

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЯДЕРНЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ «МИФИ»  
ИНЖЕНЕРНО-ФИЗИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ БИОМЕДИЦИНЫ**

На правах рукописи

УДК \_\_\_\_\_

Турсынбаева Гулайым Сабит кызы

**«ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ В КОСМЕТОЛОГИИ»**

Выпускная квалификационная работа магистра:

магистерская диссертация

Направление подготовки/специальности

03.04.02-Физика

Выпускная квалификационная работа защищена

«30» июня 2021 г.

Оценка \_\_\_\_\_

Секретарь ГЭК Осадчий А.В.

г. Москва

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЯДЕРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
«МИФИ»

**ИНЖЕНЕРНО-ФИЗИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ БИОМЕДИЦИНЫ**

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

**«ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ В КОСМЕТОЛОГИИ»**

Магистрант \_\_\_\_\_/Турсынбаева Г.С.

Научный руководитель \_\_\_\_\_/Лощенов В.Б.

Научный консультант \_\_\_\_\_/Эфендиев К.Т.

Рецензент \_\_\_\_\_/Маклыгина Ю.С.

Руководитель магистерской программы \_\_\_\_\_/Лощенов В.Б.

Заведующий кафедрой № 87 \_\_\_\_\_/Лощенов В.Б.

Москва 2021

## Оглавление

<b>Список сокращений .....</b>	<b>4</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>5</b>
<b>Цели и задачи работы .....</b>	<b>6</b>
<b>Глава 1. Аналитический обзор литературы .....</b>	<b>7</b>
1.1 Распространение лазерного излучения в биологических тканях.....	7
1.1.1 Поглощение света биологическими средами.....	8
1.1.2 Рассеяние света в биологических тканях .....	10
1.1.3 Непрозрачные среды .....	13
1.2 Фотосенсибилизаторы .....	14
1.2.1 Обзор существующих фотосенсибилизаторов .....	15
1.2.2 Идеальный фотосенсибилизатор .....	19
1.3 Применения ФДТ в косметологии .....	21
<b>Глава 2. Материалы и методы .....</b>	<b>28</b>
2.1 Спектрально-флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия.....	28
2.2 Установка лазерная электронно-спектральная ЛЭСА-01 «БИОСПЕК».....	32
2.3 Светодиодная система для проведения ФДТ .....	34
2.4 Различные формы фотосенсибилизатора Себ .....	36
<b>Глава 3. Результаты исследований .....</b>	<b>41</b>
3.1 Исследование спектрально-флуоресцентных свойств растворов Себ ..	41
3.2 Исследование спектрально-флуоресцентных свойств кожи лица человека .....	45
3.3 Исследование динамики накопления и фотобличинга Себ .....	48
3.4 Сравнительное исследование распределения коэффициента контрастности кожи при применении гелевых форм Себ на основе растворителя ДМСО и Блефарогеля .....	54
3.5 Визуальная оценка кожи лица после ФДТ .....	58
<b>Заключение .....</b>	<b>62</b>
<b>Список использованной литературы.....</b>	<b>63</b>

## Список сокращений

ФС – фотосенсибилизатор

ФДТ – фотодинамическая терапия

ФД – флуоресцентная диагностика

Себ – хлорин еб

ПК – персональный компьютер

УФ - ультрафиолет

ИК- инфракрасный

ДМСО- диметилсульфоксид

АФК- активные формы кислорода

5-АЛК- 5-Аминолевулиновая кислота

АК- актинический кератоз

## ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентная диагностика (ФД) и фотодинамическая терапия (ФДТ) - современные, динамично развивающиеся методы диагностики и лечения злокачественных новообразований. Метод ФДТ основан на избирательном накоплении фотосенсибилизатора в опухолевой ткани, который при локальном воздействии света с длиной волны, соответствующей максимуму его поглощения, способен генерировать цитотоксические агенты, вызывающие гибель опухолевых клеток [1].

Обе технологии основаны на свойстве лекарств, называемых фотосенсибилизаторами, избирательно накапливать и сохранять высокие концентрации в опухолевых тканях. Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия сопровождаются облучением опухолевых тканей, накопивших фотосенсибилизатор, лазерным излучением с длиной волны, соответствующей максимуму поглощения фотосенсибилизатора [1]. В результате этого может происходить либо излучение кванта света с возможностью последующей регистрации их флуоресценции, либо образование цитотоксических веществ, в первую очередь, синглетного кислорода и других активных радикалов, которые оказывают разрушительное действие на жизненно важные структуры клеток опухоли.

Фотодинамическая терапия - это высокоэффективный органосохраняющий метод лечения с хорошими косметическими результатами. Отсутствие негативного воздействия на иммунную систему и побочных эффектов, позволяет применять его пациентам пожилого возраста и пациентам с тяжелой сопутствующей патологией [2].

Для проведения ФД и ФДТ используются источники лазерного или светодиодного излучения, спектрометры для регистрации флуоресценции. Длина волны излучения должна попадать в полосу поглощения фотосенсибилизатора. Для регистрации флуоресценции используются спектрометры, а также видео-флуоресцентное оборудование.

## Цели и задачи работы

### Цель работы:

Разработать метод флуоресцентной диагностики с применением лазерного излучения в зеленом и красном диапазоне спектра для возбуждения фотосенсибилизаторов хлоринового ряда при фотодинамической терапии кожи лица.

Для достижения цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Исследовать спектрально-флуоресцентные свойства растворов для наружного применения, содержащие Себ
2. Исследовать динамику накопления и фотобличинга Себ коже человека
3. Сравнить распределение коэффициента контрастности кожи лица при применении гелевых форм Себ с ДМСО и Блефарогелем.
4. Провести визуальную оценку кожи лица после ФДТ.

## Глава 1. Аналитический обзор литературы

### 1.1 Распространение лазерного излучения в биологических тканях

Лазерное излучение может поглощаться, отражаться, рассеиваться и повторно излучаться биологическими тканями. Каждый из этих процессов несет информацию о микро- и макроструктуре этой среды, движении и форме ее отдельных компонентов. Световое излучение - от УФ до ИК имеет большую специфику по отношению к биологическим системам, чем коротковолновое рентгеновское излучение и  $\gamma$ -излучение или длинноволновое электромагнитное излучение радиодиапазона, что связано с большим разнообразием процессов взаимодействия света с молекулами (диссоциация, электронное возбуждение, колебательное или вращательное возбуждение) (Рисунок 1). Кожа человека представляет собой сложную многослойную среду, содержащую кровеносные сосуды, по которым проходит непрерывный кровоток. Основными факторами, влияющими на распределение лазерного излучения в биологических тканях, являются цвет кожи, наличие неоднородностей и волосяной покров. И все они усложняют исследование процессов взаимодействия лазерного излучения с кожей человека. Существует множество математических и физических моделей, позволяющих представить и описать эти процессы, и каждая из них фокусируется на конкретном случае изучения. Математическое описание процессов рассеяния и поглощения света может быть выполнено двумя способами: с использованием аналитической теории, основанной на уравнениях Максвелла, и с использованием теории переноса. Главный недостаток аналитической теории - сложность получения точных аналитических решений. Теория переноса описывает взаимодействие лазерного излучения с тканью и рассматривает перенос фотонов рассеивающей и поглощающей средой без использования уравнений Максвелла [36].

Для взаимодействия лазерного излучения с биологическими объектами важны: время облучения, режим облучения (непрерывный или импульсный), частота и продолжительность процессов [3].

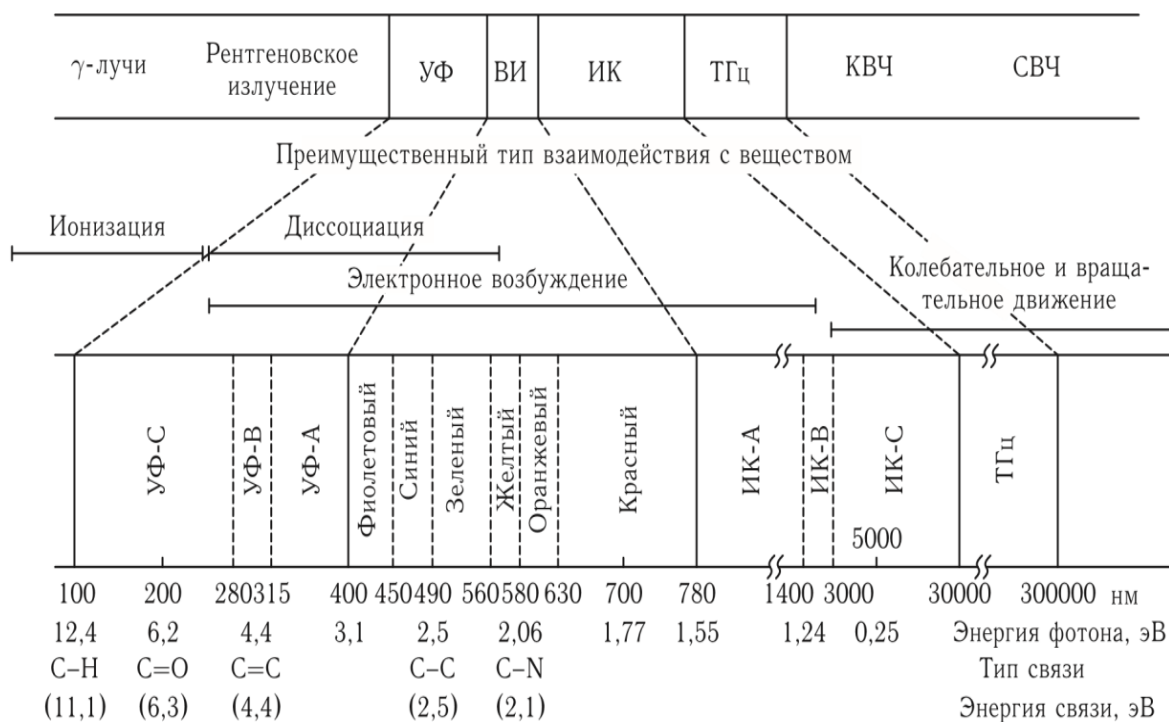


Рисунок 1. Шкала электромагнитных волн и типы взаимодействия излучения с веществом (УФ, ВИ, ИК, ТГц, КВЦ, СВЧ) [3].

Количество поглощенного, отраженного и рассеянного света зависит от типа вещества и длины волны падающего лазерного излучения. Длина волны - очень важный параметр, она определяет показатель преломления, коэффициенты поглощения и рассеяния. В свою очередь, показатель преломления определяет полную отражательную способность среды.

### 1.1.1 Поглощение света биологическими средами

Ослабление лазерного излучения при прохождении через биологическую среду определяется двумя основными процессами: поглощением и рассеянием. Поглощающая способность биологической среды определяется как отношение интенсивностей поглощенного и падающего



излучения. Роговица и хрусталик глаза почти прозрачны для видимого света среди биологических тканей. Среды, в которых падающее излучение практически полностью рассеивается и поглощается, называются непрозрачными. Способность среды поглощать LR зависит от электронной структуры атомов или молекул (поглощающих центров) [5], концентрация и температура, толщина поглощающего слоя, а также длина волны излучения. При взаимодействии падающего излучения с молекулами среды поглощается квант, энергия которого равна разности энергий их электронных состояний. Следовательно, поглощение зависит от спектра. В случае, когда рассеяние в биологической среде незначительно, то интенсивность лазерного излучения ( $I_T$ ), проходящего через среду, убывает по экспоненциальному закону, в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера, т. е.:

$$I_T(\lambda) = I_0(\lambda)e^{-\mu_a d} \quad (1)$$

где  $\mu_a$  – коэффициент поглощения. Коэффициент поглощения - это сумма вкладов всех хромофоров среды, т. е.:

$$\mu_a(\lambda) = \sum_i \varepsilon_i(\lambda) [C_i] \quad (2)$$

где  $\varepsilon_i$  - коэффициент экстинкции,  $C_i$  - концентрация i-го хромофора.

В биологических тканях рассеяние намного сильнее поглощения.

Величина, обратная коэффициенту поглощения  $\mu_a$  называется длиной поглощения:

$$L_a = \frac{1}{\mu_a}. \quad (3)$$

В биологических средах основными центрами поглощения (хромофорами) являются молекулы или макромолекулы воды. Хромофоры -

это ненасыщенные группы атомов, которые производят поглощающее электромагнитное излучение. [4].

Хромофоры в белках - это аминокислотные фрагменты, которые поглощают свет в основном в УФ-области спектра от 200 до 300 нм. Нуклеиновые кислоты также поглощаются в этом диапазоне длин волн. Клетки биологических тканей содержат сотни хромофоров, поглощающих свет в видимой и ближней УФ областях спектра, среди которых основными являются витамины, флавины, ферменты флавин, гемоглобин, каротиноиды и др. В ИК-области спектра все биомолекулы имеют интенсивные колебательные полосы поглощения. Начиная с длин волн  $\lambda = 1500$  нм и более, спектр поглощения тканей в основном определяется спектром поглощения воды

В связи с тем, что макромолекулы поглощают излучение в видимом спектральном диапазоне, «терапевтическое окно» заключено примерно в БИК-диапазоне от 600 до 1100 нм, где «окно прозрачности» воды находится в диапазоне от 900 до 1100 нм. . В этом спектральном диапазоне излучение проникает в биологические ткани с наименьшими потерями. Это дает возможность лечить и диагностировать достаточно глубокие тканевые структуры.

Клетки биологических тканей содержат сотни хромофоров, поглощающих свет в видимой и ближней ультрафиолетовой областях спектра, среди которых основными являются витамины, флавины, флавиновые ферменты, НАД • Н, гемоглобин, каротиноиды, фикобилины, фитохромы и др. В инфракрасной области спектра все биомолекулы имеют достаточно интенсивные колебательные полосы поглощения. Начиная с  $\lambda = 1500$  нм и более, спектр поглощения тканей в основном определяется спектром поглощения воды [4].

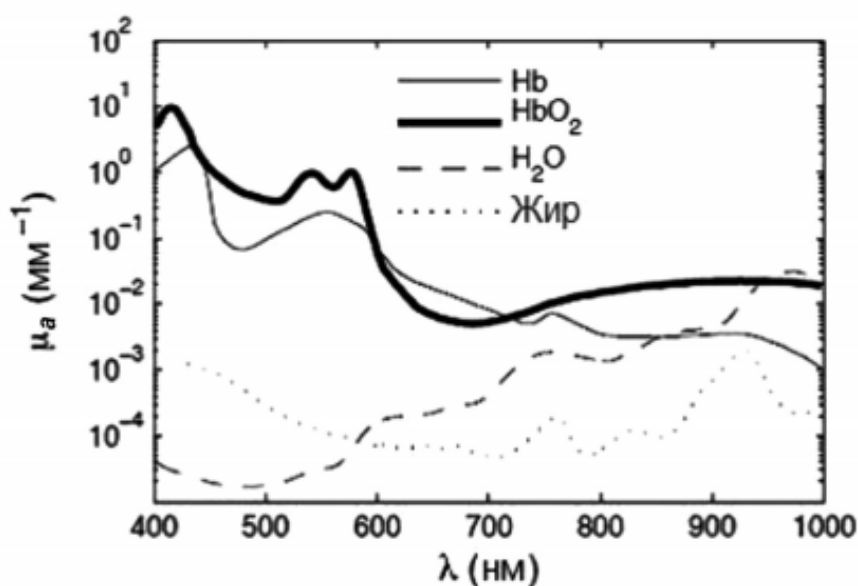


Рисунок 2. Коэффициенты поглощения основных поглощающих хромофоров в биологических тканях [4].

### 1.1.2 Рассеяние света в биологических тканях

Биологические ткани состоят из клеток. Внутриклеточные органеллы и внеклеточные структуры образуют в них сложную матрицу, макроскопически контролирующую анатомию органов. Существует множество видов тканей с разным составом. Например, соединительная ткань содержит эластин и коллаген, а мышечная ткань состоит из клеток, заполненных миозином и актином. Вне зависимости от ткани рассеяние происходит из-за изменения показателя преломления среды. На рассеяние также сильно влияет размер частиц, составляющих ткань (от нм - белков до мкм - клеток). Это позволяет использовать рассеяние как основу диагностических методов изучения морфологических изменений ткани [4].

Биологические ткани являются сильно рассеивающими объектами, распространение света через которые может считаться диффузным процессом [33]. Важное свойство рассеивающей ткани – анизотропия, которая

определяется величиной, называемой фактором анизотропии  $g$ - средний косинус угла рассеяния [34].

Потеря интенсивности из-за рассеяния описывается соотношением:

$$I(z) = I_0 e^{-\mu_s z} \quad (4)$$

где  $z$  – оптическая ось,  $\mu_s$  - коэффициент рассеяния.

Рэлеевское рассеяние - это отдельный вид упругого рассеяния. Это происходит, если длина волны падающего излучения намного больше размера рассеивающих частиц. Интенсивность  $I_0$  света, рассеянного средой, в этом случае обратно пропорциональна 4-й степени длины волны падающего света ( $I_0 \sim \lambda^{-4}$ )(закон Рэля).

Если размеры рассеивающих частиц становятся соизмеримыми с длиной волны падающего излучения, как в случае клеток крови, закон Рэля неприменим и имеет место другой тип рассеяния - рассеяние Ми. Важное различие между рассеянием Ми и рэлеевским рассеянием заключается в следующем: во-первых, рассеяние Ми имеет более слабую зависимость от длины волны ( $\sim \lambda^{-x}$ ) по сравнению с рассеянием Рэля ( $\sim \lambda^{-4}$ ), а во-вторых, рассеяние Ми происходит в основном в прямом направлении, тогда как для рэлеевского рассеяния рассеяние, интенсивности света, рассеянного вперед и назад, одинаковы [4].

В биологических тканях фотоны преимущественно рассеиваются в прямом направлении. Это явление не объясняется рассеянием Рэля, но зависимость от длины волны сильнее, чем позволяет рассеяние Ми. Таким образом, рассеяние ткани не может объяснить ни рассеяние Рэля, ни рассеяние Ми. Удобно ввести функцию вероятности  $p$  того, что фотон рассеивается под углом  $\theta$ , выбранным из экспериментальных данных. Если  $p$  не зависит от  $\theta$ , то это изотропное рассеяние. В противном случае возникает анизотропное рассеяние.

$g$  – характеристика анизотропии рассеяния, в случае когда  $g = 1$  рассеяние происходит только вперед, если  $g = -1$  - рассеяние только назад, и если  $g = 0$  - изотропное рассеяние. В полярных координатах фактор анизотропии  $g$  определяется как:

$$g = \frac{\int_{4\pi} p(\theta) \cos \theta d\omega}{\int_{4\pi} p(\theta) d\omega} \quad (5)$$

где  $p(\theta)$  - функция вероятности и  $d\omega = \sin \theta d\theta d\phi$  – элементарный телесный угол. По определению фактор анизотропии  $g$  - это средний косинус угла рассеяния  $\theta$ . Для большинства биологических тканей  $g$  лежит в диапазоне от 0,7 до 0,99. Отсюда соответствующие углы рассеяния наиболее часто равны 8–45°. Важной величиной в выражении (5) является функция вероятности  $p$  - фазовой функцией и нормируется следующим образом:

$$\frac{1}{4\pi} \int_{4\pi} p(\theta) d\omega = 1 \quad (6)$$

Некоторые теоретические фазовые функции известны как функции Рэля-Ганса, Дельта-Эддингтона и Рейнольда, Хени-Гринштейна. По экспериментальным данным функция Хени-Гринштейна является наилучшей. Её представили Хейни и Гринштейн:

$$p(\theta) = \frac{1-g^2}{(1+g^2-2g \cos \theta)^{3/2}} \quad (7)$$

Эта фазовая функция очень полезна математически, поскольку она эквивалентна представлению:

$$p(\theta) = \sum_{i=0}^{\infty} (2i+1) g^i P_i(\cos \theta) \quad (8)$$

где  $P_i$  - полиномы Лежандра [4].

### 1.1.3 Непрозрачные среды

Большинство тканей одновременно демонстрируют рассеяние и поглощение, которые называются непрозрачными или мутными средами. Их общий коэффициент затухания можно выразить [6]:

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s \quad (9)$$

Также удобно ввести такой дополнительный параметр, как оптическое альбедо  $a$ :

$$a = \frac{\mu_s}{\mu_t} = \frac{\mu_s}{\mu_a + \mu_s} \quad (10)$$

При  $a = 0$  интенсивность ЛИ ослабляется только за счет поглощения, тогда как при  $a = 1$  присутствует только рассеяние. При  $a = 1/2$  выражение примет вид  $a = s$ , то есть в этом случае коэффициенты поглощения и рассеяния станут равными. Их соотношение изменится, но на самом деле будут иметь место оба эффекта [6].

Еще один важный параметр при рассмотрении мутных сред - это оптическая толщина  $d$ :

$$d_{opt} = \int_0^l \mu_t dl' \quad (11)$$

где  $l$  - общая длина оптического пути,  $dl'$  - отрезок оптического пути. В случае равномерного затухания, когда коэффициент затухания  $\mu_t$  постоянен, выражение  $d_{opt}$  принимает вид:

$$d_{opt} = \mu_t l. \quad (12)$$

Ткань	$\lambda$ , нм	$\mu_t$ , см <sup>-1</sup>	$\mu_a$ , см <sup>-1</sup>	$\mu_s$ , см <sup>-1</sup>	$g$
Роговой слой	193	6000	6000	-	-
	250	3750	1150	2600	0,9
	308	3000	600	2400	0,9
	337	2630	330	2300	0,9
	351	2500	300	2200	0,9
	400	2230	230	2000	0,9
Эпидермис	250	3000	1000	2000	0,69
	308	1700	300	1400	0,71
	337	1320	120	1200	0,72
	351	1200	100	1100	0,72
	415	866	66	800	0,74
	488	650	50	600	0,76
	514	644	44	600	0,77
	585	506	36	470	0,79
	633	485	35	450	0,8
	800	460	40	420	0,85
Дерма	250	859	26	833	0,69
	308	591,7	8,7	583	0,71
	337	506,1	6,1	500	0,72
	351	463,2	5,2	458	0,72
	415	323,5	3,5	320	0,74
	488	252,6	2,6	250	0,76
	514	252,2	2,2	250	0,77
	585	198,2	2,2	196	0,79
	633	179,5	2	187,5	0,8
	800	176,5	1,7	175	0,85

Таблица 1. Оптические свойства кожи человека [7]

## 1.2 Фотосенсибилизаторы

Фотосенсибилизатор (ФС) - это вещество, повышающее светочувствительность тканей. На сегодняшний день существует множество различных фотосенсибилизаторов для ФДТ и ФД, по химическим свойствам они делятся на две большие группы: природные (на основе порфирина:

производные гематопорфирина, производные бензопорфирина, тексаферина; на основе хлорофилла: хлорины, пурпурины, бактериохлорины) и синтетические красители (фталоцианины, нафталоцианины) [8].

Выбор фотосенсибилизатора связан с глубиной фотодинамического терапевтического эффекта, который зависит от пика поглощения излучения. Фотосенсибилизаторы отличаются друг от друга диапазоном длин волн, локализацией накопления в опухолевых структурах и клетках. Наибольшую глубину фотодинамического воздействия могут обеспечить фотосенсибилизаторы с максимумом поглощения более 770 нм [8].

### **1.2.1 Обзор существующих фотосенсибилизаторов**

Обзор различных классов фотосенсибилизаторов, применяемых для лечения злокачественных опухолей методом фотодинамической терапии. Приведены основные требования к таким фотосенсибилизаторам, их спектральные характеристики, квантовый выход синглетного кислорода и области применения. Обсуждаются физико-химические свойства ксантеновых красителей с тяжелым атомом в структуре и возможность их использования в фотодинамической терапии [9]. За последние десятилетия были синтезированы десятки веществ с фотосенсибилизирующими свойствами. Хотя «идеальный» фотосенсибилизатор еще не получен, разработаны препараты, приближающиеся к требуемым характеристикам по ряду свойств [10].

Выделяют три поколения фотосенсибилизаторов:

- 1-е поколение - наиболее широко используемый и известный представитель Фотофрин [11].

Наиболее перспективным среди них оказался гематопорфирин.

Гематопорфирин представляет собой смесь мономерных порфиринов, димеров и высокомолекулярных олигомеров. HpD - это неочищенная смесь порфиринов, которые в значительной степени неактивны или обладают



небольшой фотосенсибилизирующей активностью. Сам гематопорфирин составляет около 20% этой смеси, продукты его монодегидратации, в том числе гидроксиэтилвинилдейтеропорфирин - 25%, продукты дидегидратации протопорфирина - 5%. Вторая половина этой смеси состоит из порфиринов, связанных эфирными связями с образованием комплексов размером от 2 до 8 пиррольных колец [8].

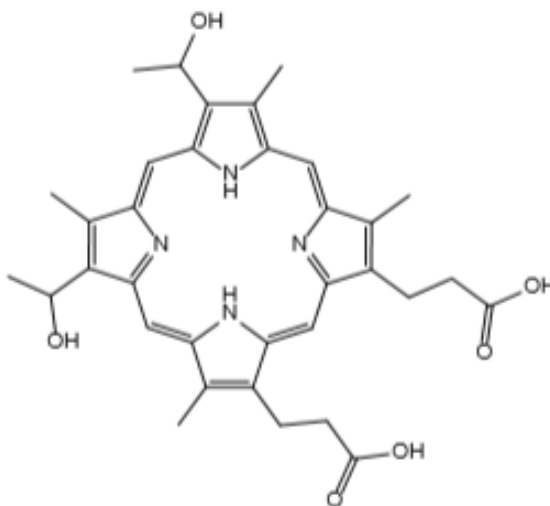


Рисунок 3. Химическая структура гематопорфирина. [12]

Препарат, содержащий не менее 80% этих активных фракций, известен как Фотофрин II (АхсанPharma, Канада), порфимер натрия или сложный эфир дигематопорфирина (DHE) [13]. Это первый в мире фотосенсибилизатор, одобренный FDA США для клинического использования в 1996 году [14]. Зарекомендовал себя как фотосенсибилизатор при ФДТ различных злокачественных новообразований. Фотофрин II в настоящее время является наиболее широко используемым фотосенсибилизатором в мире. [13].

- 2-е поколение — включает порфирины и родственные соединения (хлорины, фталоцианины, порфицены и т. д.), многие из которых все еще проходят клинические испытания [15].

### Хлорины

Хлорины - производные природного хлорофилла *a*. Химическая структура хлоринов основана на тетрапиррольном ядре с одной восстановленной двойной связью в одном из пиррольных колец (рисунок 4).

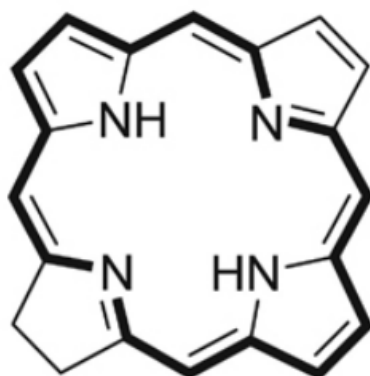


Рисунок 4. Химическая структура хлорина [1]

Наиболее изученными представителями хлориновой группы являются феофорбид *a*, хлорин еб, хлорин рб, бонеллин, моно-L-аспартилхлорин еб и пурпурин [1].

Максимум поглощения хлорина еб находится в области  $660 \pm 5$  нм, а квантовый выход синглетного кислорода достигает 0,7. Имеющиеся в настоящее время данные о клиническом применении производных хлорина еб демонстрируют его высокую фотодинамическую активность при различных формах злокачественных новообразований. Отличительной особенностью современных ФС на основе хлорина еб является относительно быстрое выведение из организма. Продолжительность периода повышенной светочувствительности при системном применении не превышает 7 дней [1].

### **Фталоцианины**

Фталоцианины (Pc) в настоящее время признаны [1] одними из лучших сенсibilизаторов второго поколения, используемых в ФДТ, они имеют длинноволновый диапазон с высоким коэффициентом экстинкции ( $\sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) и, в целом, низким темная токсичность. Их максимумы поглощения находятся в области 670-700 нм с очень высокими коэффициентами молекулярной экстинкции. Представитель соединения

алюминия тетрасульфированный фталоцианин  $AlPcS_4$ , коммерчески известный под названием Photosense, несмотря на чувствительность к нему кожи, имеет характерный для фталоцианинов максимум поглощения при 676 нм, хорошо применяется в российских клиниках против желудка, кожи, полости рта. и рак груди. Другой фталоцианин, используемый в клинике, фталоцианин кремния (рис. 5), был успешно протестирован на различных формах рака кожи (предраковый - старческий кератоз, болезнь Боуэна) и на злокачественных формах рака кожи [15].

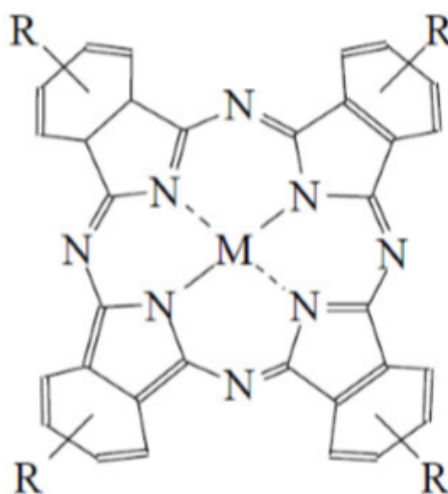


Рисунок 5. Химическая структура фталоцианинов [1]

Фталоцианины имеют четыре бензольных кольца, сопряженных с макроциклом. Для них характерно наличие двух полос поглощения - коротковолновой (полоса *soret*, 300–350 нм). Известно большое количество фталоцианинов с различными заместителями и ионами металлов (цинк, алюминий, кремний) в макроцикле. Было показано, что введение металла в макроцикл увеличивает фотодинамическую активность фталоцианинов [1].

### **Протопорфин IX**

Особое место среди ФС для ФДТ занимает 5-аминолевулиновая кислота (гидрохлорид), важнейшее природное соединение - общий предшественник порфиринов в микроорганизмах, растениях и животных. Это бесцветное соединение, которое накапливается в основном в опухолевой

ткани и биологически превращается в протопорфирин IX (PP IX), люминесцентное фотоактивное вещество, способное генерировать  $^1O_2$  при облучении видимым светом (рис. 6). Накопление PPIX в опухоли занимает несколько часов, а его высокий уровень сохраняется в течение 1-2 дней, тогда как в здоровых клетках PPIX быстро превращается в фототоксический гем [16].

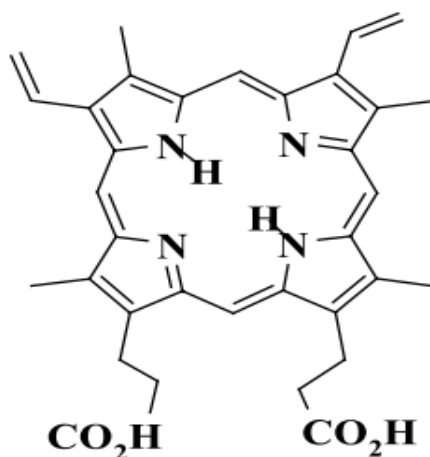


Рисунок 6. Химическая структура Пп IX [1]

ПП-IX является довольно активным ПС из-за наличия интенсивной полосы поглощения с максимумом на длине волны 630 нм и способности эффективно генерировать синглетный кислород. Кроме того, из-за избирательного накопления PP-IX в злокачественных клетках ALA является эффективным флуоресцентным маркером опухоли [1].

- 3-е поколение - включает препараты, наличие радиоактивного радикала в составе которых позволяет ему связываться только с определенными белками-носителями (моноклональные антитела, рецепторные системы и т. д.) [1].

### 1.2.2 Идеальный фотосенсибилизатор

Чтобы сравнить известные и новые фотосенсибилизаторы, следует учитывать конкретные характеристики идеального фотосенсибилизатора (таблица 2). Хотя некоторые характеристики фотосенсибилизатора можно легко изменить (например, поглощение длины волны), другие аспекты, такие

как изменение фармакокинетического (ФК) профиля фотосенсибилизатора, не так легко контролировать. Поэтому поиск нового фотосенсибилизатора, способного удовлетворить необходимые химические, физические и биологические требования для идеального фотосенсибилизатора, все еще продолжается [18].

Чистота	Должно быть одно чистое вещество известного состава, стабильное при комнатной температуре.
Токсичность	Минимальная токсичность в отсутствие света и только цитотоксичность в присутствии света определенной длины волны. Фотосенсибилизатор не должен выделять токсичные метаболиты.
ADME	Оптимальные свойства всасывания, распределения, метаболизма и выведения (ADME) для соответствующего показания.
Активация	Поглощает свет с длиной волны от 700 до 850 нм для максимального проникновения света через ткань с минимальным рассеянием света.
Квантовый выход	Высокий квантовый выход одиночного кислорода ( $\Phi$ ) для фотохимического события - обычно образования синглетного кислорода и других АФК.
Стоимость и доступность	Недорогой и коммерчески доступный, чтобы способствовать широкому использованию лечения
Селективность	Накопление в опухолевой ткани благоприятно. Субклеточная локализация в органеллах, которые вызывают апоптотический, а не некротический способ гибели клеток, например митохондрии, также полезна.

Мутагенность / канцерогенность	Фотосенсибилизатор не должен вызывать мутагенных или канцерогенных эффектов.
--------------------------------	--

Таблица 2. Характеристики идеального фотосенсибилизатора [18]

Если удастся найти соединение со всеми этими свойствами, то можно будет говорить об идеальном сенсibilизаторе для ФДТ. Многие синтезированные соединения только приближаются к этому стандарту [19].

### 1.3 Применения ФДТ в косметологии

ФДТ - это метод фототерапии, в котором используются фотосенсибилизаторы, свет и кислород. Это альтернативное лечение предраковых и раковых заболеваний кожи. Его преимущества - неинвазивность, отсутствие системной светочувствительности. Пациенты отдают предпочтение этому виду терапии благодаря хорошему косметическому эффекту, отсутствию рубцов после лечения. Основными показаниями к применению ФДТ являются актинический кератоз (АК), базальноклеточный рак кожи (БКК) и др. В настоящее время список показаний расширяется. ФДТ также используется в косметологии для фотоомоложения кожи. Ниже приведены основные препараты, применяемые для ФДТ кожи лица, характеристики лазерного излучения и методы омоложения [20]

В работе проводилась ФДТ с целью омоложения кожи. Данное исследование включало 21 пациент европеоидной расы с II или III типом кожи по Фитцпатрику (средний возраст 56,7 года, от 52 до 73 лет, 12 женщин, 9 мужчин) с различными степенями фотоповрежденной кожи лица [21].

В качестве ФС использовалась 20% гидрохлоридная соль раствора аминоревулиновой кислоты (Levulan Kerastick, Dusa Pharmaceuticals, Wilmington, **Способ введения:** Местное применение. **Время экспозиции:** 1 час). Длина волны лазерного излучения 630 нм. Плотность мощности

излучения: 160 мВт/см<sup>2</sup>. Плотность энергии: 75 Дж/см<sup>2</sup> Длительность [22]  
облучения: 12 мин.

Перед ФДТ ролик с микроиглами несколько раз проводился по коже лица с целью увеличения проникновения фотосенсибилизатора в биоткань.

Врачи не наблюдали актинического кератоза ни у одного пациента через 3 и 6 месяцев. У одного пациента была отмечена фототоксическая реакция, которая прошла через 9 дней. Следует отметить, что этот пациент допустил продолжительное пребывание на свету на следующее утро после лечения. Через 6 месяцев после лечения 16 пациентов (76,19%) отметили общее улучшение более чем на 75% и сказали, что они рекомендовали бы это лечение другим (рисунок 5–7). Три пациента (14,29%), сообщившие об общем улучшении от 50% до 74%, сказали, что порекомендовали бы это лечение другим (рис. 8). В общей сложности 19 пациентов (90,48%) отметили улучшение более чем на 50% и заявили, что порекомендовали бы это лечение другим. Два пациента (9,52%), сообщившие об общем улучшении от 25% до 50%, не рекомендовали бы лечение другим.

Значительно лучшие результаты наблюдались через 6 месяцев по сравнению с 3 месяцами наблюдения.

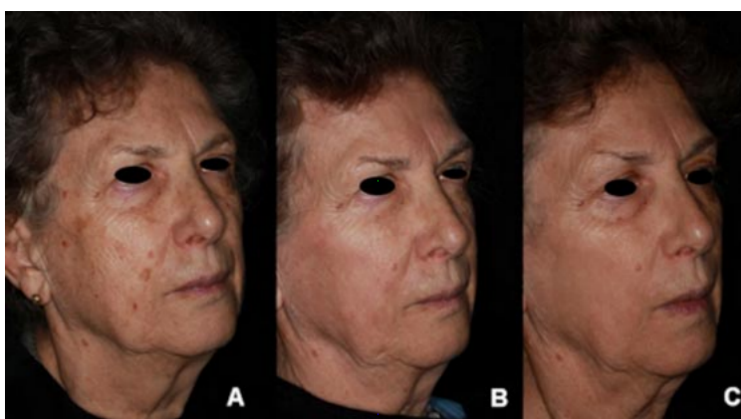


Рисунок 7. Женщина в возрасте 71 года до (А), через 3 месяца (В) и через 6 месяцев (С) после лечения [21]

В работе были представлены результаты фотоомоложения кожи. Исследование включало 13 пациентов в возрасте от 50 до 78 лет (средний возраст - 64 года) [23]. Согласно классификации Глогау групп фотостарения, у шести пациентов была III степень фотостарения (46,15%), у пяти - IV степень (38,46%). и двое - со степенью II (15,38%). В качестве ФС использовалась 20% -ный раствор 5-АЛК. Лицо предварительно очищали спиртом, а затем гомогенно наносили ФС для местного применения (Levulan®). Время экспозиции: 2 часа. Параметры ФДТ: Плотность мощности: 100 мВт/см<sup>2</sup> Время облучения: 10 минут. Плотность энергии: 60 Дж/см<sup>2</sup>. Каждые 15 дней проводились три сеанса ФДТ.

Пациенты были клинически обследованы до и после сеансов ФДТ, и любые изменения классифицировались с использованием полуколичественного метода в соответствии со следующими баллами: 0 = отсутствие реакции; 0,5 = очень слабая реакция; 1,0 = незначительная реакция; 2,0 = умеренная реакция; 3,0 = интенсивная реакция.



Рисунок 8. Фотографии до и через 21 день после третьего сеанса ФДТ [23].

Что касается клинических оценок пациентов, наблюдалось следующее: 12 пациентов (92,30%) показали улучшение клинического фотостарения, и только один пациент (7,69%) не изменился. Из 12 пациентов, состояние которых улучшилось, пять (41,66%) показали значительное улучшение, четыре (30,76%) умеренное улучшение и три (23,09%) дискретное улучшение. Поверхностные морщины слегка уменьшились у пяти пациентов



(38,46%), особенно на лбу и в периокулярной области. У двенадцати пациентов (92,30%) отмечалось улучшение дряблости кожи, а у одного пациента (7,69%) изменений не наблюдалось. У пяти пациентов (41,66%) отмечалось улучшение вялости, особенно в области нижних век, у двух пациентов (16,66%) в области носогубной складки и у 10 (83,33%) в области нижней челюсти. У всех пациентов изменился цвет и текстура кожи. Кожа выглядела желтоватой, непрозрачной и неровной по текстуре, с жирными и сухими участками. У двенадцати пациентов (92,30%) наблюдалось улучшение цвета и текстуры кожи, и только один пациент (7,69%) остался без изменений. У двух пациентов (15,38%) с эфелидами очаги исчезли только частично, а у четырех пациентов (30,76%) с меланодермией состояние не изменилось. Из 12 пациентов (92,30%) с меланозами 11 (91,66%) показали только частичное исчезновение поражений, а у одного пациента (8,33%) изменений не было. Из четырех пациентов (30,76%), у которых были обнаружены поражения с клиническим диагнозом актинического кератоза, только у одного (25%) сохранилось остаточное поражение на спинке носа, у других трех пациентов (75%) наблюдался полный регресс поражений.

У пациентов наблюдалась эритема от легкой до значительной степени интенсивности, отек в основном на нижнем веке, покалывание, дискретный зуд и шелушение от легкого до умеренного. Эти реакции различались у разных пациентов и различались между тремя сеансами. Для большинства пациентов продолжительность лечения составляла 3-5 дней. В частности, эти эффекты длились от 2 до 10 дней при средней продолжительности 6 дней. У двух пациентов развились поражения, вызванные вирусом простого герпеса, у одного после первого сеанса, а у другого - после второго; только один пациент сообщил о 24-часовой светочувствительности при воздействии естественного солнечного света после третьего сеанса.

В работе [24] представлено что внутриклеточные активные формы кислорода (АФК) стимулированные 5-АЛК опосредованной ФДТ приводят к пролиферации и активации фибробластов (рисунок 9).

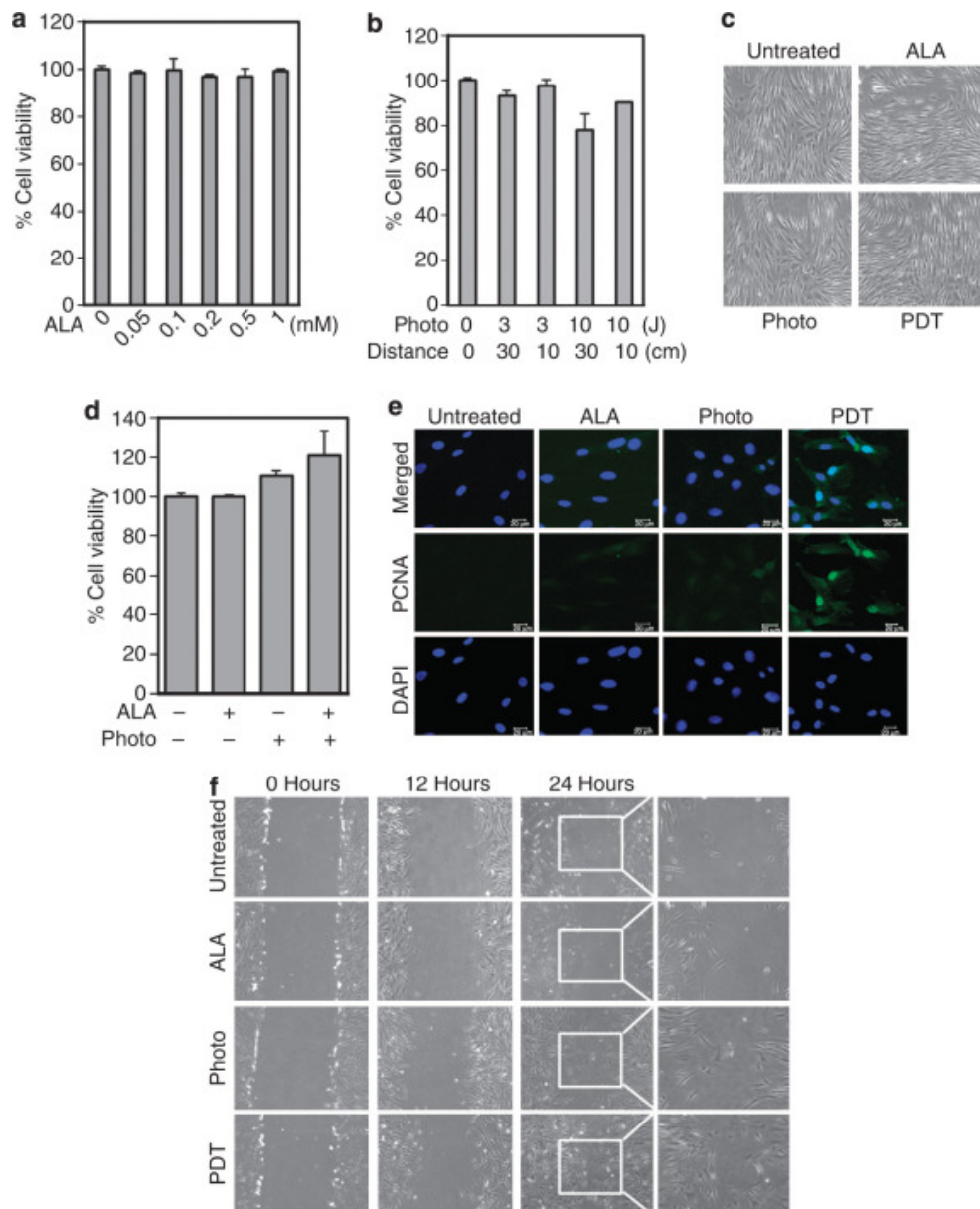


Рисунок 9. Фотодинамическая терапия усиливала пролиферацию дермальных фибробластов человека. **(a)** 5-аминолевулиновая кислота (ALA) сама по себе не оказывала цитотоксического действия на первичные фибробласты дермы. Клетки обрабатывали различными концентрациями ALA (до 1 мМ) в течение 12 часов. **(b)** Влияние дозы облучения светом и расстояния от источника света на фибробласты. Клетки обрабатывали различными дозами излучения света и расстояниями от источника света в течение 12 часов. **(c)** ФДТ не вызвала морфологических изменений. Фибробласты обрабатывали ALA при концентрации 0,1 мМ, при облучении энергии 3 Дж/см<sup>2</sup> и ФДТ при концентрации ALA 0,1 мМ, время инкубации 30 минут, и 3 J/см<sup>2</sup>, соответственно. **(d,e)** ФДТ-индуцированная

пролиферация фибробластов. Клетки обрабатывали ФДТ (0,1 мМ ALA и 3 Дж/см<sup>2</sup> света) (f) ФДТ увеличивала подвижность фибробластов. Фибробласты оценивали, чтобы определить их влияние на подвижность, используя анализ заживления ран [24].

В работе было показано, что 5-АЛК опосредованная местная ФДТ может улучшить плотность коллагена в расположении кожной ткани (рисунок 10) [25]

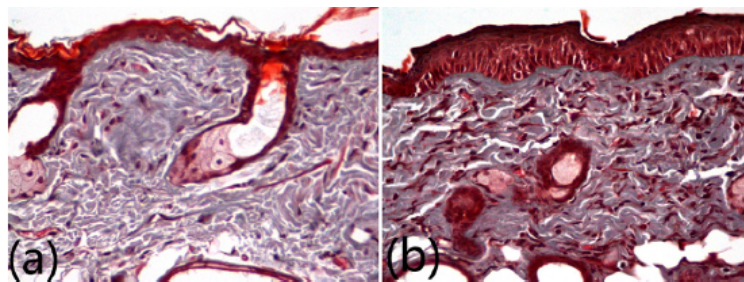


Рисунок 10. Изображения окрашивания трихромом по Массону на 12-й неделе. (a) Контрольная группа. (b) Группа 5-АЛК с ФДТ. Значительное улучшение плотности коллагена и толщины эпидермиса можно увидеть в области, обработанной ФДТ [25].

Микроскопическое исследование *in vivo* выявило заметную разницу в характерных сигналах коллагена между контрольной группой и группой ФДТ. Ориентация коллагена в дермальном слое контрольной группы была случайным образом распределена вокруг волосяных фолликулов и сопровождалась резным рисунком морщин (рисунок 11a). Напротив, ориентация коллагеновых волокон группы PDT оказалась более однородной и гладкой (рисунок 11d) [26].

Коллагеновые волокна контрольной группы выглядели более извитыми и неупорядоченными (рис, тогда как коллагеновые волокна группы PDT казались более гладкими и однородными. Эти результаты четко указывают на различия в коллагене.

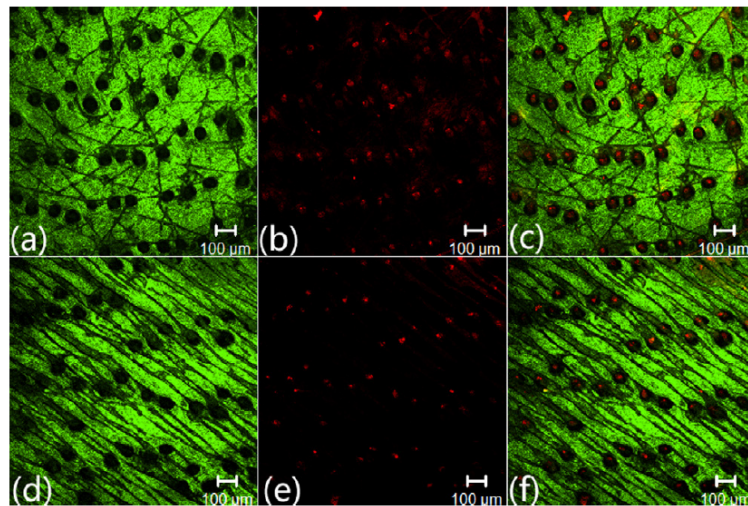


Рисунок 11. (a) и (d) коллагеновые волокна; (b) и (e) волосяные фолликулы; (c) и (f) сходящееся изображение [26].

Это исследование на животных также подтверждает, что ФДТ с АЛК может увеличивать плотность кожного коллагена и толщину эпидермиса, в конечном итоге улучшая внутренне стареющую кожу. Изменения в эпидермисе, вызванные местным применением многосессионной ФДТ с низкой дозой АЛК, могут изменить нижележащую соединительную ткань, не повреждая окружающую ткань, не вызывая воспаления или других побочных эффектов. Исследования *in vivo* и *ex vivo* также показали, что размер волосяного фолликула может быть эффективно уменьшен с помощью ALA PDT. Хотя это предварительное исследование демонстрирует, что несколько сеансов ФДТ с низкой дозой АЛК эффективны для омоложения кожи и предотвращения старения кожи, другие авторы также демонстрируют, что два сеанса ФДТ МАЛ могут значительно увеличить экспрессию коллагена I типа через 3 недели и даже 6 месяцев после лечения.

Омолаживающие эффекты ФДТ для лечения фотостарения кожи хорошо документированы в нескольких клинических испытаниях. Использование различных фотосенсибилизаторов (5-аминолевулиновая кислота, метиламинолевулинат) и различных источников света (светодиоды, лазеры, интенсивный импульсный свет) дало многообещающие результаты. С помощью ФДТ улучшились лентиго, шероховатость кожи, тонкие линии и землистый цвет лица [26].

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1 Спектрально-флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия

Методам фотодинамической терапии (ФДТ) и флуоресцентной диагностики (ФД) посвящено множество научных исследований [16]. Интерес к этой области науки обусловлен широкими возможностями использования методов ФД в диагностике и ФДТ при лечении онкологических заболеваний. Кроме того, в последнее время появились обнадеживающие результаты исследований в других областях медицины (сосудистые, кожные, некоторые инфекционные заболевания, офтальмологические заболевания - старческая дегенерация желтого пятна с неоваскуляризацией, глаукома и т. Д.). Термин PDT возник для обозначения воздействия света на биологическую ткань. Обязательным условием наличия фотодинамического эффекта является наличие в биологической ткани фотосенсибилизатора (ФС), свойства которого во многом определяют успех фотодинамической процедуры. Из известных PS наиболее эффективны PS, работающие по так называемому кислородному механизму. Это означает, что энергия поглощенных фотонов частично расходуется на флуоресценцию, а частично передается молекулярному кислороду через метастабильное триплетное состояние. В этом случае кислород переходит в возбужденное синглетное состояние, в котором он обладает высокой окислительной активностью (рис. 1). Следовательно, если PS и кислород присутствуют в какой-либо клетке или бактерии, то при воздействии света с длиной волны, соответствующей поглощению PS, биологические макромолекулы будут разрушены, и при достижении его критической концентрации в клетке или бактериях они погибнут. Поскольку часть энергии поглощенных фотонов излучается в виде флуоресценции, вполне естественно зарегистрировать ее для определения концентрации ФС в биологической ткани и динамики ее изменения от времени под воздействием света, что является основой для ПД.

Флуоресцентная диагностика стала важным методом исследования в клинической практике, особенно при выявлении и локализации предраковых и ранних раковых поражений, а также при терапии под визуальным контролем. Метод основан на принципе дифференциального флуоресцентного излучения между аномальными и нормальными тканями в ответ на возбуждение светом определенной длины волны в видимом диапазоне спектра [35].

Наша задача - не только уметь управлять этими параметрами, но и влиять на них. В то же время важным условием является адаптация методов и оборудования для использования в клинических условиях [16].

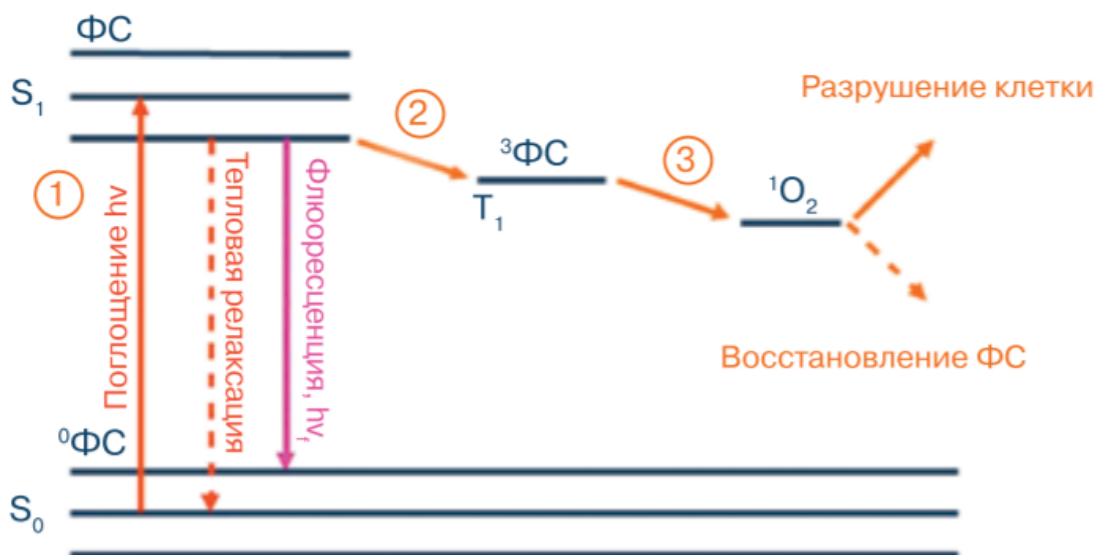


Рисунок 12. Механизм действия ФДТ: 1 –  ${}^0\text{ФС} + h\nu \rightarrow {}^1\text{ФС}$  – переход фотосенсибилизатора в короткоживущее синглетное состояние при поглощении кванта излучения; 2 –  ${}^1\text{ФС} \rightarrow {}^3\text{ФС}$  – переход в долгоживущее триплетное состояние посредством интеркомбинационной конверсии; 3 –  $3\text{PS} + \text{O}_2 \rightarrow {}^0\text{PS} + {}^1\text{O}_2$  – взаимодействие фотосенсибилизатора в возбужденном триплетном состоянии с молекулой кислорода приводит к его окислению в исходную структуру и образованию активного кислорода в синглетном состоянии [16]

$S_0$  — основное, невозбужденное состояние;  $S_1$  — синглетное возбужденное состояние;  $0 — 3$  — квантованные подуровни;  $T_1, T_1$  — квантованные уровни триплетного возбужденного состояния. Стрелками показаны переходы электронов в разные энергетические состояния [27].

Преимущества спектрального анализа тканей Основным преимуществом методов спектрального анализа тканей *in vivo* является их неинвазивность. Это позволяет получать информацию о состоянии тканей, не влияя на динамику различных биологических процессов. Такое вмешательство часто может быть нежелательным или даже опасным. Например, взятие образца ткани на биопсию от меланомы может привести к генерализации опухолевого процесса. Еще одним преимуществом оптического анализа тканей является возможность обрабатывать данные в реальном времени и корректировать параметры терапевтического процесса в соответствии с полученной информацией. Например, анализ концентрации и химического состояния ПК в процессе ФДТ позволяет корректировать интенсивность лазерного воздействия. Однако измерение спектров флуоресценции или рассеяния живого объекта - сложная задача. Еще сложнее получить количественную информацию, характеризующую состояние конкретной биологической ткани. Основные требования к оборудованию для ФД и ФДТ Обновление измеренного спектра или флуоресцентного изображения должно происходить в течение 0,5–1 с. В нашем исследовании обновление занимает 100 мс. Этого времени достаточно, чтобы избежать ошибок, связанных с сердечными импульсами, перистальтикой, дыханием или нервными импульсами. Скорость обработки результатов измерений осуществляется в режиме реального времени, что позволяет оценить концентрацию ФС или степень оксигенации гемоглобина в исследуемых тканях и оперативно принять решение. Общее время, отведенное на ФД желудка, легкого или другого полого органа, не превышает 1-2 минут. На ФДТ отводится 10-15 минут для полых органов и до одного часа и более для кожи. Исходя из этого, выбираются соответствующие плотности мощности

излучения. Точность биологических исследований обычно не очень высока, и разброс концентраций ФС при одной и той же введенной дозе у разных пациентов может отличаться в полтора-два раза для одной и той же биологической ткани. Поэтому точность определения концентрации допускает диапазон 20–30%. Погрешность определения степени оксигенации не должна превышать 8-10%. Во время терапии неравномерность светового пятна по интенсивности не должна превышать 15–20%. Точность определения световой дозы, поглощаемой биологической тканью, должна быть не хуже 20–30%. Концентрация ФС, которая реализуется при ФД и ФДТ, составляет в среднем от 0,1 до 10 мг на килограмм веса пациента. В наших исследованиях мы добиваемся высокой чувствительности оборудования за счет использования специального оптоволоконного устройства. Лазерное излучение мощностью 10 мВт подается через центральное волокно. Поскольку диаметр волокна составляет 200 мкм, плотность мощности на выходе оптического волокна довольно высока (30 Вт / см<sup>2</sup>). В этом случае никаких болезненных ощущений при контакте с тканью не возникает. Эта мощность рассеивается в основном в объеме 1–2 мм биологической ткани. Соответственно, мы определяем информацию о концентрации ФС в биологической ткани из того же объема. Для определения степени оксигенации высокая чувствительность достигается за счет увеличения расстояния между оптическим волокном, которое является источником излучения, и принимающим волокном. Таким образом, количество центров, участвующих в поглощении света, рассеянного внутри ткани, увеличивается.

Флуоресценция фотосенсибилизатора характеризуется следующими параметрами: спектром поглощения и флуоресценции, квантовым выходом и временем жизни флуоресценции. Спектр поглощения представляет собой зависимость интенсивности излучения, поглощаемого веществом, от длины волны (частоты), а спектр флуоресценции, соответственно, представляет собой зависимость интенсивности излучения от длины волны (частоты) света. Основными параметрами спектра являются интенсивность



флуоресценции, положение максимума и, следовательно, полуширина (ширина спектра находится на уровне половины максимума. Спектр излучения флуоресценции обычно не зависит от длины волны возбуждения (Каши). Спектр флуоресценции смещен в длинноволновую сторону по сравнению с полосой поглощения (как правило, Стокса) и зеркально симметричен ей (правило Левшина). Квантовый выход флуоресценции представляет собой отношение количества излучаемых фотонов к количеству поглощенных единиц. Этот параметр характеризует эффективность преобразования поглощенной энергии в излучение по сравнению с процессами безызлучательной релаксации. Чем выше квантовый выход, тем выше интенсивность флуоресценции флуорофора [16].

## **2.2 Установка лазерная электронно-спектральная ЛЭСА-01 «БИОСПЕК»**

Для регистрации спектрального сигнала использовался лазерный анализатор спектра ЛЭСА-01-БИОСПЕК. Для регистрации и анализа спектральных зависимостей использовалась программа Uno Momento (ООО «БИОСПЭК») с дополнительными функциями учета поглощающих и рассеивающих свойств, разработанными в результате данного исследования [28]. Схема портативной спектроскопической системы представлена (рисунок 13). Установка для флуоресцентных исследований методом обратного светорассеяния состоит из спектрометра, источника света с фокусирующей оптикой (галогенная лампа при измерении спектра поглощения и лазер в случае исследования флуоресценции), портативный компьютер, программу для хранения и обработки спектров UnoMomento-БИОСПЕК, гибкий оптический катетер, состоящий из передающего лазерное излучение световода в центре и расположенных вокруг него шести оптических волокон, принимающих рассеянное лазерное излучение и флуоресценцию.

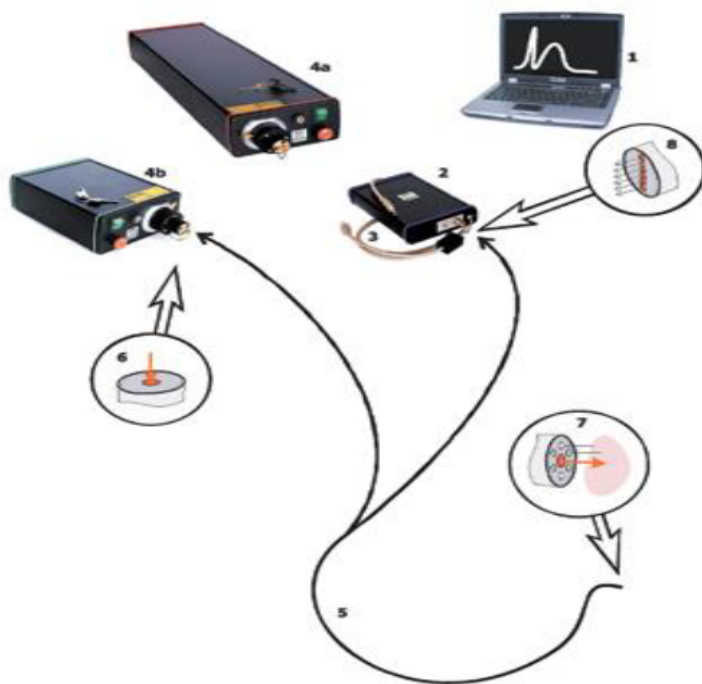


Рисунок 13. Схематическое устройство портативной системы ЛЭСА-01  
 1 – компьютер; 2 – спектрометр; 3 – кабель USB; 4 – лазерный источник; 5 –  
 Y-образный волоконно-оптический зонд; 6 – вход; 7 – рабочая часть; 8 –  
 ВЫХОД

Флуоресцентный свет на рассеянный тканью, попадают в принимающие волокна, которые окружают центральное волокно, которое служит для доставки возбуждающего флуоресценцию лазерного излучения. Изменение расстояния между рабочей частью зонда и тканью от 0 до 2 см и угла наклона от 0 до 30 ° не приводит к ошибке определения концентрации ФС более чем на 10%, если препарат равномерно распределяется по глубине ткани. В противном случае необходимо учитывать неравномерное распределение, что обычно связано с разной степенью накопления препарата в слизистых и подслизистых слоях органа. На выходном конце 8, который подключается к спектрографу, волокна расположены в ряд для увеличения светового потока без потери разрешения. Перед входом в спектрограф установлен узкополосный светофильтр, который снижает интенсивность обратно рассеянного лазерного света. Это дает возможность анализировать спектры флуоресценции и рассеянного лазерного излучения в одном

масштабе. Такой подход позволяет нормализовать спектры и количественно определять концентрацию ФС в разных тканях, а также сравнивать результаты, полученные в разное время на разных устройствах.

Общий принцип проведения измерений флуоресценции и/или поглощения в месте контакта рабочей части оптического катетера с биологическим объектом представлен (рисунок 14).

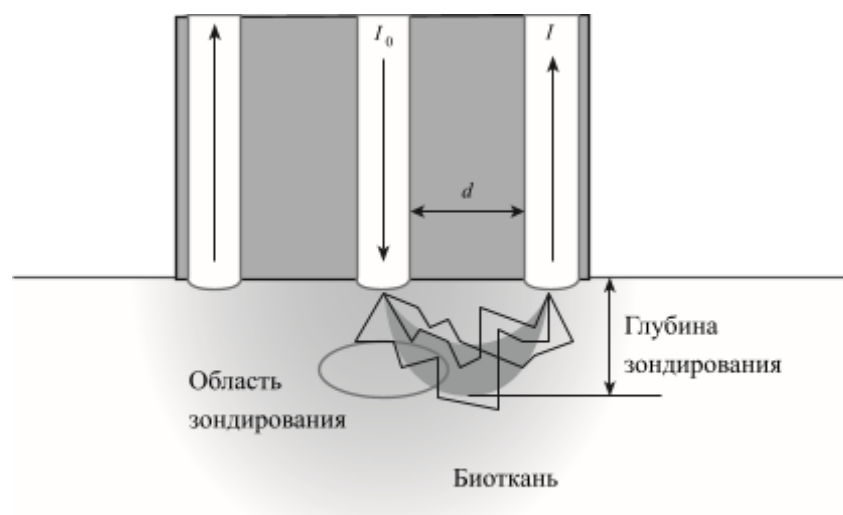


Рисунок 14. Распространение света в исследуемом образце в месте его контакта с дистальным концом гибкого оптического катетера.

После попадания в образец лазерное излучение испытывает многократные акты рассеяния, во время которых может возбудить флуоресценцию образца или фотосенсибилизатора, прежде чем попадает в приемное окно оптического волокна. Основной вклад в спектр флуоресценции вносит объем биологического образца, который находится между подающим и принимающим волокнами, поэтому глубина зондирования исследуемого образца может изменяться при изменении расстояния  $d$  между волокнами. В данной работе расстояние между волокнами составляло 250 мкм, а глубина зондирования не превышала 3 мм [29].

### 2.3 Светодиодная система для проведения ФДТ

Светодиодная система облучателя предназначалась для использования вместе с фотосенсибилизатором Себ. Она состояла из 36 узкоспектральных светодиодов с длиной волны излучения 660 нм и полушириной 22 нм (рисунок 15). Выбор спектральных характеристик излучателя производился исходя из соответствия максимуму поглощения Себ в красной области спектра ( $\lambda_{max} = 668 \text{ нм}$ ).



Рисунок 15. Изображение экспериментального светодиодного облучателя для ФДТ в конфигурации с 36 узкоспектральными светодиодами с длиной волны излучения 660 нм

Основные характеристики светодиодов, используемых в облучателе:

- Производитель: EPISTAR;
- Наименование: ES-SMBRPN42D;
- Длина волны излучения: 660 нм;
- Максимальный/рабочий ток: 750/700 мА;
- Напряжение при токе 700 мА: 3.5 В;
- Номинальная мощность: 3 Вт [28].

Чертеж корпуса облучателя с габаритными размерами изображен (рисунок 16).

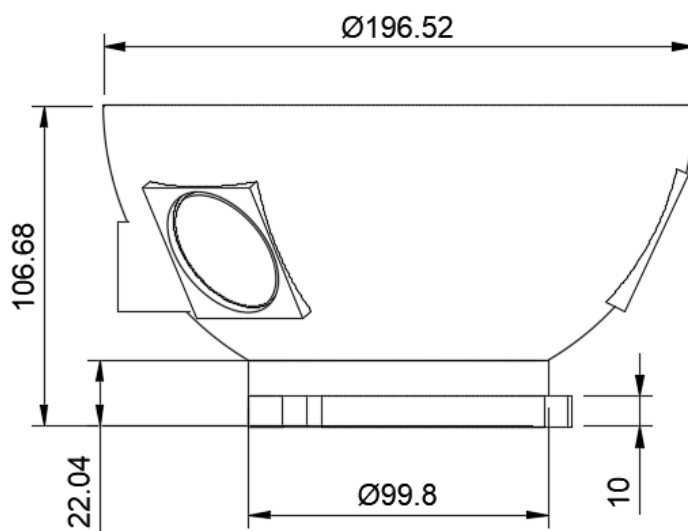


Рисунок 16. Чертеж корпуса для облучателя

#### 2.4 Различные формы фотосенсибилизатора Себ

Среди ФС второго поколения известны и широко применяются в практике производные хлоринового ряда Радахлорин (Рада-Фарма, Россия) и Фотодитазин (ООО «Вета-Гранд», Россия), Фотолон (РУП «Белмедпрепараты», Белоруссия), Фоскан («Biolitec AG», Германия).

Преимуществами Себ являются низкая фототоксичность и частота побочных эффектов, простота синтеза и селективность накопления в опухолевой ткани. Также было показано, что ФС хлоринового ряда обеспечивают высокий квантовый выход синглетного кислорода [30]. Хлорины имеют большой коэффициент экстинкции в красной области видимого спектра, который на один порядок выше соответствующего коэффициента экстинкции порфиринов. Высокая скорость распределения и накопления водорастворимых ФС производных Себ в опухоли позволяет сократить интервал между введением препарата и облучением лазерным светом [32]. Применение Себ при ФДТ способствует более глубокому некрозу, поскольку их длина волны поглощения находится в “терапевтическом окне” от 650 до 950 нм.

Механизм действия Себ больше зависит от накопления препарата в сосудистой сети, а не в опухолевой ткани т.е. его эффективность объясняется

главным образом разрушением сосудистой системы новообразований с помощью ФДТ. Себ имеет интенсивную полосу поглощения между 640 и 680 нм с максимумом примерно 660 нм и интенсивную флуоресценцию в диапазоне от 640 до 700 нм (рисунок 17).

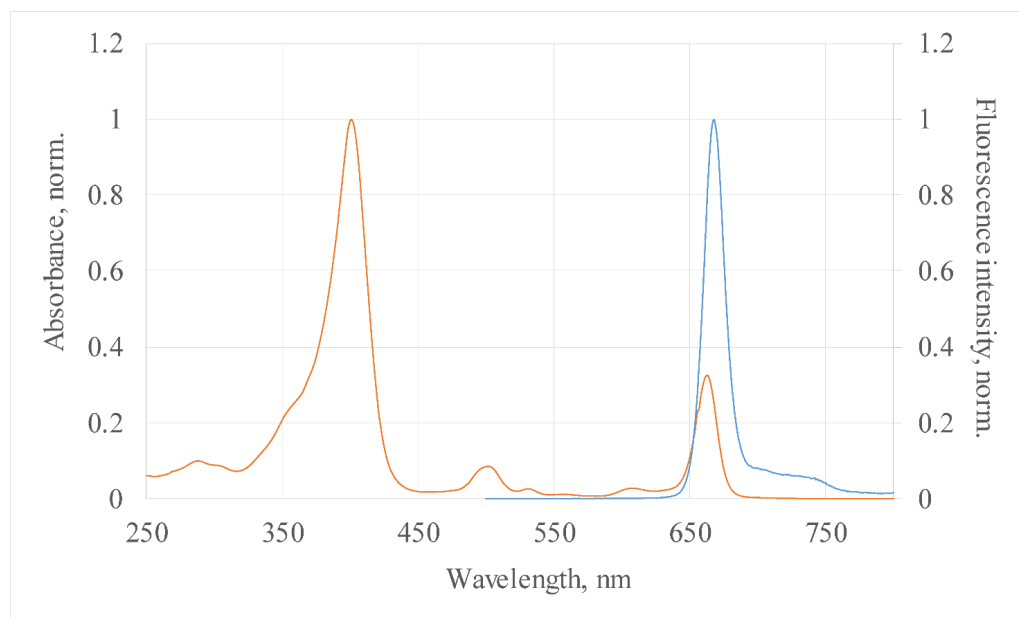


Рисунок 17. Спектры поглощения и флуоресценции хлорина еб в этаноле

В данном исследовании использовался коммерчески доступный препарат: **Фотодитазин**. Фотодитазин (Fotoditazin) разработан в компании ООО «Вета-Гранд». Он представляет собой ди-N-метилглюкаминую соль хлорина еб и является производным хлорофилла а. Фотодитазин получают из биомассы микроводоросли *Spirulina platensis* с выходом хлорина еб в количестве не менее 98 %.

Фотодитазин содержит хлорина еб, N-метил-D-глюкамин в мольном соотношении 1:2 и поливинил-пирролидон с молярным весом от 9 600 до 11 500 (т.е. в р-ре препарата находится ди-N-метилглюкаминная соль хлорина еб). Лекарственной формой фотодитазина является концентрат для приготовления раствора для инфузий 5 мг/мл, расфасованный по 10 мл во флаконы из темного стекла, зарегистрирован в 2006 г., применяется для фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики (ФД) рака кожи

(плоскоклеточный, базальноклеточный), рака легкого. Фотодитазин быстро накапливается в опухоли, максимальное накопление происходит через 2-3 часа и через 2 дня 98% препарата выводится из организма [9]. Фотодитазин обладает высокой фотодинамической активностью и имеет ряд преимуществ перед другими препаратами производных хлорина еб: - высокий коэффициент селективности накопления в опухоли по отношению к окружающей нормальной ткани, равный 10, а радахлорин и фотолон - 6 и 4 соответственно. ; - высокий квантовый выход за счет мономеричности, гидрофильности и однородности, что обеспечивает высокую степень фототоксичности; - способность связываться с мембранами опухолевых клеток; - более низкая терапевтическая доза (0,3–1,5 мг / кг веса пациента), чем радахлорин (0,5–2,4 мг / кг) и фотолон (2,5–3,0 мг / кг). Результаты клинических исследований по оценке эффективности ФДТ с использованием фотодитазина публикуются в статьях. Эффективность фотодинамической терапии у 127 пациентов с базальноклеточным раком кожи (БКК) составила 100%, при этом полная регрессия опухоли произошла у 118 (92,9%) пациентов, а частичная - у 9 (7,1%), абсолютная устойчивость опухоли к действию препарат не обнаружен. Кроме того, косметические результаты ФДТ превосходят традиционные методы лечения ОЦК (хирургический, лучевой, криодеструктивный). Во избежание побочных реакций, осложнений и необходимости соблюдения светового режима в лечении БКСК на начальных этапах применялся интерстициальный и аппликационный метод введения фотодитазина. Эффективность ФДТ на начальных этапах БКРП при интерстициальном введении препарата составляет 100%, при этом полный регресс достигнут у 76,2%, частичный регресс - 23,8%, и у всех пациентов с полным регрессом наблюдаются безрецидивы в течение 4–5 лет. А эффективность ФДТ БКРК начальных этапов после нанесения геля с Фотодитазином составляет 84,6%. ФДТ с фотодитазином - незаменимый метод лечения ОЦК при «неудобной» локализации опухоли (ушная раковина, угол глаза, веки, нос и др.). Компания «Вета-гранд» выпускает новую

лекарственную форму фотодитазина в виде 0,5% геля пенетратора, который, по мнению разработчиков, может быть перспективным для наружного применения при лечении гнойных ран, не заживающих в течение длительного времени. длительные и трофические язвы; базально-клеточный, плоскоклеточный рак и кератозы кожи; фоновые и предраковые заболевания влагалища и шейки матки; заболеваний пародонта; псориаза и дерматозов. Радахлорин был разработан компанией «Рада-Фарма» (Россия) и, в отличие от Фотодитазина, представляет собой модифицированную природную смесь хлоринов из микроводорослей рода *Spirulina*. Вещество радахлорина представляет собой 7% водный раствор (жидкий экстракт хлоринов), он содержит соли натрия: хлорина еб - 80–90%, пурпурина-5, 5–20% и пурпурина-18, который постепенно превращается в хлорин рб. Хлорин еб обладает ярко выраженной растворимостью в воде и является солюбилизующим агентом еще для двух гидрофобных хлоринов, что улучшает стабильность препарата при хранении. Если вещество содержит менее 5% пурпурина-5, оно имеет низкую биологическую активность. Ухудшается водорастворимость вещества, содержащего более 20% пурпурина-5, что отрицательно сказывается на стабильности лекарственных форм при хранении и ухудшает способность фильтровать через микропористые фильтры. Радахлорин представляет собой смесь хлорина еб и других гидрофобных компонентов, что позволяет повысить эффективность воздействия на опухоль. Однако смесь веществ усложняет фармацевтический стандарт. Компания «Рада-Фарма» производит различные лекарственные формы радахлорина: раствор для внутривенного введения 0,35% и гель «Радахлорин» для наружного применения. При внутривенном введении радахлорина в организм в дозе 0,5–2,4 мг / кг его максимальное накопление в опухоли наблюдается через 2–3 часа, тогда как для фотодитазина выводится или метаболизируется 98% радахлорина. в течение первых 48 часов. В 2005 году радахлорин рекомендован для флуоресцентной диагностики рака кожи и для ФДТ поверхностных опухолей кожи (кроме меланомы). В настоящее



время препарат проходит II фазу клинических испытаний в отоларингологии и офтальмологии [31].

### **Глава 3. Результаты исследований**

#### **3.1 Исследование спектрально-флуоресцентных свойств растворов Себ**

В качестве ФС использовался предварительно подготовленный 0,125% раствор Себ. Данный раствор состоял из двух компонент: Фотодитазина (“Вета-Гранд”, Россия) и Блефарогеля 1 (“ГЕЛЬТЕК-МЕДИКА”, Россия). Следующие компоненты раствора последовательно смешивались до образования однородной консистенции: 0.5 мл Фотодитазина и 1.5 мл Блефарогеля, активным веществом которого является гиалуроновая кислота.

Важной особенностью препарата Фотодитазин (5 мг / мл, вспомогательные вещества: вода д / и до 1 мл) является практическое отсутствие темновой цитотоксичности, быстрое (в течение 24-28 ч) выведение из организма, прежде всего с кожи и слизистые оболочки, высокий тропизм (т.е. соотношение концентрации препарата в опухоли и нормальной ткани), достигающий, в зависимости от типа опухоли, максимальных значений более 20. Указанные свойства препарата практически исключают повреждающее действие, во время ФДТ здоровых органов и тканей, а также формирование кожных покровов. После внутривенного введения Фотодитазина максимальная концентрация в опухоли достигается через 1,5-2,5 часа с момента введения (в зависимости от нозологического типа опухоли). Через 4-5 часов концентрация Фотодитазина в опухоли постепенно снижается.  $T_{1/2}$  - 12 часов. Через 28 часов после внутривенного введения в крови обнаруживаются следовые количества препарата. Максимальный контраст накопления препарата (опухоль / нормальная ткань) после внутривенного введения препарата зависит от нозологического типа новообразования и может варьироваться от 3,0 до 24. Препарат активно метаболизируется в печени (более 95%). Связь с белками плазмы - 92-96%.

Противопоказания к применению препарата Фотодитазин:

1. повышенная чувствительность к препарату;
2. выраженная почечная или печеночная недостаточность;
3. сердечно-сосудистые заболевания в фазе декомпенсации;
4. беременность и период кормления грудью;
5. детский возраст.

Для создания гелевой основы растворов применялся гель для физиотерапии век в виде прозрачной вязкой гелеобразной субстанции Блефарогель 1, в состав которого входит гиалуроновая кислота, сок алоэ вера, вода очищенная, глицерин, пропиленгликоль, поливинилпирролидон, карбомер нейтрализованный, протектол, метилпарабен, пропилпарабен. Блефарогель 1 – вязкая, прозрачная гелеобразная субстанция. Блефарогель 1 применяют для снятия усталости глаз при ношении контактных линз, работе за компьютером, длительном и регулярном нахождении в кондиционированных помещениях. Очищение кожи век с помощью Блефарогеля 1 является эффективным способом гигиены век для профилактики воспалительных заболеваний - блефаритов, демодекоза век и синдрома "сухого глаза". Не раздражает кожу и края век, не требует удаления с поверхности кожи после процедур. Блефарогель 1 применяется как гигиеническое средство для очищения кожи и краев век и как контактное средство при лечебных процедурах на веках: массаже, физиотерапевтических процедурах. Гель обеспечивает плотный (безвоздушный) контакт физиотерапевтических датчиков с кожей века и обеспечивает хорошее скольжение пальцев при массаже по поверхности века. Благодаря мицеллярной структуре и увлажняющим свойствам гиалуроновой кислоты Блефарогель 1 обладает высокими очищающими свойствами.

Противопоказания к применению препарата Блефарогель 1:

1. индивидуальная непереносимость отдельных компонентов Блефарогеля 1, проявляющаяся в виде местных аллергических реакций.

Представлены результаты спектрально-флуоресцентной диагностики Блефарогеля, раствора Себ на основе Н<sub>2</sub>О и Блефарогеля при возбуждении флуоресценции лазерным излучением длиной волны 632,8 нм (рисунок 18).

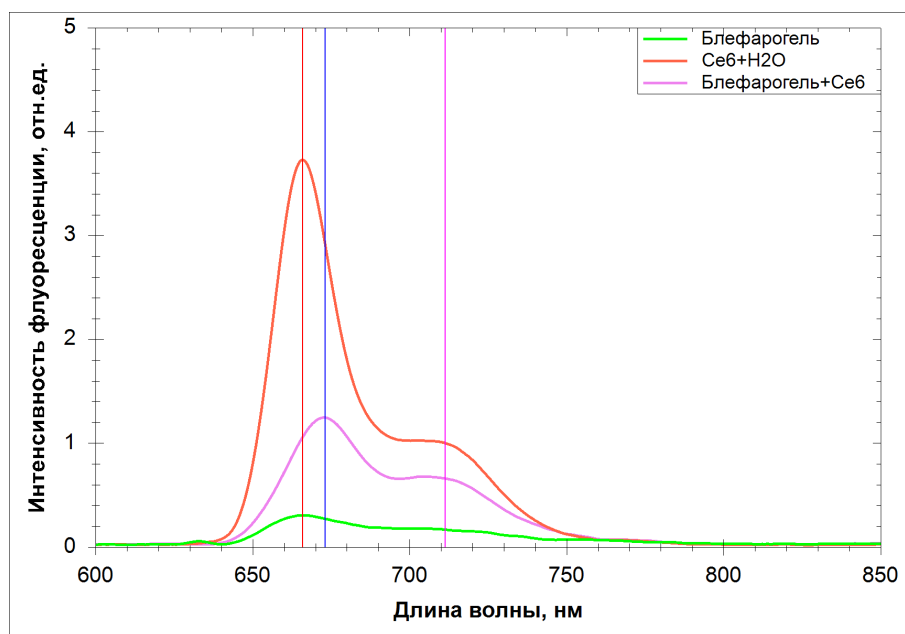


Рисунок 18. Спектры флуоресценции препарата Блефарогель (зеленый), водного раствора Себ (красный) и гелевого раствора Себ на основе Блефарогеля (фиолетовый), возбуждении флуоресценции лазерным излучением 632,8 нм

На спектрах флуоресценции Блефарогеля наблюдался пик флуоресценции на длине волны 665 нм. На спектрах флуоресценции водного раствора Себ пик наблюдалось два пика на длинах волн 672 и 710 нм. Тогда как, в случае раствора Себ на основе Блефарогеля, пики флуоресценции были на длинах волн 673 нм и 710 нм.

Представлены результаты спектрально-флуоресцентной диагностики Блефарогеля, раствора Себ на основе Н<sub>2</sub>О и Блефарогеля при возбуждении флуоресценции лазерным излучением длиной волны 532 нм (рисунок 19).

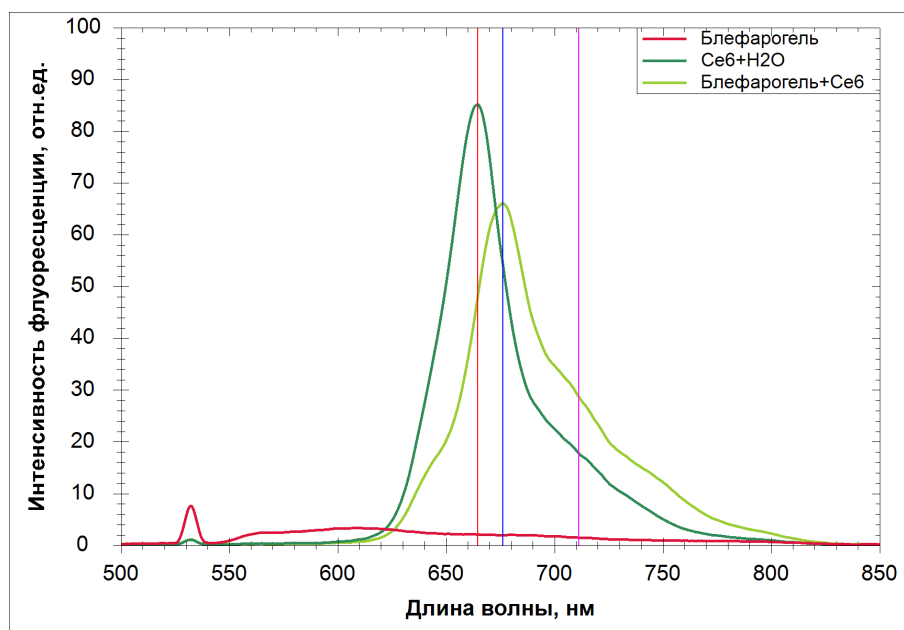


Рисунок 19. Спектры флуоресценции препарата Блефарогель (красный), водного раствора Се6 (темно-зеленый) и гелевого раствора Се6 на основе Блефарогеля (светло-зеленый), возбуждении флуоресценции лазерным излучением 532 нм

На спектрах флуоресценции Блефарогеля интенсивная флуоресценция отсутствовала. На спектрах флуоресценции водного раствора Се6 наблюдался пик на длине волны 665 нм. Тогда как, в случае раствора Се6 на основе Блефарогеля пик флуоресценции был на длине волны 676 нм.

Для проведения дополнительного исследования с целью повышения проникающей способности кожи был изготовлен 0,125% раствор Се6 на основе растворителя ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», в состав которого входит вода 88,6%, пропиленгликоль 5%, (диметилсульфоксид) ДМСО 5% и ГЭЦ 1,4%. Следующие компоненты раствора последовательно смешивались до образования однородной консистенции: 0,25 мл Фотодитазин 0,75 мл растворителя.

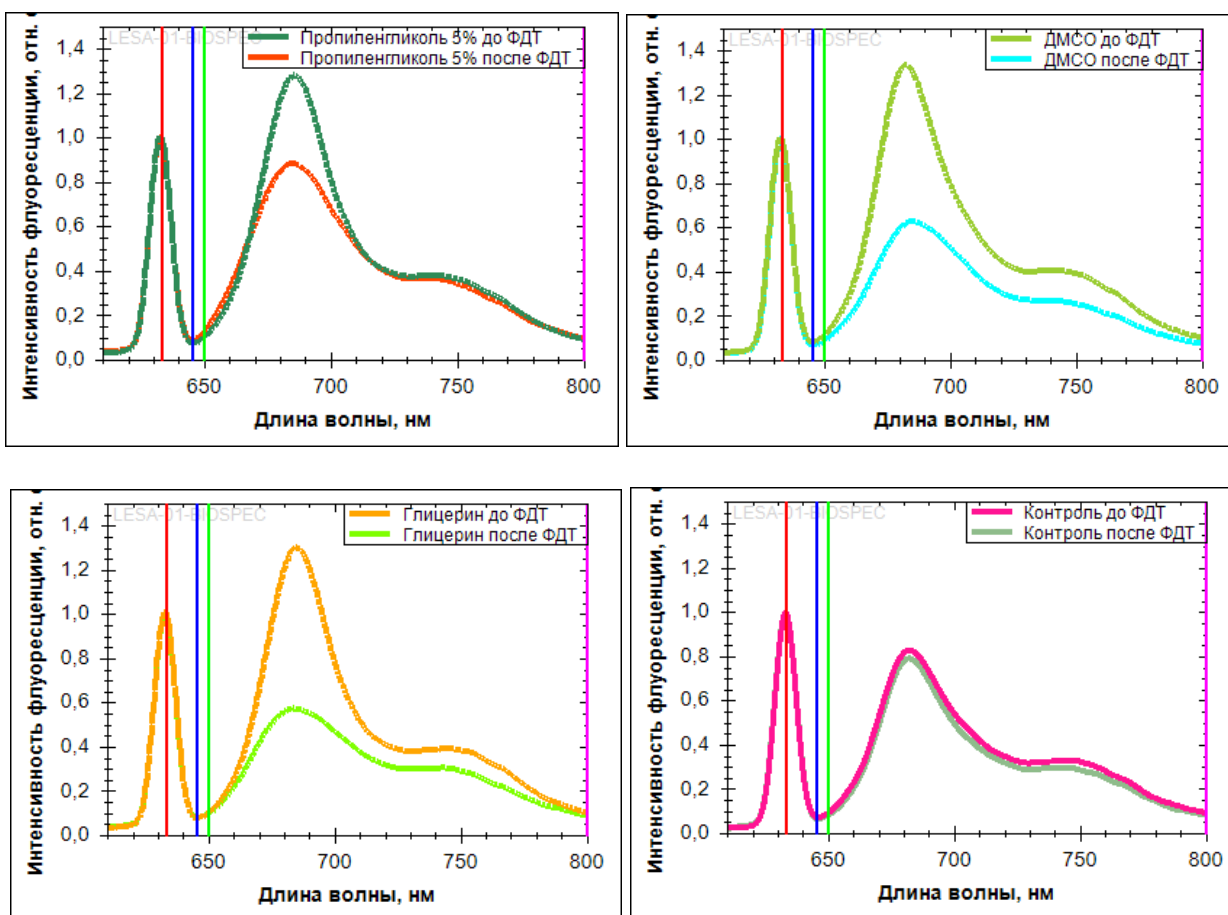


Рисунок 20. Спектры флуоресценции пропиленгликоля, ДМСО, глицерина до и после ФДТ

На всех полученных спектрах основных компонентов растворителя наблюдалась интенсивная флуоресценция в диапазоне 650-710 нм.

### 3.2 Исследование спектрально-флуоресцентных свойств кожи лица человека

Данное исследование проводилось на коже лица пациента ЛВБ возрастом 68 лет. Перед началом проведения процедуры ФД и ФДТ на коже лица были выделены зоны, в пределах которых проводилась процедура спектрально-флуоресцентной диагностики (рисунок 21).

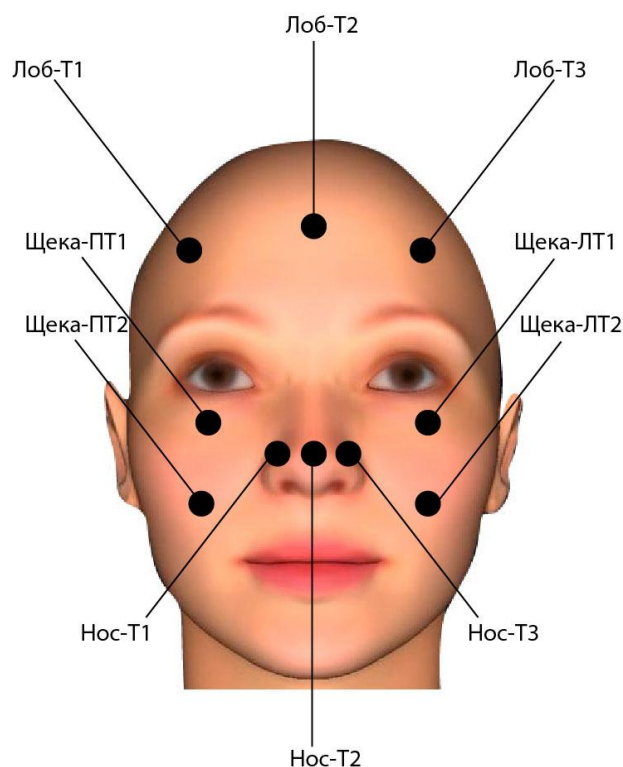


Рисунок 21. Зоны кожи лица в которых проводилась спектрально-флуоресцентная диагностика и их обозначения

### **Оборудование**

*Для проведения спектрально-флуоресцентной ФД использовалось следующее оборудование:*

1. Установка лазерная электронно-спектральная ЛЭСА-01-БИОСПЕК; оптический фильтр ЗП-633.
2. Y-образный оптоволоконный катетер (количество волокон 6+1);
3. Источники лазерного излучения с длинами волн 632.8 и 532 нм.

*Для проведения ФДТ применялось следующее оборудование:*

1. Светодиодная система с длиной волны излучения 660 нм и выходной мощностью 14 Вт;
2. Полупроводниковый источник лазерного излучения с длиной волны 660 нм и выходной мощностью 0.3 Вт;
3. Торцевое волокно TF-D600.

## Параметры ФДТ

Общая световая доза (плотность энергии) при воздействии светодиодной системой на кожу лица составляла 60 Дж/см<sup>2</sup>, плотность мощности на поверхности кожи 80 мВт/см<sup>2</sup>, время облучения 15 минут. Общая световая доза (плотность энергии) при воздействии светодиодной системой на крылья носа составляла 20 Дж/см<sup>2</sup>, плотность мощности на поверхности кожи 80 мВт/см<sup>2</sup>, время облучения 2 минуты.

## Описание сеанса ФДТ

Частота проведения сеанса 1 раз в месяц в течение 3 месяцев с возможным продлением до 6 месяцев.

1. Сделать фотографию исследуемой области кожи лица.
2. Провести спектральную диагностику до введения ФС.
3. Исследуемую область кожи лица предварительно очистить спиртом, а затем равномерно нанести раствор ФС объемом 2.5 мл.
4. Покрыть исследуемую область лица пищевой пленкой и избегать попадания прямых солнечных лучей.
5. По истечении времени экспозиции (для Себ 30 мин) промыть кожу водой. При аппликации Себ дополнительно перед проведением сеанса ФДТ механически удалить остатки ФС с поверхности кожи, используя губку средней жесткости.
6. Провести спектральную диагностику через 30 мин после аппликации с Себ.
7. Провести ФДТ.
8. Провести спектральную диагностику после ФДТ.
9. Нанести на кожу увлажняющий крем с SPF 30-50.

### 3.3 Исследование динамики накопления и фотобликинга Себ

В рамках исследования была проведена спектрально-флуоресцентная диагностика кожи лица с Себ с применением источника лазерного излучения с длиной волны 632.8 и 532 нм до и после ФДТ.

При ФД с источником лазерного излучения 632.8 нм были зарегистрированы спектры флуоресценции в каждой исследуемой зоне и рассчитаны индексы флуоресценции, как отношение площади под спектром флуоресценции  $PpIX I_{695-720}$  к площади под спектром рассеянного назад лазерного излучения  $I_{645-750}$ :

$$\text{Индекс флуоресценции} = I_{645-750} / I_{625-640}$$

На рис. 22, 23 и 24 представлены диаграммы распределения индексов флуоресценции до введения Себ, 30 мин после введения (до и после смытия ФС) и после ФДТ для различных областей кожи лица - лоб, нос и щека при использовании для ФД источника лазерного излучения с длиной волны 632.8 нм. Смытие ФС через 30 минут после введения проводили для того, чтобы избежать эффекта “экранирования” при ФДТ в связи с накоплением ФС на поверхности биоткани, что может препятствовать ФДТ в более глубоких слоях биоткани и снижать эффективность терапии.

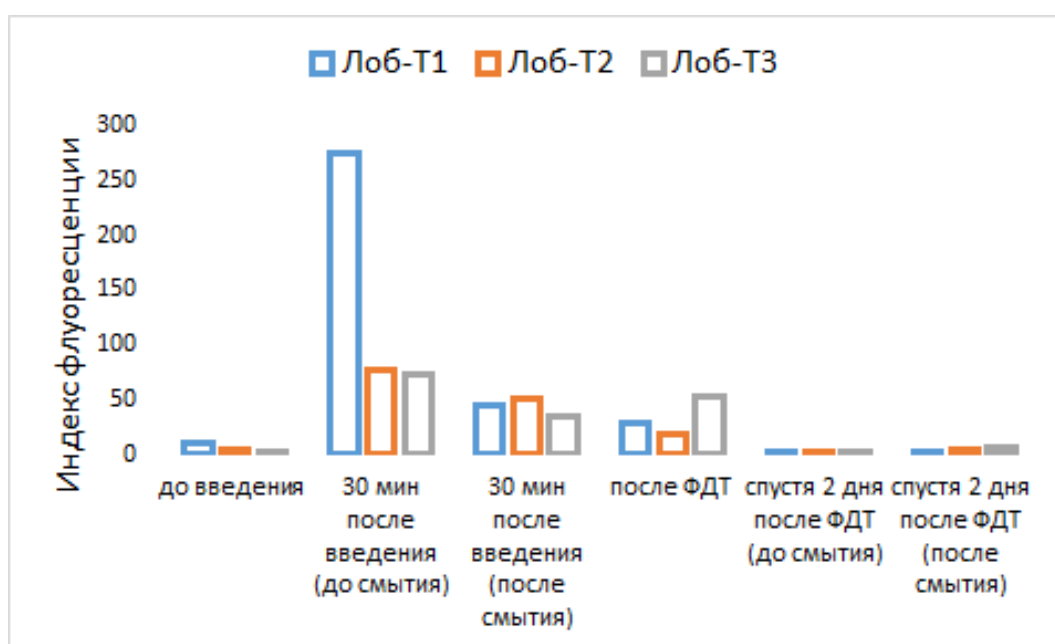




Рисунок 22. Диаграмма распределения индексов флуоресценции до введения Себ, 30 мин после введения (до и после смыва ФС) и после ФДТ в области кожи лба

Из диаграммы на рисунке выше видно, что в точке Лоб-Т1 Себ через 30 мин после аппликации накопился значительно больше, чем в других точках кожи носа. Спектрально-флуоресцентная диагностика показала неравномерное распределение ФС в биоткани, что было сложно оценить визуально до аппликации ФС. После смыва ФС с поверхности биоткани значения индексов флуоресценции снизились. Это свидетельствует, что фотосенсибилизатор распределился в более глубоких слоях биоткани. После проведения ФДТ произошло выгорание ФС. Индекс флуоресценции приблизился к значениям до введения ФС. Только в области Лоб-Т3 индекс флуоресценции был выше после ФДТ, чем до ФДТ. Это может быть связано с перегревом биоткани и приливом крови в данной области.

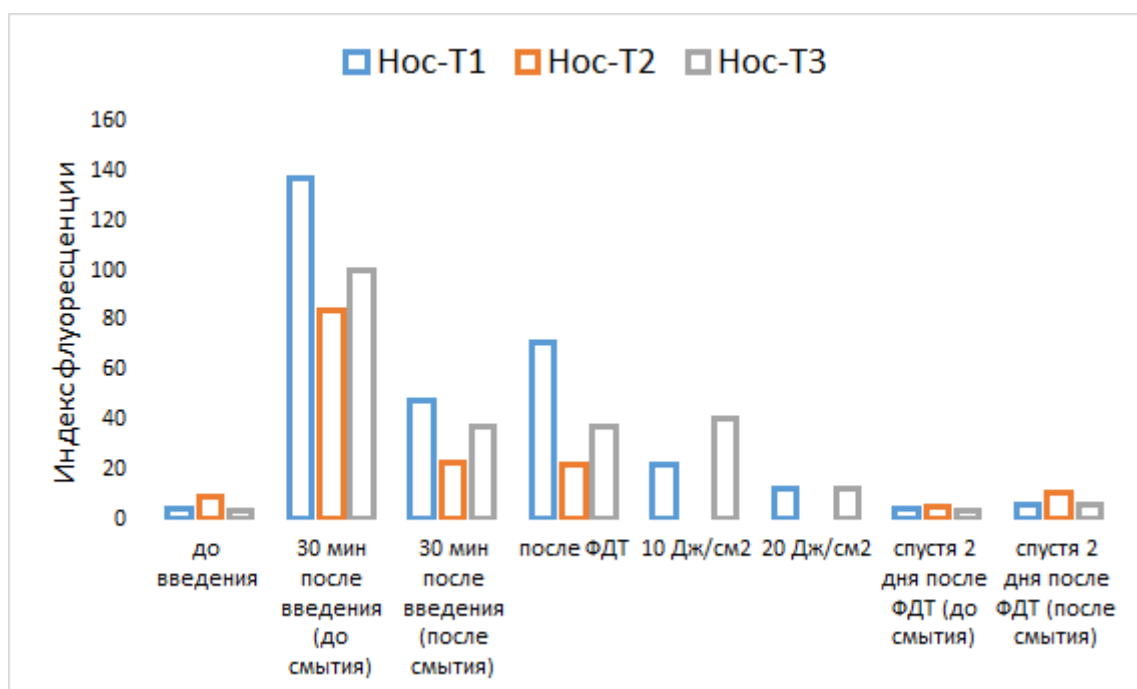


Рисунок 23. Диаграмма распределения индексов флуоресценции до введения Себ, 30 мин после введения (до и после смыва ФС) и после ФДТ в области кожи крыльев носа

Также видно, что ФС распределился неравномерно и создает “эффект экранирования”. Чтобы избежать снижение эффективности ФДТ в следствие данного эффекта области кожи носа также были промыты от излишка ФС. После смывтия значения индексов флуоресценции снизились. Себ равномерно распределился в более глубоких слоях биоткани. В зоне Нос-Т1 индекс флуоресценции после ФДТ также был выше, чем до ФДТ, в точках Нос-Т2 и Нос-Т3 не произошло выгорания ФС. Была проведена повторная ФДТ только в областях крыльев носа в точках Нос-Т1 и Нос-Т3 с плотностью энергии 20 Дж/см<sup>2</sup>. В зоне Нос-Т2 повторная ФДТ не проводилась, так как в этой области не визуализируются кровеносные сосуды ( рисунок 23).

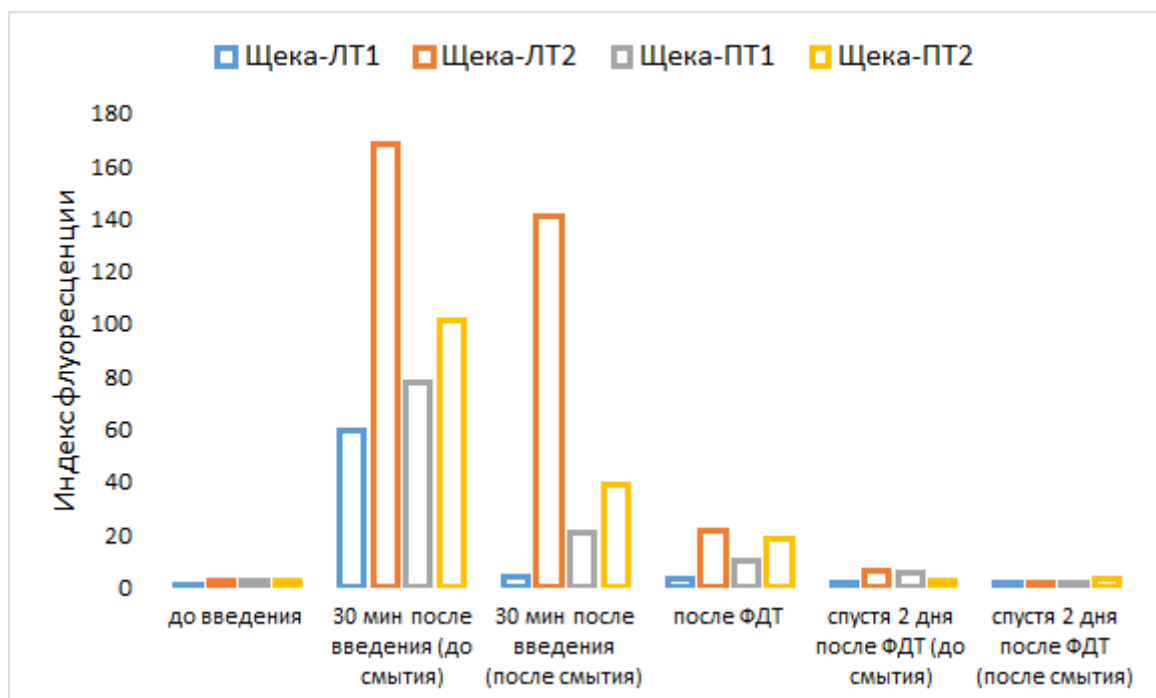


Рисунок 24. Диаграмма распределения индексов флуоресценции до введения Себ, 30 мин после введения (до и после смывтия ФС) и после ФДТ в области кожи щек

Демонстрирует неравномерное распределение ФС в области кожи щёк после аппликации с Себ. Для того, чтобы добиться равномерного распределения ФС также, как и в предыдущих случаях проводилось смывтие ФС с поверхности кожи. Однако, после смывтия в области кожи щёк не удалось достичь равномерного распределения ФС после смывтия. Это может

свидетельствовать о реально высоком накоплении ФС в данных областях. В результате выгорания ФС индекс флуоресценции снизился во всех исследуемых областях (рисунок 24).

Была проведена спектрально-флуоресцентная диагностика после ФДТ областей кожи носа Нос-Т1 и Нос-Т3 с различной плотностью энергии 60, 70 и 80 Дж/см<sup>2</sup>. Представлена диаграмма изменения индекса флуоресценции кожи носа при изменении плотности энергии (рисунок 25).

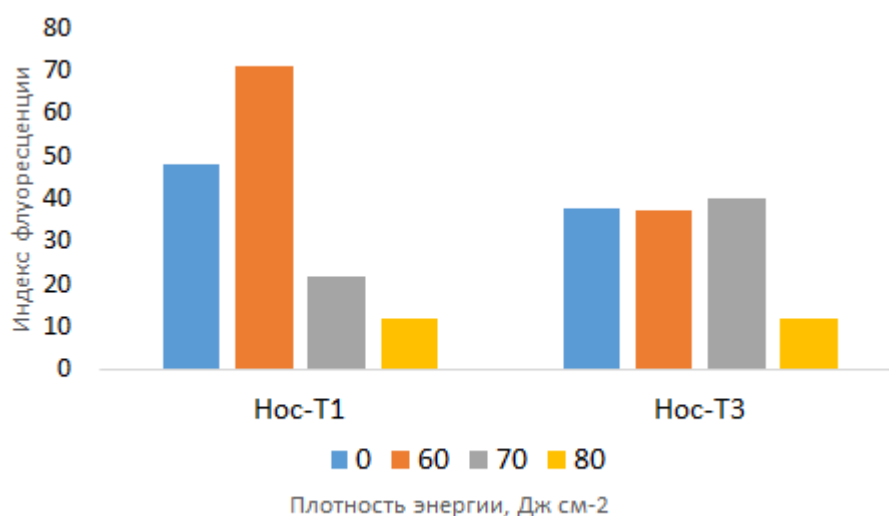


Рисунок 25. Изменения индекса флуоресценции кожи носа при различных плотностях энергии

Рисунок показывает, что после ФДТ с плотностью энергии 80 Дж/см<sup>2</sup> степень выгорания ФС значительно выше, чем при плотностях энергии 60 и 70 Дж/см<sup>2</sup> для области Нос-Т1. В области Нос-Т3 не наблюдалось выгорания ФС при ФДТ с плотностями энергии 60 и 70 Дж/см<sup>2</sup>. Только при плотности энергии 80 Дж/см<sup>2</sup> индекс флуоресценции снизился более чем на 50%. Это может быть связано с большим накоплением ФС в области Нос-Т1, чем в области Нос-Т3, что видно из представленного графика.

При ФД с источником лазерного излучения 632.8 нм были зарегистрированы спектры флуоресценции в каждой исследуемой зоне и рассчитаны индексы флуоресценции, как отношение площади под спектром

флуоресценции  $RrIX I_{645-800}$  к площади под спектром рассеянного назад лазерного излучения  $I_{525-540}$ :

$$\text{Индекс флуоресценции} = I_{645-800} / I_{525-540}$$

На рисунках представлены диаграммы распределения индексов флуоресценции до введения Себ, 30 мин спустя после введения (до и после смытия ФС) и после ФДТ для различных областей кожи лица - лоб, нос и щека при использовании для ФД источника лазерного излучения с длиной волны 532 нм (рисунки 26-28).

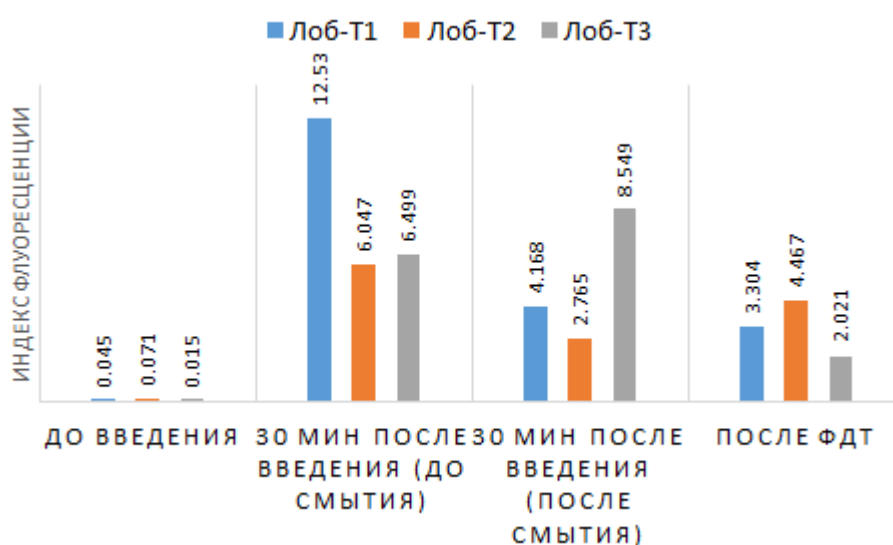


Рисунок 26. Диаграмма распределения индексов флуоресценции до введения Себ, 30 мин после введения (до и после смытия ФС) и после ФДТ в области кожи лба

После смытия ФС с поверхности кожи, спектрально-флуоресцентная диагностика показала распределение ФС в более глубоких слоях кожи как для областей кожи лба, так и для кожи носа и щёк. После ФДТ в результате выгорания Себ в коже индекс флуоресценции снизился во всех случаях.

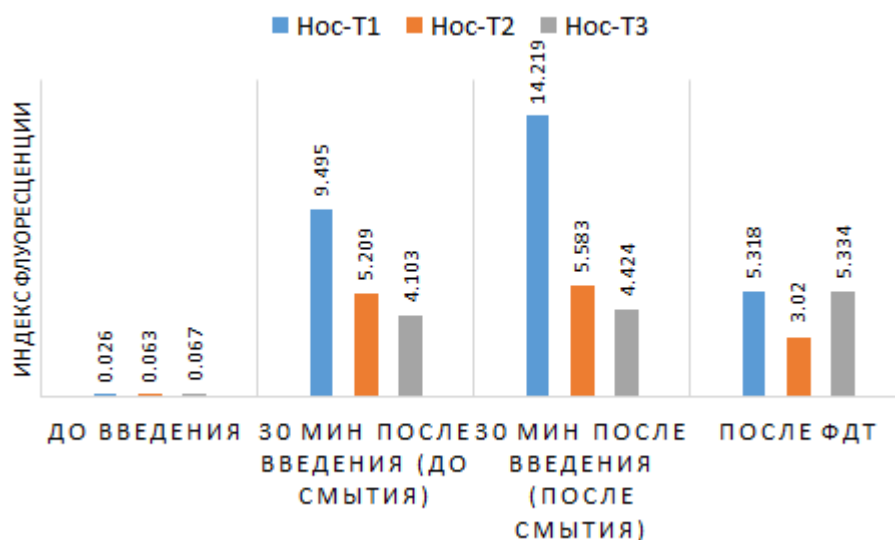


Рисунок 27. . Диаграмма распределения индексов флуоресценции до введения Себ, 30 мин после введения (до и после смытия ФС) и после ФДТ в области кожи носа

В случае области кожи носа в точке Нос-Т3 наблюдалось небольшое увеличение индекса флуоресценции после ФДТ по сравнению с результатом до ФДТ (рисунок 27).

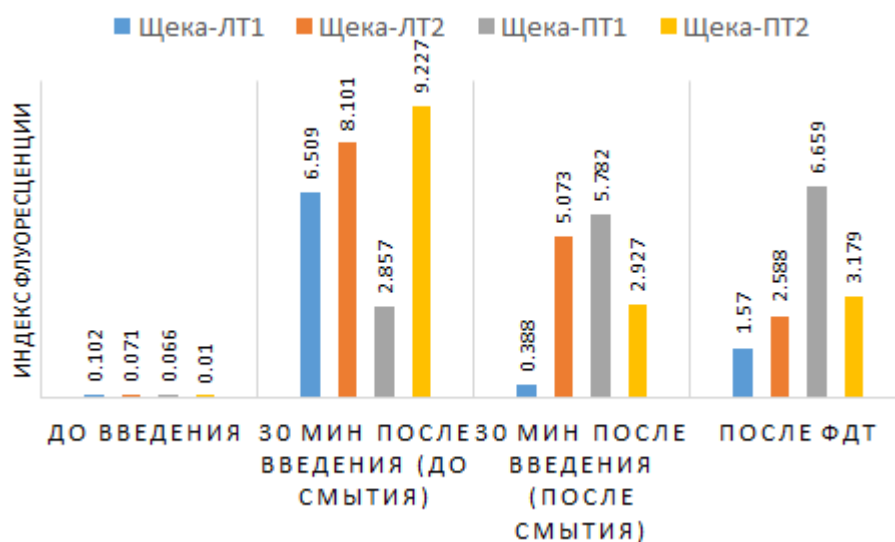


Рисунок 28. Диаграмма распределения индексов флуоресценции до введения Себ, 30 мин после введения (до и после смытия ФС) и после ФДТ в области кожи щёк

В случае кожи щёк после ФДТ индекс флуоресценции увеличился относительно значения индекса флуоресценции до ФДТ для точек области щёк Щека-ЛТ1, Щека-ПТ1, Щека-ПТ2, что может быть связано с перегревом и приливом крови к исследуемой области в результате фотодинамического воздействия, как это наблюдалось и в предыдущих результатах (рисунок 28).

### **3.4 Сравнительное исследование распределения коэффициента контрастности кожи при применении гелевых форм Себ на основе растворителя ДМСО и Блефарогеля**

#### **Оборудование**

*Оборудование для проведения спектрально-флуоресцентной диагностики (ФД)*

- Установка лазерная электронно-спектральная ЛЭСА-01-БИОСПЕК;
- Y-образный оптоволоконный катетер (количество волокон 6+1);
- He-Ne источник лазерного излучения с длиной волны 632.8 нм и выходной мощностью излучения 15 мВт;
- Оптический фильтр ЗП-633;

*Оборудования для проведения фотодинамической терапии (ФДТ)*

- Светодиодная система с длиной волны излучения 660 нм и выходной мощностью 14 Вт;
- Полупроводниковый источник лазерного излучения с длиной волны 660 нм и выходной мощностью 1.5 Вт;
- Торцевое волокно TF-D600 (гусь).

#### **Параметры ФДТ**

*Лицо: аппликация Себ*

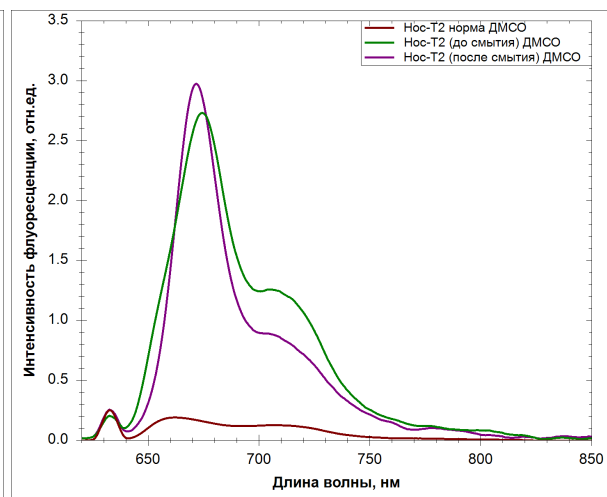
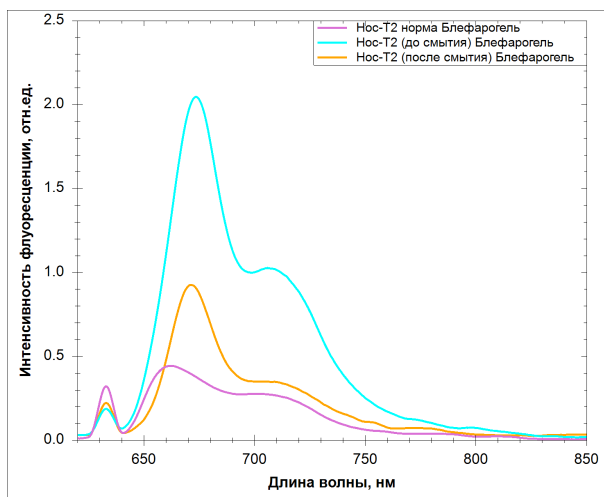
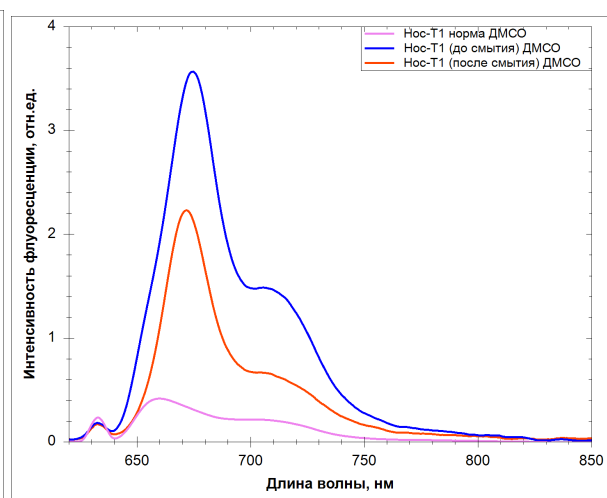
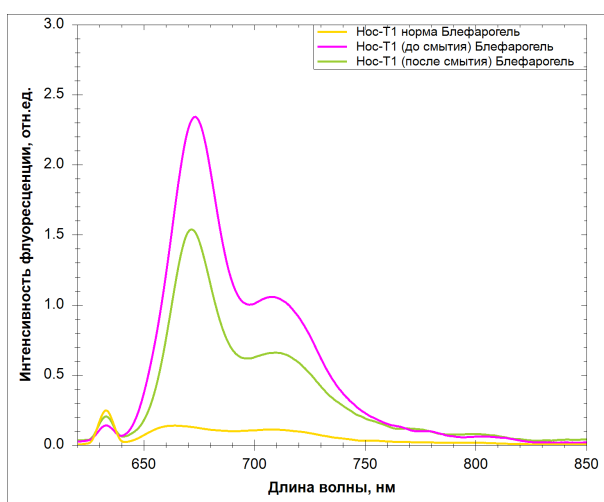
Время экспозиции ФС: 30 мин

Общая световая доза (плотность энергии) при воздействии светодиодной системой составила 60 Дж/см<sup>2</sup> (плотность мощности на поверхности кожи 80 мВт/см<sup>2</sup>, время облучения 11 минут).

Нос: аппликация Себ

Время экспозиции ФС: 30 мин

Общая световая доза (плотность энергии) при воздействии полупроводниковым источником лазерного излучения составила 30 Дж/см<sup>2</sup> (плотность мощности на поверхности кожи 80 мВт/см<sup>2</sup>, время облучения 6 минут).



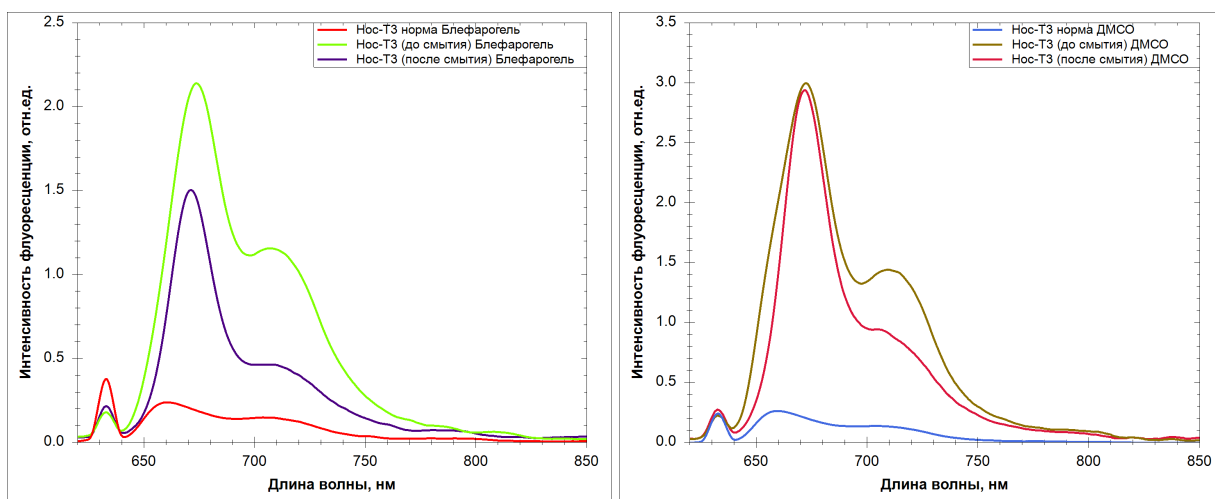
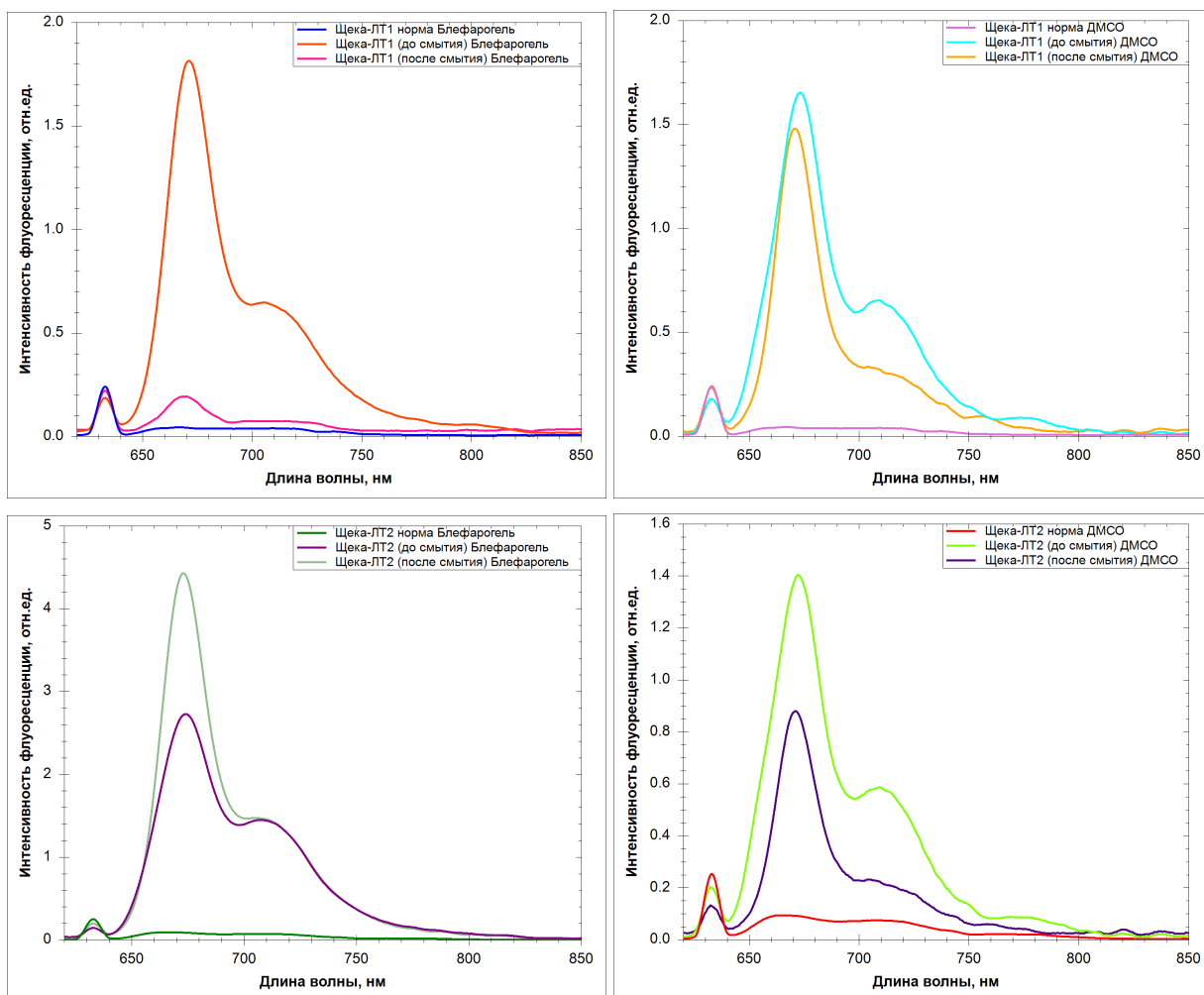


Рисунок 29. Результаты спектрально-флуоресцентной диагностики кожи носа пациента ЛВБ с применением растворов на основе Блефарогеля (слева) и ДМСО (справа)





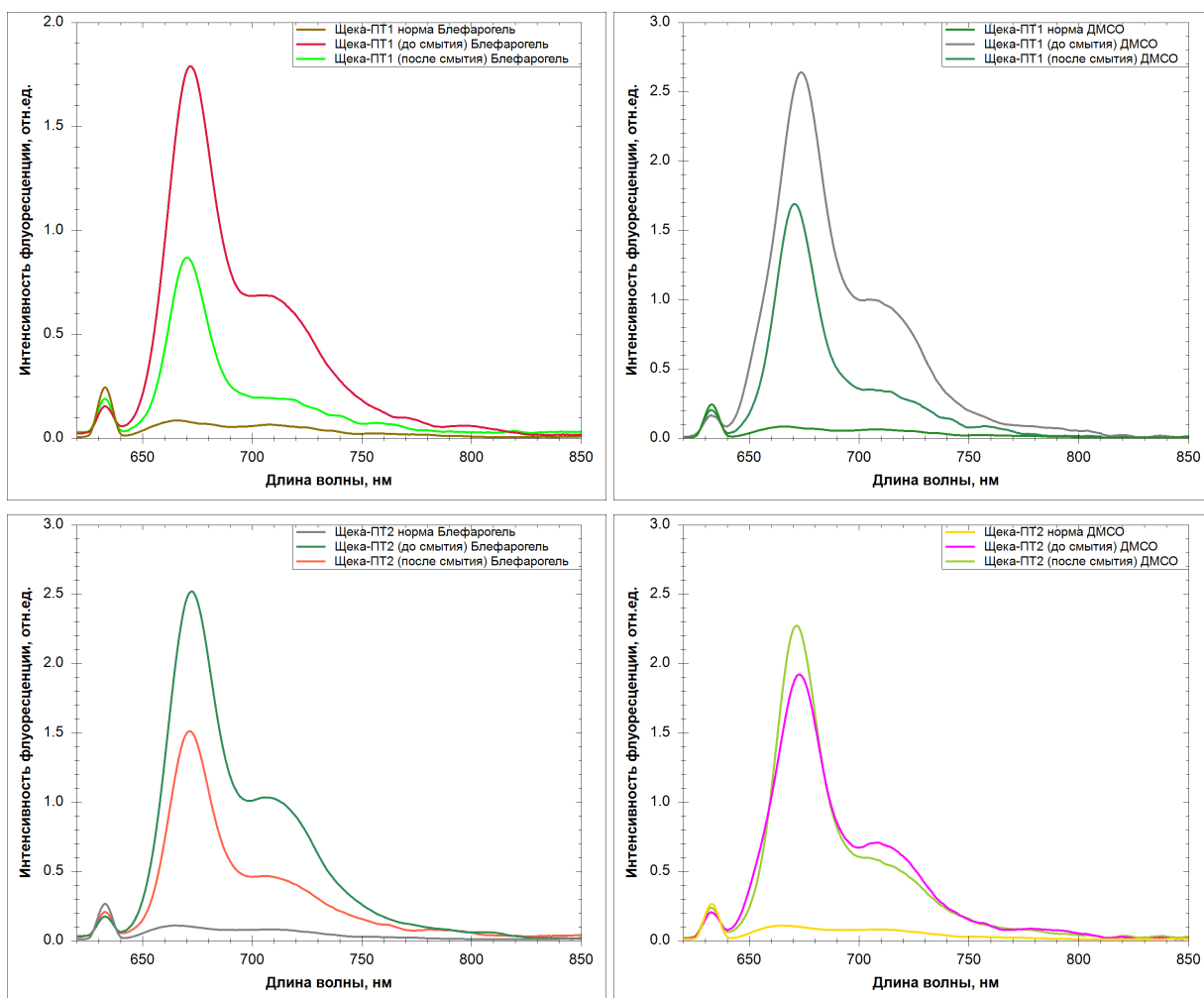


Рисунок 30. Результаты спектрально-флуоресцентной диагностики кожи щек пациента ЛВБ с применением растворов на основе Блефарогеля (слева) и ДМСО (справа)

На рисунке 31 приведены сравнительные диаграммы распределение коэффициента контрастности  $k$  тканей при применении гелевых форм Себ с ДМСО и Блефарогелем, который рассчитывался как отношение индекса флуоресценции спустя 30 мин после введения и предварительного смывания  $Fl_{\text{норма}}$  к значениям индекса флуоресценции исследуемой ткани до введения ФС  $Fl_{\text{после смывания}}$ :

$$k = \frac{Fl_{\text{норма}}}{Fl_{\text{после смывания}}}$$

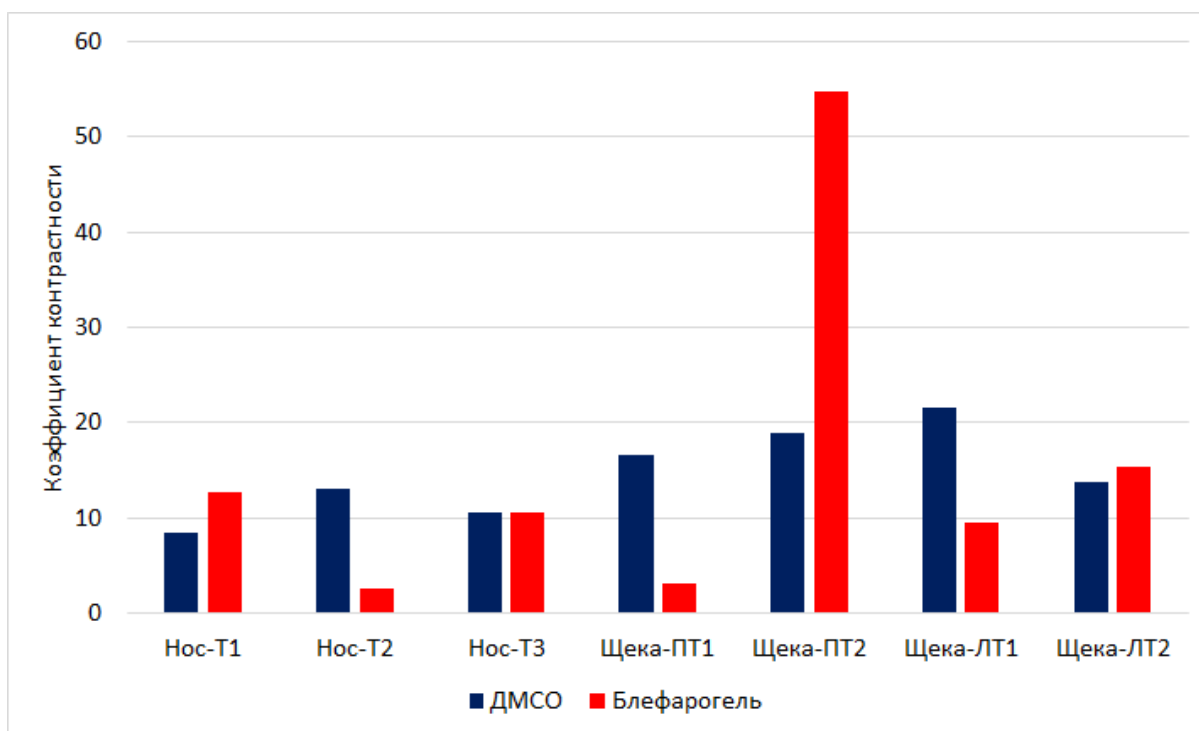


Рисунок 31. Распределение коэффициента контрастности исследуемых тканей при применении гелевых форм Себ на основе ДМСО и Блефарогелем

Наибольшее значение коэффициента контрастности наблюдалось в случае применения раствора Себ на основе Блефарогеля.

### 3.5 Визуальная оценка кожи лица после ФДТ

В процессе фотоомоложения кожи лица, проводилась фиксация изображений областей кожи, которые подвергались фотодинамическому воздействию. Изображения были получены в одинаковых световых условиях. Представлены изображения различных участков лица пациента ЛВБ до и сразу после ФДТ с применением раствора Себ на основе Блефарогеля (рисунок 32).

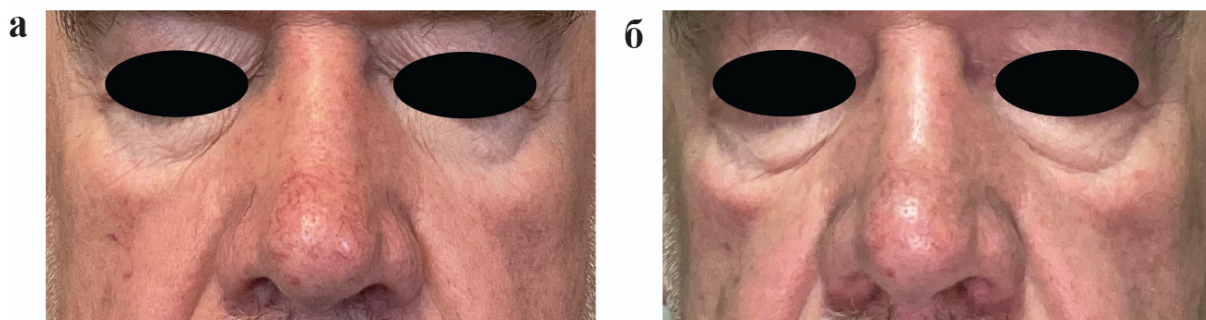


Рисунок 32. Изображения кожи лица. **а.** До ФДТ; **б.** Сразу после ФДТ

На рисунке 34 представлены изображения различных участков лица пациента ЛВБ спустя 3 дня после ФДТ с применением раствора Себ на основе Блефарогеля.

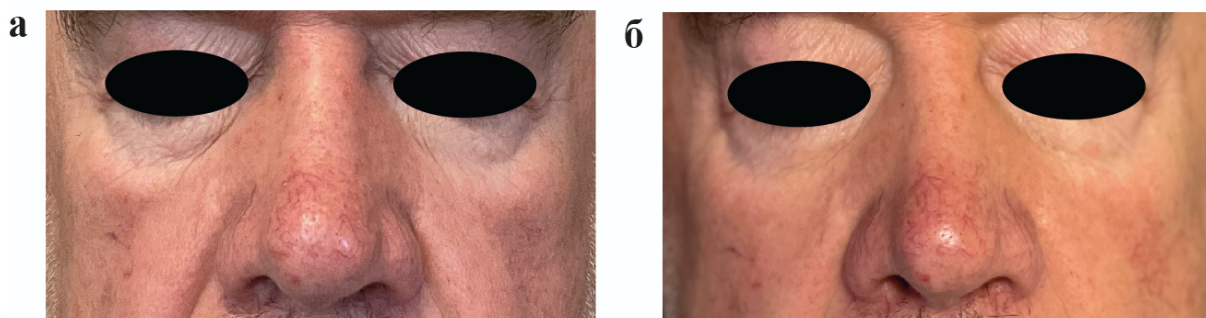


Рисунок 33. Изображения кожи лица. **а.** До ФДТ; **б.** Спустя 3 дня после ФДТ

На рисунке 34 представлены изображения различных участков лица пациента ЛВБ спустя 5 дней после ФДТ с применением раствора Себ на основе Блефарогель.

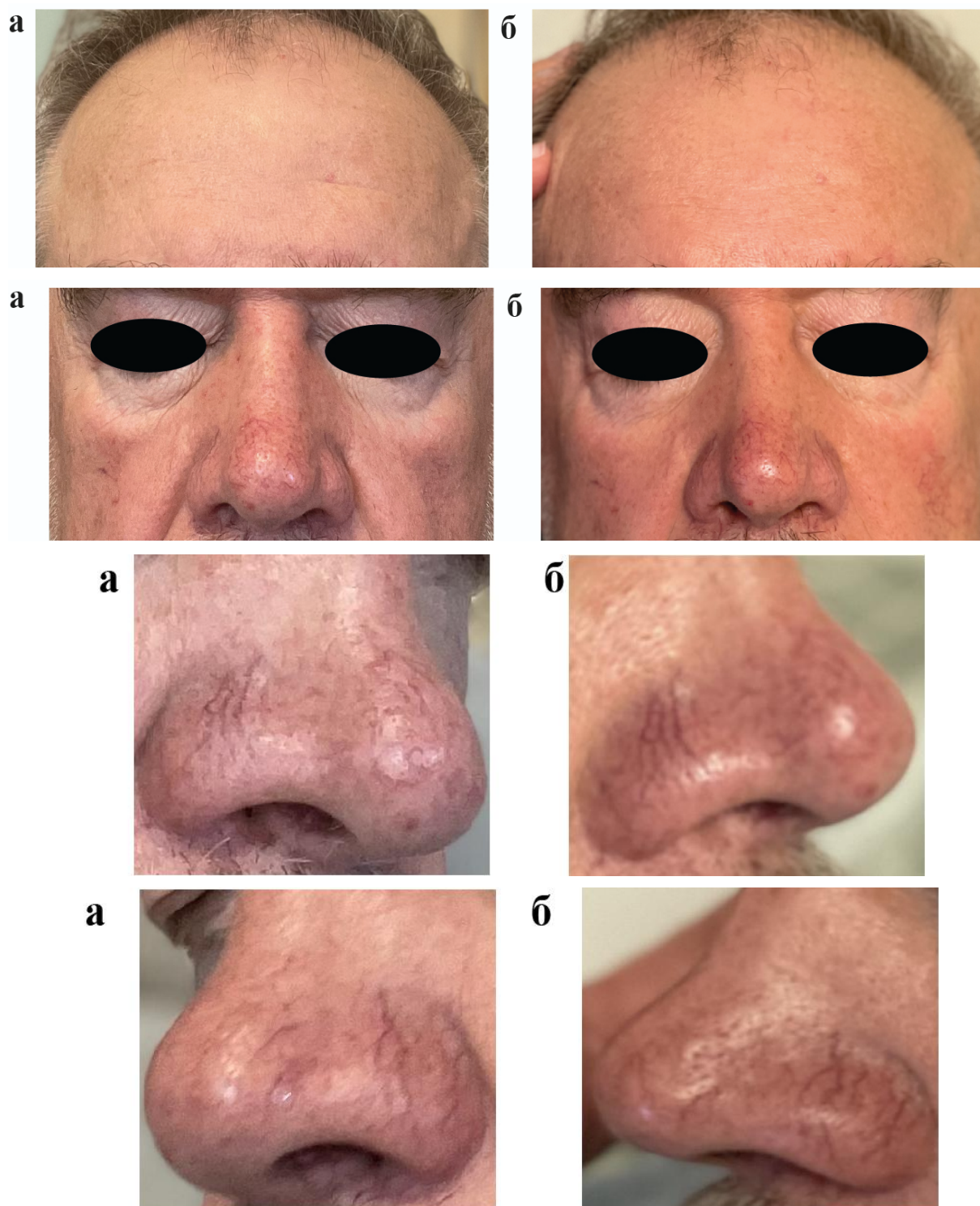


Рисунок 34. Изображения кожи лица. а. До ФДТ; б. Спустя 5 дней после ФДТ

После проведения процедур ФДТ у пациента не наблюдалось актинического кератоза. Следует отметить, что этот пациент допускал продолжительное пребывание на свету на следующее утро после фотодинамического воздействия. Спустя 5 дней после начала процедур фотоомоложения было отмечено общее улучшение состояния кожи (рисунок 34).

## Заключение

В результате проведенной работы разработан метод спектрально-флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии с целью фотоомоложения кожи лица человека посредством применения фотосенсибилизатора Себ.

Разработаны и исследованы спектрально-флуоресцентные свойства 2 гелевых раствора фотосенсибилизатора Себ на основе Блефарогеля и ДМСО с целью увеличения эффективности терапии. На спектрах флуоресценции водного раствора Себ пик наблюдалось два пика на длинах волн 665 и 710 нм. Тогда как, в случае раствора Себ на основе Блефарогеля, пики флуоресценции были на длинах волн 673 и 710 нм. На спектрах флуоресценции ДМСО интенсивная флуоресценция отсутствовала.

Исследована динамика накопления и фотобликинга Себ после его местного введения. Было выявлено неравномерное распределение на коже создает “эффект экранирования”. На основе полученных данных, для избежания “эффекта экранирования” некоторые участки кожи были подвергнуты повторному смытию фотосенсибилизатора.

Проведение сравнительной оценки распределения коэффициента контрастности кожи лица при применении гелевых форм Себ с ДМСО и Блефарогелем выявило, что наибольшее значение коэффициента контрастности наблюдается в случае применения раствора Себ на основе Блефарогеля.

В процессе проведения процедуры фотоомоложения не было выявлено актинического кератоза кожи с учетом продолжительного пребывания на свету на следующее утро после фотодинамического воздействия. Спустя 5 дней после первой процедуры ФДТ отмечено общее улучшение состояния кожи.

## Список использованной литературы

1. Шилягина Н. Ю. Исследование тетраарилтетрацианопорфиразинов в качестве потенциальных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики : дис. – Воронеж : Шилягина Наталья Юриевна, 2014.
2. Описание методов ФДТ и ФД 2015 г. \ “ФГУП «Государственный научный центр «Научно-исследовательский институт органических полупродуктов и красителей»” (<http://pdt.niopik.ru/methods/>)
3. Тучин В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. – Litres, 2018. 26-28с
4. Красников И. В. и др. Распространение оптического излучения в биологических тканях //Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина. – 2013. – №. 4. 56-63с
5. Корчагина, Ксения Сергеевна. Флуоресцентная диагностика при фотодинамической терапии базальноклеточного рака кожи : автореферат дис. ... кандидата медицинских наук : 14.01.13 / Корчагина Ксения Сергеевна; [Место защиты: Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации]. - Обнинск, 2020. - 24 с.
6. Пушкарева А. Е. Методы математического моделирования в оптике биоткани: учебное пособие //СПб: СПбГУ ИТМО. – 2008. – Т. 103.
7. Wang X. et al. Approximation of Mie scattering parameters in near-infrared tomography of normal breast tissue in vivo //Journal of biomedical optics. – 2005. – Т. 10. – №. 5. – С. 051704.
8. Allison R. R. et al. Photosensitizers in clinical PDT //Photodiagnosis and photodynamic therapy. – 2004. – Т. 1. – №. 1. – С. 27-42.
9. Поняев А. И., Глухова Я. С., Черных Я. С. Фотосенсибилизаторы для фотодинамической терапии (обзор) //Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета). – 2017. – №. 41. – С. 71-78.

10. Кашенко В. А. и др. Фотодинамическая терапия: от фундаментальных исследований к практике // Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина. – 2015. – №. 1. 158-170с

11. Суркичин С. И. и др. Использование фотодинамической терапии в лечении фотоповреждений кожи (обзор литературы) // Медицинский алфавит. – 2019. – Т. 1. – №. 7. – С. 19-23.

12. Церковский Д. А., Протопович Е. Л., Ступак Д. С. Основные аспекты применения фотосенсибилизирующих агентов в фотодинамической терапии // Онкологический журнал. – 2019. – Т. 13. – №. 2. – С. 79-99.

13. Поняев А. И., Глухова Я. С., Черных Я. С. Фотосенсибилизаторы для фотодинамической терапии (обзор) // Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета). – 2017. – №. 41. – С. 71-78.

14. Церковский Д. А., Протопович Е. Л., Ступак Д. С. Основные аспекты применения фотосенсибилизирующих агентов в фотодинамической терапии // Онкологический журнал. – 2019. – Т. 13. – №. 2. – С. 79-99.

15. Гюльханданян А. Г. Фотофизические свойства порфиринов и их медико-биологическая активность : дис. – Национальная академия наук Республики Армения институт молекулярной биологии, 2016.

16. Лощенов В. Б. и др. Аппаратурное и инструментальное обеспечение флюоресцентной диагностики и фотодинамической терапии // Biomedical photonics. – 2013. – Т. 2. – №. 3. – С. 17-25.

17. Механизмы действия фотосенсибилизаторов  
(<https://revolution.allbest.ru/physics/>)

18. O'Connor A. E., Gallagher W. M., Byrne A. T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy // Photochemistry and photobiology. – 2009. – Т. 85. – №. 5. – С. 1053-1074.

19. Фотодинамическая терапия рака  
(<https://kubanolaser.ru/fotodinamicheskaya-terapiya-raka>)



20. Лотти Т. и др. Применение местной фотодинамической терапии в дерматологии //Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2008. – №. 4. – С. 55-58.

21. Clementoni M. T., В-Roscher M., Munavalli G. S. Photodynamic photorejuvenation of the face with a combination of microneedling, red light, and broadband pulsed light //Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery. – 2010. – Т. 42. – №. 2. – С. 150-159.

22. Ермолина Т. А., Мартынова Н. А., Карякина О. Е., Красильников А.В. Медицинские аспекты использования лазерных технологий. Учебное пособие.

23. Ferolla A. C., Tamura B. M., Cucé L. C. Rejuvenation with photodynamyic therapy: clinical improvement, collagen and elastic fiber analysis. 2018. 240-268p.

24. Jang Y. H. et al. Prolonged activation of ERK contributes to the photorejuvenation effect in photodynamic therapy in human dermal fibroblasts //Journal of Investigative Dermatology. – 2013. – Т. 133. – №. 9. – С. 2265-2275.

25. Lv T. et al. Evaluation of collagen alteration after topical photodynamic therapy (PDT) using second harmonic generation (SHG) microscopy–in vivo study in a mouse model //Photodiagnosis and photodynamic therapy. – 2012. – Т. 9. – №. 2. – С. 164-169.

26. Karrer S. et al. Photodynamic therapy for skin rejuvenation: review and summary of the literature–results of a consensus conference of an expert group for aesthetic photodynamic therapy //JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. – 2013. – Т. 11. – №. 2. – С. 137-148.

27. Флуоресцентные репортеры и их молекулярные репортажи (<https://biomolecula.ru/articles/fluorestsentye-reportery-i-ikh-molekuliarnye-repo-rtazhi>)

28. Савельева Т. А. Комбинированный спектроскопический метод исследования сильнорассеивающих биологических сред : дис. – Институт общей физики им. АМ Прохорова Российской академии наук, 2013.

29. Попов А. В. и др. Спектроскопия наночастиц на основе поликристаллов  $Gd_{14}V_6Ge_2O_{34}$  и стекол  $La_2O_3-V_2O_5$ , активированных ионами  $Nd^{3+}$ , для диагностики рака //Квантовая электроника. – 2010. – Т. 40. – №. 12. – С. 1094-1097.

30. Шляхтин С. В., Трухачева Т. В. ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВНЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ХЛОРОФИЛЛА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЭФФЕКТИВНЫХ И БЕЗОПАСНЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ //Вестник фармации. – 2010. – №. 2-48. – С. 87-106.

31. Чан Т. Х. И., Раменская Г. В., Оборотова Н. А. Фотосенсибилизаторы хлоринового ряда в ФДТ опухолей //Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8. – №. 4. – С. 99-104.

32. Белик А. Ю. и др. СИНТЕЗ, ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ФОТОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДОРАСТВОРИМОЙ ДИАДЫ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНА  $C_{60}$  И ХЛОРИНА  $E_6$  //Доклады Академии наук. – Федеральное государственное бюджетное учреждение" Российская академия наук", 2017. – Т. 477. – №. 6. – С. 672-676.

33. Исимару А. Распространение и рассеяние волн в случайно неоднородных средах. Т. 1. Однократное рассеяние и теория переноса. – М.: Мир, 1981. – 281 с.

34. Пушкарева А.Е. Методы математического моделирования в оптике биоткани. Учебное пособие. СПб: СПбГУ ИТМО, 2008.– 103 с.

35. Могисси К., Стрингер М.Р., Диксон К. Флуоресцентная фотодиагностика в клинической практике // Фотодиагностика и фотодинамическая терапия. - 2008. - Т. 5. - №. 4.- С. 235-237.

36. Kozlovska T. I. et al. Physical-mathematical model of optical radiation interaction with biological tissues //Photonics Applications in Astronomy,

Communications, Industry, and High Energy Physics Experiments 2017. –  
International Society for Optics and Photonics, 2017. – T. 10445. – C. 104453G.