> for basal cancer and 300 J/cm<sup>2</sup> for squamous cell carcinoma. Clinical evaluation was performed based on tumor response according to RECIST criteria, by the presence or absence of recurrence during long term follow up and by the presence or absence of cosmetic defects. Fluorescence imaging and optical coherence tomography were used as non-invasive imaging techniques. **Results:** It was found that clinical predictors of treatment failure included tumor recurrence, squamous type of tumor, and advanced exophytic or infiltrative component. Fluorescence imaging showed an

association between clinical outcomes of PDT and fluorescence characteristics of the photosensitizer. The best clinical outcomes were achieved in 147 patients with a combination of high contrast fluorescence (FC > 1.2) and a high degree of photobleaching of the agent ( $\Delta I/I_N > 25\%$ ): the number of complete tumor responses was 94% (138 of 147), with recurrence seen in 3 (2%) patients only with the follow up from 6 to 53 month duration. Clinical predictors of PDT cosmetic failures are tumor recurrence and tumor stage above T2. The most vulnerable zones are the outer ear and nose wings; this fact is related to an involvement of the cartilage located directly beneath the thin skin in the photodynamic reaction. This was demonstrated by optical coherence tomography. **Conclusion:** Presence of clinical predictors of PDT failure justifies correction of light exposure modes that can be optimally implemented with techniques for objective evaluation of the tumor borders, photosensitizer accumulation and photobleaching. Dynamic non-invasive monitoring of PDT procedure with fluorescence imaging and optical coherence tomography seems promising for implementation of an individual approach resulting in optimal oncological and functional outcomes.

**Key words:** photodynamic therapy, chlorine photosensitizers, basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, fluorescence imaging, optical coherent tomography

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-148-157

**Gamayunov Sergey V.** – MD, PhD, Deputy Chief Physician on Surgery<sup>1</sup>

**Skrebtsova Regina R.** – MD, Oncologist (Surgeon)<sup>2</sup>

**Korchagina Kseniya S.** – MD, PhD Student, Chair of Pathological Anatomy<sup>3</sup>

**Sapunov Dmitriy A.** – MD, Otolaryngologist<sup>4</sup>

**Shakhova Mariya A.** – MD, Assistant, Chair of ENT Diseases<sup>5</sup>

**Shakhova Nataliya M.** – MD, PhD, Leading Research Fellow, Laboratory of Biophotonics<sup>6</sup>

✉ 46 Ul'yanova ul., Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation. Tel.: +7 (831) 436 80 10.

E-mail: natalia.shakhova@gmail.com

<sup>1</sup> Republican Clinical Oncologic Dispensary of Ministry of Health and Social Development of the Chuvash Republic; 31 Gladkova ul., Cheboksary, 428020, Russian Federation

<sup>2</sup> Nizhny Novgorod Regional Oncologic Clinic; 190 Rodionova ul., Nizhny Novgorod, 603126, Russian Federation

<sup>3</sup> Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov; 20–1 Delegatskaya ul., Moscow, 127473, Russian Federation

<sup>4</sup> Nizhny Novgorod Regional State Hospital named after N.A. Semashko; 190 Rodionova ul., Nizhny Novgorod, 603126, Russian Federation

<sup>5</sup> Nizhny Novgorod State Medical Academy; 10/1 Minina i Pozharskogo ploshchad', Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation

<sup>6</sup> Institute of Applied Physics of the Russian Academy of Sciences; 46 Ul'yanova ul., Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation



# Определение фундаментальных физических параметров белков сыворотки крови для развития методов диагностики злокачественных новообразований

Гибизова В.В.<sup>1</sup> • Аненкова К.А.<sup>1</sup> • Масленникова А.Д.<sup>1</sup> • Федорова К.В.<sup>1</sup> • Сергеева И.А.<sup>1</sup> • Петрова Г.П.<sup>1</sup>

**Актуальность.** Для медицинской диагностики фундаментальной проблемой является исследование воздействия патологического состояния человека на белки плазмы и сыворотки крови. В качестве диагностических параметров предлагается использовать физические молекулярно-динамические характеристики белков, которые существенно изменяются при развитии болезни. **Цель** – проведение фундаментальных исследований молекулярных свойств белков сыворотки крови (их подвижность, межмолекулярные взаимодействия,

агрегация – образование наноразмерных белковых кластеров, изменение поверхностного заряда и др.) для развития методики диагностики онкологических заболеваний, направленной на создание экспресс-метода на базе лазерного светорассеяния и флуоресценции. **Материал и методы.** Для определения динамических параметров белков использованы методы лазерного светорассеяния. **Результаты.** Проведены сравнительные исследования модельных систем и нативных образцов сыворотки крови для диагностики новообразований

и рассмотрена возможность применения оптических параметров водных растворов сыворотки крови для создания методов диагностики онкологических заболеваний. **Заключение.** Методы светорассеяния дают достаточную информацию об изменении статических и динамических свойств белков сыворотки крови при патологии.

**Ключевые слова:** светорассеяние, диагностика онкологических заболеваний, сыворотка крови

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-158-164

Успешная разработка новых физических методов медицинской диагностики распространенных заболеваний, прежде всего онкологических, зависит от понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе патологии.

Цель данной работы – проведение фундаментальных исследований молекулярных свойств белков сыворотки крови (их подвижность, межмолекулярные взаимодействия, агрегация – образование наноразмерных белковых кластеров,

изменение поверхностного заряда и др.) для развития методики диагностики онкологических заболеваний, направленной на создание экспресс-метода на базе лазерного светорассеяния и флуоресценции. Область применения разработок – медицинская диагностика (скрининг и контроль лечения онкологических заболеваний).

Основой для разрабатываемой методики послужили исследования оптических свойств растворов заряженных биополимеров, включая белки. При этом исследовались статические



параметры макромолекул – эффективная масса, коэффициент межмолекулярного взаимодействия, анизотропия поляризуемости, а также ряд динамических параметров – коэффициент трансляционной диффузии, сорбционные свойства заряженных макромолекул в условиях наличия в растворе малых заряженных молекул различной природы. Все перечисленные параметры нелинейным образом зависят от свойств как макромолекул (поверхностный заряд, дипольный момент, концентрация, количество и тип гидрофобных и гидрофильных центров), так и растворителя (диэлектрическая проницаемость, вязкость, температура).

Авторы впервые предлагают методику совокупного определения статических и динамических параметров белков, а также наноразмерных белковых кластеров в плазме и сыворотке крови. При этом для определения динамических параметров белков могут быть использованы методы фотонно-корреляционной спектроскопии, интегрального лазерного светорассеяния и флуоресценции.

Многопараметрический метод диагностики и контроля эффективности лечения онкологических заболеваний, основанный на определении нескольких независимых физических параметров белков плазмы крови, является совершенно новым. Области этих параметрических данных, соответствующие случаям образцов плазмы крови, полученных от здоровых людей и онкологических больных, практически не перекрываются [1, 2, 3]. В нашей лаборатории разработан метод создания модельных систем сыворотки крови с оптическими параметрами, соответствующими «больной», «здоровой» крови и случаям так называемой группы риска.

Проводятся сравнительные исследования модельных систем и нативных (полученных из клиник) образцов сыворотки крови пациентов с онкологическими, неонкологическими заболеваниями и здоровых людей.

## Методы и материал

Метод статического рассеяния

При конечных концентрациях всегда будет существовать межмолекулярное взаимодействие, поэтому, согласно теории Дебая, интенсивность рассеянного света можно выразить через флуктуации концентрации, которые зависят от химического потенциала. В этом случае для разбавленных растворов макромолекул имеет место соотношение:

$$cHK/R_{90} = 1/M + 2Bc...$$

**Гибцова Виктория Валерьевна** – аспирант кафедры молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества, физический факультет<sup>1</sup>

**Аненкова Ксения Александровна** – аспирант кафедры молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества, физический факультет<sup>1</sup>

**Масленникова Анна Дмитриевна** – специалист по учебно-методической работе I категории учебного отдела деканата физического факультета<sup>1</sup>

**Федорова Ксения Вячеславовна** – ассистент кафедры молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества, физический факультет<sup>1</sup>  
 ☒ 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1/2, физический факультет МГУ.  
 Тел.: +7 (495) 939 10 88.  
 E-mail: fedorova@physics.msu.ru

**Сергеева Ирина Александровна** – канд. физ.-мат. наук, ст. преподаватель кафедры молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества, физический факультет<sup>1</sup>

**Петрова Галина Петровна** – д-р физ.-мат. наук, профессор кафедры молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества, физический факультет<sup>1</sup>

Это уравнение позволяет измеряемую в эксперименте величину  $R_{90}$  – рэлеевский коэффициент, или мутность, представить в виде вириального разложения по малым концентрациям.

Метод дает возможность прямого определения молекулярной массы  $M$  рассеивающих частиц, для чего необходимо измерить  $R_{90}$  при нескольких концентрациях и экстраполировать полученную зависимость к концентрации  $c=0$ . Наклон этой прямой, равный  $2B$ , позволяет вычислить второй вириальный коэффициент  $B$ , который характеризует степень отклонения поведения раствора от идеального и служит мерой межмолекулярного взаимодействия. Стоит заметить, что для растворов заряженных макромолекул – белков – очень существенным оказывается влияние поверхностного заряда молекулы на ее поведение в растворе, в частности, на параметр межмолекулярного взаимодействия.

Сравнительные измерения показали, что для здоровых людей и пациентов с онкологическими заболеваниями различаются такие параметры, как относительная интенсивность  $R$ , масса  $M$  и коэффициент взаимодействия  $B$ . В частности, в случае онкологического заболевания  $B$  становится отрицательным, а масса рассеивающих частиц увеличивается.

Динамическое рассеяние света белками плазмы крови

Динамическое светорассеяние связано с флуктуацией концентрации рассеивающих частиц. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии и параметра рассеяния от концентрации определяется одним и тем же вириальным коэффициентом. Иначе говоря, динамический параметр  $D_p$ , статические молекулярные параметры  $B$  и  $M$  и характеристическая вязкость  $\eta$  связаны уравнением:

$$D_p = B_0 \{1 + (2BM - [\eta]c)\}.$$

Рассмотренный диффузионный коэффициент входит в показатель степени корреляционной функции светорассеяния:

$$g^{(1)}(\tau) = \exp(-Dtq^2\tau).$$

В случае сыворотки крови, где основными белками являются альбумин и глобулин, логарифмическую зависимость корреляционной функции от времени можно аппроксимировать двумя прямыми.

Метод может быть использован для диагностики. Сравнительные измерения показывают, что некоторые динамические параметры макромолекул белков сыворотки крови в водных растворах могут значительно различаться по

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1, Российская Федерация



Таблица 1. Характеристики белков

Белок	Молекулярная масса, г/моль	Изоэлектрическая точка, pH	Коэффициент трансляционной диффузии белков в нейтральной среде (pH = 7,0), $D_i \times 10^7, \text{см}^2/\text{с}$
Бычий сывороточный альбумин	68 000	4,9	5,6
Гамма-глобулин	200 000	6	3,7

величине для здоровых людей и пациентов с онкологическими заболеваниями.

В работах [2, 3] установлено, что коэффициент  $D_i$  зависит от заряда на поверхности белка  $pH$  нелинейным образом с минимумом в изоэлектрической точке подобно параметру  $B$ . Таким образом, согласно результатам исследований динамических свойств заряженных макромолекул в растворах, динамические параметры существенно зависят от зарядового состояния поверхности белков и могут быть использованы для диагностики.

Коэффициент диффузии частиц обратно пропорционален характерному времени релаксации флуктуаций интенсивности рассеянного света. Это характерное время, в свою очередь, есть время затухания экспоненциальной временной корреляционной функции рассеянного света, которая измеряется с помощью цифрового коррелятора.

Размер частиц рассчитывается по формуле Стокса – Эйнштейна, которая связывает размер частиц с их коэффициентом диффузии и вязкостью жидкости [4].

В методе корреляции фотонов используется цифровой метод нахождения автокорреляционной функции фотоэлектронов. Измеряется мгновенная интенсивность излучения, которая преобразуется в мгновенное значение фототока на выходе фоторегистрирующего прибора. В этой связи основной задачей становится извлечение информации о корреляционной функции поля излучения из корреляционной функции фототока.

#### Материал

Условно все пациенты, чьи образцы крови исследовались в данной работе, были разделены на три группы: «онкологическая», или «большая», кровь – образцы, полученные от пациентов с диагностированными и подтвержденными онкологическими заболеваниями различной этиологии

и стадий; «неонкологическая» кровь – образцы, полученные от пациентов с хроническими заболеваниями неонкологической природы («группа неонкологического риска»); «здоровая» кровь – образцы, полученные от контрольной группы. Сравнительные измерения показали, что для здоровых людей и пациентов с онкологическими заболеваниями основные оптические параметры сыворотки крови различаются, следовательно, могут быть использованы для диагностики.

Основываясь на результатах биохимических исследований крови здоровых людей и онкологических больных, были получены соотношения альбумина и  $\gamma$ -глобулина в водных растворах, которые могут быть использованы в качестве модельных систем нативных образцов сыворотки крови здоровых людей и людей с онкологическими заболеваниями [5].

Для приготовления модельных растворов в работе использовались растворимые белки – бычий сывороточный альбумин и  $\gamma$ -глобулин фирмы “Sigma”. В табл. 1 приведены молекулярные веса, значения изоэлектрических точек, значения коэффициентов трансляционной диффузии в нейтральной среде этих белков.

В ходе экспериментов проводилось исследование чистых растворов альбумина и  $\gamma$ -глобулина, а также растворов смеси белков альбумина и  $\gamma$ -глобулина при различных массовых соотношениях, имитирующих реальные ситуации (табл. 2):

- 1) альбумина больше, чем  $\gamma$ -глобулина (нормальное соотношение белков в сыворотке «здоровой» крови);
- 2)  $\gamma$ -глобулина больше, чем альбумина (модель «онкологической» крови);
- 3) альбумина и  $\gamma$ -глобулина поровну (модель «группы неонкологического риска»).

#### Экспериментальные установки

Эксперименты по исследованию модельных и нативных растворов сыворотки крови проводились на установках Photocor Complex и Photocor Compact (рис. 1, 2).

#### Результаты

Экспериментальные исследования подвижности в белковых системах

На рис. 3 изображен корреляционный график зависимости коэффициента взаимодействия  $B$  от величины массы рассеивающих частиц в водных растворах сыворотки крови здоровых людей и онкологических пациентов. Наблюдается четкое пространственное разделение точек,



Рис. 1. Анализатор размеров частиц Photocor Compact

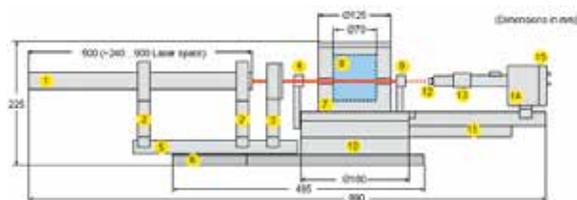


Рис. 2. Схема экспериментального оборудования (прибор Photocor Complex): 1 – лазер, 2 – держатели лазера, 3 – фокусирующая оптика, 4 – аттенуатор падающего света, 5 – оптическая скамья лазера, 6 – основание, 7 – термостат, 8 – держатель кювет, 9 – поворотное устройство с шаговым двигателем, 10 – аттенуатор прошедшего света, 11 – консоль поворотного устройства, 12 – апертурная диафрагма, 13 – приемная оптика системы счета фотонов, 14 – система счета фотонов, 15 – усилитель-дискриминатор

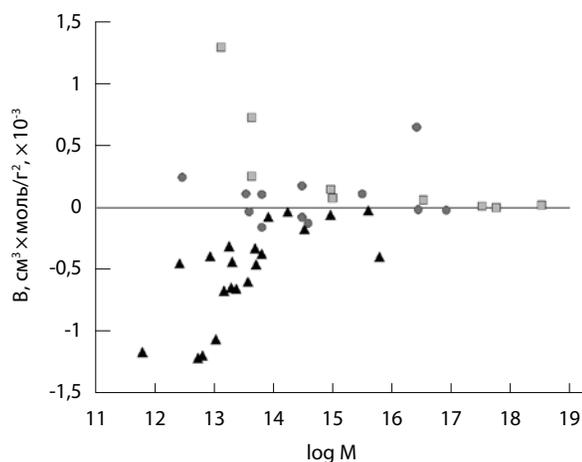


Рис. 3. Корреляционный график зависимости параметра  $B$  от логарифма величины массы рассеивающих частиц (треугольники соответствуют онкологическим заболеваниям, круглые точки – группа риска, квадраты – здоровые люди)

отображающих случаи онкологических больных и здоровых людей. Результаты, относящиеся к группе риска, локализируются вблизи линии, соответствующей  $B \sim 0$ .

Наиболее вероятно, что появление онкологического заболевания или предрасположенности к нему – результат изменения поверхностного

Таблица 2. Массовые соотношения белков в модельных растворах

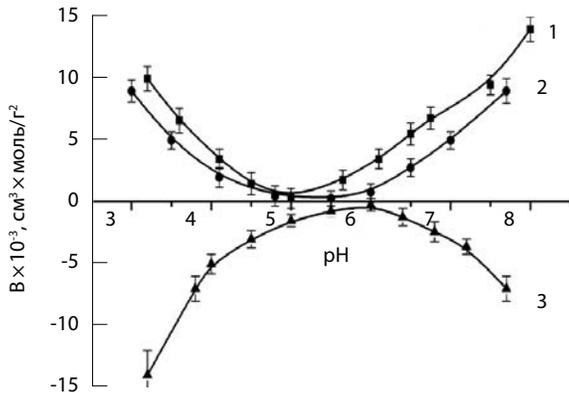
Модельный раствор	Альбумин, мг	Гамма-глобулин, мг
Сыворотка «здоровой» крови	5,5	1,6
Сыворотка крови «группы риска»	3,5	3,5
Сыворотка «больной» крови	1,6	5,5

заряда на молекулах белков. С уменьшением заряда кулоновские силы отталкивания между молекулами протеинов слабеют, и между ними начинают превалировать силы притяжения. Это приводит к изменению величины и знака коэффициента взаимодействия и к образованию комплексов молекул, обладающих массой большей, чем у отдельных протеинов. Этот вывод был подтвержден с помощью исследования модельных систем – растворов смесей белков, взятых в различных пропорциях. Были исследованы водные растворы некоторых белков при малых ионных силах и в широком диапазоне изменений  $pH$ . Исследования показали, что знак параметра  $B$  зависит от соотношения концентраций альбумина и  $\gamma$ -глобулина. При увеличении содержания  $\gamma$ -глобулина в растворе по сравнению с альбумином концентрационные зависимости параметра рассеяния становятся отрицательными.

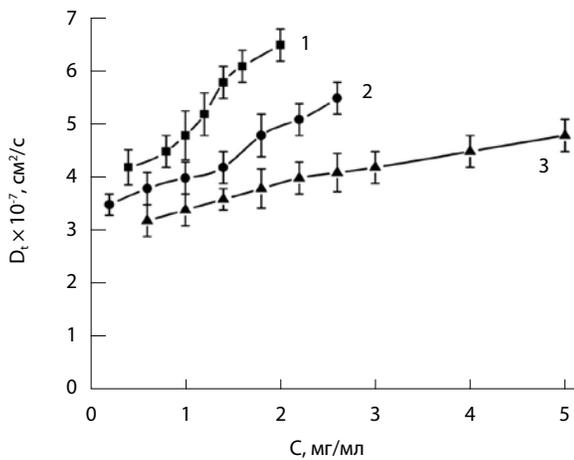
Методом динамического рассеяния света были получены зависимости коэффициентов  $B$  и трансляционной диффузии  $D_t$  рассеивающих центров от значений  $pH$  и от концентрации белков в исследуемых растворах (рис. 4, 5).

При увеличении концентрации белка возрастает коэффициент диффузии. Это можно объяснить на основе теории, предложенной Джеймсом и Эвансом,  $D_t = D_0(1 - \lambda_H c + \lambda_S c)$ , где коэффициент  $\lambda_H$ , связанный с гидродинамическими потерями энергии, значительно меньше коэффициента  $\lambda_S$ , связанного с электростатическими потерями энергии [6].

Графики зависимостей  $D_t(c)$  для модельных растворов имеют разный наклон. Наклон зависимости  $D_t(c)$  для модельного раствора сыворотки «здоровой» крови определяется наклоном зависимости  $D_t(c)$  для водного раствора альбумина, что связано с преобладанием альбумина в модельном растворе сыворотки «здоровой» крови. Аналогичная картина наблюдается для модельного раствора сыворотки «больной» крови, в котором характер зависимости задает  $\gamma$ -глобулин.



**Рис. 4.** Зависимость второго вириального коэффициента  $B$  от  $pH$ : для модельного раствора сыворотки «здоровой» крови (кривая 1), для модельного раствора крови сыворотки «группы риска» (кривая 2), для модельного раствора сыворотки «больной» крови (кривая 3)



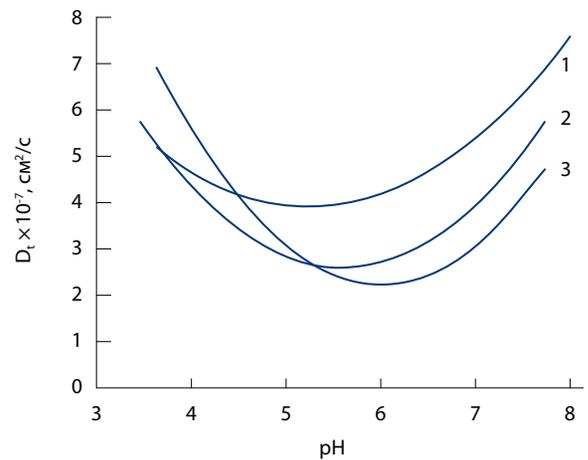
**Рис. 5.** Зависимость коэффициента трансляционной диффузии  $D_t$  от концентрации белка  $C$  при  $pH=7,0$  для сыворотки «здоровой» крови (кривая 1), для сыворотки крови «группы риска» (кривая 2), для сыворотки «больной» крови (кривая 3)

Были исследованы изменения коэффициента трансляционной диффузии, происходящие в модельных растворах сыворотки крови при изменении поверхностного заряда макромолекул и концентрации белка в растворе.

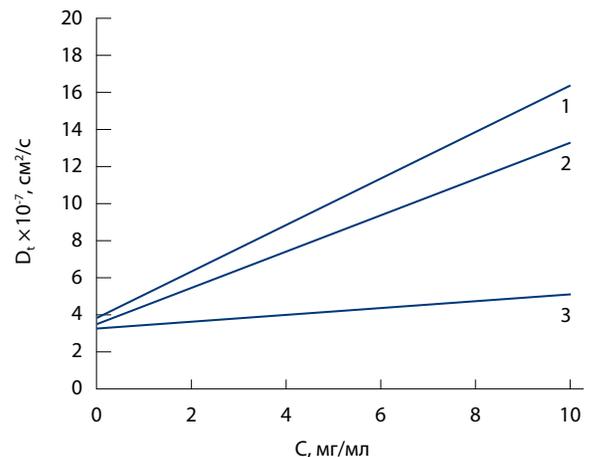
По результатам проведенных экспериментов установлено, что зависимости коэффициента трансляционной диффузии от поверхностного заряда макромолекул и концентрации раствора существенно различаются для модельных растворов сыворотки крови «здорового» и «больного» человека, в частности графики зависимости  $D_t(pH)$  различаются положением минимума коэффициента трансляционной диффузии (рис. 6), а графики зависимости  $D_t(c)$  – тангенсами угла

**Таблица 3.** Диапазон изменения угловых коэффициентов для зависимостей  $D_t(c)$  для модельных растворов

Модельный раствор	Значение углового коэффициента
Сыворотка «здоровой» крови	0,7–1,5
Сыворотка крови «группы риска»	0,3–0,9
Сыворотка «больной» крови	0,1–0,5



**Рис. 6.** Сравнительный график зависимостей  $D_t$  от  $pH$  для модельных растворов: кривая 1 – модель «здоровой» крови, кривая 2 – модель крови «группы риска», кривая 3 – модель «больной» крови



**Рис. 7.** Сравнительный график зависимостей  $D_t$  от концентрации для модельных растворов: кривая 1 – модель «здоровой» крови, кривая 2 – модель крови «группы риска», кривая 3 – модель «больной» крови

наклона (рис. 7). Значения угловых коэффициентов для модельных растворов приведены в табл. 3.

Изучение характера зависимостей коэффициента трансляционной диффузии и сравнение экспериментальных данных с теорией (Скетчарда



и Джеймса – Эванса) показали, что метод динамического рассеяния света, примененный для исследования сыворотки крови, может рассматриваться как перспективный метод диагностики онкологических заболеваний.

Изучение взаимодействия ионов цезия с модельными и нативными растворами сыворотки крови методом статического рассеяния света Клиническими испытаниями подтверждено, что хлорид цезия может быть эффективным противоопухолевым средством при комплексной терапии некоторых форм рака, а также при нейродегенеративных заболеваниях [7]. Хлорид цезия оказывается перспективным для использования в целях диагностики онкологических заболеваний на ранних стадиях болезней.

В связи с этим можно изучить механизм взаимодействия ионов цезия с основными белками сыворотки крови – альбумином (рис. 8) и  $\gamma$ -глобулином (рис. 9). При добавлении хлорида цезия в раствор сыворотки крови здоровых людей наклон зависимости сохраняется (рис. 10), то есть он не меняет своего знака. Во втором случае наклон становится положительным (рис. 11). Как можно видеть, добавление хлорида цезия в раствор нативной сыворотки больных пациентов приводит к изменению наклонов концентрационных зависимостей параметра рассеяния с отрицательного на положительный (см. рис. 9 и 11).

## Выводы

1. Исследования модельных систем сыворотки крови показали, что для «здоровых» пациентов зависимость параметра рассеяния  $cH/R_{90}$  имеет положительный наклон, а для «больных» – отрицательный.
2. По результатам проведенных экспериментов было установлено, что зависимости коэффициента трансляционной диффузии от поверхностного заряда макромолекул и концентрации раствора существенно различаются для модельных растворов сыворотки крови «здорового» и «больного» человека, в частности графики зависимости  $D_t(pH)$  различаются положением минимума коэффициента трансляционной диффузии, а графики зависимости  $D_t(c)$  – тангенсами угла наклона.
3. В модельных растворах сыворотки крови «здоровых» пациентов с добавлением хлорида цезия знак коэффициента межмолекулярного взаимодействия не меняется (положительный наклон сохраняется), а в модельных образцах сыворотки крови «больных» пациентов он

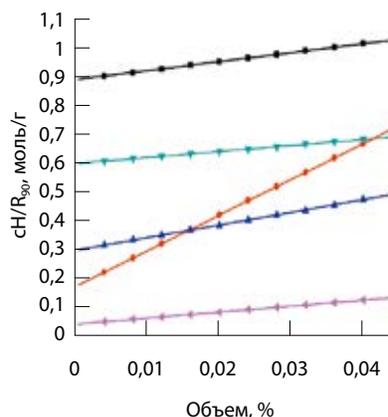


Рис. 8. График концентрационной зависимости параметра рассеяния  $cH/R_{90}$  нативных образцов сыворотки крови здоровых пациентов

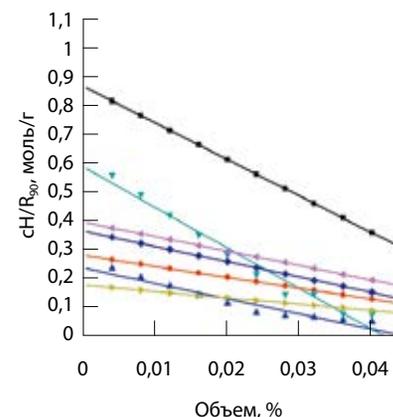


Рис. 9. График концентрационной зависимости параметра рассеяния  $cH/R_{90}$  нативных образцов сыворотки крови больных пациентов

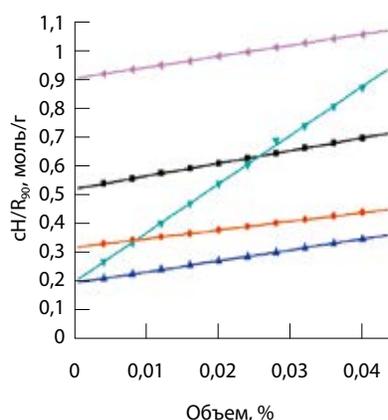


Рис. 10. График концентрационной зависимости параметра рассеяния  $cH/R_{90}$  нативных растворов сыворотки крови здоровых пациентов с добавлением хлорида цезия

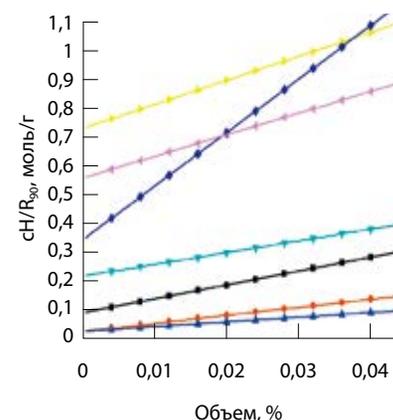


Рис. 11. График концентрационной зависимости параметра рассеяния  $cH/R_{90}$  нативных растворов сыворотки крови больных пациентов с добавлением хлорида цезия

меняется на противоположный (отрицательный наклон становится положительным).

4. Значение эффективной массы рассеивающих частиц в модельных растворах «больных» пациентов значительно больше значения массы для модельных растворов «здоровых», что, вероятно, связано с агрегацией молекул  $\gamma$ -глобулина при воздействии ионов цезия в первом случае.
5. Результаты, полученные для нативных образцов сыворотки крови, хорошо согласуются с результатами для модельных растворов.
6. Данные могут быть использованы при разработке альтернативных методов диагностики и лечения онкологических заболеваний, в том числе, возможно, и на ранних стадиях. ©



## Литература

1. Петрусевич ЮМ, Петрова ГП, Берловская ЕЕ, Макуренок АМ, Сергеева ИА, Федорова КВ. Диагностика онкологических заболеваний методами ЯМР, ЭПР и светорассеяния. Медицинская физика. 2009;(4):73–9.
2. Петрова ГП, Петрусевич ЮМ, Алексеев СГ, Иванов АВ. Метод рэлеевского рассеяния в диагностике онкологических заболеваний. В: Сборник научных трудов «Медицинская физика – 2002». М.: МГУ, физический факультет; 2002. с. 156–67.
3. Папок ИМ, Петрова ГП, Аненкова КА, Папиш ЕА. Исследование модельных растворов сыворотки крови методом динамического рассеяния света. Вестник Московского университета. Серия 3. Физика и астрономия. 2012;(5):39–43.
4. Pecora R. Dynamic light scattering from macromolecules. Stanford University; 1984.
5. Petrova GP, Boiko AV, Fedorova KV, Sergeeva IA, Sokol NV, Tichonova TN. Optical properties of solutions consisting of albumin and g-globulin molecules in different ratio modeling blood

serum. Laser Physics. 2009;19(6):1303–7. doi: 10.1134/S1054660X09060218.

6. Бриллиантов ВН, Ревокатов ОП. Молекулярная динамика неупорядоченных сред. М.: Издательство Московского университета; 1996. 160 с.
7. Zhong J, Yao W, Lee W. Cesium chloride protects cerebellar granule neurons from apoptosis induced by low potassium. Int J Dev Neurosci. 2007;25(6):359–65. doi: 10.1016/j.jidvneu.2007.07.003.

## References

1. Petrusevich YuM, Petrova GP, Berlovskaya EE, Makurenkov AM, Sergeeva IA, Fedorova KV. Diagnostika onkologicheskikh zabolevaniy metodami YaMR, EPR i svetorasseyaniya [Diagnosis of cancer by NMR, EPR and light scattering]. Meditsinskaya fizika. 2009;(4):73–9 (in Russian).
2. Petrova GP, Petrusevich YuM, Alekseev SG, Ivanov AV. Metod releevskogo rasseyaniya v diagnostike onkologicheskikh zabolevaniy [Rayleigh scattering method in the diagnosis of cancer]. In: Sbornik nauchnykh trudov “Meditsinskaya fizika – 2002” [Medical Phys-

ics – 2002]. Moscow: MSU, Faculty of Physics; 2002. p. 156–67 (in Russian).

3. Papok IM, Petrova GP, Anenkova KA, Papish EA. Using the dynamic light-scattering method for the analysis of a blood-serum model solution. Moscow University Physics Bulletin. 2012;67(5):39–43. doi: 10.3103/S0027134912050104.
4. Pecora R. Dynamic light scattering from macromolecules. Stanford University; 1984.
5. Petrova GP, Boiko AV, Fedorova KV, Sergeeva IA, Sokol NV, Tichonova TN. Optical properties of solutions consisting of albumin and g-glob-

ulin molecules in different ratio modeling blood serum. Laser Physics. 2009;19(6):1303–7. doi: 10.1134/S1054660X09060218.

6. Brilliantov VN, Revokatov OP. Molekulyarnaya dinamika neuporyadochennykh sred [Molecular dynamics of unordered environment]. Moscow: Publishing House of Moscow State University; 1996. 160 p. (in Russian).
7. Zhong J, Yao W, Lee W. Cesium chloride protects cerebellar granule neurons from apoptosis induced by low potassium. Int J Dev Neurosci. 2007;25(6):359–65. doi: 10.1016/j.jidvneu.2007.07.003.

# Determination of fundamental physical parameters of blood serum proteins for development the methods for cancer diagnosis

Gibizova V.V.<sup>1</sup> • Anenkova K.A.<sup>1</sup> • Maslennikova A.D.<sup>1</sup> • Fedorova K.V.<sup>1</sup> • Sergeeva I.A.<sup>1</sup> • Petrova G.P.<sup>1</sup>

**Background:** A fundamental problem of medical diagnostics as an assessment of human plasma and serum proteins in various pathologic states. Physical molecular and dynamic characteristics of proteins that are significantly changed during a disease have been proposed as diagnostic parameters. **Aim:** To conduct fundamental research on molecular properties of serum proteins, such as their mobility, intermolecular interactions, aggregation/formation of nanoscale protein clusters, abnormalities of the surface charge, etc., for subsequent development of methods for early diagnostics of cancer based on laser light scattering and fluorescence. **Materials and methods:** The parameters of protein dynamics were assessed

by laser light scattering methods. **Results:** We performed comparative assessments in model systems and native serum samples for cancer diagnostics and analyzed the possibility to use optical parameters of water serum solutions for development of cancer diagnostic methods. **Conclusion:** Light scattering methods provide sufficient information on changes of the static and dynamic properties of the serum proteins over time during various pathological conditions.

**Key words:** light scattering, cancer diagnostics, serum

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-158-164

**Gibizova Viktoriya V.** – PhD Student, Chair of Molecular Processes and Extreme Matter States, Faculty of Physics<sup>1</sup>

**Anenkova Kseniya Aleksandrovna** – PhD Student, Chair of Molecular Processes and Extreme Matter States, Faculty of Physics<sup>1</sup>

**Maslennikova Anna D.** – Specialist on Education and Methodology, Department of Education, Deanery of the Faculty of Physics<sup>1</sup>

**Fedorova Kseniya V.** – Assistant, Chair of Molecular Processes and Extreme Matter States, Faculty of Physics<sup>1</sup>

✉ MSU, Faculty of Physics, 1/2 Leninskie gory, Moscow, 119991, Russian Federation.  
Tel.: +7 (495) 939 10 88.  
E-mail: fedorova@physics.msu.ru

**Sergeeva Irina A.** – PhD (in Physics and Mathematics), Senior Lecturer, Chair of Molecular Processes and Extreme Matter States, Faculty of Physics<sup>1</sup>

**Petrova Galina P.** – PhD (in Physics and Mathematics), Professor, Chair of Molecular Processes and Extreme Matter States, Faculty of Physics<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie gory, Moscow, 119991, Russian Federation



# Исследование воздействия ионизирующего излучения на ткани методом лазерной флуоресцентной спектроскопии *in vivo*

Гусева И.А.<sup>1,2</sup> • Куликова П.А.<sup>1</sup> • Быченков О.А.<sup>1</sup> • Рогаткин Д.А.<sup>1</sup> • Куликов Д.А.<sup>1</sup> • Чурсинова Ю.В.<sup>1</sup> • Бобров М.А.<sup>1</sup>

**Гусева Ирина Андреевна** – техник лаборатории медико-физических исследований<sup>1</sup>, аспирант факультета экспериментальной и теоретической физики<sup>2</sup>

✉ 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2–9, Российская Федерация.  
Тел.: +7 (495) 681 89 84.  
E-mail: gusevairinaand@gmail.com

**Куликова Полина Александровна** – клинический ординатор отделения терапевтической эндокринологии, лаборант по разделу «Наука» лаборатории медико-физических исследований<sup>1</sup>

**Быченков Олег Александрович** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., отделение радиологии<sup>1</sup>

**Рогаткин Дмитрий Алексеевич** – д-р техн. наук, заведующий лабораторией медико-физических исследований<sup>1</sup>

**Куликов Дмитрий Александрович** – канд. мед. наук, ученый секретарь<sup>1</sup>

**Чурсинова Юлия Владимировна** – науч. сотр., отделение планирования и координации научных исследований; ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики факультета усовершенствования врачей<sup>1</sup>

**Бобров Максим Александрович** – науч. сотр., патологоанатомическое отделение<sup>1</sup>

**Актуальность.** Лазерная флуоресцентная спектроскопия (ЛФС) широко используется в различных медицинских направлениях, наиболее известное из которых – онкология. В основном ЛФС применяют для *in vivo* диагностики опухолей. Последние исследования показали, что ЛФС можно использовать для диагностики локального воспаления, инициированного термическим или механическим воздействием. Представляет интерес, возможно ли оценить методом ЛФС поражение мягких биологических тканей, вызванное лучевым воздействием. **Цель** – исследование динамики флуоресценции экзогенного фотосенсибилизатора в области лучевого поражения методом ЛФС *in vivo*. **Материал и методы.** В исследовании участвовали мыши линии SHK (n=12), правая задняя конечность которых подвергалась облучению на гамма-терапевтическом аппарате РОКУС-АМ (источник <sup>60</sup>Со, доза 15 Гр). Перед облучением всем животным внутривенно был введен фотосенсибилизатор Фотосенс из расчета 2,5 мг/кг. Измерения флуоресценции проводили на комплексе многофункциональной лазерной диагностики «ЛАКК-М» в течение 21 суток,

длина волны возбуждения флуоресценции – 635 нм. Параллельно на 7- и 21-е сутки проводили гистологическое исследование области лучевого поражения и исследование лейкоцитарной формулы крови экспериментальных животных. **Результаты.** Метод ЛФС выявил увеличение накопления фотосенсибилизатора в области поражения по сравнению с интактной симметричной областью, что приводило к повышению интенсивности сигнала флуоресценции в облученной конечности. Динамика сигнала флуоресценции пораженной области имеет два характерных максимума – на 3-и и 14-е сутки, что, возможно, отражает динамику развития локального лучевого поражения. **Заключение.** Применение метода ЛФС с использованием экзогенного фотосенсибилизатора имеет потенциал для персонализированной оценки лучевых реакций в радиологии.

**Ключевые слова:** спектроскопия, флуоресценция, воспаление, ионизирующее излучение, фотосенсибилизатор

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-165-171

<sup>1</sup> ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГАОУ ВПО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»; 115409, г. Москва, Каширское шоссе, 31, Российская Федерация

Уже более 25 лет лазерная флуоресцентная спектроскопия (ЛФС) *in vivo* находит свое применение в различных медицинских направлениях [1–3]. Наибольшее распространение ЛФС получила в онкологии. Сегодня для диагностирования опухолевых образований используется множество методик, основанных на явлении флуоресценции [4–6]. С помощью ЛФС также осуществляют контроль фотодинамической терапии [7].

Недавно мы показали, что регистрацию как эндогенных, так и экзогенных флуорофоров методом ЛФС можно использовать для диагностики воспалительных процессов в тканях [8]. Это открывает новые перспективы применения метода и в клинике, и в экспериментальной медицине. Представленная работа направлена на изучение возможности оценки методом ЛФС с экзогенным фотосенсибилизатором воспалений в мягких тканях после воздействия на них гамма-излучения, что может найти свое применение в качестве метода контроля лучевых реакций в радиологии.

Лучевая терапия в онкологии признана эффективным методом. При лечении опухолей орофарингеальной зоны, например, особенно широко используется дистанционная гамма-терапия. Будучи универсальным способом терапевтического воздействия на первичную опухоль и зоны регионарного метастазирования, она, тем не менее, обладает побочными эффектами – различными лучевыми реакциями, проявляющимися в середине курса терапии в виде локального воспаления, островкового и сливного эпителиита и сопровождающимися сильными болевыми ощущениями [9, 10]. Это приводит к необходимости для каждого пациента делать перерыв в радиотерапии, фракционировать дозу [11]. Сегодня в арсенале радиологов нет дешевых, неинвазивных и объективных инструментальных методов прогноза и оценки момента наступления воспаления у конкретного пациента, то есть отсутствует возможность определить, когда этот перерыв целесообразен. Метод ЛФС может помочь количественно описать состояние воспаленных тканей после воздействия гамма-облучения. Соответственно, анализ объективных показателей позволит сделать фракционирование доз в лучевой терапии более обоснованным, персонализированным, а значит, более эффективным.

В литературе можно встретить много описаний отдаленных последствий локального облучения в относительно больших дозах [12, 13]. Дело в том, что для локального лучевого поражения кожи свойственно наличие латентного периода,

длительность которого у человека составляет в среднем 1–3 недели и зависит от дозы облучения, индивидуальной чувствительности и ряда других факторов [14, 15]. Безусловно, наибольшую клиническую значимость для фракционирования дозы облучения может приобрести метод, способный неинвазивно оценить даже минимальные локальные изменения в ткани уже на ранних сроках после воздействия облучения.

Цель работы – исследование динамики флуоресценции экзогенного фотосенсибилизатора в области лучевого поражения методом ЛФС *in vivo*.

## Материал и методы

Был проведен эксперимент по моделированию воспаления путем облучения здоровых конечностей мышей и изучению характера накопления экзогенного фотосенсибилизатора в мягких тканях области поражения. Исследование проводили на мышах линии SHK ( $n = 12$ ). Все экспериментальные исследования были выполнены с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, а также принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС) и в Приказе Минздрава СССР № 755 от 12 августа 1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

Облучению на ротационно-конвергентном гамма-терапевтическом аппарате «РОКУС-АМ» (рис. 1) подвергалась одна (правая задняя) конечность животного. Контралатеральная конечность оставалась интактной. Источником в аппарате «РОКУС-АМ» является  $^{60}\text{Co}$ , доза составила 15 Гр.



Рис. 1. Гамма-терапевтический ротационно-конвергентный компьютеризированный комплекс для реализации методов лучевой терапии «РОКУС-АМ»

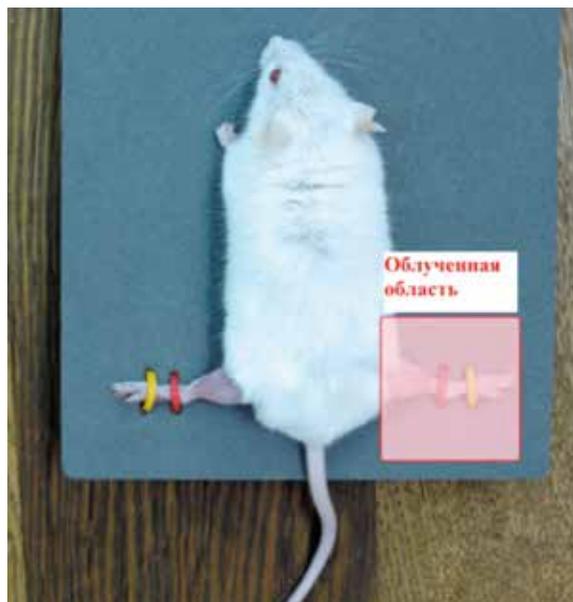


Рис. 2. Расположение облученной области

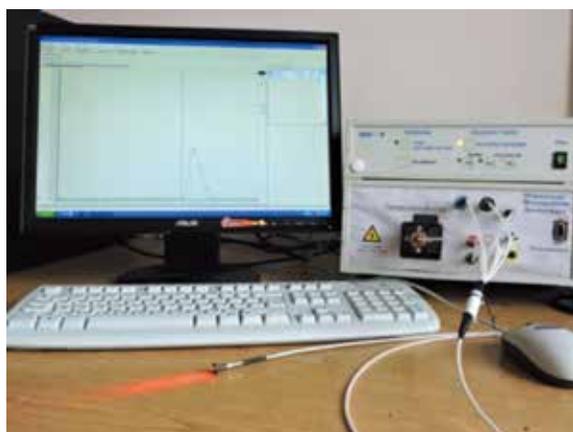


Рис. 3. Диагностический комплекс «ЛАКК-М»

Для того чтобы зафиксировать область воздействия, мыши находились в период облучения под действием наркоза и были закреплены на подложке. Облученная область формировалась свинцовыми брусками и для наглядности подсвечивалась, ее расположение представлено на рис. 2.

За сутки перед облучением всем животным внутрибрюшинно был введен фотосенсибилизатор Фотосенс из расчета 2,5 мг/кг. В течение всего эксперимента в контрольные дни наблюдения проводилось измерение интенсивности флуоресценции методом ЛФС *in vivo*. Показания снимались с поверхности кожи непосредственно над пораженной областью и в симметричной точке на

контралатеральной конечности. Измерения выполнялись на 0-, 3-, 7-, 10-, 14-, 17- и 21-е сутки. За нулевую точку взято значение флуоресценции до нанесения лучевого поражения. Все измерения проводились на многофункциональном лазерном диагностическом комплексе «ЛАКК-М» (рис. 3) [16, 17], режим работы комплекса «ЛАКК-М» – «флуоресценция». Для возбуждения флуоресценции применялся лазер с длиной волны излучения 635 нм.

Для количественной оценки наличия воспаления по измеренным интенсивностям флуоресценции использовался относительный индекс интенсивности флуоресценции мягких тканей  $\eta(\lambda_f)$ , рассчитываемый по формуле:

$$\eta(\lambda_f) = I_f(\lambda_f) / I_{f0}(\lambda_f),$$

где  $I_f$  – интенсивность флуоресценции области воспаления,  $I_{f0}$  – интенсивность флуоресценции контралатеральной области,  $\lambda_f$  – длина волны флуоресценции. Известно, что Фотосенс при воздействии света с длиной волны 635 нм может быть использован для флуоресцентно-диагностического обследования, при этом пик интенсивности флуоресценции наблюдается на длине волны 690 нм, поэтому в данной работе для вычисления интенсивности флуоресценции было принято  $\lambda_f = 690$  нм.

Дополнительно животные постепенно выводились из эксперимента для проведения гистологического исследования пораженной конечности на 0-, 7- и 21-е сутки (по 2 мыши в каждой точке). Гистологическое исследование производилось по стандартному протоколу с изготовлением парафиновых срезов толщиной 4 мкм и окраской их гематоксилином и эозином. Конечности животных были исследованы полностью на разных уровнях, проходящих перпендикулярно оси бедренной кости. Для оценки системного ответа у экспериментальных животных на лучевое поражение в эти же сроки – на 0-, 7- и 21-е сутки – проводилось исследование лейкоцитарной формулы крови.

## Результаты и обсуждение

На рис. 4 показана динамика изменения индекса интенсивности флуоресценции у экспериментальных животных на разных сроках после облучения, усредненная по всей экспериментальной группе животных. Метод ЛФС выявил в среднем увеличение интенсивности сигнала флуоресценции в области лучевого поражения на 10–30% по сравнению с интактной симметричной областью

в течение первых 16 суток эксперимента. До начала исследований и после 16 суток индекс интенсивности флуоресценции оказался близок к единице. Такой период протекания воспалительного процесса – порядка 14 дней – известен в радиобиологии. В этой связи логично предположить, что временное увеличение индекса интенсивности в течение первых 16 суток отражает локальный воспалительный ответ на лучевое воздействие. Более того, на рис. 4 ярко выражены два максимума значений индекса воспаления: на 3-и и 14-е сутки, которые, возможно, отражают еще и стадии воспалительного процесса.

Известно, что локальная воспалительная реакция в большинстве случаев проявляется более или менее стереотипными процессами в очаге поражения: локальные альтеративные изменения сменяются преимущественно экссудативными реакциями и далее – в основном пролиферативными процессами [18]. В нашем эксперименте первый пик флуоресценции пришелся, возможно, на «латентную фазу» лучевого поражения. Предположительно, он отражает в основном альтеративные изменения в ткани и ультраструктурные изменения в клетках в ответ на повреждающее воздействие. Локальное изменение метаболизма тканей, высвобождение ферментов из клеток – сложный комплекс изменений, который может быть обусловлен реакцией тканей на гамма-излучение. Второй пик может быть обусловлен развитием развернутой воспалительной реакции, что отразилось в изменении общего анализа крови (относительный нейтрофилез).

Исследование лейкоцитарной формулы крови у экспериментальных животных на 0-, 7- и 21-е сутки выявило тенденцию к уменьшению абсолютного количества лейкоцитов в сочетании с относительным увеличением процентного содержания нейтрофилов. Такая картина, вероятнее всего, отражает реактивные изменения

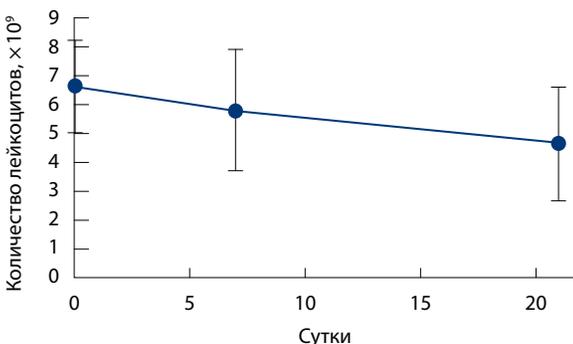


Рис. 5. Среднее количество лейкоцитов в клиническом анализе крови у экспериментальных животных

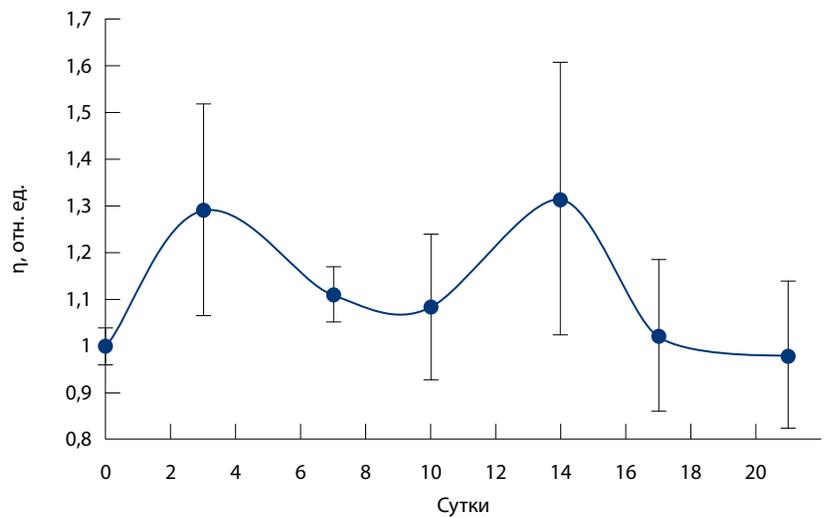


Рис. 4. Динамика индекса интенсивности воспаления

крови экспериментальных животных в ответ на лучевое воздействие и появление местной воспалительной реакции (рис. 5, 6). Как видно на графике, относительный нейтрофилез приходится на 7–21-е сутки. Именно в этот интервал попадает второй пик флуоресценции, что, скорее всего, свидетельствует о развитии развернутой местной воспалительной реакции в очаге поражения, куда мигрируют лейкоциты. Кроме того, известно, что в отличие от человеческой бедренная кость взрослой мыши содержит красный костный мозг, богатый гемопоэтическими клетками не только в эпифизах, но и в диафизе. В этой связи при проведении экспериментальных работ на мышах бедренная кость часто служит основным местом забора костного мозга [19]. Таким образом, облучение задней конечности для мышей может оказывать определенное воздействие и на гемопоэз, способное отразиться угнетением кроветворения.

Гистологический анализ области облучения на 7-е сутки выявил у одного из двух выведенных

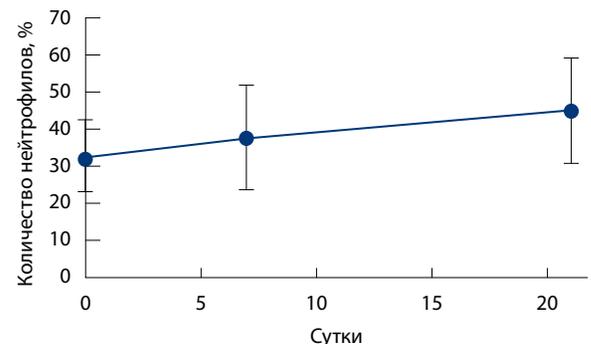
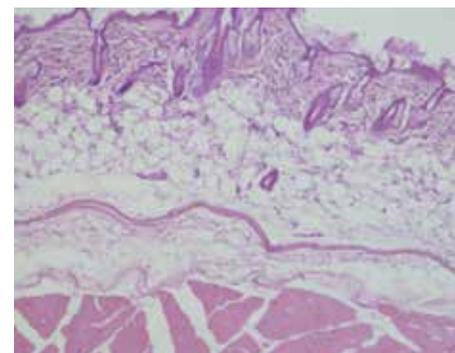
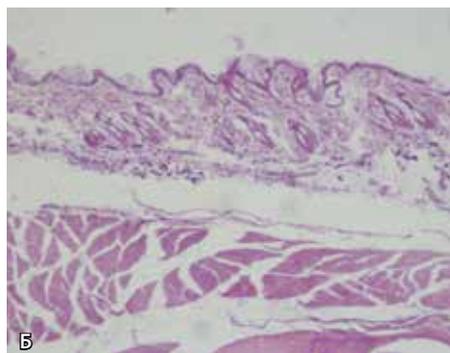
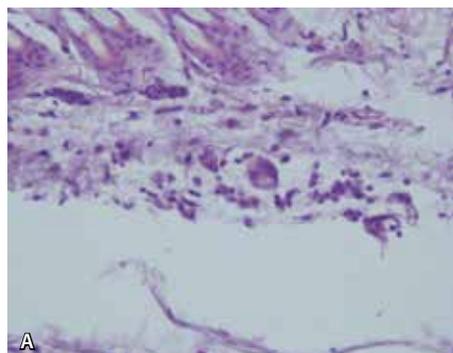


Рис. 6. Среднее процентное содержание нейтрофилов в клиническом анализе крови у экспериментальных животных



**Рис. 7.** Седьмой день после облучения. Мелкоочаговые лимфоплазмочитарные инфильтраты в коже. Окраска гематоксилином и эозином. **А** –  $\times 400$ , **Б** –  $\times 100$

**Рис. 8.** Двадцать первые сутки после облучения. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$

из эксперимента животных в коже единичные мелкоочаговые лимфоплазмочитарные инфильтраты (рис. 7), что свидетельствует о невыраженном локальном воспалительном процессе. Следует особо отметить: данное гистологическое исследование совпало по времени с «провалом» в графике зависимости индекса флуоресценции от времени, поэтому выраженность воспалительного процесса в этот период времени по данным, полученным методом ЛФС, и не должна быть слишком сильной (если наше предположение верно).

Гистологическое исследование на 21-е сутки выявило отсутствие патологических изменений в коже, подкожной жировой клетчатке и поперечно-полосатой мышечной ткани (рис. 8). Воспаление на 21-е сутки не было обнаружено и методом ЛФС, что указывает на предварительную хорошую корреляцию результатов. Однако, учитывая наличие двух максимумов на рис. 4, в последующих экспериментах необходимо проведение более частого гистологического исследования, так как не исключено, что наши предположения о стадийности воспалительного процесса могут оказаться не верны и, возможно, это внесет коррективы в предложенную интерпретацию полученных результатов.

В целом исследование методом ЛФС показало активное достоверно повышенное накопление экзогенного фотосенсибилизатора Фотосенс и, как следствие, повышенную интенсивность флуоресценции облученной области по сравнению с интактной уже на 3-и сутки после радиационного воздействия. Это может в определенной степени повлиять на интерпретацию полученных нами ранее данных по динамике сигнала флуоресценции в процессе лучевой терапии онкологических больных [20, 21]. Увеличение флуоресценции

в ранний период после лучевого воздействия свидетельствует о высокой чувствительности метода и о возможности его применения в практике лучевой терапии для индикации начала острой фазы лучевой реакции. Низкая же амплитуда колебаний индекса флуоресценции в данном исследовании, вероятнее всего, связана с относительно небольшой дозой облучения для бедра мыши. Кроме того, объяснение патофизиологии локальных и системных изменений является пока лишь предположительным, более полноценное толкование полученных данных можно будет сделать только после проведения повторных экспериментов с большими дозами облучения и исследованием гистологической картины в период максимумов накопления фотосенсибилизатора. В свете изложенного в перспективе в аналогичном эксперименте крайне интересным представляется изучение гистологической картины и анализов крови более часто по дням эксперимента, чтобы не пропустить период максимумов накопления фотосенсибилизатора.

## Заключение

В ходе исследований зафиксировано достоверное увеличение флуоресценции экзогенного фотосенсибилизатора в изучаемой области лучевого воспаления. На данном этапе работы получены первые пилотные результаты. Но они позволяют сделать предположение о перспективности использования метода ЛФС с экзогенным фотосенсибилизатором для качественной и количественной оценки локального лучевого поражения (воспаления). Предложенный метод может найти свое применение в клинической радиологии и сделать фракционирование доз облучения при лучевой терапии более персонализированным. ©



## Литература

1. Филоненко ЕВ. История развития флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии и их возможности в онкологии. Российский химический журнал. 2013;57(2):5–9.
2. Иванова СВ, Кирпиченко ЛН. Использование флуоресцентных методов в медицине. Медицинские новости. 2008;(12):56–61.
3. Рогаткин ДА. Физические основы лазерной клинической флуоресцентной спектроскопии in vivo. Медицинская физика. 2014;(4):78–96.
4. Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM. Further evaluation of the use of hematoporphyrin derivative as a new aid for the endoscopic detection of malignant disease. *Dis Chest*. 1964;46:676–9.
5. Calin MA, Parasca SV, Savastru R, Calin MR, Dontu S. Optical techniques for the noninvasive diagnosis of skin cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013;139(7):1083–104. doi: 10.1007/s00432-013-1423-3.
6. Murayama Y, Ichikawa D, Koizumi N, Komatsu S, Shiozaki A, Kuriu Y, Ikoma H, Kubota T, Nakanishi M, Harada Y, Fujiwara H, Okamoto K, Ochiai T, Kokuba Y, Takamatsu T, Otsuji E. Staging fluorescence laparoscopy for gastric cancer by using 5-aminolevulinic acid. *Anticancer Res*. 2012;32(12):5421–7.
7. Andersson-Engels S, Berg R, Svanberg K, Svanberg S. Multi-colour fluorescence imaging in connection with photodynamic therapy of delta-amino levulinic acid (ALA) sensitised skin malignancies. *Bioimaging*. 1995;3(3):134–43. doi: 10.1002/1361-6374(199509)3:3<134::AID-BIO4>3.0.CO;2-1.
8. Петрицкая ЕН, Куликов ДА, Рогаткин ДА, Гусева ИА, Куликова ПА. Использование флуоресцентной спектроскопии для диагностики гипоксии и воспалительных процессов в тканях. *Оптический журнал*. 2015;82(12):41–6.
9. Nuyts S, Lambrecht M, Duprez F, Daisne JF, Van Gestel D, Van den Weyngaert D, Platteaux N, Geussens Y, Voordeckers M, Madani I, De Neve W. Reduction of the dose to the elective neck in head and neck squamous cell carcinoma, a randomized clinical trial using intensity modulated radiotherapy (IMRT). Dosimetrical analysis and effect on acute toxicity. *Radiother Oncol*. 2013;109(2):323–9. doi: 10.1016/j.radonc.2013.06.044.
10. Тамаркина ЕИ, Миронова ЕБ, Жаркова ОВ, Коробкин СА, Тамаркин ВО, Вихлянов ИВ, Карасева ВВ. Химиолучевое лечение местнораспространенного рака органов полости рта и ротоглотки. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*. 2006;17(3):49–53.
11. Чиссов ВИ, Давыдов МИ, ред. Онкология: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2008. 1072 с.
12. Flanders KC, Sullivan CD, Fujii M, Sowers A, Anzano MA, Arabshahi A, Major C, Deng C, Russo A, Mitchell JB, Roberts AB. Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation. *Am J Pathol*. 2002;160(3):1057–68. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64926-7.
13. Weissberg JB, Fischer JJ. Effect of purine nucleosides and nucleotides on the in vivo radiation response of normal tissue in the rat. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1981;7(3):365–9. doi: 10.1016/0360-3016(81)90110-3.
14. Gottlöber P, Krähn G, Peter RU. Cutaneous radiation syndrome: clinical features, diagnosis and therapy. *Hautarzt*. 2000;51(8):567–74.
15. Пиголкин ЮИ, Квачева ЮЕ. Современные возможности судебно-медицинской экспертизы местной радиационной травмы. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2012;(3):52–5.
16. Горенков ПВ, Казаков АА, Назаренко ММ, Рогаткин ДА, Свиринов ВН, Черкасов АС, Черненко ВП. Способ определения состояния биологической ткани и диагностическая система для его реализации. Патент РФ на изобретение № 2234242 от 19.03.2002.
17. Rogatkin D, Shumskiy V, Tereshenko S, Polyakov P. Laser-based non-invasive spectrophotometry – an overview of possible medical applications. *Photonics & Lasers in Medicine*. 2013;2(3):225–240. doi: 10.1515/plm-2013-0010.
18. Пальцев МА, Аничков НМ, Литвицкий ПФ. Патология человека. Учебник для медицинских вузов. В 3-х т. М.: Медицина; 2009. 1448 с.
19. Ezeh PC, Lauer FT, MacKenzie D, McClain S, Liu KJ, Hudson LG, Gandolfi AJ, Burchiel SW. Arsenite selectively inhibits mouse bone marrow lymphoid progenitor cell development in vivo and in vitro and suppresses humoral immunity in vivo. *PLoS One*. 2014;9(4):e93920. doi: 10.1371/journal.pone.0093920.
20. Rogatkin DA, Polyakov PY, Bychenkov OA, Stepanenko EN. Non-invasive fluorescent diagnostics in radiotherapy of mucosal oral tumors. *Proc. SPIE*; 4707. Saratov Fall Meeting 2001: Optical Technologies in Biophysics and Medicine III, 236 (July 16, 2002). p. 236–43. doi: 10.1117/12.475595.
21. Rogatkin DA, Bychenkov OA, Lapaeva LG. The accuracy, reliability, and interpretation of the results of in vivo laser fluorescence diagnosis in the spectral range of the fluorescence of endogenous porphyrins. *J Opt Technol*. 2009;76(11):708–13. doi: 10.1364/JOT.76.000708.

## References

1. Filonenko EV. Istoriya razvitiya fluoressentnoy diagnostiki i fotodinamicheskoy terapii i ikh vozmozhnosti v onkologii [The history of fluorescence diagnostics and photodynamic therapy and their potential in oncology]. *Rossiyskiy khimicheskiy zhurnal*. 2013;57(2):5–9 (in Russian).
2. Ivanova SV, Kirpichenok LN. Ispol'zovanie fluoressentnykh metodov v meditsine [Use of fluorescence methods in medicine]. *Meditsinskie novosti*. 2008;(12):56–61 (in Russian).
3. Rogatkin DA. Fizicheskie osnovy lazernoy klinicheskoy fluoressentnoy spektroskopii in vivo [Physical foundations of laser clinical fluorescence spectroscopy in vivo]. *Meditsinskaya fizika*. 2014;(4):78–96 (in Russian).
4. Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM. Further evaluation of the use of hematoporphyrin derivative as a new aid for the endoscopic detection of malignant disease. *Dis Chest*. 1964;46:676–9.
5. Calin MA, Parasca SV, Savastru R, Calin MR, Dontu S. Optical techniques for the noninvasive diagnosis of skin cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013;139(7):1083–104. doi: 10.1007/s00432-013-1423-3.
6. Murayama Y, Ichikawa D, Koizumi N, Komatsu S, Shiozaki A, Kuriu Y, Ikoma H, Kubota T, Nakanishi M, Harada Y, Fujiwara H, Okamoto K, Ochiai T, Kokuba Y, Takamatsu T, Otsuji E. Staging fluorescence laparoscopy for gastric cancer by using 5-aminolevulinic acid. *Anticancer Res*. 2012;32(12):5421–7.
7. Andersson-Engels S, Berg R, Svanberg K, Svanberg S. Multi-colour fluorescence imaging in connection with photodynamic therapy of delta-amino levulinic acid (ALA) sensitised skin malignancies. *Bioimaging*. 1995;3(3):134–43. doi: 10.1002/1361-6374(199509)3:3<134::AID-BIO4>3.0.CO;2-1.
8. Petritskaya EN, Kulikov DA, Rogatkin DA, Guseva IA, Kulikova PA. Use of fluorescence spectroscopy for diagnosis of hypoxia and inflammatory processes in tissue. *Opticheskiy zhurnal [Journal of Optical Technology]*. 2015;82(12):810–4. doi: 10.1364/JOT.82.000810.
9. Nuyts S, Lambrecht M, Duprez F, Daisne JF, Van Gestel D, Van den Weyngaert D, Platteaux N, Geussens Y, Voordeckers M, Madani I, De Neve W. Reduction of the dose to the elective neck in head and neck squamous cell carcinoma, a randomized clinical trial using intensity modulated radiotherapy (IMRT). Dosimetrical analysis and effect on acute toxicity. *Radiother Oncol*. 2013;109(2):323–9. doi: 10.1016/j.radonc.2013.06.044.
10. Tamarkina EI, Mironova EB, Zharkova OV, Korobkin SA, Tamarkin VO, Vikhlyanov IV, Karaseva VV. Khimioluchevoe lechenie mestnorasprostrannogo raka organov polosti rta



- i rotoglotki [Chemoradiotherapy for locally advanced cancer of the oral cavity and oropharynx]. Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina RAMN [Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS]. 2006;17(3):49–53 (in Russian).
11. Chissov VI, Davydov MI, editors. Onkologiya: natsional'noe rukovodstvo [National guidelines in oncology]. Moscow: GEOTAR-Media; 2008. 1072 p. (in Russian).
  12. Flanders KC, Sullivan CD, Fujii M, Sowers A, Anzano MA, Arabshahi A, Major C, Deng C, Russo A, Mitchell JB, Roberts AB. Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation. *Am J Pathol.* 2002;160(3):1057–68. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64926-7.
  13. Weissberg JB, Fischer JJ. Effect of purine nucleosides and nucleotides on the *in vivo* radiation response of normal tissue in the rat. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1981;7(3):365–9. doi: 10.1016/0360-3016(81)90110-3.
  14. Gottlöber P, Krähn G, Peter RU. Cutaneous radiation syndrome: clinical features, diagnosis and therapy. *Hautarzt.* 2000;51(8):567–74.
  15. Pigolkin Yul, Kvacheva YuE. Sovremennye vozmozhnosti sudebno-meditsinskoy ekspertizy mestnoy radiatsionnoy travmy [The current potential of forensic medical expertise of a local radiation injury]. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza.* 2012;(3):52–5 (in Russian).
  16. Gorenkov RV, Kazakov AA, Nazarenko MM, Rogatkin DA, Svirin VN, Cherkasov AS, Chernenko VP, inventors; Polyus Research & Development Institute, assignee. Sposob opredeleniya sostoyaniya biologicheskoy tkani i diagnosticheskaya sistema dlya ego realizatsii [The approach to determination of biological tissue condition and the diagnostic algorithm for its implementation]. Russian Federation patent 2234242. 2002 March 19 (in Russian).
  17. Rogatkin D, Shumskiy V, Tereshenko S, Polyakov P. Laser-based non-invasive spectrophotometry – an overview of possible medical applications. *Photonics & Lasers in Medicine.* 2013;2(3):225–240. doi: 10.1515/plm-2013-0010.
  18. Pal'tsev MA, Anichkov NM, Litvitskiy PF. Patologiya cheloveka. Uchebnik dlya meditsinski-kh vuzov [Textbook of human pathology: for medical students]. In 3 vol. Moscow: Meditsina; 2009. 1448 p. (in Russian).
  19. Ezeh PC, Lauer FT, MacKenzie D, McClain S, Liu KJ, Hudson LG, Gandolfi AJ, Burchiel SW. Arsenite selectively inhibits mouse bone marrow lymphoid progenitor cell development *in vivo* and *in vitro* and suppresses humoral immunity *in vivo*. *PLoS One.* 2014;9(4):e93920. doi: 10.1371/journal.pone.0093920.
  20. Rogatkin DA, Polyakov PYu, Bychenkov OA, Stepanenko EN. Non-invasive fluorescent diagnostics in radiotherapy of mucosal oral tumors. *Proc. SPIE; 4707. Saratov Fall Meeting 2001: Optical Technologies in Biophysics and Medicine III, 236 (July 16, 2002).* p. 236–43. doi: 10.1117/12.475595.
  21. Rogatkin DA, Bychenkov OA, Lapaeva LG. The accuracy, reliability, and interpretation of the results of *in vivo* laser fluorescence diagnosis in the spectral range of the fluorescence of endogenous porphyrins. *J Opt Technol.* 2009;76(11):708–13. doi: 10.1364/JOT.76.000708.

## An *in vivo* study of the effects of ionizing radiation on tissues by laser fluorescence spectroscopy

Guseva I.A.<sup>1,2</sup> • Kulikova P.A.<sup>1</sup> • Bychenkov O.A.<sup>1</sup> • Rogatkin D.A.<sup>1</sup> • Kulikov D.A.<sup>1</sup> • Chursinova Yu.V.<sup>1</sup> • Bobrov M.A.<sup>1</sup>

**Background:** Laser fluorescence spectroscopy (LFS) is widely used in various medical areas, oncology being the most known of them. In general, the LFS is used for *in vivo* diagnostics of tumors. Recent studies have shown that this method could be used for diagnostics of local inflammation, induced by thermal or mechanical injury. It is of interest if LFS could be used for assessment of soft biological tissue injury caused by radiation exposure. **Aim:** To study fluorescence of an exogenous photosensitizer and its changes over time in the radiation injury area by LFS method *in vivo*. **Materials and methods:** The experiment was done in 12 outbred SHK mice whose right hind limbs were irradiated using a gamma-therapy device ROKUS-AM (source, <sup>60</sup>Co, at dose of 15 Gy). Before irradiation, the photosensitizer Photosens was administered to all animals intraperitoneally at dose of 2.5 mg/kg. For 21 days fluorescence was assessed *in vivo* with a laser diagnostic system

LAKK-M in the “fluorescence” operation mode, with an excitation wavelength of 635 nm. At days 7 and 21, tissue samples from the irradiated areas of the model animals were studied histologically and differential blood cell counts were assessed simultaneously. **Results:** The LFS method showed an increase in the accumulation of the photosensitizer in the affected area, compared to an intact contralateral area, with higher signal intensity from the irradiated limb. The changes in the fluorescence signal from the affected over time had two characteristic peaks at days 3 and 14, probably reflecting the stage of local radiation injury. **Conclusion:** The use of LFS with an exogenous photosensitizer has a potential for a personalized assessment of radiation reactions in radiology.

**Key words:** spectroscopy, fluorescence, inflammation, ionizing radiation, photosensitizer

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-165-171

**Guseva Irina A.** – Technician, Laboratory of Medical and Physics Research<sup>1</sup>; PhD Student, Faculty of Experimental and Theoretical Physics<sup>2</sup>  
 ✉ 61/2–9 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 681 89 84.  
 E-mail: gusevairinaand@gmail.com

**Kulikova Polina A.** – Clinical Resident, Department of Medical Endocrinology; Research Assistant, Laboratory of Medical and Physics Research<sup>1</sup>

**Bychenkov Oleg A.** – MD, PhD, Senior Research Fellow, Department of Radiology<sup>1</sup>

**Rogatkin Dmitry A.** – PhD (in Engineering), Head of Laboratory of Medical and Physics Research<sup>1</sup>

**Kulikov Dmitry A.** – MD, PhD, Scientific Secretary<sup>1</sup>

**Chursinova Yuliya V.** – Research Fellow, Department of Planning and Coordination of Research; Assistant, Clinical Laboratory Diagnostics Department, Postgraduate Training Faculty<sup>1</sup>

**Bobrov Maksim A.** – Research Fellow, Pathology-anatomy Department<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation

<sup>2</sup> National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute); 31 Kashirskoe shosse, Moscow, 115409, Russian Federation



# «Умные» лазерные скальпели для роботизированной хирургии

Дмитриев А.К.<sup>1</sup> • Коновалов А.Н.<sup>1</sup> • Кортунов В.Н.<sup>1</sup> • Ульянов В.А.<sup>1</sup>

**Актуальность.** Создание автоматизированных и роботизированных систем для обеспечения прецизионности и малотравматичности операции – одно из главных направлений современной хирургии. Концепция так называемых умных лазерных скальпелей представляется перспективным техническим решением в этом направлении. **Цель** – разработка принципов организации обратной связи для интеллектуальных лазерных хирургических установок на основе CO<sub>2</sub>- и волоконных лазеров. **Материал и методы.** В качестве лазерных источников использовали одномодовый волноводный CO<sub>2</sub>-лазер мощностью до 25 Вт с высокочастотной накачкой активной среды, длиной волны излучения 10,6 мкм, а также одномодовый волоконный эрбиевый лазер мощностью до 5 Вт, длиной волны излучения 1,54 мкм. Методом организации обратной связи в хирургической лазерной установке послужил автодинный метод контроля лазерного выпаривания биотканей. Объектами воздействия «умного»

лазерного скальпеля стали ткани свиньи *in vitro*. Осуществлено тестирование лазерных установок с обратной связью на здоровых и опухолевых тканях животных (белые крысы) *in vitro* и *in vivo*. Производилось тестирование возможности диагностики лазерного выпаривания опухолевых тканей человека. **Результаты.** На примере одномодового CO<sub>2</sub>-лазера и одномодового волоконного эрбиевого лазера показано, что автодинный сигнал, возникающий при выпаривании разных биологических тканей, имеет разные спектральные характеристики. Это создает основу для организации обратной связи в хирургических установках, работающих по принципу «умного» скальпеля. Разработаны «интеллектуальная» хирургическая установка с обратной связью на основе CO<sub>2</sub>-лазера и макет «интеллектуальной» хирургической установки на основе волоконного эрбиевого лазера. Выполнены исследования возможностей дифференциальной диагностики типа испаряемой биологической ткани *in vitro* с использованием

данных лазерных скальпелей. Проведены доклинические испытания на биологических тканях *in vivo* «интеллектуальной» хирургической установки на основе CO<sub>2</sub>-лазера. Испытания показали, что такой «умный» лазерный скальпель позволяет оперативно отличать здоровую ткань от опухолевой, благодаря чему можно реализовать принципы малотравматичной операции. **Заключение.** С помощью метода автодинной диагностики лазерного испарения биологических тканей можно создавать хирургические установки, работающие по принципу «умного» скальпеля, который в режиме реального времени позволяет дифференцировать разные типы ткани, а также отличать здоровую ткань от опухолевой.

**Ключевые слова:** хирургический интеллектуальный лазер, «умный» лазерный скальпель, роботизированная хирургия

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-172-178

Современной тенденцией развития и совершенствования медицинских технологий является создание и применение в хирургии автоматизированных и роботизированных систем [1, 2]. Такой подход обеспечивает высокую точность проведения операций, минимальную инвазивность, контроль за ходом хирургического вмешательства в режиме реального времени, снижает риски

человеческого фактора и в итоге способствует быстрой послеоперационной реабилитации пациентов. Как правило, в подобных хирургических установках (например, хирургический комплекс Да Винчи [3]) можно выделить три основные компоненты: хирургические инструменты для проведения хирургических манипуляций, механизированную робототехническую систему для осуществления прецизионного



манипулирования этими инструментами, а также систему визуального наблюдения, с помощью которой на монитор выводится четкое изображение операционного поля.

Подобного рода системам присуща одна ключевая особенность, а именно: хирург, манипулируя инструментами дистанционно, посредством джойстиков, теряет контакт с реальной тканью, и единственным источником информации о хирургическом вмешательстве становится визуальное наблюдение. В связи с этим остро встает вопрос о разработке разного рода сенсоров, которые бы позволили хирургу «чувствовать» объект воздействия. Помимо этого сигналы с таких сенсоров могут использоваться для организации обратной связи. При определенных условиях хирургического вмешательства в автоматизированном режиме в реальном времени она формирует сигналы для системы управления хирургическим инструментом. Благодаря оперативному управлению инструментом в автоматизированном режиме с обратной связью можно минимизировать травматизацию здоровых тканей или вовсе ее избежать.

Одним из широко используемых хирургических инструментов является лазерное излучение [4]. Лазерные хирургические вмешательства характеризуются высокими локальностью и скоростью, минимальной травматизацией здоровых тканей.

Среди различных типов лазерных хирургических систем наибольшее распространение в медицинской практике получили установки на основе одноименных CO<sub>2</sub>-лазеров, генерирующих инфракрасное излучение с длиной волны 10,6 мкм [5, 6]. К существенным преимуществам этих хирургических систем относят высокий коэффициент поглощения такого излучения в воде (860 см<sup>-1</sup>), что дает возможность эффективно производить рез и испарение мягких тканей. К недостаткам – относительно высокую стоимость, большие габариты, а также то обстоятельство, что доставка излучения в операционное поле производится главным образом с помощью зеркально-шарнирного манипулятора, вследствие чего резко ограничивается их применение в широком спектре задач полостных хирургических вмешательств. Сегодня ограничение, связанное с доставкой излучения CO<sub>2</sub>-лазеров, частично преодолено в результате разработки гибких полых и кристаллических волноводов, позволяющих эффективно передавать операционное излучение в труднодоступные места человеческого тела [6].

**Дмитриев Александр Константинович** – науч. сотр.<sup>1</sup>

**Коновалов Алексей Николаевич** – канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр.<sup>1</sup>  
 ✉ 142190,  
 г. Москва, г. Троицк,  
 ул. Пионерская, 2.  
 Тел.: +7 (496) 751 09 92.  
 E-mail: alex\_konov@mail.ru

**Кортунов Владимир Николаевич** – науч. сотр.<sup>1</sup>

**Ульянов Валерий Андреевич** – канд. техн. наук, заместитель директора<sup>1</sup>

В лазерной хирургии широкое применение получили также волоконные лазеры. Благодаря гибкости и малым поперечным размерам оптоволоконна эти установки стали широко использоваться для внутрисполостных операций вместе с современной эндоскопической техникой [7]. По сравнению с CO<sub>2</sub>-лазерами волоконные лазеры компактны и дешевы. Однако они имеют небольшой коэффициент поглощения (от 0,1 до 70 см<sup>-1</sup>) в воде на длинах волн, которые генерируют данные источники (от 0,9 до 2 мкм).

В ИПЛИТ РАН ведутся исследования и разработки так называемых умных лазерных скальпелей. Такие системы подразумевают организацию обратной связи, когда в режиме реального времени можно получать информацию о ходе процесса хирургического вмешательства и принимать оперативно в автоматизированном режиме решение об изменении условий воздействия на биологическую ткань [8, 9]. Такая концепция позволяет более эффективно реализовывать принципы малотравматичной и органосохраняющей хирургии.

Для организации обратной связи авторы предлагают использовать эффект самогетеродинамирования (автодинный эффект), возникающий в одномодовых лазерах при воздействии излучения на конденсированные среды, в частности на биологические ткани [10, 11]. Данный эффект заключается в том, что обратно рассеянное от внешнего движущегося объекта излучение попадает в резонатор лазера и инициирует модуляцию выходной мощности (автодинный сигнал) на доплеровской частоте. Автодинный сигнал может служить оперативным источником информации о ходе лазерного выпаривания биологических тканей и тем самым становится своего рода сенсором для организации обратной связи в «интеллектуальных» хирургических установках.

В статье представлены результаты работ по созданию хирургических установок с обратной связью на основе одномодовых CO<sub>2</sub>-лазеров и одномодовых волоконных лазеров.

## Методы и материал

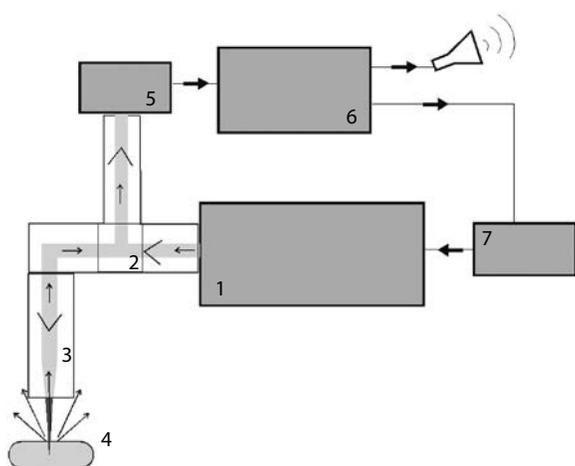
Метод организации обратной связи в «умном» лазерном скальпеле

Для создания оптико-информационного канала обратной связи использовался разработанный в ИПЛИТ РАН метод доплеровской диагностики лазерного испарения биологических тканей, основанный на самогетеродинамировании (прием на резонатор лазера) обратно рассеянного из зоны воздействия излучения [10, 11]. Оперативная

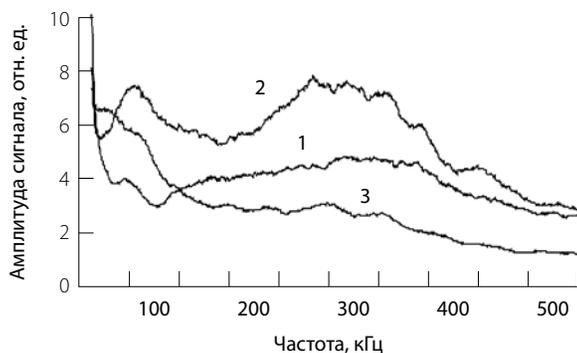
<sup>1</sup> ФГБУН «Институт проблем лазерных и информационных технологий» РАН; 140700, Московская область, г. Шатура, ул. Святоозерская, 1, Российская Федерация

диагностика процессов лазерного рассеяния, перфорации или испарения биологических тканей по автодинному сигналу и его производным (доплеровский спектр, площадь спектра, его средневзвешенная частота) состоит в выявлении различий и характерных особенностей амплитудно-частотных характеристик сигнала для различных типов испаряемых биологических тканей и коррекции параметров подаваемого излучения.

Ключевыми элементами (рис. 1) оптико-информационного канала обратной связи на основе метода самогетеродинамирования являются: одномодовый лазер (1) как источник и операционного, и диагностического излучения; фотоприемник



**Рис. 1.** Принципиальная схема оптико-информационного канала обратной связи на основе метода самогетеродинамирования в «умном» хирургическом лазерном скальпеле: 1 – одномодовый лазер, 2 – оптическая система ответвления излучения, 3 – система доставки излучения, 4 – биоткань, 5 – фотоприемник, 6 – блок анализа-управления процессом лазерного испарения биотканей, 7 – блок управления лазера



**Рис. 2.** Усредненные спектры автодинного сигнала, возникающего в одномодовом  $\text{CO}_2$ -лазере при рассеянии биотканей различного типа при интенсивности  $10 \text{ кВт/см}^2$ : 1 – кость, 2 – жир, 3 – мышца

лазерного излучения (5); система доставки (3) лазерного излучения в операционное поле; программно-аппаратное обеспечение оперативной диагностики и управления процессом лазерного испарения биологической ткани (6 и 7).

Диагностика процесса лазерного испарения биологической ткани осуществляется следующим образом. Обратное рассеянное излучение с доплеровским сдвигом частоты попадает в резонатор лазера, в результате чего происходит модуляция его выходного излучения. Часть излучения лазера отводится и направляется на приемник лазерного излучения. Сигнал с фотоприемника обрабатывается и анализируется в блоке анализа-управления. Контроль и управление процессом испарения биологической ткани в режиме реального времени основываются на динамике изменения величины средневзвешенной частоты сигнала  $f(t)$  и мощности сигнала  $W(t)$  в заранее выбранном диапазоне частот. При достижении заранее задаваемых условий блок анализа-управления может подавать или звуковой сигнал, информирующий хирурга, или сигнал на блок управления лазера для изменения условий воздействия на биологическую ткань (например, экстренное выключение генерации излучения).

#### Лазерные источники

В качестве лазерных источников использовались одномодовый волоконный  $\text{CO}_2$ -лазер мощностью до 25 Вт с высокочастотной накачкой активной среды, длиной волны излучения 10,6 мкм, а также одномодовый волоконный эрбиевый лазер мощностью до 5 Вт, длиной волны излучения 1,54 мкм.

#### Объекты воздействия и способы воздействия

В качестве объектов воздействия служили ткани свиньи *in vitro*. При использовании тканей моделировался процесс хирургического вмешательства, при котором происходит переход воздействия излучения лазера с одной ткани на другую.

В случае  $\text{CO}_2$ -лазера производился рез тканей путем перемещения манипулятора лазерной установки и фокусировки излучения на поверхность ткани. При использовании волоконного эрбиевого лазера моделировался процесс хирургического вмешательства в режиме контактного воздействия. При этом осуществлялась перфорация отверстий путем перемещения дистального конца волокна лазера вглубь образцов тканей.

Исследования возможностей «умного» лазерного скальпеля проводились в ФГБУ



«МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, ФГБУ «Государственный научный центр лазерной медицины ФМБА РФ», ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, ГУЗ ТО «Тульская областная клиническая больница» (отделение нейрохирургии).

Для изучения возможностей дифференциации здоровой и опухолевой тканей человека в процессе лазерной операции использовались образцы тканей *in vitro* и *in vivo*. В случае *in vitro* образцы ткани злокачественной и доброкачественной опухолей молочной железы вместе с участками здоровой ткани изымались после проведения операций мастэктомии в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Размеры образцов не превышали объема 1–2 см<sup>3</sup>. Использовались образцы трех видов: целиком состоящие из опухолевой ткани, целиком состоящие из здоровой ткани (как правило, из жировой клетчатки) и образцы, содержащие как участки здоровой ткани, так и опухолевой. В первых двух случаях, чтобы обеспечить прохождение лазерного излучения через границу раздела биологических тканей, оба образца вплотную прижимались друг к другу. Образцы рассекались с захватом здоровых и патологических участков ткани сфокусированным лучом CO<sub>2</sub>-лазера мощностью 5 Вт.

В случае *in vivo* производился полный мониторинг операции, который включал в себя запись автодинного сигнала в процессе хирургического вмешательства с одновременной видеосъемкой всех манипуляций хирурга в оперируемой области. Это позволило в дальнейшем однозначно сопоставлять временные трансформации доплеровских спектров и, соответственно, изменения их параметров с конкретными изменениями, происходящими в операционной зоне: переходом лазерного пучка с одной ткани на другую, в том числе пересечением мелких кровеносных сосудов, жировых, иных включений и т.п.

## Результаты

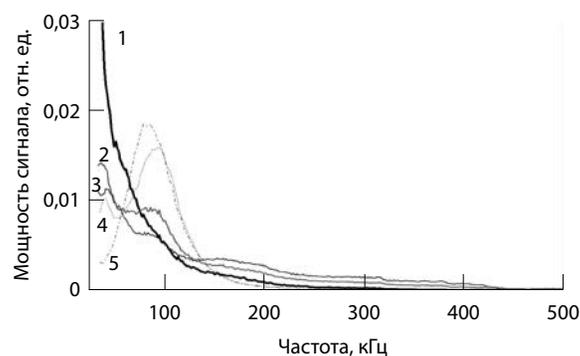
На рис. 2 приведены спектры автодинного сигнала, возникающего в одномодовом CO<sub>2</sub>-лазере при рассечении биологических тканей различного типа излучением интенсивностью 10 кВт/см<sup>2</sup>. При этом биологические ткани перемещались относительно сфокусированного пучка одномодового CO<sub>2</sub>-лазера со скоростью 0,5 мм/с. Как видно из рисунков, спектры, полученные при воздействии CO<sub>2</sub>-лазера на разные биологические ткани, имеют явные различия как по форме, так и по амплитуде. Это создает базу для



**Рис. 3.** «Интеллектуальная» лазерная установка с обратной связью на основе CO<sub>2</sub>-лазера

организации обратной связи в хирургических установках, работающих по принципу «умного» скальпеля.

На основе одномодового волноводного CO<sub>2</sub>-лазера была создана «интеллектуальная» хирургическая установка (рис. 3) с обратной связью. Приведем ее основные характеристики: длина волны излучения – 10,6 мкм, мощность выходного излучения – до 20 Вт, доставка излучения до операционного поля – шарнирно-зеркальный манипулятор. Из функциональных возможностей оперативной диагностики «умного» скальпеля на основе CO<sub>2</sub>-лазера выделим следующие: протоколирование лазерной операции в режиме реального времени – для последующего анализа данных; возможность задания «критических» параметров работы системы обратной связи, по которым определяется переход от испарения одной



**Рис. 4.** Нормированные спектры мощности сигнала обратного рассеяния, возникающего при контактом выпаривании биомоделей волоконным эрбиевым лазером: 1 – жир, 2 – кожа, 3 – миокард, 4 – почка, 5 – мускул



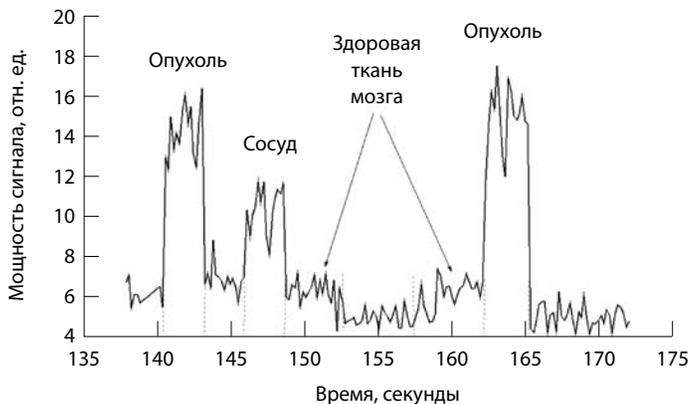
**Рис. 5.** Макет «интеллектуальной» хирургической установки с обратной связью на основе одномодового волоконного эрбиевого лазера



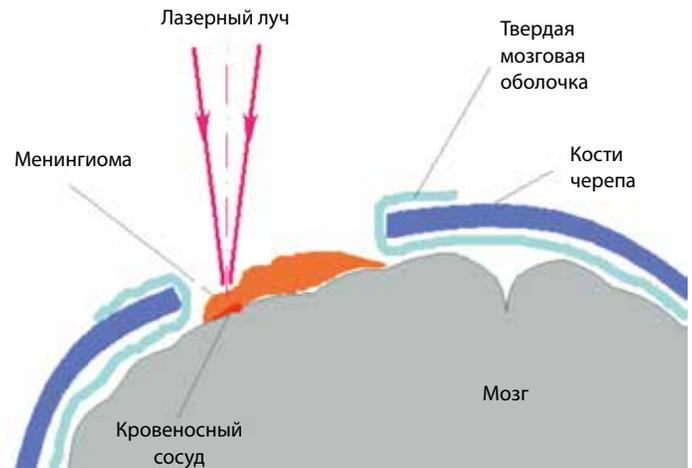
**Рис. 6.** Зависимость мощности автодинного сигнала от времени при удалении рака гортани человека



**Рис. 7.** Зависимость мощности автодинного сигнала от времени при выпаривании излучением CO<sub>2</sub>-лазера здоровой и опухолевой тканей молочной железы



**Рис. 8.** Зависимость мощности автодинного сигнала от времени при удалении злокачественной опухоли головного мозга излучением CO<sub>2</sub>-лазера (Тульская областная больница, отделение нейрохирургии)



**Рис. 9.** Схематическое изображение операции по удалению менингиомы «умным» скальпелем на основе CO<sub>2</sub>-лазера

биологической ткани к другой; подача предупреждающего звукового сигнала при начале воздействия на здоровую ткань; подача управляющих сигналов на блок управления лазера при заранее определяемых условиях для оперативного изменения режима воздействия на ткань (понижение мощности, экстренное выключение).

На рис. 4 даны усредненные нормированные спектры обратного рассеяния, возникающего для разных биологических тканей при их перфорации дистальным концом выходного волокна волоконного эрбиевого лазера. В качестве выходного волокна использовалось многомодовое волокно диаметром 400 мкм. Мощность излучения на выходе волокна составляла 3,7 Вт, а интенсивность – 2,9 кВт/см<sup>2</sup>. Скорость перемещения

волокна относительно биологической ткани – 1,4 мм/с.

Так же, как и в случае бесконтактного рассеяния биологических тканей излучением CO<sub>2</sub>-лазера, видны явные различия в спектрах автодинного сигнала, возникающего в волоконном эрбиевом лазере в режиме перфорации. На основе одномодового волоконного эрбиевого лазера мы создали макет «интеллектуальной» хирургической установки с обратной связью (рис. 5) со следующими основными техническими характеристиками: длина волны излучения – 1,54 мкм, мощность выходного излучения – до 5 Вт, доставка излучения до операционного поля – многомодовое волокно, режим генерации – непрерывный. «Умный» скальпель на основе волоконного



лазера обладает такими функциональными возможностями оперативной диагностики, как протоколирование лазерной операции в режиме реального времени – для последующего анализа данных, а также подача предупреждающего звукового сигнала при переходе от воздействия от одной ткани к другой.

На рис. 6 продемонстрирована зависимость мощности автодинного сигнала от времени при удалении рака гортани человека излучением «умного» скальпеля на основе CO<sub>2</sub>-лазера. Плоскоклеточный рак (мужчина, 45 лет) был локализован в нижнем отделе гортани. Опухоль в виде вытянутого вдоль гортани эллипса  $\frac{2}{5}$  см закрывала  $\frac{2}{3}$  площади сечения гортанного прохода. Операция заключалась в радикальном удалении пораженного участка гортани.

На рис. 7 изображен фрагмент динамики автодинного сигнала при прохождении излучения CO<sub>2</sub>-лазера через здоровую и опухолевую ткани молочной железы (*in vitro*).

На рис. 8 показан фрагмент динамики автодинного сигнала при выпаривании опухолевой ткани в мозге человека (*in vivo*) излучением CO<sub>2</sub>-лазера. Менингососудистая злокачественная опухоль левого доминантного полушария (женщина, 26 лет) была локализована вблизи синуса. Опухоль капсулирована, жидкой консистенции, размером 3–4 см в диаметре, частично проросла в твердую мозговую оболочку. Удаление опухоли проводилось как путем отсоса жидкой фракции, так и с помощью лазерного выпаривания, особенно в местах инфильтрации опухоли в мозговую оболочку (рис. 9).

Как видно из приведенных рисунков, мощность автодинного сигнала испытывает резкое изменение при пересечении лазерным пучком границы раздела разных тканей. Это создает основу для осуществления оперативной дифференциальной диагностики типа испаряемой биологической ткани и реализации принципа «умного» лазерного скальпеля в роботизированных хирургических установках.

## Заключение

Предложена концепция организации обратной связи для «умных» лазерных скальпелей, с помощью которых в режиме реального времени можно контролировать процесс хирургического вмешательства и изменять условия воздействия на биологическую ткань в целях минимизации травмирующего воздействия на здоровые ткани.

На примере одномодового CO<sub>2</sub>-лазера и одномодового волоконного эрбиевого лазера показано, что автодинный сигнал, возникающий при выпаривании разных биологических тканей, имеет разные спектральные характеристики. Этот принцип может быть использован для организации обратной связи в хирургических установках типа «умного» скальпеля.

На основе одномодового волноводного CO<sub>2</sub>-лазера была создана «интеллектуальная» хирургическая установка с обратной связью и проведены ее доклинические испытания. Их результаты показали, что такой «умный» лазерный скальпель позволяет оперативно отличать здоровую ткань от опухолевой, что дает возможность реализовать принципы малотравматичной операции. ©

## Финансирование

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 13-08-12121 офи\_м.

## Литература

- Ota T, Degani A, Schwartzman D, Zubiato B, McGarvey J, Choset H, Zenati MA. A highly articulated robotic surgical system for minimally invasive surgery. *Ann Thorac Surg*. 2009;87(4):1253–6. doi: 10.1016/j.athoracsur.2008.10.026.
- Rivera-Serrano CM, Johnson P, Zubiato B, Kuenzler R, Choset H, Zenati M, Tully S, Duvvuri U. A transoral highly flexible robot: Novel technology and application. *Laryngoscope*. 2012;122(5):1067–71. doi: 10.1002/lary.23237.
- Краевский СВ, Рогаткин ДА. Медицинская робототехника: первые шаги медицинских роботов. *Технологии живых систем*. 2010;7(4):3–14.
- Неворотин АИ. Введение в лазерную хирургию. СПб.: СпецЛит; 2000. 176 с.
- Минаев ВП. Лазерные аппараты для хирургии и силовой терапии: вчера, сегодня, завтра. *Лазерная медицина*. 2012;16(3): 57–65.
- Urich A, Maier RRJ, Fei Yu, Knight JC, Hand DP, Shephard JD. Silica hollow core microstructured fibres for mid-infrared surgical applications. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2013;377:236–9. doi: 10.1016/j.jnoncrsol.2013.01.055.
- Минаев ВП, Жилин КМ. Современные лазерные аппараты для хирургии и силовой терапии на основе полупроводниковых и волоконных лазеров. М.: Издатель И.В. Балабанов; 2009. 48 с.
- Кортунов ВН, Дмитриев АК, Коновалов АН, Ульянов ВА. Интеллектуальные CO<sub>2</sub> лазерные хирургические системы для прецизионного удаления новообразований. *Онкохирургия*. 2010;2(1):187–8.
- Дмитриев АК, Коновалов АН, Панченко ВЯ, Ульянов ВА, Варев ГА, Гейниц АВ, Маторин ОВ, Решетов ИВ, Самошенков ГС. Новые подходы к прецизионному и малотравматичному испарению биотканей на основе интеллектуальных лазерных хирургических систем. *Лазерная медицина*. 2013;17(1):4–10.
- Гордиенко ВМ, Коновалов АН, Ульянов ВА. Самогетеродинамирование обратно рассеянного излучения в одномодовых CO<sub>2</sub>-лазерах. *Квантовая электроника*. 2011;41(5): 433–40.
- Дмитриев АК, Коновалов АН, Ульянов ВА. Самогетеродинамирование обратнорассеянного излучения в одномодовом волоконном эрбиевом лазере для задач доплеровской спектроскопии и измерения скоростей. *Квантовая электроника*. 2014;44(4):309–13.



## References

- Ota T, Degani A, Schwartzman D, Zubiato B, McGarvey J, Choset H, Zenati MA. A highly articulated robotic surgical system for minimally invasive surgery. *Ann Thorac Surg.* 2009;87(4):1253–6. doi: 10.1016/j.athoracsur.2008.10.026.
- Rivera-Serrano CM, Johnson P, Zubiato B, Kuenzler R, Choset H, Zenati M, Tully S, Duvvuri U. A transoral highly flexible robot: Novel technology and application. *Laryngoscope.* 2012;122(5):1067–71. doi: 10.1002/lary.23237.
- Kraevskiy SV, Rogatkin DA. Meditsinskaya robototekhnika: pervye shagi meditsinskikh robotov [Medical robotics: the first steps of medical robots]. *Tekhnologii zhivyykh sistem [Technologies of Living Systems].* 2010;7(4):3–14 (in Russian).
- Nevorotin AI. Vvedenie v lazernuyu khirurgiyu [Introduction to laser surgery]. Saint Petersburg: SpetsLit; 2000. 176 p. (in Russian).
- Minaev VP. Lazernye apparaty dlya khirurgii i silovoy terapii: vchera, segodnya, zavtra [Laser devices for surgery and power therapy: yesterday, today and tomorrow]. *Lazernaya meditsina [Laser Medicine].* 2012;16(3):57–65 (in Russian).
- Urich A, Maier RRJ, Fei Yu, Knight JC, Hand DP, Shephard JD. Silica hollow core microstructured fibres for mid-infrared surgical applications. *Journal of Non-Crystalline Solids.* 2013;377:236–9. doi: 10.1016/j.jnoncrysol.2013.01.055.
- Minaev VP, Zhilin KM. Sovremennye lazernye apparaty dlya khirurgii i silovoy terapii na osnove poluprovodnikovyykh i volokonnykh lazerev [Modern laser apparatus for surgery and force therapy based on semiconductor and fiber lasers]. Moscow: Publisher I.V. Balabanov; 2009. 48 p. (in Russian).
- Kortunov VN, Dmitriev AK, Konovalov AN, Ul'yanov VA. Intellektual'nye CO<sub>2</sub> lazernye khirurgicheskie sistemy dlya pretsizionnogo udaleniya novoobrazovaniy [Smart CO<sub>2</sub> laser surgical system for precise removal of tumors]. *Onkokhirurgiya [Oncosurgery].* 2010;2(1):187–8 (in Russian).
- Dmitriev AK, Konovalov AN, Panchenko VYa, Ul'yanov VA, Varev GA, Geynits AV, Matorin OV, Reshetov IV, Samoshenkov GS. Novye podkhody k pretsizionnomu i malotravmatichnomu isparenuyu biotkaney na osnove intellektual'nykh lazernykh khirurgicheskikh sistem [New approaches to precision and small-traumatic biotissue evaporation using intellectual laser surgical systems]. *Lazernaya meditsina [Laser Medicine].* 2013;17(1):4–10 (in Russian).
- Gordienko VM, Konovalov AN, Ul'yanov VA. Self-heterodyne detection of backscattered radiation in single-mode CO<sub>2</sub> lasers. *Quantum Electronics.* 2011;41(5):433–40. doi: 10.1070/QE2011v041n05ABEH014517.
- Dmitriev AK, Konovalov AN, Ul'yanov VA. Self-mixing detection of backscattered radiation in a single-mode erbium fibre laser for Doppler spectroscopy and velocity measurements. *Quantum Electronics.* 2014;44(4):309–13. doi: 10.1070/QE2014v044n04ABEH015316.

# “Smart” laser scalpels for robotic surgery

Dmitriev A.K.<sup>1</sup> • Konovalov A.N.<sup>1</sup> • Kortunov V.N.<sup>1</sup> • Ul'yanov V.A.<sup>1</sup>

**Background:** Elaboration of automatized and robotic systems for precision and minimally traumatic surgery is one of the main areas of modern surgery. The concept of the so-called “smart” laser scalpels seems a promising technical solution in this field. **Aim:** To develop organizational principles of a feedback smart surgical laser devices based on CO<sub>2</sub> and fiber lasers. **Materials and methods:** As laser sources, we used a one mode wave CO<sub>2</sub> laser with a power of up to 25 W, high frequency pumping of the active media and radiation wavelength of 10.6 μm, as well as a one mode fiber Er laser with a power of up to 5 W and radiation wavelength of 1.54 μm. The laser device feedback was organized with an autodynic control of laser evaporation of biological tissues. The “smart” laser scalpel effects were studied in the porcine tissues *in vitro*. The feedback laser devices were tested on normal and tumor animal tissues (white rats) *in vitro* and *in vivo*. Also, we tested the possibility of diagnostics of laser evaporation on human tumor tissues. **Results:** Taking the one mode CO<sub>2</sub> laser and one mode fiber Er laser as examples, it was shown that an autodynic signal arising during evaporation of various biological

tissues has different spectral characteristics. This makes the bases for organization of a feedback in surgical devices functioning as a “smart” scalpel. A “smart” surgical feedback device based on CO<sub>2</sub> laser and a decoy of a “smart” surgical device based on a fiber Er laser were developed. We studied the possibilities of differential diagnostics of a type of a tissue being evaporated *in vitro* with the use of the data from laser scalpels. Also, pre-clinical trials of a CO<sub>2</sub> laser-based “smart” surgical device on biological tissues were performed. The trials showed that such a “smart” laser scalpel allows for intra-operative differentiation between normal and tumor tissues that would give the possibility to implement minimally traumatic surgery principles. **Conclusion:** The method of autodynic diagnostics of laser evaporation of biological tissues allows for development of surgical devices functioning as a “smart” laser. It gives the possibility of a real-time differentiation of various types of tissues, including normal and tumor ones.

**Key words:** smart surgical laser, “smart” laser scalpel, robotic surgery

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-172-178

**Dmitriev Aleksandr K.** – Research Fellow<sup>1</sup>

**Konovalov Aleksey N.** – PhD (in Physics and Mathematics), Senior Research Fellow<sup>1</sup>

✉ 2 Pionerskaya ul., Troitsk, Moscow, 142190, Russian Federation. Tel.: +7 (496) 751 09 92. E-mail: alex\_konov@mail.ru

**Kortunov Vladimir N.** – Research Fellow<sup>1</sup>

**Ul'yanov Valeriy A.** – PhD (in Engineering), Deputy Director<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Laser and Information Technologies of the Russian Academy of Sciences; 1 Svyatoozerskaya ul., Shatura, Moskovskaya oblast', 140700, Russian Federation



# Практическое применение импедансной реографии в кардиологии – новые подходы

Думлер А.А.<sup>1</sup> • Подтаев С.Ю.<sup>2</sup> • Степанов Р.А.<sup>3</sup> • Фрик П.Г.<sup>3</sup>

**Думлер Андрей Артурович** – канд. мед. наук, доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней № 1<sup>1</sup>

**Подтаев Сергей Юрьевич** – канд. физ.-мат. наук, директор по научно-исследовательским и опытно-конструкторским работам<sup>2</sup>

**Степанов Родион Александрович** – д-р физ.-мат. наук, вед. науч. сотр.<sup>3</sup>  
 ✉ 614013, г. Пермь, ул. Академика Королева, 1, Российская Федерация.  
 Тел.: +7 (342) 237 83 94.  
 E-mail: rodion@icmm.ru

**Фрик Петр Готлобович** – д-р физ.-мат. наук, профессор, заведующий лабораторией физической гидродинамики<sup>3</sup>

**Актуальность.** Импедансная реокардиография – простой, недорогой, неинвазивный метод изучения центральной гемодинамики, который может быть использован для выявления процесса ремоделирования сердечно-сосудистой системы и способствовать снижению смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. Современные математические методы обработки данных позволяют открыть новые возможности анализа реографических сигналов. **Цель** – показать возможности вейвлет-обработки реографического сигнала для получения информации о ремоделировании миокарда больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями. **Материал и методы.** Для верификации метода проведено обследование 12 здоровых мужчин в возрасте от 20 до 25 лет, составивших группу контроля, и 14 пациентов с диагнозом гипертонической болезни. Использовался метод полиреокардиографии, в котором одновременно с импедансной реокардиограммой регистрировались электрокардиограмма и фонокардиограмма. Была использована методика оценки функционального состояния сердечно-сосудистой системы на основе анализа двумерных частотно-временных распределений вейвлет-коэффициентов

преобразования кривых дифференциальной реограммы. **Результаты.** Данные нагрузочного изометрического теста подтверждают адекватность определения параметра ударного объема на основе амплитуд вейвлет-коэффициентов и масштаба E-волны. Параметр ISTI в рамках этого подхода определяется как временной интервал между R-пиком электрокардиограммы и максимумом вейвлет-представления E-волны. Одновременный частотно-временной анализ как пульсовой, так и дыхательной составляющей реографического сигнала может служить основой для разработки комплекса функциональных тестов на основе дыхания. **Заключение.** Предлагаемый подход показывает возможность получения характеристик диастолической фазы сердечного цикла и позволяет уточнить определение ударного объема. Обработка данных проходит в автоматическом режиме. Эти преимущества предполагается использовать при создании мобильного кардиографа для скрининговой диагностики.

**Ключевые слова:** импедансная реокардиография, фонокардиография, ударный объем, вейвлет-анализ

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-179-185

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России; 614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26, Российская Федерация

<sup>2</sup> НТЦ «ФМ Диагностика»; 614000, г. Пермь, ул. Ленина, 10 (КЭД), Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБУН «Институт механики сплошных сред» УрО РАН; 614013, г. Пермь, ул. Академика Королева, 1, Российская Федерация

**В** структуре общей смертности на долю сердечно-сосудистой приходится 57%. Сегодня хроническая сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца (инфаркт миокарда, стенокардия), артериальная гипертензия представляют собой основную проблему здравоохранения экономически развитых стран, которая останется таковой в течение ближайших 50 лет. Все перечисленные заболевания запускают процесс ремоделирования сердечно-сосудистой системы. Термин «ремоделирование» включает весь комплекс структурно-функциональных многоуровневых проявлений, соответствующих понятию «гипертоническое сердце», поражение органов-мишеней, морфологические и функциональные изменения сосудистого звена в виде вазоспастической реакции, утолщения сосудистой стенки и повышения ее жесткости [1, 2, 3]. В свою очередь сердечно-сосудистый континуум предполагает непрерывную цепь взаимодействия его составляющих, среди которых можно выделить факторы риска изменения сердечно-сосудистой системы, присоединение атеросклеротического процесса, вначале клинически бессимптомного, а затем проявляющегося несмертельными и смертельными осложнениями [4]. Своевременное выявление процесса ремоделирования может значительно повлиять на качество оказания помощи и способствовать снижению смертности от сердечно-сосудистых заболеваний.

В арсенале современной медицины имеется широкий набор методов диагностики сердечно-сосудистых заболеваний, однако часть из них инвазивна, опасна для пациента, а часть достаточно сложна в эксплуатации и имеет крайне высокую цену, что делает эти методы недоступными для большинства больных.

До начала «ультразвуковой эры» в кардиологии основным неинвазивным методом

исследования центральной гемодинамики была импедансная реокардиография. Существовавшие традиционные методики (тетраполярная грудная реография по Кубичеку, интегральная реография по Тищенко) позволяли оценить только систолическую функцию сердца по величине ударного объема и производных от него параметров. При этом невозможно было оценить диастолическую функцию и сократительную компоненту систолической функции левого желудочка, что признавалось значительным недостатком этих методов. Именно поэтому с появлением ультразвуковых методов исследования интерес к реографии значительно снизился.

Новым этапом неинвазивного исследования гемодинамики реографическим методом стало применение новых математических методов и информационных технологий для анализа реографических сигналов. Информация, заложенная в кривых реокардиограммы, достаточно ценна и требует своей оценки. Кроме того, импедансная реокардиография относительно точна, дает воспроизводимый результат и имеет низкую цену в сравнении с ультразвуковыми методами.

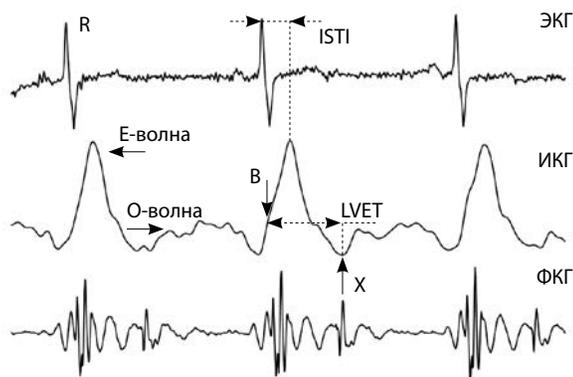
Цель настоящей работы – показать возможности вейвлет-обработки реографического сигнала для получения информации о ремоделировании миокарда больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

## Методы

Импедансная реокардиография

Импедансная реокардиография (ИКГ) – простой, недорогой, неинвазивный метод изучения центральной гемодинамики, при помощи которого можно определить один из ее ключевых показателей – ударный объем, а также оценить сердечный выброс, общее периферическое сосудистое сопротивление, время изгнания крови из левого желудочка и другие параметры. Главный принцип метода основан на регистрации изменений электрического сопротивления биологических тканей при прохождении высокочастотного переменного тока. Важно отметить, что метод может быть использован не только в стационарных условиях, но и при мониторинге, в том числе для функциональной диагностики. По сравнению со стандартной электрокардиограммой (ЭКГ), разные структуры ИКГ-сигнала относительно легко распознать, и это не требует такого количества времени и столь высокой квалификации, как эхокардиография [5].

Сигнал ИКГ имеет набор характерных точек и волн [6] – на рис. 1 они обозначены как В, Е, Х, О.



**Рис. 1.** Типичные сигналы полиреокардиографа: электрокардиограмма (ЭКГ), собственно дифференциальная реокардиограмма (импедансная реокардиограмма – ИКГ) и фонокардиограмма (ФКГ)



Рис. 2. Прибор iCor в работе

Эти точки связаны с различными физиологическими событиями в сердечном цикле. Точка В синхронизирована с первым тоном сердца, возникающим при закрытии атриовентрикулярных клапанов в самом начале систолы желудочков. Иногда определение локализации точки В проблематично, поскольку форма сигнала ИКГ в этой области не всегда четко выражена [7]. Точка Е – это максимум на дифференциальной реограмме. Эта точка отражает максимальную скорость изменения импеданса, что, в свою очередь, связано с максимальной скоростью выброса, измеренного с помощью ультразвуковых методов [8]. Точка Х соответствует захлопыванию полулунных клапанов в конце систолы желудочков (и второму тону сердца). Для ИКГ первый максимум (то есть Е-волна) связан с систолической фазой сердечного цикла, а второй максимум – с меньшей амплитудой (О-волна) – связан с диастолической фазой. Амплитуда Е-волны пропорциональна ударному объему, а амплитуда О-волны коррелирует с изменением объема левого предсердия во время фазы диастолы. В некоторых случаях амплитуда О-волны оказывается важным диагностическим параметром [9, 10]. Согласно формуле Кубичека [11], ударный объем пропорционален времени выброса и максимальному значению первой производной импеданса  $dZ/dt$  для данного цикла.

Время изгнания крови из левого желудочка (LVET) определяется как временной интервал между открытием клапана аорты и его последующим закрытием. В некоторых исследованиях [12] было показано, что ИКГ не позволяет определить обнаружение LVET с достаточной точностью.

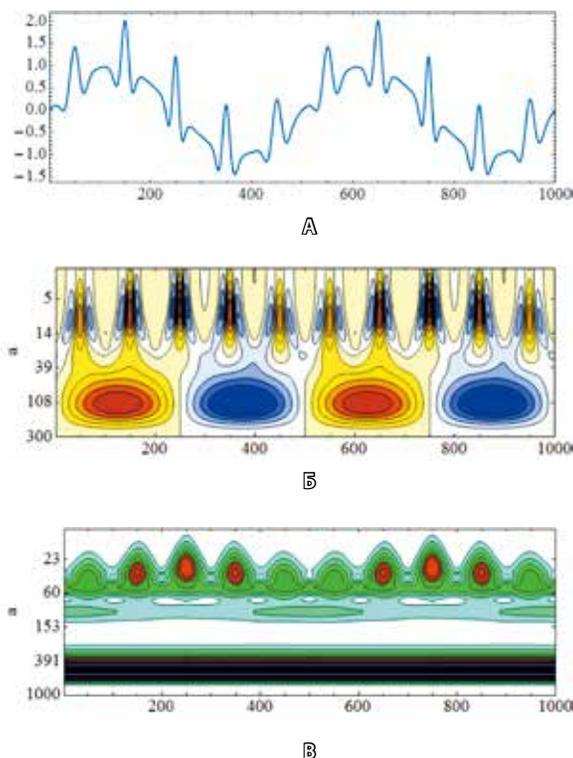
Приборная реализация и программные алгоритмы В качестве приборной базы в данном проекте использован многофункциональный прибор iCor (НТЦ «ФМ Диагностика», г. Пермь), позволяющий проводить регистрацию объемной реограммы

тетраполярным методом, фонокардиограммы и ЭКГ (рис. 2). Создан программный модуль с элементами пользовательского интерфейса, реализованный на базе пакета Mathematica. Модуль включает в себя загрузку данных, фильтрацию артефактов и шумов, вейвлет-обработку, определение показателей гемодинамики, графическое отображение вейвлет-образов кардиоциклов, экспорт полученных данных в виде стандартного табличного протокола и в графическом виде. Процедура выбора пригодных для обработки кардиоциклов основана на первичной оценке уровня шумов и последующего отбора по принципу подобия. Математическая процедура исключения зашумленных участков сигнала проводится по предельно допустимым амплитудам сигнала и по максимальному значению стандартного отклонения от скользящего среднего. Далее выбираются только те кардиоциклы, которые обеспечивают между собой кросс-корреляцию не менее 0,75. При помощи такого подхода удается существенно снизить погрешности вычисления показателей гемодинамики, которые связаны с появлением артефактов и шумов во время измерений [13].

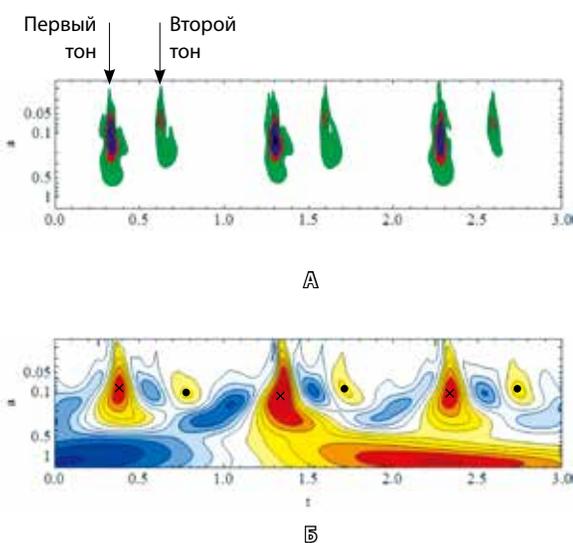
#### Вейвлеты

Из названия метода (от англ. wavelet – маленькая волна) следует его главное отличие от традиционного спектрального анализа Фурье, состоящее в том, что в качестве эталонных сигналов используются не бесконечные гармоники, а функции, описывающие короткие осцилляции заданной частоты вблизи заданного момента времени. При проведении анализа вейвлет заданного масштаба как шаблон «прикладывается» к анализируемому сигналу в самом его начале и постепенно продвигается до его конца. Для каждого положения шаблона вычисляется степень соответствия сигнала вейвлету. В результате получается вейвлет-плоскость, отображающая зависимость вейвлет-коэффициентов от масштаба (частоты) и времени. На этой плоскости можно видеть, как меняется со временем спектральный состав сигнала, или узнать, в какие моменты в сигнале появлялись всплески различной продолжительности.

Не отягощая изложение формулами, которые можно найти во многих книгах и обзорах [14], проиллюстрируем возможности вейвлетов примером, данным на рис. 3. Здесь показаны вейвлет-плоскости сигнала, полученные с помощью различных анализирующих вейвлетов. Сигнал представляет собой суперпозицию низкочастотной гармоники и квазипериодических всплесков со слабо меняющимися характеристиками



**Рис. 3.** Вейвлет-образы тестового сигнала (А), представляющего собой комбинацию низкочастотных колебаний и коротких всплесков со слабой модуляцией амплитуды и длины волны. Модуляция имеет ту же частоту, что и низкочастотная компонента, но сдвинута по фазе на  $\pi/2$ . Вейвлет-образы получены с помощью вейвлета «мексиканская шляпа» (Б) и вейвлета Морле (В)



**Рис. 4.** Вейвлет-образы трех кардиоциклов по сигналам фонокардиографии (А) и импедансной реокардиографии (Б), где максимумы E-волны обозначены крестиками, а O-волны – точками

(амплитудой и периодичностью) – схематический аналог сердечного ритма на фоне дыхательной волны. Обе картинки позволяют понять структуру сигнала и проследить за изменениями обеих компонент. При этом вейвлет «мексиканская шляпа» лучше выделяет каждый всплеск и позволяет отличить вдох от выдоха, а вейвлет Морле (волночка подлиннее) четче показывает периодическую составляющую.

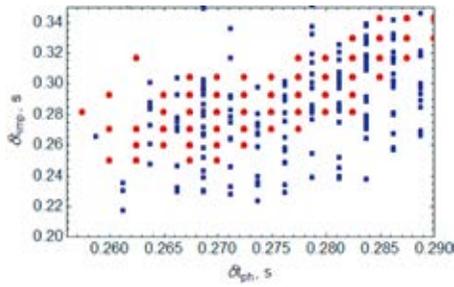
Отметим, что вейвлеты широко применяются при анализе медицинских сигналов, но их использование почти всегда ограничивается фильтрацией, выполняемой в терминах дискретного вейвлет-преобразования. Возможности вейвлет-анализа существенно шире, и в данной работе аппарат непрерывного вейвлет-преобразования использован не только для фильтрации сигнала реокардиографа, но и для регуляризации процедур обработки исходных сигналов, исследования степени коррелированности сигналов в заданной полосе частот и определения количественных функциональных характеристик сердца, таких как ударный объем.

Нами предлагается методика оценки функционального состояния сердечно-сосудистой системы на основе анализа двумерных частотно-временных распределений вейвлет-коэффициентов преобразования кривых дифференциальной реограммы. На изображениях (вейвлет-портретах) кардиоциклов для различных групп больных удается распознать характерные особенности в систолической и диастолической фазах сердечного цикла. На рис. 4 показаны вейвлет-образы дифференциальной реограммы и фонокардиограммы трех последовательных кардиоциклов.

## Результаты

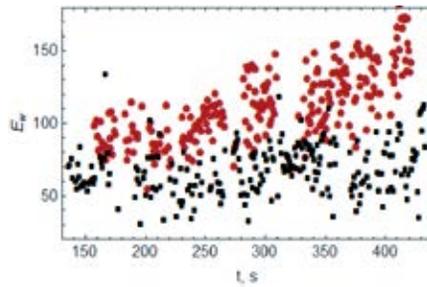
Определение параметров для оценки ударного объема

Традиционно ударный объем в ИКГ определяется как произведение максимума первой производной реограммы на время изгнания с соответствующими антропометрическими коэффициентами и учетом полного биоимпеданса. В стандартных методиках амплитуда E-волны определяется после установки реограммы на изолинию, то есть после компенсации дыхательных и двигательных артефактов. Использование подхода на основе вейвлетов позволяет разделить пульсовую и дыхательную волны и использовать для определения амплитуды вейвлет-коэффициентов E-волны, а для определения LVET – масштаб этой волны. На рис. 5 показана корреляция между масштабом E-волны и временным интервалом между

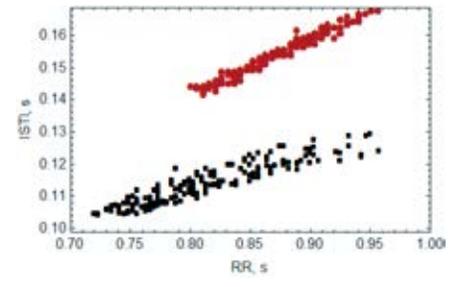


■ Вейвлет ■ В-Х интервал

**Рис. 5.** Время изгнания, определенное по импедансной реокардиограмме с помощью вейвлетов (красные точки) и стандартным методом (синие точки), против значений, определенных по фонокардиограмме



А



Б

■ Здоровый ■ Больной

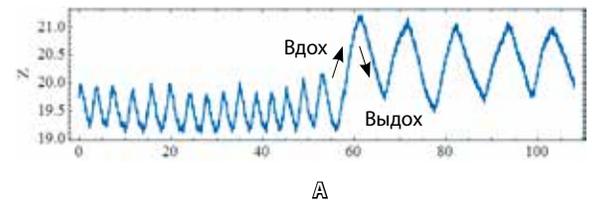
**Рис. 6.** Нагрузочный тест: изменения амплитуды E-волны со временем (А) и зависимость интервала ISTI от RR-интервала (Б) для здорового (красные точки) и больного (черные точки) с диагнозом гипертонической болезни

открытием клапана аорты и его последующим закрытием, определяемым из фонокардиограммы ( $r=0,7$ ,  $p<0,001$ ). Предлагаемый подход обеспечивает большую точность в сравнении с методом определения времени изгнания по характерным точкам дифференциальной реограммы. Параметр ISTI в рамках этого подхода определяется как временной интервал между R-пиком ЭКГ и максимумом вейвлет-представления E-волны.

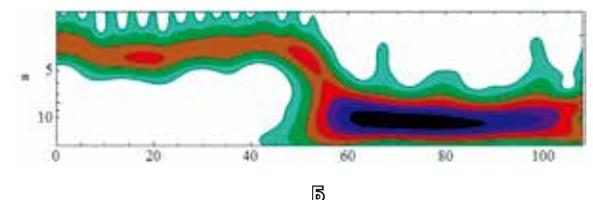
Для верификации метода проведено обследование 12 здоровых мужчин в возрасте от 20 до 25 лет, составивших группу контроля, и 14 пациентов с диагнозом гипертонической болезни. Использовался метод полиреокардиографии, в котором одновременно с ИКГ регистрировались ЭКГ и фонокардиограмма. Во время регистрации полиреокардиограммы проводился нагрузочный изометрический тест – подъем ног из горизонтального положения и удержание под углом 30–45 градусов. Во время нагрузочного теста для здоровых пациентов регистрируется линейный рост амплитуд E- и O-волны. После прекращения нагрузки (опускания ног в горизонтальное положение) амплитуды E- и O-волны принимают начальные значения. Изменение ударного объема во время этого теста объясняется действием механизма Франка – Старлинга, и его линейный рост во время нагрузки соответствует нормальной физиологической реакции. Для пациентов с гипертонической болезнью наблюдаются слабо выраженные изменения амплитуд E- и O-волны (рис. 6А, дана только амплитуда E-волны) и укорочение интервала ISTI во время теста, что свидетельствует о серьезном нарушении компенсаторных механизмов. На рис. 6Б показана связь длин интервала ISTI и интервала RR для здоровых и больных.

Анализ взаимосвязи дыхания, RR-интервала и ударного объема

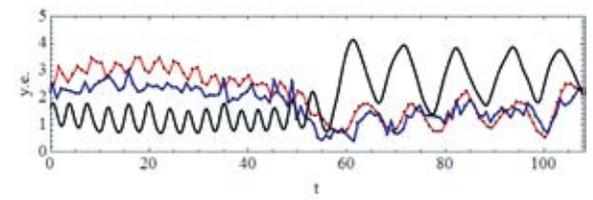
Предлагаемый подход позволяет провести одновременный частотно-временной анализ как пульсовой, так и дыхательной составляющей реографического сигнала. Основной причиной изменения импеданса на вдохе является наполнение альвеол легких воздухом, что приводит к его росту. Одновременно происходит изменение продолжительности RR-интервала и величины



А



Б



Б

**Рис. 7.** Режим нормального и глубокого дыхания. Вариация импеданса (А), вейвлет-образ импедансной реокардиограммы (Б), длинноволновая вариация импеданса (черная линия), изменение RR-интервала (синяя линия) и амплитуды E-волны (красная линия) (Б)

сердечного выброса. На рис. 7 даны исходная реограмма (7А), ее вейвлет-образ (7Б), а также сигнал ИКГ после фильтрации, амплитуда Е-волны и RR-интервал (7В) во время нормального и глубокого дыхания. На вейвлет-плоскости отчетливо видна дыхательная волна, которая существенно меняет свою частоту и интенсивность при глубоком дыхании (пульсовая волна остается за верхней границей рисунка). На рис. 8 продемонстрировано распределение RR-интервалов и ударного объема (амплитуд вейвлет-коэффициентов Е-волны) в зависимости от фазы дыхательного цикла, определенной на основе вариации низкочастотной (дыхательной) компоненты. В этом примере видно, как меняются модуляции RR-интервала и ударного объема в зависимости от глубины дыхания. За счет того что во время вдоха давление в грудной полости ниже, чем обычно, происходит растяжение кровеносных сосудов органов грудной клетки, уменьшение объема крови, поступающей в левые отделы сердца, и уменьшение сердечного выброса. Такое представление совместного функционирования и взаимодействия сердечно-сосудистой и дыхательной систем может служить основой для разработки комплекса функциональных тестов на основе дыхания.

## Заключение

В существующих серийно выпускаемых реокардиографах не используются программы, позволяющие проводить обработку данных в автоматическом режиме, что значительно усиливает влияние субъективной оценки при обработке сигналов и требует в конечном итоге особой подготовки

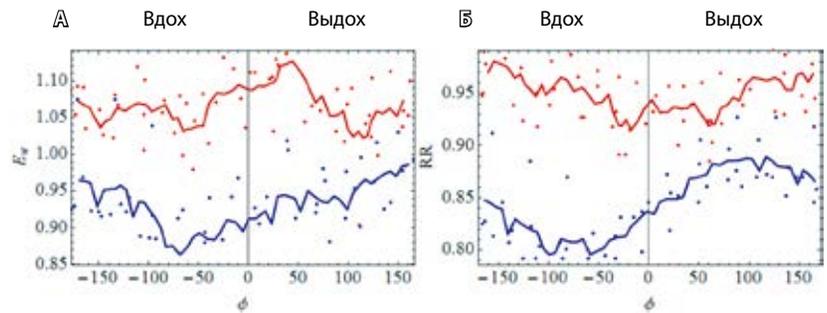


Рис. 8. Зависимость амплитуды RR-интервала (А) и Е-волны (Б) от фазы дыхательной волны при нормальном (красные точки) и глубоком (синие точки) дыхании

специалистов. Кроме того, в серийных приборах результатом измерений и вычислений является набор гемодинамических характеристик, полученных на основе оценки дифференциальной реограммы и вычисления ударного объема по формуле Кубичека. В настоящее время у ведущих специалистов кардиологов нет единого мнения по предлагаемому подходу, а в некоторых исследованиях получены результаты, не подтверждающие этот метод вычисления ударного объема.

Предлагаемый нами подход показывает возможность получения характеристик диастолической фазы сердечного цикла и позволяет уточнить определение ударного объема. Обработка данных проходит в автоматическом режиме. Эти преимущества предполагается использовать при создании мобильного кардиографа для скрининговой диагностики. Прибор предлагается к применению не только в специализированных центрах оказания кардиологической помощи, но и при проведении первичных осмотров в обычных поликлиниках. ©

## Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-00809).

## Литература

1. Бойцов СА. Сосуды как плацдарм и мишень артериальной гипертензии. Актуальные вопросы болезней сердца и сосудов. 2006;1(3):35–40.
2. Чазов ЕИ. Дизрегуляция и гиперреактивность организма как факторы формирования болезни. Кардиологический вестник. 2006;1(1):5–9.
3. Devereux RB, Okin PM, Roman MJ. Left ventricular hypertrophy as a surrogate end-point in hypertension. Clin Exp Hypertens. 1999;21(5–6):583–93.
4. Braunwald E. Heart disease. 5th edition. New York: W.B. Saunders company; 1997. 165 p.
5. Bour J, Kellett J. Impedance cardiography: a rapid and cost-effective screening tool for cardiac disease. Eur J Intern Med. 2008;19(6):399–405. doi: 10.1016/j.ejim.2007.07.007.
6. Lababidi Z, Ehmke DA, Durnin RE, Leaverton PE, Lauer RM. The first derivative thoracic impedance cardiogram. Circulation. 1970;41(4):651–8. doi: 10.1161/01.CIR.41.4.651.
7. Lozano DL, Norman G, Knox D, Wood BL, Miller BD, Emery CF, Berntson GG. Where to B in dZ/dt. Psychophysiology. 2007;44(1):113–9. doi: 10.1111/j.1469-8986.2006.00468.x.
8. Cybulski G. Ambulatory impedance cardiography. The systems and their applications. Series: Lecture notes in electrical engineering. Vol. 76. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag; 2011. doi: 10.1007/978-3-642-11987-3.
9. Pickett BR, Buell JC. Usefulness of the impedance cardiogram to reflect left ventricular diastolic function. Am J Cardiol. 1993;71(12):1099–103. doi: 10.1016/0002-9149(93)90580-6.
10. Kubicek WG, Karnegis JN, Patterson RP, Witsoe DA, Mattson RH. Development and evaluation of an impedance cardiac output system. Aerosp Med. 1966;37(12):1208–12.
11. Ermishkin VV, Lukoshkova EV, Bersenev EYu, Saidova MA, Shitov VN, Vinogradova OL, Khayutin VM. Beat-by-beat changes in pre-ejection period during functional tests evaluated by impedance aortography: a step to a left ventricular contractility monitoring. In: IFMBE Proceedings. Vol. 17. Berlin; Heidelberg: Springer; 2007. p. 655–8. doi: 10.1007/978-3-540-73841-1\_169.
12. Фрик ПГ, Подтаев СЮ, Попов АВ, Думлер АА, Степанов РА. Диагностика состояния сердечно-сосудистой системы на основе вейвлет-анализа данных неинвазивных измерений. Вестник Пермского научного центра УрО РАН. 2010;(1):9–18.
13. Малла С. Вэйвлеты в обработке сигналов. Пер. с англ. М.: Мир; 2005. 672 с.
14. Гайтон А, Холл Д. Медицинская физиология. М.: Логосфера; 2008. 1273 с.



## References

- Boytsov SA. Sosudy kak platsdarm i mishen' arterial'noy gipertenzii [Vasculature as a foothold and a target of arterial hypertension]. Aktual'nye voprosy bolezney serdtsa i sosudov [Urgent issues of heart and vascular disorders]. 2006;1(3):35–40 (in Russian).
- Chazov EI. Dizregulyatsiya i giperreaktivnost' organizma kak faktory formirovaniya bolezni [The body's dysregulation and hyperreactivity as predictors of disease]. Kardiologicheskii vestnik. 2006;1(1):5–9 (in Russian).
- Devereux RB, Okin PM, Roman MJ. Left ventricular hypertrophy as a surrogate end-point in hypertension. Clin Exp Hypertens. 1999;21(5–6):583–93.
- Braunwald E. Heart disease. 5<sup>th</sup> edition. New York: W.B. Saunders company; 1997. 165 p.
- Bour J, Kellett J. Impedance cardiography: a rapid and cost-effective screening tool for cardiac disease. Eur J Intern Med. 2008;19(6):399–405. doi: 10.1016/j.ejim.2007.07.007.
- Lababidi Z, Ehmke DA, Durnin RE, Leaverton PE, Lauer RM. The first derivative thoracic impedance cardiogram. Circulation. 1970;41(4):651–8. doi: 10.1161/01.CIR.41.4.651.
- Lozano DL, Norman G, Knox D, Wood BL, Miller BD, Emery CF, Berntson GG. Where to B in dZ/dt. Psychophysiology. 2007;44(1):113–9. doi: 10.1111/j.1469-8986.2006.00468.x.
- Cybulski G. Ambulatory impedance cardiography. The systems and their applications. Series: Lecture notes in electrical engineering. Vol. 76. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag; 2011. doi: 10.1007/978-3-642-11987-3.
- Pickett BR, Buell JC. Usefulness of the impedance cardiogram to reflect left ventricular diastolic function. Am J Cardiol. 1993;71(12):1099–103. doi: 10.1016/0002-9149(93)90580-6.
- Kubicek WG, Karnegis JN, Patterson RP, Witsoe DA, Mattson RH. Development and evaluation of an impedance cardiac output system. Aersp Med. 1966;37(12):1208–12.
- Ermishkin VV, Lukoshkova EV, Bersenev EYu, Saidova MA, Shitov VN, Vinogradova OL, Khayutin VM. Beat-by-beat changes in pre-ejection period during functional tests evaluated by impedance aortography: a step to a left ventricular contractility monitoring. In: IFMBE Proceedings. Vol. 17. Berlin; Heidelberg: Springer; 2007. p. 655–8. doi: 10.1007/978-3-540-73841-1\_169.
- Frick PG, Podtaev SYu, Popov AV, Dumler AA, Stepanov RA. Diagnostika sostoyaniya serdечно-sosudistoy sistemy na osnove veyvlet-analiza dannykh neinvazivnykh izmereniy [The diagnostics of cardiovascular system status based on a wavelet analysis of noninvasive measurements]. Vestnik Permskogo nauchnogo tsentra UrO RAN. 2010;(1):9–18 (in Russian).
- Mallat S. A wavelet tour of signal processing: the sparse way. 3<sup>rd</sup> edition. Amsterdam; Boston: Elsevier/Academic Press; 2009. 805 p.
- Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. 11<sup>th</sup> edition. New York: Elsevier; 2006. 1116 p.

# Practical implementation of impedance reography in cardiology – new approaches

Dumler A.A.<sup>1</sup> • Podtaev S.Yu.<sup>2</sup> • Stepanov R.A.<sup>3</sup> • Frick P.G.<sup>3</sup>

**Background:** The impedance rheocardiography is a simple, inexpensive, noninvasive method of assessment of central hemodynamics that can be used for detection of cardiovascular remodeling and thus promote an improvement of cardiovascular mortality. Modern mathematical methods of data management could help to discover new possibilities of rheographic signal analysis. **Aim:** To demonstrate the potential of a wavelet-analysis of rheocardiograms for identification of myocardial remodeling of patients with cardiovascular disorders. **Materials and methods:** The proposed method was validated in 12 healthy men aged from 20 to 25 years and 14 patients with arterial hypertension. We used a polyreocardiograph, which records simultaneously the impedance (ICG), the electrocardiogram (ECG) and the phonogram (PCG). The function of the cardiovascular system was assessed based on the two-dimensional time-frequency distributions of wavelet transformed coefficients of differential rheogram curves. **Results:** The results

of an isometric load test confirm the adequacy of stroke volume estimation based on the amplitude of wavelet coefficients and the scale of the E wave. In this technique, ISTI parameter was defined as the time interval between the R wave in the ECG and the maximum of the E wave in the wavelet image. The simultaneous time-frequency analysis of both the pulse and respiratory component of an ICG signal can be a basis for the development of complex functional respiratory tests. **Conclusion:** The approach proposed demonstrates the possibility to obtain the characteristics of the diastolic phase of the cardiac cycle, and allows for a more precise determination of the stroke volume. Data management is done automatically. These advantages are expected to be used for producing a mobile cardiograph for screening diagnostic.

**Key words:** rheocardiography impedance, phonocardiography, stroke volume, wavelet analysis

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-179-185

**Dumler Andrey A.** – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Therapy No 1<sup>1</sup>

**Podtaev Sergey Yu.** – PhD (in Physics and Mathematics), Research and Development Director<sup>2</sup>

**Stepanov Rodion A.** – PhD (in Physics and Mathematics), Leading Research Fellow<sup>3</sup>

✉ 1 Akademika Koroleva ul., Perm, 614013, Russian Federation. Tel.: +7 (342) 237 83 94.  
E-mail: rodion@icmm.ru

**Frick Petr G.** – PhD (in Physics and Mathematics), Professor, Head of Laboratory of Physical Hydrodynamics<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Perm State Medical University named after E.A. Wagner; 26 Petropavlovskaya ul., Perm, 614990, Russian Federation

<sup>2</sup>NTC "FM Diagnostics"; 10 Lenina ul., Perm, 614000, Russian Federation

<sup>3</sup>Institute of Continuous Media Mechanics of the Ural Branch of Russian Academy of Sciences; 1 Akademika Koroleva ul., Perm, 614013, Russian Federation



# Оценка состояния микроциркуляторного русла кожи и сетчатки глаза с помощью оптических методов диагностики у больных сахарным диабетом

Котляр К.Е.<sup>1</sup> • Глазков А.А.<sup>2</sup> • Ковалева Ю.А.<sup>2</sup> • Дроздова Г.А.<sup>3</sup> • Куликов Д.А.<sup>2</sup>

**Актуальность.** В качестве раннего маркера развития осложнений сахарного диабета могут выступать патологические изменения микроциркуляторного русла. В этой связи неинвазивная оценка его состояния у больных сахарным диабетом представляется актуальной задачей. **Цель** – оценка микроциркуляции крови в коже и сетчатке глаза у пациентов с сахарным диабетом с помощью метода оптической диагностики лазерной доплеровской флоуметрии и с помощью анализатора сосудов сетчатки Retinal Vessel Analyser (RVA). **Материал и методы.** Анализ ритмов кожной микроциркуляции проводили в ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Москва) у 18 пациентов с сахарным диабетом 2-го типа и 16 условно здоровых добровольцев. Кожную микроциркуляцию крови измеряли на тыльных поверхностях кисти и стопы методом лазерной доплеровской флоуметрии в течение 2 минут. Амплитуду и частоту колебаний перфузии, соответствующих ритмам различной этиологии, анализировали с использованием вейвлет-преобразования. Изменения вазомоций ретинальных

сосудов изучали в Аахенском университете прикладных наук (Германия) у 33 пациентов с сахарным диабетом 1-го типа в сравнении с показателями 33 условно здоровых добровольцев. Анализ (с использованием преобразования Фурье, кросскорреляционного и автокорреляционного анализа) проводили на основании данных оригинальных записей измерений анализатора сосудов сетчатки RVA. **Результаты.** Между пациентами с сахарным диабетом 2-го типа и условно здоровыми добровольцами различия микроциркуляторных ритмов, оцененных с помощью лазерной доплеровской флоуметрии, в коже верхних конечностей отсутствовали; в коже нижних конечностей были выявлены статистически значимые различия в амплитуде высокочастотных колебаний, соответствующих диапазону сердечного ритма. Эти данные соотносятся с результатами визуального анализа сосудов сетчатки глаза, где также были обнаружены статистически значимые различия в амплитуде колебаний сосудистой стенки, соответствующих кардиоритму. В группе пациентов

с сахарным диабетом 1-го типа периодичность венозных пульсаций была выше, чем в контрольной группе. **Заключение.** И динамический анализ пульсаций и вазомоций сосудов сетчатки глаза (RVA), и анализ ритмов микроциркуляции крови в коже нижних конечностей (лазерная доплеровская флоуметрия) позволили выявить статистически значимые изменения в амплитуде кардиоритма у пациентов с сахарным диабетом. Комбинация данных методов может быть использована в дальнейшем для более полного изучения характера поражения микроциркуляторного русла у больных сахарным диабетом и сопоставления полученной информации с клиническими данными.

**Ключевые слова:** пульсации, вазомоции, ауторегуляция, сетчатка глаза, кожная микроциркуляция крови, неинвазивная диагностика, лазерная доплеровская флоуметрия, анализатор сосудов сетчатки

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-186-192

**П**о данным Международной диабетической федерации (International Diabetes Federation – IDF), в мире каждый 11-й взрослый человек болен сахарным диабетом [1]. Опасность этого заболевания обусловлена высокой частотой осложнений, приводящих к инвалидизации и смерти.

Развитие осложнений сахарного диабета сопровождается системными нарушениями микроциркуляции крови. Морфологические и функциональные изменения сосудов микроциркуляторного русла наряду с реологическими нарушениями наблюдаются даже на ранних (в том числе доклинических) стадиях развития

осложнений [2]. Ранние микроциркуляторные нарушения признаны перспективным клиническим маркером прогрессирующих осложнений сахарного диабета [3]. Тем не менее большинству существующих методов диагностики состояния микроциркуляции присущи отдельные недостатки или их сочетание: высокая вариабельность параметров микроциркуляции (как следствие – методы не обладают клинической значимостью [4, 5]), субъективность, способность выявлять отклонения на поздних стадиях заболевания. Примерами таких методов могут быть офтальмоскопия, видеокапилляроскопия, лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ) [6].



Благодаря доступности для визуального анализа микроциркуляторное русло сетчатки глаза, по сравнению с таковым других органов, лучше всего изучено. Так, осмотр глазного дна офтальмологом – рутинная процедура обследования пациентов с сахарным диабетом. К сожалению, этот метод достаточно субъективен и выявляет уже имеющиеся осложнения, не позволяя проводить их раннюю диагностику [7]. Для объективизации данного метода проводят измерения диаметра артерий и вен сетчатки с помощью различных анализаторов [8]. Одинокое моментальное измерение диаметра сосудов не дает полной информации о состоянии самих сосудов и микроциркуляции в целом, так как сосуды микроциркуляторного русла находятся в движении: выполняя функцию регуляции, они постоянно пульсируют [9]. С возрастом и при различных видах сосудистой патологии динамическое поведение малых сосудов изменяется, причем эти изменения могут происходить уже на ранних стадиях развития сосудистой патологии [10].

Самым известным методом для оценки периферической микроциркуляции считается ЛДФ. Этот метод позволил выявить нарушения кожной микроциркуляции при различных заболеваниях, в том числе при сахарном диабете. Но его диагностическая точность низкая: он отлично выявляет различия между группами, но не позволяет дать медицинское заключение по единичному измерению отдельного пациента. Именно поэтому, несмотря на высокую востребованность ЛДФ в научных исследованиях, врачи не используют этот метод в клинической практике.

Нашей целью был анализ и сопоставление результатов изучения в ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского микроциркуляторных ритмов, регистрировавшихся на коже верхних и нижних конечностей методом ЛДФ, с данными анализа колебаний микрососудов сетчатки глаза, регистрировавшихся с помощью анализатора сосудов сетчатки RVA (Retinal Vessel Analyser) в Аахенском университете прикладных наук.

## Материал и методы

*Колебания смешанной микроциркуляции крови в коже верхних и нижних конечностей* оценивали с помощью метода ЛДФ. В исследование включили 18 пациентов (9 мужчин и 9 женщин) с сахарным диабетом 2-го типа в состоянии декомпенсации (длительность заболевания более 5 лет, уровень HbA1c > 7,5%, наличие осложнений). Медиана уровня HbA1c составила 9,3% [8,1; 9,9], средний возраст пациентов – 61,6 ± 8,3 года. В контрольную группу вошли 16 молодых условно здоровых

**Котляр Константин Ефимович** – д-р биол. наук, профессор, факультет медицинской инженерии и прикладной математики<sup>1</sup>  
 ✉ FH Aachen University of Applied Sciences, Campus Jülich; Heinrich-Mussmann-Str., Jülich, 52428, Germany.  
 Тел.: +49 (0) 241 600 95 38 12. E-mail: kotliar@fh-aachen.de

**Глазков Алексей Андреевич** – мл. науч. сотр., лаборатория медико-физических исследований<sup>2</sup>

**Ковалева Юлия Александровна** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., отделение терапевтической эндокринологии<sup>2</sup>

**Дроздова Галина Александровна** – д-р мед. наук, профессор, кафедра общей патологии и патологической физиологии медицинского факультета<sup>3</sup>

**Куликов Дмитрий Александрович** – канд. мед. наук, ученый секретарь<sup>2</sup>

добровольцев (9 женщин и 7 мужчин), средний возраст – 22,9 ± 2,4 года. Кожную микроциркуляцию крови регистрировали на верхних и нижних конечностях с использованием комплекса ЛАКК-02 в течение 2 минут. На ноге регистрацию параметров микроциркуляции проводили на тыльной поверхности правой стопы на 4 см дистальнее середины межпальцевой линии, на верхней конечности – на тыльной поверхности правой кисти на 4 см дистальнее середины лучезапястного сустава. После 2 минут записи микроциркуляции проводили Вейвлет-преобразование полученной ЛДФ-граммы и оценивали амплитуду и частоту сосудистых ритмов (нейрогенного, миогенного, дыхательного и сердечного).

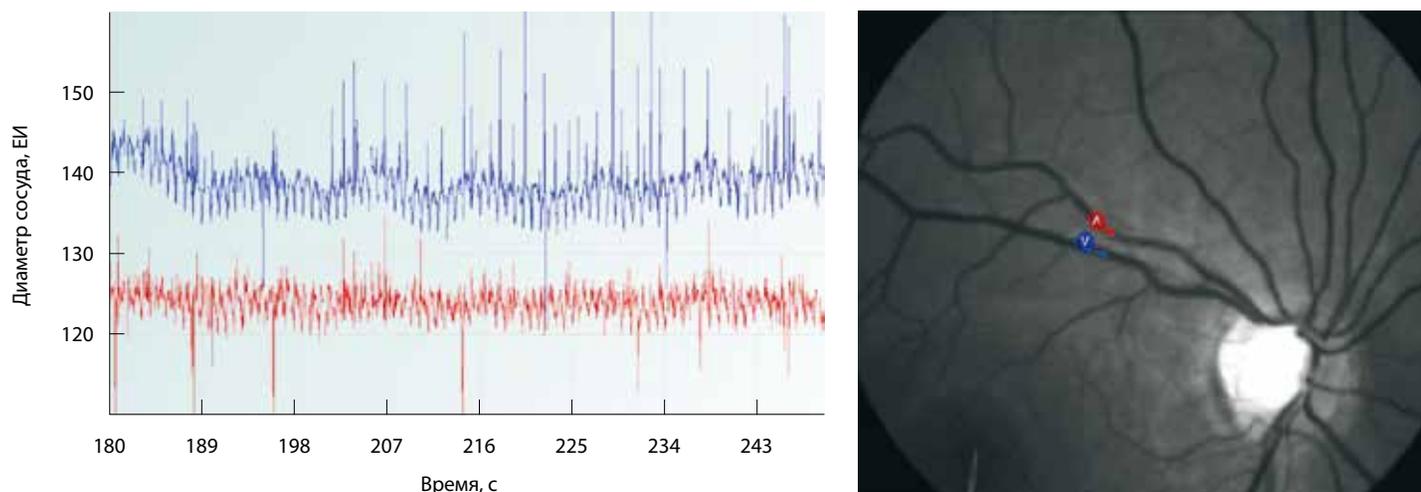
В исследовании *пульсаций и вазомоций артерий и вен сетчатки* участвовали 33 пациента с сахарным диабетом 1-го типа в возрасте 51,7 ± 8,3 года, из них 16 мужчин и 17 женщин, а также 33 здоровых по медицинским показателям добровольцев, сопоставимых с основной группой по возрастным и гендерным параметрам (средний возраст – 52,3 ± 9,1 года; 16 мужчин и 17 женщин). Все пациенты находились на инсулиновой терапии, не имели серьезных параметров. В 22 наблюдениях диабетическая ретинопатия отсутствовала (уровень HbA1c равнялся 6,8% [6,0; 7,4]), в 11 случаях была диагностирована ее легкая форма (HbA1c – 7,1% [6,8; 7,5]).

Для анализа использовали оригинальные записи измерений с анализатора сосудов сетчатки правого глаза RVA (IMEDOS Systems, Йена, ФРГ) вне периодов функциональной стимуляции. Выбирался участок временной зависимости изменения диаметра (рис. 1) продолжительностью ~ 40 с (1024 точки). Критериями включения были временные интервалы с менее чем 10% выпадающих значений (вызванных, как правило, морганием или случайными саккадами) и отсутствием промежутков длиннее 1 с. Короткие промежутки – менее 1 с – интерполировались. Обработка сигнала осуществлялась сервисными программами VBA MS Excel и MATLAB. Характеристические частоты периодического изменения диаметра сосудов сетчатки анализировались с помощью быстрого преобразования Фурье. Автокорреляционный анализ использовали для изучения периодичности и стабильности модуляции сосудистой стенки. Кросскорреляционный анализ выявлял относительное временное смещение осцилляций артерий и вен, характеризующее ригидность сосудов и оболочек глазного яблока. При анализе динамического поведения сосудов сетчатки

<sup>1</sup> Аахенский университет прикладных наук; 52066, Ахен, Байерн аллея 11, Федеративная Республика Германия

<sup>2</sup> ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

<sup>3</sup> ГАОУ ВПО «Российский университет дружбы народов»; 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8, Российская Федерация

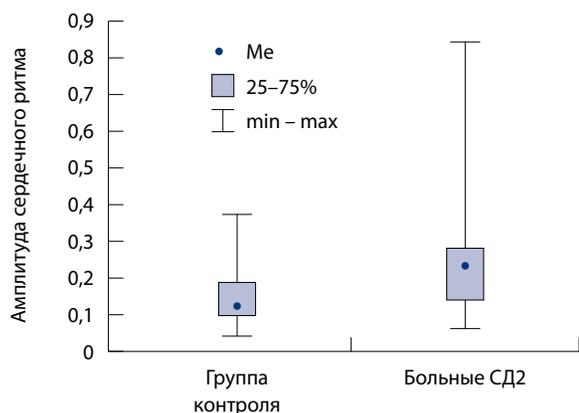


**Рис. 1.** Пример высоко- и низкочастотных временных изменений диаметров сосудов (пульсаций и вазомоций), записанных на анализаторе сосудов сетчатки правого глаза (Retinal Vessel Analyser – RVA) в течение ~60 с на участках, показанных справа. Синяя линия – вена, красная линия – артерия. Вертикальная ось: абсолютный диаметр сосуда измеряется RVA в так называемых единицах измерения (ЕИ)

**Таблица 1.** Результаты анализа микроциркуляторных ритмов на верхних и нижних конечностях у больных сахарным диабетом 2-го типа и здоровых добровольцев

Локализация	Параметр	Ритм	Контроль (n = 16)	Пациенты с сахарным диабетом 2-го типа (n = 18)	Значение p (критерий Манна – Уитни)
Верхняя конечность	Частота	Нейрогенный	0,040 [0,025; 0,058]	0,039 [0,035; 0,055]	0,794
		Миогенный	0,068 [0,063; 0,101]	0,070 [0,062; 0,083]	0,755
		Дыхательный	0,223 [0,202; 0,271]	0,223 [0,201; 0,271]	0,862
		Сердечный	1,055 [0,655; 1,162]	1,006 [0,630; 1,168]	0,904
	Амплитуда	Нейрогенный	0,505 [0,325; 0,575]	0,270 [0,190; 0,640]	0,269
		Миогенный	0,430 [0,275; 0,640]	0,270 [0,190; 0,560]	0,234
		Дыхательный	0,170 [0,130; 0,245]	0,190 [0,150; 0,310]	0,457
		Сердечный	0,120 [0,095; 0,160]	0,160 [0,090; 0,190]	0,333
Нижняя конечность	Частота	Нейрогенный	0,030 [0,025; 0,043]	0,041 [0,027; 0,050]	0,226
		Миогенный	0,063 [0,061; 0,087]	0,063 [0,061; 0,099]	0,754
		Дыхательный	0,207 [0,200; 0,223]	0,255 [0,210; 0,314]	0,033
		Сердечный	1,122 [0,942; 1,330]	1,104 [0,964; 1,208]	0,546
	Амплитуда	Нейрогенный	0,400 [0,330; 0,570]	0,355 [0,140; 0,720]	0,704
		Миогенный	0,360 [0,205; 0,520]	0,275 [0,120; 0,560]	0,904
		Дыхательный	0,155 [0,065; 0,275]	0,135 [0,080; 0,200]	0,769
		Сердечный	0,125 [0,100; 0,190]	0,235 [0,140; 0,280]	0,015

Данные представлены в виде медианы [25-й процентиль; 75-й процентиль]



**Рис. 2.** Различия в амплитуде сердечных ритмов между группами больных сахарным диабетом 2-го типа (СД2) и здоровыми добровольцами;  $p=0,015$  (критерий Манна – Уитни)

использовали следующую дифференциацию осцилляций: высокочастотные (пульсации) – период  $< 1,5$  с, частота  $> 0,67$  Гц и низкочастотные (вазомоции) – период  $> 1,5$  с, частота  $< 0,67$  Гц. На основе данных измерений RVA рассчитывали преобладающие частотные интервалы осцилляций (нормированная площадь под кривой спектра мощности на частотных интервалах, безразмерная величина) и коэффициент периодичности (отношение мощности периодической составляющей и мощности стохастической составляющей анализируемого сигнала: временное изменение диаметра сосуда, безразмерная величина).

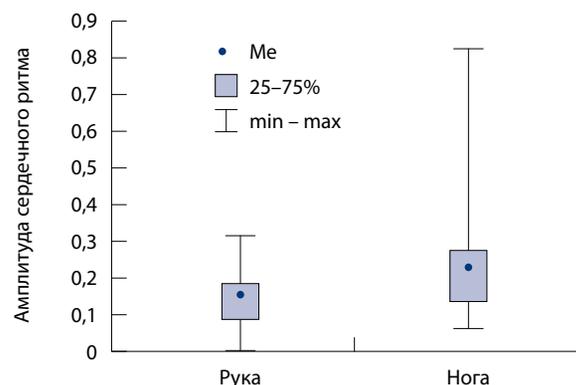
Кроме того, для групп пациентов и здоровых испытуемых по индивидуальным частотным спектрам рассчитывали усредненные спектры мощности осцилляций артерий и вен: точка усредненного спектра на данной частоте рассчитывалась как медиана значений всех индивидуальных спектров группы на этой частоте.

Данные представлены в форме медианы, в квадратных скобках указаны 25-й и 75-й перцентили – Me [Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>]. Сравнение групп осуществлялось непараметрическим критерием Манна – Уитни с коррекцией на множественные сравнения. Уровень  $p < 0,05$  рассматривался как статистически значимый. Статистическая обработка данных проводилась программами MS Excel, Statistica 10 и SPSSv.17.0.

## Результаты и обсуждение

Ритмы смешанной периферической микроциркуляции у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа

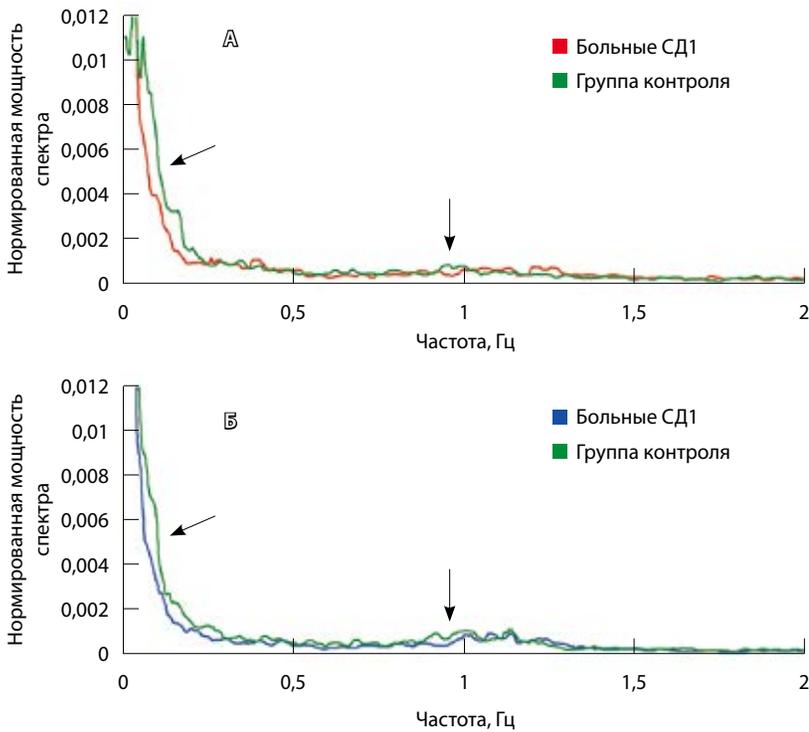
Результаты анализа микроциркуляторных ритмов, полученных после вейвлет-преобразования ЛДФ-грамм двухминутной длительности, приведены



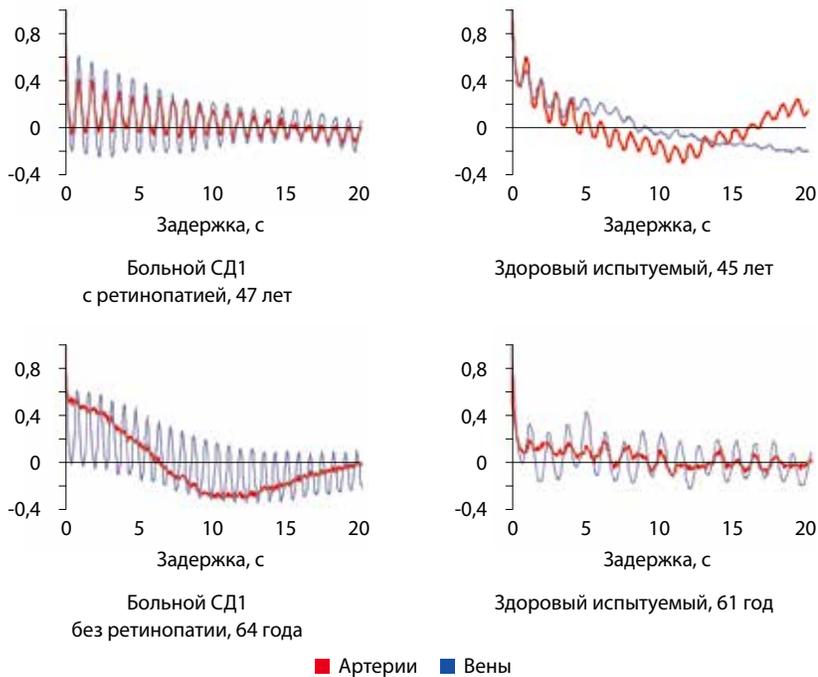
**Рис. 3.** Различия в амплитуде сердечных ритмов между верхней и нижней конечностью у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа ( $p = 0,023$ , критерий Уилкоксона)

в табл. 1. Статистически значимые различия между группами пациентов с сахарным диабетом 2-го типа и здоровыми людьми были выявлены по параметрам частоты дыхательных ритмов и амплитуды сердечных ритмов на нижней конечности. В группе пациентов с сахарным диабетом 2-го типа были обнаружены статистически значимые различия в амплитуде сердечных колебаний между верхней и нижней конечностями (рис. 2). Амплитудно-частотные характеристики спектров колебаний на нижних конечностях больных диабетом приведены на рис. 3.

Как правило, исследователи обращают внимание на низкочастотные колебания – менее 0,2 Гц, которые отражают миогенные, нейрогенные и эндотелиальные ритмы [9, 11]. Большой интерес для оценки может также представлять кардиальный ритм. В капиллярной сети систолические/диастолические пульсации линейной скорости кровотока отсутствуют, но, присутствуя в артериолах и артериовенозных шунтах, они могут вносить существенный вклад в амплитуду регистрируемого с помощью ЛДФ кардиоритма. Следовательно, если для низкочастотных ритмов амплитуда колебаний отражает именно движения сосудистой стенки, то для амплитуды сердечного ритма важную роль играют скачки линейной скорости кровотока. В качестве дополнительного объяснения увеличения амплитуды сердечного ритма в исследуемой группе можно привести известные данные о том, что при нейропатии у пациентов задействуется большее количество артериовенозных шунтов [12]. Таким образом, значительная часть крови минует капиллярное звено, где пульсовые колебания скорости кровотока отсутствуют, и идет по шунтам, где эти колебания, видимо, регистрируются прибором.



**Рис. 4.** Усредненные нормированные спектры мощности в группах больных сахарным диабетом 1-го типа (СД1) и здоровых людей: **А** – спектры артериальных пульсаций/вазомоций, **Б** – спектры венозных пульсаций/вазомоций. Стрелками показаны частотные интервалы, на которых усредненные нормированные спектры значительно различались между группами (площадь под кривой)



**Рис. 5.** Анализ регистрации анализатора сосудов сетчатки (RVA): примеры характерных автокорреляционных функций колебаний сосудистой стенки артерий и вен сетчатки в группах больных сахарным диабетом 1-го типа (СД1) и здоровых добровольцев

Пульсации и вазомоции артерий и вен сетчатки у пациентов с сахарным диабетом 1-го типа. Значения большинства количественных параметров, характеризующих пульсации и вазомоции артерий пациентов с сахарным диабетом 1-го типа, не отличались от контрольной группы. Суммарные спектральные характеристики в группах демонстрировали различия осцилляций сосудистой стенки артерий и вен, особенно на низких частотах (площадь под кривой на частотных интервалах, рис. 4). Кроме того, периодичность венозных пульсаций была значительно выше в группе больных диабетом по сравнению со здоровыми людьми (рис. 5). Внезапный численный коэффициент в группе больных диабетом и в контрольной группе составлял: для частот, соответствующих сердечному ритму, 0,12 [0,08; 0,23] и 0,08 [0,06; 0,17] ( $p < 0,05$ , тест Манна – Уитни); для частот, соответствующих дыхательным, нейрогенным и миогенным ритмам, 0,62 [0,49; 1,23] и 0,16 [0,10; 0,24] ( $p < 0,001$ ). Таким образом, вены сетчатки у пациентов с сахарным диабетом демонстрировали измененные вазомоции и пульсации по сравнению с возрастной и гендерной нормой. Эти изменения, предположительно, отражают известные при данном заболевании нарушения функции сосудистой стенки, а также ухудшение регуляции микроциркуляторного русла сетчатки. Отсутствие различий для коэффициентов периодичности, характеризующих артериальные пульсации и вазомоции, может означать преобладающее сохранение нормальной функции ретинальных артериальных осцилляций при хорошо подобранной инсулиновой терапии.

Исследование периферической смешанной микроциркуляции методом ЛДФ позволило выявить статистически значимое увеличение в амплитуде сердечного ритма у больных с сахарным диабетом 2-го типа на нижних конечностях по сравнению с контролем. При анализе нормированной мощности спектра у пациентов с сахарным диабетом 1-го типа с помощью RVA наблюдаются противоположные результаты: площадь под графиком для высокочастотных колебаний (в том числе соответствующих сердечному ритму) у пациентов с сахарным диабетом ниже, чем в контрольной группе, и для артерий, и для вен (см. рис. 4). Это расхождение можно объяснить множеством причин. Подобранные группы сильно различались: группы больных – по типу диабета, состоянию компенсации заболевания, наличию осложнений; контрольные группы не были сопоставимы по возрасту. Помимо этого, вклад могла внести специфика методов: ЛДФ в оценке сердечного



ритма учитывает как движения сосудистой стенки, так и пульсовые колебания линейной скорости кровотока, а с помощью RVA можно с высокой точностью оценить изменение диаметра сосуда. Получается, что ЛДФ дает некую «суммарную характеристику» периферического микроциркуляторного кровотока, в то время как RVA позволяет вычленять нарушения сосудодвигательных реакций в конкретном сосуде. Снижение в группе с сахарным диабетом амплитуды высокочастотных колебаний венозных и артериальных сосудов сетчатки можно, видимо, объяснить увеличением ригидности сосудистой стенки и нарушением регуляторных механизмов. Увеличение этого же параметра для периферической смешанной микроциркуляции, регистрируемой при помощи ЛДФ, может быть обусловлено высокими значениями пульсовых скачков линейной скорости кровотока у больных сахарным диабетом. Для проверки высказанных гипотез и установления взаимосвязей между нарушениями микроциркуляции в сетчатке

и на периферии целесообразным становится проведение двуцентрового исследования с совместным использованием ЛДФ и RVA с применением общих аналитических методов на сопоставимых когортах обследуемых.

## Заключение

Как видно из представленных результатов, оба метода оценки микроциркуляции выявляют различия между контрольной и исследуемой группами. То, что результаты оценки амплитуды колебаний, соответствующих сердечному ритму, разными методами оказались противоположными, может быть обусловлено как особенностями методов, так и неоднородностью поражения сосудистого русла при разных типах сахарного диабета и разной степени тяжести заболевания. Для более глубокого изучения этого вопроса необходимо проведение параллельного двуцентрового исследования с применением как ЛДФ, так и RVA на одной когорте обследуемых. ☺

## Литература

1. International Diabetes Federation. IDF Diabetes, 7<sup>th</sup> edition. Brussels: International Diabetes Federation; 2015. Доступно на: <http://www.diabetesatlas.org>
2. Koscielny J, Latza R, Wolf S, Kiesewetter H, Jung F. Early rheological and microcirculatory changes in children with type 1 diabetes mellitus. *Clin Hemorheol Microcirc.* 1998;19(2):139–50.
3. Greenman RL, Panasyuk S, Wang X, Lyons TE, Dinh T, Longoria L, Giurini JM, Freeman J, Khadodhiar L, Veves A. Early changes in the skin microcirculation and muscle metabolism of the diabetic foot. *Lancet.* 2005;366(9498):1711–7. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67696-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67696-9).
4. Roustit M, Cracowski JL. Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation.* 2012;19(1):47–64. doi: 10.1111/j.1549-8719.2011.00129.x.
5. Рогаткин ДА, Лапитан ДГ, Колбас ЮЮ, Шумский ВИ. Индивидуальная вариабельность параметров микроциркуляции крови и проблемы функциональной диагностики системы микроциркуляции. *Функциональная диагностика.* 2012;(4):24–9.
6. Allen J, Howell K. Microvascular imaging: techniques and opportunities for clinical physiological measurements. *Physiol Meas.* 2014;35(7):R91–R141. doi: 10.1088/0967-3334/35/7/R91.
7. Verma A, Raman R, Vaitheeswaran K, Pal SS, Laxmi G, Gupta M, Shekar SC, Sharma T. Does neuronal damage precede vascular damage in subjects with type 2 diabetes mellitus and having no clinical diabetic retinopathy? *Ophthalmic Res.* 2012;47(4):202–7. doi: 10.1159/000333220.
8. Котляр К, Дроздова Г. Гемодинамика глаза и современные методы ее исследования. Часть III. Неинвазивные методы исследования кровообращения глаза. 3. Регистрация пульсовых колебаний, оксиметрия и новейшие методики в стадии разработки. *Глаукома.* 2007;(3):49–59.
9. Крупаткин А, Сидоров В. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем: колебания, информация, нелинейность: руководство для врачей. М.: Либроком; 2014. 498 с.
10. Bek T, Jeppesen P, Kanters JK. Spontaneous high frequency diameter oscillations of larger retinal arterioles are reduced in type 2 diabetes mellitus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(1):636–40. doi: 10.1167/iov.12-11182.
11. Au M, Rattigan S. Barriers to the management of Diabetes Mellitus – is there a future role for Laser Doppler Flowmetry? *Australas Med J.* 2012;5(12):627–32. doi: 10.4066/AMJ.2012.1526.
12. Береговский ВБ, Карпова ИА, Алексеева ЕС. Нарушения кожной микроциркуляции в нижних конечностях при сахарном диабете: патофизиологический феномен или объект для лечения? *Сахарный диабет.* 2011;(3):49–53.

## References

1. International Diabetes Federation. IDF Diabetes, 7<sup>th</sup> edition. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2015. Available from: <http://www.diabetesatlas.org>
2. Koscielny J, Latza R, Wolf S, Kiesewetter H, Jung F. Early rheological and microcirculatory changes in children with type 1 diabetes mellitus. *Clin Hemorheol Microcirc.* 1998;19(2): 139–50.
3. Greenman RL, Panasyuk S, Wang X, Lyons TE, Dinh T, Longoria L, Giurini JM, Freeman J, Khadodhiar L, Veves A. Early changes in the skin microcirculation and muscle metabolism of the diabetic foot. *Lancet.* 2005;366(9498):1711–7. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67696-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67696-9).
4. Roustit M, Cracowski JL. Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation.* 2012;19(1):47–64. doi: 10.1111/j.1549-8719.2011.00129.x.
5. Rogatkin DA, Lapitan DG, Kolbas YuYu, Shumskiy VI. Individual'naya variabel'nost' parametrov mikrotsirkulyatsii krovi i problemy funkcional'noy diagnostiki sistemy mikrotsirkulyatsii [Individual variability of blood microcirculation parameters and problems



of functional diagnostics of microcirculation system]. *Funktsional'naya diagnostika*. 2012;(4):24–9 (in Russian).

6. Allen J, Howell K. Microvascular imaging: techniques and opportunities for clinical physiological measurements. *Physiol Meas*. 2014;35(7):R91–R141. doi: 10.1088/0967-3334/35/7/R91.

7. Verma A, Raman R, Vaitheeswaran K, Pal SS, Laxmi G, Gupta M, Shekar SC, Sharma T. Does neuronal damage precede vascular damage in subjects with type 2 diabetes mellitus and having no clinical diabetic retinopathy? *Ophthalmic Res*. 2012;47(4):202–7. doi: 10.1159/000333220.

8. Kotliar K, Drozdova G. Gemodinamika glaza i sovremennye metody ee issledovaniya. Chast' III. Neinvazivnye metody issledovani-

ya krovoobrashcheniya glaza. 3. Registratsiya pul'sovykh kolebaniy, oksimetriya i noveyshe metodiki v stadii razrabotki [Ocular hemodynamics and contemporary methods of its assessment. Part III. Non-invasive methods of assessment of ocular blood flow. 3. Assessment of ocular pulse, oxymetry and novel methods under development]. *Glaukoma*. 2007;(3):49–59 (in Russian).

9. Krupatkin A, Sidorov V. Funktsional'naya diagnostika sostoyaniya mikrotsirkulyatorno-tkanevykh sistem: kolebaniya, informatsiya, nelineynost': rukovodstvo dlya vrachey [Functional diagnostics of microvasculature: oscillations, information, non-linearity: a guide for doctors]. Moscow: Librokom; 2014. 498 p. (in Russian).

10. Bek T, Jeppesen P, Kanters JK. Spontaneous high frequency diameter oscillations of larg-

er retinal arterioles are reduced in type 2 diabetes mellitus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(1):636–40. doi: 10.1167/iovs.12-11182.

11. Au M, Rattigan S. Barriers to the management of Diabetes Mellitus – is there a future role for Laser Doppler Flowmetry? *Australas Med J*. 2012;5(12):627–32. doi: 10.4066/AMJ.2012.1526.

12. Beregovskiy VB, Karpova IA, Alekseeva ES. Narusheniya kozhnoy mikrotsirkulyatsii v nizhnikh konechnostyakh pri sakharnom diabete: patofiziologicheskii fenomen ili ob'ekt dlya lecheniya? [Disturbances of skin microcirculation in lower extremities in diabetes mellitus: a pathophysiological phenomenon or an object for therapy?]. *Diabetes Mellitus*. 2011;(3):49–53 (in Russian).

## Assessment of the skin and retinal microvasculature with the optical methods of diagnostics in patients with diabetes mellitus

Kotliar K.E.<sup>1</sup> • Glazkov A.A.<sup>2</sup> • Kovaleva Yu.A.<sup>2</sup> • Drozdova G.A.<sup>3</sup> • Kulikov D.A.<sup>2</sup>

**Background:** Abnormalities of microvasculature could be an early marker of diabetic complications. Therefore, its non-invasive assessment in diabetic patient seems highly relevant. **Aim:** To assess microcirculation in the skin and retina of patients with diabetes mellitus using optical diagnostic techniques: laser Doppler flowmetry (LDF) and Retinal Vessel Analyser (RVA). **Materials and methods:** Cutaneous microcirculation rhythms were analyzed in 18 patients with type 2 diabetes mellitus and 16 healthy volunteers in the MONIKI (Moscow, Russia). Microcirculation in the dorsal hand and foot skin was assessed by LDF for 2 minutes. The amplitude and frequencies of perfusion oscillations corresponding to the rhythms of various etiologies were computed by Wavelet-analysis. Retinal vasomotions and their changes were studied in 33 type 1 diabetic patients compared to 33 healthy volunteers in the Aachen University of Applied Sciences (Germany). Original recordings made by the RVA were used for the analysis with a Fourier transformation, cross-correlation and autocorrelation. **Results:** There was no significant difference in the hand skin microcirculation rhythms assessed by LDF between patients with diabetes mellitus and healthy volunteers, whereas in the lower extremities, statistically

significant differences were found in the amplitude of high-frequency oscillations corresponding to the range of the heart rhythm. These results correlate well with the results of the optical assessment of retinal vasculature, where statistically significant differences in the amplitude of high frequency oscillations corresponding to the heart rate were found. In type 1 diabetic patients the periodicity of venous pulsation was higher than in the control healthy group. **Conclusion:** Both dynamic analysis of the pulsations and vasomotions of retinal vessels assessed by RVA and analysis of the rhythms of blood circulation in the skin of the lower extremities measured by LDF revealed a statistically significant abnormalities of the microcirculatory dynamics in diabetic patients. The combination of these methods can be successfully applied for a more comprehensive evaluation of the nature of microvascular abnormalities in diabetic patients and for comparison of the information obtained with clinical data.

**Key words:** pulsation, vasomotion, autoregulation, retina, skin microcirculation, non-invasive diagnostics, laser Doppler flowmetry, retinal vessel analyser

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-186-192

**Kotliar Konstantin E.** – PhD (in Biol.), Professor, Faculty of Medical Engineering and Applied Mathematics<sup>1</sup>

✉ FH Aachen University of Applied Sciences, Campus Jülich; 1 Heinrich-Mussmann-Str., Jülich, 52428, Germany. Tel.: +49 (0) 241 600 95 38 12.

E-mail: kotliar@fh-aachen.de

**Glazkov Alexey A.** – MD, Junior Research Fellow, Medical Physics Laboratory<sup>2</sup>

**Kovaleva Yulia A.** – MD, PhD, Senior Research Fellow, Department of Therapeutic Endocrinology<sup>2</sup>

**Drozdova Galina A.** – MD, PhD, Professor, Chair of General Pathology and Pathophysiology, Medical Faculty<sup>3</sup>

**Kulikov Dmitry A.** – MD, PhD, Scientific Secretary<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Aachen University of Applied Sciences; 11 Bayernallee, Aachen, 52066, Germany

<sup>2</sup> Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation

<sup>3</sup> Peoples' Friendship University of Russia; 8 Mikluho-Maklaya ul., Moscow, 117198, Russian Federation



# Изучение биофизических свойств костной ткани для медико-биологических приложений

Матвейчук И.В.<sup>1</sup> • Розанов В.В.<sup>1,2</sup> • Литвинов Ю.Ю.<sup>1</sup>

**Актуальность.** В последние десятилетия объемом реконструктивно-восстановительных операций в травматологии значительно вырос ввиду повышения случаев травматизма, числа пострадавших в локальных военных конфликтах, ухудшения экологии. Это привело к увеличению потребности в пластическом материале и необходимости создания современных наукоемких технологий, позволяющих удовлетворить спрос на пластический материал, включая альтернативные источники получения костных имплантатов. Решение этой проблемы предусматривает углубленное изучение биофизических свойств костной ткани с использованием инновационных методов для разработки требований к созданию новых эффективных имплантатов на основе как натуральной кости, так и искусственных и природных аналогов. Указанные аспекты стали **целью** настоящего исследования, результаты которого представляют интерес для медико-биологических и клинических приложений. **Материалом** исследования послужили фрагменты костей различной локализации человека в возрастном диапазоне от 3 до 89 лет и животных (бык) в возрасте от 1,5 до 2 лет. Биофизические особенности исследованного материала изучены на стадиях пробоподготовки с использованием оригинальных авторских **методов** физико-механической обработки, при анализе закономерностей изменения

структурно-функционального состояния костного вещества в норме, при изменении его композитности с учетом возрастного фактора, анизотропии материала и уровня структурной организации. Изучение закономерностей структуры выполнено с применением классических (световая, сканирующая электронная микроскопия) и современных (акустическая микроскопия) методов. Для оценки функциональных изменений в макро- и микрообъемах костных образцов использованы методы инженерной биомеханики. К основным **результатам** исследований следует отнести разработку инновационных методов пробоподготовки и структурно-функционального анализа. В первую очередь – методы механической обработки костных фрагментов, основанные на использовании в условиях ограниченного количества минерализованных биотканей дисковых и полых цилиндрических фрез, а также на применении гидродинамической инцизии, обеспечивающей щадящий режим высокоэффективного режущего воздействия на костную ткань. Другой отличительной особенностью исследования является разработанная методология морфо-механического анализа костных образцов на макро- и микроуровне с учетом реального физико-химического состояния образцов. С целью обеспечения стерильности образцов авторами предложены инновационные методы

с использованием озono-кислородных смесей. В результате исследований получены комплексные количественные характеристики, отражающие возрастные изменения композиционного состава костной ткани человека, анизотропию ее физико-механических характеристик, параметров остеонов, физико-механических показателей костной ткани с учетом композиционного состава. **Заключение.** Применение предложенной методологии позволило получить новые сведения о биофизических свойствах костной ткани, представляющие интерес для биоимплантологии, биоматериаловедения и расширяющие фундаментальные представления о костной ткани как природном биокомпозите. Они служат базой для выработки практических рекомендаций по оптимизации выбора костных фрагментов для изготовления имплантатов с учетом выявленных закономерностей изменения макро- и микроструктуры, физико-механических характеристик и состава костной ткани в исследованном возрастном диапазоне.

**Ключевые слова:** костная ткань, физико-механические характеристики, биоимплантаты, методы пробоподготовки, цилиндрические полые фрезы, гидродинамическая резка биотканей

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-193-202



**К**остная ткань представляет собой уникальный природный композитный биополимер, который участвует в построении костей как элементов биомеханической системы, выполняющих различные функции в организме человека и животных – опорную, локомоторную, защитную, а также служит депо минеральных компонентов на основе кальция и фосфора. В последние десятилетия отмечен повышенный интерес к комплексным исследованиям минерализованных тканей, что объясняется возрастанием объема реконструктивно-восстановительных операций в травматологии, ортопедии, челюстно-лицевой хирургии ввиду повышения случаев травматизма, ухудшения экологии, увеличения числа пострадавших в локальных военных конфликтах [1]. Это обусловило возрастание потребности в пластическом материале, соответствующем установленным медико-техническим требованиям. Учитывая, что количество костей аллогенного происхождения, отвечающих принятым критериям, постоянно снижается, существует необходимость создания современных наукоемких технологий, позволяющих удовлетворить спрос на пластический материал, включая альтернативные источники получения костных имплантатов. Актуальность рассматриваемой проблемы подтверждается тем, что 2001–2010 гг. были объявлены Всемирной организацией здравоохранения и Международным обществом ортопедической хирургии и травматологии (SICOT) десятилетием костей и суставов.

Существуют различные подходы к решению задач в рамках рассматриваемой проблемы. Один из них предполагает создание новых, а также совершенствование и экспериментальную апробацию существующих технологий получения и комплексного анализа биофизических свойств костной ткани как природного биополимера, включая изучение дифференциальных и интегральных характеристик основных его компонентов с применением объективных методов оценки морфофункционального состояния [1, 2]. Экспериментальные данные, полученные при использовании такого подхода, могут служить в качестве базисных при установлении критериев и выработке требований к созданию современных имплантатов, в том числе новых лекарственных форм с использованием костных имплантатов в качестве носителей лекарственных препаратов.

Цель настоящего исследования – изучение биофизических свойств костной ткани для медико-биологических приложений на основе комплексного структурно-функционального анализа

**Матвейчук Игорь Васильевич** – д-р биол. наук, профессор, руководитель Научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий<sup>1</sup>  
✉ 123056, г. Москва, ул. Красина, 2, Российская Федерация.  
Тел.: +7 (499) 254 46 49.  
E-mail: nizbmtvilar@mtu-net.ru

**Розанов Владимир Викторович** – канд. физ.-мат. наук, д-р биол. наук, зав. лабораторией Научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий<sup>1</sup>, вед. науч. сотр. научного центра гидрофизических исследований физического факультета, профессор кафедры физики ускорителей и радиационной медицины физического факультета<sup>2</sup>  
✉ 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1/2, физический факультет МГУ, Российская Федерация.  
Тел.: +7 (495) 939 24 44.  
E-mail: vrozanov@mail.ru

**Литвинов Юрий Юрьевич** – заместитель руководителя Научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий<sup>1</sup>

костных образцов с использованием наукоемких технологий их изготовления и современных методов исследования.

## Материал и методы

Объектом исследования служили как целые бедренные, плечевые, большеберцовые, малоберцовые, нижнечелюстные кости, ребра, позвонки и их фрагменты, так и изготовленные из них с учетом методических и биологических факторов образцы компактного и губчатого вещества костей людей и животных. Указанный материал был взят от трупов мужчин европеоидной расы, причина смерти которых не связана с заболеваниями костно-суставной системы. Возрастной диапазон составил от 3 до 89 лет (II–VII возрастные группы), посмертный период – от 8 до 24 часов. Общее количество исследованных костей – 340.

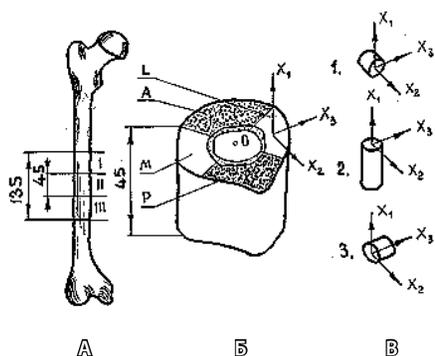
Для сравнительного структурно-биомеханического анализа были использованы 400 костей от клинически здоровых животных класса млекопитающих (бык, возраст от 1,5 до 2 лет). Посмертный период составлял от 1 до 5 часов. Животных содержали в условиях их промышленного разведения в хозяйствах Подмосковья при стандартном режиме кормления.

Поскольку вопросам пробоподготовки костных образцов с учетом высоких современных требований до сих пор уделяется мало внимания, авторы предложили инновационные физические (основанные на применении отрезных дисковых и полых цилиндрических фрез) и физико-химические (с использованием метода гидродинамической инцизии) способы решения данной проблемы.

При проведении морфологического анализа применяли методы объективной регистрации – световую микроскопию, сканирующую электронную микроскопию и акустическую микроскопию. Биомеханические исследования осуществляли на макрообразцах (цилиндрические образцы диаметром от 3 до 5 мм, высота образцов – от 5 до 15 мм) посредством проведения испытаний на сжатие и путем изучения упруго-пластических свойств указанных образцов в микрообъемах, определяя показатель микротвердости по Виккерсу с учетом особенностей архитектоники и уровней структурной организации костной ткани. Физические характеристики костных образцов (объемная масса или кажущаяся плотность) изучали с помощью гравиметрического анализа, предварительно регистрируя линейные размеры с применением контактных и бесконтактных методов. Для

<sup>1</sup> ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» ФАНО России; 117216, г. Москва, ул. Грина, 7, Российская Федерация

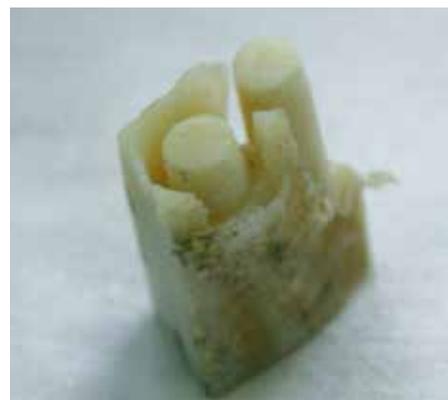
<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1, Российская Федерация



**Рис. 1.** Схема деления диафиза бедренной кости (А) на зоны и пояса (Б) с учетом фактора анизотропии (В): образцы продольной (1), тангенциальной (трансверсальной) (2) и радиальной (3) ориентации



**Рис. 2.** Цилиндрические полые фрезы разного рабочего диаметра



**Рис. 3.** Пример практической реализации метода получения образцов с помощью полых фрез при использовании ограниченного количества костного вещества

определения состава компактной костной ткани использовали композиционный и элементный анализ. В целях получения результатов, отражающих физико-механическое состояние образцов, близкое к реальному, снижение влияния условий хранения на костную ткань обеспечивали посредством сокращения времени до проведения исследований: морфологический анализ осуществляли не позднее 24 часов с момента забора фрагментов, а физико-механические исследования – в течение первых трех суток. Кратковременное хранение костных фрагментов до проведения исследований осуществляли в воздушной среде в специальной упаковке при температуре  $-20 \pm 2$  °С.

Для изучения композиционного состава костной ткани, соотношения основных фаз кости – органической, минеральной и воды – костные образцы подвергали деминерализации или деорганификации с целью селективного выделения исследуемого компонента. Полученные таким способом образцы органической и минеральной фаз сохраняли сплошность, непрерывность, что позволяло осуществлять их структурно-функциональный анализ. Подробное описание использованных методов исследования представлено авторами ранее [1–9].

С целью обеспечения стерильности образцов авторы применили инновационные подходы с использованием озono-кислородных смесей [10].

Несмотря на идентичные условия изготовления и испытания образцов, их физико-механические показатели и морфометрические характеристики имеют различия ввиду структурной макро- и микронеоднородности композитных биополимеров. В этой связи представленные

параметры отражают фактические свойства материала лишь с определенной точностью, зависящей от объема выборки, условий испытаний, особенностей материала и применяемой методики статистической обработки опытных данных. В настоящем исследовании результаты испытаний ограниченного количества образцов (выборки) обрабатывали с применением методов математической статистики согласно рекомендациям М.Н. Степнова [11].

## Результаты и обсуждение

Разработка инновационных способов пробоподготовки костных образцов и их значение для биоимплантологии

С позиций биоматериаловедения [1, 8] костная ткань рассматривается как природный анизотропный биокомпозит, отличающийся хорошей обрабатываемостью при использовании традиционных методов механической обработки – точения, фрезерования. Это свойство позволяет получать костные образцы различной формы и размеров независимо от ориентации по отношению к главным осям анизотропии. На примере бедренной кости (рис. 1) показана возможность изготовления продольных, тангенциальных (трансверсальных) и радиальных образцов цилиндрической формы. Это реализовано с помощью полых цилиндрических фрез разной длины и диаметра (рис. 2) и специальных устройств, позволяющих осуществлять подобную механическую обработку в условиях ограниченного количества биоматериала (рис. 3).

Для обеспечения качества торцевых поверхностей, получения образцов необходимой высоты

применяли отрезные дисковые фрезы толщиной до 150 мкм с режущей частью в виде зубьев или выполненной с использованием алмазного напыления. Использование охлаждающих сред (вода, физиологический раствор) позволяло исключить нагрев костной ткани в процессе механической обработки, а также получить эффект дополнительного шлифования вновь образуемых костных поверхностей и высокого качества поверхностного слоя образцов.

Еще одно инновационное решение – применение в медико-биологических исследованиях гидроструйных технологий, благодаря которым можно развивать новые подходы и направления в медицинской практике [2–4]. Нами созданы специализированное оборудование и инструментарий, а также выработаны рекомендации по его применению. В частности, в рамках выполняемого цикла исследований выпущен экспериментальный образец оригинального медицинского гидроструйного аппарата «Аквamed-1», с помощью которого отработаны технологические режимы гидродинамической инцизии различных биологических тканей в лабораторных условиях. Для работы с костной тканью *in vitro* в условиях тканевого банка создан специализированный аппарат «Аквamed-2ТБ», оборудованный рабочим столом с регулируемыми перемещениями обрабатываемого костного фрагмента с помощью пневмоприводов.

Применение гидродинамической технологии не только позволяет эффективно резать костные фрагменты с различным композиционным составом, но и обеспечивает возможность придания им заданной формы при одновременном достижении высокого качества обрабатываемых поверхностей (рис. 4).

Вопросы пробоподготовки являются важной составной частью программы, предусматривающей разработку современных подходов к оптимизации проведения реконструктивно-восстановительных операций в травматологии, составляют основу совершенствования здоровьесберегающих технологий в биоимплантологии. В рамках рассматриваемой проблемы возникает необходимость решения комплекса задач, связанных с отработкой технологических подходов к выполнению операций, оценкой физиологического статуса и подготовкой пациента в оптимальный для его реального физиологического состояния период, выбором высокотехнологичных имплантатов, обеспечивающих минимальные сроки замещения дефекта с восстановлением органотипической структуры и утраченной



Рис. 4. Костные фрагменты эпифиза бедренной кости, полученные методом гидродинамической резки

функции кости как органа. Последняя задача, как и две предыдущие, сопряжена с необходимостью учета многих факторов, влияние которых на процесс остеогенеза представляется существенным. К малоизученным аспектам относится структурно-функциональное состояние поверхностного слоя биоимплантатов, особенности его формирования при физико-химических воздействиях. Именно в зоне контакта поверхностей имплантата и костного дефекта происходит взаимодействие костного вещества, определяющее дальнейший ход процесса регенерации. Особый интерес к этому вопросу объясняется следующими обстоятельствами. С одной стороны, к качеству имплантатов предъявляются очень высокие требования. С другой стороны, благодаря появившимся в последние годы возможностям применения высокотехнологичных способов физико-механического разделения и обработки биологических минерализованных тканей возникает потребность в проведении детального анализа структуры и физико-механических свойств поверхностей, образуемых при использовании указанных методов.

В кости, с учетом уровней ее структурной организации, имеется ряд естественных поверхностей. На макроуровне они представлены наружной (периостальной) и внутренней (эндостальной) поверхностью, образующей костно-мозговой канал. На микроуровне, при использовании традиционных методов физико-механической обработки минерализованных



**Таблица 1.** Закономерности возрастных изменений композиционного состава костной ткани человека

Возрастная группа (годы)	Содержание, % по массе		
	вода (свободная)	минеральная фаза	органическая фаза + вода (связанная)
II (3–11)	21,52 ± 0,65	58,84 ± 1,18	19,64
III (12–18)	19,6 ± 0,59	58,95 ± 1,77	21,45
IV (19–44)	10,2 ± 0,36	62,1 ± 0,61	27,70
V (45–59)	10,9 ± 0,38	62,8 ± 2,51	26,30
VI (60–74)	11,6 ± 0,35	61,9 ± 1,86	26,50
VII (75–89)	10,3 ± 0,31	64,4 ± 0,57	25,30

тканей, на поверхности образцов могут возникать необратимые структурные и физико-механические изменения в виде царапин, сколов, трещин, а также дефекты, обусловленные температурными напряжениями и деформациями. Как показали данные объективной регистрации состояния поверхностного слоя, образованного в результате использования методов гидродинамического или механического резания с помощью алмазных отрезных фрез и с применением охлаждения, даже в непосредственной близости от зоны резания микроструктура поверхности не претерпевает изменений [4]. Микрорельеф поверхности отвечает как требованиям, предъявляемым к биоимплантатам, так и биомеханическим условиям оценки показателя микротвердости, характеризующего упруго-пластические свойства поверхностного слоя [9]. Параметр шероховатости поверхности костных фрагментов Ra составляет от 0,1 до 0,6 мкм. Величина микротвердости не имела достоверных различий ни на поверхности костного образца, ни в его объеме. Отсутствие существенных морфомеханических изменений образцов минерализованных тканей подтверждается и данными исследований с применением акустической микроскопии [5].

Представляет интерес анализ свойств поверхностных слоев образцов с применением метода контактной профилометрии, однако эти методы не в полной мере отвечают требуемой точности и нуждаются в дальнейшем совершенствовании.

Заслуживает внимания косвенная оценка рельефа исследуемой поверхности образца посредством изготовления ее отпечатка с применением

масс для реплик. Имеющиеся в настоящее время композиции обладают способностью заполнять несплошности малых размеров (менее 0,1 мкм), что позволяет получать точную копию поверхности с последующим анализом полученных изображений. Это особенно важно при наличии образцов с измененным композиционным составом после проведения деминерализации, деорганизации или дегидратации [10].

Изучение композиционного состава костной ткани. Композиционный состав костной ткани, соотношение ее основных фаз – значимый показатель качества имплантатов, а также патологических изменений костной системы. В табл. 1 представлены закономерности его изменения в зависимости от возрастной принадлежности материала при изучении образцов компактного вещества бедренной кости мужчин [1]. Для развивающейся кости (II–III возрастные группы) отмечены низкие значения содержания минерального компонента (около 59%), органической фазы (19,64–21,45%) при высоком уровне свободной воды (19,6–21,52%). По достижении зрелого возраста (IV–V группы) доля минеральной фазы возрастает до 62,1–62,8%, а органической до 26,3–27,7%. Однако количество свободной воды снижается при этом до 10,2–10,9%. В процессе старения указанные величины не претерпевают существенных изменений, а их соотношения остаются практически без изменений (по данным анализа композиционного состава бедренных костей мужчин VI–VII возрастных групп).

Изучение композиционного состава бедренных и плечевых костей у животных не выявило существенных различий. Содержание свободной воды находилось в пределах 9,4–12,8%, доля минерального компонента составляла 60,67–71,19% от массы нативных влажных образцов, а органического 18,31–26,15%. При этом выявлена индивидуальная вариабельность содержания основных фаз, достигающая 10–15%.

Проведено изучение роли органического и минерального компонента в обеспечении механической функции кости как композита. Образцы органической и минеральной фаз имели низкие значения прочности (около 10% от ее значения для композита). Для образцов минерального компонента установлено изменение прочности при сжатии ( $\sigma_{11}$ ), микротвердости ( $H_{11}$ ) и объемной массы ( $\rho$ ), обусловленное изменением влагосодержания образцов при высушивании их до постоянной массы при различных температурах (табл. 2).



## Анизотропия механических свойств кости

Изучение закономерностей структуры кости как конструкции свидетельствует: она является гетерогенной с выраженной анизотропией, что обуславливает различие прочностных, деформативных и упруго-пластических характеристик в зависимости от ориентации по отношению к главным осям анизотропии – продольной  $X_1$ , радиальной  $X_3$  и тангенциальной (трансверсальной)  $X_2$ , перпендикулярной  $X_1$  и  $X_3$  (табл. 3). При этом основной вклад в анизотропию механических свойств кости как композита вносит прежде всего минеральный компонент, для которого степень анизотропии является выраженной, а различия установленных параметров с учетом главных осей – статистически достоверными:

$$\sigma_{11} : \sigma_{22} : \sigma_{33} = 1 : 0,5 : 0,61;$$

$$H_{11} : H_{22} : H_{33} = 1 : 0,71 : 0,76.$$

Структурно-функциональные изменения костной ткани с возрастом

Старение опорно-двигательного аппарата, как и всего организма в целом, отличается гетерохронностью, проявляющейся в неодинаковых структурных изменениях костей различной локализации. Это обстоятельство было учтено при изучении морфофункциональных особенностей костной ткани в возрастном аспекте. Для исследования были взяты идентичные по локализации образцы, полученные из функционально однотипных костей. Для объективизации изменений структуры костной ткани использованы методы световой, сканирующей электронной микроскопии, гистоморфометрии. В качестве критериев количественных изменений структуры костной

Таблица 2. Физико-механические характеристики костных образцов человека

Состояние образцов	$\sigma_{11} \pm \Delta\sigma_{11}$ , МПа	$H_{11} \pm \Delta H_{11}$ , МПа	$\rho \pm \Delta\rho$ , г/см <sup>3</sup>
Контроль	158 ± 2,3	372 ± 3,4	1,98 ± 0,003
Деорганифицированные (влажные)	10,7 ± 0,55	55 ± 2,55	1,84 ± 0,006
Высушивание при температуре +20 °С	63 ± 2,47	254 ± 5,79	1,4 ± 0,013
Высушивание при температуре +105 °С	71 ± 2,75	317 ± 9,2	1,32 ± 0,013

ткани были взяты морфометрические характеристики основных структурно-функциональных единиц – остеонных систем, тонко реагирующих на воздействие факторов экзо- и эндогенной природы (табл. 4). В различные возрастные периоды параметры остеонов претерпевают изменения, которые не имеют строгой закономерности, но их необходимо учитывать при интерпретации происходящих структурно-функциональных преобразований.

Изучение архитектоники кости с учетом различных уровней ее пространственной организации показывает, что она не является хаотичной. Формирующиеся на различных этапах остеогенеза системы каналов, лакун и канальцев, пор и пространств представляют собой объемную ориентированную систему внутрикостных пространств [12, 13], морфометрические характеристики которой зависят от возрастного фактора, видовых особенностей и физико-химического состояния костного вещества [1, 7, 14]. Наличие в кости – природном биокомпозите – такой системы позволяет использовать этот факт для различных целей. Во-первых – для обоснования

Таблица 3. Средние значения прочности при сжатии и микротвердости костных образцов различной ориентации

Вид	Состояние образцов (годы)	Ориентация образцов	n*	$\sigma \pm \Delta\sigma$ , МПа	n	$H \pm \Delta H$ , МПа
Человек	Нативные (19–44)	Продольная ( $X_1$ )	85	166 ± 2,5	133	379 ± 8,4
		Тангенциальная ( $X_2$ )	37	99 ± 4,4	25	309 ± 6,9
		Радиальная ( $X_3$ )	17	136 ± 8,8	25	333 ± 5,5
	Деминерализованные (19–44)	Продольная ( $X_1$ )	60	11,2 ± 0,58	–	–
		Тангенциальная ( $X_2$ )	40	10,9 ± 0,6	–	–
		Радиальная ( $X_3$ )	40	10,6 ± 0,68	–	–
	Деорганифицированные (19–44)	Продольная ( $X_1$ )	69	10,7 ± 0,55	47	55 ± 2,6
		Тангенциальная ( $X_2$ )	50	5,35 ± 0,43	40	39 ± 5,4
		Радиальная ( $X_3$ )	50	6,53 ± 0,59	40	42 ± 4,9
Бык	Нативные (1,5–2)	Продольная ( $X_1$ )	15	210 ± 7,1	40	430 ± 5,9
		Тангенциальная ( $X_2$ )	15	134 ± 8,1	35	341 ± 5,3
		Радиальная ( $X_3$ )	15	162 ± 8,9	35	369 ± 5,4

\*n – количество образцов (измерений)

**Таблица 4.** Возрастные изменения параметров остеонов человека

Возрастная группа (годы)	Условный диаметр (средний), мкм		Расстояния между каналами остеонов, мкм	Средняя масса человека, кг
	остеон	центральный канал		
II (3–11)	115 ± 5,31	29 ± 1,55	110 ± 3,86	15–35
III (12–18)	120 ± 3,97	30 ± 1,15	122 ± 4,33	35–65
IV (19–44)	151 ± 4,94	44 ± 2,89	121 ± 4,48	65–80
V (45–59)	168 ± 4,74	33 ± 0,71	143 ± 4,12	70–80
VI (60–74)	146 ± 4,79	31 ± 1,44	104 ± 4,58	70–75
VII (75–89)	149 ± 5,07	59 ± 3	115 ± 4,52	70–75

**Таблица 5.** Возрастные особенности физико-механических характеристик костной ткани человека с учетом композиционного состава

Возрастная группа (годы)	Содержание, % по массе			$\sigma_{11} \pm \Delta\sigma$ , МПа	$H_{11} \pm \Delta H_{11}$ , МПа
	вода (свободная)	минеральная фаза	органическая фаза + вода (связанная)		
II (3–11)	21,52 ± 0,65	58,84 ± 1,18	19,64	128 ± 2,5	280 ± 2,2
III (12–18)	19,6 ± 0,59	58,95 ± 1,77	21,45	148 ± 2,8	333 ± 4,8
IV (19–44)	10,2 ± 0,36	62,1 ± 0,61	27,7	166 ± 4,5	383 ± 6,9
V (45–59)	10,9 ± 0,38	62,8 ± 2,51	26,3	161 ± 3,5	374 ± 7,7
VI (60–74)	11,6 ± 0,35	61,9 ± 1,86	26,5	155 ± 2,3	365 ± 4,2
VII (75–89)	10,3 ± 0,31	64,4 ± 0,57	25,3	142 ± 2,5	360 ± 4,2

**Таблица 6.** Значения микротвердости и содержания минерального компонента в различных костях человека (мужчины IV возрастной группы)

Исследованная кость	n*	$H_{11} \pm \Delta H_{11}$ , МПа	n	Содержание минерала, % по массе
Бедренная	133	379 ± 8,3	16	62,1 ± 0,61
Большеберцовая	15	382 ± 7,1	8	61,01 ± 1,04
Нижнечелюстная	20	370 ± 12	8	60,5 ± 2,14
Малоберцовая	15	355 ± 14	8	60,01 ± 2,01
Ребро	80	280 ± 12	8	50 ± 2,47
Позвонок	15	72 ± 3,2	8	19,48 ± 0,97

\*n – количество измерений

специфических морфомеханических проявлений в зависимости от величины внешних нагрузок: при физиологических напряжениях система внутрикостных пространств выполняет защитно-компенсаторную функцию, препятствуя распространению единично возникающих трещин, а с повышением нагрузок выше физиологических становится зоной концентрации напряжений и развития магистральных трещин, которые могут вызвать серьезные разрушения структуры кости. Во-вторых – при создании новых лекарственных форм, когда костная ткань может выполнять функцию носителя лекарственных препаратов.

Своеобразие структуры и композиционного состава кости в различные возрастные периоды отвечает характер изменений ее прочностных ( $\sigma_{11}$ ) и упруго-пластических ( $H_{11}$ ) свойств (показателя микротвердости) в продольном направлении (табл. 5).

Морфомеханический анализ костей человека различной локализации

В зависимости от локализации и костно-суставном аппарате кости человека и животных испытывают различный уровень функциональных нагрузок [1], которому соответствует степень минерализации кости. Это определяет и значения механических параметров на макро- и микроуровне их регистрации. Результаты определения микротвердости и степени минерализации образцов, взятых из костей различной локализации у мужчин IV возрастной группы, свидетельствуют о наличии корреляции между структурой, композиционным составом кости, ее функцией в скелете и механическими параметрами (табл. 6).

Значение биоэлементологии для изучения биофизических свойств костной ткани

В рамках рассматриваемой проблемы представляет интерес использование результатов фундаментальных и прикладных исследований в области такого интегративного и системного научного направления, как биоэлементология. Она является важной составляющей наук о жизни и служит связующим звеном между химией и биохимией, физикой и биофизикой, другими естественнонаучными дисциплинами.

Использование разработанных в биоэлементологии методик позволяет получать объективную информацию об элементном статусе человека и применять полученные с помощью многоэлементного анализа волос и других био-



субстратов данные при диагностике физиологического состояния, оценке нарушений здоровья с целью последующей коррекции возникших изменений, а также для разработки эффективных мероприятий профилактического характера. Решение обозначенных задач во многом затруднено ввиду отсутствия достаточной информации об особенностях взаимодействия лекарственных препаратов с различными тканями, органами и организмом человека в целом, что указывает на особую важность исследований в сфере биоэлементологии для разработки новых лекарств. Это подтверждает и известное утверждение профессора А. Бюргера: «Если бы мы имели хотя бы отдаленное представление о взаимодействии препаратов с химическими компонентами организма, нам покорились бы почти все проблемы химии лекарств».

Особо следует подчеркнуть актуальность таких исследований для решения проблем биоимплантологии. Проведенные авторами многочисленные исследования по созданию новых видов пластического материала для реконструктивно-восстановительных операций в травматологии, ортопедии, челюстно-лицевой хирургии позволяют сделать вывод о необходимости и целесообразности использования методов биоэлементологии в практике тканевых банков как на начальном этапе отбора биологических тканей, так и на последующих стадиях изготовления, стерилизации, консервации, хранения имплантатов. Важная информация о структурно-функциональном и композиционном состоянии фрагментов биоимплантатов может быть получена и при опосредованном контроле растворов, контактирующих с тканями на различных этапах технологического процесса изготовления (деминерализация, деорганификация, дегидратация и др.).

Заслуживают внимания исследования с позиций биоэлементологии, позволяющие осуществлять комплексное изучение новых лекарственных форм, в которых биологические ткани выступают носителями лекарственных препаратов. Благодаря полученным при этом данным становится возможным не только оптимизировать технологии конструирования новых лекарственных форм, но и обеспечить более эффективную доставку лекарственных средств к органам-мишеням.

## Заключение

Представленные данные комплексного структурно-функционального анализа говорят о том, что костная ткань с позиций биоматериаловедения

относится к анизотропным природным биокompозитам. Особенности архитектоники – ориентация остеонов, пластинчатых структур, минерализованных волокон коллагена в направлении преимущественного действия физиологических нагрузок – обуславливают гетерогенность механических свойств компактного вещества кости в направлении главных осей анизотропии. Она выступает проявлением структурно-функциональной адаптации кости. Анизотропия свойственна кости как композиту, присуща основным фазам ее развития и сохраняется независимо от изменения композитности материала при различных физико-химических воздействиях.

При изготовлении костных имплантатов необходимо иметь в виду, что их физико-механические характеристики являются интегральным выражением морфомеханического статуса костей скелета с учетом уровня их структурной организации, действующих функциональных нагрузок и композиционного состава костной ткани.

Полученные результаты позволяют разработать практические рекомендации, которые необходимо учитывать при выборе костных фрагментов для изготовления имплантатов:

- необходимо не только оценивать их внешнее состояние (наличие видимых разрушений, трещин), но и следить за отсутствием микро-разрушений костного вещества;
- принимая во внимание выявленные закономерности изменения макро- и микро-структуры, физико-механических характеристик и состава костной ткани в исследованном возрастном диапазоне, оптимальным следует считать использование костных фрагментов зрелой кости (IV возрастная группа – от 19 до 44 лет), для которой средняя величина объемной массы составляет  $1,8-1,95 \text{ г/см}^3$ , предел прочности при сжатии образцов продольной ориентации (вдоль оси остеонов) –  $165 \pm 5 \text{ МПа}$ , величина микротвердости –  $380 \pm 10 \text{ МПа}$ , содержание минеральной и органической фаз – около 62 и 28% соответственно.

Проведенные исследования свидетельствуют о важности дальнейшей разработки и экспериментальной апробации инновационных методов для совершенствования здоровьесберегающих технологий. Это указывает на необходимость и целесообразность объединения усилий представителей различных направлений науки для более эффективного решения актуальных проблем в данной области. ©



## Литература

1. Денисов-Никольский ЮИ, Миронов СП, Омеляненко НП, Матвейчук ИВ. Актуальные проблемы теоретической и клинической остеартрологии. М.: Типография «Новости»; 2005. 336 с.
2. Розанов ВВ. Высокоэнергетическое гидродинамическое воздействие на биологические ткани – новая перспективная биомедицинская технология. *Наукоемкие технологии*. 2003;(6):35–43.
3. Розанов ВВ, Денисов-Никольский ЮИ, Матвейчук ИВ, Ложкин ОВ, Эйхенвальд ЭВ, Осипенкова ТК, Омеляненко НП, Северин АЕ. Гидродинамические технологии в биологии и медицине. *Технологии живых систем*. 2005;2(4–5):28–40.
4. Пантелеев ВИ, Розанов ВВ, Матвейчук ИВ, Лекишвили МВ, Сысоев НН, Шутеев СА, Альков СВ, Андреева ТМ. Медицинские озонные технологии: новые задачи, возможности, оборудование. *Биомедицинская радиоэлектроника*. 2013;(2):3–11.
5. Денисова ЛА, Маев РГ, Денисов-Никольский ЮИ, Матвейчук ИВ, Денисов АА. Основы применения акустической микроскопии в медико-биологических исследованиях: учебное пособие. М.: НИЦ БМТ; 2002. 62 с.
6. Матвейчук ИВ. Изготовление образцов для механических испытаний кости с помощью полого сверла. *Механика композитных материалов*. 1980;(1):155–8.
7. Матвейчук ИВ. Биомеханические подходы к изучению морфофункциональных особенностей кости с целью создания ее синтетического аналога. В: *Биомедицинские технологии: сборник научных трудов*. Вып. 5. М.: НИЦ БМТ; 1996. с. 15–22.
8. Матвейчук ИВ. Изучение системы внутрикостных пространств с позиций биоматериаловедения и его прикладное значение. В: *Биомедицинские технологии: сборник научных трудов*. Вып. 9. М.: НИЦ БМТ ВИЛАР; 1998. с. 54–8.
9. Матвейчук ИВ, Денисов-Никольский ЮИ. Региональные особенности механических характеристик компактного вещества бедренной кости. В: *Проблемы инженерной биомедицины. Труды МВТУ № 433*. М.; 1985. с. 65–78.
10. Быков ВА, Розанов ВВ, Матвейчук ИВ, Пантелеев ВИ, Шутеев СА, Литвинов ЮЮ, Воротников АИ. Способ изготовления костных имплантатов. Патент РФ № 2526429 от 20 августа 2014 г.
11. Степнов МН. Статистическая обработка результатов механических испытаний. М.: Машиностроение; 1972. 232 с.
12. Матвейчук ИВ, Розанов ВВ, Денисов-Никольский ЮИ. Сравнительная структурно-функциональная характеристика костных алло- и ксеоимплантатов. *Технологии живых систем*. 2013;10(8):25–30.
13. Денисов-Никольский ЮИ, Матвейчук ИВ, Розанов ВВ. Инновационные подходы к структурно-функциональному анализу костной ткани для решения фундаментальных и прикладных задач в биоматериалологии и биоматериаловедении. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2012;(1):223–8.
14. Луньков АЕ. Порометрические методики морфометрии костной ткани. Саратов: Изд-во Саратовского медицинского университета; 2015. 120 с.

## References

1. Denisov-Nikol'skiy Yul, Mironov SP, Omel'yanenko NP, Matveychuk IV. Aktual'nye problemy teoreticheskoy i klinicheskoy osteoartrologii [Actual problems of theoretical and clinical osteoarthrology]. Moscow: Tipografiya "Novosti"; 2005. 336 p. (in Russian).
2. Rozanov VV. Vysokoenergeticheskoe gidrodinamicheskoe vozdeystvie na biologicheskie tkani – novaya perspektivnaya biomeditsinskaya tekhnologiya [High-energy hydrodynamic effects on biological tissues – a promising new biomedical technology]. *Naukoemkie tekhnologii* [High technologies]. 2003;(6):35–43 (in Russian).
3. Rozanov VV, Denisov-Nikol'skiy Yul, Matveychuk IV, Lozhkin OV, Eykhenval'd EV, Osipenkova TK, Omel'yanenko NP, Severin AE. Gidrodinamicheskie tekhnologii v biologii i meditsine [The hydrodynamic technologies in the biology and medicine]. *Tekhnologii zhivyykh system* [Living system technologies]. 2005;2(4–5):28–40 (in Russian).
4. Panteleev VI, Rozanov VV, Matveychuk IV, Lekishvili MV, Sysoev NN, Shuteev SA, Al'kov SV, Andreeva TM. Meditsinskie ozonovye tekhnologii: novye zadachi, vozmozhnosti, oborudovanie [Medical ozone technologies: new problems, possibilities, equipment]. *Biomeditsinskaya radioelektronika* [Biomedical Radioelectronics]. 2013;(2):3–11 (in Russian).
5. Denisova LA, Maev RG, Denisov-Nikol'skiy Yul, Matveychuk IV, Denisov AA. Osnovy primeneniya akusticheskoy mikroskopii v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh: uchebnoe posobie [Fundamentals of application of acoustic microscopy in biomedical research]. Moscow: NITs BMT; 2002. 62 p. (in Russian).
6. Matveychuk IV. Izgotovlenie obraztsov dlya mekhanicheskikh ispytaniy kosti s pomoshch'yu pologo sverla [Production of samples for mechanical testing of bones by means of a hollow drill]. *Mekhanika kompozitnykh materialov* [Mechanics of Composite Materials]. 1980;(1):155–8 (in Russian).
7. Matveychuk IV. Biomekhanicheskie podkhody k izucheniyu morfofunktsional'nykh osobennostey kosti s tsel'yu sozdaniya ee sinteticheskogo analoga [Biomechanical approaches to the study of morphological and functional characteristics of the bone in order to create its synthetic analogue]. In: *Biomeditsinskie tekhnologii: sbornik nauchnykh trudov* [Biomedical technologies: Proceedings of Scientific Centre "Biomedical technologies"]. Issue 5. Moscow: NITs BMT; 1996. p. 15–22 (in Russian).
8. Matveychuk IV. Izuchenie sistemy vnutrikostnykh prostranstv s pozitsiy biomaterialovedeniya i ego prikladnoe znachenie [The study of intraosseous spaces from the stand point of biomaterials science and its applied significance]. In: *Biomeditsinskie tekhnologii: sbornik nauchnykh trudov* [Biomedical technologies: Proceedings of Scientific Centre "Biomedical technologies"]. Issue 9. Moscow: NITs BMT VILAR; 1998. p. 54–8 (in Russian).
9. Matveychuk IV, Denisov-Nikol'skiy Yul. Regional'nye osobennosti mekhanicheskikh kharakteristik kompaktnogo veshchestva bedrennoy kosti [Regional features of the mechanical characteristics of the compact substance of the femur]. In: *Problemy inzhenernoy biomeditsiny. Trudy MVTU* [Problems of Biomedical Engineering: Proceedings of Bauman Moscow Higher Technical School]. Issue 433. Moscow; 1985. p. 65–78 (in Russian).
10. Bykov VA, Rozanov VV, Matveychuk IV, Panteleev VI, Shuteev SA, Litvinov YuYu, Vorotnikov AI. Sposob izgotovleniya kostnykh implantatov [A method for manufacturing of bone implants]. Patent No. 2526429 RU from 20.08.2014 (in Russian).
11. Stepnov MN. Statisticheskaya obrabotka rezul'tatov mekhanicheskikh ispytaniy [Statistical treatment of the mechanical tests results]. Moscow: Mashinostroenie; 1972. 232 p. (in Russian).
12. Matveychuk IV, Rozanov VV, Denisov-Nikol'skiy Yul. Sravnitel'naya strukturno-funktsional'naya kharakteristika kostnykh allo- i kseoimplantatov [Comprehensive structural and functional characterization of bone allograft implants and xenomaterials]. *Tekhnologii*



zhivyykh system [Living system technologies]. 2013;10(8):25–30 (in Russian).

13. Denisov-Nikol'skiy Yul, Matveychuk IV, Rozanov VV. Innovatsionnye podkhody k struktural'no-funktional'nomu analizu kostnoy tkani dlya resheniya fundamental'nykh i prikladnykh zadach v bioimplantologii i biomate-

rialovedenii [Innovative approaches to the structural and functional analysis of bone tissue for to solving of fundamental and applied problems in bioimplantology and biomaterials science]. Voprosy biologicheskoy, meditsinskoj i farmatsevticheskoy khimii [Problems of Biological Medical and Pharma-

ceutical Chemistry]. 2012;(1):223–8 (in Russian).

14. Lun'kov AE. Porometricheskie metodiki morfometrii kostnoy tkani [Poros investigation methods for bone tissue morphometry]. Saratov: Saratov State Medical University; 2015. 120 p. (in Russian).

## Evaluation of biophysical properties of the bone tissue for biomedical applications

Matveychuk I.V.<sup>1</sup> • Rozanov V.V.<sup>1,2</sup> • Litvinov Yu.Yu.<sup>1</sup>

**Background and aim:** The volume of reconstructive surgery in traumatology in recent decades has increased significantly due to an increase in traumas, numbers of affected in local military conflicts, and environmental deterioration. This has led to an increase in demand for plastic materials, and the need to create modern high technologies to meet this need, including alternative sources of bone implants. Any solution to this problem would involve an in-depth study of bone biophysical properties with innovative techniques to develop requirements to elaboration of new effective implants based on natural bone, as well as on natural or synthetic analogues. This study aimed exactly at these aspects. **Materials and methods:** We studied human bone samples taken from various parts of the skeleton aged from 3 to 89 years and animal (bovine) bone samples aged from 1.5 to 2 years. Biophysical characteristics of the studied materials were assessed at the stage of sample preparation with original author's methods of physical and mechanical processing, in the process of analysis of patterns of normal changes in the bone structure and function, as well as during changes in its composition with age, anisotropy of the material and the level of structural organization. Structure patterns were studied by classical (light, scanning electron microscopy) and advanced (acoustic microscopy) techniques. Methods of engineering biomechanics were used to assess functional changes in macro and micro volumes of bone samples. **Results:** The main study results involve the development of innovative methods of sample preparation and structural and functional analysis. First of all, these are the methods of mechanical processing of bone fragments based on the use

of hollow cylindrical milling cutters in the environment of limited amounts of mineralized biological tissues, as well as on the application of hydrodynamic cutting ensuring a delicate and highly efficient bone cut. Another distinctive feature of the study is the elaborated methodology for morphological and mechanical analysis of bone samples at the macro and micro levels, with consideration of real physical and chemical condition of samples. To ensure sample sterility, the authors proposed innovative techniques using of ozone-oxygen mixtures. The study results gave a complex of quantitative characteristics describing age-related compositional changes of the human bone, anisotropy of its physical and mechanical characteristics, osteon parameters and physical and mechanical characteristics of bone tissue depending on its composition. **Conclusion:** The use of the proposed methodology allowed for obtaining of new data on biophysical properties of bone tissue that are of interest for bioimplantology, biomaterial science and expands basic information on the bone as a natural biocomposite. They can be the basis for development of practical guidelines on optimization of the choice of bone fragments for manufacture of implants based on the detected patterns of changes in macro- and microstructure, physical and mechanical characteristics and bone composition in the studied age range.

**Key words:** bone tissue, physical and mechanical characteristics, bioimplant, methods of sample preparation, hollow cylindrical milling cutters, hydrodynamic cutting of biologic tissues

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-193-202

**Matveychuk Igor V.** – PhD, Doctor of Science in Biology, Professor, Head of Scientific and Educational-methodic Centre of Biomedical Technologies<sup>1</sup>  
✉ 2 Krasina ul., Moscow, 123056, Russian Federation. Tel.: +7 (499) 254 46 49.  
E-mail: nizbmtvilar@mtu-net.ru

**Rozanov Vladimir V.** – PhD in Physics, Doctor of Science in Biology, Head of Laboratory, Scientific and Educational-methodic Centre of Biomedical Technologies<sup>1</sup>; Leading Research Fellow, Scientific Centre of Hydro-physics Researches, Professor of the Department of Accelerators Physics and Radiation Medicine, Faculty of Physics<sup>2</sup>  
✉ Faculty of Physics MSU, 1/2 Leninskie gory, Moscow, 119991, Russian Federation.  
Tel.: +7 (495) 939 24 44. E-mail: vrozanov@mail.ru

**Litvinov Yury Yu.** – Deputy Head of Scientific and Educational-methodic Centre of Biomedical Technologies<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Russian Institute of Medicinal and Aromatic Plants; 7 Grina ul., Moscow, 117216, Russian Federation

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation



# Неинвазивная диагностика неопухолевой патологии с использованием оптической когерентной томографии

Меллер А.Е.<sup>1</sup> • Мотовилова Т.М.<sup>2</sup> • Пантелеева О.Г.<sup>3</sup> • Кузнецов С.С.<sup>2</sup> • Стройкова К.И.<sup>2</sup> • Кондратьева О.А.<sup>4</sup> • Кириллин М.Ю.<sup>5</sup> • Шахова Н.М.<sup>5</sup>

**Актуальность.** Отличительными чертами современных воспалительных заболеваний являются латентное течение и склонность к хронизации. Хроническое воспаление лежит в основе развития тяжелых заболеваний, в том числе аутоиммунных и онкологических, и выступает причиной нарушения основных функций человеческого организма. Диагностика хронических воспалений сопряжена с рядом проблем, которые обусловлены, с одной стороны, многообразием клинических вариантов и морфологических форм, а с другой – преобладанием в последнее время латентного течения заболеваний. В свою очередь, правильный выбор тактики лечения может быть основан на понимании и четком распознавании этиологических и морфологических типов заболевания. Это определяет актуальность развития новых методов диагностики, одним из которых может стать оптическая когерентная томография (ОКТ). **Цель** – показать принципиальную возможность ОКТ в распознавании морфологических изменений, сопровождающих хронические воспалительные заболевания различной локализации. **Материал и методы.** ОКТ-исследование выполнено комплексно стандартным диагностическим процедурам у 225 пациентов с хроническими воспалительными

заболеваниями различной локализации: хроническим рецидивирующим ринитом, хроническим латентным сальпингитом и хроническим эндометритом. Для ОКТ использована установка «ОКТ-1300У» (длина волны излучения 1280 нм, разрешение 15–20 мкм, время получения ОКТ-изображений 8 кадров в секунду, глубина зондирования – 1,4 мм, диаметр зонда 2,4 мм). Используются методы численной обработки ОКТ-изображений: численная характеристика гистограмм и текстуры ОКТ-изображений с последующим определением значений, характерных для различных групп изображений, соответствующих определенным состояниям биоткани, и нейронная сеть, входными параметрами которой служили гистограммы и двумерные Фурье-образы ОКТ-изображений. **Результаты.** При ОКТ-лапароскопии получено 3 типа изображений маточных труб с ОКТ-признаками, характерными для нормы и воспаления. Появление неоднородности в структуре ОКТ-изображения свидетельствовало о морфологической неоднородности мышечного слоя маточной трубы, что позволяло нам делать заключение о хроническом сальпингите. При ОКТ-гистероскопии нами показано, что ОКТ способна визуализировать патоморфологические особенности хронических эндометритов.

Полученные при ОКТ-риноскопии данные дают основание сделать предварительные выводы о возможности детектировать специфические черты различных вариантов хронического ринита. Применение численной обработки ОКТ-изображений позволило повысить диагностическую точность метода и объективизировать его. **Заключение.** ОКТ способна детектировать морфологические изменения, вызванные хроническим воспалительным процессом. ОКТ-критерии воспалительных процессов достаточно универсальны для разных органов. Продемонстрирована возможность неинвазивной диагностики патоморфологических вариантов заболеваний. Показаны трудности в развитии ОКТ для диагностики неопухолевой патологии и некоторые пути их преодоления, в частности, применение численной обработки изображений. Аргументирована целесообразность дальнейших исследований.

**Ключевые слова:** оптическая когерентная томография, гистероскопия, лапароскопия, риноскопия, воспалительные заболевания органов малого таза, хронический эндометрит, хронический сальпингит, хронический ринит

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-203-212



Отличительными чертами современных воспалительных заболеваний считаются латентное течение и склонность к хронизации. Известно, что хроническое воспаление лежит в основе развития таких тяжелых заболеваний, как аутоиммунные и онкологические [1]. Осложнения воспалительных заболеваний наносят ущерб основным функциям человеческого организма, в том числе поддержания гомеостаза и репродуктивной. С этой точки зрения особое место занимают воспалительные заболевания ЛОР-органов, прежде всего риниты, отличающиеся высокой распространенностью и существенным влиянием на качество жизни за счет системных симптомов (усталость, головная боль, нарушение сна и когнитивных функций), что приводит к значительным экономическим затратам [2]. Диагностика хронического ринита сопряжена с рядом проблем, которые, с одной стороны, обусловлены многообразием клинических вариантов и морфологических форм, а с другой стороны, преобладанием в последнее время латентного течения заболевания [3, 4]. В свою очередь, выбор тактики лечения может быть основан на понимании и четком распознавании этиологических и морфологических типов заболевания [3–6]. Например, очень важно дифференцировать аллергический и неаллергический ринит, так как тактика лечения при этих формах различается драматически [2, 3, 6]. Предпринимаются попытки найти оптимальные способы диагностики, предлагаются различные подходы, в частности, цитологическое исследование мазков из полости носа и даже гистологическое исследование биоптатов слизистой оболочки [7]. Наиболее информативным признан тест на локальную эозинофилию, чувствительность которого составляет всего 74% [8]. Очевидно, что существует потребность в дальнейшем совершенствовании диагностических технологий.

Одним из перспективных подходов для диагностики и дифференциальной диагностики воспалительных заболеваний ЛОР-органов представляется оптическая когерентная томография (ОКТ). Сегодня ОКТ чаще применяется для обследования гортани с целью диагностики опухолей [9–11]. Однако предпринимались попытки использовать ОКТ для диагностики неопухолевой воспалительной патологии при изучении внутренней структуры слизистой оболочки полости носа и носоглотки [12–15]. Этот интерес обусловлен морфологической гетерогенностью ринитов и потребностью неинвазивно изучать морфологию слизистой оболочки носа для

**Меллер Алина Ефимовна** – врач<sup>1</sup>

**Мотовилова Татьяна Михайловна** – канд. мед. наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии<sup>2</sup>

**Пантелеева Ольга Геннадиевна** – канд. мед. наук, врач<sup>3</sup>

**Кузнецов Сергей Станиславович** – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии<sup>2</sup>

**Стройкова Ксения Ивановна** – студент<sup>2</sup>

эффективной диагностики формы хронического ринита.

В последние десятилетия весьма актуальными стали вопросы сохранения и восстановления репродуктивной функции женского организма [16]. Это связано со значительным ростом заболеваний, угрожающих репродуктивному потенциалу. Среди них воспалительные заболевания органов малого таза – наиболее частый патогенетический фактор развития бесплодия и невынашивания беременности [17–19]. Они характеризуются преобладанием латентных форм, вызывающих минимальные морфологические и функциональные изменения [17, 20]. Это приводит к тому, что при несовершенстве диагностических методов в 28% случаев причины бесплодия остаются невыясненными [16, 21, 22]. Так, «золотым стандартом» завершающего этапа диагностики женского бесплодия и невынашивания считаются эндоскопические методы (лапароскопия и гистероскопия) [23, 24]. Сейчас значение и возможности этих методов дискутируются [23, 25, 26]. Установлено, что в распознавании хронических воспалительных заболеваний органов малого таза лапароскопия демонстрирует очень низкую чувствительность (27%), хотя диагностическая точность остается удовлетворительной (78%) за счет высокой специфичности (92%) [27]. В этой связи целесообразно и весьма актуально усовершенствование эндоскопических методов. Это может быть реализовано за счет использования дополнительных методов, например ОКТ, возможности которой при комPLEMENTАРНОМ использовании с лапароскопией изучаются [28–30].

Цель исследования – показать принципиальную возможность ОКТ в распознавании морфологических изменений, сопровождающих хронические воспалительные заболевания разной локализации.

## Материал и методы

ОКТ-исследование выполнено комPLEMENTАРНО стандартным диагностическим процедурам у пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями разной локализации. В данной работе представлен анализ исследований 225 пациентов. У 150 женщин репродуктивного возраста (от 25 до 45 лет, средний возраст – 28,5 года) с бесплодием неясного генеза ОКТ выполнена при лапароскопии (зонд вводился через троакар лапароскопа в полость малого таза) с целью визуализации маточных труб. У 20 пациенток репродуктивного возраста (от 25 до 44 лет, средний возраст – 29,75 года) с невынашиванием беременности ОКТ

<sup>1</sup> ФБУЗ «Приволжский окружной медицинский центр» ФМБА России; 603001, г. Нижний Новгород, Нижневолжская набережная, 2, Российская Федерация

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России; 603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1, Российская Федерация

<sup>3</sup> НУЗ «Дорожная клиническая больница» на ст. Горький ОАО «РЖД»; 603140, г. Нижний Новгород, просп. Ленина, 18, Российская Федерация



**Рис. 1.** Общий вид ОКТ-установки (А); процедура ОКТ-лапароскопии (Б); схема ОКТ-изображения с характерным масштабом кадра (В)

проведена при гистероскопии (зонд вводился через рабочий канал гистероскопа в полость матки) для визуализации эндометрия. Пятидесяти пяти пациентам обоих полов (женщин – 35, мужчин – 20, от 19 до 72 лет, средний возраст – 42,5 года) с хроническим часто рецидивирующим ринитом ОКТ проведена при риноскопии с целью визуализации слизистой оболочки полости носа.

Исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации, разрешено Этической комиссией по проведению научных исследований с участием человека в качестве объекта исследования (Протокол № 8 от 03.11.2009). Все пациенты подписывали протокол добровольного информированного согласия.

Для ОКТ использована установка «ОКТ-1300У» (ИПФ РАН, ООО «Биомедтех», Н. Новгород, Россия) со следующими техническими параметрами: длина волны излучения – 1280 нм, разрешение по глубине – 15 мкм, латеральное – 20 мкм, время получения ОКТ-изображения – 8 кадров в секунду, глубина зондирования – 1,4 мм, диаметр эндоскопического сменного зонда – 2,4 мм. Режим видеокadra позволяет получать информацию не только о морфологических, но и функциональных особенностях биотканей (рис. 1А).

Для получения ОКТ-изображений зонд подвигался к зоне интереса и фиксировался легким прижатием на 1–2 секунды (рис. 1Б). Сбор и отображение данных на мониторе компьютера осуществлялись в режиме реального времени с использованием программы, входящей в комплект ОКТ-установки. Характерный масштаб ОКТ-изображения показан на схеме (рис. 1В).

Интерпретация ОКТ-изображений проводилась по критериям, разработанным ранее в соответствии с морфологическими данными [31, 32].

Мы использовали ОКТ в качестве дополнительного метода в ходе стандартной лапароскопии у пациенток с диагнозом «бесплодие неясного генеза». По данным анамнеза, этиопатогенетическим фактором бесплодия

предполагались хронические воспалительные заболевания органов малого таза. Однако клинические проявления и лабораторные изменения были минимальными. При проведении стандартной лапароскопии в большинстве случаев явных отклонений выявлено не было либо имелись косвенные данные о хроническом воспалительном процессе. Зондирование маточной трубы проводилось со стороны серозной оболочки, зонд подводился к перешейку, наиболее прямому отделу маточной трубы, и фиксировался к серозной оболочке легким прижатием. Серозная оболочка, имеющая толщину около 80 мкм, является прозрачной для ОКТ. Таким образом, при информативной глубине зондирования 1,4 мм предметом исследования фактически был только мышечный слой маточной трубы. Известно, что для хронического сальпингита наиболее характерным с точки зрения морфологических изменений является вовлечение в процесс мышечного слоя [26].

Мы также использовали ОКТ как дополнительный метод во время стандартной гистероскопии у пациенток с диагнозом «привычное невынашивание беременности», причем в обследованной группе основным этиопатогенетическим фактором рассматривался хронический эндометрит. Гистероскопия проводилась в соответствии со стандартом на 5-й день менструального цикла, когда функциональный слой не выражен и эндометрий в основном представлен базальным слоем. Для получения ОКТ-изображения зонд, введенный через рабочий канал гистероскопа, подводился к эндометрию в области дна матки, что позволяло достаточно хорошо фиксировать его прижатием к слизистой оболочке. После гистероскопии проводилась биопсия эндометрия. Таким образом, мы имели возможность сопоставить ОКТ-изображения с гистологическими результатами и иммуногистохимическими данными.

ОКТ-исследование слизистой оболочки полости носа проведено при стандартной риноскопии с использованием носового зеркала. ОКТ-зонд подводился к носовой раковине и фиксировался легким прижатием к слизистой оболочке. Для разработки критериев ОКТ-изображений слизистой оболочки носа на данном этапе исследования мы выделили три морфологически различающихся варианта: неизменную слизистую оболочку, гипертрофический ринит и атрофический ринит.

Для объективизации данных использованы методы численной обработки ОКТ-изображений. Применяемые подходы заключаются в численной характеристике гистограмм и текстуры

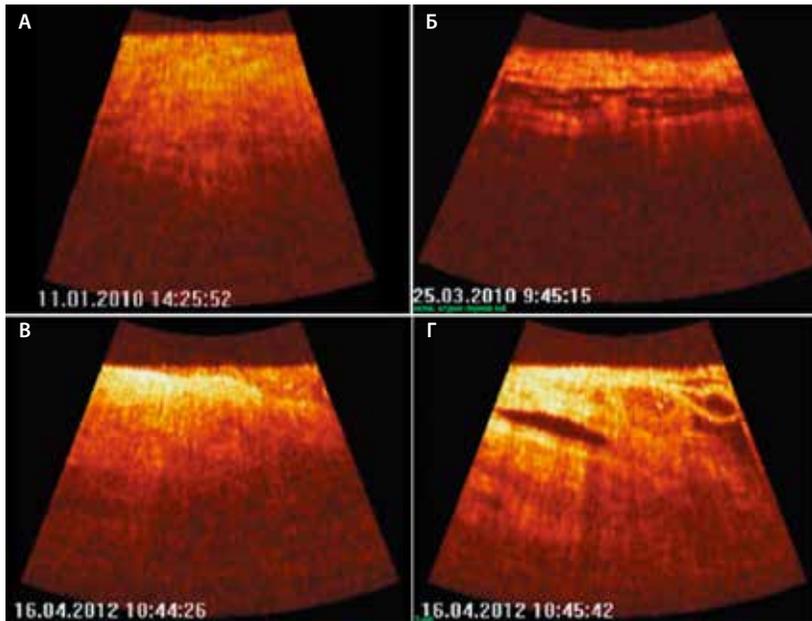
**Кондратьева Ольга Алексеевна** – студент<sup>4</sup>

**Кириллин Михаил Юрьевич** – канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр., лаборатория биофотоники<sup>5</sup>

**Шахова Наталия Михайловна** – д-р мед. наук, вед. науч. сотр., лаборатория биофотоники<sup>5</sup>  
 ✉ 603950, г. Нижний Новгород, ул. Ульянова, 46, Российская Федерация.  
 Тел.: +7 (831) 436 80 10.  
 E-mail: natalia.shakhova@gmail.com

<sup>4</sup> ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»; 603950, г. Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23, Российская Федерация

<sup>5</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики Российской академии наук»; 603950, г. Нижний Новгород, ул. Ульянова, 46, Российская Федерация



**Рис. 2.** ОКТ-изображения маточной трубы, полученные при лапароскопии: **А** – неизменная маточная труба; **Б** – ОКТ-признаки экссудативного воспалительного процесса; **В** – ОКТ-признаки выраженного фибрирования маточной трубы; **Г** – смешанный вариант ОКТ-визуализации маточной трубы, признаки отека и склерозирования

ОКТ-изображений с последующим определением значений, характерных для различных групп изображений, соответствующих определенным состояниям биоткани [29]. Для дифференциации ОКТ-изображений применялась также нейронная сеть, входными параметрами которой служили гистограммы и двумерные Фурье-образы ОКТ-изображений [33].

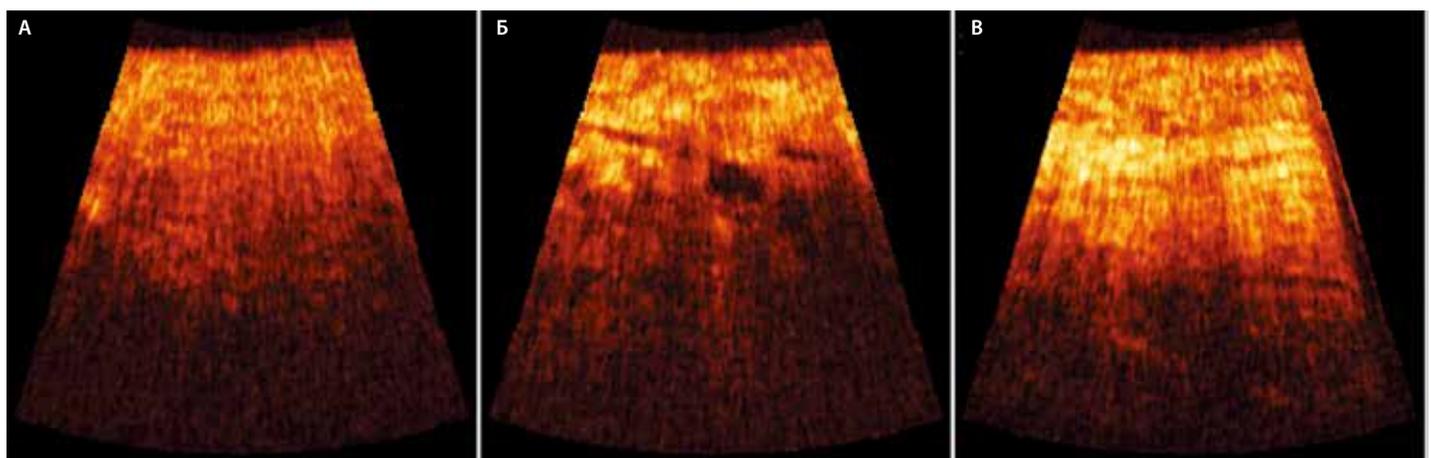
## Результаты

### ОКТ-лапароскопия

В ходе работы при ОКТ-лапароскопии маточных труб нами получено 3 типа изображений (рис. 2). В отсутствие патологии маточных труб ОКТ-изображение было бесструктурным, интенсивность сигнала – умеренная с равномерным снижением по глубине кадра (рис. 2А). Появление неоднородности в структуре ОКТ-изображения свидетельствовало о морфологической неоднородности мышечного слоя маточной трубы, что позволяло нам делать заключение о хроническом сальпингите (рис. 2Б–Г). Преобладание зон с низким уровнем сигнала (см. рис. 2Б) указывало на преимущественно экссудативный патоморфологический вариант процесса. Наличие в изображении участков повышенной интенсивности сигнала говорило в пользу процессов склерозирования и фибрирования мышечного слоя (см. рис. 2В). Достаточно часто встречались ОКТ-изображения с чередованием гипо- и гиперинтенсивных неоднородностей, что, по нашему мнению, свидетельствует о смешанном характере патоморфологических изменений маточной трубы (см. рис. 2Г). В ранее проведенных исследованиях мы показали, что ОКТ-критерии соответствуют морфологическим данным [31].

### ОКТ-гистероскопия

На рис. 3А приведено ОКТ-изображение практически неизмененного эндометрия, когда эндоскопически визуализируются минимальные признаки хронического эндометрита. При гистологии отмечают минимальные морфологические



**Рис. 3.** ОКТ-изображения эндометрия, полученные при гистероскопии: **А** – хронический неспецифический эндометрит в стадии ремиссии, нормопластический вариант; **Б** – хронический неспецифический эндометрит в стадии обострения, нормопластический вариант; **В** – хронический неспецифический эндометрит в стадии обострения, гиперпластический вариант

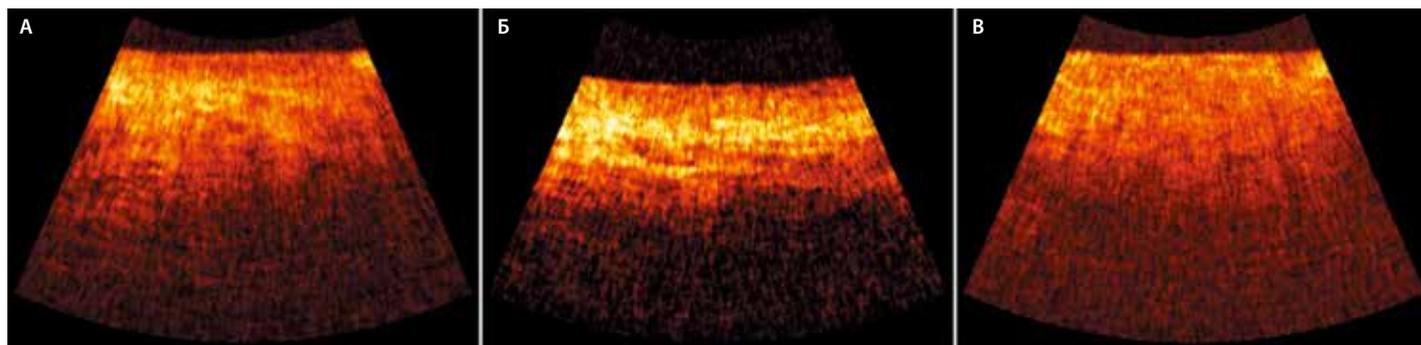


Рис. 4. ОКТ-изображения слизистой оболочки носа: **А** – норма; **Б** – гипертрофический ринит; **В** – атрофический ринит

изменения эндометрия, связанные с перенесенным воспалительным процессом, и отсутствие обострения на момент исследования. Данные иммуногистохимии указывают на незначительное снижение рецепторов эстрогенов и прогестерона при равномерном распределении их и в железах, и в строме. Иными словами, можно говорить о практически неизменном эндометрии и морфологически, и функционально. В этом случае на ОКТ мы видим однородное изображение с умеренным равномерным спаданием сигнала по глубине.

В случае наличия выраженных морфологических изменений (диффузная лимфогистиоцитарная инфильтрация, склероз в сочетании с отеком, множественные геморрагии, полнокровные сосуды) при гистероскопии регистрируется обострение хронического эндометрита. На ОКТ-изображении визуализируются участки различной формы и размеров с чередованием снижения интенсивности сигнала (темные зоны) со значительным его повышением (яркие зоны) (рис. 3Б). При этом данные иммуногистохимии говорят о том, что содержание клеток, экспрессирующих рецепторы эстрогена и прогестерона, значительно снижено и в железах, и в строме; обращает на себя внимание крайняя неравномерность в распределении элементов, экспрессирующих рецепторы гормонов. Имеется сочетание выраженного воспалительного процесса с функциональными нарушениями.

На рис. 3В при ОКТ получено двуслойное изображение с умеренно рассеивающим верхним слоем и более интенсивно рассеивающим подлежащим слоем. Наблюдается иной морфологический вариант хронического эндометрита: пролиферативные изменения эндометрия в сочетании с отеком и склерозом, что при гистероскопии диагностируется как гиперпластический вариант хронического эндометрита. Функционально по

данным иммуногистохимии отмечаются снижение количества рецепторов и их хаотичное расположение, особенно в строме. В данном случае именно пролиферативные изменения функционального слоя обеспечивают при ОКТ визуализацию функционального слоя эндометрия в виде оптического слоя.

Таким образом, нами показано, что ОКТ способна визуализировать патоморфологические особенности хронических эндометритов.

#### ОКТ-риноскопия

Полученные ОКТ-изображения слизистой полости носа отражают особенности выделенных нами морфологических вариантов хронического ринита. Очевидно, что все три изображения имеют специфические черты (рис. 4).

В норме (рис. 4А) на ОКТ визуализируются два слоя. Верхний – умеренно рассеивающий – соответствует эпителию. Он не имеет очень четкой границы с подлежащим слоем, который выглядит достаточно компактным и характеризуется наличием небольших округлых зон сниженной интенсивности (морфологически они соответствуют кровеносным сосудам и железам). При наличии гипертрофического ринита (рис. 4Б) верхний слой изображения несколько утолщен, граница между эпителием и собственной пластинкой еще более размыта. В подэпителиальном слое визуализируются линейные зоны пониженного сигнала, что характерно для отека тканей. При атрофическом рините (рис. 4В) не удастся рассмотреть эпителий как отдельный оптический слой, изображение подэпителиального слоя выглядит почти однородным. Описанные различия ОКТ-изображений позволяют нам сделать предварительные выводы о возможности ОКТ детектировать специфические черты различных вариантов хронического ринита.



## Обработка изображений

Приведенные нами примеры показывают: ОКТ-информация имеет дифференциально-диагностическое значение. Но интерпретация изображений достаточно субъективна, она требует хорошего знания гистологии изучаемого органа и морфологической сущности соответствующей патологии. В этой связи нами предприняты попытки объективизации диагностики за счет использования методов численной обработки ОКТ-изображений. В данной работе приводится пример обработки ОКТ-изображений маточных труб для повышения диагностической ценности метода. Поскольку наличие на ОКТ-изображениях структур, а именно областей с низким уровнем сигнала, является признаком отека, при разработке алгоритма численного анализа в качестве численной характеристики были выбраны параметры, характеризующие неоднородность изображения – первая производная сигнала по глубине и двумерный Фурье-образ. Для склерозирования, напротив, характерен высокий уровень сигнала, что послужило предпосылкой для выбора характеристик гистограммы в качестве второго параметра. Комбинация этих параметров была использована для дифференциальной диагностики состояния маточных труб. В ранее проведенных исследованиях [31] мы показали, что даже при субъективной оценке изображений метод ОКТ имеет высокие показатели чувствительности относительно хронических воспалительных заболеваний органов малого таза (90%) и специфичности (81%), диагностическая точность составляет 88% при индексе согласия  $k = 0,63$  (95% доверительный интервал 0,5082–0,7453), что позволяет говорить о хорошем согласии специалистов, а значит, о достаточной объективности метода. Благодаря применению численной обработки к ОКТ-изображениям маточных труб удалось диагностическую точность метода дополнительно повысить до 96%, чувствительность – до 96% и специфичность – до 100%. Применение нейронной сети позволило достичь диагностической точности 82–100% при дифференцировании различных патоморфологических вариантов хронического сальпингита с преобладанием склерозирования, экссудативного компонента или смешанного состояния в зависимости от выбора параметра обучения сети.

## Обсуждение и заключение

Оптическая когерентная томография зарекомендовала себя как метод диагностики злокачественных новообразований [34]. В данном исследовании мы показали: ОКТ, которая дает возможность получать информацию о внутренней структуре

биоткани с разрешением на уровне тканевых слоев, может быть успешно использована и для диагностики неопухоловой патологии. Пример хронического сальпингита демонстрирует, что ОКТ способна дифференцировать оптическую структуру стенки маточной трубы. Эта информация сопоставима с гистологическими данными, получаемыми при биопсии, инвазивность которой не позволяет использовать этот метод относительно маточных труб. Это способствует значительному повышению чувствительности базовой процедуры: в ранее проведенных исследованиях нами оценена чувствительность лапароскопии как 43,5%, в то время как комплементарное использование ОКТ повышает этот процент до 95,7% [35]. Относительно ОКТ-гистероскопии необходимо подчеркнуть: в случае подозрения на хронический эндометрит с помощью стандартной гистероскопии можно по макроскопическим признакам идентифицировать хронический эндометрит не более чем в 35–60% случаев [36], что требует дополнительно проводить биопсию и морфологическое исследование эндометрия. С клинической точки зрения считается целесообразным выделять гистероскопические макротипы хронического эндометрита – гиперпластический, гипопластический и смешанный. Однако существуют трудности интерпретации данных гистероскопии. В частности, это может быть связано с вариабельностью эндоскопических картин в разных фазах воспаления. Применение неинвазивной визуализации эндометрия с использованием ОКТ должно повысить диагностическую эффективность стандартной гистероскопии.

В настоящее время мы не можем оценить диагностическую точность ОКТ-гистероскопии и ОКТ-риноскопии. Для этого требуется продолжение клинических исследований, тем не менее уже сейчас мы можем говорить об их целесообразности. Прежде всего, применяя метод для разных локализаций (полость матки, полость носа), мы показали, что ОКТ-критерии воспалительных процессов достаточно универсальны. На примере хронического эндометрита и хронического ринита еще раз продемонстрирован важный аспект использования ОКТ: возможность неинвазивной диагностики патоморфологического варианта заболевания.

Необходимо отметить, что развитие ОКТ как дополнительного метода в диагностике неопухоловой патологии сопряжено с некоторыми трудностями. Например, для интерпретации изображений необходимо сопоставление данных ОКТ и гистологии. Но биопсия традиционно не применяется при ринитах, а биопсия эндометрия не

### Благодарности

Авторы выражают признательность персоналу клиник, в которых проводились исследования, и сотрудникам ИПФ РАН за сопровождение работ. За финансовую поддержку исследований авторы благодарны РФФИ (гранты № 15-32-20250 и 15-42-02572).



является прицельной, так как выполняется кюретаж полости матки. Именно поэтому в нашем исследовании интерпретация ОКТ-изображений слизистой оболочки полости носа проведена на основе известных морфологических признаков и данных *post mortem* гистологии других пациентов, а анализ изображений определенных зон эндометрия, подвергшихся ОКТ-зондированию, проводился на основе гистологического описания всех цугов слизистой оболочки полости матки. Еще одна проблема связана с невозможностью эффективного прижатия ОКТ-зонда к слизистой оболочке носовой раковины, что не всегда позволяет получить качественное изображение.

Есть и некоторая неудовлетворенность результатами на данном этапе исследования. Как упоминалось выше, в ринологии очень важно различать две формы хронического ринита: аллергический и неаллергический [2, 3, 6]. У данных форм нет выраженных морфологических различий, вероятность отека, гипертрофии и гипотрофии эпителия существует при обоих вариантах заболевания. Но мы надеемся при анализе большого количества клинических случаев и изображений найти критерии их дифференциальной диагностики. Перспективным для решения этой задачи представляется применение методов обработки изображений, поиск численных характеристик, специфичных для аллергического

и неаллергического ринита. Развитие методов обработки целесообразно и при анализе ОКТ-изображений других локализаций. Следующий шаг в развитии метода, несомненно, будет связан с его объективизацией и автоматизацией. Последнее востребовано для объективной численной оценки ОКТ-изображений не постфактум, а в режиме реального времени.

В заключение еще раз подчеркнем: дополнительные данные о внутренней структуре слизистой оболочки разной локализации, которые могут быть получены неинвазивно и в режиме реального времени с помощью ОКТ, достаточно информативны для диагностики хронических воспалительных процессов. Это важно при выявлении латентных заболеваний, не имеющих выраженной клинической и лабораторной манифестации. ОКТ при комплементарном использовании со стандартными методами может значительно повысить их эффективность не только относительно диагностики воспалительного процесса, но и дифференциальной диагностики различных его форм и вариантов. ОКТ может быть использована и на этапе лечения для мониторинга и контроля, что, в свою очередь, будет способствовать максимальной персонализации лечебной тактики. Несомненно, ОКТ требует дальнейшего развития с точки зрения разработки методик использования, обработки изображений и усовершенствования приборной базы. ☺

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Литература

- Willoughby DA, Giroud JP, Velo GP. Perspectives in inflammation: future trends and developments. Springer Science & Business Media; 2012. 638 p.
- Angier E, Willington J, Scadding G, Holmes S, Walker S; British Society for Allergy & Clinical Immunology (BSACI) Standards of Care Committee. Management of allergic and non-allergic rhinitis: a primary care summary of the BSACI guideline. *Prim Care Respir J*. 2010;19(3):217–22. doi: 10.4104/pcrj.2010.00044.
- Mølgaard E, Thomsen SF, Lund T, Pedersen L, Nolte H, Backer V. Differences between allergic and nonallergic rhinitis in a large sample of adolescents and adults. *Allergy*. 2007;62(9):1033–7. doi: 10.1111/j.1398-9995.2007.01355.x.
- Астафьева НГ, Удовиченко ЕН, Гамова ИВ, Перфилова ИА, Наумова ОС, Кенесариева ЖМ, Вачугова ЛК, Гапон МС. Аллергические и неаллергические риниты: сравнительная характеристика. Лечащий врач. 2013;(4):10–3. Доступно на: <http://www.lvrach.ru/2013/04/15435672/> (Дата обращения 23.11.2015).
- Quan M, Casale TB, Blaiss MS. Should clinicians routinely determine rhinitis subtype on initial diagnosis and evaluation? A debate among experts. *Clin Cornerstone*. 2009;9(3):54–60. doi: 10.1016/S1098-3597(09)80014-8.
- Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, Zuberbier T, Baeana-Cagnani CE, Canonica GW, van Weel C, Agache I, Ait-Khaled N, Bachert C, Blaiss MS, Bonini S, Boulet LP, Bousquet PJ, Camargos P, Carlsen KH, Chen Y, Custovic A, Dahl R, Demoly P, Douagui H, Durham SR, van Wijk RG, Kalayci O, Kaliner MA, Kim YY, Kowalski ML, Kuna P, Le LT, Lemiere C, Li J, Lockey RF, Mavale-Manuel S, Meltzer EO, Mohammad Y, Mullol J, Naclerio R, O'Hehir RE, Ohta K, Ouedraogo S, Palkonen S, Papadopoulos N, Passalacqua G, Pawankar R, Popov TA, Rabe KF, Rosado-Pinto J, Scadding GK, Simons FE, Toskala E, Valovirta E, van Cauwenberge P, Wang DY, Wickman M, Yawn BP, Yorgancioglu A, Yusuf OM, Zar H, Annesi-Maesano I, Bateman ED, Ben Kheder A, Boakye DA, Bouchard J, Burney P, Busse WW, Chan-Yeung M, Chavannes NH, Chuchalin A, Dolen WK, Emuzyte R, Grouse L, Humbert M, Jackson C, Johnston SL, Keith PK, Kemp JP, Klossek JM, Larenas-Linnemann D, Lipworth B, Malo JL, Marshall GD, Naspitz C, Nekam K, Niggemann B, Nizankowska-Mogilnicka E, Okamoto Y, Orru MP, Potter P, Price D, Stoloff SW, Vandemplas O, Viegi G, Williams D; World Health Organization; GA(2)LEN; AllerGen. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*. 2008;63 Suppl 86:8–160. doi: 10.1111/j.1398-9995.2007.01620.x.
- Gindros G, Kantas I, Balatsouras DG, Kandiloros D, Manthos AK, Kaidoglou A. Mucosal changes in chronic hypertrophic rhinitis after surgical turbinate reduction. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2009;266(9):1409–16. doi: 10.1007/s00405-009-0916-9.
- Ahmadiashar A, Taghiloo D, Esmailzadeh A, Falakflaki B. Nasal eosinophilia as a marker for allergic rhinitis: a controlled study of 50 patients. *Ear Nose Throat J*. 2012;91(3):122–4.
- Armstrong WB, Ridgway JM, Vokes DE, Guo S, Perez J, Jackson RP, Gu M, Su J, Crumley RL, Shibuya TY, Mahmood U, Chen Z, Wong BJ. Optical coherence tomography of laryngeal cancer. *Laryngoscope*. 2006;116(7):1107–13. doi: 10.1097/01.mlg.0000217539.27432.5a.



10. Klein AM, Pierce MC, Zeitels SM, Anderson RR, Kobler JB, Shishkov M, de Boer JF. Imaging the human vocal folds in vivo with optical coherence tomography: a preliminary experience. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2006;115(4):277–84.
11. Kraft M, Glanz H, von Gerlach S, Wisweh H, Lubatschowski H, Arens C. Clinical value of optical coherence tomography in laryngology. *Head Neck.* 2008;30(12):1628–35. doi: 10.1002/hed.20914.
12. Ridgway JM, Armstrong WB, Guo S, Mahmood U, Su J, Jackson RP, Shibuya T, Crumley RL, Gu M, Chen Z, Wong BJ. In vivo optical coherence tomography of the human oral cavity and oropharynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;132(10):1074–81. doi: 10.1001/archotol.132.10.1074.
13. Mahmood U, Ridgway J, Jackson R, Guo S, Su J, Armstrong W, Shibuya T, Crumley R, Chen Z, Wong B. In vivo optical coherence tomography of the nasal mucosa. *Am J Rhinol.* 2006;20(2):155–9.
14. Olzowy B, Starke N, Schuldt T, Hüttman G, Lankenau E, Just T. Optical coherence tomography and confocal endomicroscopy for rhinologic pathologies: a pilot study. *Proc. SPIE.* 2013;8805:880505. doi: 10.1117/12.2033174.
15. Oltmanns U, Palmowski K, Wielpütz M, Kahn N, Baroke E, Eberhardt R, Wege S, Wiebel M, Kreuter M, Herth FJ, Mall MA. Optical coherence tomography detects structural abnormalities of the nasal mucosa in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2015. pii: S1569-1993(15)00165-4. doi: 10.1016/j.jcf.2015.07.003.
16. Kamath MS, Bhattacharya S. Demographics of infertility and management of unexplained infertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2012;26(6):729–38. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2012.08.001.
17. Wiesenfeld HC, Hillier SL, Meyn LA, Amortegui AJ, Sweet RL. Subclinical pelvic inflammatory disease and infertility. *Obstet Gynecol.* 2012;120(1):37–43. doi: 10.1097/AOG.0b013e-31825a6bc9.
18. Посисеева ЛВ. Ранние репродуктивные потери: проблемы и решения. *Гинекология.* 2012;14(6):38–41.
19. Brunham RC, Gottlieb SL, Paavonen J. Pelvic inflammatory disease. *N Engl J Med.* 2015;372(21):2039–48. doi: 10.1056/NEJMr1411426.
20. Sweet RL, Gibbs RS. *Infectious diseases of the female genital tract.* Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2009. 480 p.
21. Gleicher N, Barad D. Unexplained infertility: does it really exist? *Hum Reprod.* 2006;21(8):1951–5. doi: 10.1093/humrep/del135.
22. Siristatidis C, Bhattacharya S. Unexplained infertility: does it really exist? Does it matter? *Hum Reprod.* 2007;22(8):2084–7. doi: 10.1093/humrep/dem117.
23. Tsuji I, Ami K, Miyazaki A, Hujinami N, Hoshiai H. Benefit of diagnostic laparoscopy for patients with unexplained infertility and normal hysterosalpingography findings. *Tohoku J Exp Med.* 2009;219(1):39–42. doi: http://doi.org/10.1620/tjem.219.39.
24. Плужникова ТА, Комаров ЕК. Диагностика и лечение хронического эндометрита у женщин с невынашиванием беременности в анамнезе. *Проблемы репродукции.* 2012;(6):30–3.
25. Merviel P, Lourdel E, Brzakowski M, Garriot B, Mamy L, Gagneur O, Nasreddine A. Should a laparoscopy be necessary in case of infertility with normal tubes at hysterosalpingography? *Gynecol Obstet Fertil.* 2011;39(9):504–8. doi: 10.1016/j.gyobfe.2011.07.008.
26. Workowski KA, Berman S; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. *MMWR Recomm Rep.* 2010;59(RR-12):1–110.
27. Molander P, Finne P, Sjöberg J, Sellors J, Paavonen J. Observer agreement with laparoscopic diagnosis of pelvic inflammatory disease using photographs. *Obstet Gynecol.* 2003;101(5 Pt 1):875–80. doi: 10.1016/S0029-7844(03)00013-9.
28. Ascencio M, Collinet P, Cosson M, Mordon S. The role and value of optical coherence tomography in gynecology. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 2007;36(8):749–55. doi: 10.1016/j.jgyn.2007.07.005.
29. Kirillin M, Panteleeva O, Yunusova E, Donchenko E, Shakhova N. Criteria for pathology recognition in optical coherence tomography of fallopian tubes. *J Biomed Opt.* 2012;17(8):081413-1. doi: 10.1117/1.JBO.17.8.081413.
30. Trottmann M, Kölle S, Leeb R, Doering D, Reese S, Stief CG, Dulohery K, Leavy M, Kuznetsova J, Homann C, Sroka R. Ex vivo investigations on the potential of optical coherence tomography (OCT) as a diagnostic tool for reproductive medicine in a bovine model. *J Biophotonics.* 2016;9(1–2):129–37. doi: 10.1002/jbio.201500009.
31. Пантелеева ОГ, Шахов БЕ, Юнусова КЭ, Кириллин МЮ, Шахова НМ. Оптическая интроскопия – новый метод диагностики в репродуктивной медицине. *Вестник рентгенологии и радиологии.* 2012;(4):50–5.
32. Meller A, Shakhova M, Rilkin Y, Novozhilov A, Kirillin M, Shakhov A. Optical coherence tomography in diagnosing inflammatory diseases of ENT. *Photon Lasers Med.* 2014;3(4):323–30. doi: 10.1515/plm-2014-0025.
33. Kirillin M, Panteleeva O, Agrba P, Pasukhin M, Sergeeva E, Plankina E, Dudenkova V, Gubarkova E, Kiseleva E, Gladkova N, Shakhova N, Vitkin A. Towards advanced OCT clinical applications. *Proc. SPIE.* 2015;9542:95420I. doi: 10.1117/12.2183794.
34. Vakoc BJ, Fukumura D, Jain RK, Bouma BE. Cancer imaging by optical coherence tomography: preclinical progress and clinical potential. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(5):363–8. doi: 10.1038/nrc3235.
35. Пантелеева ОГ, Кузнецова ИА, Качалина ОВ, Елисеева ДД, Гребенкина ЕВ, Гамаюнов СВ, Кузнецов СС, Юнусова ЕЭ, Губарькова ЕВ, Кириллин МЮ, Шахова НМ. Оптическая когерентная томография как инструмент репродуктивной гинекологии. *Современные технологии в медицине.* 2015;7(1):89–96. doi: 10.17691/stm2015.7.1.12.
36. Корсак ВС, Забелкина ОИ, Исакова ЭВ, Попов ЭН. Диагностика патологии полости матки у больных, страдающих трубно-перитонеальной формой бесплодия. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2005;LIV(3):50–3.

## References

1. Willoughby DA, Giroud JP, Velo GP. Perspectives in inflammation: future trends and developments. *Springer Science & Business Media.* 2012. 638 p.
2. Angier E, Willington J, Scadding G, Holmes S, Walker S; British Society for Allergy & Clinical Immunology (BSACI) Standards of Care Committee. Management of allergic and non-allergic rhinitis: a primary care summary of the BSACI guideline. *Prim Care Respir J.* 2010;19(3):217–22. doi: 10.4104/pcrj.2010.00044.
3. Mølgaard E, Thomsen SF, Lund T, Pedersen L, Nolte H, Backer V. Differences between allergic and nonallergic rhinitis in a large sample of adolescents and adults. *Allergy.* 2007;62(9):1033–7. doi: 10.1111/j.1398-9995.2007.01355.x.
4. Astaf'eva NG, Udovichenko EN, Gamova IV, Perfilova IA, Naumova OS, Kenesariyeva ZhM, Vachugova LK, Gapon MS. Allergicheskie i ne-allergicheskie rinity: sravnitel'naya kharakteristika [Allergic and non-infectious non-allergic rhinitis from the point of view of terminological issues, clinical epidemiology, diagnostics and treatment (part 1)]. *Lechashchiy vrach.* 2013;(4):10–3. Available at: <http://www.lvrach.ru/2013/04/15435672/> (Accessed 23.11.2015) (in Russian).



5. Quan M, Casale TB, Blaiss MS. Should clinicians routinely determine rhinitis subtype on initial diagnosis and evaluation? A debate among experts. *Clin Cornerstone*. 2009;9(3):54–60. doi: 10.1016/S1098-3597(09)80014-8.
6. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, Zuberbier T, Bae-na-Cagnani CE, Canonica GW, van Weel C, Agache I, Ait-Khaled N, Bachert C, Blaiss MS, Bonini S, Boulet LP, Bousquet PJ, Camargos P, Carlsen KH, Chen Y, Custovic A, Dahl R, Demoly P, Douagui H, Durham SR, van Wijk RG, Kalayci O, Kaliner MA, Kim YY, Kowalski ML, Kuna P, Le LT, Lemiere C, Li J, Lockey RF, Mavale-Manuel S, Meltzer EO, Mohammad Y, Mullol J, Naclerio R, O'Hehir RE, Ohta K, Ouedraogo S, Palkonen S, Papadopoulos N, Passalacqua G, Pawankar R, Popov TA, Rabe KF, Rosado-Pinto J, Scadding GK, Simons FE, Toskala E, Valovirta E, van Cauwenberge P, Wang DY, Wickman M, Yawn BP, Yorgancıoğlu A, Yusuf OM, Zar H, Annesi-Maesano I, Bateman ED, Ben Kheder A, Boakye DA, Bouchard J, Burney P, Busse WW, Chan-Yeung M, Chavannes NH, Chuchalin A, Dolen WK, Emuzyte R, Grouse L, Humbert M, Jackson C, Johnston SL, Keith PK, Kemp JP, Klossek JM, Larenas-Linnemann D, Lipworth B, Malo JL, Marshall GD, Naspitz C, Nekam K, Niggemann B, Nizankowska-Mogilnicka E, Okamoto Y, Orru MP, Potter P, Price D, Stoloff SW, Vandenas O, Viegi G, Williams D; World Health Organization; GA(2)LEN; AllerGen. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*. 2008;63 Suppl 86:8–160. doi: 10.1111/j.1398-9995.2007.01620.x.
7. Gindros G, Kantas I, Balatsouras DG, Kandiloros D, Manthos AK, Kaidoglou A. Mucosal changes in chronic hypertrophic rhinitis after surgical turbinate reduction. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2009;266(9):1409–16. doi: 10.1007/s00405-009-0916-9.
8. Ahmadiafshar A, Taghiloo D, Esmailzadeh A, Falakafaki B. Nasal eosinophilia as a marker for allergic rhinitis: a controlled study of 50 patients. *Ear Nose Throat J*. 2012;91(3):122–4.
9. Armstrong WB, Ridgway JM, Vokes DE, Guo S, Perez J, Jackson RP, Gu M, Su J, Crumley RL, Shibuya TY, Mahmood U, Chen Z, Wong BJ. Optical coherence tomography of laryngeal cancer. *Laryngoscope*. 2006;116(7):1107–13. doi: 10.1097/01.mlg.0000217539.27432.5a.
10. Klein AM, Pierce MC, Zeitels SM, Anderson RR, Kobler JB, Shishkov M, de Boer JF. Imaging the human vocal folds in vivo with optical coherence tomography: a preliminary experience. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2006;115(4):277–84.
11. Kraft M, Glanz H, von Gerlach S, Wisweh H, Lubatschowski H, Arens C. Clinical value of optical coherence tomography in laryngology. *Head Neck*. 2008;30(12):1628–35. doi: 10.1002/hed.20914.
12. Ridgway JM, Armstrong WB, Guo S, Mahmood U, Su J, Jackson RP, Shibuya T, Crumley RL, Gu M, Chen Z, Wong BJ. In vivo optical coherence tomography of the human oral cavity and oropharynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006;132(10):1074–81. doi: 10.1001/archotol.132.10.1074.
13. Mahmood U, Ridgway J, Jackson R, Guo S, Su J, Armstrong W, Shibuya T, Crumley R, Chen Z, Wong B. In vivo optical coherence tomography of the nasal mucosa. *Am J Rhinol*. 2006;20(2):155–9.
14. Olzowy B, Starke N, Schuldt T, Hüttman G, Lankenau E, Just T. Optical coherence tomography and confocal endomicroscopy for rhinologic pathologies: a pilot study. *Proc SPIE*. 2013;8805:880505. doi: 10.1117/12.2033174.
15. Oltmanns U, Palmowski K, Wielpütz M, Kahn N, Baroke E, Eberhardt R, Wege S, Wiebel M, Kreuter M, Herth FJ, Mall MA. Optical coherence tomography detects structural abnormalities of the nasal mucosa in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2015. pii: S1569-1993(15)00165-4. doi: 10.1016/j.jcf.2015.07.003.
16. Kamath MS, Bhattacharya S. Demographics of infertility and management of unexplained infertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2012;26(6):729–38. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2012.08.001.
17. Wiesenfeld HC, Hillier SL, Meyn LA, Amortegui AJ, Sweet RL. Subclinical pelvic inflammatory disease and infertility. *Obstet Gynecol*. 2012;120(1):37–43. doi: 10.1097/AOG.0b013e-31825a6bc9.
18. Posiseeva LV. Rannie reproduktivnye poteri: problemy i resheniya [The early reproductive losses: problems and solutions]. *Ginekologiya [Gynecology]*. 2012;14(6):38–41 (in Russian).
19. Brunham RC, Gottlieb SL, Paavonen J. Pelvic inflammatory disease. *N Engl J Med*. 2015;372(21):2039–48. doi: 10.1056/NEJMr1411426.
20. Sweet RL, Gibbs RS. Infectious diseases of the female genital tract. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2009. 480 p.
21. Gleicher N, Barad D. Unexplained infertility: does it really exist? *Hum Reprod*. 2006;21(8):1951–5. doi: 10.1093/humrep/del135.
22. Siristatidis C, Bhattacharya S. Unexplained infertility: does it really exist? Does it matter? *Hum Reprod*. 2007;22(8):2084–7. doi: 10.1093/humrep/dem117.
23. Tsuji I, Ami K, Miyazaki A, Hujinami N, Hoshiai H. Benefit of diagnostic laparoscopy for patients with unexplained infertility and normal hysterosalpingography findings. *Tohoku J Exp Med*. 2009;219(1):39–42. doi: http://doi.org/10.1620/tjem.219.39.
24. Pluzhnikova TA, Komarov EK. Diagnostika i lechenie khronicheskogo endometrita u zhenshchin s nevnashivaniem beremennosti v anamneze [Diagnosis and treatment of chronic endometritis in women with previous miscarriages]. *Problemy reproduktivnoi [Russian Journal of Human Reproduction]*. 2012;6:30–3 (in Russian).
25. Merviel P, Lourdel E, Brzakowski M, Garriot B, Mamy L, Gagneur O, Nasreddine A. Should a laparoscopy be necessary in case of infertility with normal tubes at hysterosalpingography? *Gynecol Obstet Fertil*. 2011;39(9):504–8. doi: 10.1016/j.gyobfe.2011.07.008.
26. Workowski KA, Berman S; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. *MMWR Recomm Rep*. 2010;59(RR-12):1–110.
27. Molander P, Finne P, Sjöberg J, Sellors J, Paavonen J. Observer agreement with laparoscopic diagnosis of pelvic inflammatory disease using photographs. *Obstet Gynecol*. 2003;101(5 Pt 1):875–80. doi: 10.1016/S0029-7844(03)00013-9.
28. Ascencio M, Collinet P, Cosson M, Mordon S. The role and value of optical coherence tomography in gynecology. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2007;36(8):749–55. doi: 10.1016/j.jgyn.2007.07.005.
29. Kirillin M, Panteleeva O, Yunusova E, Donchenko E, Shakhova N. Criteria for pathology recognition in optical coherence tomography of fallopian tubes. *J Biomed Opt*. 2012;17(8):081413-1. doi: 10.1117/1.JBO.17.8.081413.
30. Trottmann M, Kölle S, Leeb R, Doering D, Reese S, Stief CG, Dulohery K, Leavy M, Kuznetsova J, Homann C, Sroka R. Ex vivo investigations on the potential of optical coherence tomography (OCT) as a diagnostic tool for reproductive medicine in a bovine model. *J Biophotonics*. 2016;9(1–2):129–37. doi: 10.1002/jbio.201500009.
31. Panteleeva OG, Shakhov BE, Yunusova KE, Kirillin MYu, Shakhova NM. Opticheskaya introskopiya – novyy metod diagnostiki v reproduktivnoy meditsine [Optical intrascopy is a new diagnostic technique in reproductive medicine]. *Vestnik rentgenologii i radiologii [Journal of Radiology]*. 2012;(4):50–5 (in Russian).
32. Meller A, Shakhova M, Rilkin Y, Novozhilov A, Kirillin M, Shakhov A. Optical coherence tomography in diagnosing inflammatory diseases of ENT. *Photon Lasers Med*. 2014;3(4):323–30. doi: 10.1515/plm-2014-0025.
33. Kirillin M, Panteleeva O, Agrba P, Pasukhin M, Sergeeva E, Plankina E, Dudenkova V, Gubarkova E, Kiseleva E, Gladkova N, Shakhova N, Vitkin A. Towards advanced OCT clinical applications. *Proc SPIE*. 2015;9542:95420L. doi: 10.1117/12.2183794.
34. Vakoc BJ, Fukumura D, Jain RK, Bouma BE. Cancer imaging by optical coherence tomography: preclinical progress and clinical potential. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(5):363–8. doi: 10.1038/nrc3235.



35. Panteleeva OG, Kuznetsova IA, Kachalina OV, Eliseeva DD, Grebenkina EV, Gamayunov SV, Kuznetsov SS, Yunusova EE, Gubar'kova EV, Kirillin MYu, Shakhova NM. Opticheskaya kogerentnaya tomografiya kak instrument reproduktivnoy ginekologii [Optical coherence tomography as a tool in reproductive gynecology]. *Sovremennye tekhnologii v meditsine* [Modern Technologies in Medicine]. 2015;7(1):89–96 (in Russian). doi: 10.17691/stm2015.7.1.12.

36. Korsak VS, Zabelkina OI, Isakova EV, Popov EN. Diagnostika patologii polosti matki u bol'nykh, str-

adayushchikh trubno-peritoneal'noy formoy besplodiya [The diagnostics of pathology in uterine cavity in patients with tubal and peritoneal type of infertility]. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney* [Journal of Obstetrics and Diseases of Women]. 2005;LIV(3):50–3 (in Russian).

## Non-invasive diagnostics of non-tumor disorders with optical coherence tomography

Meller A.E.<sup>1</sup> • Motovilova T.M.<sup>2</sup> • Panteleeva O.G.<sup>3</sup> • Kuznetsov S.S.<sup>2</sup> • Stroykova K.I.<sup>2</sup> • Kondrat'eva O.A.<sup>4</sup> • Kirillin M.Yu.<sup>5</sup> • Shakhova N.M.<sup>5</sup>

**Introduction:** The distinctive features of modern inflammatory diseases are their indolent course and predisposition to chronicity. Chronic inflammation is the basis for the development of serious disorders, including autoimmune and oncologic ones, and a cause of major functional abnormalities of the human body. Diagnostics of chronic inflammation is associated with a number of problems which originate from a variety of clinical phenotypes and morphological forms, on the one hand, and from the rising prevalence of their latent course, on the other. In its turn, an adequate treatment choice may be based on understanding and accurate detection of etiological and morphological types of the disease. In this connection, development of novel diagnostic techniques, such as optical coherence tomography (OCT), is of utmost importance. **Aim:** To demonstrate feasibility of OCT in detection of morphological abnormalities associated with chronic inflammatory disorders of various localizations. **Materials and methods:** OCT diagnostics was performed in addition to standard diagnostic procedures in 225 patients with chronic inflammatory disorders of various localizations, such as chronic recurrent rhinitis, chronic latent salpingitis and chronic endometritis. For OCT, an "OCT-1300U" system was used, with central wavelength of 1280 nm, spatial resolution of 15–20 μm, image acquisition rate of 8 frames per second, imaging depth of 1.4 mm and a probe diameter of 2.4 mm. The following techniques of quantitative processing were used for processing of the OCT images. Quantitative characterization of histograms and image texture was performed with further determination of values typical for various images groups corresponding

to particular states of biological tissues. Neural network was also employed with histograms and 2D Fourier transforms of the images as input data. **Results:** OCT laparoscopy allowed to obtain three types of OCT images of fallopian tubes with features typical for healthy and inflammatory states. Presence of heterogeneity in the structure of an OCT image indicated heterogeneity in the muscle layer of the fallopian tube, which allowed for a conclusion on chronic salpingitis. With OCT hysteroscopy we demonstrated the ability of OCT to visualize pathomorphologic features of chronic endometritis. The diagnostic data obtained by OCT-rhinoscopy allowed to draw preliminary conclusions on the OCT ability to detect specific features of various types of chronic rhinitis. Numerical processing of diagnostic OCT images resulted in their higher objectivity and an improvement of diagnostic accuracy of the technique. **Conclusion:** OCT is able to detect morphological changes induced by a chronic inflammatory process. OCT criteria were shown to be universal for various organs. We demonstrated the possibility of non-invasive diagnostics of pathomorphologic forms of disease, showed some challenges in the development of OCT for diagnostics of non-tumor disorders and ways to overcome them are proposed, in particular, the use of image numerical processing. Further studies seem to be justified.

**Key words:** optical coherence tomography, hysteroscopy, laparoscopy, rhinoscopy, pelvic inflammatory diseases, chronic endometritis, chronic salpingitis, chronic rhinitis

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-203-212

**Meller Alina E.** – MD, Physician<sup>1</sup>

**Motovilova Tat'yana M.** – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Obstetrics and Gynecology<sup>2</sup>

**Panteleeva Ol'ga G.** – MD, PhD, Physician<sup>3</sup>

**Kuznetsov Sergey S.** – MD, PhD, Professor, Head of the Chair of Pathological Anatomy<sup>2</sup>

**Stroykova Kseniya I.** – Undergraduate Student<sup>2</sup>

**Kondrat'eva Ol'ga A.** – Undergraduate Student<sup>4</sup>

**Kirillin Mikhail Yu.** – PhD (in Physics and Mathematics), Senior Research Fellow, Laboratory of Biophotonics<sup>5</sup>

**Shakhova Nataliya M.** – MD, PhD, Leading Research Fellow, Laboratory of Biophotonics<sup>5</sup>

✉ 46 Ul'yanova ul., Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation. Tel.: +7 (831) 436 80 10.

E-mail: natalia.shakhova@gmail.com

<sup>1</sup> Volga District Medical Centre; 2 Nizhnevolzhskaya naberezhnaya, Nizhny Novgorod, 603001, Russian Federation

<sup>2</sup> Nizhny Novgorod State Medical Academy; 10/1 Minina i Pozharskogo ploshchad', Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation

<sup>3</sup> Clinical Hospital of the Russian Railways; 18 Lenina prospekt, Nizhny Novgorod, 603140, Russian Federation

<sup>4</sup> National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod; 23 Gagarina prospekt, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation

<sup>5</sup> Institute of Applied Physics of the Rus. Acad. Sci.; 46 Ul'yanova ul., Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation



# Экстракорпоральная фотохимиотерапия типичного и атипичного красного плоского лишая

Молочков А.В.<sup>1</sup> • Кильдюшевский А.В.<sup>1</sup> • Молочкова Ю.В.<sup>1</sup>

**Актуальность.** Красный плоский лишай (КПЛ) входит в группу папулосквамозных дерматозов. Возникновение этого наиболее частого лихеноидного дерматоза связано с аутоиммунным разрушением базальных кератиноцитов. В терапии КПЛ используются системные кортикостероиды, цитостатики, иммуносупрессанты, ароматические ретиноиды, ПУВА-терапия, а также биологические препараты (ретуксимаб, эфализумаб), применение которых недостаточно эффективно и сопровождается множеством побочных эффектов и осложнений. **Цель** – изучение эффективности экстракорпоральной фотохимиотерапии (ЭФХТ) при распространенном типичном и атипичном КПЛ. **Материал и методы.** Проведено проспективное когортное исследование с активным контролем. Тридцать три пациента с различными формами красного плоского лишая, получавшие лечение с применением ЭФХТ, были разделены на 2 группы: в первую группу вошли 19 пациентов с типичным

распространенным (в том числе подострым и хроническим) КПЛ, во вторую – 14 больных атипичным (пигментный, фолликулярный, гипертрофический, эрозивно-язвенный, вульвовагинально-гингивальный синдром) КПЛ. Для проведения ЭФХТ за 2 часа до процедуры пациент принимал 8-метоксипсорален, затем на клеточном сепараторе Naemonetics MCS+ производилось выделение мононуклеарных клеток, которые подвергались облучению ультрафиолетового света спектра А (с длиной волны 320–400 нм), после чего моноцитарная масса реинфузировалась пациенту. Курс лечения составлял 4 процедуры, которые проводились через день. **Результаты.** У каждого из 33 больных был отмечен положительный клинический эффект и вполне удовлетворительная переносимость ЭФХТ. При этом у пациентов с распространенным подострым типичным КПЛ ЭФХТ способствовала активации естественных механизмов иммуносупрессии (корреляционная зависимость между

CD8<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup>, а также между CD8<sup>+</sup> и CD11b<sup>+</sup> отсутствовала:  $r=0,52$  ( $p>0,05$ ) и  $r=0,35$  ( $p>0,05$ ) соответственно), а у больных с распространенным хроническим КПЛ – восстановлению процессов иммунологической толерантности к собственным антигенным структурам организма (отмечено сохранение корреляции между CD16<sup>+</sup> и CD11b<sup>+</sup> и ее снижение между CD16<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup>:  $r=0,77$  ( $p<0,05$ ) и  $r=0,62$  ( $p>0,05$ ) соответственно). **Заключение.** Полученные данные подтверждают высокую клиническую эффективность ЭФХТ и ее патогенетическую направленность на ранних и поздних сроках распространенного типичного КПЛ.

**Ключевые слова:** типичный подострый красный плоский лишай, типичный хронический красный плоский лишай, атипичный красный плоский лишай, экстракорпоральная фотохимиотерапия, иммунные нарушения

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-213-220



**К**расный плоский лишай (КПЛ) – частый воспалительный дерматоз, патогенез которого связан с аутоиммунным разрушением Т-клетками базальных кератиноцитов, измененных вирусными, лекарственными агентами или другими аллергенами [1]. В лечении КПЛ используют системные кортикостероиды, цитостатики, иммуносупрессанты, ароматические ретиноиды, ПУВА-терапию [2, 3], а также биологические препараты, такие как ретуксимаб и эфализумаб [4, 5], применение которых не только недостаточно эффективно, но и сопровождается множеством побочных эффектов и осложнений [6].

С конца 1970-х годов несомненный вклад в лечение больных КПЛ внесла фотохимиотерапия, основанная на приеме внутрь фотосенсибилизатора 8-метоксипсоралена и последующем облучении кожи ультрафиолетовыми лучами спектра А (ПУВА-терапия) [3]. И хотя этот метод обеспечивает не только местное, но и системное воздействие, он недостаточно эффективен при распространенных кожных и тяжелых эрозивных поражениях полости рта, а применение для достижения полного клинического эффекта больших кумулятивных доз ультрафиолетового излучения (7,2–23,9 Дж/см<sup>2</sup>) существенно повышает канцерогенную опасность [7].

Вследствие этого наше внимание привлекла экстракорпоральная фотохимиотерапия (ЭФХТ), эффект которой основан на биологическом действии 8-метоксипсоралена и ультрафиолетового излучения спектра А на мононуклеарные клетки, отобранные с помощью цитафереза и реинфузированные пациенту. Этот метод адаптивной (от англ. adoptive – восприимчивый) иммунотерапии с успехом применяется при Т-клеточной лимфоме кожи, целом ряде аутоиммунных заболеваний (пузырчатке, системной склеродермии, системной красной волчанке), атопическом дерматите, псориазе, хронической форме болезни Лайма и т.д. [8, 9].

Однако данные об эффективности ЭФХТ при КПЛ основаны только на отдельных сообщениях. A.D. Guyot и соавт. отмечали высокую клиническую эффективность ЭФХТ в лечении 12 больных КПЛ (в том числе при процессе, резистентном к системной кортикостероидной терапии и приему циклоспорина), сопровождавшуюся снижением количества лимфоцитов периферической крови [10]. A.S. Marchesseau-Merlin и соавт. получили эффект у 2 больных КПЛ [11]. В работе С. Kunte и соавт. ЭФХТ проводилась в комплексе с наружными препаратами у 4 пациентов и также

**Молочков Антон Владимирович** – д-р мед. наук, профессор, заместитель директора по науке и международным связям<sup>1</sup>

**Кильдюшевский Александр Вадимович** – д-р мед. наук, профессор, вед. науч. сотр., отделение хирургической гемокоррекции и детоксикации<sup>1</sup>

**Молочкова Юлия Владимировна** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., отделение дерматовенерологии и дерматоонкологии<sup>1</sup>  
✉ 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2–2, Российская Федерация.  
Тел.: +7 (495) 681 43 63.  
E-mail: derma@monikiweb.ru

зарегистрирована высокая эффективность метода, при этом ЭФХТ применялась не только при генерализованном типичном КПЛ кожи, но и при эрозивном КПЛ полости рта [12, 13].

Целью настоящего исследования было изучение эффективности ЭФХТ при распространенном типичном и атипичном КПЛ.

## Материал и методы

Проведено проспективное когортное исследование с активным контролем. Проведение исследования одобрено независимым комитетом по этике при ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» (протокол № 6 от 12 декабря 2013 г.). При проведении клинико-лабораторных исследований соблюдались этические принципы, принятые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964, редакция 2000 г.).

Тридцать три пациента с различными формами красного плоского лишая, получавшие лечение с применением ЭФХТ, были разделены на 2 группы. Группу больных с типичным распространенным КПЛ составили 19 пациентов в возрасте от 24 до 72 лет, в том числе 6 мужчин и 13 женщин со средней давностью заболевания 9,8±4,3 года. Из них 17 безуспешно или с непродолжительным эффектом лечились ранее системными кортикостероидами (5 пациентов), препаратами хинолинового ряда в качестве монотерапии либо в сочетании с антибиотикотерапией тетрациклином (10 и 2 пациента соответственно). По клиническим формам КПЛ пациенты распределялись следующим образом: в 6 наблюдениях патологический процесс поражал только кожу, в 4 – кожу и слизистые оболочки полости рта, в 2 – кожу и слизистые оболочки половых органов, в 6 – кожу, а также слизистые оболочки полости рта и половых органов, в 1 – только слизистые оболочки половых органов.

Группа из 14 больных атипичным КПЛ включала 6 мужчин и 8 женщин в возрасте от 32 до 68 лет с давностью заболевания 14,3±4,5 года. В 11 случаях отмечалось поражение кожи и слизистых оболочек, в том числе у 4 пациентов – кожи и слизистых оболочек полости рта, у 3 – кожи и слизистых оболочек половых органов, у 4 – кожи, а также слизистых оболочек полости рта и половых органов. В 3 наблюдениях из этой группы процесс затронул слизистые оболочки полости рта и половых органов. Кроме того, в 4 случаях наблюдалось поражение ногтей, в том числе

<sup>1</sup> ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация



Таблица 1. Динамика иммунологических показателей в группе больных подострым типичным красным плоским лишаем

Маркер	Здоровые доноры	Этап обследования пациента		
		до ЭФХТ	после ЭФХТ	p
Лимфоциты, % / 10 <sup>9</sup> /л	24 ± 3,2 / 1,2 ± 1,3	29,9 ± 8,56 / 1,81 ± 0,52	27,8 ± 13,1 / 1,53 ± 0,72	
CD3, % / 10 <sup>9</sup> /л	62,8 ± 1,2 / 0,75 ± 0,01	73,4 ± 7,7 / 1,33 ± 0,14	68,5 ± 7,85 / 1,05 ± 0,12	*
CD4, % / 10 <sup>9</sup> /л	37,1 ± 1,2 / 0,45 ± 0,01	41,8 ± 14 / 0,76 ± 0,25	43,7 ± 7,16 / 0,67 ± 0,12	*
CD8, % / 10 <sup>9</sup> /л	25,5 ± 0,8 / 0,31 ± 0,01	41,1 ± 7,7 / 0,74 ± 0,14	28,6 ± 7,67 / 0,44 ± 0,12	*†
CD16, % / 10 <sup>9</sup> /л	18,8 ± 1,5 / 0,23 ± 0,02	20,2 ± 9,02 / 0,37 ± 0,16	22,3 ± 14,9 / 0,34 ± 0,23	
CD4/CD8, ед	1,5 ± 0,4	1,05 ± 0,53	1,5 ± 0,28	*†
CD11b, % / 10 <sup>9</sup> /л	26,8 ± 0,8 / 0,32 ± 0,01	36 ± 16,5 / 0,65 ± 0,3	33 ± 17,3 / 0,5 ± 0,26	
HLA-DR, % / 10 <sup>9</sup> /л	9,8 ± 0,5 / 0,12 ± 0,01	18,8 ± 7,7 / 0,34 ± 0,14	22,4 ± 9,53 / 0,34 ± 0,15	*
CD38 <sup>+</sup> , % / 10 <sup>9</sup> /л	30,6 ± 1,5 / 0,37 ± 0,02	50,7 ± 13,8 / 0,92 ± 0,25	44,3 ± 19,5 / 0,68 ± 0,3	*
CD25, % / 10 <sup>9</sup> /л	4,2 ± 0,2 / 0,05 ± 0,01	20,8 ± 10,4 / 0,38 ± 0,19	18 ± 7,77 / 0,27 ± 0,12	*

ЭФХТ – экстракорпоральная фотохимиотерапия

Данные представлены в виде средней величины и стандартного отклонения

\* Достоверно между нормой и больными подострым типичным красным плоским лишаем до ЭФХТ

† Достоверно между больными подострым типичным красным плоским лишаем до и после ЭФХТ

у 2 больных с вульвовагинально-гингивальным синдромом.

При гипертрофическом КПЛ (2 случая) высыпания в области нижних конечностей были представлены множественными бляшками диаметром от 5 до 20 см с бородавчатыми разрастаниями на поверхности. В 1 наблюдении в процесс вовлекалась слизистая оболочка полости рта, еще в 1 имело место поражение слизистых оболочек полости рта и половых органов.

У 3 пациентов с пигментным КПЛ высыпания характеризовались интенсивно пигментированными лихеноидными папулами и бляшками диаметром до 5 см, расположенными в кожных складках, на шее, в области боковых поверхностей туловища, голенях, пациентов беспокоил незначительный зуд. В 1 случае в процесс вовлекались слизистые оболочки полости рта и половых органов, у 2 больных отмечалось поражение слизистых оболочек только половых органов.

В 1 наблюдении диагностирован инвертированный пигментный КПЛ. У этого пациента высыпания располагались на верхних конечностях, в подмышечных впадинах и на слизистой оболочке твердого нёба, где имелся гипертрофический КПЛ. Отмечена также выраженная продольная исчерченность ногтей.

При фолликулярном КПЛ (2 случая) высыпания были представлены интенсивно зудящими распространенными мелкими фолликулярными узелками на туловище и волосистой части головы. У одного пациента в процесс были вовлечены слизистая оболочка половых органов и ногтевые пластинки (онихорексис), у второго – слизистая полости рта.

Зарегистрирован 1 случай атрофического КПЛ. На коже процесс был представлен очагами поверхностной атрофии с перламутровым оттенком и западающей центральной частью, замещающейся беловатой рубцовой атрофией; на слизистой оболочке полости рта – экссудативно-гиперемической формой.

Эрозивно-язвенные поражения полости рта, красной каймы губ и гениталий были у 2 больных с лихеноидными папулами на туловище и несмотря на получаемую системную кортикостероидную и другую терапию не заживали до 6 лет, а при вульвовагинально-гингивальном синдроме (3 случая) – до 10 лет.

В целом отсутствие эффекта от проводимой ранее терапии имело место в 12 случаях, в том числе от системной кортикостероидной терапии – у 7 больных, от терапии препаратами хинолинового ряда – у 3, от сочетания препаратов

**Таблица 2.** Динамика иммунологических показателей в группе больных хроническим типичным красным плоским лишаем

Маркер	Здоровые доноры	Этап обследования пациента		
		до ЭФХТ	после ЭФХТ	<i>p</i>
Лимфоциты	24±3,2 / 1,2±1,3	31,4±5,97 / 1,93±0,36	28,2±6,5 / 1,61±0,37	*
CD3	62,8±1,2 / 0,75±0,01	63,9±12,4 / 1,23±0,24	69,9±10,3 / 1,13±0,17	
CD4	37,1±1,2 / 0,45±0,01	37,2±10,2 / 0,72±0,2	37,9±12,9 / 0,61±0,21	
CD8	25,5±0,8 / 0,31±0,01	35,7±7,8 / 0,69±0,15	27,9±5,46 / 0,45±0,09	*
CD16	18,8±1,5 / 0,23±0,02	25,9±8,3 / 0,5±0,16	14,9±8,7 / 0,24±0,14	*†
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> , ед	1,5±0,4	1,11±0,75	1,4±0,42	*†
CD11b	26,8±0,8 / 0,32±0,01	49±12,5 / 0,95±0,24	46,3±11,7 / 0,75±0,19	*
HLA-DR	9,8±0,5 / 0,12±0,01	15,9±5,58 / 0,31±0,11	21,4±13,2 / 0,34±0,21	*
CD38 <sup>+</sup>	30,6±1,5 / 0,36±0,02	55,5±11,9 / 1,07±0,23	49,5±18,7 / 0,8±0,3	*
CD25	4,2±0,2 / 0,05±0,01	14,1±4,5 / 0,27±0,09	18,1±8,82 / 0,29±0,14	*

ЭФХТ – экстракорпоральная фотохимиотерапия

Данные представлены в виде средней величины и стандартного отклонения

\* Достоверно между нормой и больными хроническим типичным красным плоским лишаем до ЭФХТ

† Достоверно между больными хроническим типичным красным плоским лишаем до и после ЭФХТ

хинолинового ряда и антибиотикотерапии тетрациклином – у 2.

ЭФХТ проводилась в комплексе с гипосенсибилизирующей терапией, применением антигистаминных средств, в 10 случаях назначались препараты хинолинового ряда, в 5 – антибиотикотерапия тетрациклином. Местное лечение включало кортикостероидные мази, при поражении слизистых оболочек рта – полоскания хлоргексидином, настоем ромашки, при эрозивных поражениях слизистой половых органов применялись метиленовый синий, бура в глицерине, Солкосерил в форме геля.

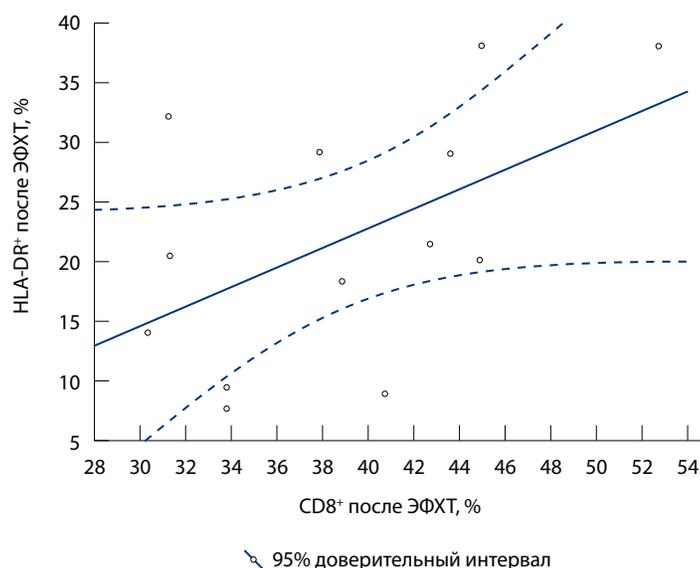
Методика ЭФХТ заключалась в следующем. Выделение мононуклеарных клеток проводили с помощью клеточного сепаратора Naemonetics MCS+ (США) по протоколу RBCP (выделение стволовых клеток). За одну процедуру выделяли от 40 до 70 мл концентрата мононуклеарных клеток, которые ресуспендировали в 0,9% растворе хлористого натрия, доводя общий объем до 200 мл. Клеточную суспензию подвергали ультрафиолетовому воздействию на аппарате ультрафиолетового облучения крови «ЮЛИЯ» при длине волны 380–420 нм. Общая доза экспозиции составляла 0,8–1,2 Дж/см<sup>2</sup>. В качестве фотосенсибилизатора использовали отечественный препарат Аммифурин

(8-метоксипсорален) в дозе 0,6 мг/кг, который пациент перорально принимал за 2 часа до процедуры. После воздействия ультрафиолетовым облучением клеточную суспензию реинфузировали пациенту в течение 30 минут [8]. Курс состоял из 4 сеансов, проводимых с интервалом 1–2 дня.

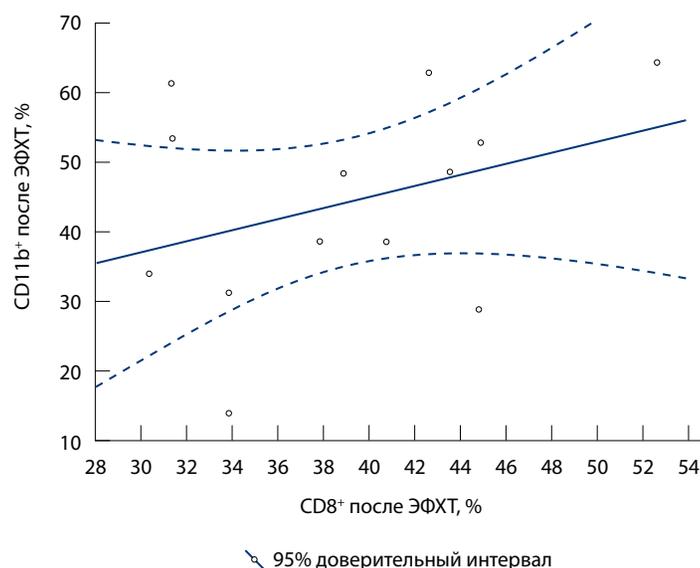
Показатели, полученные в ходе исследования, были внесены в электронную базу данных. Результаты обрабатывались методами статистического и корреляционного анализа с использованием пакета анализа MS Office 2007 для Windows 7 и программы Statistica v6.0. Методами вариационной статистики определялись средняя величина и стандартное отклонение. Достоверность различий оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента и t-критерия Стьюдента для зависимых выборок, статистически значимыми считались различия при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Процедуру ЭФХТ все больные перенесли удовлетворительно, осложнений и побочных эффектов не было. Положительная клиническая динамика была отмечена у каждого из 33 пациентов. Уже через 4–7 дней после 4 сеансов ЭФХТ у всех больных прекратился зуд, значительно уменьшились инфильтрация и гиперемия, произошел полный



**Рис. 1.** Отсутствие корреляции между  $CD8^+$  и  $HLA-DR^+$  у больных с подострым типичным красным плоским лишаем после экстракорпоральной фотохимиотерапии (ЭФХТ)



**Рис. 2.** Отсутствие достоверной положительной корреляции между  $CD8^+/CD11b^+$  у больных с подострым типичным красным плоским лишаем после экстракорпоральной фотохимиотерапии (ЭФХТ)

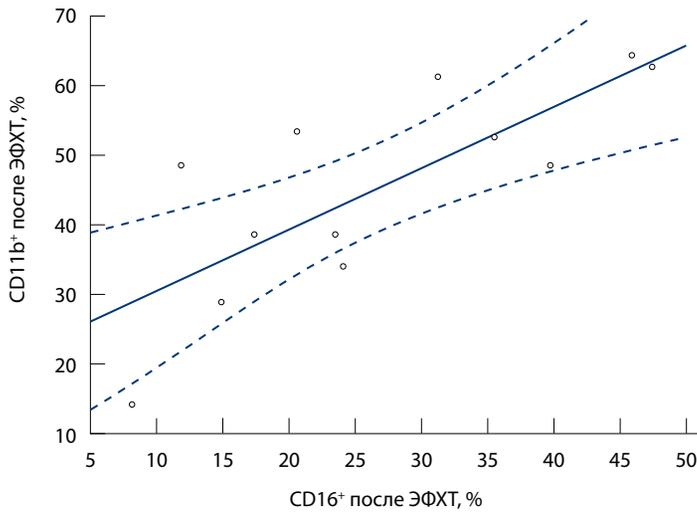
(в 19 случаях) или частичный (в 14 случаях) регресс высыпаний на коже и слизистых оболочках. У 3 пациенток с вульвовагинально-гингивальным синдромом регрессировали высыпания на коже и слизистых оболочках, однако в 2 случаях остались дистрофические изменения ногтевых пластинок. При изучении отдаленных результатов в сроки от 2 до 72 месяцев ( $38,7 \pm 9,4$  месяца) рецидивов не было.

Данные иммунологического обследования пациентов с типичным (подострым и хроническим) КПЛ до и после ЭФХТ представлены в табл. 1 и 2.

При подостром типичном КПЛ после ЭФХТ наблюдалось достоверное снижение уровня  $CD8^+$  (с существенным повышением иммунорегуляторного индекса), а отсутствие корреляционной зависимости между  $CD8^+$  и  $HLA-DR^+$  ( $r=0,52$ ,  $p>0,05$ ) и между  $CD8^+$  и  $CD11b^+$  ( $r=0,35$ ,  $p>0,05$ ) свидетельствовало о снижении аутоагрессии со стороны цитолитических Т-лимфоцитов (рис. 1, 2), а также устранении их способности к миграции через сосудистый эндотелий. Таким образом, на подострой стадии типичного распространенного КПЛ клинический эффект ЭФХТ был обусловлен снижением аутоиммунной агрессии со стороны аутореактивного клона цитолитических Т-лимфоцитов – уменьшением их количества, активационного потенциала и возможности для миграции через сосудистый эндотелий к клеткам-мишеням (кератиноцитам).

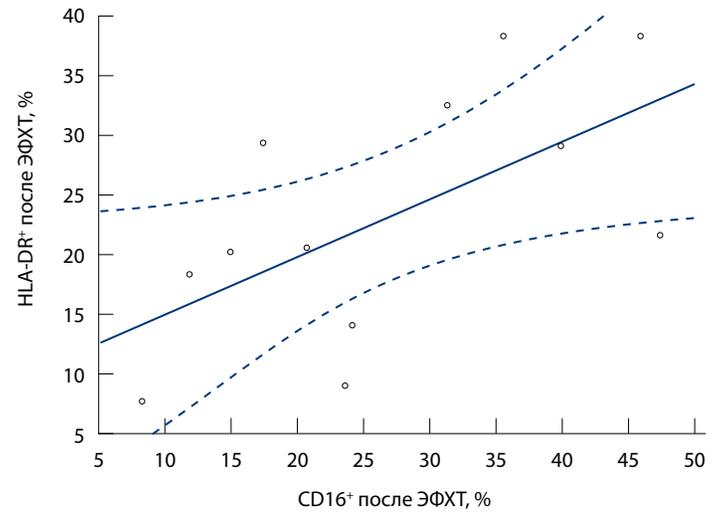
При хроническом типичном КПЛ после ЭФХТ сохранялась корреляция между  $CD16^+$  и молекулой адгезии  $CD11b^+$  ( $r=0,77$ ,  $p<0,05$ ) (рис. 3), что свидетельствовало о сохранении возможности перехода через сосудистый эндотелий естественных киллерных клеток, необходимых для осуществления контроля за кумулятивными процессами кератиноцитов. Уменьшение присутствия на  $CD16^+$  клетках молекул активации  $HLA-DR^+$  ( $r=0,62$ ,  $p>0,05$ ) (рис. 4) говорило об утрате их реактивности к соответствующим клеткам-мишеням (кератиноцитам). Следовательно, при хронической стадии типичного распространенного КПЛ клинический эффект ЭФХТ был обусловлен уменьшением количества и активности естественных киллерных клеток.

ЭФХТ – метод адоптивной иммунотерапии. Полученные данные указывают на ее высокую эффективность при типичном и атипичном КПЛ в отношении ближайших, а также отдаленных результатов. Применение ЭФХТ в комплексном лечении позволяет существенно повысить эффективность терапии типичного и атипичного КПЛ (в частности, в случаях, устойчивых к ранее проводившейся терапии, в том числе с применением системных кортикостероидов) при удовлетворительной переносимости метода. В настоящем исследовании подтверждаются данные зарубежных авторов как об эффективности ЭФХТ в лечении КПЛ, так и о высоком профиле безопасности этого метода [10–14]. Полученные



95% доверительный интервал

**Рис. 3.** Сохранение корреляции между CD16<sup>+</sup> и CD11b<sup>+</sup> у больных с хроническим типичным красным плоским лишаем после экстракорпоральной фотодинамической терапии (ЭФХТ)



95% доверительный интервал

**Рис. 4.** Отсутствие корреляционной зависимости CD16<sup>+</sup> от HLA-DR<sup>+</sup> у больных с хроническим типичным красным плоским лишаем после экстракорпоральной фотодинамической терапии (ЭФХТ)

нами клинико-иммунологические данные указывают также на патогенетическую направленность метода при подостром и хроническом типичном КПЛ. В соответствии с аутоиммунной теорией происхождения КПЛ, главная роль в его развитии отводится активации Th-1 иммунного ответа, приводящего к апоптозу базальных кератиноцитов [15]. В ранних элементах КПЛ антигенпрезентирующие клетки Лангерганса, количество которых на этом сроке повышено, взаимодействуют с Т-лимфоцитами за счет активации aberrантной продукции провоспалительных цитокинов (интерферона- $\gamma$ , фактора некроза опухоли- $\alpha$ , интерлейкинов 1 $\alpha$ , 6 и 8, белков FAS/Apo-1 и Bcl-2, хемокина CXCL10), при этом в начале болезни происходит повышение уровня Т-хелперов и иммунорегуляторного индекса, а в период ремиссии – их нормализация [16]. По данным, полученным нами ранее, в подострой стадии типичного КПЛ иммунные нарушения сопровождаются патологической агрессией со стороны аутореактивных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, способных мигрировать через сосудистый эндотелий к кератиноцитам, на что указывают достоверное повышение CD8<sup>+</sup> клеток и их высокая корреляционная связь с молекулами HLA-DR и интегринами молекулой адгезии CD11b<sup>+</sup>. В хронической стадии иммуновоспалительный процесс обусловлен преимущественно активированными CD16<sup>+</sup> клетками, имеющими возможность к трансэндотелиальной миграции, на что указывает увеличение

их количества, а также ассоциация с молекулами HLA-DR<sup>+</sup> и молекулами адгезии CD11b<sup>+</sup> [17].

В связи с особенностями иммунопатогенеза типичного КПЛ в подострой и хронической стадиях патогенетическая направленность ЭФХТ нами оценивалась в каждой из этих стадий. В подострой стадии КПЛ метод способствовал восстановлению естественных механизмов иммунного ответа, а в хронической после лечения отмечалось достоверное снижение ранее выявлявшейся повышенной активности эффекторов врожденного иммунитета, в частности происходило уменьшение количества и активности CD16<sup>+</sup> клеток. Полученные данные свидетельствуют о возможности проведения эффективной коррекции основных иммунных нарушений, лежащих в основе патогенеза подострого и хронического КПЛ [17, 18].

### Заключение

ЭФХТ представляется не только эффективным методом лечения типичного и атипичного КПЛ, но и патогенетически обоснованным методом лечения больных подострым и хроническим распространенным типичным КПЛ кожи и слизистой оболочки полости рта. Последующее изучение иммунологических изменений у пациентов с атипичными формами КПЛ позволит установить патогенетическую обоснованность метода в их терапии, а также глубже понять механизмы, сопровождающие столь ярко выраженные клинические эффекты. ©



## Литература

1. Караулов АВ, Быков СА, Быков АС. Иммунология, микробиология и иммунопатология кожи. М.: БИНОМ-Пресс; 2012. 328 с.
2. Молочков ВА, Молочков АВ, Переверзева ОЭ. К совершенствованию терапии красного плоского лишая. Российский журнал кожных и венерических болезней. 2011;(2):7–9.
3. Wackernagel A, Legat FJ, Hofer A, Quehenberger F, Kerl H, Wolf P. Psoralen plus UVA vs. UVB-311 nm for the treatment of lichen planus. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2007;23(1):15–9. doi: 10.1111/j.1600-0781.2007.00261.x.
4. McAleer MA, Murphy M, Bourke J. Retuximab therapy for resistant erosive lichen planus and pyoderma gangrenosum. *Br J Dermatol*. 2010;163(2):445.
5. Cheng A, Mann C. Oral erosive lichen planus treated with efalizumab. *Arch Dermatol*. 2006;142(6):680–2. doi: 10.1001/archderm.142.6.680.
6. Zaraa I, Mahfoudh A, Sellami MK, Chelly I, El Euch D, Zitouna M, Mokni M, Makni S, Ben Osman A. Lichen planus pemphigoides: four new cases and a review of the literature. *Int J Dermatol*. 2013;52(4):406–12. doi: 10.1111/j.1365-4632.2012.05693.x.
7. Schwarz T, Rutter A, Hawk J. Phototherapy and photochemotherapy: less common indications for its use. In: Krutmann J, Honigsmann H, Elmets CA, editors. *Dermatological phototherapy and photodiagnostic methods*. 2<sup>nd</sup> edition. Springer; 2009. p. 205–27.
8. Молочков ВА, Кильдюшевский АВ, Молочков АВ, ред. Фотоферез в дерматовенерологии. М.: БИНОМ; 2014. 152 с.
9. Kerdel FA, Romanelli P, Trent J. *Dermatologic Therapeutics. A pocket guide*. New York: McGraw-Hill; 2005. 420 p.
10. Guyot AD, Farhi D, Ingen-Housz-Oro S, Bussel A, Parquet N, Rabian C, Bachelez H, Francès C. Treatment of refractory erosive oral lichen planus with extracorporeal photochemotherapy: 12 cases. *Br J Dermatol*. 2007;156(3):553–6. doi: 10.1111/j.1365-2133.2006.07647.x.
11. Marchesseau-Merlin AS, Perea R, Kanold J, Demeocq F, Souteyrand P, D'Incan M. Photopheresis: an alternative therapeutic approach in corticoreistant erosive oral lichen planus. *Ann Dermatol Venereol*. 2008;135(3):209–12. doi: 10.1016/j.jannder.2007.06.010.
12. Kunte C, Erlenkeuser-Uebelhoer I, Michelsen S, Scheerer-Dhungel K, Plewig G. Treatment of therapy-resistant erosive oral lichen planus with extracorporeal photopheresis (ECP). *J Dtsch Dermatol Ges*. 2005;3(11):889–94. doi: 10.1111/j.1610-0387.2005.05759.x.
13. Knobler R, Berlin G, Calzavara-Pinton P, Greinix H, Jaksch P, Laroche L, Ludvigsson J, Quaglino P, Reinisch W, Scarisbrick J, Schwarz T, Wolf P, Arenberger P, Assaf C, Bagot M, Barr M, Bohbot A, Bruckner-Tuderman L, Dreno B, Enk A, French L, Gniadecki R, Gollnick H, Hertl M, Jantschitsch C, Jung A, Klemke CD, Lippert U, Luger T, Papadavid E, Pehamberger H, Ranki A, Stadler R, Sterry W, Wolf IH, Worm M, Zic J, Zouboulis CC, Hillen U. Guidelines on the use of extracorporeal photopheresis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014;28 Suppl 1:1–37. doi: 10.1111/jdv.12311.
14. Adamski J, Kinard T, Ipe T, Cooling L. Extracorporeal photopheresis for the treatment of autoimmune diseases. *Transfus Apher Sci*. 2015;52(2):171–82. doi: 10.1016/j.transci.2015.02.005.
15. Lehman JS, Tollefson MM, Gibson LE. Lichen planus. *Int J Dermatol*. 2009;48(7):682–94. doi: 10.1111/j.1365-4632.2009.04062.x.
16. Simon M Jr, Keller J. Subpopulations of T lymphocytes in peripheral blood and in skin lesions in lichen ruber planus. *Dermatologica*. 1984;169(3):112–6.
17. Караулов АВ, Кильдюшевский АВ, Молочкова ЮВ. Клинико-иммунологические аспекты патогенеза красного плоского лишая. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2014;(2):91–8.
18. Сергеев АЮ, Караулов АВ, Сергеев ЮВ. Иммунодерматология: иммунологические основы патогенеза главных воспалительных дерматозов человека. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2003;(3):10–23.
19. Караулов АВ, Быков СА, Быков АС. Иммунология, микробиология и иммунопатология кожи. М.: БИНОМ-Пресс; 2012. 328 с.
20. Молочков ВА, Молочков АВ, Переверзева ОЭ. К совершенствованию терапии красного плоского лишая. Российский журнал кожных и венерических болезней. 2011;(2):7–9.
21. Wackernagel A, Legat FJ, Hofer A, Quehenberger F, Kerl H, Wolf P. Psoralen plus UVA vs. UVB-311 nm for the treatment of lichen planus. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2007;23(1):15–9. doi: 10.1111/j.1600-0781.2007.00261.x.
22. McAleer MA, Murphy M, Bourke J. Retuximab therapy for resistant erosive lichen planus and pyoderma gangrenosum. *Br J Dermatol*. 2010;163(2):445.
23. Cheng A, Mann C. Oral erosive lichen planus treated with efalizumab. *Arch Dermatol*. 2006;142(6):680–2. doi: 10.1001/archderm.142.6.680.
24. Zaraa I, Mahfoudh A, Sellami MK, Chelly I, El Euch D, Zitouna M, Mokni M, Makni S, Ben Osman A. Lichen planus pemphigoides: four new cases and a review of the literature. *Int J Dermatol*. 2013;52(4):406–12. doi: 10.1111/j.1365-4632.2012.05693.x.
25. Schwarz T, Rutter A, Hawk J. Phototherapy and photochemotherapy: less common indications for its use. In: Krutmann J, Honigsmann H, Elmets CA, editors. *Dermatological phototherapy and photodiagnostic methods*. 2<sup>nd</sup> edition. Springer; 2009. p. 205–27.
26. Молочков ВА, Кильдюшевский АВ, Молочков АВ, ред. Фотоферез в дерматовенерологии [Phototherapy in dermatovenereology]. Moscow: BINOM; 2014. 152 p. (in Russian).
27. Kerdel FA, Romanelli P, Trent J. *Dermatologic Therapeutics. A pocket guide*. New York: McGraw-Hill; 2005. 420 p.
28. Guyot AD, Farhi D, Ingen-Housz-Oro S, Bussel A, Parquet N, Rabian C, Bachelez H, Francès C. Treatment of refractory erosive oral lichen planus with extracorporeal photochemotherapy: 12 cases. *Br J Dermatol*. 2007;156(3):553–6. doi: 10.1111/j.1365-2133.2006.07647.x.
29. Marchesseau-Merlin AS, Perea R, Kanold J, Demeocq F, Souteyrand P, D'Incan M. Photopheresis: an alternative therapeutic approach in corticoreistant erosive oral lichen planus. *Ann Dermatol Venereol*. 2008;135(3):209–12. doi: 10.1016/j.jannder.2007.06.010.
30. Kunte C, Erlenkeuser-Uebelhoer I, Michelsen S, Scheerer-Dhungel K, Plewig G. Treatment of therapy-resistant erosive oral lichen planus with extracorporeal photopheresis (ECP). *J Dtsch Dermatol Ges*. 2005;3(11):889–94. doi: 10.1111/j.1610-0387.2005.05759.x.
31. Knobler R, Berlin G, Calzavara-Pinton P, Greinix H, Jaksch P, Laroche L, Ludvigsson J, Quaglino P, Reinisch W, Scarisbrick J, Schwarz T, Wolf P, Arenberger P, Assaf C, Bagot M, Barr M, Bohbot A, Bruckner-Tuderman L, Dreno B, Enk A, French L, Gniadecki R, Gollnick H, Hertl M, Jantschitsch C, Jung A, Klemke CD, Lippert U, Luger T, Papadavid E, Pehamberger H, Ranki A, Stadler R, Sterry W, Wolf IH, Worm M, Zic J, Zouboulis CC, Hillen U. Guidelines on the use of extracorporeal photopheresis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014;28 Suppl 1:1–37. doi: 10.1111/jdv.12311.
32. Adamski J, Kinard T, Ipe T, Cooling L. Extracorporeal photopheresis for the treatment of autoimmune diseases. *Transfus Apher Sci*. 2015;52(2):171–82. doi: 10.1016/j.transci.2015.02.005.
33. Lehman JS, Tollefson MM, Gibson LE. Lichen planus. *Int J Dermatol*. 2009;48(7):682–94. doi: 10.1111/j.1365-4632.2009.04062.x.
34. Simon M Jr, Keller J. Subpopulations of T lymphocytes in peripheral blood and in skin lesions in lichen ruber planus. *Dermatologica*. 1984;169(3):112–6.
35. Караулов АВ, Кильдюшевский АВ, Молочкова ЮВ. Клинико-иммунологические аспекты патогенеза красного плоского лишая. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2014;(2):91–8.
36. Сергеев АЮ, Караулов АВ, Сергеев ЮВ. Иммунодерматология: иммунологические основы патогенеза главных воспалительных дерматозов человека. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2003;(3):10–23.

## References

1. Karaulov AV, Bykov SA, Bykov AS. *Immunologiya, mikrobiologiya i immunopatologiya kozhi* [Immunology, microbiology and immunopathology of skin]. Moscow: BINOM-Press; 2012. 328 p. (in Russian).
2. Molochkov VA, Molochkov AV, Pereverzeva OE. K sovershenstvovaniyu terapii krasnogo ploskogo lishaya [To a problem of improvement of lichen planus therapy]. *Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney* [Russian Journal of Skin and Sexually Transmitted Diseases]. 2011;(2):7–9 (in Russian).
3. Wackernagel A, Legat FJ, Hofer A, Quehenberger F, Kerl H, Wolf P. Psoralen plus UVA vs. UVB-311 nm for the treatment of lichen planus. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2007;23(1):15–9. doi: 10.1111/j.1600-0781.2007.00261.x.
4. McAleer MA, Murphy M, Bourke J. Retuximab therapy for resistant erosive lichen planus and pyoderma gangrenosum. *Br J Dermatol*. 2010;163(2):445.
5. Cheng A, Mann C. Oral erosive lichen planus treated with efalizumab. *Arch Dermatol*. 2006;142(6):680–2. doi: 10.1001/archderm.142.6.680.
6. Zaraa I, Mahfoudh A, Sellami MK, Chelly I, El Euch D, Zitouna M, Mokni M, Makni S, Ben Osman A. Lichen planus pemphigoides: four new cases and a review of the literature. *Int J Dermatol*. 2013;52(4):406–12. doi: 10.1111/j.1365-4632.2012.05693.x.
7. Schwarz T, Rutter A, Hawk J. Phototherapy and photochemotherapy: less common indications for its use. In: Krutmann J, Honigsmann H, Elmets CA, editors. *Dermatological phototherapy and photodiagnostic methods*. 2<sup>nd</sup> edition. Springer; 2009. p. 205–27.
8. Molochkov VA, Kil'dyushevskiy AV, Molochkov AV, editors. *Fotoferez v dermatovenerologii* [Phototherapy in dermatovenereology]. Moscow: BINOM; 2014. 152 p. (in Russian).
9. Kerdel FA, Romanelli P, Trent J. *Dermatologic Therapeutics. A pocket guide*. New York: McGraw-Hill; 2005. 420 p.
10. Guyot AD, Farhi D, Ingen-Housz-Oro S, Bussel A, Parquet N, Rabian C, Bachelez H, Francès C. Treatment of refractory erosive oral lichen planus with extracorporeal photochemotherapy: 12 cases. *Br J Dermatol*. 2007;156(3):553–6. doi: 10.1111/j.1365-2133.2006.07647.x.
11. Marchesseau-Merlin AS, Perea R, Kanold J, Demeocq F, Souteyrand P, D'Incan M. Photopheresis: an alternative therapeutic approach in corticoreistant erosive oral lichen planus. *Ann Dermatol Venereol*. 2008;135(3):209–12. doi: 10.1016/j.jannder.2007.06.010.
12. Kunte C, Erlenkeuser-Uebelhoer I, Michelsen S, Scheerer-Dhungel K, Plewig G. Treatment of therapy-resistant erosive oral lichen planus with extracorporeal photopheresis (ECP). *J Dtsch Dermatol Ges*. 2005;3(11):889–94. doi: 10.1111/j.1610-0387.2005.05759.x.
13. Knobler R, Berlin G, Calzavara-Pinton P, Greinix H, Jaksch P, Laroche L, Ludvigsson J, Quaglino P, Reinisch W, Scarisbrick J, Schwarz T, Wolf P, Arenberger P, Assaf C, Bagot M, Barr M, Bohbot A, Bruckner-Tuderman L, Dreno B, Enk A, French L, Gniadecki R, Gollnick H, Hertl M, Jantschitsch C, Jung A, Klemke CD, Lippert U, Luger T, Papadavid E, Pehamberger H, Ranki A, Stadler R, Sterry W, Wolf IH, Worm M, Zic J, Zouboulis CC, Hillen U. Guidelines on the use of extracorporeal photopheresis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014;28 Suppl 1:1–37. doi: 10.1111/jdv.12311.
14. Adamski J, Kinard T, Ipe T, Cooling L. Extracorporeal photopheresis for the treatment of autoimmune diseases. *Transfus Apher Sci*. 2015;52(2):171–82. doi: 10.1016/j.transci.2015.02.005.
15. Lehman JS, Tollefson MM, Gibson LE. Lichen planus. *Int J Dermatol*. 2009;48(7):682–94. doi: 10.1111/j.1365-4632.2009.04062.x.
16. Simon M Jr, Keller J. Subpopulations of T lymphocytes in peripheral blood and in skin lesions in lichen ruber planus. *Dermatologica*. 1984;169(3):112–6.
17. Караулов АВ, Кильдюшевский АВ, Молочкова ЮВ. Клинико-иммунологические аспекты патогенеза красного плоского лишая. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2014;(2):91–8.
18. Сергеев АЮ, Караулов АВ, Сергеев ЮВ. Иммунодерматология: иммунологические основы патогенеза главных воспалительных дерматозов человека. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2003;(3):10–23.



- Just U, Klemke CD, Lippert U, Luger T, Papadavid E, Pehamberger H, Ranki A, Stadler R, Sterry W, Wolf IH, Worm M, Zic J, Zouboulis CC, Hillen U. Guidelines on the use of extracorporeal photopheresis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014;28 Suppl 1:1–37. doi: 10.1111/jdv.12311.
14. Adamski J, Kinard T, Ipe T, Cooling L. Extracorporeal photopheresis for the treatment of autoimmune diseases. *Transfus Apher Sci.* 2015;52(2):171–82. doi: 10.1016/j.transci.2015.02.005.
15. Lehman JS, Tollefson MM, Gibson LE. Lichen planus. *Int J Dermatol.* 2009;48(7):682–94. doi: 10.1111/j.1365-4632.2009.04062.x.
16. Simon M Jr, Keller J. Subpopulations of T lymphocytes in peripheral blood and in skin lesions in lichen ruber planus. *Dermatologica.* 1984;169(3):112–6.
17. Karulov AV, Kil'dyushevskiy AV, Molochkova YuV. Kliniko-immunologicheskie aspekty patogeneza krasnogo ploskogo lishaya [Clinical and immunological aspects in pathogenesis of the lichen planus]. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya.* 2014;(2):91–8 (in Russian).
18. Sergeev AYu, Karulov AV, Sergeev YuV. Immunodermatologiya: immunologicheskie osnovy patogeneza glavnykh vospalitel'nykh dermatozov cheloveka [Immunodermatology: immunological basis for pathogenesis of major inflammatory skin diseases]. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya.* 2003;(3):10–23 (in Russian).

## Extracorporeal photochemotherapy in the treatment of typical and atypical lichen planus rubrum

Molochkov A.V.<sup>1</sup> • Kil'dyushevskiy A.V.<sup>1</sup> • Molochkova Yu.V.<sup>1</sup>

**Background:** Lichen planus rubrum (LPR) belongs to the group of papulosquamous dermatoses. Pathophysiology of this most common lichenic dermatosis is related to autoimmune destruction of basal keratinocytes. Treatment of LPR includes systemic corticosteroids, cytotoxic agents, immunosuppressants, aromatic retinoids, PUVA-therapy, as well as biological preparations (rituximab, efalizumab), which all are insufficiently effective and associated with multiple side effects and complications. **Aim:** To evaluate efficacy of extracorporeal photochemotherapy (EPCT) in generalized typical and atypical LPR. **Materials and methods:** We performed a prospective active-controlled cohort study. Thirty three patients with different types of LPR treated with EPCT were divided into 2 groups. Group 1 included 19 patients with typical generalized (including subacute and chronic) LPR, group 2, 14 patients with atypical (pigmented, follicular, hypertrophic, erosive ulcerated, vulvovaginal/gingival syndrome) LPR. At 2 hours before a EPCT session patients were administered 8-methoxypsoralen, then mononuclear cells were isolated with a cell separator Haemonetics MCS+ and treated with UV A radiation (at a wavelength from 320 to 400 nm), then monocyte mass was reinfused

to the patient. The treatment course consisted of 4 sessions performed every other day. **Results:** Positive clinical effect and satisfactory tolerability of EPCT were demonstrated in all 33 patients. In patients with generalized subacute typical LPR, EPCT promoted activation of natural immunosuppressive mechanisms (there was no correlation between CD8<sup>+</sup> and HLA-DR<sup>+</sup>, as well as between CD8<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup>:  $r=0.52$  ( $p>0.05$ ) and  $r=0.35$  ( $p>0.05$ ), respectively). In patients with generalized chronic LPR the treatment led to restoration of immune tolerance to genuine body antigens (correlation between CD16<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup> was preserved and correlation between CD16<sup>+</sup> and HLA-DR<sup>+</sup> was lower:  $r=0.77$  ( $p<0.05$ ) and  $r=0.62$  ( $p>0.05$ ), respectively). **Conclusion:** The data obtained confirms high clinical efficacy of EPCT and its pathophysiological effects at early and later stages of generalized typical LPR.

**Key words:** typical subacute lichen planus rubrum, typical chronic lichen planus rubrum, atypical lichen planus rubrum, extracorporeal photochemotherapy, immune abnormalities

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-213-220

**Molochkov Anton V.** – MD, PhD, Professor, Deputy Director on Science and International Communications<sup>1</sup>

**Kil'dyushevskiy Aleksandr V.** – MD, PhD, Professor, Leading Research Fellow, Surgical Hemocorrection and Detoxication Department<sup>1</sup>

**Molochkova Yuliya V.** – MD, PhD, Senior Research Fellow, Dermatovenereology and Dermato-oncology Department<sup>1</sup>

✉ 61/2–1 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 681 43 63.  
E-mail: derma@monikiweb.ru

<sup>1</sup> Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation



# Сравнительная характеристика антибактериального действия препаратов серебра и наносеребра *in vitro*

Петрицкая Е.Н.<sup>1</sup> • Рогаткин Д.А.<sup>1</sup> • Русанова Е.В.<sup>1</sup>

**Петрицкая Елена Николаевна** – канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаборатория медико-физических исследований<sup>1</sup>

✉ 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2–8, Российская Федерация.  
Тел.: +7 (495) 681 89 84.

E-mail: medphys@monikiweb.ru

**Рогаткин Дмитрий Алексеевич** – д-р техн. наук, заведующий лабораторией медико-физических исследований<sup>1</sup>

**Русанова Елена Владимировна** – канд. мед. наук, заведующая лабораторией клинической микробиологии<sup>1</sup>

**Актуальность.** Проблема резистентности микроорганизмов ко многим классам антимикробных препаратов приобретает все более угрожающий характер. Это заставляет искать новые лекарственные формы для профилактики и лечения гнойно-воспалительных заболеваний. **Цель** – исследование антибактериального действия коллоидного раствора наночастиц серебра на грамотрицательную, грамположительную флору и грибы в сравнении с действием известных лекарственных форм на основе солей серебра и нитратов других металлов. **Материал и методы.** Для изучения влияния коллоидного раствора наночастиц серебра (концентрация наночастиц 50 и 100 мг/л, диаметр частиц  $15 \pm 5$  нм) на ростовые свойства микроорганизмов были использованы штаммы *Staphylococcus aureus* (№ 209P), *Escherichia coli* (№ 26941), *Klebsiella pneumoniae* (№ 43062), а также полученные из клинического материала штаммы *Candida albicans*. Объектами сравнительного действия были протеинат серебра,

нитрофураил и растворы замещения  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{Sn}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  в эквивалентных концентрациях 1% раствора  $\text{AgNO}_3$ . **Результаты.** После нанесения исследуемых растворов наночастиц серебра и растворов сравнения на засеянные чашки Петри с тест-культурами наблюдался газонный рост на месте нанесения наночастиц серебра (в обеих концентрациях) и отсутствие роста в местах нанесения растворов сравнения. **Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о том, что коллоидные растворы наночастиц серебра с концентрацией 50 и 100 мг/л не оказывают влияния на ростовые свойства изученных культур, тогда как растворы сравнения проявляют выраженный антибактериальный эффект.

**Ключевые слова:** антибактериальное действие, наночастицы серебра, коллоидные растворы, нитраты, нитрат-анионы, микроорганизмы

<sup>1</sup> ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-221-226

**В**о всем мире постоянно разрабатываются новые виды антимикробных препаратов, особенно для борьбы с гнойно-воспалительными заболеваниями [1]. Между тем резистентность микроорганизмов ко многим антимикробным препаратам приобретает все более угрожающий характер [2]. Это заставляет искать новые подходы к профилактике и лечению гнойно-воспалительных процессов. Так, сегодня широкое применение находят физические методы воздействия: фотодинамическая терапия, терапия оксидом азота, воздействие низкочастотным ультразвуком, потоком плазмы [3].

На пути поиска новых антибактериальных агентов постоянно поднимается вопрос об антибактериальной активности ионов

серебра и растворов на основе солей серебра [4–10]. Благодаря эффекту постепенного «почернения» серебра на открытом воздухе и/или в воде представления об обеззараживающих свойствах этого металла получили большое распространение еще в древнем мире [4, 5, 8]. Однако науке достоверно известно, что это явление – тривиальный результат соединения серебра с серой и образования сульфида серебра, а микроорганизмы и обеззараживание тут ни при чем.

Тем не менее со второй половины XIX века после открытия К. Креде мощного противомикробного эффекта у 1% раствора азотнокислого серебра ( $\text{AgNO}_3$ ) различные соли серебра стали использоваться как антимикробное средство [11]. Чуть позже появились рецепты первых коммерческих



лекарственных форм других коллоидных препаратов серебра – Колларгола и Протаргола, также диссоциирующих в растворе с образованием ионов серебра [12, 13]. До открытия А. Флемингом в 1928 г. пенициллина эти растворы солей серебра были практически единственными эффективными «антибиотиками» в медицине.

Согласно данным литературы, антимикробные свойства этих и других аналогичных препаратов серебра определяются биологической активностью ионов серебра, образующихся при диссоциации соединений серебра в воде [10, 12, 13]. Ионы серебра способны блокировать сульфгидрильные группы ферментных систем микроорганизмов, взаимодействуют с молекулами дезоксирибонуклеиновой кислоты, при реакции с белками образуют альбуминаты и т.д., что приводит к угнетению роста и размножения микроорганизмов [13]. Несмотря на то что в растворе такого препарата, как например Ляпис, кроме ионов серебра  $Ag^+$  содержатся еще и достаточно активные отрицательные ионы  $NO_3^-$  – окислители, их возможное действие на микроорганизмы обычно не рассматривается. В подавляющем большинстве публикаций обсуждается лишь антимикробное действие катионов  $Ag^+$  [9, 10].

В последнее время стремительное развитие нанотехнологий и наноматериалов вызвало острые дискуссии по поводу возможной токсичности и иного неблагоприятного биологического действия на организм человека и животных разного рода наночастиц [14]. Опубликованы данные о токсичности наночастиц двуокиси титана, углеродных нанотрубок, наночастиц оксида цинка и некоторых других металлов [15]. Имеются сведения и о достаточно сильной токсичности наночастиц серебра [16–19], но мы ранее не обнаруживали таковой вовсе [20] либо регистрировали слабо выраженный возрастной эффект [21].

Ряд авторов высказывает мнение, что по размеру наночастицы близки большинству биологических макромолекул [16], а по химической активности могут превосходить ионы вследствие большой удельной площади поверхности наночастиц в растворах [18]. В связи с этим можно ожидать, что наночастицы серебра могут оказывать более сильное антимикробное или бактериостатическое действие, чем обычные растворы ионов серебра, причем в дозах, не опасных для человека. Именно поэтому изучение антимикробной активности наночастиц серебра в сравнении с ионами серебра и известными антисептиками представляет определенный интерес. Задачей нашего исследования, с учетом изложенного, было

изучение возможного бактерицидного влияния коллоидных растворов наночастиц серебра на жизнедеятельность микроорганизмов в сравнении с рядом известных антисептиков, включая препараты на основе солей серебра.

## Материал и методы

Ранее было показано, что бактерицидность наночастиц серебра проявляется в основном в отношении только грамотрицательных микроорганизмов [16–18]. Мы расширили спектр изучаемых микроорганизмов. Из грамотрицательных бактерий были использованы контрольные штаммы *Escherichia coli* (*E. coli* ATCC № 26941), а также *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae* ATCC № 43062), обладающие капсулой как дополнительным фактором патогенности. Из грамположительных был выбран *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* № 209P) как микроорганизм с факторами патогенности выше, чем у других стафилококков. Из грибов использовали клинические штаммы *Candida albicans* (*C. albicans*, большой К., история болезни № 4612 12.031.11).

В качестве основного объекта для исследования служил коллоидный раствор наночастиц серебра «Серебряный щит» (производство ООО «Фрактал-М») с концентрацией наночастиц 50 и 100 мг/л и диаметром частиц порядка  $15 \pm 5$  нм. Определение формы и размера наночастиц серебра в коллоидном растворе проводили методами атомно-силовой микроскопии на предприятии-изготовителе. Следует отдельно подчеркнуть, что это фактически максимально возможные концентрации чистых наночастиц серебра в растворе на практике. Существует несколько технологий изготовления высокодисперсных растворов металлов (в частности Ag) в жидких средах. Традиционные методы основаны на химических реакциях соединений, содержащих металлы. Общей проблемой химических методов получения коллоидных растворов частиц наносеребра является их загрязнение продуктами реакции, что значительно сужает область их использования. Эта проблема может быть решена при помощи физических методов диспергирования: лазерной абляции массивного металла и электродуговой эрозии электродов, выполненных из соответствующих металлов. Но и в том, и в другом случае концентрация в 100 мг/л коллоидного раствора наночастиц является практически предельно достижимой. Можно получить раствор коллоидного серебра и более сильной концентрации, однако он будет уже седиментационно и агрегативно неустойчив на время проведения



эксперимента, так как частицы будут слипаться и выпадать в осадок. Неприемлем и такой метод, как использование при приготовлении раствора поверхностно активных веществ: они сами могут оказаться токсичными, что способно повлиять на результаты эксперимента на токсичность. Таким образом, выбранная нами концентрация в 100 мг/л представляется максимальной из возможных по порядку величин концентраций для подобного рода экспериментов.

Основное исследование с коллоидным раствором нанофазного серебра проводилось в двух сериях по три опыта в каждой. При проведении первой серии опытов использовали суспензии 5 ЕД по оптическому стандарту мутности, полученные из суточной агаровой культуры, эмульгированной в физиологическом растворе. Полученную суспензию равномерно засеивали по поверхности чашки Петри с кровяным агаром для культивирования *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* и со средой Сабуро для *C. albicans*. Далее засеянные чашки маркировали, разделяя на сектора с номерами. Один сектор оставался в чашке контрольным, другие сектора использовались в качестве экспериментальных. После этого чашки помещали в термостат на 24 часа при 37 °С.

При проведении второй серии опытов использовали суспензии 5 ЕД по оптическому стандарту мутности, полученные из суточной агаровой культуры, эмульгированной в растворе наночастиц серебра с концентрациями 50 и 100 мг/л. Затем суспензию высевали на агар сразу после получения, через 2 часа и через 24 часа инкубации при 37 °С. После этого чашки также помещали в термостат на 24 часа.

Объектами сравнения служили: 1% раствор протеината серебра (препарат Протаргол) и раствор нитрофураля 1:5000 (препарат Фурацилин). На засеянные чашки Петри с *S. aureus* и *E. coli*, разделенные на четыре сектора, капельно, в объеме 30 мкл наносился раствор нитрофураля – сектор № 1, коллоидный раствор 100 мкг/л наночастиц серебра – сектор № 2, раствор протеината серебра – сектор № 4. Контрольным оставался сектор № 3. Чашки помещались в термостат на 24 часа.

Для проверки специфичности действия ионов серебра и роли нитрат-анионов в растворах использовали растворы сравнения, содержащие нитраты других металлов в эквимольных концентрациях 1% раствору  $\text{AgNO}_3$ :  $\text{Sn}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Na}(\text{NO}_3)_2$ . Чашки Петри засеивали тест-культурами *S. aureus* и *E. coli* с исходной концентрацией 5 ЕД по оптическому стандарту мутности. Затем чашки разделяли на четыре

сектора. В каждый сектор капельно наносилось по 30 мкл испытуемого раствора:  $\text{Sn}(\text{NO}_3)_2$  – сектор № 1,  $\text{Na}(\text{NO}_3)_2$  – сектор № 2,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  – сектор № 3,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$  – сектор № 4. Чашки помещались в термостат на 24 часа. Эксперимент проводился в трех повторях.

## Результаты

Коллоидные растворы наночастиц серебра

По окончании инкубации была проведена визуальная оценка результатов первой и второй серии опытов. На всех засеянных чашках первой серии опыта с нанесенным раствором наночастиц серебра в концентрации 50 мг/л отмечался равномерный газонный рост тест-культуры в контрольном секторе и на месте нанесения испытуемого раствора. Аналогичная картина наблюдалась при нанесении раствора с концентрацией 100 мг/л.

Во второй серии, где испытуемые культуры подвергались предварительному двухчасовому и суточному воздействию наночастиц серебра в концентрациях 50 и 100 мг/л, после 24 часов инкубации зарегистрирован равномерный рост тест-культур на всех чашках Петри (рис. 1). Таким образом, исследуемые коллоидные растворы наночастиц серебра с концентрациями 50 и 100 мг/л не оказали бактерицидного влияния на ростовые свойства изученных культур микроорганизмов в границах поставленного опыта.

Объекты сравнения

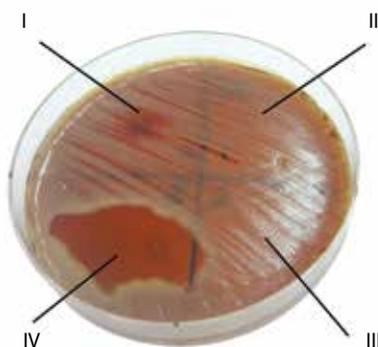
После окончания инкубации была проведена визуальная оценка результатов. На чашках Петри с культурами *S. aureus* и *E. coli* на фоне равномерного газонного роста тест-культур наблюдались зоны отсутствия роста, повторяющие капли нанесенного нитрофураля (сектор № 1) и раствора протеината серебра (сектор № 4). На секторах № 2 и № 3 отмечался сплошной рост тест-культур (рис. 2). Следовательно, в отличие от наночастиц серебра в концентрации 50 и 100 мг/л нитрофураля и протеината серебра характеризуются антибактериальным действием.

Растворы замещения

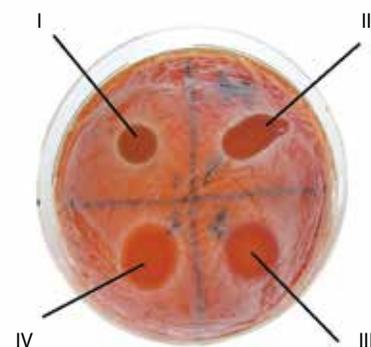
В результате 18-часовой инкубации чашек Петри с тест-культурами обнаружено, что в местах нанесения всех растворов –  $\text{Sn}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Na}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$  – и повторяя контуры их нанесения рост обеих бактериальных культур – *S. aureus*, *E. coli* – полностью отсутствовал (рис. 3), что свидетельствует о бактерицидной активности данных растворов в отношении исследуемых культур.



**Рис. 1.** Чашка Петри с нанесенной культурой *S. aureus* и коллоидными растворами наночастиц серебра. Сектор I – наночастицы серебра с концентрацией 50 мг/л, сектор II – наночастицы серебра с концентрацией 100 мг/л, сектор III – контроль



**Рис. 2.** Чашка Петри с нанесенной культурой *E. coli* и растворами сравнения. Сектор I – нитрофуран, сектор II – наночастицы серебра с концентрацией 100 мг/л, сектор III – контроль, сектор IV – протеинат серебра



**Рис. 3.** Чашка Петри с нанесенной культурой *S. aureus* и растворами замещения. Сектор I –  $\text{Sn}(\text{NO}_3)_2$ , сектор II –  $\text{Na}(\text{NO}_3)_2$ , сектор III –  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ , сектор IV –  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$

## Обсуждение

Отсутствие бактерицидного и бактериостатического действия коллоидных растворов наночастиц серебра вполне предсказуемо. Как упоминалось выше, бактерицидным (бактериостатическим) свойством обладают образуемые при растворении в воде солей серебра ионы серебра  $\text{Ag}^+$ . Только они взаимодействуют с сульфгидрильными группами ферментных систем микроорганизмов. Однако ни нанофазное серебро, ни цельный кусок серебра не дают ионов серебра в нужной концентрации в водном растворе. Серебро в электрохимическом ряду напряжений стоит намного правее водорода и не замещает его в большинстве реакций, то есть оно почти не растворимо в обычных условиях даже во многих кислотах (кроме азотной), тем более в воде. Растворимость цельного металлического серебра в воде ничтожно мала – много меньше  $10^{-13}$  г/л. Именно поэтому мы и не обнаружили искомого эффекта, несмотря на то что концентрация собственно нанофазного серебра в наших растворах была в диапазоне  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  М/мл. В отличие от нас в эксперименте, описанном N. Simonetti и соавт. [10], где использовались растворы с эквивалентной концентрацией ионов серебра, для *E. coli* (но не для *C. albicans* и *A. niger*) был получен явный бактерицидный эффект от действия  $\text{Ag}^+$ . Следовательно, можно сделать вывод, что коллоидные растворы наночастиц серебра в указанных концентрациях не являются антисептическими средствами, так как не дают ионов серебра в нужной концентрации.

По СанПиН 2.1.4.1074-01 «Вода питьевая» предельно допустимая концентрация серебра в питьевой воде в России составляет 50 мкг/л ( $5 \times 10^{-5}$  г/л). Для сравнения: в морской воде содержится около  $10^{-7}$  г/л серебра, это на два порядка ниже предельно допустимой концентрации. Чтобы из коллоидного раствора наночастиц серебра даже с предельной и очень токсичной концентрацией 100 мг/л получить концентрацию ионов в 100–150 мкг/л, подавляющую бактерии (граница бактерицидного эффекта согласно данным литературы), нужно, чтобы в воде растворился примерно 1% этого наносеребра. В случае наночастиц за счет увеличения поверхностной энергии можно ожидать увеличения растворимости, тем не менее все равно нельзя прогнозировать, что в воде растворится 1% благородного металла. В этой связи к появляющимся в последнее время многочисленным рекламным публикациям по антибактериальному действию чистого серебра, наночастиц серебра и/или различных «антибактериальных» покрытий на их основе надо относиться весьма осторожно.

Достаточно интересным оказался результат дополнительных экспериментов с растворами замещения. Тот факт, что аналогичное 1% раствору  $\text{AgNO}_3$  антибактериальное действие оказывают нитраты и других металлов в эквимольных концентрациях, свидетельствует о наличии неспецифического и синергетического действия на бактериальные клетки нитрат-анионов в совокупности с катионами разных металлов. Серебро – лишь один из частных случаев и отнюдь не ключевой антибактериальный агент. Здесь могут действовать



ионы других металлов, например натрия или цинка. В медицине широкое распространение получили антибактериальные препараты на основе ртути (ртути двухлористая), висмута (Ксероформ), свинца (свинцовая вода) и других «тяжелых» металлов. Логично предположить, что анионы и катионы в таких растворах действуют на микроорганизмы совместно, подавляя их рост и/или размножение за счет синергетического эффекта.

## Выводы

1. Коллоидный раствор чистого нанофазного серебра в концентрации до 100 мг/л не имеет антимикробного действия.

2. Эквимолярные 1% раствору  $\text{AgNO}_3$  концентрации ионов других металлов – натрия, цинка, кобальта и олова – в растворе совместно с анионами  $\text{NO}_3^-$  обладают выраженными антибактериальными свойствами, схожими со свойствами раствора  $\text{AgNO}_3$ .
3. Катионы серебра стандартных фармацевтических препаратов ингибируют рост бактерий не специфически, а в синергизме с анионами.
4. Чистое серебро в качестве антимикробного средства, включая нанофазное серебро, малоэффективно вследствие его недостаточной растворимости в воде. ☺

## Литература

1. Сидоренко СВ. Механизмы резистентности микроорганизмов. В: Страчунский ЛС, Белоусов ЮБ, Козлов СН, ред. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. М.: НИИАХ СГМА; 2002. с. 21–31.
2. Андреева ИВ, Стецюк ОУ, Козлов РС. Тигециклин: перспективы применения в клинической практике. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2010;12(2):127–45.
3. Пыхтеева ЕН, Ашуров ЗМ, Наседкин АН, Зенгер ВГ, Плаксина ГВ, Русанова ЕВ. Применение фотодинамической терапии при хроническом тонзиллите. Российская оториноларингология. 2007;(Прилож.):502–7.
4. Кульский ЛА. Серебряная вода. Киев: Наукова думка; 1982. 136 с.
5. Мосин ОВ. Физиологическое воздействие наночастиц серебра на организм человека. NanoWeek. 2008;(3):34–7.
6. Голубович ВН, Работнова ИЛ. Кинетика подавления роста *Candida Utilis* ионами серебра. Микробиология. 1974;43(6):1115–7.
7. Масленко АА. Влияние «серебряной воды» и воды, консервированной серебром, на органы пищеварения. Врачебное дело. 1976;(5):88–90.
8. Артемова А. Серебро исцеляет и омолаживает. М. – СПб.: ДИЛЯ; 2002. 142 с.
9. Pedahzur R, Lev O, Fattal B, Shuval HI. The interaction of silver ions and hydrogen peroxide in the inactivation of *E. coli*: a preliminary evaluation of a new long acting residual drinking water disinfectant. Wat Sci Tech. 1995;31(5–6):123–9.
10. Simonetti N, Simonetti G, Bougnol F, Scalzo M. Electrochemical  $\text{Ag}^+$  for preservative use. Appl Environ Microbiol. 1992;58(12):3834–6.
11. Волков ВА, Вонский ЕВ, Кузнецова ГИ. Выдающиеся химии мира. М.: Высшая школа; 1991. 656 с.
12. Белеванцев ВИ, Бондарчук ИВ. Очерк свойств серебра и его соединений. В: Применение препаратов серебра в медицине. Новосибирск: Институт неорганической химии СО РАН; 1994. с. 89–95.
13. Покровский ВИ, ред. Краткая медицинская энциклопедия. В 2 томах. М.: Медицинская энциклопедия, Крон-пресс; 1994. с. 303.
14. Абаева ЛФ, Шумский ВИ, Петрицкая ЕН, Рогаткин ДА, Любченко ПН. Наночастицы и нанотехнологии в медицине сегодня и завтра. Альманах клинической медицины. 2010;22:10–6.
15. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. Biointerphases. 2007;2(4):MR17–71.
16. Singh M, Singh S, Prasad S, Gambhir IS. Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures. 2008;3(3):115–22.
17. Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G, Ramachandrarao P, Dash D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. Nanotechnology. 2007;18(22):225103. doi: 10.1088/0957-4484/18/22/225103.
18. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, Yacaman MJ. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology. 2005;16(10):2346–53. doi: 10.1088/0957-4484/16/10/059.
19. Красочко ПА, Красочко ИА, Станкуть АЭ. Противовирусные свойства препарата на основе наночастиц серебра. Ветеринарна медицина. 2013;97:526–8.
20. Петрицкая ЕН, Абаева ЛФ, Рогаткин ДА, Литвинова КС, Бобров МА. К вопросу о токсичности наночастиц серебра при пероральном введении коллоидного раствора. Альманах клинической медицины. 2011;25:9–12.
21. Петрицкая ЕН, Абаева ЛФ, Рогаткин ДА. Некоторые аспекты токсичности наночастиц серебра в эксперименте со взрослыми мышами при пероральном приеме коллоидных растворов. Нанотехника. 2013;1(33):108–12.
1. Sidorenko SV. Mekhanizmy rezistentnosti mikroorganizmov [Mechanisms of microorganism resistance]. In: Strachunskiy LS, Belousov YuB, Kozlov SN, editors. Prakticheskoe rukovodstvo po antiinfektsionnoy khimioterapii [Practical guide on anti-infective chemotherapy]. Moscow: NIIAKh SGMA; 2002. p. 21–31 (in Russian).
2. Andreeva IV, Stetsyuk OU, Kozlov RS. Tigetsiklin: perspektivy primeneniya v klinicheskoy praktike [Clinical perspectives of tigeicycline]. Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya. 2010;12(2):127–45 (in Russian).
3. Pykhteeva EN, Ashurov ZM, Nasedkin AN, Zenger VG, Plaksina GV, Rusanova EV. Prime-
- nenie fotodinamicheskoy terapii pri khronicheskom tonzillite [The use of photodynamic therapy in chronic tonsillitis]. Rossiyskaya otorinolaringologiya. 2007;(Prilozh.):502–7 (in Russian).
4. Kul'skiy LA. Serebryanaya voda [Silver water]. Kiev: Naukova dumka; 1982. 136 p. (in Russian).



5. Mosin OV. Fiziologicheskoe vozdeystvie nanochastits serebra na organizm cheloveka [Physiological effects of silver nanoparticles on the human body]. NanoWeek. 2008;(3): 34–7 (in Russian).
6. Golubovich VN, Rabotnova IL. Kinetika podavleniya rosta *Candida Utilis* ionami serebra [The kinetics of *Candida Utilis* growth suppression by silver ions]. Mikrobiologiya. 1974;43(6):1115–7 (in Russian).
7. Maslenko AA. Vliyanie «serebryanoy vody» i vody, konservirovannoy serebrom, na organy pishchevareniya [The effects of “silver water” and silver-preserved water on digestive organs]. Vrachebnoe delo. 1976;(5):88–90 (in Russian).
8. Artemova A. Serebro istselyaet i omolazhivaet [Silver cures and makes younger]. Moscow – Saint Petersburg: DILYa; 2002. 142 p. (in Russian).
9. Pedahzur R, Lev O, Fattal B, Shuval HI. The interaction of silver ions and hydrogen peroxide in the inactivation of *E. coli*: a preliminary evaluation of a new long acting residual drinking water disinfectant. Wat Sci Tech. 1995;31(5–6):123–9.
10. Simonetti N, Simonetti G, Bougnol F, Scalzo M. Electrochemical Ag+ for preservative use. Appl Environ Microbiol. 1992;58(12):3834–6.
11. Volkov VA, Vonskiy EV, Kuznetsova GI. Vydayushchiesya khimiki mira [The famous chemists of the world]. Moscow: Vysshaya shkola; 1991. 656 p. (in Russian).
12. Belevantsev VI, Bondarchuk IV. Ocherk svoystv serebra i ego soedineniy [An essay on properties of silver and its compounds]. In: Primenenie preparatov serebra v meditsine [The use of silver preparations in medicine]. Novosibirsk: Institut neorganicheskoy khimii SO RAN; 1994. p. 89–95 (in Russian).
13. Pokrovskiy VI, editor. Kratkaya meditsinskaya entsiklopediya [The short medical encyclopedia]. In 2 vol. Moscow: Meditsinskaya entsiklopediya, Kron-press; 1994. p. 303 (in Russian).
14. Abaeva LF, Shumskiy VI, Petritskaya EN, Rogatkin DA, Lyubchenko PN. Nanochastitsy i nanotekhnologii v meditsine segodnya i zavtra [Nanoparticles and nanotechnologies today and beyond]. Al'manakh klinicheskoy meditsiny. 2010;22:10–6 (in Russian).
15. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. Bio-interphases. 2007;2(4):MR17–71.
16. Singh M, Singh S, Prasad S, Gambhir IS. Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures. 2008;3(3):115–22.
17. Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G, Ramachandrarao P, Dash D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. Nanotechnology. 2007;18(22):225103. doi: 10.1088/0957-4484/18/22/225103.
18. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, Yacaman MJ. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology. 2005;16(10):2346–53. doi: 10.1088/0957-4484/16/10/059.
19. Krasochko PA, Krasochko IA, Stankut' AE. Protivovirusnye svoystva preparata na osnove nanochastits serebra [Antiviral properties of an agent based on silver nanoparticles]. Veterinarna meditsina. 2013;97:526–8 (in Russian).
20. Petritskaya EN, Abaeva LF, Rogatkin DA, Litvinova KS, Bobrov MA. K voprosu o toksichnosti nanochastits serebra pri peroral'nom vvedenii kolloidnogo rastvora [On the problem of silver nanoparticles toxicity after oral administration of colloidal solution]. Al'manakh klinicheskoy meditsiny. 2011;25:9–12 (in Russian).
21. Petritskaya EN, Abaeva LF, Rogatkin DA. Nekotorye aspekty toksichnosti nanochastits serebra v eksperimente so vzroslymi myshami pri peroral'nom prieme kolloidnykh rastvorov [Some aspects of toxicity of silver nanoparticles in an experiment with adult mice after oral administration of colloid solutions]. Nanotekhnika. 2013;1(33):108–12 (in Russian).

## Comparative characteristics of antibacterial effect of silver and nanosilver *in vitro*

Petritskaya E.N.<sup>1</sup> • Rogatkin D.A.<sup>1</sup> • Rusanova E.V.<sup>1</sup>

**Rationale:** The problem of the resistance of microorganisms to many classes of antimicrobial agents becomes increasingly threatening. This promotes the search of new formulations for prevention and treatment of infectious inflammation. **Aim:** To evaluate antibacterial effects of silver nanoparticle colloid solutions on gram-negative, gram-positive and fungal microflora compared to already known formulations based on silver salts and nitrates of other metals. **Materials and methods:** The effects of silver nanoparticle colloid solutions (with concentration of nanoparticles of 50 and 100 mg/mL, particle diameter of  $15 \pm 5$  nm) on the microorganism growth were studied in *Staphylococcus aureus* (# 209P), *Escherichia coli* (# 26941), *Klebsiella pneumoniae* (# 43062) and clinical isolates of *Candida albicans*. For comparison, silver proteinate, nitrofurazone, and solutions of  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{Sn(NO}_3)_2$ ,  $\text{Co(NO}_3)_2$  and

$\text{Zn(NO}_3)_2$  at equimolar concentrations to  $\text{AgNO}_3$  1% were used. **Results:** After the plates with test cultures were treated with silver nanoparticle solutions and with comparator solutions, there was sheer culture growth in the areas of silver nanoparticle application (at both concentrations) and no growth in the areas of the comparator solutions application. **Conclusion:** The results obtained indicate that silver nanoparticle colloid solutions 50 and 100 mg/mL do not influence the growth of the studied cultures, whereas the comparator solutions exert an advanced antibacterial effect.

**Key words:** antibacterial action, silver nanoparticles, colloid solution, nitrates, nitrate anion, microorganism

**Petritskaya Elena N.** – PhD (in Biology), Leading Research Fellow, Laboratory of Medical and Physics Research<sup>1</sup>

✉ 61/2–8 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 681 89 84.

E-mail: medphys@monikiweb.ru

**Rogatkin Dmitriy A.** – PhD (in Engineering), Head of Laboratory of Medical and Physics Research<sup>1</sup>

**Rusanova Elena V.** – MD, PhD, Head of Laboratory of Clinical Microbiology<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation



# Люминесцентная диагностика опухолей с применением апконвертирующих наночастиц

Рочева В.В.<sup>1</sup> • Шолина Н.В.<sup>1,2</sup> • Деревяшкин С.П.<sup>1</sup> • Генералова А.Н.<sup>1,3</sup> • Нечаев А.В.<sup>1,4</sup> • Хоченков Д.А.<sup>1,2</sup> • Семчишен В.А.<sup>1</sup> • Хайдуков Е.В.<sup>1</sup> • Степанова Е.В.<sup>2</sup> • Панченко В.Я.<sup>1</sup>

**Актуальность.** Для повышения качества онкологических операций необходимо полностью удалить опухоль, включая метастазы, свести к минимуму повреждения здоровых тканей и сократить время операции. Современные методы детектирования, в основе которых лежит рентгеновская компьютерная томография, а также магнитно-резонансная томография, определяют опухоль, когда ее объем становится достаточно большим (содержит более 10 миллиардов клеток). В этой связи актуальной задачей представляется повышение чувствительности и разрешающей способности методов диагностики для обнаружения злокачественных новообразований на ранних этапах развития. **Цель** – продемонстрировать возможности применения нового класса антистоксовых люминесцентных наночастиц для глубокой высококонтрастной оптической визуализации злокачественных опухолей. **Материал и методы.** В работе использовались узкодисперсные апконвертирующие наночастицы размером 70–80 нм, имеющие структуру ядро/оболочка  $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Tm}^{3+}/\text{NaYF}_4$ .

Наночастицы обладают интенсивной полосой антистоксовой фотолюминесценции на длине волны 800 нм при возбуждении излучением на длине волны 975 нм (обе длины волны попадают в окно прозрачности биологической ткани). Коэффициент конверсии возбуждающего излучения в антистоксовую люминесценцию составлял 9%. Для увеличения времени циркуляции частиц в кровотоке малых животных наночастицы покрывались биосовместимой амфифильной полимерной оболочкой. В качестве опухолевой модели использовалась перевитая мышам эпидермоидная карцинома Льюиса. **Результаты.** Получены стабильные водные коллоиды наночастиц, покрытых амфифильным полимером, способные сохранять первичные размеры в течение как минимум месяца. Применение апконвертирующих наночастиц с гидрофильной оболочкой из чередующегося сополимера малеинового ангидрида и октадецена с последующим покрытием с помощью диглицидилового эфира полиэтиленгликоля позволило снизить неспецифическое взаимодействие наночастиц с белками плазмы

крови, что, в свою очередь, привело к увеличению времени их циркуляции в кровотоке малых животных до 1 часа. На модели карциномы легкого Льюиса, перевитой мышам, продемонстрирована прижизненная доставка апконвертирующих наночастиц в опухоль с высокой степенью локализации за счет пассивного EPR-эффекта. Контраст люминесцентного сигнала в опухоли по отношению к окружающим тканям составил не менее 70%. Продемонстрирована возможность визуализации апконвертирующих наночастиц в глубине биоткани до 15 мм. **Заключение.** Методы оптической визуализации с применением антистоксовых фотолюминесцентных маркеров обеспечивают высокий контраст обнаружения опухолевых тканей в режиме реального времени, что позволяет использовать их для интраоперационной диагностики.

**Ключевые слова:** апконвертирующие наночастицы, оптическая люминесцентная визуализация, интраоперационная оценка границ опухоли

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-227-233

**Рочева Василина Васильевна** – аспирант, мл. науч. сотр., лаборатория нелинейной оптики поверхности и лазерно-плазменных процессов, отделение перспективных лазерных технологий<sup>1</sup>

**Шолина Наталья Валериевна** – мл. науч. сотр., лаборатория нелинейной оптики поверхности и лазерно-плазменных процессов, отделение перспективных лазерных технологий<sup>1</sup>; мл. науч. сотр., лаборатория биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза, НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей<sup>2</sup>

**Деревяшкин Сергей Петрович** – лаборант-исследователь, лаборатория нелинейной оптики поверхности

и лазерно-плазменных процессов, отделение перспективных лазерных технологий<sup>1</sup>

**Генералова Алла Николаевна** – канд. хим. наук, ст. науч. сотр., лаборатория нелинейной оптики поверхности и лазерно-плазменных процессов, отделение перспективных лазерных технологий<sup>1</sup>; ст. науч. сотр., лаборатория полимеров для биологии<sup>3</sup>

**Нечаев Андрей Валерьевич** – канд. хим. наук, лаборатория нелинейной оптики поверхности и лазерно-плазменных процессов, отделение перспективных лазерных технологий<sup>1</sup>; доцент кафедры химии и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского<sup>4</sup>

**Хоченков Дмитрий Александрович** – канд. биол. наук, науч. сотр., лаборатория нелинейной оптики поверхности и лазерно-плазменных процессов, отделение перспективных лазерных технологий<sup>1</sup>; науч. сотр., лаборатория биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза, НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей<sup>2</sup>

**Семчишен Владимир Анатольевич** – канд. физ.-мат. наук, вед. науч. сотр., лаборатория нелинейной оптики поверхности и лазерно-плазменных процессов, отделение перспективных лазерных технологий<sup>1</sup>

**Хайдуков Евгений Валерьевич** – канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр., лаборатория нелинейной оптики

поверхности и лазерно-плазменных процессов, отделение перспективных лазерных технологий<sup>1</sup>

✉ 140700, Московская область, г. Шатура, ул. Святоозерская, 1, Российская Федерация.  
Тел.: +7 (495) 851 08 40.  
E-mail: khaydukov@mail.ru

**Степанова Евгения Владиславовна** – д-р мед. наук, вед. науч. сотр., лаборатория биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей<sup>2</sup>

**Панченко Владислав Яковлевич** – д-р физ.-мат. наук, академик РАН, профессор, директор<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт проблем лазерных и информационных технологий» РАН; 140700, Московская область, г. Шатура, ул. Святоозерская, 1, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН; 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Российская Федерация

<sup>4</sup> ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова»; 119571, г. Москва, проспект Вернадского, 86, Российская Федерация



**Р**анняя диагностика с последующим хирургическим удалением опухолевой ткани – один из наиболее эффективных методов лечения ряда онкологических заболеваний. Однако интраоперационная оценка границ хирургического вмешательства является субъективной, что может привести к неполной резекции опухоли и ее дальнейшему рецидивированию [1, 2]. В целях повышения качества операций необходимо полностью удалить опухоль, включая метастазы, свести к минимуму повреждения здоровых тканей и сократить время операции. Современные методы детектирования, в основе которых лежит рентгеновская компьютерная томография, а также магнитно-резонансная томография, определяют опухоль, когда ее объем становится достаточно большим (содержит более 10 миллиардов клеток). В этой связи актуальной задачей становится повышение чувствительности и разрешающей способности методов диагностики для обнаружения злокачественных новообразований на ранних этапах развития.

Апконвертирующие наночастицы (НАФ), обладающие уникальными оптическими свойствами, считаются перспективной платформой для создания опухолевых маркеров, обеспечивающих оптическую визуализацию тканей в режиме реального времени с высокой чувствительностью и контрастом, что позволяет использовать их для интраоперационной диагностики [3, 4, 5]. Наночастицы представляют собой неорганические кристаллы  $\text{NaYF}_4$ , легированные ионами эрбия и тулия ( $\text{Yb}^{3+}$  и  $\text{Tm}^{3+}$ ). Наночастицы нетоксичны, фотостабильны, а их поверхность позволяет создавать конъюгаты с нацеливающими модулями [6]. Длина волны возбуждения (975 нм) и пик фотолюминесценции НАФ (800 нм) находятся в ближней инфракрасной области спектра и попадают в окно прозрачности биоткани [7], а антистоксовый характер фотолюминесценции наночастиц позволяет спектрально подавить сигнал стоксовой автолюминесценции от хромофоров биоткани, что обеспечивает высокий контраст визуализации маркированных тканей [5].

Рост большинства злокачественных опухолей в значительной степени зависит от ангиогенеза – процесса образования новых опухолевых кровеносных сосудов из уже существующих. Кровеносная система опухолей имеет ряд особенностей, отличающих ее от нормальной сосудистой сети: гипертангуляция, патологическая нерегулярная архитектура сосудистой сети, избыточное производство опухолевыми клетками

проангиогенных факторов (VEGF, FGF2), а также нарушения лимфатического дренажа. Сосуды опухоли обладают «дефектным» эндотелием с широкими фенестрациями (до 4 мкм), не имеют развитого мышечного слоя, имеют относительно широкий просвет, а также недостаток рецепторов для ряда вазоактивных медиаторов (ангиотензин II) [8, 9]. Гиперэкспрессия ряда сосудистых медиаторов, таких как фактор роста эндотелия сосудов, брадикинин, простагландины, оксиды азота и матричные металлопротеиназы [10, 11], в значительной степени способствует повышенной проницаемости сосудов в тканях опухоли. Особенность сосудов опухоли, характеризующихся повышенной проницаемостью и возможностью удерживать введенные препараты и наночастицы, получила название EPR-эффекта (англ. enhanced permeability and retention) [12]. Наночастицы с размерами от 10 до 100 нм способны эффективно аккумулироваться в солидных опухолях благодаря аномальной структуре кровеносных сосудов и отсутствию эффективного лимфодренажа [13, 14]. Избирательное накопление наночастиц в опухолях представляется эффективным механизмом для маркирования и последующей диагностики опухолевых очагов.

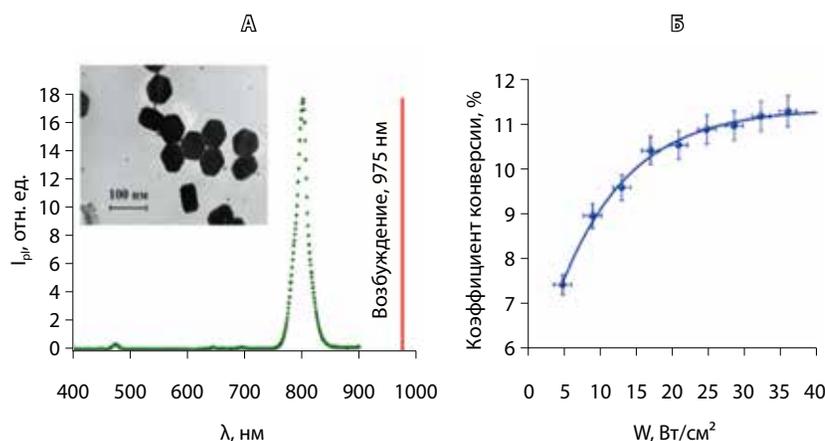
## Материал и методы

Синтез и оптические свойства апконвертирующих наночастиц

Наночастицы синтезированы по технологии, описанной нами ранее [15]. Были получены нанокристаллы со структурой ядро/оболочка. Ядро –  $\beta\text{-NaYF}_4$ , солегирированное  $\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Tm}^{3+}$  в молярном соотношении 18%:2% соответственно, кристаллическая оболочка состояла из нелегированного  $\text{NaYF}_4$ . Технология синтеза позволила получить узкодисперсные частицы размером  $75 \pm 5$  нм, обладающие коэффициентом конверсии (отношение излученной мощности к поглощенной) 9% при интенсивности возбуждающего излучения  $10 \text{ Вт/см}^2$ . На рис. 1 представлены характеристики синтезированных наночастиц.

Покрытие апконвертирующих наночастиц амфифильными полимерами

Синтез НАФ обычно проводится в среде органических растворителей, в результате формируются гидрофобные наночастицы, стабилизированные олеиновой кислотой [16]. В случае применения НАФ в качестве маркеров для оптической визуализации опухолей необходимо провести модификацию их поверхности с целью придания им гидрофильных свойств для сохранения коллоидных



**Рис. 1.** Характеристики синтезированных наночастиц: **А** – спектр фотолюминесценции наночастиц со структурой ядро/оболочка  $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}/\text{NaYF}_4$  при возбуждении на длине волны 975 нм, на вставке: ТЕМ фотография; **Б** – зависимость коэффициента конверсии наночастиц от интенсивности возбуждающего излучения

свойств в живом организме. Гидрофилизацию наночастиц проводили путем формирования полимерной оболочки на поверхности НАФ за счет проникновения гидрофобных фрагментов амфифильного полимера (чередующегося сополимера малеинового ангидрида и октадецена, ПМАО) в оболочку олеиновой кислоты без ее удаления с поверхности наночастиц. Полимерная оболочка формируется без непосредственного воздействия агрессивных агентов (растворителей, щелочи и т.д.) на нанокристаллы и выполняет защитную функцию, предохраняя НАФ от воздействия биологической среды. Методика модификации НАФ амфифильными полимерами приведена в опубликованной нами работе [6]. Для снижения неспецифической сорбции белков крови на

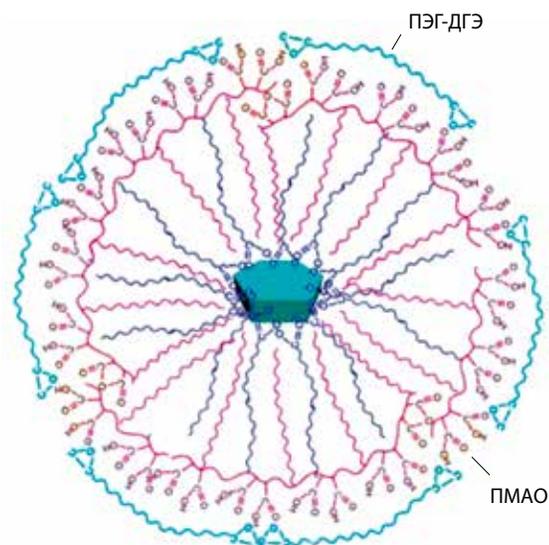
поверхности полимер-модифицированных апконвертирующих наночастиц был использован сшивающий агент диглицидиловый эфир полиэтиленгликоля (ПЭГ-ДГЭ), который позволил создать дополнительную внешнюю оболочку из цепей полиэтиленгликоля (рис. 2).

Оценка времени нахождения апконвертирующих наночастиц в кровотоке

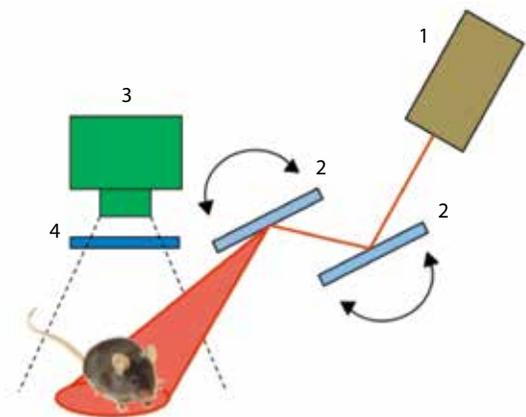
Для оценки времени нахождения наночастиц в кровотоке экспериментальных животных были использованы мыши линии Balb/c (массой 20–25 г). Внутривенно (в ретроорбитальный синус) вводилось 0,15 мл 0,2% раствора наночастиц в фосфатно-солевом буфере. После внутривенной инъекции НАФ в течение 180 минут контролировалось содержание наночастиц в крови. Образцы крови для контроля брались из хвостовой вены мыши. Капля свежей крови наносилась на предметное стекло, отступая 1–2 см от края; когда она равномерно растекалась, быстрым движением шлифованного стекла под углом 35–40° делался мазок, который затем накрывался предметным стеклом. Подготовленные таким образом препараты крови исследовались с помощью разработанного нами апконверсионного люминесцентного микроскопа. Чувствительность регистрации позволяла детектировать единичные маркеры. Количество наночастиц в единице объема образца крови подсчитывалось по полученным с апконверсионного люминесцентного микроскопа микрофотографиям. Для уменьшения ошибки анализ каждого образца проводился в четырех различных точках.

Опухолевая модель

Прижизненная визуализация опухоли с применением НАФ была продемонстрирована на модели карциномы Льюиса (LLC) из банка опухолевых штаммов ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Клетки LLC получали от ранее перевитых мышей, измельчая ткань опухоли в среде DMEM (Gibco). 0,2 мл клеточной суспензии, содержащей  $2 \times 10^6$  опухолевых клеток, прививали мышам линии BDF<sub>1</sub> (питомник «Столбовая»). Животные содержались при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. При достижении опухолью объема 200 мм<sup>3</sup> животным вводили 0,15 мл 0,2% раствора наночастиц в фосфатно-солевом буфере. Для визуализации с исследуемой области удаляли волосяной покров. Эпилюминесцентные изображения регистрировались в течение 180 минут после инъекции наночастиц. Отдельные изображения



**Рис. 2.** Схематическое изображение полимер-модифицированной апконвертирующей наночастицы; ПЭГ-ДГЭ – диглицидиловый эфир полиэтиленгликоля, ПМАО – чередующийся сополимер малеинового ангидрида и октадецена



**Рис. 3.** Принципиальная схема системы визуализации апконвертирующих наночастиц в малых животных: 1 – лазер, 2 – зеркала сканирующей системы, 3 – EMCCD камера, 4 – фильтр. Луч от непрерывного полупроводникового лазера  $\lambda=975$  нм сканирует исследуемый объект. Детектирование сигнала фотолюминесценции маркированной области осуществляется цифровой EMCCD камерой с использованием интерференционных фильтров для отсекающего возбуждающего излучения лазера

опухоли были получены *post mortem* через 2 часа после инъекции наночастиц.

Система визуализации апконвертирующих наночастиц в малых животных

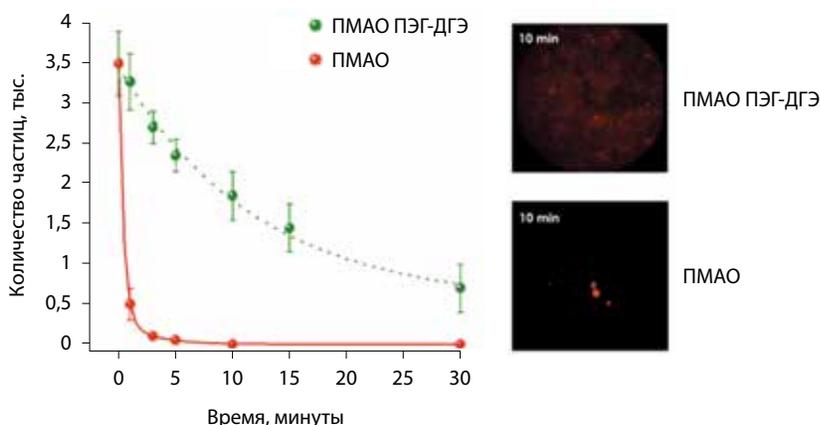
Система визуализации апконвертирующих наночастиц в малых животных (рис. 3) разработана в ИПЛИТ РАН и описана в работе [16]. Луч от непрерывного полупроводникового лазера на длине волны 975 нм сканируется согласно заданной программе по поверхности исследуемого объекта. Сканирование реализовано с применением сканирующей головки с зеркалами на гальванических драйверах Miniscan-07 фирмы Raylase (Германия). Система позволяет программно задавать область и траекторию сканирования. Плотность мощности в лазерном луче ограничивалась физиологически разрешенным уровнем и не превышала 1 Вт/см<sup>2</sup>. Экспериментально установлено, что данная плотность мощности лазерного излучения является приемлемой и не вызывает ожогов кожных покровов у малых животных. Детектирование сигнала фотолюминесценции маркированной НАФ области осуществлялось цифровой EMCCD камерой с электронным умножением Falcon фирмы Raptor (Ирландия), оснащенной объективом с числовой апертурой 0,95. Перед объективом устанавливались интерференционные светофильтры Semrock, отсекающие рассеянное излучение возбуждающего лазера.

## Результаты и обсуждение

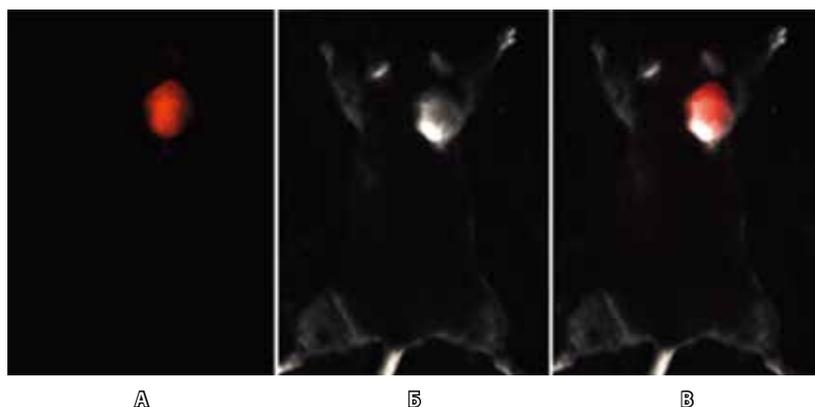
Получены стабильные водные коллоиды наночастиц, покрытых амфифильным полимером, способные сохранять первичные размеры в течение как минимум месяца. Измерения размеров наночастиц после реакции поверхностной модификации и по истечении месяца показали, что относительная фракция агрегатов остается

незначительной и не превышает 10%. На рис. 4 выборочно представлены микрофотографии образцов крови, полученные с помощью разработанного нами апконверсионного люминесцентного микроскопа, и экспериментальная зависимость, количественно описывающая изменение концентрации наночастиц в кровотоке, начиная с 1-й минуты после введения препаратов на основе НАФ с различным покрытием.

Согласно полученным данным, НАФ, не имеющие покрытия ПЭГ-ДГЭ, быстро удаляются из системы кровообращения (почти 15-кратные потери в первые 3 минуты). Наночастицы, как правило, удаляются из кровотока благодаря ретикуло-эндотелиальной системе – в основном клетками Купфера в печени, а также макрофагами селезенки и почек, что приводит к их накоплению в этих органах и, соответственно, снижению концентрации НАФ в крови [10]. Покрывая частицы ПЭГ-ДГЭ, мы снижаем их адсорбцию белками крови и фагоцитоз макрофагами, что продлевает их свободную циркуляцию [11]. Использование дополнительной оболочки из ПЭГ-ДГЭ позволило снизить неспецифическое взаимодействие наночастиц с белками крови и тем самым увеличить время их циркуляции в кровотоке малых животных до 1 часа. Увеличение времени циркуляции наночастиц в кровотоке способствует их накоплению в опухолях. НАФ с длительным временем пребывания в кровотоке пронизывают опухолевые сосуды и из-за отсутствия эффективного



**Рис. 4.** Зависимость изменения концентрации наночастиц от времени циркуляции наночастиц в кровотоке мыши начиная с 1-й минуты после введения препарата. Сплошная кривая – наночастицы с покрытием чередующимся сополимером малеинового ангидрида и октадецена (ПМАО), пунктирная кривая – наночастицы ПМАО с дополнительной оболочкой диглицидилового эфира полиэтиленгликоля (ПЭГ-ДГЭ). На вставке даны микрофотографии с апконверсионного люминесцентного микроскопа, демонстрирующие люминесценцию апконвертирующих наночастиц в образцах крови на 10-й минуте после введения. Исходная концентрация вводимых наночастиц одинакова. Размер наночастиц и их фотолюминесцентные свойства идентичны



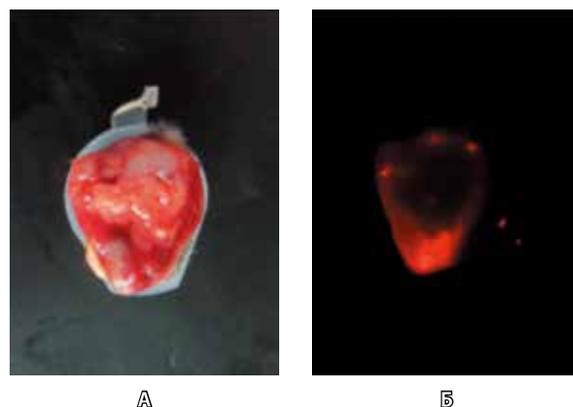
**Рис. 5.** Демонстрация эффективности маркирования опухоли апконвертирующими наночастицами. Изображения получены *in vivo* через 1 час после инъекции наночастиц. Эпилюминесцентный сигнал от апконвертирующих наночастиц (А), светлопольное изображение мыши (Б), наложение эпилюминесцентного сигнала со светлопольной фотографией (В). Эпилюминесцентный сигнал от фотолюминесцентных апконвертирующих наночастиц показан красным цветом

лимфодренажа задерживаются в патологической ткани. На рис. 5 даны изображения мыши, полученные с использованием системы оптической визуализации малых животных, демонстрирующие эффективную прижизненную доставку НАФ в опухоль.

На рис. 6 представлена фотография среза опухоли. Распределение интенсивности по сечению опухоли показывает, что наночастицы преимущественно накапливаются на границе опухоли в непосредственной близости от сосудов. Центральная область опухоли с очагами некроза остается слабо промаркированной наночастицами. Контраст люминесцентного сигнала в опухоли по отношению к окружающим тканям составляет не менее 70%.

## Заключение

В работе продемонстрирована возможность применения апконвертирующих наночастиц для диагностики злокачественных новообразований еще на стадии формирования сосудистой системы. Синтезированы апконвертирующие наночастицы с размером 70–80 нм, со структурой ядро/оболочка  $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Tm}^{3+}/\text{NaYF}_4$ . Наночастицы



**Рис. 6.** Фотография среза опухоли (А) и соответствующее люминесцентное изображение (Б). Показано, что накопление наночастиц идет на периферии опухоли, где более развита сосудистая система и меньше интерстициальное давление. Время выведения животного из эксперимента 180 минут

обладают интенсивной полосой фотолюминесценции на длине волны 800 нм при возбуждении излучением на длине волны 975 нм. Длина волны возбуждения и длина волны люминесценции попадают в окно прозрачности биоткани, что позволяет использовать наночастицы для оптической люминесцентной визуализации с глубины до 15 мм. Покрытие гидрофильной оболочкой ПМАО с последующим покрытием ПЭГ-ДГЭ позволило получить биосовместимые наноконструкции с низким неспецифическим взаимодействием частиц и белков плазмы крови. Длительное время нахождения наночастиц в кровотоке имеет решающее значение при пассивной доставке наночастиц в опухоль. На модели эпидермоидной карциномы легкого Льюиса, перевитой мышам, показана прижизненная доставка апконвертирующих наночастиц в опухоль за счет пассивного EPR-эффекта. Исследования, направленные на получение флуоресцентных изображений опухолей *in vivo* с использованием апконвертирующих наночастиц в качестве флуоресцентных меток, пока ограничиваются экспериментальными животными, однако очевидны перспективы их применения для диагностики опухолей человека. ©

## Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ 14-13-01421.

## Литература

1. Renton SC, Gazet JC, Ford HT, Corbishley C, Sutcliffe R. The importance of the resection margin in conservative surgery for breast cancer. *Eur J Surg Oncol.* 1996;22(1):17–22.
2. Schiller DE, Le LW, Cho BC, Youngson BJ, McCready DR. Factors associated with negative margins of lumpectomy specimen: potential use in selecting patients for intraoperative radiotherapy. *Ann Surg Oncol.* 2008;15(3):833–42.
3. Hadjipavlou AG, Kambin P, Lander PH, Crow WN, Simmons JW. Imaging guided minimally invasive surgery for low back pain sciatica and spinal infection. *Journal of Interventional Radiology.* 1999;14(1):1–22.
4. van Dam GM, Themelis G, Crane LM, Harlaar NJ, Pleijhuis RG, Kelder W, Sarantopoulos A, de Jong JS, Arts HJ, van der Zee AG, Bart J, Low PS, Ntzachristos V. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- $\alpha$  targeting: first in-human results. *Nat Med.* 2011;17(10):1315–9. doi: 10.1038/nm.2472.



- Nadort A, Sreenivasan VK, Song Z, Grebenik EA, Nechaev AV, Semchishen VA, Panchenko VY, Zvyagin AV. Quantitative imaging of single upconversion nanoparticles in biological tissue. *PLoS One*. 2013;8(5):e63292. doi: 10.1371/journal.pone.0063292.
- Grebenik EA, Nadort A, Generalova AN, Nechaev AV, Sreenivasan VK, Khaydukov EV, Semchishen VA, Popov AP, Sokolov VI, Akhmanov AS, Zubov VP, Klinov DV, Panchenko VY, Deyev SM, Zvyagin AV. Feasibility study of the optical imaging of a breast cancer lesion labeled with upconversion nanoparticle bio-complexes. *J Biomed Opt*. 2013;18(7):76004. doi: 10.1117/1.JBO.18.7.076004.
- Tromberg BJ, Shah N, Lanning R, Cerussi A, Espinoza J, Pham T, Svaasand L, Butler J. Non-invasive in vivo characterization of breast tumors using photon migration spectroscopy. *Neoplasia*. 2000;2(1–2):26–40. doi: 10.1038/sj.neo.7900082.
- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev*. 2001;53(2):283–318.
- Maeda H. Macromolecular therapeutics in cancer treatment: the EPR effect and beyond. *J Control Release*. 2012;164(2):138–44. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.04.038.
- Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res*. 1986;46(12 Pt 1):6387–92.
- Wu J, Akaike T, Maeda H. Modulation of enhanced vascular permeability in tumors by a bradykinin antagonist, a cyclooxygenase inhibitor, and a nitric oxide scavenger. *Cancer Res*. 1998;58(1):159–65.
- Cole AJ, David AE, Wang J, Galbán CJ, Yang VC. Magnetic brain tumor targeting and biodistribution of long-circulating PEG-modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 2011;32(26):6291–301. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.024.
- Noguchi Y, Wu J, Duncan R, Strohal J, Ulbrich K, Akaike T, Maeda H. Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. *Jpn J Cancer Res*. 1998;89(3):307–14.
- Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, Chen Q, Murakami M, Kimura M, Terada Y, Kano MR, Miyazono K, Uesaka M, Nishiyama N, Kataoka K. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat Nanotechnol*. 2011;6(12):815–23. doi: 10.1038/nnano.2011.166.
- Khaydukov EV, Semchishen VA, Seminogov VN, Sokolov VI, Popov AP, Bykov AV, Nechaev AV, Akhmanov AS, Panchenko VYa, Zvyagin AV. Enhanced spatial resolution in optical imaging of biotissues labelled with upconversion nanoparticles using a fibre-optic probe scanning technique. *Laser Phys Lett*. 2014;11(9):095602. dx.doi.org/10.1088/1612-2011/11/9/095602.
- Хайдуков ЕВ, Рочева ВВ, Семчишен ВА, Семиногов ВН, Соколов ВИ, Звягин АВ, Ахманов АС, Панченко ВЯ, Нечаев АВ, Генералова АН, Шехтер АБ. Оптическая визуализация опухолевых тканей с применением антистоксовых наночастиц. *Вестник Российского фонда фундаментальных исследований*. 2014;(4):7–17.

## References

- Renton SC, Gazet JC, Ford HT, Corbishley C, Sutcliffe R. The importance of the resection margin in conservative surgery for breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 1996;22(1):17–22.
- Schiller DE, Le LW, Cho BC, Youngson BJ, McCready DR. Factors associated with negative margins of lumpectomy specimen: potential use in selecting patients for intraoperative radiotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(3):833–42.
- Hadjipavlou AG, Kambin P, Lander PH, Crow WN, Simmons JW. Imaging guided minimally invasive surgery for low back pain sciatica and spinal infection. *Journal of Interventional Radiology*. 1999;14(1):1–22.
- van Dam GM, Themelis G, Crane LM, Harlaar NJ, Pleijhuis RG, Kelder W, Sarantopoulos A, de Jong JS, Arts HJ, van der Zee AG, Bart J, Low PS, Ntziachristos V. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- $\alpha$  targeting: first in-human results. *Nat Med*. 2011;17(10):1315–9. doi: 10.1038/nm.2472.
- Nadort A, Sreenivasan VK, Song Z, Grebenik EA, Nechaev AV, Semchishen VA, Panchenko VY, Zvyagin AV. Quantitative imaging of single upconversion nanoparticles in biological tissue. *PLoS One*. 2013;8(5):e63292. doi: 10.1371/journal.pone.0063292.
- Grebenik EA, Nadort A, Generalova AN, Nechaev AV, Sreenivasan VK, Khaydukov EV, Semchishen VA, Popov AP, Sokolov VI, Akhmanov AS, Zubov VP, Klinov DV, Panchenko VY, Deyev SM, Zvyagin AV. Feasibility study of the optical imaging of a breast cancer lesion labeled with upconversion nanoparticle bio-complexes. *J Biomed Opt*. 2013;18(7):76004. doi: 10.1117/1.JBO.18.7.076004.
- Tromberg BJ, Shah N, Lanning R, Cerussi A, Espinoza J, Pham T, Svaasand L, Butler J. Non-invasive in vivo characterization of breast tumors using photon migration spectroscopy. *Neoplasia*. 2000;2(1–2):26–40. doi: 10.1038/sj.neo.7900082.
- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev*. 2001;53(2):283–318.
- Maeda H. Macromolecular therapeutics in cancer treatment: the EPR effect and beyond. *J Control Release*. 2012;164(2):138–44. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.04.038.
- Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res*. 1986;46(12 Pt 1):6387–92.
- Wu J, Akaike T, Maeda H. Modulation of enhanced vascular permeability in tumors by a bradykinin antagonist, a cyclooxygenase inhibitor, and a nitric oxide scavenger. *Cancer Res*. 1998;58(1):159–65.
- Cole AJ, David AE, Wang J, Galbán CJ, Yang VC. Magnetic brain tumor targeting and biodistribution of long-circulating PEG-modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 2011;32(26):6291–301. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.024.
- Noguchi Y, Wu J, Duncan R, Strohal J, Ulbrich K, Akaike T, Maeda H. Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. *Jpn J Cancer Res*. 1998;89(3):307–14.
- Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, Chen Q, Murakami M, Kimura M, Terada Y, Kano MR, Miyazono K, Uesaka M, Nishiyama N, Kataoka K. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat Nanotechnol*. 2011;6(12):815–23. doi: 10.1038/nnano.2011.166.
- Khaydukov EV, Semchishen VA, Seminogov VN, Sokolov VI, Popov AP, Bykov AV, Nechaev AV, Akhmanov AS, Panchenko VYa, Zvyagin AV. Enhanced spatial resolution in optical imaging of biotissues labelled with upconversion nanoparticles using a fibre-optic probe scanning technique. *Laser Phys Lett*. 2014;11(9):095602. dx.doi.org/10.1088/1612-2011/11/9/095602.
- Khaydukov EV, Rocheva VV, Semchishen VA, Seminogov VN, Sokolov VI, Zvyagin AV, Akhmanov AS, Panchenko VYa, Nechaev AV, Generalova AN, Shekhter AB. Opticheskaya vizualizatsiya opukholevykh tkaney s primeneniem antistoksovykh nanochastits [Applications of upconversion nanoparticles in optical bioimaging of the tumor tissue]. *Vestnik Rossiyskogo fonda fundamental'nykh issledovaniy [RFBR Journal]*. 2014;(4):7–17 (in Russian).



# Luminescence diagnostics of tumors with upconversion nanoparticles

Rocheva V.V.<sup>1</sup> • Sholina N.V.<sup>1,2</sup> • Derevyashkin S.P.<sup>1</sup> •  
Generalova A.N.<sup>1,3</sup> • Nechaev A.V.<sup>1,4</sup> • Khochenkov D.A.<sup>1,2</sup> •  
Semchishen V.A.<sup>1</sup> • Khaydukov E.V.<sup>1</sup> • Stepanova E.V.<sup>2</sup> •  
Panchenko V.Ya.<sup>1</sup>

**Background:** To improve quality of surgery in oncology, it is necessary to completely remove the tumor, including its metastases, to minimize injury to normal tissues and to reduce duration of an intervention. Modern methods of detection based on radiological computerized tomography and magnetic resonance imaging can identify a tumor after its volume has become big enough, i.e. it contains more than 10 billion cells. Therefore, an improvement of sensitivity and resolution ability of diagnostic tools to identify early stages of malignant neoplasms seems of utmost importance. **Aim:** To demonstrate the potential of a new class of anti-Stokes luminescence nanoparticles for deep optical imaging with high contrast of malignant tumors. **Materials and methods:** Upconversion nanoparticles with narrow dispersion and a size of 70 to 80 nm, with a core/shell structure of NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>:Tm<sup>3+</sup>/NaYF<sub>4</sub> were used in the study. The nanoparticles have an intensive band of anti-Stokes photoluminescence at a wavelength of 800 nm under irradiation with a wavelength of 975 nm (both wavelengths are within the transparency window for biological tissues). The conversion coefficient of the excitation radiation into the anti-Stokes luminescence was 9%. To increase the time during which nanoparticles can circulate in blood flow of small animals, the nanoparticles were covered by a biocompatible amphiphilic polymer shell. As a tumor model we used Lewis epidermoid carcinoma transfected

to mice. **Results:** We were able to obtain stable water colloids of nanoparticles covered with amphiphilic polymer that could preserve their initial size at least for one month. The use of upconversion nanoparticles with a hydrophilic shell made of intermittent maleic anhydride and octadecene co-polymer with subsequent coating with diglycidyl polyethylene glycol ether allowed for reduction of non-specific reaction of nanoparticles with plasma proteins. In its turn, it resulted in an increased time of their circulation in blood flow of small animals for up to 1 hour. With the Lewis lung carcinoma transfected to mice model we demonstrated an in-life transportation of upconversion nanoparticles into the tumor with a high degree of localization due to a passive EPR effect. The contrast of luminescent signal in the tumor compared to adjacent tissues was at least 70%. The possibility of visualization of upconverted nanoparticles up to 15 mm of biological tissue was shown. **Conclusion:** The optical imaging techniques with anti-Stokes photoluminescent markers ensure a high contrast real-time detection of tumor tissues that allows for their use for intra-operative diagnostics.

**Key words:** upconverted nanoparticles, optical luminescence imaging, intraoperative assessment of tumor borders

**Rocheva Vasilina V.** – PhD Student, Junior Research Fellow, Laboratory for Nonlinear Optics of Surface and Laser-Plasma Processes, Advanced Laser Technologies Division<sup>1</sup>

**Sholina Nataliya V.** – Junior Research Fellow, Laboratory for Nonlinear Optics of Surface and Laser-Plasma Processes, Advanced Laser Technologies Division<sup>1</sup>; Junior Research Fellow, Laboratory of Biomarkers and Mechanisms of Tumor Angiogenesis, Research Institute of Experimental Diagnostics and Tumor Therapy<sup>2</sup>

**Derevyashkin Sergey P.** – Research Laboratorian, Laboratory for Nonlinear Optics of Surface and Laser-Plasma Processes, Advanced Laser Technologies Division<sup>1</sup>

**Generalova Alla N.** – PhD (in Chemistry), Senior Research Fellow, Laboratory for Nonlinear Optics of Surface and Laser-Plasma Processes, Advanced Laser Technologies Division<sup>1</sup>; Senior Research Fellow, Polymers for Biology Laboratory<sup>3</sup>

**Nechaev Andrey V.** – PhD (in Chemistry), Laboratory for Nonlinear Optics of Surface and Laser-Plasma Processes, Advanced Laser Technologies Division<sup>1</sup>; Associate Professor, Chair of Chemistry and Technology of Synthetic Biologically Active Substances<sup>4</sup>

**Khochenkov Dmitriy A.** – PhD (in Biology), Research Fellow, Laboratory for Nonlinear Optics of Surface and Laser-Plasma Processes, Advanced Laser Technologies Division<sup>1</sup>; Research Fellow, Laboratory of Biomarkers and Mechanisms of Tumor Angiogenesis, Research Institute of Experimental Diagnostics and Tumor Therapy<sup>2</sup>

**Semchishen Vladimir A.** – PhD (in Physics and Mathematics), Leading Research Fellow, Laboratory for Nonlinear Optics of Surface and Laser-Plasma Processes, Advanced Laser Technologies Division<sup>1</sup>

**Khaydukov Evgeniy V.** – PhD (in Physics and Mathematics), Senior Research Fellow, Laboratory for Nonlinear Optics of Surface and Laser-Plasma Processes, Advanced Laser Technologies Division<sup>1</sup>  
✉ 1 Svyatoozerskaya ul., Shatura, Moskovskaya oblast', 140700, Russian Federation.  
Tel.: +7 (495) 851 08 40. E-mail: khaydukov@mail.ru

**Stepanova Evgeniya V.** – MD, PhD, Leading Research Fellow, Laboratory of Biomarkers and Mechanisms of Tumor Angiogenesis, Research Institute of Experimental Diagnostics and Tumor Therapy<sup>2</sup>

**Panchenko Vladislav Ya.** – PhD (in Physics and Mathematics), Academician of Russian Academy of Sciences, Professor, Director<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Laser and Information Technologies of the Russian Academy of Sciences;  
1 Svyatoozerskaya ul., Shatura, Moskovskaya oblast', 140700, Russian Federation

<sup>2</sup>N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center;  
24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russian Federation

<sup>3</sup>Shemyakin – Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences;  
16/10 Miklukho-Maklaya ul., Moscow, 117997, Russian Federation

<sup>4</sup>Lomonosov Moscow University of Fine Chemical Technology; 86 Prospekt Vernadskogo, Moscow, 119571, Russian Federation



# Наноструктура мембран эритроцитов при интоксикации крови. Исследование с помощью атомной силовой микроскопии

Сергунова В.А.<sup>1</sup> • Черняев А.П.<sup>2</sup> • Козлов А.П.<sup>3</sup> • Близнюк У.А.<sup>2</sup> • Борщевговская П.Ю.<sup>2</sup> • Козлова Е.К.<sup>1,2,3</sup> • Черныш А.М.<sup>1,3</sup>

## Сергунова Виктория

Александровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаборатория биофизики мембран клеток при критических состояниях<sup>1</sup>

✉ 107031, г. Москва, ул. Петровка, 25/2, Российская Федерация.  
Тел.: +7 (985) 724 18 27.  
E-mail: orbf@mail.ru

Черняев Александр Петрович – д-р физ.-мат. наук, профессор, заведующий кафедрой физики ускорителей и радиационной медицины физического факультета<sup>2</sup>

Козлов Александр Павлович – канд. физ.-мат. наук, доцент кафедры медицинской и биологической физики<sup>3</sup>

Близнюк Ульяна Александровна – канд. физ.-мат. наук, ст. преподаватель кафедры физики ускорителей и радиационной медицины физического факультета<sup>2</sup>

Борщевговская Полина Юрьевна – канд. физ.-мат. наук, преподаватель кафедры физики ускорителей и радиационной медицины физического факультета<sup>2</sup>

Козлова Елена Карловна – д-р физ.-мат. наук, вед. науч. сотр., лаборатория биофизики мембран клеток при критических состояниях<sup>1</sup>; профессор кафедры физики ускорителей и радиационной медицины физического факультета<sup>2</sup>; профессор кафедры медицинской и биологической физики<sup>3</sup>

Черныш Александр Михайлович – д-р биол. наук, заведующий лабораторией биофизики мембран клеток при критических состояниях<sup>1</sup>; профессор кафедры медицинской и биологической физики<sup>3</sup>

**Актуальность.** Действие токсинов на наноструктуру мембран клеток крови – одна из ключевых проблем биофизики и медицины. Главными показателями качества крови признаны морфология и структура мембран эритроцитов. В этой связи актуальной задачей представляется анализ дефектов мембран при действии токсинов. **Цель** – выявить характерные особенности наноструктуры мембран и установить закономерности ее изменения, возникающие при интоксикации геминном и при длительном хранении эритроцитарной взвеси. **Материал и методы.** Исследования проводили *in vitro* на цельной крови человека, в которую добавляли гемин, и на эритроцитарной взвеси с гемоконсервантом CPD, которую хранили при 4 °С в течение 30 суток. Наноструктуру мембран эритроцитов изучали с помощью атомной силовой микроскопии. **Результаты.** Характерные размеры пространственных периодов между «зернами» составили 120–200 нм. Количество «зерен» в области топологического дефекта варьировало от 4–5 до нескольких десятков. Такие домены возникали практически на всех клетках эритроцитарной взвеси, а также при воздействии гемина на кровь. При повышении интоксикации геминном и при увеличении срока хранения возрастало количество эхиноцитов, которые

впоследствии трансформировались в сфероэхиноциты. При воздействии геминном и при хранении эритроцитарной взвеси на 9–12-е сутки наблюдалось специфическое изменение наноструктуры мембран красных клеток крови. Образовывались структурные кластеры – домены, в которых проявлялась зернистая структура. **Заключение.** Экспериментально установлено, что гемин и окислительные процессы в крови оказывают специфическое воздействие на наноструктуру мембран эритроцитов, образуя домены на поверхности. Характерный размер зернистых структур в доменах составляет 100–200 нм, что совпадает с характерным размером спектринового матрикса. Данные результаты можно применять в фундаментальной и практической медицине, при проведении гемотрансфузии, при анализе действия токсина на организм человека. Биофизические механизмы образования доменов могут лечь в основу изучения взаимодействия токсинов с мембранами.

**Ключевые слова:** мембраны эритроцитов, наноструктура, домены с зернистой структурой, атомная силовая микроскопия, гемин, эритроцитарная взвесь

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-234-241

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей реаниматологии имени В.А. Неговского»; 107031, г. Москва, ул. Петровка, 25/2, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России; 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8/2, Российская Федерация



**В** физиологических условиях окислительные процессы сопровождаются образованием радикалов. Однако некоторые вещества (анилин и его производные), лекарства и яды (нитриты и нитраты, нафталин, окиси азота) способны окислять  $Fe^{2+}$  до  $Fe^{3+}$ , увеличивая количество производных гемоглобина.

Окисление гема может происходить также при выходе гемоглобина из клетки в кровеносное русло, острой кровопотере, хранении эритроцитарной взвеси. Окисленный гемоглобин не способен переносить кислород к тканям. Кроме того, производные гемоглобина могут нарушить структуру мембран эритроцитов. Так, гемин нарушает конформацию спектрина, белка band 4.1 и ослабляет связь между ними [1]. Изменения морфологии красных клеток крови и структуры их мембран могут быть вызваны окислительными процессами, развивающимися в объеме длительно сохраняемой эритроцитарной взвеси, и активацией свободнорадикальных процессов в самом эритроците [2, 3]. Поддержание стабильного состояния эритроцитов при длительном хранении эритроцитарной взвеси – одна из ключевых проблем трансфузиологии [4].

Переливание компонентов крови рассматривается как операция трансплантации ткани организма с возможным последующим развитием жизненно опасных реакций. Качество трансфузионных сред считается первостепенным в обеспечении эффективности трансфузий и профилактики подавляющего большинства тяжелых посттрансфузионных реакций [5]. Качество сохраняемой эритроцитарной взвеси во многом определяется формой эритроцитов и структурой их мембран [6, 7]. Нарушение этих параметров может приводить к снижению деформируемости эритроцитов, ослаблению или вовсе прекращению их газотранспортной функции, к ухудшению реологических свойств крови [8].

К эффективным методам изучения морфологии и структуры мембран клеток относят атомную силовую микроскопию [9]. Этот метод не требует предварительной фиксации объекта, а предел разрешения атомных силовых микроскопов составляет менее одного нанометра, что позволяет детально изучать структуру мембран клеток.

Цель работы – выявить характерные особенности наноструктуры мембран и установить закономерности ее изменения, возникающие при интоксикации гемом и при длительном хранении эритроцитарной взвеси.

## Материал и методы

Кровь и растворы

Забор крови производили у пяти доноров в микроветты с ЭДТА (Sarstedt AG and Co., Германия) при профилактических осмотрах. В соответствии с требованиями этического комитета ФГБНУ «НИИОР» было получено согласие всех доноров на проведение исследований.

Интоксикация крови гемом производилась *in vitro*. Для приготовления рабочего раствора использовали сухой гемин (Sigma, США). Сначала растворяли 200 мг NaOH в 10 мл дистиллированной воды. Затем 50 мг сухого гемина растворяли в 1 мл этого раствора и добавляли 5 мл дистиллированной воды. Рабочий раствор вводили в различных объемах в микроветты с кровью для получения различных концентраций гемина. Конечная концентрация гемина в крови составляла в наших опытах от 0,3 до 1,8 мМ. Время воздействия варьировало от 2 до 60 минут.

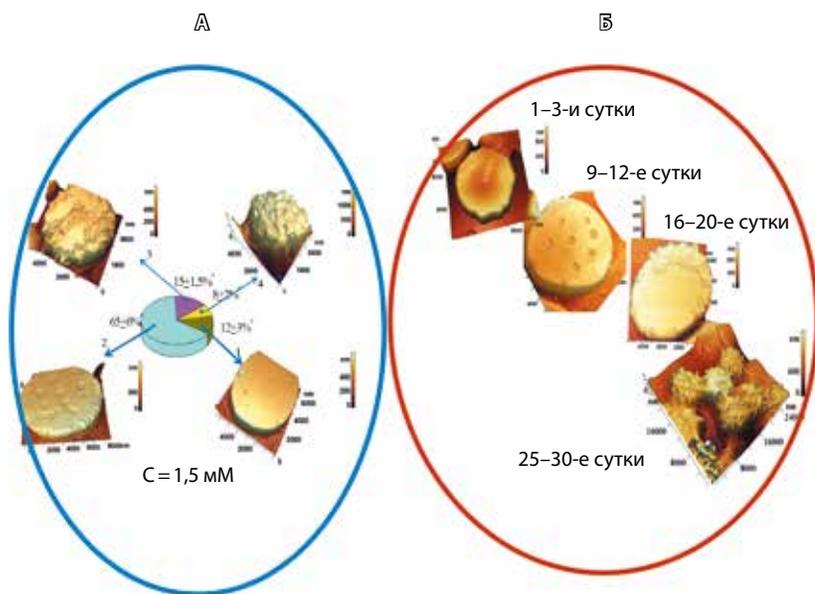
Эритроцитарная взвесь

Эритроцитарную взвесь, запечатанную в герметичные контейнеры (400 мл) с гемоконсервантом CPD, получали от двух независимых источников: Станция переливания крови Департамента здравоохранения г. Москвы – 4 контейнера с группами крови А(II), В(III), О(I), О(I) и учреждение службы крови МО РФ – 5 контейнеров с группами крови О(I), АВ (IV), А(II), А(II), В(III). На станциях кровь исследовали на возбудителей инфекционных заболеваний, центрифугировали, фильтровали в соответствии с существующими инструкциями. Гематокрит эритроцитарной взвеси составлял 50–55%.

Эритроцитарную взвесь хранили в течение 30 суток при температуре 4 °С в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения [10]. В день проведения опыта отбирали пробу 15 мл крови без нарушения герметичности контейнера и разбавляли физиологическим раствором до нормального гематокрита (34–40%). Пробы крови отбирали на 2-, 5-, 9-, 16-, 23- и 30-е сутки хранения. Измерения проводили при 20 °С.

Общий анализ крови проводили на гематологическом анализаторе “ADVIA 60” (Германия), биохимический анализ – на анализаторе “Miura One” (I.S.E. Group, Италия).

Анализ кислотно-основного состояния проводили с помощью ионометрического преобразователя «И-510» (Россия). Для измерения pH использовали электроды ЭС-10603 с электродом



**Рис. 1.** Статистическое распределение морфологии клеток: **А** – при воздействии на кровь гемина в концентрации  $C = 1,5 \text{ мМ}$ , \* $p < 0,05$  по сравнению с контрольным мазком; цифрами обозначены формы эритроцитов: 1 – планоцит, 2 – планоциты с зернистыми доменами, 3 – эхиноцит, 4 – сфероэхиноцит; **Б** – при интоксикации в результате хранения эритроцитарной взвеси: 1–3-и сутки – дискоцит, 9–12-е сутки – планоцит с зернистыми доменами, 16–20-е сутки – эхиноцит, 25–30-е сутки – сфероэхиноциты

сравнения ЭСр-10103. Концентрацию ионов калия измеряли калий-селективным электродом ХС-К-001.

Выход гемоглобина в раствор гемоконсерванта определяли спектрофотометрическим методом, используя спектрофотометр “Unico 2800” (США). Для этого 2 раза центрифугировали эритроцитарную взвесь (2500 об/мин, 5 минут), отбирали надосадочную жидкость, регистрировали оптическую плотность  $D$  на длине волн в диапазоне 500–760 нм. Исходя из соотношения  $D = \epsilon Cl$  ( $\epsilon$  – молярный показатель поглощения,  $C$  – концентрация гемоглобина,  $l$  – толщина слоя) и расчетных формул [7], вычисляли показатели выхода гемоглобина в раствор.

Получение изображений с помощью атомного силового микроскопа

Изображения клеток и их мембран получали с помощью атомного силового микроскопа “NTEGRA Prima” (NT-MDT, Россия) в полуконтактном режиме на монослоях, приготовленных с помощью прибора “V-Sampler, Vision Microscopy” (Австрия). Использовали кантилеверы NSG01 (force constant 5 N/m). Число точек сканирования составило 512, 1024, поля сканирования –  $100 \times 100 \text{ мкм}$ ,  $10 \times 10 \text{ мкм}$ ,  $3 \times 3 \text{ мкм}$ .

Анализировали изображения и их профили в плоском и 3D форматах. Подробно методика получения и анализа наноизображений мембран эритроцитов описана нами ранее [9]. Анализ форм клеток для каждого образца проводили по 5 сканам  $100 \times 100 \text{ мкм}$  ( $> 500$  клеток).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения “Origin” (Origin Lab Corporation, США). Получали статистические распределения по форме клеток, проводили интервальную оценку ошибок измерений. Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-Way ANOVA).

## Результаты

Ниже приведены результаты, описывающие нарушения наноструктуры мембран эритроцитов при действии гемина и возникающие при длительном хранении эритроцитарной взвеси.

Наноструктура мембран эритроцитов при действии гемина

### *Изменение морфологии при действии гемина на кровь*

При малых концентрациях гемина (0,5–1 мМ) в монослое преобладали стоматоциты и плоские клетки. Их форма близка к контрольным дискоцитам. При концентрациях гемина от 1,3 до 1,7 мМ в монослое наблюдались клетки с выраженными характерными структурами на их поверхности – доменами. При больших концентрациях гемина происходило зарождение эхиноцитов и образование мелких сфероэхиноцитов.

Данные получены для времени воздействия раствора гемина 20 минут. В опытах установлено, что в одном монослое не могут присутствовать клетки только одного вида. Так, даже в контрольном мазке 75% клеток представлены дискоцитами, а 25% – клетками с глубокой впадиной. При концентрации 0,3 мМ большинство (80%) клеток были с глубокой впадиной, 15% составляли стоматоциты, в 5% случаев появлялись плоские клетки. При концентрации 1,5 мМ плоских клеток становилось больше – 12%, основную долю (65%) составляли клетки с характерными доменами – наноструктуры в виде зерен, 15% клеток – зарождающиеся эхиноциты, 8% клеток – сфероэхиноциты (рис. 1А). С ростом концентрации гемина и времени его воздействия один вид клеток переходил в другой – происходила трансформация от дискоцитов до сфероэхиноцитов.

**Таблица 1.** Усредненные по всем образцам биохимические показатели эритроцитарной взвеси

Показатель	Сутки хранения				
	2-е	9-е	16-е	23-и	30-е
Лактат, мМ	8,7±0,5	16,0±2,9*	24,9±6,6*	27,3±8,4*	30,5±10*
Глюкоза, мМ	30,1±2,6	26,4±2,9	20,4±5	19,5±6,5*	16,7±6,6*
Выход гемоглобина в раствор (D×10), отн. ед.	0,14±0,04	0,17±0,06	0,23±0,06*	0,28±0,09*	0,39±0,12*
Калий, мМ	1,2±0,1	5,4±1,2*	9,3±1,3*	15,6±3,4*	19,1±3,7*
pH	7,06±0,02	6,95±0,08*	6,79±0,06*	6,70±0,08*	6,62±0,08*

\* p &lt; 0,05 – достоверное различие биохимических показателей в сравнении с первым днем хранения

**Нарушение наноструктуры мембран**

Установлено, что образование на поверхности мембран доменов с «зернами» внутри (рис. 2А) – пороговый эффект. При отклонении от концентрации на 20% появление таких наноструктур не наблюдалось.

Для более детального представления структур был проанализирован фрагмент с доменом. На рис. 2А показана клетка с доменом и фрагмент ее мембраны с регулярной наноструктурой в виде зерен, на рис. 2В – профиль участка с доменами.

Для профиля с доменами характерна периодичность в пространстве. Характерное расстояние на профиле составило  $140 \pm 60$  нм. Высота структур достигла  $12 \pm 4$  нм. При этом на остальной поверхности мембраны без доменов также наблюдались повторяющиеся структуры, типичные для контрольных клеток без воздействия гемина. Но их высота была намного меньше и равнялась  $1,7 \pm 0,7$  нм.

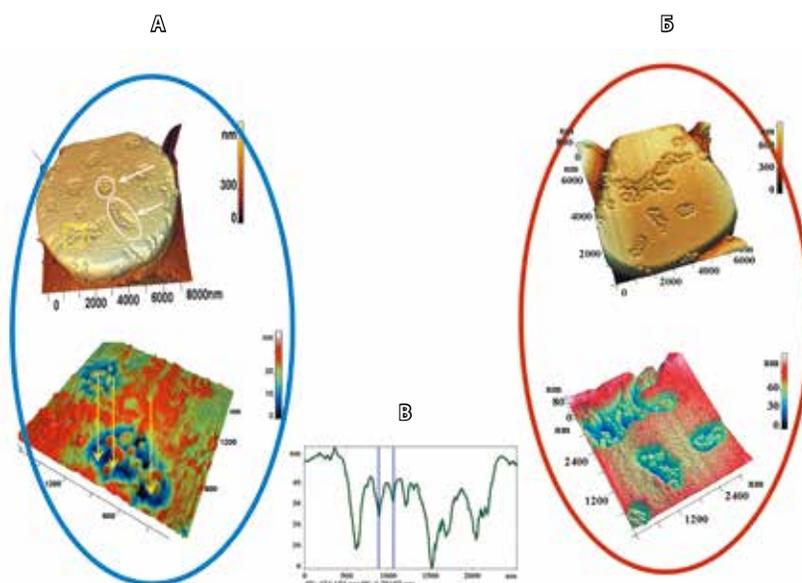
В зависимости от концентрации гемина в крови изменялось количество зерен в одном домене. При концентрации 1,3 мМ количество «зерен» в одном домене составляло  $3 \pm 1$ , при концентрации 1,5 мМ –  $10 \pm 6$ .

При малых концентрациях гемина число доменов на мембране составляло  $4 \pm 2$ . При концентрации 1,5 мМ этот показатель увеличивался до  $14 \pm 4$ . Размеры доменов были от 200 до 1500 нм, при больших размерах доменов происходило их слияние (рис. 3А).

Экспериментально установлено, что с ростом концентрации гемина происходило слияние доменов и «зерен» внутри них. Это в конечном счете приводило к образованию спикул и к формированию эхиноцитов и сфероэхиноцитов.

Наноструктура мембран эритроцитов по мере хранения эритроцитарной взвеси

По мере хранения эритроцитарной взвеси pH уменьшался. В норме pH плазмы находится в пределах от 7,35 до 7,45. В начале периода хранения pH эритроцитарной взвеси разных доноров был снижен по сравнению с нормальными показателями в плазме и был равен  $7,06 \pm 0,02$ . На 9-е сутки хранения pH составил  $6,95 \pm 0,08$ , на 30-е –  $6,62 \pm 0,08$ , что указывает на нарушения окислительно-восстановительных процессов [11].



**Рис. 2.** Зарождение доменов на мембране эритроцитов: **А** – при воздействии гемина на кровь (овалами выделены домены с характерной регулярной наноструктурой в виде зерен, стрелками – домены и зерна в них); **Б** – при хранении эритроцитарной взвеси на 9–12-е сутки; **В** – профиль структур в домене

**Таблица 2.** Трансформация форм эритроцитов в течение срока хранения

Содержание клеток разной формы, %	Сутки хранения					
	2-е	5-е	9-е	16-е	23-и	30-е
Дискоциты	43 ± 13	42 ± 12	36 ± 9	12 ± 2	6 ± 16	0
Овалоциты	27 ± 3	16 ± 2	12 ± 3	28 ± 7	15 ± 2	0
Планоциты	16 ± 2	25 ± 3	24 ± 4	13 ± 3	0	2 ± 1
Эхиноциты	14 ± 4	17 ± 2	28 ± 2	47 ± 11	32 ± 8	15 ± 4
Сфероэхиноциты	0		0	0	47 ± 12	83 ± 16

В процессе хранения эритроцитарной взвеси существенно изменялись концентрации лактата, глюкозы и показатели выхода гемоглобина. Остальные биохимические показатели находились в пределах нормы. В табл. 1 приведены биохимические показатели, которые изменялись на протяжении всего периода хранения.

Увеличение лактата в гемоконсерванте в 2 и более раз вызвано процессом гликолиза – расщеплением глюкозы. В результате содержание глюкозы уменьшилось к 30-м суткам в 1,5–2 раза в среднем по всем донорам по сравнению с первым днем хранения.

Важнейшим показателем нарушения структуры мембран эритроцитов является выход

гемоглобина в раствор гемоконсерванта. На 30-е сутки хранения этот показатель в среднем для всех доноров увеличился втрое по сравнению с первым днем хранения. Различия показателей для разных групп крови на 2-е сутки хранения недостоверны.

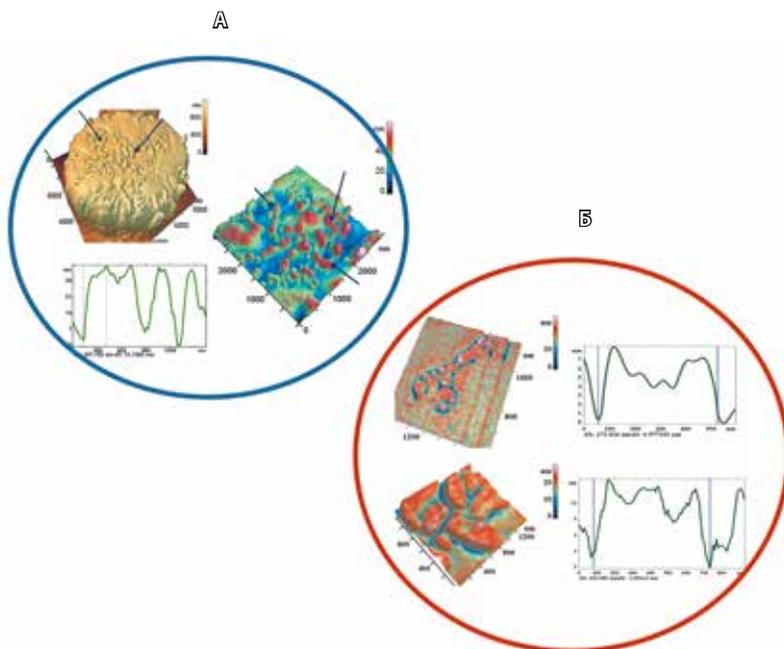
#### *Изменение морфологии эритроцитов при хранении эритроцитарной взвеси*

Одновременно с биохимическими показателями происходили изменения форм эритроцитов и структуры их мембран. В работе анализировали трансформацию дискоцитов в иные основные формы: планоциты, эхиноциты, сфероэхиноциты (рис. 1Б).

На всех полученных образцах наблюдался пойкилоцитоз. Разброс процентных соотношений тех или иных форм клеток для разных образцов и для разных доноров был значительным и составлял от 25 до 36%.

В табл. 2 дано процентное соотношение клеток разной формы на протяжении всего срока хранения эритроцитов. Количество анализируемых клеток для каждого суток хранения составляло не менее 1200. На 2-е сутки хранения в мазках эритроцитарной взвеси преобладали дискоциты – 43 ± 13%. Дискоциты имели диаметр 7,6–8,1 мкм и впадину 200–300 нм. Их поверхность практически не имела повреждений, а глубина шероховатости не превышала 4 нм. К 16-м суткам хранения их процентное соотношение падало до 12 ± 2%, а к 30-м суткам снижалось до 0.

Овалоциты – клетки вытянутой формы с максимальной длиной 13–13,5 мкм. Глубина впадины 350–400 нм. Форма овалоцитов в период хранения претерпевала трансформацию. Вначале это были эритроциты овальной и эллипсоидной формы. Такие формы могли


**Рис. 3.** Агрегация доменов: **А** – при воздействии на клетку гемина; **Б** – при хранении эритроцитарной взвеси



определяться механическим эффектом центрифугирования. На 16-е сутки хранения овалоциты деформировались и приобретали форму лимона с заостренными концами. Такие формы эритроцитов могли возникать в результате изменения окислительно-восстановительных процессов в эритроците [8] и полимеризации гемоглобина внутри клеток [12].

Средний диаметр эхиноцитов равнялся 7895–8645 нм. Глубина впадины – 294 нм. Количество эхиноцитов возрастало по мере хранения от  $14 \pm 4\%$  на 2-е сутки до  $47 \pm 11\%$  к 16-м суткам хранения. На 23-и сутки хранения общая конфигурация клеток претерпевала деструктивные изменения. После этого эхиноциты частично трансформировались в сфероэхиноциты. Их процентное соотношение уменьшалось до  $15 \pm 4\%$  к 30-м суткам хранения, а количество сфероэхиноцитов к этому времени достигало  $83 \pm 16\%$ .

Морфология эритроцитов не зависела от группы крови. Во всех группах крови независимо от того, на какой станции производился ее забор, наблюдались одинаковые тенденции трансформации морфологии и структуры мембран эритроцитов по мере их хранения.

#### Нарушения наноструктуры мембран

На 9–12-е сутки хранения эритроциты становились плоскими и на поверхности появлялись топологические дефекты в виде зернистой наноструктуры – домены (рис. 2Б). Характерные размеры пространственных периодов между «зернами» варьировали от 120 до 200 нм. Количество «зерен» в области топологического дефекта колебалось от 4–5 до нескольких десятков. Такие домены возникают практически на всех клетках эритроцитарной взвеси, а также при воздействии гемина на кровь [13]. Домены на поверхности мембран эритроцитов характерны и при воздействии гемина на кровь. К 20-м суткам происходила агрегация доменов (рис. 3Б), которые превращались в выросты. На поверхности мембраны эритроцита выросты достигали размера 2000–2500 нм и высоты до 600 нм.

#### Обсуждение

При добавлении в кровь гемина в опытах *in vitro* и при хранении эритроцитарной взвеси изменялась морфология клеток. При усилении интоксикации гемом и увеличении срока хранения возрастало количество эхиноцитов, которые впоследствии трансформировались в сфероэхиноциты. При воздействии гемом и при хранении

эритроцитарной взвеси на 9–12-е сутки наблюдалось специфическое изменение наноструктуры мембран красных клеток крови. Образовывались структурные кластеры – домены, в которых проявлялась зернистая структура.

Пространственный период наблюдаемых структур соизмерим с размером ячеек спектринового матрикса. Мембрана красных клеток крови состоит из бислоя липидов, мембранных белков и спектринового матрикса, размер ячейки которого варьирует от 80 до 200 нм [14–16]. Липидный бислой связан со спектриновым матриксом в определенных местах соединения с помощью белков band 3, band 4.1, анкирина, актина и др. Связь липидного бислоя и спектринового матрикса может нарушаться при окислительных процессах в крови, воздействии фармацевтических и химических препаратов, ионизирующего излучения [17]. В работах I. Solar и соавт. [3], А.М. Черныша и соавт. [18] показано, что гемин может разрушать спектрин, влиять на band 4.1, ослаблять связь «спектрин – band 4.1», снижать стабильность мембранного цитоскелета. Такие же изменения происходят и при длительном хранении эритроцитарной взвеси.

В опытах, представленных в данной статье, нам удалось без нарушения целостности клетки наглядно показать результат воздействия гемина и окислительных процессов при хранении эритроцитов на конформацию соединительного комплекса «спектрин – белки band 4.1, band 3», что проявилось в локальных нарушениях наноструктуры мембран эритроцитов. В опытах также установлено, что появление типичных кластеров на поверхности мембраны при воздействии гемина и на 9–12-е сутки хранения эритроцитарной взвеси стало пусковым механизмом изменения формы клетки – постепенно формировались эхиноциты, а затем и сфероэхиноциты. При этом происходило значительное уменьшение диаметра клетки и увеличение ее высоты. Так, если в контрольном мазке диаметр эритроцита составлял около 7,5 мкм, то у сфероэхиноцита он уменьшался до 5,5 мкм.

#### Заключение

В статье показаны нарушения наноструктуры мембран эритроцитов при интоксикации эритроцитов агентами различной природы. При этом характеристики этих нарушений были близки между собой. По-видимому, механизмы, вызывающие такие нарушения, определяются одними и теми же закономерностями. ©



## Литература

1. Girasole M, Pompeo G, Cricenti A, Longo G, Boumis G, Bellelli A, Amiconi S. The how, when, and why of the aging signals appearing on the human erythrocyte membrane: an atomic force microscopy study of surface roughness. *Nanomedicine*. 2010;6(6):760–8. doi: 10.1016/j.nano.2010.06.004.
2. Umbreit J. Methemoglobin – it's not just blue: a concise review. *Am J Hematol*. 2007;82(2):134–44. doi: 10.1002/ajh.20738.
3. Solar I, Muller-Eberhard U, Shviro Y, Shaklai N. Long-term intercalation of residual hemin in erythrocyte membranes distorts the cell. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1062(1):51–8.
4. Kozlova E, Chernysh A, Moroz V, Sergunova V, Gudkova O, Kuzovlev A. Nanodefects of membranes cause destruction of packed red blood cells during long-term storage. *Exp Cell Res*. 2015;337(2):192–201. doi: 10.1016/0005-2736(91)90334-5.
5. Костин АИ, Майорова ОА, Ложкин АВ, Почтарь МЕ, Демичева МИ, Кузмичев ВА, Луговская СА, Наумова ЕВ, Кисилкина ДГ, Андрейцева ЭВ, Долгов ВВ. К вопросу о контроле качества эритроцитсодержащих компонентов крови, обедненных лейкоцитами. *Трансфузиология*. 2011;12(2):12–33.
6. Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, Deitch EA, Machiedo GW. Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J Surg Res*. 2002;102(1):6–12. doi: 10.1006/jsre.2001.6306.
7. Moroz VV, Chernysh AM, Kozlova EK, Sergunova VA, Gudkova OE, Khoroshilov SE, Onufrievich AD, Kostin AI. Disorders in the Morphology and Nanostructure of Erythrocyte Membranes after Long-term Storage of Erythrocyte Suspension: Atomic Force Microscopy Study. *Bull Exp Biol Med*. 2015;159(3):406–10. doi: 10.1007/s10517-015-2975-9.
8. Ciccoli L, De Felice C, Paccagnini E, Leoncini S, Pecorelli A, Signorini C, Belmonte G, Valacchi G, Rossi M, Hayek J. Morphological changes and oxidative damage in Rett Syndrome erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(4):511–20. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.12.002.
9. Kozlova EK, Chernysh AM, Moroz VV, Kuzovlev AN. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron*. 2013;44:218–27. doi: 10.1016/j.micron.2012.06.012.
10. World Health Organization: Department of Blood Safety and Clinical Technology. The blood cold chain. Guide to the selection and procurement of equipment and accessories. Geneva: World Health Organization; 2002. 61 p.
11. Karon BS, van Buskirk CM, Jaben EA, Hoyer JD, Thomas DD. Temporal sequence of major biochemical events during blood bank storage of packed red blood cells. *Blood Transfus*. 2012;10(4):453–61. doi: 10.2450/2012.0099-11.
12. Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. *J Cell Mol Med*. 2007;11(1):148–55. doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00008.x.
13. Kozlova E, Chernysh A, Moroz V, Gudkova O, Sergunova V, Kuzovlev A. Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action. *Sci Rep*. 2014;4:6033. doi: 10.1038/srep06033.
14. Moroz VV, Kirsanova AK, Novodergkina IS, Alexandrin VV, Chernysh AM, Kozlova EK. Macro- and microstructure of erythrocyte membranes under acute massive hemorrhage and subsequent blood reinfusion. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*. 2010;14(4):248–55. doi: 10.1177/1089253210388518.
15. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*. 2008;112(10):3939–48. doi: 10.1182/blood-2008-07-161166.
16. Kodippili GC, Spector J, Sullivan C, Kuypers FA, Labotka R, Gallagher PG, Ritchie K, Low PS. Imaging of the diffusion of single band 3 molecules on normal and mutant erythrocytes. *Blood*. 2009;113(24):6237–45. doi: 10.1182/blood-2009-02-205450.
17. Козлова ЕК, Черняев АП, Алексеева ПЮ, Близняк УА, Черныш АМ, Назарова МА. Диагностика состояния биологических мембран после воздействия  $\gamma$ -излучения в малых дозах. *Радиационная биология, радиэкология*. 2005;45(6):653–6.
18. Chernysh AM, Kozlova EK, Moroz VV. Nanostructure of red blood cell membrane under critical state. Atomic force microscopy and calibrated electroporation. Proceedings of European Summit for Clinical Nanomedicine, 07–09 May 2012, Basel, Switzerland. Basel; 2012. p. 112–3.

## References

1. Girasole M, Pompeo G, Cricenti A, Longo G, Boumis G, Bellelli A, Amiconi S. The how, when, and why of the aging signals appearing on the human erythrocyte membrane: an atomic force microscopy study of surface roughness. *Nanomedicine*. 2010;6(6):760–8. doi: 10.1016/j.nano.2010.06.004.
2. Umbreit J. Methemoglobin – it's not just blue: a concise review. *Am J Hematol*. 2007;82(2):134–44. doi: 10.1002/ajh.20738.
3. Solar I, Muller-Eberhard U, Shviro Y, Shaklai N. Long-term intercalation of residual hemin in erythrocyte membranes distorts the cell. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1062(1):51–8.
4. Kozlova E, Chernysh A, Moroz V, Sergunova V, Gudkova O, Kuzovlev A. Nanodefects of membranes cause destruction of packed red blood cells during long-term storage. *Exp Cell Res*. 2015;337(2):192–201. doi: 10.1016/0005-2736(91)90334-5.
5. Kostin AI, Mayorova OA, Lozhkin AV, Pochtar' ME, Demicheva MI, Kuzmichev VA, Lugovskaya SA, Naumova EV, Ksilichina DG, Andreytseva EV, Dolgov VV. K voprosu o kontrole kachestva eritrotsitsozderzhashchikh komponentov krovi, obednennykh leykotsitami [Anent the quality control of leukodepleted blood components containing RBC]. *Transfuziologiya*. 2011;12(2):12–33 (in Russian).
6. Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, Deitch EA, Machiedo GW. Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J Surg Res*. 2002;102(1):6–12. doi: 10.1006/jsre.2001.6306.
7. Moroz VV, Chernysh AM, Kozlova EK, Sergunova VA, Gudkova OE, Khoroshilov SE, Onufrievich AD, Kostin AI. Disorders in the Morphology and Nanostructure of Erythrocyte Membranes after Long-term Storage of Erythrocyte Suspension: Atomic Force Microscopy Study. *Bull Exp Biol Med*. 2015;159(3):406–10. doi: 10.1007/s10517-015-2975-9.
8. Ciccoli L, De Felice C, Paccagnini E, Leoncini S, Pecorelli A, Signorini C, Belmonte G, Valacchi G, Rossi M, Hayek J. Morphological changes and oxidative damage in Rett Syndrome erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(4):511–20. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.12.002.
9. Kozlova EK, Chernysh AM, Moroz VV, Kuzovlev AN. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron*. 2013;44:218–27. doi: 10.1016/j.micron.2012.06.012.
10. World Health Organization: Department of Blood Safety and Clinical Technology. The blood cold chain. Guide to the selection and procurement of equipment and accessories. Geneva: World Health Organization; 2002. 61 p.
11. Karon BS, van Buskirk CM, Jaben EA, Hoyer JD, Thomas DD. Temporal sequence of major biochemical events during blood bank storage of packed red blood cells. *Blood Transfus*. 2012;10(4):453–61. doi: 10.2450/2012.0099-11.
12. Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Progressive oxidation of cytoskele-



- tal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. *J Cell Mol Med.* 2007;11(1):148–55. doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00008.x.
13. Kozlova E, Chernysh A, Moroz V, Gudkova O, Sergunova V, Kuzovlev A. Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action. *Sci Rep.* 2014;4:6033. doi: 10.1038/srep06033.
14. Moroz VV, Kirsanova AK, Novodergkina IS, Alexandrin VV, Chernysh AM, Kozlova EK. Macro- and microstructure of erythrocyte membranes under acute massive hemorrhage and

- subsequent blood reinfusion. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* 2010;14(4):248–55. doi: 10.1177/1089253210388518.
15. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood.* 2008;112(10):3939–48. doi: 10.1182/blood-2008-07-161166.
16. Kodippili GC, Spector J, Sullivan C, Kuypers FA, Labotka R, Gallagher PG, Ritchie K, Low PS. Imaging of the diffusion of single band 3 molecules on normal and mutant erythrocytes. *Blood.* 2009;113(24):6237–45. doi: 10.1182/blood-2009-02-205450.

17. Kozlova EK, Cherniaev AP, Alekseeva Plu, Bliznyuk UA, Chernysh AM, Nazarova MA. The diagnostic of membranes' state after exposure of gamma-radiation of small doses. *Radiats Biol Radioecol.* 2005;45(6):653–6.
18. Chernysh AM, Kozlova EK, Moroz VV. Nanostructure of red blood cell membrane under critical state. Atomic force microscopy and calibrated electroporation. *Proceedings of European Summit for Clinical Nanomedicine, 07–09 May 2012, Basel, Switzerland.* Basel; 2012. p. 112–3.

## The nanostructure of erythrocyte membranes under blood intoxication: an atomic force microscopy study

Sergunova V.A.<sup>1</sup> • Chernyaev A.P.<sup>2</sup> • Kozlov A.P.<sup>3</sup> • Bliznyuk U.A.<sup>2</sup> • Borshchegovskaya P.Yu.<sup>2</sup> • Kozlova E.K.<sup>1,2,3</sup> • Chernysh A.M.<sup>1,3</sup>

**Background:** The effects of toxins on nanostructure of blood cells are one of the key problems of biophysics and medicine. Erythrocyte morphology and membrane structure are recognized as the main parameters of blood quality. Therefore, analysis of membrane defects under toxin effects seems an urgent issue. **Aim:** To identify characteristic features and patterns of changes in membrane nanostructure under hemin intoxication and during extended storage of erythrocyte suspension. **Materials and methods:** The study was done *in vitro* in human whole blood with addition of hemin, and in erythrocyte suspension with a CPD blood preservative stored at 4 °C for 30 days. The nanostructure of erythrocyte membrane was assessed by atomic force microscopy. **Results:** Characteristic size of space periods between “granules” was from 120 to 200 nm. “Granule” numbers within a topological defect varied from 4 to 5 and to several dozens. Such domains arose virtually on all cells in erythrocyte suspension, as well as after hemin addition to the blood. An increase in hemin intoxication and an increase in a storage time were associated by increases in echinocyte numbers

that subsequently transformed into spherical echinocytes. Both under hemin and during the storage of erythrocyte suspension for 9 to 12 days, a specific abnormality in nanostructure of erythrocyte membrane was observed: structural clusters, i.e., domains with granular structure, were formed. **Conclusion:** The experiments showed that both hemin and oxidative processes in the blood can specifically affect the nanostructure of erythrocyte membranes with formation of domains on their surface. The specific size of granular structures in the domains is from 100 to 200 nm that coincides with a specific size of spectrin matrix. These results can be used in basic and applied medicine, in blood transfusion, for the analysis of a toxin effects in the human body. The biophysical mechanisms of domain formation can become a basis for the study on a toxin – membrane cross-talk.

**Key words:** erythrocyte membrane, nanostructure, granular structure domain, atomic force microscopy, hemin, erythrocyte suspension

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-234-241

**Sergunova Viktoriya A.** – PhD (in Biology), Senior Research Fellow, Laboratory of Biophysics of Cells Membranes in Critical States<sup>1</sup>

✉ 25/2 Petrovka ul., Moscow, 107031, Russian Federation. Tel.: +7 (985) 724 18 27. E-mail: orbf@mail.ru

**Chernyaev Aleksandr P.** – PhD (in Physics and Mathematics), Professor, Head of the Chair of Physics of Accelerators and Radiation Medicine, Faculty of Physics<sup>2</sup>

**Kozlov Aleksandr P.** – PhD (in Physics and Mathematics), Associate Professor, Chair of Medical and Biological Physics<sup>3</sup>

**Bliznyuk Ul'yana A.** – PhD (in Physics and Mathematics), Senior Lecturer, Chair of Physics of Accelerators and Radiation Medicine, Faculty of Physics<sup>2</sup>

**Borshchegovskaya Polina Yu.** – PhD (in Physics and Mathematics), Lecturer, Chair of Physics of Accelerators and Radiation Medicine, Faculty of Physics<sup>2</sup>

**Kozlova Elena K.** – PhD (in Physics and Mathematics), Leading Research Fellow, Laboratory of Biophysics of Cells Membranes in Critical States<sup>1</sup>; Professor, Chair of Physics of Accelerators and Radiation Medicine, Faculty of Physics<sup>2</sup>; Professor, Chair of Medical and Biological Physics<sup>3</sup>

**Chernysh Aleksandr M.** – PhD (in Biology), Head of Laboratory of Biophysics of Cells Membranes in Critical States<sup>1</sup>; Professor, Chair of Medical and Biological Physics<sup>3</sup>

<sup>1</sup>V.A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology; 25/2 Petrovka ul., Moscow, 107031, Russian Federation

<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie gory, Moscow, 119991, Russian Federation

<sup>3</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8/2 Trubetskaya ul., Moscow, 119991, Russian Federation



# Клиническая эффективность робот-ассистированной лапароскопической миомэктомии

Гудебская В.А.<sup>1</sup>

**Актуальность.** Одной из наиболее сложных и до конца не решенных задач клинической медицины представляется выбор оптимального органосохраняющего метода лечения миомы матки у женщин репродуктивного возраста. **Цель** – оценка клинической эффективности робот-ассистированной лапароскопической миомэктомии. **Материал и методы.** Поиск работ проводился в системе баз данных PubMed, Embase, Trip, Cochrane, DocMe по ключевым словам: «миома», «робот», «da Vinci», «роботизированная миомэктомия», «робот-ассистированная миомэктомия». **Результаты.** Найдено 25 статей, посвященных робот-ассистированной лапароскопической миомэктомии, в том числе в 6 публикациях представлены данные по репродуктивным исходам после проведенного лечения (уровни доказательности II–IV). Время оперативного вмешательства

с использованием роботхирургии составляло от 132 до 261 минуты, интраоперационная кровопотеря – от 50 до 387 мл, послеоперационный койко-день – от 1 до 3,9 дня. При проведении роботизированной миомэктомии отмечается меньший процент интра- и послеоперационных осложнений, чем при абдоминальном или классическом лапароскопическом доступе, а в сравнении с лапароскопией – меньший процент конверсионных лапаротомий. Частота наступления беременности после роботизированной миомэктомии составляет от 16,7 до 69%. В литературе описан единственный случай разрыва матки после робот-ассистированной лапароскопической миомэктомии. **Заключение.** Вследствие высокой стоимости метода проведено недостаточное количество исследований для определения роли роботизированных технологий в органосохраняющем лечении миомы

матки. Представленные результаты варьируют в широком диапазоне. Тем не менее они дают основания говорить о том, что робот-ассистированная лапароскопическая миомэктомия оправдывает себя у женщин репродуктивного возраста, планирующих беременность, с наличием интрамуральных узлов больших размеров с центрипетальным ростом и деформацией полости матки и является самостоятельным методом восстановления фертильности, а также может быть первым этапом перед применением вспомогательных репродуктивных технологий.

**Ключевые слова:** миома, робот, da Vinci, роботизированная миомэктомия, робот-ассистированная миомэктомия

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-242-248

Лечение миомы матки остается одной из наиболее сложных и до конца не решенных задач клинической медицины. Особенно остро эта проблема стоит у женщин с нереализованной репродуктивной функцией. Улучшение результатов хирургического лечения больных миомой матки представляется актуальной проблемой. В настоящее время проводятся многочисленные исследования, основанные на миниинвазивных доступах оперативного лечения. Однако пока не разработана идеальная методика с минимальными побочными действиями и максимальной эффективностью результатов операции. С одной стороны, миомэктомию следует выполнять максимально щадящим для пациентки доступом, с другой – не должно быть сомнений в качестве сформированного рубца на матке.

С 2004 г. в мировой практике появились сведения о роботической ассистенции при удалении миомы матки лапароскопическим доступом. В литературе широко обсуждается вопрос об эффективности и экономической целесообразности использования роботов в гинекологии, в частности при удалении миоматозных узлов. Тем не менее многие авторы эмпирически отмечают, что робот-ассистированная лапароскопическая миомэктомия способна стать альтернативой абдоминальному доступу по качеству зашивания рубца на матке и аналогична классическому лапароскопическому доступу по степени инвазивности методики.

Цель настоящего обзора – провести изучение клинической эффективности робот-ассистированной лапароскопической миомэктомии, основываясь на публикациях в базах данных PubMed, Embase, Trip, Cochrane, DocMe.



## Материал и методы

Поиск по базам данных PubMed, Embase, Trip и Cochrane проведен в сентябре 2015 г. с использованием терминов медицинских предметных рубрик (Medical Subject Headings – MeSH): «роботизированный», «роботизированное хирургическое вмешательство», «миомэктомия», «миома» (англ. “robotics”, “robotic surgical procedures”, “uterine myomectomy”, “myoma”), с добавлением свободного текстового поиска на английском, французском и русском языках: «робот-ассистированная миомэктомия» (англ. “robot-assisted myomectomy”), «робот» (“robot”), “da Vinci Si”. Аналогичный тематический поиск был проведен в отечественной базе данных DocMe. Учитывая, что метод робот-ассистированной лапароскопической миомэктомии используется в клинической практике сравнительно недавно, рассматривались исследования всех типов. Уровень доказательности оценивался в соответствии с системой, предложенной Оксфордским центром доказательной медицины (Oxford Centre for Evidence-Based Medicine) с ноября 2008 г.

## Результаты

Найдено 25 статей, посвященных робот-ассистированной лапароскопической миомэктомии [1–25]. Из них 20 представляют собой результаты исследований с уровнем доказательности II–IV, в которых изучали клиническую эффективность робот-ассистированной лапароскопической миомэктомии, в том числе в 15 – в сравнении с классической лапароскопией и абдоминальным доступом (таблица).

Первые выводы о перспективах робот-ассистированной миомэктомии были сделаны А.Р. Advincula в 2004 г. на основании анализа 35 операций. В 2007 г. этот же автор опубликовал ряд работ, посвященных подробному описанию техники лапароскопической миомэктомии с роботической ассистенцией, где показаны преимущества использования роботхирургии и ее недостатки, связанные в основном с высокой себестоимостью операции с участием робота [1, 2, 25]. В России первая миомэктомия с роботической ассистенцией с помощью роботизированной системы da Vinci Si была выполнена в 2009 г. (Е.Ф. Кира, А.К. Политова) (рис. 1, 2).

Большинство авторов отмечали, что робот-ассистированная лапароскопическая миомэктомия – более продолжительное оперативное вмешательство в сравнении с традиционным лапароскопическим и абдоминальным доступом [1–11, 13–24]. Только А. Göçmen и соавт. (2013)

**Гудебская Виктория**

**Александровна** – аспирант кафедры женских болезней и репродуктивного здоровья Института усовершенствования врачей<sup>1</sup>

✉ 141282, Московская область, г. Ивантеевка, ул. Толмачева, 29–23, Российская Федерация. Тел.: +7 (985) 966 21 34. E-mail: victoriagudebskaya@yahoo.fr



**Рис. 1.** Роботизированный комплекс da Vinci Si (платформа пациента)

не получили статистически значимой разницы при удалении миомы лапароскопически и с использованием робототехники (138 и 140 минут соответственно,  $p=0,887$ ) [12]. В исследовании S.M. Hsiao и соавт. (2013) проведен многофакторный анализ, в результате которого получено, что независимыми факторами, влияющими на время работы, являются использование робота (коэффициент = 79,1,  $p < 0,001$ ), количество миом (коэффициент = 15,4,  $p = 0,002$ ) и наличие миомы шеечной локализации (коэффициент = 54,9,  $p = 0,01$ ) [14].

Во многих работах показано, что при использовании роботхирургии интраоперационная кровопотеря минимальна [1, 4, 6, 12, 17, 22]. В сравнительном анализе С. Nezhat и соавт. (2009), а также в исследовании С.Е. Bedient и соавт. (2009) не получено статистически значимой разницы в величине кровопотери при проведении лапароскопической и роботизированной миомэктомии ( $p > 0,05$ ) [19]. N. Ranisavljevic и соавт. (2012) провели ретроспективное исследование с целью сравнительного анализа роботизированной и лапаротомной миомэктомии у пациентов репродуктивного возраста с размером по крайней мере одного из узлов более 6 см. По их данным, статистически значимая разница в величине интраоперационной кровопотери отсутствовала (387 и 397 мл соответственно,  $p = 0,71$ ) [21]. К. Nash и соавт. (2012) также не выявили разницы в величине кровопотери после роботизированной и абдоминальной миомэктомии ( $p > 0,05$ ) [18]. В исследованиях А.Р. Gargiulo и соавт. (2012) кровопотеря в группе роботизированной миомэктомии достоверно превысила таковую в лапароскопической группе (110 и 85,9 мл соответственно,  $p = 0,04$ ) [7, 10]. S.M. Hsiao и соавт. (2013) показали, что диаметр доминантного миоматозного узла – единственный фактор, влияющий на интраоперационную кровопотерю (коэффициент корреляции = 113,4,  $p = 0,003$ ) [14].

Абсолютное большинство авторов сходятся в том, что при использовании миниинвазивных технологий по сравнению с абдоминальным доступом снижаются длительность пребывания в стационаре и частота интра- и постоперационных осложнений [1–25].

Ряд работ свидетельствуют о более гладком течении послеоперационного периода после робот-ассистированной лапароскопической миомэктомии по сравнению с лапаротомией, основанием тому служат меньшая длительность температурной реакции, меньшая частота гемотрансфузий [4, 7, 11, 17].

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медико-хирургический Центр им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; 105203, г. Москва, ул. Нижняя Первомайская, 70, Российская Федерация

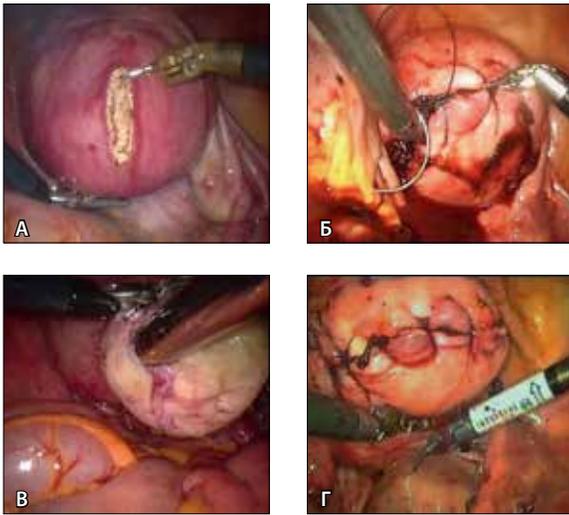


Источник, год	Дизайн исследования	Метод	Уровень доказательности	Количество пациентов	Полученные результаты
Advincula A.P. и соавт., 2007	Ретроспективное, «случай – контроль»	Сравнительный анализ роботизированной и лапаротомной миомэктомии	III	58	Время операции: Rbt 231 vs Lt 154 мин, $p < 0,05$ Кровопотеря: Rbt 196 vs Lt 365 мл, $p < 0,05$ Койко-день: Rbt 1,48 vs Lt 3,62 дня, $p < 0,05$ Частота осложнений: Rbt 3 vs Lt 14, $p < 0,05$ Себестоимость операции: Rbt 5946,48 vs Lt 4664,48 долл. США, $p < 0,05$
Nezhat C. и соавт., 2009	Ретроспективное, «случай – контроль»	Сравнительный анализ роботизированной и лапароскопической миомэктомии	III	50 (15 Rbt vs 35 Ls)	Время операции: Rbt 234 vs Ls 203 мин, $p < 0,05$ Кровопотеря, время пребывания в стационаре и частота послеоперационных осложнений достоверно не различались, $p > 0,05$
Lönnfors C. и соавт., 2009	Проспективное наблюдательное	Оценка эффективности робот-ассистированной лапароскопической миомэктомии при энуклеации глубоко расположенных интрамуральных узлов	III	13 Rbt	Время операции: 132 (94–209) мин Кровопотеря: 50 (25–200) мл Койко-день: 1 (1–3) день Интра- и послеоперационных осложнений не было В динамике через 6 месяцев при трансвагинальном ультразвуковом исследовании миомы размером более 5 мм не выявлены. Из 8 пациенток, планировавших зачатие, беременность наступила у 6, в среднем через 15 месяцев. Все симптомы, связанные с миомой, были устранены
Bedient S.E. и соавт., 2009	Ретроспективное	Сравнительный анализ роботизированной и лапароскопической миомэктомии	III	81 (40 Rbt vs 41 Ls)	Время операции: Ls 141 vs Rbt 166 мин, $p < 0,05$ Кровопотеря: Ls 100 vs Rbt 250 мл, $p < 0,05$ Койко-день: более 2 дней (12% Rbt vs 23% Ls) Частота интраоперационных и послеоперационных осложнений: 2% Rbt vs 20% Ls и 11% Rbt vs 17% Ls соответственно)
Ascher-Walsh CJ и соавт., 2010	Ретроспективное, «случай – контроль»	Сравнительный анализ роботизированной и лапаротомной миомэктомии у пациенток с количеством узлов менее 3	III	125	При роботизированной миомэктомии значительно ниже интраоперационная кровопотеря, менее выраженные изменения гематокрита; менее длительная температурная реакция в послеоперационном периоде; оперативное вмешательство с роботом более продолжительное, $p < 0,05$
Sangha R. и соавт., 2010	Ретроспективное	Сравнительный анализ роботизированной и лапаротомной миомэктомии	III	148 (100 Rbt vs 48 Lt)	Время операции: Rbt 194 vs Lt 128 мин, $p < 0,001$ Кровопотеря: Rbt 100 vs Lt 200 мл, $p < 0,001$ Койко-день: Rbt 1 vs Lt 3 дня, $p < 0,01$
Barakat E.E. и соавт., 2011	Ретроспективное	Сравнительный анализ роботизированной, лапароскопической и лапаротомной миомэктомии	II-b	575 (89 Rbt vs 93 Ls vs 393 Lt)	Время операции: Lt 126 vs Ls 155 vs Rbt 181 мин, $p < 0,001$ Кровопотеря: Rbt 100 vs Ls 200 vs Lt 150 мл, $p < 0,001$ Койко-день: Lt 3 vs Ls 1 vs Rbt 1 день, $p < 0,001$ Вес удаляемой опухоли: Rbt 223 vs Ls 97 vs Lt 263 г, $p < 0,001$
Ranisaivjevic N. и соавт., 2012	Ретроспективное, «случай – контроль»	Сравнительный анализ роботизированной и лапаротомной миомэктомии у пациенток с размером по крайней мере одного из узлов более 6 см	III	22 (16 Rbt vs 6 Lt)	Кровопотеря: Lt 397 vs Rbt 387 мл, $p = 0,71$ Койко-день: Lt 7,2 vs Rbt 3,9 дня, $p < 0,001$ Частота осложнений: 66,7% Lt vs 0% Rbt, $p = 0,002$ Все лапароскопические миомэктомии с участием робота выполнены без конверсии на лапаротомию
Gargiulo A.R. и соавт., 2012	Ретроспективное	Сравнительный анализ роботизированной и лапароскопической миомэктомии	II-b	289 (174 Rbt vs 115 Ls)	Время операции: Rbt 195,1 vs Ls 118,3 мин, $p < 0,001$ Кровопотеря: Rbt 110 vs Ls 85,9 мл, $p = 0,04$ Частота послеоперационных осложнений была сопоставимой



Mansour F.W. и соавт., 2012	Ретроспективное	Сравнительный анализ роботизированной и лапаротомной миомэктомии	III	59 (38 Rbt vs 21 Lt)	<p>Время операции: Rbt 189,7 vs Lt 92,5 мин, <math>p &lt; 0,001</math></p> <p>Кровопотеря: снижение концентрации гемоглобина Rbt 25,6 vs Lt 37,7 г/л, <math>p = 0,018</math>; послеоперационный уровень гемоглобина: Rbt 99 vs Lt 88 г/л, <math>p = 0,005</math></p> <p>Гемотрансфузия: 3 Lt vs 1 Rbt</p> <p>Койко-день: Rbt 1,2 vs Lt 2,5 дня, <math>p &lt; 0,001</math></p>
Nash K. и соавт., 2012	Ретроспективное	Сравнительный анализ роботизированной и лапаротомной миомэктомии	III	27 Rbt	<p>Меньше количество используемого анестетика и меньший койко-день в группе роботхирургии, <math>p &lt; 0,01</math>. Без статистически значимых различий в объеме кровопотери и интра- и послеоперационных осложнениях. Экономические затраты в группе роботхирургии значительно превысили таковые в группе пациентов после абдоминальной миомэктомии, <math>p &lt; 0,0001</math></p>
Hsiao S.M. и соавт., 2013	Ретроспективное	Сравнительный анализ роботизированной и лапароскопической миомэктомии	III	42 (20 Rbt vs 22 Ls)	<p>Время операции больше в группе роботхирургии, <math>p &lt; 0,05</math></p> <p>Многофакторный анализ выявил, что использование робототехники (коэффициент = 79,1, <math>p &lt; 0,001</math>), количество миом (коэффициент = 15,4, <math>p = 0,002</math>) и наличие миомы шеечной локализации (коэффициент = 54,9, <math>p = 0,01</math>) были независимыми факторами, влияющими на время работы. Максимальный диаметр миоматозного узла был единственным фактором, влияющим на кровопотерю (коэффициент корреляции = 113,4, <math>p = 0,003</math>)</p>
Gösten A. и соавт., 2013	Проспективное	Сравнительный анализ роботизированной и лапароскопической миомэктомии	III	38 (15 Rbt vs 23 Ls)	<p>Время операции: Rbt 138 vs Ls 140 мин, <math>p = 0,887</math></p> <p>Кровопотеря: Rbt 101 vs Ls 119 мл, <math>p = 0,549</math></p> <p>Койко-день: Rbt 1,67 vs Ls 1,87 дня, <math>p = 0,369</math></p> <p>В исследуемых группах не было конверсионных лапаротомий, интра- и послеоперационных осложнений</p>
Griffin L. и соавт., 2013	Ретроспективное	Сравнительный анализ роботизированной и лапаротомной миомэктомии	III	39 (16 Rbt vs 23 Lt)	<p>Время операции: Rbt 261,1 vs Lt 124,8 мин, <math>p &lt; 0,001</math></p> <p>Койко-день: Rbt 1,5 vs Lt 2,7 дня, <math>p &lt; 0,001</math></p> <p>Операционная эффективность: Rbt 73,7 vs Lt 253 г образца/час, <math>p &lt; 0,05</math></p> <p>Группы одинаково эффективны в отношении уменьшения симптомов миомы матки и удовлетворенности качеством жизни в послеоперационном периоде. Возвращение к работе в течение 1 месяца после операции: 85,7% Rbt vs 45% Ls, <math>p &lt; 0,05</math>. Остаточный фиброзный объем: 17,3 Rbt vs 3,4 Lt см (3), <math>p &lt; 0,05</math></p>
Gobern J.M. и соавт., 2013	Ретроспективное	Сравнительный анализ роботизированной, II-b лапароскопической и лапаротомной миомэктомии	II-b	308 (66 Rbt vs 73 Ls vs 169 Lt)	<p>Время операции: Rbt 140 vs Ls 70 vs Lt 17 мин, <math>p &lt; 0,005</math></p> <p>В группах лапароскопической и роботизированной миомэктомии меньше интраоперационная кровопотеря и койко-день (<math>p &lt; 0,005</math>). Гемотрансфузии реже проводились в группе роботхирургии (<math>p &lt; 0,005</math>). Не получено статистической разницы в частоте интра- и послеоперационных осложнений.</p> <p>Средний размер удаленного доминантного узла: Rbt 6,1 vs Ls 6,4 vs Lt 6,1 см, <math>p = 0,13</math>, хотя большинство миом более 10 см были удалены абдоминально. В исследовании не было конверсионных лапаротомий.</p> <p>Средний вес удаленной миомы: Lt 200 vs Ls 115 vs Rbt 129 г, <math>p &lt; 0,05</math></p>
Asmar J., 2015	Ретроспективное наблюдательное	Оценка клинической эффективности робот-ассистированной лапароскопической миомэктомии	III	36	<p>Время операции: 161 минута</p> <p>Койко-день: 3,3 дня</p> <p>Средний вес и размер удаляемых узлов: 163 г и 73 мм</p> <p>Три случая конверсионной лапаротомии. В 7 случаях – анемия в послеоперационном периоде, гемотрансфузии не проводились</p>

Rbt – роботхирургия; Lt – лапаротомия; Ls – лапароскопия



**Рис. 2.** Проведение миомэктомии с помощью роботизированной системы da Vinci Si: **А** – вскрытие миометрия над узлом, **Б** – зашивание ложа миоматозного узла, **В** – извлечение миоматозного узла с помощью морцеллятора WISAP, **Г** – шов на матке

Многими авторами обсуждается экономическая целесообразность применения роботхирургии, поскольку затраты на лечение при использовании робота значительно превышают таковые при миомэктомии лапароскопическим и абдоминальным доступом. Так, в работе С. Nezhat и соавт. (2009) приводятся данные о том, что затраты на лечение миомы матки с применением роботхирургии составляют 56 тыс. долл. США, тогда как при лапароскопической миомэктомии – 34500 долл. США [19]. Роботизированная миомэктомия оправдывает себя у пациенток фертильного возраста с нереализованной репродуктивной функцией, сочетанным бесплодием, особенно при глубокой интрамуральной локализации фиброида с деформацией полости матки [1, 18, 19].

Шесть публикаций, вошедших в наш обзор, посвящены репродуктивным исходам после робот-ассистированной лапароскопической миомэктомии (уровень доказательности II–IV).

С. Lönnerfors и J. Persson (2009) в проспективном обсервационном исследовании (уровень доказательности III) с участием 13 пациенток с миомой матки с глубокой интрамуральной локализацией узла показали, что из 8 пациенток, планировавших зачатие, беременность наступила у 6 в среднем через 15 месяцев после операции [15]. В другой публикации (2011) эти же авторы привели результаты проспективного исследования (уровень доказательности III) с участием 31 пациентки, 14 из которых страдали

бесплодием. В качестве одной из возможных причин infertility выступала деформация полости матки миоматозным узлом. Двадцать две пациентки планировали беременность, у 15 (68%) из них беременность наступила в течение 10 месяцев после операции. В итоге – 18 наступивших беременностей, из них: 3 самопроизвольных выкидыша (после экстракорпорального оплодотворения), 2 аборта, 10 родов в доношенном сроке, 3 прогрессирующие беременности на момент публикации. У пациенток с бесплодием частота наступления беременности составила 69%, при этом 55% – спонтанно наступившие беременности [16].

М.С. Pitter и соавт. (2013) провели многоцентровое ретроспективное когортное исследование (уровень доказательности II-a) с участием 872 пациенток, которым была проведена робот-ассистированная лапароскопическая миомэктомия. Средний размер удаляемого узла был 7,5 см, в 20,6% удалялись фиброиды с центрально-петельным ростом и деформацией полости матки. У 107 пациенток впоследствии наступила беременность. Общее число беременностей – 127, родов – 92. Среднее время для зачатия составило  $12,9 \pm 11,5$  месяца. Методы вспомогательной репродукции использованы в 39,4% случаев. Многоплодные беременности были в 9,8% случаев, в 18,9% – самопроизвольные выкидыши в первом триместре. Преждевременные роды до 35 недель беременности произошли в 17,4% случаев. Был зафиксирован один разрыв матки. Во время операции кесарева сечения у 11,4% пациенток обнаружен спаечный процесс в малом тазу. При проведении регрессионного анализа выявлено, что большая частота самопроизвольных выкидышей встречается у пациенток с множественной миомой матки либо при расположении доминантного узла больших размеров по передней стенке (по сравнению с другими локализациями) ( $p=0,01$ ) [20].

V. Cela и соавт. (2013) провели ретроспективное исследование (уровень доказательности III) с участием 48 пациенток с целью оценки фертильности и эндокринной функции у женщин после робот-ассистированной лапароскопической миомэктомии. Беременность наступила у 8 (16,7%) женщин. Зарегистрировано 6 родов путем операции кесарева сечения и одни нормальные роды *per via naturalis*. Случаев самопроизвольных выкидышей, перинатальной или материнской смертности, осложнений течения беременности или родов, разрывов матки не отмечено. Проводилось исследование уровней



фолликулостимулирующего и антимюллера гормонов в раннюю фолликулярную фазу, а также ультразвуковая оценка овариального резерва до и через 6 месяцев после операции. Не получено данных об отрицательном влиянии робот-ассистированной лапароскопической миомэктомии на функцию гонад и фолликулярный резерв [8].

S.N. Markuly и соавт. (2014) сообщают о случае разрыва матки после роботизированной миомэктомии у первобеременной пациентки 34 лет на сроке беременности 37 недель 3 дня. У пациентки в анамнезе была миома матки: 1 узел размером 9 см с центрипетальным ростом по задней стенке и 1 узел 5 см субсерозной локализации по передней стенке матки. Роботизированная миомэктомия с использованием комплекса Da Vinci выполнена без технических сложностей, общая кровопотеря составила 75 мл. На ложе удаленного доминантного узла был наложен трехрядный шов. Беременность наступила через 164 дня после оперативного вмешательства. Пациентке было рекомендовано родоразрешение путем операции кесарева сечения в 38 недель. В 37 недель с началом родовой деятельности произошел неполный разрыв матки. Женщина прооперирована в экстренном порядке [24].

J. Asmar и соавт. (2015) опубликовали результаты ретроспективного обсервационного исследования (уровень доказательности III) 36 пациенток с миомой матки, которым проводилась робот-ассистированная лапароскопическая миомэктомия. Помимо особенностей хирургического вмешательства оценивались репродуктивные исходы. Из 5 пациенток, желающих

забеременеть, беременность наступила у 4: у одной женщины – через 10 месяцев после оперативного вмешательства при помощи интрацитоплазматической инъекции сперматозоида, у второй – с помощью экстракорпорального оплодотворения, и в 2 наблюдениях произошло спонтанное наступление беременности. Одна из наступивших беременностей закончилась самопроизвольным выкидышем [5].

## Заключение

Этот обзор основывается на небольших ретроспективных исследованиях и сообщениях об отдельных случаях. Высокая стоимость роботхирургии и сравнительно недавнее внедрение технологии в клиническую практику представляются основными препятствиями для проведения рандомизированных контролируемых исследований. Для того чтобы сегодня определить роль роботизированных технологий в органосохраняющем лечении миомы матки количество проведенных исследований недостаточно. В целом полученные данные свидетельствуют о том, что робот-ассистированная лапароскопическая миомэктомия оправдывает себя у женщин репродуктивного возраста, планирующих беременность, с наличием интрамуральных узлов больших размеров с центрипетальным ростом и деформацией полости матки. У данной группы пациенток роботизированная миомэктомия является самостоятельным методом восстановления фертильности, а также может быть первым этапом перед применением вспомогательных репродуктивных технологий. ☺

## Литература / References

1. Advincula AP, Xu X, Goudeau S 4<sup>th</sup>, Ransom SB. Robot-assisted laparoscopic myomectomy versus abdominal myomectomy: a comparison of short-term surgical outcomes and immediate costs. *J Minim Invasive Gynecol.* 2007;14(6):698–705.
2. Advincula AP, Song A. The role of robotic surgery in gynecology. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2007;19(4):331–6.
3. Amodeo A, Linares Quevedo A, Joseph JV, Belgrano E, Patel HR. Robotic laparoscopic surgery: cost and training. *Minerva Urol Nefrol.* 2009;61(2):121–8.
4. Ascher-Walsh CJ, Capes TL. Robot-assisted laparoscopic myomectomy is an improvement over laparotomy in women with a limited number of myomas. *J Minim Invasive Gynecol.* 2010;17(3):306–10. doi: 10.1016/j.jmig.2010.01.011.
5. Asmar J, Even M, Carbonnel M, Goetgheluck J, Revaux A, Ayoubi JM. Myomectomy by Robotically Assisted Laparoscopic Surgery: Results at Foch Hospital, Paris. *Front Surg.* 2015;2:40. doi: 10.3389/fsurg.2015.00040.
6. Barakat EE, Bedaiwy MA, Zimberg S, Nutter B, Nosseir M, Falcone T. Robotic-assisted, laparoscopic, and abdominal myomectomy: a comparison of surgical outcomes. *Obstet Gynecol.* 2011;117(2 Pt 1):256–65. doi: 10.1097/AOG.0b013e318207854f.
7. Bedient CE, Magrina JF, Noble BN, Kho RM. Comparison of robotic and laparoscopic myomectomy. *Am J Obstet Gynecol.* 2009;201(6):566.e1–5. doi: 10.1016/j.ajog.2009.05.049.
8. Cela V, Freschi L, Simi G, Tana R, Russo N, Artini PG, Pluchino N. Fertility and endocrine outcome after robot-assisted laparoscopic myomectomy (RALM). *Gynecol Endocrinol.* 2013;29(1):79–82. doi: 10.3109/09513590.2012.705393.
9. Chen CC, Falcone T. Robotic gynecologic surgery: past, present, and future. *Clin Obstet Gynecol.* 2009;52(3):335–43. doi: 10.1097/GRF.0b013e3181b08adf.
10. Gargiulo AR, Srouji SS, Missmer SA, Correia KF, Vellinga TT, Einarsson JI. Robot-assisted laparoscopic myomectomy compared with standard laparoscopic myomectomy. *Obstet Gynecol.* 2012;120(2 Pt 1):284–91. doi: 10.1097/AOG.0b013e3182602c7d.
11. Govern JM, Rosemeyer CJ, Barter JF, Steren AJ. Comparison of robotic, laparoscopic, and abdominal myomectomy in a community hospital. *JSLs.* 2013;17(1):116–20. doi: 10.4293/108680812X13517013317473.
12. Göçmen A, Şanlıkan F, Uçar MG. Comparison of robotic-assisted laparoscopic myomectomy



- outcomes with laparoscopic myomectomy. *Arch Gynecol Obstet*. 2013;287(1):91–6. doi: 10.1007/s00404-012-2530-0.
13. Griffin L, Feinglass J, Garrett A, Henson A, Cohen L, Chaudhari A, Lin A. Postoperative outcomes after robotic versus abdominal myomectomy. *JSLs*. 2013;17(3):407–13. doi: 10.4293/108680813X13693422521557.
  14. Hsiao SM, Lin HH, Peng FS, Jen PJ, Hsiao CF, Tu FC. Comparison of robot-assisted laparoscopic myomectomy and traditional laparoscopic myomectomy. *J Obstet Gynaecol Res*. 2013;39(5):1024–9. doi: 10.1111/j.1447-0756.2012.02073.x.
  15. Lönnerfors C, Persson J. Robot-assisted laparoscopic myomectomy; a feasible technique for removal of unfavorably localized myomas. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2009;88(9):994–9. doi: 10.1080/00016340903118026.
  16. Lönnerfors C, Persson J. Pregnancy following robot-assisted laparoscopic myomectomy in women with deep intramural myomas. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2011;90(9):972–7. doi: 10.1111/j.1600-0412.2011.01207.x.
  17. Mansour FW, Kives S, Urbach DR, Lefebvre G. Robotically assisted laparoscopic myomectomy: a Canadian experience. *J Obstet Gynaecol Can*. 2012;34(4):353–8.
  18. Nash K, Feinglass J, Zei C, Lu G, Mengesha B, Lewicky-Gaupp C, Lin A. Robotic-assisted laparoscopic myomectomy versus abdominal myomectomy: a comparative analysis of surgical outcomes and costs. *Arch Gynecol Obstet*. 2012;285(2):435–40. doi: 10.1007/s00404-011-1999-2.
  19. Nezhat C, Lavie O, Hsu S, Watson J, Barnett O, Lemyre M. Robotic-assisted laparoscopic myomectomy compared with standard laparoscopic myomectomy – a retrospective matched control study. *Fertil Steril*. 2009;91(2):556–9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.11.092.
  20. Pitter MC, Gargiulo AR, Bonaventura LM, Lehman JS, Srouji SS. Pregnancy outcomes following robot-assisted myomectomy. *Hum Reprod*. 2013;28(1):99–108. doi: 10.1093/humrep/des365.
  21. Ranisavljevic N, Mercier G, Masia F, Mares P, De Tayrac R, Triopon G. Robot-assisted laparoscopic myomectomy: comparison with abdominal myomectomy. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2012;41(5):439–44. doi: 10.1016/j.jgyn.2012.05.010.
  22. Sangha R, Eisenstein D, George A, Munkarah A, Wegienka G. Surgical outcomes for robotic-assisted laparoscopic myomectomy compared to abdominal myomectomy. *J Robot Surg*. 2010;4(4):229–33.
  23. Senapati S, Advincula AP. Surgical techniques: robot-assisted laparoscopic myomectomy with the da Vinci® surgical system. *J Robot Surg*. 2007;1(1):69–74.
  24. Markuly SN, Miller CE, Szela K. Uterine rupture after robotic-assisted laparoscopic myomectomy. Case Report. CRLS MIS Case Reports from SLS.org. e2014.00208. Available from: <http://crsls.sls.org/uterine-rupture-after-robotic-assisted-laparoscopic-myomectomy/>
  25. Visco AG, Advincula AP. Robotic gynecologic surgery. *Obstet Gynecol*. 2008;112(6):1369–84. doi: 10.1097/AOG.0b013e31818f3c17.

## Clinical efficacy of the robot-assisted laparoscopic myomectomy (a review of the literature)

Gudebskaya V.A.<sup>1</sup>

**Rationale:** One of the most complicated and unresolved problems in clinical medicine is the choice of an optimal method for organ-preservation treatment of uterine fibroids in women of childbearing age. **Aim:** To assess clinical efficacy of robot-assisted laparoscopic myomectomy. **Materials and methods:** The search was performed in PubMed, Embase, Trip, Cochrane, DocMe databases by keywords: “fibroids”, “robot”, “da Vinci”, “robotic myomectomy”, “robot-assisted myomectomy”. **Results:** We found 25 publications on robot-assisted laparoscopic myomectomy, including 6 papers on its reproductive outcomes (levels of evidence II–IV). Duration of robot-assisted surgery ranged from 132 to 261 minutes, intraoperative blood loss was in the range from 50 to 387 mL, postoperative hospital stay ranged from 1 to 3.9 days. There was a lower percentage of intra- and postoperative complications after the robot-assisted interventions, compared to abdominal or classic laparoscopic access, as well as a lower percentage of conversion laparotomies compared

to laparoscopy. Pregnancy rates after robotic myomectomy ranged from 16.7 to 69%. Only one case of uterine rupture after robot-assisted laparoscopic myomectomy has been described in the literature. **Conclusion:** Due to high cost of the method, the number of conducted studies is insufficient to evaluate the role of robotic technologies in the organ-preservation approach to uterine fibroids. Nevertheless, they suggest that robot-assisted laparoscopic myomectomy is justified in women of childbearing age who are planning pregnancy, with big centripetally growing intramural nodes and deformation of the uterine cavity. This technique on its own is an independent method for fertility restoration and could be the first step before the use of assisted reproductive technology.

**Key words:** myoma, robot, da Vinci, robotic myomectomy, robot-assisted laparoscopic myomectomy

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-242-248

**Gudebskaya Viktoriya A.** – Postgraduate Student, Chair of Women's Disorders and Reproductive Health, Institute of Postgraduate Medical Training<sup>1</sup>  
 ✉ 29–23 Tolmacheva ul., Ivanteevka, Moskovskaya oblast', 141282, Russian Federation.  
 Tel.: +7 (985) 966 21 34.  
 E-mail: victoriagudebskaya@yahoo.fr

<sup>1</sup>N.I. Pirogov National Medical Surgical Center; 70 Nizhnaya Pervomayskaya ul., Moscow, 105203, Russian Federation



# Функциональные исследования системы микроциркуляции крови методом лазерной доплеровской флоуметрии в клинической медицине: проблемы и перспективы

Лапитан Д.Г.<sup>1</sup> • Рогаткин Д.А.<sup>1</sup>

В статье представлен обзор современных данных по исследованию системы микроциркуляции крови методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ). Рассмотрены особенности оценки показателя микроциркуляции методом ЛДФ, обсуждается индивидуальная вариабельность параметров микроциркуляции, измеряемых в реальном масштабе времени *in vivo*. Относительный физиологический разброс результатов измерений в ЛДФ находится в диапазоне не менее  $\pm 35\%$  от среднего измеренного значения показателя микроциркуляции. Это накладывает определенные ограничения на интерпретацию результатов диагностики в терминах «норма/патология». Раскрываются

особенности выполнения функциональных нагрузочных проб на систему микроциркуляции крови. Диагностические критерии по результатам функциональных проб на систему микроциркуляции крови, выполнение которых может быть методически строго нормировано и регламентировано, например, по результатам окклюзионного теста, являются более метрологически надежными и достоверными по сравнению с данными исследований параметров в фоновых тестах без нагрузок. Обсуждаются вопросы внедрения данных функциональных проб в клиническую практику. Показано, что спектр их применения в клинике может быть широк – от функциональной диагностики и раннего выявления нарушений

микродинамики при сахарном диабете, артериальной гипертензии и других заболеваниях, ассоциированных с нарушениями в системе микроциркуляции крови, до физического обоснования параметров воздействия и объективизации эффективности проведения тех или иных терапевтических процедур, направленных на стимулирование микроциркуляторных функций в тканях и органах пациента.

**Ключевые слова:** система микроциркуляции крови, лазерная доплеровская флоуметрия, функциональные пробы, показатель микроциркуляции, перфузия крови, вариабельность

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-249-259

**П**роблемы микроциркуляции, связанные с выявлением фундаментальных закономерностей кровотока и лимфотока в микрососудах, привлекают все больше внимания исследователей-медиков, медицинских физиков, биологов и практикующих врачей самых разных специальностей. Сложность и актуальность этой проблематики можно объяснить тем, что система микроциркуляции крови охватывает множество функционально взаимосвязанных сосудов диаметром от 2 до 200 мкм и играет важную роль в поддержании гомеостаза всех систем организма, в протекании многих обменных процессов в тканях, включая процессы транспорта и потребления кислорода как на системном, так и на локальном уровнях. Именно поэтому совершенствование методов исследования

**Лапитан Денис Григорьевич** – науч. сотр., лаборатория медико-физических исследований<sup>1</sup>  
 ✉ 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2–8, Российская Федерация.  
 Тел.: +7 (495) 681 89 84.  
 E-mail: lapitandenis@mail.ru

**Рогаткин Дмитрий Алексеевич** – д-р техн. наук, заведующий лабораторией медико-физических исследований<sup>1</sup>

функционирования микроциркуляторного русла в норме и при патологиях представляет собой одно из интересных направлений для теоретической и практической медицины [1, 2].

До последнего времени исследование системы микроциркуляции крови *in vivo* не входило напрямую в задачи классической функциональной диагностики ввиду отсутствия в практической медицине необходимого оборудования. Появление на рубеже XX–XXI веков доступных оптических (в том числе лазерных) инструментов для неинвазивной диагностики дало такие возможности. Широкое распространение получили методы видеокапилляроскопии, фотоплетизмографии, лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ), оптической тканевой оксиметрии, тепловой инфракрасной визуализации и др. [3–7].

<sup>1</sup> ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация



Сегодня уже ведутся работы по созданию беспроводных мобильных оптических технологий для изучения системы микроциркуляции крови, которые давали бы испытуемому намного больше свободы в передвижении [8–10].

Среди лазерных методов исследования системы микроциркуляции крови особо можно выделить такой неинвазивный метод, как ЛДФ [5], в названии которого заложен его физический принцип. ЛДФ основана на регистрации доплеровского сдвига частоты оптического излучения на движущихся форменных элементах крови при зондировании поверхности биоткани *in vivo* низкоинтенсивным лазерным излучением. Свет эффективно проникает в ткани неглубоко, на несколько миллиметров (только с такой глубины можно собрать достаточный для детектирования обратно рассеянный сигнал), поэтому объектом исследования выступают мелкие сосуды. Поскольку скорость движения крови даже по крупным сосудам, не говоря уже о микроциркуляторном русле, мала, соответственно, мал и доплеровский сдвиг частоты. Его можно обнаружить лишь методом гетеродинного приема при регистрации низкочастотных биений исходной и доплеровской компонент излучения. Но скорость движения крови еще и не постоянна. Более того, она различается в зависимости от иерархии сосудов. Это порождает целый сплошной спектр биений, который интегрально и регистрируется прибором. Таким образом, в ЛДФ оценивается не сам доплеровский сдвиг частоты или скорость кровотока в сосудах, а некий интегральный параметр – индекс микроциркуляции, или показатель микроциркуляции (в российской терминологии), называемый часто, особенно в англоязычной литературе, также индексом перфузии тканей кровью (perfusion index), просто перфузией (perfusion) или потоком крови (blood flow). Он пропорционален скорости движения эритроцитов и количеству эритроцитов (основных рассеивателей света) в зоне обследования [11]:

$$PM = K \cdot N_{эр} \cdot V_{ср}, \quad (1)$$

где  $PM$  – показатель (индекс) микроциркуляции (пф. ед.),  $K$  – коэффициент пропорциональности,  $N_{эр}$  – количество эритроцитов в зоне обследования (основные рассеиватели света),  $V_{ср}$  – средняя скорость эритроцитов в зондируемом объеме.  $PM$  является в общем случае функцией времени  $t$ , так как от времени зависят  $N_{эр}$  и  $V_{ср}$ . Следовательно, в ЛДФ результирующий параметр  $PM(t)$  определяет динамическую характеристику

микрогемодинамики – изменение потока и объема крови (перфузии ткани кровью) в единицу времени в зондируемом объеме.

Анализ среднего уровня перфузии  $PM(t)$  и ее изменений, особенно при различных нагрузочных (провокационных) тестах на систему микроциркуляции крови, позволяет получать достаточно богатую информацию о микроциркуляции крови в тканях. Но еще более тонкую информацию для врача может дать понимание особенностей функционирования различных регуляторных механизмов микрогемодинамики – миогенных, нейрогенных, эндотелиальных. Каждый из них вносит свой вклад в динамику перфузии крови в тканях, добавляет свои низкочастотные «ритмы» в регистрируемый  $PM(t)$ , поэтому, согласно современным представлениям [12], частотный анализ регистрируемого сигнала на частотах до 1 Гц позволяет оценивать еще и различные физиологические особенности регуляции микроциркуляции. Важной особенностью метода ЛДФ считается потенциальная возможность получения *in vivo* всего спектра ритмических процессов в микрососудах – от пульсовых до циркадных ритмов [13].

На рис. 1 представлен пример проведения измерений кожной микроциркуляции *in vivo* на руках испытуемого с помощью двухканального оптоволоконного лазерного доплеровского анализатора капиллярного кровотока «ЛАКК-02» (ООО «ЛАЗМА», Россия).

Рис. 2 демонстрирует запись базового уровня  $PM(t)$  на одной из рук в этом эксперименте. Отчетливо прослеживаются на фоне среднего уровня перфузии ее флуктуации (вазомоции) с разными амплитудно-частотными характеристиками. Однако, как показали недавние наши исследования, российские приборы серии «ЛАКК» (приборы, наиболее часто используемые в России) могут в ряде случаев недостоверно оценивать частотные параметры вазомоций, вносят искажения в регистрируемые спектральные характеристики сигнала<sup>1</sup>. По этой причине анализ частотных ритмов микроциркуляции и связанные с ними проблемы в данной работе не рассматриваются, будучи темой отдельной статьи.

В профильной научной литературе есть много сведений о большой информативности ЛДФ в оценке кровотока во время различных операций, при ионофорезе, фармакологических испытаниях, заживлении ран, а также исследовании кожных заболеваний [14–16]. Однако, несмотря на длительную историю существования ЛДФ, до практической клинической медицины этот метод пока еще не дошел. Что этому мешает?

<sup>1</sup> Лапитан ДГ, Рогаткин ДА, Милицинский ЭМ. Образование ложного спектра в схеме обработки сигнала приборов лазерной доплеровской флоуметрии серии «ЛАКК». В: Сборник материалов VI Троицкой конференции «Медицинская физика и инновации в медицине» (ТКМФ-6); Троицк, 2–6 июня 2014 г. Троицк – Москва; 2014. с. 279–281.



Рис. 1. Пример проведения измерений с помощью двухканального оптоволоконного лазерного доплеровского анализатора «ЛАКК-02»

### Особенности оценки показателя микроциркуляции методом лазерной доплеровской флоуметрии

Если использовать базовый тест, то есть просто оценивать средний уровень  $M$  показателя микроциркуляции  $PM(t)$  за интервал времени  $T=1\dots 6$  минут (типичные времена в большинстве стандартных методик для базового теста [5]), что математически выражается интегрированием на интервале времени  $T$  регистрируемого сигнала  $PM(t)$ :

$$M = \frac{1}{T} \int_0^T PM(t) dt, \quad (2)$$

где  $M$  – средний уровень показателя микроциркуляции за интервал времени  $T$ , то далеко не всегда можно найти разницу в  $M$  по сравнению с нормой даже для пациентов с ярко выраженными нарушениями микроциркуляции<sup>2</sup>. Причина тому – большой индивидуальный физиологический разброс  $PM(t)$  и его зависимость от множества факторов, в том числе от температуры окружающего воздуха, от психоэмоционального состояния испытуемого и т.п. [2]. В литературе эта проблема не часто, но периодически обсуждается [17–19]. В.В. Сидоров и соавт. [19] указывают на изменение ЛДФ-граммы у одного и того же пациента в разное время суток, в различные дни и недели, что связано с временной изменчивостью перфузии ткани, причем эти изменения могут достигать 2–4 раз. В работах группы исследователей МОНИКИ недавно было экспериментально показано, что относительный индивидуальный физиологический разброс результатов измерений  $M$  в ЛДФ находится, в среднем, без учета ритмов микроциркуляции, в диапазоне не менее  $\pm 35\%$  от среднего измеренного значения  $M$ , если разброс оценивать по величине  $\sigma$  – величине среднего



Рис. 2. Пример записи базового уровня  $PM$

Рис. 2. Пример записи базового уровня  $PM$

квадратического отклонения в  $M$  при многократно повторяемых измерениях (для ритмов он еще больше – до 60% [17]). Это заставляет для каждого конкретного пациента записывать результаты единичных измерений в виде  $M \pm 0,35 M$ . Если же принимать, как это обычно делается в измерениях в медицине, доверительную вероятность безошибочного результата в 95%, то есть оценивать результат по уровню  $2\sigma$ , то разброс показателя среднего уровня микроциркуляции необходимо записать уже в виде  $M \pm 0,7 M$ . Это часто приводит к тому, что результаты измерений в норме и при патологии сильно перекрываются и становится невозможно по результатам единичных измерений выдать диагностическое заключение каждому конкретному пациенту.

Кроме того, дополнительной проблемой для любых измерений, в том числе для метода ЛДФ, выступает погрешность измерений, как приборных (из-за несовершенства приборов), так и методических, присущих методу в целом. В случае аппаратов ЛДФ ситуация усугубляется еще и тем, что это не средства измерений, но приборы индикаторного типа [20]. Они не аттестованы (не сертифицированы) для количественных измерений, не калибруются единообразно, особенно приборы разных производителей, и для них неизвестны и не нормируются ни функция преобразования прибора, ни погрешность измерений. Строго говоря, такими приборами нельзя проводить количественные измерения. Они вносят в результат измерения  $M$  дополнительную неопределенность  $\Delta M_{дон}$ , которая неизвестна по величине и искажает конечный диагностический результат. С ее учетом результат измерения  $M$  должен быть записан так:

$$M = M_{исп} \pm \Delta M_{фв} \pm \Delta M_{дон}, \quad (3)$$

<sup>2</sup> Лапитан Д.Г., Егоян Г.Г., Рогаткин Д.А. Исследование системы микроциркуляции крови у больных с различными заболеваниями. В: Материалы международной научной конференции «Микроциркуляция и гемореология» (Клиника и эксперимент: из лаборатории к постели больного); Ярославль, 5–8 июля 2015 г. Ярославль: Канцлер; 2015. с. 58.



где  $M_{ист}$  – истинное значение показателя микроциркуляции,  $\Delta M_{фв}$  – физиологические вариации результата, описанные выше ( $\approx 0,35M$ ), и  $\Delta M_{дон}$  – дополнительная неопределенность от погрешностей измерений. В группах испытуемых, если проводятся научные исследования, эти слагаемые, как правило, усредняются по группе для оценки среднего, что уменьшает в целом их влияние и на конечное среднее, и на среднее квадратическое отклонение в группе. Именно поэтому приборы ЛДФ оказались весьма эффективными в научных целях. Для индивидуального же «диагноза» необходимо учитывать все слагаемые, что затрудняет внедрение приборов в практическую медицину.

До последнего времени все эти вопросы метрологии измерений в ЛДФ оставались за рамками поля зрения исследователей [20]. Между тем исследования по метрологии неинвазивных спектрофотометрических измерений оказываются интересными по своим выводам и следствиям. Так, одним из результатов нашего недавнего исследования [21] стала констатация факта, что основной вклад в  $\Delta M_{дон}$  вносит так называемая интерактивная составляющая погрешности, обусловленная взаимодействием средства и объекта измерений. В частности, для оптоволоконных приборов она во многом связана с неопределенностью позиционирования оптического волокна (датчика прибора) на измеряемой поверхности и с неопределенностью давления этого датчика на поверхностные ткани. При повторных измерениях несколько иное положение волокна и несколько иная сила его нажима на ткани приводят к сильному отличию результатов измерений друг от друга, вплоть до разницы в  $M$  в 85–90%. Как следствие, более воспроизводимыми и достоверными оказываются непрерывные измерения без снятия датчика, например, в процессе проведения функциональных нагрузочных проб на систему микроциркуляции крови.

### Функциональные пробы

Проблема сильной физиологической вариабельности  $M$  и невозможности в связи с этим использовать  $M$  для формирования индивидуального диагностического заключения (поскольку достаточно сложно повлиять на разные компоненты  $\Delta M_i$  в сторону их уменьшения) приводит к тому, что единственным путем повышения достоверности измерений в ЛДФ пока остается поиск методик, увеличивающих различия в  $M$ , или разработка относительных методов, позволяющих оценивать относительные изменения в перфузии

тканей кровью в разных физиологических ситуациях без привязки к их абсолютным значениям. Такими относительными методами являются различные функциональные тесты: с нагревом (тепловая проба), с охлаждением (холодовая проба), с артериальной окклюзией (окклюзионная проба), с глубоким вдохом и задержкой дыхания (дыхательный тест) и ряд других тестов, которые способны вызвать быстрые и динамичные изменения в локальной микрогемодинамике [5]. По относительному изменению  $PM(t)$  во время проведения теста можно более точно и объективно судить о функционировании системы микроциркуляции крови. Одним из преимуществ функциональных тестов считается потенциальная возможность стандартизации условий их проведения. Например, для наиболее широко используемой в зарубежных исследованиях тепловой пробы стандартизация заключается в возможности инструментального контроля и поддержания заданной температуры нагрева ткани в 42–43 °C [2]. Это дополнительно снижает вариативность регистрируемого  $PM(t)$ . В нашей работе 2012 г. [17] оценивался индивидуальный физиологический разброс результатов окклюзионной и дыхательной пробы у одних и тех же испытуемых по методике многократных статистических измерений. В режиме дыхательной пробы вычислялся индекс дыхательной пробы (ИДП) по формуле:

$$ИДП = \frac{(M - PM_{min})}{M} \cdot 100\%, \quad (4)$$

где  $M$  – среднее значение  $PM(t)$  до вдоха, а  $PM_{min}$  – минимальное значение перфузии во время задержки дыхания. Как правило, задержка дыхания на 15–20 секунд приводит к падению кровотока на 20–25 секунд в коже ладонной поверхности дистальных фаланг пальцев рук (рис. 3). Это потенциально позволяет оценить функционирование механизмов венозного оттока крови и симпатической периферической иннервации сосудов (главным образом мелких артериол и прекапиллярных сфинктеров) [5].

В режиме окклюзионного теста с плечевой артериальной окклюзией в коже ладонной поверхности пальцев рук определялся резерв капиллярного кровотока (РКК):

$$РКК = \frac{PM_{max}}{M} \cdot 100\%, \quad (5)$$

где  $M$  – среднее значение  $PM(t)$  до окклюзии,  $PM_{max}$  – максимальное значение перфузии в фазе постокклюзионной гиперемии (рис. 4). В момент пережатия плечевой артерии поступление крови

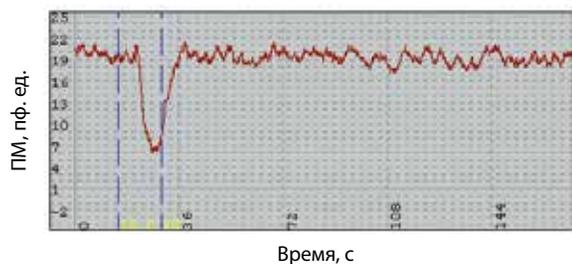


Рис. 3. Регистрируемый  $PM(t)$  во время дыхательного теста

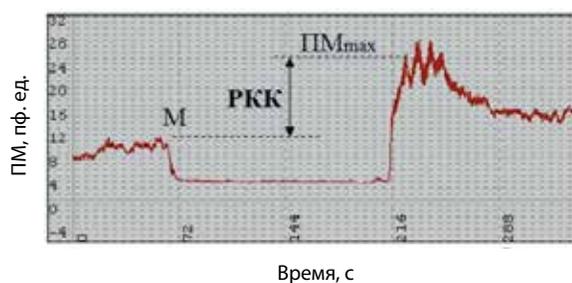


Рис. 4. Регистрируемый  $PM(t)$  во время окклюзионного теста. Окклюзия плечевой артерии с 60-й по 210-ю секунды; РКК – резерв капиллярного кровотока

в конечность прекращается,  $PM(t)$  падает почти до нуля, и наступает искусственно вызванная ишемия тканей конечности. По окончании артериальной окклюзии (в момент декомпрессии) кровотоков в артерии восстанавливается, и в тканях развивается реактивная постокклюзионная гиперемия с максимальным заполнением свежей кровью всех работоспособных мелких сосудов и капилляров, что диагностически наглядно проявляется резким увеличением  $PM$  до значений, часто превышающих его исходный уровень. Изменение кровотока в коже от средних значений до компрессии до максимальных в процессе реактивной гиперемии характеризует диапазон возможностей в кровенаполнении тканей, эндотелиальную функцию сосудов (ответ на ишемию и острую гипоксию) и тип микроциркуляции у испытуемого [22].

В цитируемом исследовании принимали участие два человека без отягощенного сердечно-сосудистого анамнеза (в том числе один из авторов данной публикации) – мужчины в возрасте от 24 до 50 лет. Первая часть исследований носила ретроспективный характер и касалась сбора и анализа диагностических данных для одного из авторов статьи (44–50 лет), полученных в течение 6 лет. При этом не существовало строгой последовательности и периодичности этих измерений, просто время от времени с автора снимались

данные при выполнении окклюзионного теста в тех или иных исследовательских и/или демонстрационных целях. Эта часть исследований позволила оценить долговременную вариабельность параметров у одного испытуемого на отрезке времени в 6 лет при случайной выборке момента времени измерения. Для этого все показатели (порядка 200 измерений) были усреднены за весь период исследования с вычислением среднего арифметического каждого из показателей ( $P$ ), его среднего квадратического отклонения ( $\sigma$ ) и относительного разброса результатов измерений (коэффициента вариации)  $\delta$  в процентах к среднему:

$$\delta = \frac{\sigma}{P} \cdot 100\% . \quad (6)$$

Табл. 1 иллюстрирует полученные результаты.

Вторая часть исследований была направлена на изучение кратковременного физиологического разброса показателей у одного испытуемого 25 лет в течение 10 дней, при проведении измерений ежедневно в одно и то же время (в 10 часов утра), чтобы исключить циркадные ритмы кровообращения (табл. 2). Из представленных результатов видно, что параметр  $M$  сильнее подвержен индивидуальной физиологической изменчивости, чем РКК. В обоих экспериментах коэффициент вариации у РКК меньше, чем у  $M$ . Это является

Таблица 1. Разброс индивидуальных показателей окклюзионного теста у одного испытуемого за время наблюдений 6 лет при случайном выборе момента времени проведения измерений

Статистический параметр	M, пф. ед.	РКК, %
Среднее по всем измерениям ( $P$ )	17,67	136,73
Среднее квадратическое отклонение ( $\sigma$ ) в серии измерений	4,71	17,77
Коэффициент вариации $\delta = 100(\sigma/P)$ , %	26,69	12,99

РКК – резерв капиллярного кровотока

Таблица 2. Физиологический разброс параметров одного испытуемого в течение 10 дней при ежедневных измерениях в одно и то же время

Статистический параметр	M, пф. ед.	ИДП, %	РКК, %
Среднее по всем измерениям ( $P$ )	18,42	17,33	138,35
Среднее квадратическое отклонение ( $\sigma$ ) в серии измерений	7,04	33,22	23,43
Коэффициент вариации $\delta = 100(\sigma/P)$ , %	38,21	191,73	16,94

ИДП – индекс дыхательной пробы, РКК – резерв капиллярного кровотока

следствием относительного характера измерений (по отношению к начальному уровню) и возможности стандартизовать проведение окклюзионной пробы. Давление в манжете при окклюзии (порядка 280 мм рт. ст.) и время выдержки окклюзии 2,5–3 минуты достаточно легко воспроизводить и контролировать. Небольшие различия в результатах могут наблюдаться от разной скорости подачи давления в манжету (рис. 5, выделенная левая часть графиков), но при комплектации прибора автоматическим компрессором этот параметр также может быть стандартизован.

В большей степени вариабельность была зафиксирована для индекса дыхательной пробы (ИДП) – 191%. Был выявлен факт, что один и тот же человек на фоне глубокого вдоха с последующей задержкой дыхания может иметь как нормальный вазоконстрикторный эффект в сосудах пальцев рук по типу рис. 3, так и вазодилаторный – так называемую парадоксальную реакцию (рис. 6). Изучение этого феномена и характера вдоха пациентов показало: при наблюдаемой парадоксальной реакции все пациенты делают более медленный вдох с наполнением воздуха в области верхушек легких (испытуемые непроизвольно поднимали плечи). Именно при таком выполнении вдоха дыхательная проба сопровождалась ярким вазодилатирующим эффектом на конечностях и воспроизводилась многократно, одновременно на обеих конечностях, особенно при измерениях на лазерных флоуметрах «ЛАКК-02» с инфракрасным каналом (рис. 7А). Нормальная же реакция на дыхательную пробу (вазоконстрикторная, рис. 7Б) также многократно воспроизводится, более надежно на флоуметрах «ЛАКК-01» с «красным» каналом с гелий-неоновым лазером, но наблюдается только в случае глубокого вдоха, выполняемого исключительно нижней частью легких с использованием диафрагмы и мышц живота. Если же вдох производился по смешанному типу, верхней и нижней частью легких одновременно, реакция системы микроциркуляции крови на задержку дыхания на графиках была выражена очень слабо или не отмечалась совсем. Это говорит о том, что стандартизовать дыхательную пробу очень сложно. Она приводит к большим разбросам результатов измерений, поэтому мало информативна в клинической практике<sup>3</sup>.

«Парадоксальный» висцеро-вазомоторный рефлекс при дыхательной пробе может быть объяснен раздражением медленно адаптирующихся рецепторов [23]. Он проявляется при постепенном вдохе с растяжением преимущественно гладких мышц главных дыхательных путей

<sup>3</sup> Петрицкая ЕН, Абаева ЛФ, Карташова НВ, Рогаткин ДА. Особенности выполнения дыхательной пробы при исследовании микроциркуляции крови в пальцах рук. В: Тезисы докладов на VIII Международной конференции «Системное кровообращение, микроциркуляция и гемореология»; Ярославль, 10–14 июня 2011 г. Ярославль; 2011. с. 122.

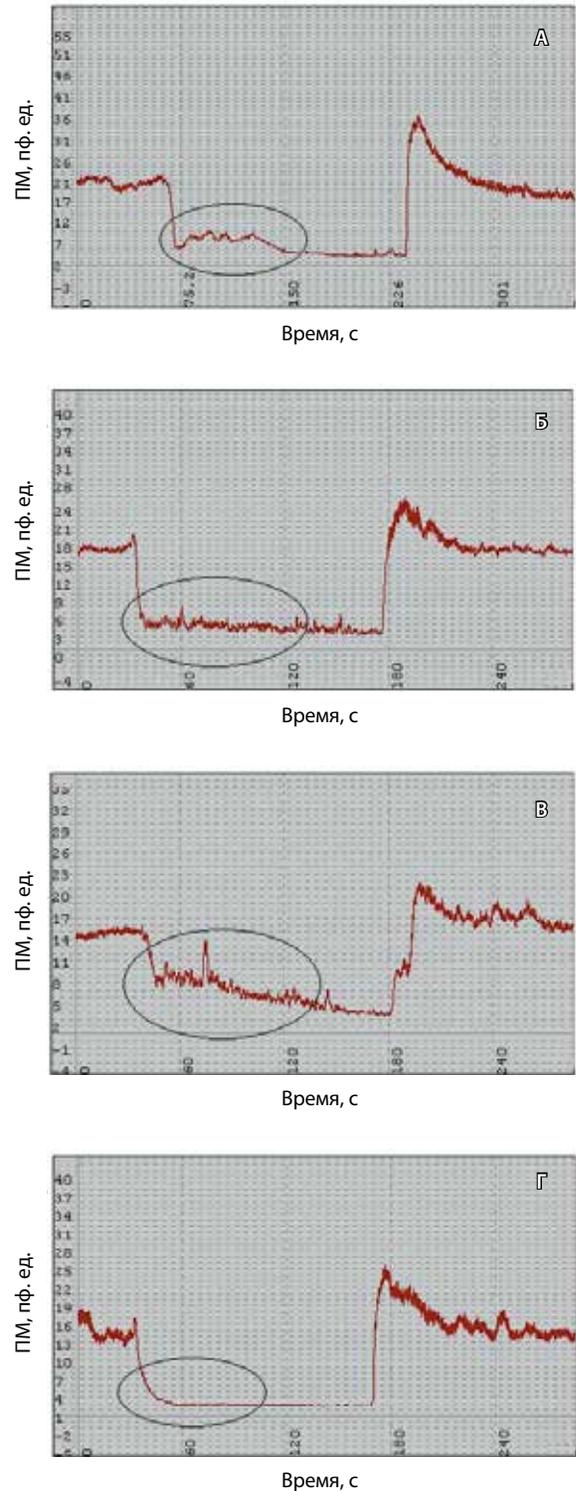
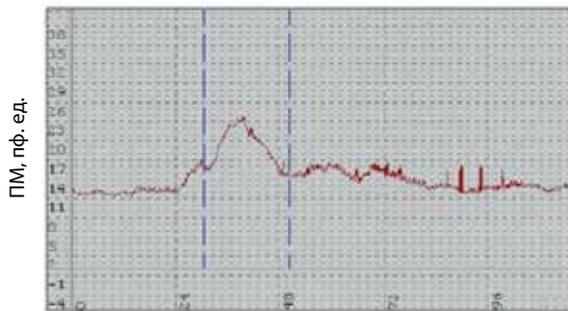


Рис. 5. Проявление разной скорости подачи давления в манжету на зависимость  $PIM(t)$  в момент начала окклюзии

бронхиального дерева (bronchi и трахея), и рецепторы раздражаются в результате увеличения объема легких (раздувание). Рецепторы связаны

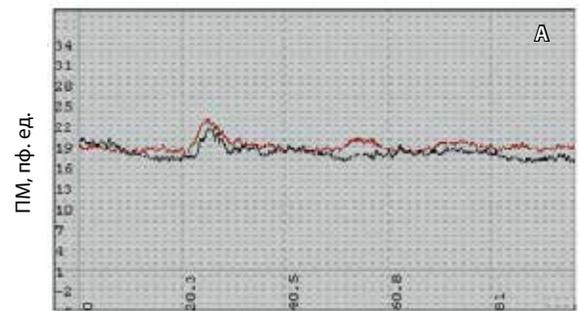


Время, с

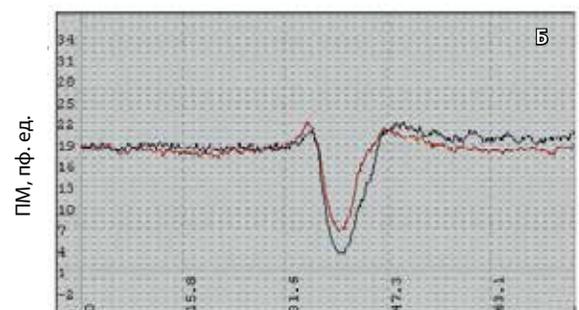
**Рис. 6.** Парадоксальная реакция микроциркуляции на дыхательную пробу

с нейронами дорсальной дыхательной группы дыхательного центра и миелинизированными афферентными волокнами блуждающего нерва. Стимуляция этих рецепторов вызывает рефлекс Геринга – Брейера, который у животных проявляется в том, что раздувание легких вызывает рефлекторное переключение фазы вдоха на фазу выдоха. У человека в состоянии бодрствования этот рефлекторный эффект возникает при величине дыхательного объема, который превышает примерно втрое его нормальную величину при спокойном дыхании. Данный соматовегетативный рефлекс способствует относительной ваготонии в организме с ослаблением нейrogenной симпатической импульсации и снижением периферического вазоконстрикторного эффекта. Как видим, изучение и грамотная интерпретация результатов функциональных тестов могут давать еще и достаточно глубокую информацию по механизмам регуляции микрогемодинамики, но для полноценной оценки вегетативной регуляции сосудов, в первую очередь акральных зон конечностей, при проведении функциональных проб важен еще и общий конечный путь иннервации, являющийся основой для эфферентной рефлекторной регуляции периферического кровообращения в целом. А значит, при обследовании пациентов следует обязательно учитывать возможность центральных влияний на сосуды конечностей, особенно плотно иннервируемые.

Однако и функциональные тесты сами по себе, как единичные тесты, далеко не всегда оказываются информативными для практикующих клиницистов. В связи с этим последние тенденции в поисках приемлемых стандартизуемых функциональных исследований сопряжены с попытками комбинации и выполнения нескольких взаимодополняющих тестов подряд [2]. Это могут быть комбинации теплового и окклюзионного тестов, пробы Ортнера и ортостатического теста и т.д.



Время, с



Время, с

**Рис. 7.** Две подряд выполненные дыхательные пробы одним и тем же испытуемым с разной техникой выполнения вдоха: **А** – верхушками легких, **Б** – диафрагмой

Например, в нашей работе 2014 г. [24] были разработаны функциональные диагностические пробы с применением комбинации теплового и ортостатического воздействия. Использование этих проб совместно с переводом стандартного  $ПМ(t)$ , измеряемого в перфузионных единицах, в относительные (безразмерные) значения путем деления  $ПМ(t)$  в каждый момент времени на среднее значение  $M$  за базовый период позволило выявить значимые различия показателей у больных сахарным диабетом и контрольной группы в момент комбинированной нагрузки: для комплексной пробы на ноге значение относительного индекса микроциркуляции составило  $3,2 \pm 1,9$  в исследуемой группе и  $6,3 \pm 4,6$  в контрольной ( $p=0,05$ ), для пробы на руке –  $3,3 \pm 1,4$  и  $5,3 \pm 2,8$  соответственно ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, для клинического использования наибольший интерес представляют именно функциональные нагрузочные пробы на систему микроциркуляции, особенно комплексные, а не единичное измерение базового уровня кровотока.

### Другие применения в клинике

Как уже говорилось, метод ЛДФ еще не вошел в клиническую практику, тем не менее проведено достаточно много исследований, позволяющих

говорить о возможности и перспективности такого внедрения в ближайшее время. Одна из задач для клиницистов, потенциально решаемая методом ЛДФ, – объективизация тех или иных воздействий на систему микроциркуляции крови во время проведения терапевтических процедур. Любые физические воздействия в физиотерапии, действие ионизирующего излучения в радиологии, эффект от применения лекарственных препаратов, влияющих на микроциркуляцию (например, нитроглицерина), – все это можно рассматривать как разновидность функциональных нагрузочных тестов на систему микроциркуляции крови. Если оптическое волокно прибора не снимать во время проведения терапевтической процедуры и до начала процедуры в стандартных условиях по температуре, положению пациента (сидя, лежа) и т.д. прописать начальное значение  $ПМ(t)$ , то относительное изменение показателя во время проведения процедуры и сразу после нее может дать врачу дополнительную информацию о функционировании системы микроциркуляции крови у пациента и ее острой ответной реакции на конкретное терапевтическое воздействие. В частности, ранее нами [25] была проведена экспериментальная объективизация методом ЛДФ реакции системы микроциркуляции крови на действие экзогенного оксида азота (NO) при лечении заболеваний ЛОР-органов. В ходе проведения исследований было экспериментально показано достоверное усиление микроциркуляции крови как в слизистой полости носа при непосредственном обдуве полости носа NO-содержащим газовым потоком, так и в барабанной перепонке уха при обдуве NO-содержащим газовым потоком кожи заушной области. На рис. 8 представлена ЛДФ-грамма, записанная при воздействии NO-содержащего газового потока на носовую полость. Как видно, после начала обдува (обдув показан пунктирными линиями) происходит заметное усиление уровня микроциркуляции ( $p < 0,005$ ), а после окончания обдува эффект усиления микроциркуляции сохраняется еще некоторое время. Эксперимент «плацебо» в этой работе с аналогичным обдувом воздухом без NO подтвердил, что стимуляция микроциркуляции в данном случае происходит именно за счет действия молекул NO. Следовательно, была доказана возможность проведения NO-терапии, стимулирующей микроциркуляцию в тканях ЛОР-органов. Полученные в данной работе результаты имеют принципиальное значение для обоснования применения метода NO-терапии в клинической практике с целью активации регенеративных процессов у больных, перенесших различные операции,

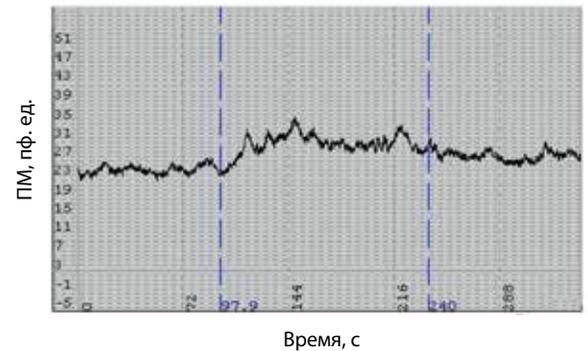


Рис. 8. ЛДФ-грамма, записанная при воздействии NO-содержащего газового потока на носовую полость

в том числе в полости носа, околоносовых пазухах и ухе.

Аналогично в работе 2011 г. [26], а также в последующих обзорах [27, 28] нами показана возможность объективизации стимуляции микроциркуляции крови при процедурах низкоинтенсивной лазерной терапии. Стимуляция микроциркуляции крови считалась долгое время одним из основных клинических эффектов действия низкоинтенсивного лазерного излучения во время процедур низкоинтенсивной лазерной терапии. Подразумевалось, что сеансы терапии проводятся при дозировках, исключающих нагрев тканей за счет поглощения излучения более чем на  $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$  (так называемая холодная терапия [29]), а эффект стимуляции реализуется за счет каких-либо фотофизических, фотохимических или нервно-рефлекторных механизмов, никак не связанных с нагревом. Однако в процессе цитируемых инструментальных исследований, в том числе с помощью метода ЛДФ, было объективно показано, что стимуляция микроциркуляции крови происходит в процессе лазерной терапии не так часто, как это иногда декларируют некоторые медицинские первоисточники, а связана она, в подавляющем большинстве случаев, именно с нагревом тканей от действия излучения.

Логично предположить, что подобный объективный мониторинг динамики микроциркуляции крови возможен и при других терапевтических процедурах, например, при процедурах магнитотерапии в физиотерапии. В нашей статье 2008 г. [30] содержится другой пример – влияния ионизирующего излучения на микроциркуляцию при лучевой терапии опухолей. С учетом патогенетической роли микроциркуляторных нарушений в развитии инсулинорезистентности, а также влияния хронической гипергликемии на состояние кожной микроциркуляции крови, можно предполагать



перспективность данного подхода для оценки эффективности медикаментозной терапии сахарного диабета [31]. Особенно интересным может быть исследование, связанное с влиянием типа микроциркуляции крови (спастический, гиперемический, нормоциркуляторный) на эффективность тех или иных физиотерапевтических процедур или процедур медикаментозной терапии [22]. Из литературы результаты такого исследования пока не известны.

## Заключение

Человек, как объект диагностики параметров микрогемодинамики, измеряемых *in vivo* методом ЛДФ, является в общем случае динамически изменчивой системой с широким диапазоном физиологического разброса показателей в норме. Относительный индивидуальный физиологический разброс результатов измерений в ЛДФ среднего уровня показателя микроциркуляции  $ПМ(t)$  находится в диапазоне не менее  $\pm 35\%$  по уровню среднего квадратического отклонения ( $\sigma$ ) от среднего вычисленного значения  $M$ . Если же принимать доверительную вероятность безошибочного результата в 95% (обычная практика при измерениях в медицине), то есть оценивать результат по уровню  $2\sigma$ , разброс показателей в норме возрастает

до  $\pm 70\%$ , что может поставить под сомнение ряд результатов работ других авторов по дифференциальной диагностике «норма/патология» по критериям, различающимся между собой на меньшую величину. Диагностические же критерии по результатам функциональных нагрузочных проб на систему микроциркуляции крови, выполнение которых может быть методически строго нормировано и регламентировано, наоборот, оказываются более метрологически надежными и достоверными по сравнению с данными исследований параметров в фоновых (базовых) тестах без нагрузок. Это позволяет говорить о возможности внедрения функциональных проб в клиническую практику уже на данном этапе исследований. При этом спектр их применения в клинике может быть широк – от функциональной диагностики и раннего выявления нарушений микрогемодинамики при сахарном диабете, артериальной гипертензии и других заболеваниях, ассоциированных с нарушениями в системе микроциркуляции крови, до обоснования параметров воздействия и объективизации эффективности проведения тех или иных терапевтических процедур, процедур физиотерапии, например, направленных на стимулирование микроциркуляторных функций в тканях и органах пациента. ☺

## Литература

- Wright CL, Kroner CI, Draijer R. Non-invasive methods and stimuli for evaluating the skin's microcirculation. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2006;54(1):1–25. doi: 10.1016/j.vascn.2005.09.004.
- Roustit M, Cracowski JL. Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation*. 2012;19(1):47–64. doi: 10.1111/j.1549-8719.2011.00129.x.
- Gurfinkel Yu. Computer capillaroscopy as a channel of local visualization, noninvasive diagnostics, and screening of substances in circulating blood. Proc. SPIE; 4241. Saratov Fall Meeting 2000: Optical Technologies in Biophysics and Medicine II (May 4, 2001). p. 467. doi: 10.1117/12.431560.
- Allen J. Photoplethysmography and its application in clinical physiological measurement. *Physiol Meas*. 2007;28(3):R1–39.
- Крупаткин АИ, Сидоров ВВ, ред. Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови. М.: Медицина; 2005. 125 с.
- Рогаткин ДА. Физические основы оптической оксиметрии. Лекция. Медицинская физика. 2012;(2):97–114.
- Иваницкий ГР, Хижняк ЕП, Деев АА. Биофизические основы медицинского тепловидения. *Биофизика*. 2012;57(1):130–9.
- Бессонов АС, Колбас ЮЮ, Лапитан ДГ. Информационные технологии в разработке медицинского аппаратно-программного комплекса для функциональной диагностики системы микроциркуляции крови. *Медицинская физика*. 2011;(2):74–83.
- Kimura Y, Goma M, Onoe A, Higurashi E, Sawada R. Integrated laser Doppler blood flowmeter designed to enable wafer-level packaging. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2010;57(8):2026–33. doi: 10.1109/TBME.2010.2043842.
- Spigulis J, Ertz R, Nikiforovs V, Kviesis-Kipge E. Wearable wireless photoplethysmography sensors. Proc. SPIE; 6991. Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care (May 02, 2008). p. 69912O. doi: 10.1117/12.801966.
- Bonner RF, Nossal R. Model for laser Doppler measurements of blood flow in tissue. *Appl Opt*. 1981;20(12):2097–107. doi: 10.1364/AO.20.002097.
- Крупаткин АИ, Сидоров ВВ. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем: колебания, информация, нелинейность. Руководство для врачей. М.: ЛИБРОКОМ; 2013. 496 с.
- Чуян ЕН, Трибрат НС, Раваева МЮ, Ананченко МН. Активные механизмы регуляции процессов микроциркуляции: влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона. *Физика живого*. 2008;16(1):82–90.
- Swiontkowski MF. *Laser Doppler Flowmetry – Development and Clinical Application*. Iowa Orthop J. 1991;11:119–26.
- Agarwal SC, Allen J, Murray A, Purcell IF. Comparative reproducibility of dermal microvascular blood flow changes in response to acetylcholine iontophoresis, hyperthermia and reactive hyperaemia. *Physiol Meas*. 2010;31(1):1–11. doi: 10.1088/0967-3334/31/1/001.
- Nilsson GE, Salerud EG, Stromberg NOT, Wardell K. Laser Doppler Perfusion Monitoring and Imaging. In: Vo-Dinh T, editor. *Biomedical photonics handbook*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2003. p. 15:1–24.
- Рогаткин ДА, Лапитан ДГ, Колбас ЮЮ, Шумский ВИ. Индивидуальная вариабельность параметров микроциркуляции крови и проблемы функциональной диагностики системы микроциркуляции. *Функциональная диагностика*. 2012;(4):24–9.
- Dunaev AV, Sidorov VV, Stewart NA, Sokolovski SG, Rafailov EU. Laser reflectance oximetry and Doppler flowmetry in assessment of complex physiological parameters of cutaneous blood microcirculation. Proc. SPIE;



8572. *Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic Systems XI* (March 22, 2013). p. 857205. doi: 10.1117/12.2001797.
19. Сидоров ВВ, Ронкин МА, Максименко ИМ, Щербанина ВЮ, Уколов ИА. Физические основы метода лазерной доплеровской флоуметрии и его применение в неврологической практике. *Биомедицинские технологии и радиоэлектроника*. 2003;(12):26–35.
20. Рогаткин ДА, Дунаев АВ, Лапаева ЛГ. Метрологическое обеспечение методов и приборов неинвазивной медицинской спектродофотометрии. *Медицинская техника*. 2010;(2):30–7.
21. Rogatkin DA, Lapaeva LG, Bychenkov OA, Tereshchenko SG, Shumskii VI. Principal Sources of Errors in Noninvasive Medical Spectrophotometry. Part 1. Physicotechnical Sources and Factors of Errors. *Measurement Techniques*. 2013;56(2):201–10.
22. Rogatkin D, Shumskiy V, Tereshenko S, Polyakov P. Laser-based non-invasive spectrophotometry – an overview of possible medical applications. *Photonics & Lasers in Medicine*. 2013;2(3):225–40. doi: 10.1515/plm-2013-0010.
23. Губа ГП. Неврологические симптомы, синдромы и функциональные пробы. Киев: Здоров'я; 1969. 300 с.
24. Глазков АА, Куликов ДА, Древаль АВ, Ковалева ЮА, Шумский ВИ, Рогаткин ДА. Разработка способа диагностики нарушений микроциркуляции крови у больных сахарным диабетом методом лазерной доплеровской флоуметрии. *Альманах клинической медицины*. 2014;31:7–10.
25. Лапитан ДГ, Рогаткин ДА, Свистушкин ВМ, Шевчик ЕА, Ратова АВ, Голубовский ГА. Медико-физические аспекты стимуляции микроциркуляции крови экзогенным NO при лечении заболеваний ЛОР-органов. *Медицинская физика*. 2012;(1):61–8.
26. Рогаткин ДА, Макаров ДС, Быченков ОА, Щербаков МИ. Тепловизионный контроль процессов нагрева и микроциркуляции крови при проведении низкоинтенсивных лазерных терапевтических процедур. *Оптический журнал*. 2011;78(10):38–45.
27. Рогаткин Д, Дунаев А. Стимуляция микроциркуляции крови при низкоинтенсивной лазерной терапии. Часть 1. История вопроса и методы исследований. *Врач*. 2015;(7):18–23.
28. Рогаткин Д, Дунаев А. Стимуляция микроциркуляции крови при низкоинтенсивной лазерной терапии. Часть 2. Результаты и обсуждение. *Врач*. 2015;(8):16–23.
29. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng*. 2012;40(2):516–33. doi: 10.1007/s10439-011-0454-7.
30. Рогаткин ДА, Быченков ОА, Поляков ПЮ. Неинвазивная медицинская спектродофотометрия в современной радиологии: вопросы точности и информативности результатов измерений. *Альманах клинической медицины*. 2008;17(1):83–7.
31. Franklin VL, Khan F, Kennedy G, Belch JJ, Greene SA. Intensive insulin therapy improves endothelial function and microvascular reactivity in young people with type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(2):353–60.

## References

1. Wright CI, Kroner CI, Draijer R. Non-invasive methods and stimuli for evaluating the skin's microcirculation. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2006;54(1):1–25. doi: 10.1016/j.vascn.2005.09.004.
2. Roustit M, Cracowski JL. Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation*. 2012;19(1):47–64. doi: 10.1111/j.1549-8719.2011.00129.x.
3. Gurfinkel Yu. Computer capillaroscopy as a channel of local visualization, noninvasive diagnostics, and screening of substances in circulating blood. *Proc. SPIE*; 4241. Saratov Fall Meeting 2000: Optical Technologies in Biophysics and Medicine II (May 4, 2001). p. 467. doi: 10.1117/12.431560.
4. Allen J. Photoplethysmography and its application in clinical physiological measurement. *Physiol Meas*. 2007;28(3):R1–39.
5. Krupatkin AI, Sidorov VV, editors. *Lazernaya doplerovskaya floumetriya mikrotsirkulyatsii krovi* [Laser Doppler flowmetry for measurement of blood microcirculation]. Moscow: Meditsina; 2005. 125 p. (in Russian).
6. Rogatkin DA. *Fizicheskie osnovy opticheskoy oksimetrii* [Physical foundations of optical oximetry]. *Meditsinskaya fizika* [Medical Physics]. 2012;(2):97–114 (in Russian).
7. Ivanitsky GR, Khizhnyak EP, Deev AA. Biophysical basis of medical thermovision. *Biophysics*. 2012;57(1):106–14. doi: 10.1134/S0006350912010125.
8. Bessonov AS, Kolbas YuYu, Lapitan DG. *Informatsionnye tekhnologii v razrabotke meditsinskogo apparatno-programmnogo kompleksa dlya funktsional'noy diagnostiki sistemy mikrotsirkulyatsii krovi* [Information technologies in development of the medical hardware-software system for functional diagnostics of the blood microcirculation system]. *Meditsinskaya fizika* [Medical Physics]. 2011;(2):74–83 (in Russian).
9. Kimura Y, Goma M, Onoe A, Higurashi E, Sawada R. Integrated laser Doppler blood flowmeter designed to enable wafer-level packaging. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2010;57(8):2026–33. doi: 10.1109/TBME.2010.2043842.
10. Spigulis J, Ertis R, Nikiforovs V, Kviesis-Kipge E. Wearable wireless photoplethysmography sensors. *Proc. SPIE*; 6991. *Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care* (May 02, 2008). p. 69912O. doi: 10.1117/12.801966.
11. Bonner RF, Nossal R. Model for laser Doppler measurements of blood flow in tissue. *Appl Opt*. 1981;20(12):2097–107. doi: 10.1364/AO.20.002097.
12. Krupatkin AI, Sidorov VV. *Funktsional'naya diagnostika sostoyaniya mikrotsirkulyatorno-tkanevykh sistem: kolebaniya, informativniy, nelineynost'*. *Rukovodstvo dlya vrachey* [Functional diagnostics of microcirculation-tissue systems: vibrations, information, non-linearity. Guidelines for doctors]. Moscow: LIBROKOM; 2013. 496 p. (in Russian).
13. Chuyan EN, Tribat NS, Ravaeva MYu, Ananchenko MN. *Aktivnye mekhanizmy regulyatsii protsessov mikrotsirkulyatsii: vliyaniye nizkointensivnogo elektromagnitnogo izlucheniya millimetrovogo diapazona* [Change of processes of microcirculation at influence of lowintensity electromagnetic radiation of the millimetric range]. *Physics of the Alive*. 2008;16(1):82–90 (in Russian).
14. Swionkowski MF. *Laser Doppler Flowmetry – Development and Clinical Application*. Iowa Orthop J. 1991;11:119–26.
15. Agarwal SC, Allen J, Murray A, Purcell IF. Comparative reproducibility of dermal microvascular blood flow changes in response to acetylcholine iontophoresis, hyperthermia and reactive hyperaemia. *Physiol Meas*. 2010;31(1):1–11. doi: 10.1088/0967-3334/31/1/001.
16. Nilsson GE, Salerud EG, Stromberg NOT, Wardell K. *Laser Doppler Perfusion Monitoring and Imaging*. In: Vo-Dinh T, editor. *Biomedical photonics handbook*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2003. p. 15:1–24.
17. Rogatkin DA, Lapitan DG, Kolbas YuYu, Shumskiy VI. *Individual'naya variabel'nost' parametrov mikrotsirkulyatsii krovi i problemy funktsional'noy diagnostiki sistemy mikrotsirkulyatsii* [Individual variability of blood microcirculation parameters and problems of functional diagnostics of microcirculation system]. *Funktsional'naya diagnostika*. 2012;(4):24–9 (in Russian).
18. Dunaev AV, Sidorov VV, Stewart NA, Sokolovskiy SG, Rafailov EU. *Laser reflectance oximetry and Doppler flowmetry in assessment of complex physiological parameters of cutaneous blood microcirculation*. *Proc. SPIE*; 8572. *Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic Systems XI* (March 22, 2013). p. 857205. doi: 10.1117/12.2001797.



19. Sidorov VV, Ronkin MA, Maksimenko IM, Shcherbanina VYu, Ukolov IA. Fizicheskie osnovy metoda lazernoy dopplerovskoy floumetrii i ego primeneniye v nevrologicheskoy praktike [Physical basis of Laser Doppler Flowmetry and its application in neurological practice]. *Biomeditsinskie tekhnologii i radioelektronika*. 2003;(12):26–35 (in Russian).
20. Rogatkin DA, Lapaeva LG, Dunaev AV. Metrological support of methods and devices for noninvasive medical spectrophotometry. *Biomedical Engineering*. 2010;44(2):66–70. doi: 10.1007/s10527-010-9157-x
21. Rogatkin DA, Lapaeva LG, Bychenkov OA, Tereshchenko SG, Shumskii VI. Principal Sources of Errors in Noninvasive Medical Spectrophotometry. Part 1. Physicotechnical Sources and Factors of Errors. *Measurement Techniques*. 2013;56(2):201–10.
22. Rogatkin D, Shumskiy V, Tereshenko S, Polyakov P. Laser-based non-invasive spectrophotometry – an overview of possible medical applications. *Photonics & Lasers in Medicine*. 2013;2(3):225–40. doi: 10.1515/plm-2013-0010.
23. Guba GP. Nevrologicheskie simptomyy, sindromyy i funktsional'nye proby [Neurological symptoms, syndromes and functional tests]. Kiev: Zdorov'ya; 1969. 300 p. (in Russian).
24. Glazkov AA, Kulikov DA, Dreval' AV, Koval'eva YuA, Shumskiy VI, Rogatkin DA. Razrabotka sposoba diagnostiki narusheniy mikrotsirkulyatsii krovi u bol'nykh sakharnym diabetom metodom lazernoy dopplerovskoy floumetrii [Development of non-invasive method for blood microcirculation disorders diagnostics in diabetic patients using laser Doppler flowmetry]. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny*. 2014;31:7–10 (in Russian).
25. Lapitan DG, Rogatkin DA, Svistushkin VM, Shevchik EA, Ratova AV, Golubovskiy GA. Mediko-fizicheskie aspekty stimulyatsii mikrotsirkulyatsii krovi ekzogennym NO pri lechenii zabolevaniy LOR-organov [Medical and physical aspects of stimulation of blood microcirculation by exogenous NO in a treatment of ENT diseases]. *Meditsinskaya fizika [Medical Physics]*. 2012;(1):61–8 (in Russian).
26. Rogatkin DA, Shcherbakov MI, Makarov DS, Bychenkov OA. Thermal-vision monitoring of processes of heating and microcirculation of blood accompanying low-intensity laser therapeutic procedures. *Journal of Optical Technology*. 2011;78(10):666–71. doi: 10.1364/JOT.78.000666.
27. Rogatkin D, Dunaev A. Stimulyatsiya mikrotsirkulyatsii krovi pri nizkointensivnoy lazernoy terapii. Chast' 1. Istoriya voprosa i metody issledovaniy [Stimulation of blood microcirculation during low-intensity laser therapy. Part 1: historical background and study methods]. *Vrach*. 2015;(7):18–23 (in Russian).
28. Rogatkin D, Dunaev A. Stimulyatsiya mikrotsirkulyatsii krovi pri nizkointensivnoy lazernoy terapii. Chast' 2. Rezul'taty i obsuzhdeniye [Stimulation of blood microcirculation during low-intensity laser therapy. Part 2. Results and discussion]. *Vrach*. 2015;(8):16–23 (in Russian).
29. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng*. 2012;40(2):516–33. doi: 10.1007/s10439-011-0454-7.
30. Rogatkin DA, Bychenkov OA, Polyakov PYu. Neinvazivnaya meditsinskaya spektrofotometriya v sovremennoy radiologii: voprosy tochnosti i informativnosti rezul'tatov izmereniy [Noninvasive spectrophotometry in the modern radiology: problems of accuracy and informativeness of diagnostic results]. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny*. 2008;17(1):83–7 (in Russian).
31. Franklin VL, Khan F, Kennedy G, Belch JJ, Greene SA. Intensive insulin therapy improves endothelial function and microvascular reactivity in young people with type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(2):353–60.

## Functional studies on blood microcirculation system with laser Doppler flowmetry in clinical medicine: problems and prospects

Lapitan D.G.<sup>1</sup> • Rogatkin D.A.<sup>1</sup>

The paper presents a review of the research update on the blood microcirculation system assessed with laser Doppler flowmetry (LDF). Specific procedures for measurement of the microcirculation index by LDF and individual variability of microcirculation parameters during their real time assessment *in vivo* are discussed. In physiological conditions, a relative deviation of the results of measurements by LDF is within the range  $\pm 35\%$  and above from the mean value of the microcirculation index. This imposes certain limitations on the interpretation of the diagnostic results in terms of the "normal or pathologic". Specifics of performance of functional stress tests on the microcirculation system are reviewed. Diagnostic criteria based on functional stress testing of the microcirculation system, which can be implemented with methodologically strict norms and regulations, for examples, those for the occlusion test, are more reliable from metrologic

perspective and significant compared to the results obtained without stress testing. Problems of implementation of the functional tests into clinical practice are discussed. It was shown that they may have a potentially wide spectrum of clinical indications, from functional diagnostics and early detection of microcirculatory abnormalities in diabetes mellitus, arterial hypertension and other diseases associated with microcirculatory disorders, to the physical rationale of exposure parameters, as well as objectification of efficiency of medical procedures aimed to stimulation of the microcirculatory functions in a patient's tissues and organs.

**Key words:** blood microcirculation system, laser Doppler flowmetry, functional tests, index of blood microcirculation, blood perfusion, variability

**Lapitan Denis G.** – Research Fellow, Laboratory of Medical and Physics Research<sup>1</sup>  
 ✉ 61/2–8 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 681 89 84.  
 E-mail: lapitandenis@mail.ru

**Rogatkin Dmitriy A.** – PhD (in Engineering), Head of Laboratory of Medical and Physics Research<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation



# Ускорительные и радионуклидные технологии в клинической медицине

Черняев А.П.<sup>1,2</sup> • Варзарь С.М.<sup>1</sup>

**Черняев Александр Петрович** – д-р физ.-мат. наук, профессор, заведующий кафедрой физики ускорителей и радиационной медицины физического факультета<sup>1</sup>; заведующий лабораторией пучковых технологий и медицинской физики<sup>2</sup>

**Варзарь Сергей Михайлович** – канд. физ.-мат. наук, доцент кафедры физики ускорителей и радиационной медицины физического факультета<sup>1</sup>  
✉ 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1/2, физический факультет МГУ, Российская Федерация  
Тел.: +7 (495) 939 49 46.  
E-mail: varzar@physics.msu.ru

В клиническую практику современной медицины все активнее проникают методы, основанные на использовании ускорительных и радионуклидных технологий. Цель данного обзора – показать роль ядерно-физических методов в лечении и диагностике заболеваний. Проанализированы данные, опубликованные в течение последних 50 лет в научных статьях, отчетах и других открытых источниках. Рассмотрены особенности применения

в лучевой терапии и ядерной медицине ускорителей электронов и тяжелых заряженных частиц, приведены сведения о распространенности ускорителей и другой высокотехнологичной медицинской техники в России и в мире.

**Ключевые слова:** медицинская физика, ионизирующие излучения, медицинские ускорители, ядерная медицина

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-260-268

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1, Российская Федерация

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт ядерной физики имени Д.В. Скобельцына Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1/2, Российская Федерация

**В** конце XIX века исследование строения вещества привело к открытию излучений, проникающих через непрозрачные среды. В 1895 г. В. Рентген обнаружил, что при попадании на анод катодных лучей возникают X-лучи – рентгеновское излучение, в 1896 г. А. Беккерель открыл способность испускать излучение солями урана. Оба вида лучей при прохождении через вещество ионизировали его и приводили к изменению его структуры.

Практически с момента открытия ионизирующих излучений началось их использование в различных отраслях мирового хозяйства, и в первую очередь в медицине. Структура применения ионизирующих излучений в медицине включает в себя несколько основных направлений: рентгеновскую диагностику и терапию, лучевую терапию и ядерную медицину (рисунок).

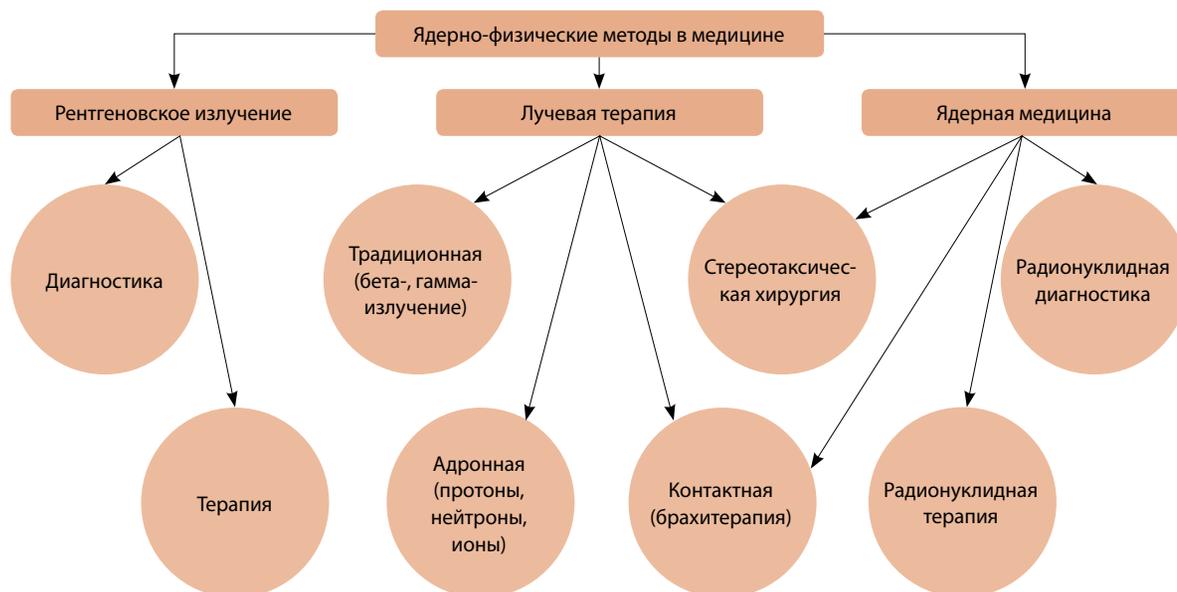
По последним оценкам [1, 2, 3], в медицине, не считая рентгеновские аппараты, используются более 110 тысяч единиц техники, действие которых основано на технологиях ядерной физики, в том числе около 14 000 ускорителей

электронов и протонов, порядка 100 реакторов, 1500 кобальтовых установок, примерно по 300 гамма-ножей и кибер-ножей, более 2200 аппаратов для брахитерапии. Кроме того, существует диагностическое оборудование: порядка 30 000 установок магнитно-резонансной томографии, 40 000 компьютерных томографов и 4000 позитронно-эмиссионных сканеров, входящих в состав 600 центров позитронно-эмиссионной томографии.

Ниже приводится анализ данных о распространенности в области медицины методов, основанных на использовании пучковых и радионуклидных технологий.

## Медицинские ускорители

По мере развития науки для экспериментального исследования вещества и явлений на субатомном уровне стало не хватать энергии и интенсивности пучков частиц от естественных изотопов. В конце 20-х – начале 30-х гг. прошлого века были разработаны и запущены первые ускорители: линейный ускоритель Видероэ (1928), каскадный



Структура использования ионизирующих излучений в медицине

ускоритель (1929), электростатический генератор Ван де Граафа (1931), циклотрон (1931).

Ускорители в медицине начали использовать менее чем через 10 лет после их создания. Уже в 1937 г. в Лондоне высоковольтный ускоритель был применен для лечения онкологических заболеваний. Активное проникновение ускорительной техники в медицину связывают с 1970-ми [4]. К этому времени в данной отрасли работало уже более 300 ускорителей различных типов (157 бетатронов, 118 линейных ускорителей, 22 ускорителя Ван де Граафа и 9 резонансных трансформаторов). Были проведены пробные эксперименты по использованию ускорителей протонов – их действовало 4, в том числе 2 в нашей стране.

С 1980-х гг. линейные ускорители электронов существенно уменьшились в размере и стали удобными для использования в лучевой терапии [2]. Они начали вытеснять доминировавшие до этого бетатроны и кобальтовые установки. Уже к 2000 г. в мире количество медицинских ускорителей достигло 5000 [5, 6, 7], сегодня возросло почти до 12000 [1, 3, 8, 9, 10, 11]. Если темпы роста числа медицинских ускорителей сохраняются, то, к примеру, к 2020 г. их будет более 20000.

Сегодня медицинские ускорители есть в 117 странах мира, причем подавляющее большинство – более 9500 аппаратов – сконцентрированы в 17 ведущих государствах. По данным Международного агентства по атомной энергии, из 17 стран, использующих в области медицины более 100 ускорителей, Российская Федерация

занимает 13-е место по числу аппаратов и 15-е по количеству жителей на один ускоритель (табл. 1) [10].

С начала 1990-х гг. основными производителями ускорительной техники стали компании Varian, Elekta, IBA, до некоторого времени – Siemens и Philips. Бурный рост продаж медицинских ускорителей способствовал тому, что их суммарный выпуск составил от 700 до 1000 аппаратов в год.

Роль ускорительной техники постоянно повышается. Такая тенденция наблюдается не только в медицине, но и в других отраслях мирового хозяйства. Сегодня в мире действует около 40 тысяч ускорителей [1, 3]. Из них в фундаментальной науке работает чуть более 3%, в то время как в промышленности и сельском хозяйстве – более 60%, а в медицинских учреждениях – 35%. По некоторым оценкам, к 2020 г. их общее количество может превысить 50 тысяч единиц.

Согласно имеющимся данным [10, 12], в России по состоянию на начало 2014 г. действовало примерно 400 ускорителей электронов и 50 ускорителей протонов. В нашей стране распределение ускорителей по отраслям народного хозяйства значительно отличается от мирового. Так, в науке задействовано около 20% работающих в стране аппаратов, в промышленности – 43%, в медицине – 37%. Основная часть (около 90%) медицинских ускорителей используется для лучевой терапии, остальные – для протонной или ионной лучевой терапии, а также производства

**Таблица 1.** Медицинские ускорители в ведущих странах мира (по данным Международного агентства по атомной энергии, источник [10])

Государство	Население на 1 ускоритель, тыс. жителей	Население страны, млн чел.	Количество ускорителей, шт.
США	79	321,3	4085
Китай	1231	1374,9	1117
Япония	152	126,9	833
Германия	158	81,2	515
Франция	140	64,2	458
Италия	156	60,8	389
Великобритания	207	64,8	313
Бразилия	713	203,3	285
Канада	130	34,7	267
Испания	217	46,4	214
Индия	6144	1284,1	209
Турция	440	78,7	179
Россия	909	140	154
Польша	271	38,5	142
Австралия	180	24,8	138
Нидерланды	134	16,9	126
Южная Корея	421	51,4	122
Всего			9546

радиоизотопов в целях диагностики в центрах позитронно-эмиссионной томографии и для технологий ядерной медицины.

### Ускорители в лучевой терапии

Из 14 тысяч медицинских ускорителей, работающих в разных странах мира, более 13 тысяч – это линейные ускорители электронов. Ускорителей тяжелых заряженных частиц (протонов и ионов) в медицине используется около тысячи [1, 3].

#### Ускорители электронов

Как отмечалось выше, линейные ускорители электронов с 1980-х гг. стали основным инструментом лучевой терапии. В подавляющем числе случаев медицинские ускорители используют для получения тормозных фотонов, которые генерируются

при торможении электронов. Обычно максимальная энергия электронов в ускорителе составляет от 6 до 25 МэВ, а для совпадения границ опухоли с максимальной дозой облучения его проводят с нескольких направлений при меняющейся интенсивности пучка фотонов (метод лучевой терапии с модуляцией интенсивности пучка – англ. intensity-modulated radiation therapy, IMRT).

Основной прогресс в конструкции линейных ускорителей электронов был связан с улучшением элементов и систем, генерирующих излучение, а также совершенствованием способов формирования дозового поля. В результате в современных моделях реализован ряд уникальных технологий, к последним из которых относятся метод IMRT и лучевая терапия с визуальным контролем (англ. image-guided radiation therapy, IGRT).

Пучки электронов применяются в лучевой терапии существенно реже и для облучения опухолей, расположенных вблизи поверхности [13]. Тем не менее появляются предложения по расширению применимости электронного излучения в медицине путем повышения энергии и размещения облучаемой области в сильном магнитном поле [14].

Одним из направлений применения электронных пучков выступает интраоперационная лучевая терапия. Подход предполагает облучение пучками электронов во время операции ложа опухоли с целью уничтожения онкологических клеток, оставшихся в ткани после проведения хирургической операции. Метод был опробован примерно в 200 онкологических центрах мира, однако его перспективы оценивались скептически, так как хирургическая операция и последующее облучение на медицинском линейном ускорителе могли проводиться только в разных помещениях: в операционной и ускорительном зале [13]. Это требовало серьезных усилий, направленных на то, чтобы избежать заражения раны при транспортировке пациента из операционной в ускорительный зал и обратно. В 1990-е гг. эта проблема была решена с появлением компактных комплексов, которые могут располагаться непосредственно в операционной комнате. Первым из них, прошедшим все необходимое лицензирование, стал американский комплекс Mobetron.

Имеется задел в области аппаратов для интраоперационной лучевой терапии и в России. Например, в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова совместно с Техническим университетом Каталонии разработан проект комплекса на базе разрезного микротрона с энергией пучка электронов от 4 до



12 МэВ. Уникальность предлагаемого ускорителя заключается в его габаритах, которые позволяют поместить аппарат в небольшом контейнере с геометрическими размерами  $24 \times 13 \times 48 \text{ см}^3$ . Вес микротрона не превышает 120 кг, а потребляемая от сети мощность составляет около 1 кВт [15].

Последние 10–15 лет характеризуются активным развитием стереотаксической радиохирургии, заключающейся в однократном подведении к опухоли высокой дозы с целью ее полного разрушения. Главными радиохирургическими аппаратами признаны гамма-нож и кибер-нож. Но при некоторых локализациях опухолей необходимые дозы могут быть подведены к мишени с помощью модифицированных медицинских ускорителей, в которых реализуется принцип «двойной дуги»: ускоритель вращается вокруг изоцентра в вертикальной плоскости, а лечебный стол – в горизонтальной.

Гамма-нож основан на создании дозового поля с помощью большого числа кобальтовых источников, излучение которых направлено в одну точку [16, 17]. «Ускорительной» альтернативой гамма-ножу стала система, получившая название «кибер-нож» [18]. Установка содержит два основных элемента: легкий линейный ускоритель и мобильную контролируруемую компьютером роботизированную руку, имеющую 6 степеней свободы. Ускоритель, управляемый компьютером, может в одном сеансе облучать опухоль и множество метастазов (с 1200 возможных направлений), что невозможно в хирургической операции. Энергия ускорителя электронов, на котором базируется установка, составляет 4 или 6 МэВ. При помощи кибер-ножа возможно проводить неизоцентрическое облучение мишени, а также осуществлять несимметричное и в высокой степени конформное облучение мишени с точностью до 0,5 мм. Кибер-нож позволяет облучать большее количество локализаций в теле человека, чем гамма-нож, и представляет собой одно из наиболее ярких достижений ускорительной техники в медицине [19].

Сегодня в мире функционирует более 300 кибер-ножей [20] и 300 гамма-ножей, причем больше половины установок приходится на США и Японию [21]. В России стереотаксическая радиохирургия также значительно продвинулась вперед: по общему количеству таких установок наша страна за последние 3–4 года переместилась с 30–40-х мест на 10-е.

Разрабатываются установки, позволяющие одновременно совмещать методы лучевой терапии с диагностическими. Например, так называемая томотерапия объединяет в себе возможности компьютерной томографии и радиохирургического

уничтожения онкологических очагов пучками тормозных фотонов из ускорителя электронов [22].

#### Ускорители протонов и ионов

С конца 1950-х гг. физики совместно с медиками стали проводить исследования по использованию в медицине ускорителей тяжелых заряженных частиц – протонов, ионов и пионов [23]. Основным преимуществом таких установок считается то, что энергия частиц передается веществу в конце пробега, то есть в глубинном распределении дозы возникает так называемый пик Брэгга. При энергии протонов 200–250 МэВ пик в биологических тканях располагается на глубине 10–15 см, что оказывается удобным для проведения лучевой терапии. По сравнению с пучком электронов пучки тяжелых заряженных частиц обладают и многими другими преимуществами, например, малым углом рассеяния.

До начала 1990-х гг. в мире работало 23 центра протонной и ионной терапии, которые располагались в научных институтах и использовали пучки из исследовательских ускорителей [24, 25]. Здесь были получены клинические результаты, подтвердившие перспективность и конкурентную способность этого метода лечения. Первый клинический центр протонной лучевой терапии открылся в университете Лома Линда (США) в 1990 г. В наши дни в 19 странах мира действует более 50 центров протонной лучевой терапии, а еще около 50 центров находятся в стадии проектирования или строительства. Пучки ионов углерода используются в 9 центрах, строится еще 5 таких центров [24].

Из примерно 100 действующих и создаваемых (разрабатываемых) центров протонной и ионной лучевой терапии в нашей стране расположено 6. Протонная лучевая терапия продолжает развиваться в Институте теоретической и экспериментальной физики (Москва), в Объединенном институте ядерных исследований (Дубна) и в Петербургском институте ядерной физики им. Б.П. Константинова (Гатчина). Создаются центры протонной терапии на базе ядерных центров Троицка и Димитровграда, углеродной терапии в Институте физики высоких энергий (Протвино) [25]. Для того чтобы достигнуть уровня ведущих стран мира, нам необходимо построить до 20 клинических центров протонной и ионной лучевой терапии.

#### Ускорители в ядерной медицине

Ядерная медицина включает в себя радионуклидную диагностику и терапию с использованием



радиоактивных изотопов. Для этих целей применяются естественные и искусственные изотопы, которые получают либо при переработке горных пород, либо на ускорителях или в реакторах.

В мире в ядерной медицине [26, 27] для наработки радионуклидов действует около 1000 ускорителей заряженных частиц (в России – 20), а также около 100 реакторов (в России – 7). Большинство этих ускорителей генерируют пучки протонов с энергией от 7 до 70 МэВ, однако в последнее время развивается ряд методик получения изотопов на ускорителях электронов [28].

Как правило, современные центры позитронно-эмиссионной томографии создаются на основе ускорителей, например, циклотронов. В таких центрах разных стран мира работают около 600 протонных ускорителей [27].

### Радионуклидные технологии в медицине

Радионуклиды в лучевой терапии

Открытое в 1896 г. А. Беккерелем явление естественной радиоактивности некоторых веществ быстро нашло медицинское применение. Идея использования радиоизотопов в лечении онкологических заболеваний впервые была высказана еще в 1901 г. французским физиком П. Кюри. В 1910 г. американские ученые Д. Пасто и П. Дегрэ разработали методику лечения, обеспечивавшую доставку необходимой дозы радиоактивного вещества к предстательной железе. Немного позднее Б. Барринджер предложил метод введения радиоактивных микроисточников в опухоль с помощью специальных полых игл [1, 2].

Брахитерапия – вид лучевой терапии, в которой небольшой герметично упакованный источник излучения помещают внутрь зоны, требующей лечения, или рядом с ней. Радиоактивные вещества в этом случае не попадают непосредственно в организм, а облучают окружающие ткани через стенки капсулы. Одним из преимуществ брахитерапии по сравнению с дистанционной терапией признается быстрый спад дозы вследствие геометрического ослабления при удалении от радиоактивного источника. Как следствие, при брахитерапии облучению подвергается меньший объем здоровых тканей, и к опухоли можно подводить более высокие дозы, чем в дистанционной лучевой терапии [29, 30].

За всю историю в брахитерапии задействовано около полутора десятков радионуклидов. Начиная с 1930-х гг. в течение длительного периода широко использовали изотопы  $^{226}\text{Ra}$  и  $^{222}\text{Rn}$ ,

но по соображениям радиационной безопасности их применение почти прекращено. В настоящее время активно используются шесть радионуклидов:  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{192}\text{Ir}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{103}\text{Pd}$ ,  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ , существенно реже –  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{106}\text{Ru}$  и  $^{252}\text{Cf}$ . С точки зрения клинической практики из всех возможных изотопов наиболее удобными считаются  $^{125}\text{I}$ ,  $^{103}\text{Pd}$ ,  $^{131}\text{Cs}$  и  $^{60}\text{Co}$  [30].

В зависимости от специфики применения источники, содержащие радиоизотоп, изготавливаются, как правило, в форме капсул, которые обычно имеют двойные стенки (существуют, однако, и бескапсульные методики). При этом источники размещаются непосредственно в теле пациента. Их производят в виде игл, трубок, гранул, проволоки или таблеток [30, 31].

С 1950-х гг. радионуклиды стали широко применяться в дистанционной лучевой терапии, составив конкуренцию ускорителям. Установки, использующие радиоактивные изотопы, имели сравнимую с ускорителями интенсивность и энергию фотонов, но меньшие габариты. Первый аппарат для лучевой терапии с источником  $^{60}\text{Co}$  (период полураспада – 5 лет) был запущен в 1951 г. в Канаде. Особенно широко этот метод развивался в онкологическом институте Торонто. Кроме того, там же использовали источник  $^{137}\text{Cs}$  (период полураспада – 30 лет), были попытки задействовать  $^{192}\text{Ir}$ , имеющий период полураспада всего 74,5 дня [30].

В 1951 г. Л. Лексел предложил концепцию стереотаксической хирургии облучения мозга при помощи источников  $^{60}\text{Co}$  без вскрытия черепа человека, которую реализовал совместно с радиобиологом Б. Ларссоном в установках, получивших название «гамма-нож» [17]. Первая подобная операция была проведена в Стокгольме в 1968 г. Преимущество метода заключается в том, что множество пучков (в первой установке их было 179) от радиоактивных источников направляется в одну точку, где накапливаемая доза во много раз превышает таковую на поверхности тела человека. Таким образом, доза до 10 Гр подводится непосредственно к опухоли, что приводит к ее гибели, а здоровые ткани получают незначительную дозу облучения. Точность наведения пучков гамма-излучения достигает 0,3 мм. Гамма-нож позволяет лечить сосудистые новообразования, опухоли головного мозга, включая метастазы, без хирургического вмешательства и длительного многодневного облучения [17]. За все время было выпущено около 500 таких установок, а всего в мире сейчас эксплуатируется более 300 аппаратов [21].



## Радионуклиды в ядерной медицине

Принципиальной особенностью ядерной медицины является использование радиоактивных материалов в виде радиофармпрепаратов для диагностики и терапии заболеваний. Рождение радионуклидной диагностики связывают с именем Дж. Хэвеша, который в 1911 г. провел эксперименты на мышах по метаболизму с  $^{210}\text{Bi}$ . В клинической практике радионуклиды, а именно газ радон, впервые были применены в 1927 г. Г. Блумгартом и С. Вейсом для оценки гемодинамики у больных сердечной недостаточностью. Потенциальные возможности радионуклидной диагностики стали очевидны после открытия искусственной радиоактивности и развития методов наработки радионуклидов на ускорителях и в ядерных реакторах. К настоящему времени в диагностических целях используются около 90 изотопов [1, 31].

К современным средствам радионуклидной диагностики относятся гамма-камеры и однофотонные эмиссионные компьютерные томографы, которые регистрируют испускаемые радиоизотопами фотоны, а также позитронно-эмиссионные томографы.

В позитронно-эмиссионной томографии используются радионуклиды  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$  и  $^{18}\text{F}$ , распадающиеся с испусканием позитронов. Позитроны проходят в окружающих тканях расстояние, равное 1–3 мм, и в момент остановки аннигилируют с электроном среды. В результате аннигиляции образуются два фотона с энергией 0,511 МэВ, разлетающиеся в противоположных направлениях. Фотоны регистрируются двумя противоположно расположенными сцинтилляционными детекторами, а события, соответствующие одновременному приходу фотонов, родившихся в результате одного акта аннигиляции, отбираются схемой совпадений [31, 32].

Среди изотопов, применявшихся на начальном этапе развития радионуклидной терапии (1940–70-е гг.), наибольшее распространение получили  $^{32}\text{P}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ . Сегодня перечень нуклидов включает около 40 элементов, из них наиболее популярные – изотопы  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ . Интенсивные поисковые исследования ведутся в отношении радиофармпрепаратов на основе  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{117\text{m}}\text{Sn}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{149}\text{Tb}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{225}\text{Ac}$  ( $^{213}\text{Bi}$ ) и др. [33, 34].

Темпы развития направления по использованию радионуклидов в медицине столь велики, что только в США в 2014 г. доход рынка радиофармпрепаратов составил около 8 млрд долларов. По оценкам экспертов, рост мирового рынка

продукции и услуг ядерной медицины в 2015 г. достигнет 84 млрд долларов США [34].

## Высокотехнологичные медицинские аппараты в России

К началу XXI века развитие ускорительных и ядерных технологий привело к широкому внедрению в медицину аппаратов, основанных на их применении. В мире общее количество такой техники оценивается в 110 тысяч единиц. Из них 27 тысяч (24,5%) – это установки, нарабатывающие или использующие радионуклиды, причем их большая часть – 23 тысячи – работает в радионуклидной диагностике [1, 2].

В медицинских учреждениях и центрах России число высокотехнологичных медицинских аппаратов и комплексов насчитывает около 1,5 тысяч единиц, что при сравнении с уровнем обеспечения аналогичной техникой медицинских учреждений стран Европы составляет менее 30% (табл. 2) [1, 35, 36]. В стране работает немногим более 400 установок для дистанционной лучевой терапии: до 150 ускорителей электронов, 3 центра протонной терапии (еще 2 в настоящий момент находятся в процессе строительства), 9 кибер-ножей, около 200 дистанционных аппаратов на  $^{60}\text{Co}$  и 5 гамма-ножей. Что касается диагностических установок, в нашей стране есть 240 гамма-камер, 100 компьютерных томографов, около 20 сканеров позитронно-эмиссионной томографии и 450 магнитно-резонансных томографов. При этом необходимо учитывать, что значительная

**Таблица 2.** Количество аппаратов в лучевой терапии и ядерной медицине в России и мире (оценочно)

Техника, штуки	В мире	В России
Ускорители	14 000	150
Кобальтовые аппараты	1 500	200
Гамма-камеры	17 000	240
Компьютерные томографы	40 000	100
Магнитно-резонансные томографы	30 000	450
Сканеры позитронно-эмиссионной томографии	4 000	20
Гамма-ножи	300	5
Кибер-ножи	300	9
Установки для брахитерапии	2 200	150
Комплексы протонной и ионной терапии	50	3

часть этой аппаратуры выработала свой ресурс и требует замены.

Для того чтобы выйти на средневропейский уровень, Российской Федерации необходимо как минимум 400–450 новых медицинских ускорителей электронов, около 100 циклотронов и центров позитронно-эмиссионной томографии, 1000 компьютерно-томографических сканеров (в том числе сканеров позитронно-эмиссионной/компьютерной томографии – около 100), 300 установок однофотонной эмиссионной компьютерной томографии, 1400 магнитно-резонансных томографов и около 300 установок для брахитерапии.

Однако одними закупками новой техники вопрос развития лучевой терапии и ядерной медицины решить не получится. При наличии сопоставимых технологических ресурсов качество медицинской помощи может существенно различаться. Для обеспечения высокого качества лечебного процесса необходимо готовить кадры, способные успешно работать на новом оборудовании. Сегодня в России работают около 1500 врачей-радиотерапевтов и 300 медицинских физиков, что примерно в 6 раз ниже необходимого уровня. Многие из этих специалистов обучены для работы с устаревшим оборудованием. Новых квалифицированных медицинских физиков и инженеров высшие учебные заведения России выпускают в недостаточном количестве, причем при их подготовке отсутствует тесная взаимосвязь с клиническими центрами. Часто выпускники вузов приступают к клинической работе, не имея должной системной практической подготовки, и из-за низкого уровня оплаты труда физиков и инженеров в системе здравоохранения уходят работать по другим специальностям. В совокупности эти причины приводят к 20–30% рентабельности использования

дорогостоящего оборудования. Именно поэтому помимо закупки оборудования вопрос подготовки кадров, в особенности медицинских физиков, представляется ключевым для развития радиотерапии и ядерной медицины в нашей стране. Для его решения необходимы совместные активные усилия медицинских и образовательных ведомств и учреждений.

## Заключение

Многолетний опыт применения ускорителей и радионуклидных технологий показал не только их высокую научную значимость, но и экономическую эффективность в случае прикладного использования во многих отраслях мирового хозяйства, особенно в медицине. Благодаря им возникли и динамично развиваются такие области клинической медицины, как рентгенодиагностика, ядерная медицина, лучевая терапия, различные виды томографии и др.

С уверенностью можно сказать, что ядерно-физические технологии получают дальнейшее качественное и количественное развитие в медицине, при этом в ближайшие годы основными тенденциями [1, 2, 37, 38] должны стать следующие:

- быстрый рост количества линейных ускорителей с энергией до 25 МэВ;
- увеличение числа центров протонной и ионной лучевой терапии;
- развитие стереотаксической хирургии, в том числе за счет совершенствования ускорительной техники (уменьшение размеров и веса ускорителей, увеличение мощности пучка);
- масштабное строительство ускорителей для ядерной медицины;
- начало применения в клинической медицине диагностических методов, основанных на свойствах синхротронного излучения. ☺

## Литература

1. Черняев АП, Белоусов АВ, Варзарь СМ, Борщеговская ПЮ, Колыванова МА, Николаева АА. Радионуклидные технологии в медицине. Научное издание. 2015;(7):65–74.
2. Черняев АП, Варзарь СМ, Белоусов АВ, Близинок УА, Осипов АС, Загоруйко МВ. Ускорители в медицине. Медицинская физика. 2014;(1):113–20.
3. Hamm RW. Industrial accelerators. In: Chao A, Chou W, editors. Reviews of accelerator science and technology. Singapore: World Scientific; 2008. Vol. 1. Chap. 8. p. 163–84.
4. Комар ЕФ. Использование ускорителей в медицине и народном хозяйстве. Вестник РАН. 1973;(12):23–8.
5. Amaldi U, Bonomi R, Braccinin S, Crescenti M, Degiovanni A, Garlasche M, Garonna A, Magrin G, Mellace C, Pearce P, Pitta G, Puggioni P, Rosso E, Verdu Andres S, Wegner R, Weiss M, Zennaro R. Accelerators for hadrontherapy: From Lawrence cyclotrons to linacs. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. 2010;620(1–2):563–77.
6. Maciszewski W, Scharf W. Particle accelerators for radiotherapy. Present status and future. Physica Medica. 2004;4:137–45.
7. Trikalinos TA, Terasawa T, Ip S, Raman G, Lau J. Particle beam radiation therapies for cancer. Technical brief No. 1. (Prepared by Tufts Medical Center Evidence-based Practice Center under Contract No. HNSA-290-07-10055.) Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality. Revised November 2009. Доступно на: [www.effectivehealthcare.ahrq.gov/reports/final.cfm](http://www.effectivehealthcare.ahrq.gov/reports/final.cfm)
8. Beringer J et al. (Particle Data Group). Review of Particle Physics. Phys. Rev. D 86, 010001. Published 20 July 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevD.86.010001>.



9. Chernyaev AP. Nuclear physics-based technologies in medicine. *Physics of Particles and Nuclei*. 2012;43(2):262–72.
10. <http://www-naweb.iaea.org/nahu/dirac/>
11. [http://www-elsa.physik.uni-bonn.de/accelerator\\_list.html](http://www-elsa.physik.uni-bonn.de/accelerator_list.html)
12. Chernyaev AP, Varzar SM. Particle accelerators in modern world. *Physics of Atomic Nuclei*. 2014;77(10):1203–15. doi: 10.1134/S1063778814100032.
13. Hogstrom KR, Almond PR. Review of electron beam therapy physics. *Phys Med Biol*. 2006;51(13):R455–89. doi: <http://dx.doi.org/10.1088/0031-9155/51/13/R25>.
14. Belousov AV, Varzar' SM, Chernyaev AP. Simulation of the conditions of photon and electron beam irradiation in magnetic fields for increasing conformity of radiation therapy. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*. 2007;71(6):841–3. doi: 10.3103/S1062873807060172.
15. Alimov AS, Ishkhanov BS, Shvedunov VI. Compact linear electron accelerator for radiation technologies. *Moscow University Physics Bulletin*. 2008;63(4):256–8. doi: 10.3103/S0027134908040073.
16. Leksell L. The stereotaxic method and radiosurgery of the brain. *Acta Chir Scand*. 1951;102(4):316–9.
17. Leksell L. *Stereotaxis and radiosurgery: an operative system*. Springfield: Charles C Thomas; 1971.
18. Adler JR Jr, Chang SD, Murphy MJ, Doty J, Geis P, Hancock SL. The Cyberknife: a frameless robotic system for radiosurgery. *Stereotact Funct Neurosurg*. 1997;69(1–4 Pt 2):124–8.
19. Ho AK, Fu D, Cotrutz C, Hancock SL, Chang SD, Gibbs IC, Maurer CR Jr, Adler JR Jr. A study of the accuracy of cyberknife spinal radiosurgery using skeletal structure tracking. *Neurosurgery*. 2007;60(2 Suppl 1):ONS147–56.
20. <http://www.accuray.com/treatment-centers>
21. <https://www.elekta.com>
22. Kapatoes JM, Olivera GH, Ruchala KJ, Smilowitz JB, Reckwerdt PJ, Mackie TR. A feasible method for clinical delivery verification and dose reconstruction in tomotherapy. *Med Phys*. 2001;28(4):528–42.
23. Wilson RR. Radiological use of fast protons. *Radiology*. 1946;47(5):487–91. doi: <http://dx.doi.org/10.1148/47.5.487>.
24. <http://www.ptcog.ch>
25. Кленов ГИ, Козлов ЮФ, Хорошков ВС. Шестнадцать лет протонной лучевой терапии: результаты, проблемы и тенденции. *Медицинская физика*. 2015;(1):86–90.
26. International Atomic Energy Agency. *Directory of cyclotrons used for radionuclide production in member states: 2006 Update*. IAEA-DICRP/2006. Vienna: IAEA; 2006. 532 p.
27. International Atomic Energy Agency. *Cyclotron Produced Radionuclides: Physical Characteristics and Production Methods*. IAEA Technical Report Series No. 468. Vienna: IAEA; 2009. 279 p.
28. Belyshev SS, Ermakov AN, Ishkhanov BS, Khankin VV, Kurilik AS, Kuznetsov AA, Shvedunov VI, Stopani KA. Studying photonuclear reactions using the activation technique. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*. 2014;745(5):133–7. doi: 10.1016/j.nima.2014.01.057.
29. International Atomic Energy Agency. *Implementation of high dose rate brachytherapy in limited resource settings*. IAEA Human Health Series No. 30. Vienna: IAEA; 2015. 97 p.
30. Williamson JF. Brachytherapy technology and physics practice since 1950: a half-century of progress. *Phys Med Biol*. 2006;51(13):R303–25.
31. Christian PE, Bernier DR, Langan JK, editors. *Nuclear Medicine and PET: Technology and Techniques*. 5<sup>th</sup> ed. St. Louis: Mosby; 2004.
32. Ter-Pogossian MM, Phelps ME, Hoffman EJ, Mullan NA. A positron-emission transaxial tomograph for nuclear imaging (PETT). *Radiology*. 1975;114(1):89–98. doi: <http://dx.doi.org/10.1148/114.1.89>.
33. Zhukov BL. Production of medical radionuclides in Russia: Status and future – a review. *Journal of Applied Radiation and Isotopes*. 2004;84:48–56. doi: 10.1016/j.apradiso.2013.11.025.
34. International Atomic Energy Agency. *Nuclear Technology Review*. IAEA/NTR/2015. Vienna: IAEA; 2015. Доступно на: [https://www.iaea.org/About/Policy/GC/GC59/GC59InfDocuments/English/gc59inf\\_2\\_en.pdf](https://www.iaea.org/About/Policy/GC/GC59/GC59InfDocuments/English/gc59inf_2_en.pdf)
35. Корсунский ВН, Кодина ГЕ, Брусин АБ. Ядерная медицина. Современное состояние и перспективы развития. *Атомная стратегия*. 2007;(5):4–6.
36. Костылев ВА. Предложения о системном развитии атомной медицины и медицинской физики в России. *Медицинская физика*. 2008;3:8–29.
37. U.S. Department of Energy. *Accelerators for America's Future*. Washington: US DOE; 2010. 100 p. Доступно на: <http://science.energy.gov/~media/hep/pdf/accelerator-rd-stewardship/Report.pdf>
38. Barletta W, Chattopadhyay S, Seryi A. Educating and training accelerator scientists and technologists for tomorrow. *Reviews of Accelerator Science and Technology*. 2012;5:313–31. doi: 10.1142/S1793626812300125.

## References

1. Chernyaev AP, Belousov AV, Varzar' SM, Borshchegovskaya PYu, Kolyvanova MA, Nikolaeva AA. Radionuklidnye tekhnologii v meditsine [Radionuclide technologies in medicine]. *Naukoemkie tekhnologii [Science Intensive Technologies]*. 2015;(7):65–74 (in Russian).
2. Chernyaev AP, Varzar' SM, Belousov AV, Bliznyuk UA, Osipov AS, Zagoruyko MV. *Uskoriteli v meditsine [Medical accelerators]*. *Meditsinskaya fizika [Medical Physics]*. 2014;(1):113–20 (in Russian).
3. Hamm RW. *Industrial accelerators*. In: Chao A, Chou W, editors. *Reviews of accelerator science and technology*. Singapore: World Scientific; 2008. Vol. 1. Chap. 8. p. 163–84.
4. Komar EG. *Ispol'zovanie uskoriteley v meditsine i narodnom khozyaystve [Application of accelerators in medicine and national economy]*. *Vestnik RAN [Bulletin of RAS]*. 1973;(12):23–8 (in Russian).
5. Amaldi U, Bonomi R, Braccinini S, Crescenti M, Degiovanni A, Garlasche M, Garonna A, Magrin G, Mellace C, Pearce P, Pitta G, Puggioni P, Rosso E, Verdu Andres S, Wegner R, Weiss M, Zennaro R. *Accelerators for hadrontherapy: From Lawrence cyclotrons to linacs*. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*. 2010;620(1–2):563–77.
6. Maciszewski W, Scharf W. *Particle accelerators for radiotherapy. Present status and future*. *Physica Medica*. 2004;4:137–45.
7. Trikalinos TA, Terasawa T, Ip S, Raman G, Lau J. *Particle beam radiation therapies for cancer*. Technical brief No. 1. (Prepared by Tufts Medical Center Evidence-based Practice Center under Contract No. HHS-290-07-10055.) Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality. Revised November 2009. Available from: [www.effectivehealthcare.ahrq.gov/reports/final.cfm](http://www.effectivehealthcare.ahrq.gov/reports/final.cfm)
8. Beringer J et al. (Particle Data Group). *Review of Particle Physics*. *Phys. Rev. D* 86, 010001. Published 20 July 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevD.86.010001>.
9. Chernyaev AP. Nuclear physics-based technologies in medicine. *Physics of Particles and Nuclei*. 2012;43(2):262–72.
10. <http://www-naweb.iaea.org/nahu/dirac/>
11. [http://www-elsa.physik.uni-bonn.de/accelerator\\_list.html](http://www-elsa.physik.uni-bonn.de/accelerator_list.html)
12. Chernyaev AP, Varzar SM. Particle accelerators in modern world. *Physics of Atomic Nuclei*. 2014;77(10):1203–15. doi: 10.1134/S1063778814100032.
13. Hogstrom KR, Almond PR. Review of electron beam therapy physics. *Phys Med Biol*. 2006;51(13):R455–89. doi: <http://dx.doi.org/10.1088/0031-9155/51/13/R25>.
14. Belousov AV, Varzar' SM, Chernyaev AP. Simulation of the conditions of photon and elec-



- tron beam irradiation in magnetic fields for increasing conformity of radiation therapy. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*. 2007;71(6):841–3. doi: 10.3103/S1062873807060172.
15. Alimov AS, Ishkhanov BS, Shvedunov VI. Compact linear electron accelerator for radiation technologies. *Moscow University Physics Bulletin*. 2008;63(4):256–8. doi: 10.3103/S0027134908040073.
  16. Leksell L. The stereotaxic method and radiosurgery of the brain. *Acta Chir Scand*. 1951;102(4):316–9.
  17. Leksell L. Stereotaxis and radiosurgery: an operative system. Springfield: Charles C Thomas; 1971.
  18. Adler JR Jr, Chang SD, Murphy MJ, Doty J, Geis P, Hancock SL. The Cyberknife: a frameless robotic system for radiosurgery. *Stereotact Funct Neurosurg*. 1997;69(1–4 Pt 2):124–8.
  19. Ho AK, Fu D, Cotrutz C, Hancock SL, Chang SD, Gibbs IC, Maurer CR Jr, Adler JR Jr. A study of the accuracy of cyberknife spinal radiosurgery using skeletal structure tracking. *Neurosurgery*. 2007;60(2 Suppl 1):ONS147–56.
  20. <http://www accuray.com/treatment-centers>
  21. <https://www.elekta.com>
  22. Kapatoes JM, Olivera GH, Ruchala KJ, Smilowitz JB, Reckwerdt PJ, Mackie TR. A feasible method for clinical delivery verification and dose reconstruction in tomotherapy. *Med Phys*. 2001;28(4):528–42.
  23. Wilson RR. Radiological use of fast protons. *Radiology*. 1946;47(5):487–91. doi: <http://dx.doi.org/10.1148/47.5.487>.
  24. <http://www.ptcog.ch>
  25. Klenov GI, Kozlov YuF, Khoroshkov VS. Shest'desyat let protonnoy luchevoy terapii: rezul'taty, problemy i tendentsii [60 years of the proton therapy: results, problems, tendencies]. *Meditinskaya fizika [Medical Physics]*. 2015;(1):86–90 (in Russian).
  26. International Atomic Energy Agency. Directory of cyclotrons used for radionuclide production in member states: 2006 Update. IAEA-DCRP/2006. Vienna: IAEA; 2006. 532 p.
  27. International Atomic Energy Agency. Cyclotron Produced Radionuclides: Physical Characteristics and Production Methods. IAEA Technical Report Series No. 468. Vienna: IAEA; 2009. 279 p.
  28. Belyshev SS, Ermakov AN, Ishkhanov BS, Khankin VV, Kurilik AS, Kuznetsov AA, Shvedunov VI, Stopani KA. Studying photonuclear reactions using the activation technique. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*. 2014;745(5):133–7. doi: 10.1016/j.nima.2014.01.057.
  29. International Atomic Energy Agency. Implementation of high dose rate brachytherapy in limited resource settings. IAEA Human Health Series No. 30. Vienna: IAEA; 2015. 97 p.
  30. Williamson JF. Brachytherapy technology and physics practice since 1950: a half-century of progress. *Phys Med Biol*. 2006;51(13):R303–25.
  31. Christian PE, Bernier DR, Langan JK, editors. *Nuclear Medicine and PET: Technology and Techniques*. 5<sup>th</sup> ed. St. Louis: Mosby; 2004.
  32. Ter-Pogossian MM, Phelps ME, Hoffman EJ, Mullani NA. A positron-emission transaxial tomograph for nuclear imaging (PETT). *Radiology*. 1975;114(1):89–98. doi: <http://dx.doi.org/10.1148/114.1.89>.
  33. Zhuikov BL. Production of medical radionuclides in Russia: Status and future – a review. *Journal of Applied Radiation and Isotopes*. 2004;84:48–56. doi: 10.1016/j.apradiso.2013.11.025.
  34. International Atomic Energy Agency. Nuclear Technology Review. IAEA/NTR/2015. Vienna: IAEA; 2015. Available from: [https://www.iaea.org/About/Policy/GC/GC59/GC59InfDocuments/English/gc59inf-2\\_en.pdf](https://www.iaea.org/About/Policy/GC/GC59/GC59InfDocuments/English/gc59inf-2_en.pdf)
  35. Korsunskiy VN, Kodina GE, Bruskin AB. Yadernaya meditsina. Sovremennoe sostoyanie i perspektivy razvitiya [Nuclear medicine. The present status and perspectives]. *Atomnaya strategiya [Atomic strategy]*. 2007;(5):4–6 (in Russian).
  36. Kostylev VA. Predlozheniya o sistemnom razvitiy atomnoy meditsiny i meditsinskoy fiziki v Rossii [The proposal for systematic development of atomic medicine and medical physics in Russia]. *Meditinskaya fizika [Medical Physics]*. 2008;3:8–29 (in Russian).
  37. U.S. Department of Energy. Accelerators for America's Future. Washington: US DOE; 2010. 100 p. Available from: <http://science.energy.gov/~media/hep/pdf/accelerator-rd-stewardship/Report.pdf>
  38. Barletta W, Chattopadhyay S, Seryi A. Educating and training accelerator scientists and technologists for tomorrow. *Reviews of Accelerator Science and Technology*. 2012;5:313–31. doi: 10.1142/S1793626812300125.

## Accelerative and radionuclide technologies in clinical medicine

Chernyaev A.P.<sup>1,2</sup> • Varzar<sup>1</sup> S.M.<sup>1</sup>

Methods based on accelerative and radionuclide technologies are more and more invading clinical practice of modern medicine. The aim of this review is to demonstrate the role of nuclear physics techniques for treatment and diagnostics of various disorders. We analyzed data published in the last 50 years in research papers, reports and other open sources considering particulars of electron accelerators and heavy charged particles

in radiation and nuclear medicine and presenting the information on prevalence of accelerators and other high-tech medical equipment in Russia and worldwide.

**Key words:** medical physics, ionizing radiation, medical accelerators, nuclear medicine

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-260-268

**Chernyaev Aleksandr P.** – PhD, Doctor of Science in Physics and Mathematics, Professor, Head of the Chair of Physics of Accelerators and Radiation Medicine, Faculty of Physics<sup>1</sup>; Head of the Laboratory of Beam Technologies and Medical Physics<sup>2</sup>

**Varzar' Sergey M.** – PhD, Associate Professor, Chair of Physics of Accelerators and Radiation Medicine, Faculty of Physics<sup>1</sup>

✉ Faculty of Physics MSU, 1 Leninskie gory, Moscow, 119991, Russian Federation.

Tel.: +7 (495) 939 49 46.

E-mail: [varzar@physics.msu.ru](mailto:varzar@physics.msu.ru)

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie gory, Moscow, 119991, Russian Federation

<sup>2</sup> Skobeltsyn Institute of Nuclear Physics, Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie gory, Moscow, 119991, Russian Federation



135 лет со дня рождения В.Ф. Зеленина

# XI Национальный конгресс терапевтов

23–25 ноября 2016 года

Москва  КРОКУС ЭКСПО

ст. метро Мякинино, 65 км МКАД

[www.congress2016.rnmot.ru](http://www.congress2016.rnmot.ru)

