

На правах рукописи



ПРОКОПЬЕВ Владимир Егорович

**БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ
НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ ТКАНИ И
ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ИХ СОСТОЯНИЯ**

Специальность 03.00.02 - биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени доктора физико-математических наук

Томск-2004

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Работа выполнена в Институте сильноточной электроники СО РАН,
ГУ НИИ Фармакологии ТНЦ СО РАМН, ГУ НИИ Онкологии ТНЦ СО РАМН,
Томском государственном университете

Научный консультант по медицине: доктор медицинских наук, профессор
Удут Владимир Васильевич

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук, профессор
Хлѣбопрос Рем Григорьевич,
доктор физико-математических наук, профессор
Проворов Александр Сергеевич,
доктор медицинских наук, профессор
Дыхно Юрий Александрович

Ведущая организация: Институт оптики атмосферы СО РАН, г. Томск

Защита состоится «__» _____ 2004 г. в ____ ч на заседании диссертационного
совета Д.003.007.01 при Институте биофизики СО РАН по адресу:
г. Красноярск-36, Академгородок

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биофизики СО РАН

Автореферат разослан « ____ » апреля 2004 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Косолапова Л.Г.

Актуальность проблемы. Диагностика и лечение злокачественных опухолей является одной из актуальных медико-биологических проблем нашего времени. Действительно, неопластические процессы в структуре причин смертности уступают лишь сердечно-сосудистым заболеваниям.

Изучение вероятностного прогноза онкологической ситуации на ближайшее десятилетие не позволяет надеяться на изменение ситуации в лучшую сторону. Длительный скрытый период течения болезни, системный характер, несовершенство диагностических и лечебных методов обуславливают высокий процент запущенности и, следовательно, смертности.

Эффективность лечения онкологических заболеваний в значительной степени зависит от своевременной — ранней их диагностики, возможно даже на этапах преобладающих неопластическую трансформацию тканей (диагностика патологических состояний и патологических изменений, характеризующихся высокой вероятностью злокачественного перерождения). В свою очередь, основными видами терапии рака остаются комбинации специфической химиотерапии, вариантов лучевого воздействия и оперативного удаления пораженной ткани.

В последние годы, при проведении комбинированного лечения, наметилась тенденция соблюдения принципа органосохранности. Основным посылом к этому явилось принятие раковой болезни, как системного процесса. Именно поэтому относительный радикализм и органосохранность, в случаях успешного использования перечисленных выше видов лечения, позволяют обеспечить высокое качество жизни пациента.

В свете вышеизложенного особый интерес представляет достаточно новый метод ранней диагностики и лечения рака - фотодинамическая диагностика (ФДЦ) и терапия (ФДТ). Это методы, основанные на биологических особенностях неопластически измененных тканей селективно накапливать и удерживать ряд экзогенных фотосенсибилизаторов (ФС) порфириновой природы. Селективное накопление этих молекул малигнизированными тканями создает условия их обнаружения по возбуждении красной и инфракрасной флуоресценции молекул ФС при облучении синим светом. Эти процессы создают также условия для индуцированных световым воздействием кислородозависимых эффектов, приводящих к гибели тканей, являющихся реципиентами ФС. Как правило, для фотодинамического разрушения раковых тканей используется лазерное излучение красного диапазона спектра хорошо проходящее через кровь и другие биологические ткани, но абсорбирующееся молекулами ФС. То есть, ФДТ позволяет соблюсти принцип радикализма вкупе с органосохранностью вмешательства.

Однако методы ФДЦ и ФДТ, в силу ряда вполне объективных причин, остаются делом единичных специализированных учреждений. В основе причин ограничения их широкого использования лежат: 1) необходимость введения экзогенных ФС; 2) высокая их фототоксичность; 3) длительность периода накопления ФС опухолью (24—48 ч) и длительность снижения его концентрации в здоровой ткани; 4) относительная тропность к некоторым доброкачественным опухолям; 5) возможность аллергических реакций и высокая стоимость разрешенных к клиническому применению ФС.

И, наконец, чрезвычайно важная позиция, - эффективность ФДТ напрямую зависит от точности и оперативности диагностики. Действительно, несмотря на то, что глаз человека достаточно совершенный «спектральный прибор», в определенном диапазоне длин волн (красный и ближний инфракрасный диапазон) его чувствительность и разрешающая способность явно недостаточны для анализа информа-

ции имеющих место различий в состоянии здоровой и патологически измененной ткани.

Именно эти моменты определяют ошибки поиска участков неопластической трансформации и, следовательно, ошибки забора тканей для детального морфологического анализа, для ее хирургического удаления, для прицельной ФДТ. Оптические методы диагностики злокачественных опухолей, в том числе микроскопические и эндоскопические, являются наиболее точными и удобными. Причем микроскопический метод анализа гистологических и цитологических препаратов является решающими при окончательном диагнозе злокачественных новообразований. Суть визуальных оптических методов диагностики, заключается в количественных или качественных измерениях и сравнении морфометрических и цитохимических характеристик клеток и тканей в норме и при патологических изменениях. Их основной недостаток - невозможность определения злокачественного процесса на ранних стадиях. Поэтому необходимость исследований подобной направленности не вызывает сомнения.

Типовые патологические процессы находят отражение в состоянии энергетических характеристик мембран клетки и, как правило, характеризуются изменением скорости синтетических и окислительно-восстановительных процессов в цепи переноса электронов. При этом наиболее важные компоненты цепи переноса электронов (НАД⁺/НАД-Н, ФАД^{*}/ФАД-Н₂, окисленные и восстановленные цитохромы, порфирины и т.д.) имеют характерные спектры поглощения и флуоресценции, зависящие от окислительно - восстановительного (red/ox) потенциала. Поэтому даже самые незначительные изменения этого параметра проявляются в спектральных характеристиках.

Перечисленные причины стимулирует исследования, направленные на дальнейшее совершенствование систем технического зрения, которые имеют максимальные характеристики по чувствительности и спектральному разрешению в ультрафиолетовом (УФ), видимом и инфракрасном (ИК) диапазонах.

Хорошо известны успехи применения спектроскопических и, в частности, абсорбционных методов исследования биологических тканей в клинической практике онкологического профиля. Современная эндоскопическая техника обеспечивает доступ к тканям полых органов и создает возможность прижизненного бесконтактного анализа их состояния. А уровень разработок спектральных приборов, источников и приемников излучения с компьютерным управлением и анализом информации позволяет надеяться на возможность использования спектроскопических методов для идентификации неопластической трансформации тканей на ранних стадиях с помощью методов и систем искусственного интеллекта. Объединение этих технологий позволит, с одной стороны, проводить диагностику состояния тканей путем измерения и анализа их спектральных характеристик еще на стадиях, характеризующихся высокой вероятностью злокачественного перерождения, а с другой, - даст возможность реализации методик направленной коррекции выявленных нарушений.

Одним из вариантов подобной коррекции может явиться селективное фотовозбуждение и изменения состояния той или иной группы органических молекул, играющих существенную роль в биофизических процессах и физиологических реакциях, протекающих в организме. В отличие от ФДТ, для которой известны основные фоторецепторы, первичные фотофизические, фотохимические и фотобиологические процессы, дозы и условия облучения, показания и противопоказания и т.д., высокая эффективность применения низкоинтенсивного излучения He—Ne-лазера (НИЛИ) на длине волны 632,8 нм в лечении различных заболеваний до сих пор не имеет приемлемого объяснения и является предметом оживленных споров.

Теория объяснения механизмов низкоинтенсивной фототерапии должна объяснить, по крайней мере, следующие вопросы. Каковы основные причины положительных эффектов действия излучения He-Ne-лазера на кровь и организм при различных нозологиях и что их объединяет? Появляются ли, при изучаемом воздействии, значительные изменения (положительных или отрицательных) в крови и организме здоровых доноров? Объяснима ли, хотя бы, часть экспериментальных фактов, касающихся изменений концентрации продуктов и метаболитов фотохимических реакций, ответных реакций клеток, гомеостатических систем и организма на действие света в ходе сеанса и курса фототерапии? Как можно аргументировать необходимые дозы светового облучения на циркулирующую кровь и возможность сочетания фототерапии с другими способами и методами лечения? Каковы условия воздействия, при которых реализуется положительный терапевтический эффект и какие противопоказания к его использованию?

Исследования, посвященные решению перечисленных вопросов, должны проводиться на хорошо изученных клинических моделях, позволяющих исследовать процессы и механизмы взаимодействия света *in vivo et in vitro*. Этим условиям, с нашей точки зрения, удовлетворяют воспалительно-дегенеративные заболевания верхних отделов желудочно-кишечного тракта и поражения слизистой оболочки мочевого пузыря, имеющие высокую потенцию злокачественного перерождения, а также культуральные среды лейкозных линий, позволяющие проводить детальные лабораторные исследования *in vitro*.

Цель и задачи работы. Исследование механизмов воздействия лазерного излучения красного и инфракрасного диапазона на биологические ткани и разработка оптических методов диагностики их состояния.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи.

1. *Исследование биофизических механизмов низкоинтенсивной фототерапии предраковых состояний и изменений слизистой оболочки желудка при внутривенном облучении крови (БЛОК) излучением He-Ne-лазера с $\lambda = 632,8$ нм*

5. Определение первичных акцепторов фотонов и области их локализации в цельной крови и ее компонентах.

6. Исследование изменений клеточного и гуморального иммунитета, а также общей и ферментативной антиоксидантной активности в ответ на воздействие излучением He-Ne лазера с $\lambda = 632,8$ нм в режимах: от однократного, до курсового.

7. Исследование динамики изменений продуктов фотоокислительных процессов в ответ на воздействие излучением He-Ne-лазера с $\lambda = 632,8$ нм.

8. Изучение реакций системы регуляции агрегатного состояния крови, в ответ на воздействие излучением He-Ne-лазера с $\lambda = 632,8$ нм.

9. Исследование морфофункциональных и цитохимических характеристик периферического звена эритрона в ответ на воздействие излучением He-Ne-лазера с $\lambda = 632,8$ нм.

10. Исследование состояния вегетативного обеспечения функций и гормонального статуса и их изменений в ответ на воздействие излучением He-Ne-лазера с $\lambda = 632,8$ нм.

11. Разработка установки и методического обеспечения для использования излучения He-Ne-лазера с $\lambda = 632,8$ нм в программах лечения язвенной болезни желудка (ЯБЖ).

12. Исследование процесса синтеза порфиринов в условиях избытка 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК), как метаболического их предшественника, на клеточных культурах нормальных тканей и на модели клеточной лейкозной линии К-562.

11. Исследование и разработка лабораторных и прижизненных клинических методов и систем, для спектроскопической диагностики злокачественных новообразований на ранних стадиях

1. Разработка лазерных и нелазерных источников излучения.

2. Разработка приемников излучения.

3. Определение физико-технических параметров источников и приемников излучения обеспечивающих оптимальные условия работы и максимальную точность диагностики и эффективность терапии.

4. Разработка и создание опытного образца прибора для клинической диагностики состояния биологических тканей в норме и при их патологической трансформации.

5. Определение условий спектрофлуориметрической диагностики злокачественных новообразований слизистой оболочки мочевого пузыря с помощью экзогенного «фотосенсибилизатора» 5-АЛК.

6. Разработка методических приемов спектрофлуориметрической диагностики злокачественно трансформированных тканей по собственной флуоресценции эндогенных флуорохромов.

7. Разработка спектроскопических критериев дифференциальной диагностики состояния тканей при их злокачественной трансформации.

8. Разработка и создание опытных и коммерческих образцов приборов спектрофлуориметрической диагностики состояния биологических тканей и фототерапии для клинической практики.

Защищаемые положения.

1. Нарушения порфиринового обмена сопровождаются увеличением накопления в мембранах эритроцитов эндогенного фотосенсибилизатора - протопорфирина IX, который, при возбуждении светом с $\lambda = 405$ нм, флуоресцирует в красной области спектра с максимумом на $\lambda = 635 \pm 1$ нм, а в плазме и сыворотке крови на $\lambda = 625 \pm 2$ нм.

2. На модельных средах клеток миелолейкоза К-562, клеток костного мозга, эритроцитов, лимфоцитов и лимфоцитов, активированных ФГА, полученных у здоровых доноров, в присутствии избытка 5-аминолевулиновой кислоты, доказана избирательность накопления протопорфирина IX пролиферирующими опухолевыми клетками и их интенсивное разрушение при облучении излучением He-Ne-лазера.

3. Основу механизма действия низкоинтенсивного внутрисосудистого лазерного облучения на циркулирующую кровь на длине волны $\lambda = 632,8$ нм (He-Ne-лазер) составляет совокупность следующих биофизических процессов: фотодинамический эффект за счет прямого фотовозбуждения протопорфирина IX (наработка, в присутст-

вии O_2 , радикалов и последующего разрушения патологически измененных клеток, опосредованно стимулирующего гемопоз); стимуляция диссоциации оксигемоглобина (фотодиссоциация), приводящая к повышению содержания кислорода в крови и тканях; фотореактивация глутатионпероксидазы и миелопероксидазы - антиоксидантных ферментов, приводящая к повышению устойчивости клеточных мембран.

4. Эффекты чрезкожного облучения циркулирующей крови светом на длинах волн 600-700 нм при дозах эквивалентных внутрисосудистому лазерному воздействию по механизм формирования идентичны, различаясь лишь соотношением долей составляющих: фотодинамических процессов, процессов фотодиссоциации оксигемоглобина и фотореактивации антиоксидантных ферментов.

5. Максимум функции спектрального распределения Планка для фотонов солнечного излучения, приходящийся на длину волны $\lambda = 632,7$ нм, совпадает с максимумом полосы поглощения протопорфирина IX, накапливающегося в мембранах патологически измененных и старых клеток, а также с терапевтическим окном прозрачности кожи и цельной крови. Общая доза света, поглощаемая циркулирующей периферической кровью через открытый участок кожи площадью 500-1000 см² в диапазоне спектра 600-700 нм в течение светового времени суток в средних широтах составляет около нескольких джоулей, которая близка к оптимальной дозе светотерапии на длине волны $\lambda = 632,8$ нм.

6. Впервые разработаны алгоритмы и программы спектрофлуориметрической диагностики состояния тканей человека, основанные на методе корреляционного анализа спектров и методе распознавания спектральных образов изображений биологических тканей по характеристикам автофлуоресценции и диффузного отражения. Разработан и создан видеоспектроанализатор для регистрации и анализа оптических изображений и спектральных характеристик образцов тканей, работающий в режиме счета фотоэлектронных событий со стробированием и временным разрешением 100 нс.

Личный вклад автора. Личный вклад автора в получении представленных в диссертации результатов заключается в следующем:

1. Непосредственно автором выполнены экспериментальные исследования спектральных, пространственно-временных и энергетических характеристик ВКР-преобразователей излучения эксимерного XeCl (308 нм) и второй гармоники неодимового (532 нм) лазеров в парах атомов металлов, а также молекулах водорода, дейтерия и жидком диметилсульфоксиде (ДМСО).

2. Автором осуществлена постановка задач и проведение исследований по разработке и созданию чувствительных видеоспектроанализаторов и алгоритмам их работы.

3. Автору принадлежит идея создания активного варианта «фотонной таблетки» на основе электронной таблетки ЖКТ.

4. Решающий вклад автора заключается в проведении исследований по взаимному воздействию светового излучения с биологическими тканями и в создании первых диагностических программ.

5. Все описанные в диссертации эксперименты, а также полученные результаты и подготовленные на их основе публикации сделаны по инициативе и при непосредственном участии автора.

Апробация работы. Основные положения исследования докладывались и обсуждались на международных, всесоюзных, республиканских, региональных про-

фильных симпозиумах и конференциях. Международной конференции «Применение лазеров в хирургии и медицине», Самарканд, 1988; Международной конференции «Лазеры и медицина», Ташкент, 1989; 11-м Всесоюзном семинаре «Лазерная биофизика и новые применения лазеров в медицине», Тарту, 1989; Всесоюзной

конференции «Действие низкоэнергетического излучения на кровь», Киев, 1989; Республиканской конференции «Фундаментальные науки практической медицине и здравоохранению», Иркутск, 1989; Всесоюзной конференции «Актуальные вопросы совершенствования онкологического компонента диспансеризации», Томск, 1990; Всесоюзном симпозиуме «Низкоинтенсивные лазеры в медицине» Обнинск, 1991, 1993; Пленуме правления Российского общества гастроэнтерологов, Ростов-на-Дону, 1991; The Second International Conference Laser M2P, Grenoble (France), July, 1991; The Third International Conference Laser M2P, Lyon (France), December, 1993; Республиканской конференции «Нетрадиционные методы в онкологии» Ростов-на-Дону, 1991; III Всесоюзном научно-техническом семинаре «Применение лазеров в науке и технике», Иркутск, 1990; I Дальневосточной региональной конференции с всесоюзным и международным участием «Новые медицинские технологии на Дальнем Востоке» Хабаровск, 1996; I съезде онкологов стран СНГ, Москва, 1996; Международной конференции, посвященная столетию со дня открытия радиоактивности и столетию Томского политехнического университета «Радиоактивность и радиоактивные элементы в среде обитания человека», Томск, 1996; Научно-практической конференции урологов Сибири, посвященная 30-летию Томского обл. науч. общества урологов им. акад. В.М. Мыша «Актуальные вопросы урологии», Томск, 1998; I, II, III, IV, V, VI Международных конференциях «Импульсные лазеры на переходах атомов и молекул», Томск, 1993, 1995, 1997, 1999, 2001, 2003 гг.; XVI International cancer congress, New Delfi (India), 1994; Пленуме патофизиологов и фармакологов Сибири и Дальнего Востока «Механизмы развития патологических процессов», Кемерово, 1994; Научной юбилейной конференции Института фармакологии ТНЦ РАМН «Актуальные проблемы фармакологии и поиска новых лекарственных препаратов», Томск, 1994; 17th Congress of the International Commission for Optics (ICO-XVII) "Optics for Science and New Technology", Taejon (Korea), 1996; Научно-практической конференции «Социально-клинические проблемы онкологии», Кемерово, 2001; X Conference on Laser Optics. St. Petersburg, Russia, June 26-30, 2000; The Second and Third International Symposium "Modern Problems of Laser Physics (MPLP)" Novosibirsk, 1997, 2000; «Туберкулез и рак мочевого системы: вопросы дифференциальной диагностики и лечения». Материалах научно-практической конференции. Новосибирск, 27-29 марта 2002 г. International Quantum Electronics Conference on Lasers, Applications, and Technologies (IQEC/LAT) 2002; Moscow, Russia, June 24-27, 2002; «Новые технологии в медицине». I и II Объединенные научные сессии СО РАН и СО РАМН, Новосибирск, 17 декабря 1998 г. и 18-19 июня 2002 г.; Лазерный видеоспектроанализатор LVI-1 был представлен на Международной выставке последних достижений в квантовой электронике, лазерным приложениям и технологиям (IQEC/LAT-2002) в Москве в 2002 г. и на инновационной выставке Сибирские Афины «Интеграция-2003» в г. Томске и награжден дипломами этих выставок.

Научная новизна.

1. Впервые обнаружены и исследованы спектры катодо- и рентгенолюминесценции сухих образцов цельной крови в видимой области спектра и проведено их сравнение со спектрами флуоресценции при возбуждении оптическим излучением на длинах волн вблизи 400 нм. При этом показано, что активаторами излучения двух наиболее сильных полос флуоресценции крови с центрами на длине волны $X_1 = 710$ нм и $X_2 = 760$ нм являются трехвалентные ионы железа, находящиеся в различных координационных положениях в активных центрах металлопорфиринов белковых молекул крови. Установлено, что при всех видах возбуждения образцов крови больных, интенсивность флуоресценции длинноволновой полосы с $X_2 = 760$ нм повышается по сравнению с кровью здоровых доноров.

2. Обнаружено, что при лечении ЯБЖ при помощи ВЛОК излучением He—Ne-лазера происходит фотореактивация антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы (ГП) в конце сеанса облучения и рост ее активности на 25-30% в конце курса лечения.

3. Максимум функции спектрального распределения Планка для фотонов солнечного излучения, приходящийся на длину волны $X = 632,7$ нм, совпадает с максимумом полосы поглощения ПП IX, накапливающегося в мембранах патологически измененных и старых клеток, а также с терапевтическим окном прозрачности кожи и цельной крови.

4. Впервые, если судить по известной нам литературе, получены «выжигание провалов» в спектрах флуоресценции биологических тканей при их облучении лазером на $X = 532$ нм, совпадающем с одной из полос поглощения гемоглобинов и порфириновых молекул.

Практическая новизна.

1. Исследованы фотофизические и темновые фотохимические процессы, которые позволили предложить научно-обоснованную методику внутривенного лазерного облучения крови излучением He-Ne-лазера на $X = 632,8$ нм для лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки (методические рекомендации НИИ Онкологии ТНЦ АМН СССР, Томск-1990).

2. Создан эндоскопический лазерный спектроанализатор для клинической диагностики злокачественных новообразований слизистых желудка и мочевого пузыря.

3. Разработан сертифицированный прибор для внутривенной лазерной терапии язвенной болезни желудка на основе He-Ne-лазера.

4. На основе проведенных исследований разработаны и внедрены в клиническую практику разрешенные Минздравом РФ аппараты для чрезкожного (транскутного) облучения циркулирующей крови «Дюна-Т» (длины волн светодиодного излучателя 660 ± 15 нм и $840 - 950$ нм) и эндогенный электрофотостимулятор «фотонная таблетка» (регистрационное удостоверение № 29/02040699/1081-00).

5. Изучены и предложены простые спектроскопические критерии и алгоритмы для компьютерной программы по распознаванию нормальных и злокачественных тканей (диагностическая процедура) основанная на сравнении интенсивности поглощения и флуоресценции (при УФ-возбуждении) этих тканей на трех длинах волн.

В первую очередь, практическое значение настоящей работы видится в получении инструмента для ранней диагностики предраковых и злокачественных изменений в доступных обзору тканях (кожные покровы, видимые слизистые полости рта, носо-



мочеполовой системы) и проведения фототерапии в случае их обнаружения.

Методы исследования. В работе использовались биофизические, лабораторные и клинические методы исследования. В основе физических исследований лежали оптико-спектроскопические и лазерные методы изучения биологических тканей *in vitro et in vivo*. При клинических методах исследования использовался метод группового анализа параметров, полученных в сформированных группах пациентов. Контрольные группы составляли практически здоровые доноры и пациенты, обследование и лечение которых проводились общепринятыми медикаментозными методами. Материалом исследований являлась периферическая и венозная кровь, биопсийные и операционные ткани в норме и при злокачественных новообразованиях, а также поверхности слизистых желудка и мочевого пузыря доступные для эндоскопического исследования.

В основу работы положены результаты комплексного клиничко-лабораторного обследования и лечения 420 больных с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки (ДПК) и клиничко-лабораторного обследования 84 и 36 пациентов со злокачественными опухолями желудка и мочевого пузыря соответственно.

Достоверность результатов работы. Достоверность полученных экспериментальных результатов, отраженных в научных положениях и выводах, подтверждается применением различных общепринятых методик и установок для измерения одних и тех же параметров, совпадением экспериментальных результатов с данными других авторов, в том случае, когда они существуют. Например, выводы о наличии определенного хромофора в биологических тканях и растворах, как правило, делался на основе измерения и анализа спектров флуоресценции, возбуждения флуоресценции и поглощения в широком диапазоне длин волн. При определении химического состава и структуры хромофорных центров проводился микроэлементный эмиссионный спектральный, спектроскопический, рентгеноструктурный и ЭПР (электронный парамагнитный резонанс) анализ. Кроме того, при интерпретации полученных данных использовались одновременные измерения и анализ спектров флуоресценции биологических объектов при их облучении рентгеновскими, электронными и световыми лучами.

Публикации. По результатам проведенных исследований лично, и в соавторстве, опубликовано более 60 научных работ, в том числе, одна коллективная монография. Получено 4 патента РФ на изобретения. Работа по теме диссертации была поддержана грантом РФФИ №96-02-17692 «Экспериментальное и теоретическое исследование спектральных характеристик биологических тканей в норме и при патологиях» (руководитель работ В.Е. Прокопьев) и научным грантом Томской области за 2002 г.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, семи глав, выводов, заключения, приложения. Содержит 284 страницы машинописного текста, 79 рисунков, 21 таблицу и список цитируемой литературы из 400 наименований.

В первой главе анализируется история возникновения и развития светолечения и применения оптических методов для диагностики болезней, в том числе, злокачественных новообразований. Показано, что можно выделить четыре этапа развития и применения оптических методов в практической медицине, связанных с открытием и разработкой новых источников и приемников излучения, оптических спектраль-

ных приборов и методов регистрации и обработки результатов наблюдения. Например, современный - четвертый этап, характеризуется использованием лазерных источников и многоканальных приемников излучения, эндоскопической световолоконной оптикой, малогабаритными спектроанализаторами и персональными компьютерами для записи, хранения и обработки результатов измерений. История применения светолечения начинается с использования солнечного излучения в сочетании с растительными вытяжками для лечения псориаза, витилиго и других кожных заболеваний в древнем Китае, Индии, Греции, Риме. Затем в Средних веках было обнаружено, что солнечное излучение различного диапазона спектра «цвета» можно использовать как для дезинфекции помещения, ран и кожных заболеваний, так и для лечения психических и соматических болезней. В начале прошлого века (1934 г.) было обнаружено, что облучение даже небольших объемов крови больных УФ-излучением приводит к положительному терапевтическому эффекту. В 1968 г., красный свет He-Ne-лазера на длине волны 632,8 нм был впервые успешно применен для внутривенного облучения циркулирующей крови больных с ишемической болезнью сердца [1].

В настоящее время НИЛИ (плотность мощности $1 * 100 \text{ мВт/см}^2$) прочно вошло в арсенал современной медицины как высокоэффективный метод воздействия на кровь и организм при лечении широкого круга заболеваний.

Вместе с тем, несмотря на большое количество работ по влиянию НИЛИ на биологические структуры различного уровня, вопрос о механизмах первичных фотофизических процессов, определяющих биологическое и терапевтическое действие этого излучения, остается открытым и является предметом многочисленных дискуссий. Молекулярно-клеточные и фотобиологические механизмы лечебного действия НИЛИ обсуждаются сейчас в литературе лишь на уровне гипотез, многие из которых противоречивы и умозрительны, не имеют экспериментальных доказательств наличия первичных хромофоров, темновых фотофизических и фотохимических процессов, вызывающих реакцию гомеостатических систем организма и приводящих в итоге к формированию положительного физиологически оправданного ответа организма. Наиболее широко в медицине в настоящее время используется He-Ne-излучение с $\lambda = 632,8 \text{ нм}$. Применительно к этому источнику лазерного света в литературе высказываются предположения, что хромофорами в этой области спектра могут быть следующие молекулы: порфирины и его производные [3]; ферменты антиоксидантной системы - каталаза, супероксиддисмутаза, церуллоплазмин [4, 5, 6]; компоненты дыхательной цепи митохондрий - флавопротеины и цитохромы [7]; молекулярный кислород [8].

Что касается гипотез о фотобиологическом действии НИЛИ, то в литературе, начиная с конца 70-х гг. прошлого века и до настоящего времени рассматриваются несколько основных предположений о механизме действия лазерного излучения: 1) фотореактивация металлосодержащих ферментов антиоксидантов [9, 10]; 2) гипотеза о взаимодействии НИЛИ с компонентами цепи транспорта электронов в митохондриях [11]; 3) прямое фотовозбуждение молекулярного кислорода в синглетное состояние [12]; 4) неспецифическое влияние на структуру воды [13]; 5) изменение пространственной структуры и функциональной активности ферментов в поле световой волны лазера [14]. Основным недостатком большинства работ, посвященных исследованию первичных фотоакцепторов биологических тканей и механизмов

действия лазерного является то, что они проводились в основном на биологических растворах и на модельных изолированных чистых культурах клеток крови, т.е. на моделях далеких от реальных систем и условий которые присутствуют и функционируют в организме. Таким образом, первичные фотоакцепторы и механизмы положительного терапевтического действия НИЛИ, полученного в клинической практике при лечении пациентов с различными заболеваниями, к моменту начала настоящей работы были не известны. В наших работах, опубликованных в 1989-1992 гг. была предложена концепция мембранного механизма положительного терапевтического действия НИЛИ при внутривенном облучении крови излучением He-Ne-лазера. При этом полагалось, что основные фотоакцепторы либо расположены в мембранах клеток крови, либо накапливаются в них при патологических процессах и старении клеток. Поглощение света первыми приводило к фотореактивации антиоксидантных ферментов в неизменных клетках и разрушению патологически измененных и «старых» клеток. Как первый, так и второй процесс приводят к повышению неспецифической сопротивляемости, правда, через различающиеся механизмы. В качестве основного метода исследования был использован системный анализ изучаемых характеристик крови и функциональных систем организма, полученных до и после сеанса внутривенного облучения крови излучением He-Ne-лазера в ходе курса лечения пациентов с язвенной болезнью желудка.

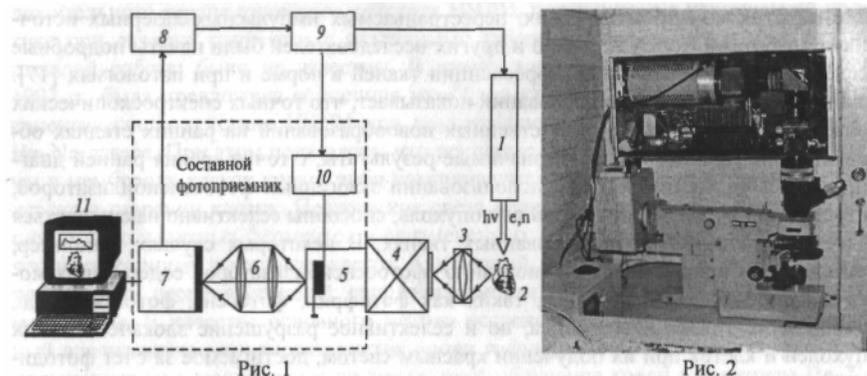
Визуальные морфологические и цветовые характеристики биологических тканей для диагностики заболеваний использовались в практической медицине с давних времен. Однако широкое и успешное применение оптических методов в клинической лабораторной диагностике стало возможным после открытия Бугером-Ламбертом—Бером законов поглощения света, связывающих интенсивность света с концентрацией поглощающих веществ. Интенсивное исследование возможности использования спектроскопических методов для диагностики злокачественных новообразований началось с середины 50-х гг. прошлого века после открытия чувствительных одноканальных фотоприемников - ФЭУ, позволяющих определить микроколичества веществ (хромофоров) по характерным для этих молекул спектрам флуоресценции [15]. Попытки определения злокачественных новообразований, в том числе на ранних стадиях, с помощью спектрометрических методов по характерным для биологических молекул спектрам отражения и флуоресценции предпринимались неоднократно. Однако эти работы были скорее случайными, чем закономерными и системными. При этом исследователи исходили из априорного убеждения в том, что между спектральными характеристиками нормальных и злокачественно трансформированных тканей существует значительная разница в интенсивностях и форме (виде) спектров. Анализ научной литературы показывает, что до 50-х гг. прошлого столетия для определения злокачественных опухолей использовались в основном спектры поглощения и отражения пораженных пораженных тканей, а также спектры оптического вращения плоскости поляризации. Среди работ этого периода можно отметить исследования А.В. Карякина, в которых рассматриваются спектры флуоресценции нормальных и опухолевых тканей *in vitro* [16]. Следует подчеркнуть, что данные отдельных авторов нередко противоречивы. Расхождения в наблюдениях отдельных авторов понятны, если учесть, что им приходилось на малом количестве материала ограничиваться констатацией качественных различий спектров флуоресценции тканей или биологических жидкостей, взя-

тых у больных раком и здоровых людей. При этом факторы, обуславливающие эти различия, оставались невыясненными. Требуется достаточно много труда и времени для того, чтобы выяснить, какими отклонениями в процессах метаболизма обуславливается появление той или иной флуоресценции, используемой как диагностический признак, и насколько этот признак обладает диагностической ценностью. После открытия монохроматических, перестраиваемых импульсных лазерных источников, работами Robert R. Alfano и других исследователей были начаты подробные исследования спектров автофлуоресценции тканей в норме и при патологиях [17]. Анализ результатов этих исследований показывает, что точных спектроскопических критериев диагностики злокачественных новообразований на ранних стадиях обнаружить не удалось. Наиболее значимые результаты, с точки зрения ранней диагностики, были достигнуты при использовании экзогенных фотосенсибилизаторов, которые, при их введении в кровь или опухоль, способны селективно накапливаться в злокачественно трансформированных тканях. В некоторых случаях, например, при введении в кровь или интраорганно фотосенсибилизаторов содержащих молекулы порфириновой природы, таких как фотофрин, фотосенс, фотогем и т.д., возможна не только диагностика, но и селективное разрушение злокачественных опухолей и клеток при их облучении красным светом, достигаемое за счет фотодинамического эффекта. В этой главе дан подробный анализ применения экзогенных фотосенсибилизаторов для диагностики и фотодинамической терапии злокачественных новообразований, в том числе и опухолей слизистой поверхности мочевого пузыря на примере использования 5-аминоуалиновой кислоты (АЛК) [17]. Показано, что, несмотря на широкое применение ФС первого, второго и третьего поколения, в ФДТ и ФДД актуальным остается поиск новых соединений, обладающих более высокой фотодинамической активностью, а также лучшими фотофизическими и химическими характеристиками. Материалы главы формируют необходимую основу для понимания дальнейшего изложения.

Во второй главе описаны методы получения и подготовки биологических тканей и клеток для спектроскопических измерений. Представлена экспериментальная аппаратура и методики измерения и анализа спектральных характеристик биологических тканей, в том числе методы распознавания спектральных образов и видеоизображений. Обосновываются и приводятся основные характеристики и особенности спектральных анализаторов и чувствительных многоканальных приемников света. В этой части работы изложены также результаты экспериментальных исследований и разработок по созданию лазерных и нелазерных источников и приемников излучения, работающих в широком диапазоне спектра 200 ••• 1400 нм.

Одной из основных технических сложностей, решения проблемы практической реализации спектроскопических методов при изучении состояния биологических тканей, является низкая интенсивность излучения, как в отраженном свете, так и при их флуоресценции. По этой причине, для регистрации слабых световых потоков, как правило, применяются чувствительные ФЭУ, работающие в режиме накопления сигналов на фоне шумов со стробированием [18]. Однако во многих случаях, при клинических исследованиях, требуется определить не только область, но и границы локализации патологически измененных тканей. Эта задача чрезвычайно важна в случаях необходимости идентификации злокачественной трансформации тканей на ранних стадиях (*in situ*), обнаружения метастазов для выбора оптималь-

ной тактики вмешательства при хирургических операциях. Поэтому регистрирующая аппаратура должна обеспечить измерение не только интегральных, но и локальных (отдельных пикселей изображения) спектральных характеристик подозрительных участков тканей. Принципиальная блок-схема созданной экспериментальной



ной установки показана на рис. 1.

Рис. 1. Принципиальная блок-схема экспериментальной установки: 1 - источник возбуждения флуоресценции образца; 2 - образец; 3 - объектив микроскопа или телескопа; 4 - спектральный прибор; 5 - усилитель яркости изображения; 6 - оптический адаптер; 7 - координатно-чувствительный элемент с блоками управления (видеокамера); 8 - блок деления частоты; 9 - блок сопряжения систем регистрации, возбуждения и обработки; 10 - генератор высоковольтных импульсов

Рис. 2. Видеосистема с усилителем яркости изображения на МКП, адаптированная к флуоресцентному микроскопу И-2

Система регистрации способна работать как в токовом режиме, так и в режиме счета фотонов с частотой следования до 50 Гц. Для этой установки были проведены экспериментальные оценки эффективности счета квантов, интенсивность шумовых отсчетов и исследованы ее частотно-контрастные характеристики. Созданная система была адаптирована к микроскопу И-2 (рис. 2) для наблюдения операционного материала, клеток крови, гистологических и цитологических препаратов в свете флуоресценции и отражения. В случае спектральных исследований в смотровом кабинете и при трансуретральной резекции слизистой мочевого пузыря в операционной, использовались черно-белая видеокамера VNC-702 (чувствительность которой не хуже 0,00004 люкс, разрешающая способность 580 ТВ линии) и цветные видеокамеры Sony-TR311 и Olympus, адаптированные к спектральному блоку, описанному ниже, и цистоскопам фирм Karl Storz и Olympus. Для получения спектров флуоресценции и отражения биологических тканей, клеток и клеточных структур и наблюдения видеоизображений в свете отражения и флуоресценции, нами был собран спектральный блок на основе полихроматора и ПЗС-линейки, микрофотометрической приставки ФМЭЛ-1 и флуоресцентного микроскопа ЛЮМАМ-2И. Световой поток люминесценции или отражения со стороны облучаемой поверхности образца направлялся на входную щель дифракционного полихроматора посредством линзовой системы или кварцевым световодом. При наблюдении изображений

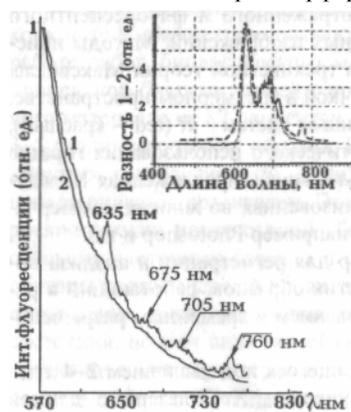
на отдельных длинах волн использовались 20 интерференционных фильтров (ИФ) приставки ФМЭЛ, имеющих ширину полосы пропускания $\sim 0,5$ нм и пропускающие в диапазоне спектра 400-800 нм. В случае необходимости использовались дополнительные УФ- и ИК-полосовые и ИФ светофильтры, пропускающие в диапазонах 250 -г 400 и 800 ч- 1100 нм. Этот же спектральный блок был адаптирован к эндоскопическому оборудованию для наблюдения биологических тканей *in vivo*.

В отдельных случаях для концентрации света в первом порядке дифракционной решетки и уменьшения оптических шумов мы использовали топографические дифракционные решетки, которые изготавливали сами. В этом случае в качестве источника когерентного света для их получения мы использовали одночастотный ХеСl-лазер, работающий на длине волны $\lambda = 307,96$ нм с шириной линии $0,01 \text{ см}^{-1}$ и имеющий расходимость луча, близкую к дифракционной. В качестве несущей среды для записи решетки использовались фотопленка Микрат-900 и голографические фотопластинки. При спектральных исследованиях гистологических и цитологических препаратов и эндоскопических измерениях мы использовали акустооптический спектрометр САО «Кварц-3102В-ГЭ». В лабораторных исследованиях биологических тканей и растворов мы обычно использовали монохроматоры типа МДР-23, ДМР-4, спектрофотометр СФ-26, флуоресцентный спектрофотометр "Hitachi MPF-4 и т.д. Для регистрации спектров флуоресценции, поглощения и отражения в области спектра 200-1300 нм использовались спектрофлуориметр фирмы Hitachi MPF-4, Комплекс спектральный вычислительный универсальный МДР-23, автоматизированный спектрофотометр СФ-26, спектрофотометр Specord M40 и разработанный в ИОА СО РАН спектрофотометрический анализатор растворов СА-2. Применение различных спектральных приборов позволяло нам получать информацию в широком диапазоне электромагнитного спектра и избегать систематические ошибки отдельных приборов, обусловленных принципиальными особенностями дисперсионных элементов этих установок.

Видеосигнал с видеокамер, имеющих различные технические характеристики, и в частности диапазон спектральной чувствительности, подавался через платы видеоввода на персональный компьютер или видеоманитофон. Визуализация, обработка и хранение информации осуществлялись с помощью персональных электронных вычислительных машин. В работе использовались оригинальные и коммерческие программы по обработке изображений и спектров. Обработка изображений и спектров происходила в два этапа. На первом этапе происходила программная или аппаратная обработка поступающего на персональный компьютер видеосигнала, которая состояла из процесса суммирования видеокадров и вычисления собственных и наведенных шумов и помех из суммарного видеокadra. На втором этапе выполнялся анализ изображения и его идентификация по критерию норма/патология.

Для возбуждения спектров флуоресценции и комбинационного рассеяния исследуемых тканей использовались как коммерческие лазеры, так и разработанные нами излучатели. В качестве источников излучения использовались модернизированные нами коммерческие лазеры: импульсный неодимовый оптический квантовый генератор, работающий на основной длине волны ($\lambda = 1064 \text{ нм}$), второй ($\lambda = 532 \text{ нм}$), третьей ($\lambda = 355 \text{ нм}$) и четвертой ($\lambda = 266 \text{ нм}$) гармониках с длительности импульса 1-150 нс; импульсный азотный лазер ЛГИ-21 ($\lambda = 337 \text{ нм}$) и непрерывные - аргоновый ($\lambda = 514$ и 488 нм) и гелий-неоновые лазеры ($\lambda = 632,8 \text{ нм}$).

Из рис. 4 следует, что разность спектров флуоресценции мембран здоровых доноров и больных ЯБЖ полностью совпадает со спектром ПП IX. Дополнительные исследования спектров поглощения и возбуждения флуоресценции этих образцов позволили доказать, что в МЭ больных доноров и старших возрастных групп происходит накопление протопорфирина IX (ПП IX) и его димерных и агрегированных форм.



Параллельно с этими исследованиями проведены измерения вязкости липидной фазы МЭ с помощью изучения параметров флуоресценции пиренового зонда. Было показано достоверное увеличение этого параметра для больных доноров с ЯБЖ и старших возрастных групп по сравнению со здоровыми соответственно на 23-27 и 20-23%. Эти результаты косвенным образом указывают на структурные изменения в билипидном слое мембран. Поскольку максимум длинноволновой полосы поглощения ПП IX, находящихся в мембранах,

Рис. 4. Спектры флуоресценции мембран больных ЯБЖ - 1; здоровых доноров - 2; их разности (-); ПП IX (-)

расположена на $\lambda = 633$ нм, то очевидно, что поглощение фотонов излучения He—Ne-лазера может привести к разрушению патологических и старых клеток в результате фотодинамического эффекта. Фотодинамическое действие протекает с максимальной скоростью в присутствии свободного молекулярного кислорода. Проведенные нами измерения спектров поглощения крови до и после облучения образцов излучением He-Ne-лазера на длине волны 632,8 нм показали достоверное увеличение оксигенации образцов крови в результате фотодиссоциации оксигемоглобина. При облучении образцов плазмы крови (в которой отсутствовали следы гемоглобина), были также обнаружены изменения поглощения исследуемых образцов под воздействием света, которые связаны с протеканием окислительно-восстановительных процессов в этой среде, индуцированных поглощением фотонов красного цвета, аналогичные тем, которые наблюдались в работах [21]. Анализ спектров пропускания воды, плазмы, сыворотки крови, водных суспензий мембран эритроцитов и форменных клеточных фракции крови в ИК-области спектра на длинах волн, превышающих 900 нм, позволил установить типичное ослабление поглощения, обусловленное высокой поглотительной способностью воды и ее вытеснением из биологических структур. Методом производной спектроскопии выявлены полосы поглощения на 910-920, 1060, 1200 и 1240-1270 нм, принадлежащие составным и комбинационным колебаниям связей -ОН, -СН, -NH, липидов, триглицеридов и белков, которыми очень богаты мембраны клеток. Для идентификации хромофорных центров крови в настоящей работе исследованы спектры и активные центры флуоресценции цельной крови и ее компонент для здоровых доноров (контроль), больных со злокачественными новообразованиями и язвенной болезнью желудка при световом, рентгеновском и электронном облучении образцов. Показано, что, по отношению к норме, образцы цельной крови которой флуоресцируют при возбуж-

дении световыми и рентгеновскими лучами на длинах волн вблизи $\lambda = 710$ нм, в крови больных появляются дополнительные максимумы излучения на $\lambda = 580$ (ЯБЖ) и 760 нм (злокачественные новообразования). В результате исследования спектров флуоресценции крови и ее компонент, находящихся в жидкой и твердой фазах, при оптическом и рентгеновском облучении, микроэлементного эмиссионного спектрального и рентгеноструктурного анализа показано, что первый дополнительный максимум флуоресценции на $\lambda = 580$ нм принадлежит двукратным ионам марганца, а второй на $\lambda = 760$ нм трехкратному иону железа, находящемуся в плазматической МЭ в определенном координационном положении. При этом полоса флуоресценции цельной крови в норме с максимумом на длине волны (715 ± 5) нм также принадлежит трехкратным ионам железа, однако находящимся в другом координационном положении, чем в образцах, полученных у пациентов с указанными заболеваниями. Таким образом, в работе впервые измерены спектры рентгенофлуоресценции цельной крови и ее компонентов и показано, что спектры флуоресценции нормальных образцов крови здоровых доноров, онкологических больных и пациентов с ЯБЖ существенно отличаются друг от друга.

Целью работ, описанных в четвертой главе, явилось изучение условий синтеза порфиринов и уточнение их спектров флуоресценции при использовании 5-АЛК в качестве метаболического предшественника в гемопоэтических и лимфоидных клетках здоровых доноров и на модели клеточной лейкозной линии К-562 в экспериментах *in vitro*. В работе использовали клетки миелолейкоза человека К-562, клетки костного мозга, мононуклеарные клетки, лимфоциты периферической крови, вступившие в реакцию бласттрансформации, и эритроциты, выделенные из периферической крови здоровых доноров. Кроме того, исследовалась возможность фотодинамических эффектов при действии на эти клетки излучения He-Ne-лазера.

При оценке влияния различных доз 5-АЛК на выживаемость клеток миелолейкоза К-562 и интенсивность флуоресценции суспензии клеток нами установлено, что добавление 5-АЛК в среду культивирования в дозах от 0,4 до 15 мМ приводит к дозозависимому увеличению числа погибших клеток и снижению интенсивности флуоресценции в красной области. Эффект темновой фототоксичности 5-АЛК начинает проявляться при использовании 5-АЛК в дозе, превышающей 8 мМ. Возрастает гибель клеток, достигая уровня 43%. При максимальной дозе 5-АЛК (15 мМ) количество погибших клеток составило 86%. Этот факт можно объяснить тем, что с увеличением содержания 5-АЛК в среде роста происходит уменьшение pH, приводящее к нарушению процессов нормального функционирования клеток и кислотно-му разрушению плазматических мембран клеток. Зарегистрированный диапазон нетоксичности доз 5-АЛК и оптимальное время инкубации (4 ч) соответствуют данным литературы, полученным для других типов злокачественных клеток. В связи с этим в дальнейших опытах мы применяли 5-АЛК в концентрации до 5 мМ, культивирование клеток проводили в течение 4 ч.

Спектральные характеристики проб изучали на спектрофлуориметре «Hitachi MPF-4». Измерения проводили в термостатируемых кварцевых кюветах (1x1 см). Исследование спектров флуоресценции образцов микрокультур, указанных выше, показало, что полоса флуоресценции в красной области спектра с максимумом интенсивности вблизи длин волн 630 нм и слабой широкой полосой в области 690 нм наблюдается только в суспензии клеток миелолейкоза К-562 (см. рис. 5).

Из полученных спектров следует, что коротковолновую полосу флуоресценции на длинах волн вблизи 630 нм можно разложить на две составляющие, с максимумами интенсивности полос на $\lambda_1 = 625$ нм и $\lambda_2 = 635$ нм. Для того, чтобы выяснить вклад различных молекулярных компонентов нами было проведено сравнительное изучение спектральных характеристик суспензии опухолевых клеток в среде инкубации, супернатанта и клеток, отмытых от среды инкубации. В результате было выяснено, что первая из указанных выше полос наблюдается в чистых растворах супернатанта, а вторая соответствует полосе флуоресценции ПП IX в клетках (см. рис. 6). При больших интенсивностях полосы 630 нм, соответствующих относительно высоким концентрациям этой молекулы как в супернатанте, так и в клетках, в длинноволновой области спектра возникает дополнительная полоса с максимумом на $\lambda = 675$ нм, которая характерна для димерных форм молекул ПП IX. Спектры флуоресценции молекулы уропорфирина и копропорфирина наблюдались нами лишь в первые часы (1-3 ч) инкубирования клеток в присутствии 5-АЛК.

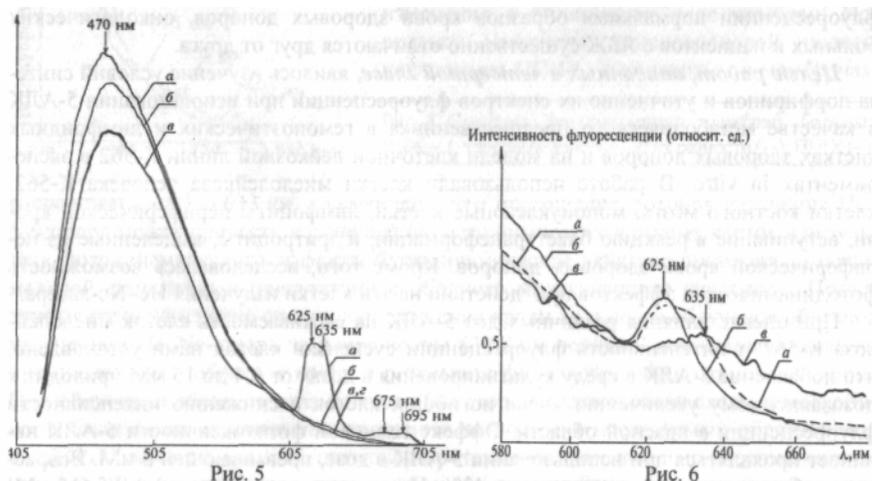


Рис. 5. Спектры флуоресценции суспензии клеток K-562 (а), клеток костного мозга (б), нормальных лимфоцитов (в) и активированных лимфоцитов (г)

Рис. 6. Спектры флуоресценции суспензии клеток K-562, проинкубированных с 5 мМ 5-АЛК в течение 4 ч. (а), супернатанта этих клеток (б), клеток K-562, отмытых от среды инкубации (в)

Таким образом, эти сравнительные исследования *in vitro* возможности накопления ПП IX эритроцитами, клетками костного мозга, нормальными лимфоцитами, лимфоцитами, активированными митогеном ФГА и клетками миелолейкоза K-562 показали исключительно высокую степень избирательности накопления данного вещества в опухолевых клетках по сравнению с нормальными клетками.

Микроскопическое изучение клеток после инкубации в присутствии 5-АЛК проводили с использованием люминесцентного микроскопа ЛЮМАМ И-2. Визуальное и телевизионное наблюдение общего количества клеток и их флуоресценции проводилось в камере Горяева. Регистрацию фазово-контрастного и флуоресцент-

ного изображения клеток проводили через канал наблюдения дихроичного зеркала микроскопа, пропускающего свет красного диапазона спектра. Дополнительно к этому возбуждение и наблюдение флуоресценции производилось в системе двух скрещенных светофильтров. Светофильтр, пропускающий свет в диапазоне 350-490 нм (СС-8), устанавливался в осветительном (возбуждающем) канале микроскопа. Светофильтр (ЖЗ-18), пропускающий излучение с длинами волн больше 580 нм, устанавливался в наблюдательном канале перед чувствительной видеокамерой VNC-703. Съемка каждого поля зрения осуществлялась на два видеокадра: на первый — фазово-контрастное изображение клетки, на второй — флуоресцентное изображение клетки, обусловленное излучением порфириновых молекул в красной области спектра. Обработка результатов этих наблюдений проводилась с помощью компьютерной программы, которая включала захват и суммирование видеок кадров, вычисление шумов и помех видеосистемы, а также математическую обработку полученных видеозаписей. Микроскопическое изучение опухолевых клеток линии K-562 после культивирования в присутствии 5 мМ 5-АЛК показало, что увеличение интенсивности флуоресценции зависит от времени инкубации и от фазы клеточного роста. Из анализа видеозаписей следует, что спустя 2-4 ч после начала инкубации флуоресцируют не более 30-40% всех клеток. При этом максимальной интенсивностью флуоресценции обладают клетки больших размеров с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, то есть клетки, находящиеся в стадии пролиферативной активности. После суточной инкубации флуоресцируют не менее 95% клеток, наблюдаемых в поле зрения микроскопа. Это объясняется увеличением скорости синтеза и накопления молекул ПП IX в активно пролиферирующих клетках, а также захватом молекул ПП IX из супернатанта плазматической мембраной покоящихся клеток. В этих условиях флуоресцирующие клетки можно было легко наблюдать визуально. При этом отмечаются значительные колебания в яркости флуоресценции наблюдаемых клеток. Время затухания свечения клеток составляло 5 с и зависело от интенсивности возбуждающего излучения.

Для оценки фотодинамического эффекта миелолейкозные клетки, эритроциты и нормальные клетки костного мозга, проинкубированные с 5 мМ 5-АЛК в течение 4 ч, подвергали фотооблучению на длинах волн 620-625 нм (источник излучения - ксеноновая лампа) и на длине волны 632,8 нм (источник излучения - He-Ne-лазер) при сравнимых интенсивностях облучения 0,3 мВт/см² в течение 30 мин. После облучения интенсивность флуоресценции на длине волны 625 нм была снижена более чем на 50% в суспензии миелолейкозных клеток, облученных светом при $\lambda = 620$ нм, в то время как облучение суспензии клеток светом при $\lambda = 632,8$ нм не приводило к аналогичному эффекту. При этом в первом случае облучение привело к гибели 25% клеток, а во втором - к 43%. Эти факты можно объяснить значительным уровнем фотомодификации молекул ПП IX в супернатанте под действием излучения на длине волны 620 нм и фотодинамическим эффектом в клетках под действием излучения на длине волны 632,8 нм. Спустя 24 ч после фотодинамической обработки количество погибших клеток миелолейкоза K-562 возросло до 62%, в то время как число облученных эритроцитов и клеток нормального костного мозга уменьшилось лишь на 2% по сравнению с необлученными клетками контроля.

Таким образом, в результате экспериментальных исследований, описанных в *третьей и четвертой главах*, показано, что достоверное накопление ПП IX про-

исходит, в основном, в мембранах и клетках эритроцитов больных ЯБЖ и злокачественных клетках крови.

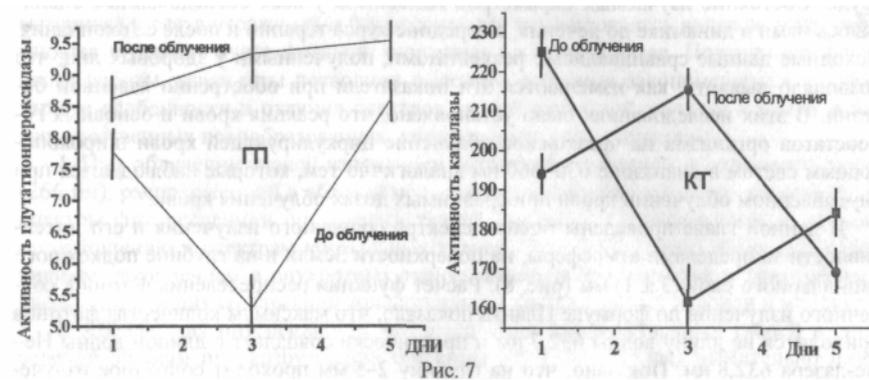
В пятой главе изложены клинические и лабораторные исследования и работы, направленные на выяснение биофизических механизмов внутривенной лазерной терапии язвенной болезни желудка излучением He-Ne-лазера с длиной волны 632,8 нм. Нами пролечено 420 больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки. В 83% случаев получен положительный терапевтический эффект, выразившийся в снижении интенсивности болей, ускорении сроков заживления язвы с 24 до 16 дней с образованием нежного (розового) рубца, а при язвах небольших размеров - с эпителизацией. БЛОК в предлагаемом режиме использовалась в качестве монотерапии. Всем больным через световод, введенный в локтевую вену, проводили облучение крови He-Ne-лазером, работающим в непрерывном режиме на $\lambda = 632,8$ нм, со средней мощностью излучения на выходе световода в 3-6 мВт. Длительность процедуры 30 мин, курс лечения 5-7 сеансов, суммарная доза облучения за сеанс - 10 Дж. На основе динамических и системных исследованиях показателей основных гомеостатов организма: иммунной, гормональной, вегетативной, про- и антиоксидантных систем до и после тридцатиминутного сеанса внутривенного облучения крови в течений курса лазеротерапии длительностью 5-6 дней, анализируются механизмы положительного терапевтического действия.

В этой части работы рассматривались: 1) основные продукты и механизмы генерации активных форм кислорода; 2) поведение системы антиоксидантной защиты при проведении лазерной терапии; 3) реакция системы регуляции агрегатного состояния крови; 4) морфофункциональные и цитохимические характеристики периферического звена эритрона; 5) изменение систем клеточного и гуморального иммунитета при ЛТ; 6) исследование функциональной активности и цитохимических характеристик нейтрофилов в ответ на ЛТ; 7) состояние вегетативной нервной системы и гормонального статуса при проведении ЛТ и т.д.

Один из наиболее существенных оригинальных научных результатов, представленных в пятой главе, заключается в обнаружении фотореактивации ферментов антиоксидантной защиты мембран глутатионпероксидазы (ГП) и миелопероксидазы (МП). Определение активности ферментов антиоксидантной защиты (АЗ) показало сложный и разнонаправленный характер их изменения в течении, как всего курса лечения, так и одного сеанса облучения. Величина этого параметра зависела от вида анализируемого фермента и его начальной активности. При этом активность таких ферментов, как ГП и МП, в конце курса лечения достоверно увеличивалась (рис. 7, ГП), в то время как активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КТ) достигла насыщения после третьего - четвертого сеанса. В дальнейшем изменения этого параметра СОД и КТ либо не происходило, либо имело разнонаправленный характер. Общая АЗ мембран эритроцитов и крови оценивалась косвенным образом по результатам изучения осморезистентности эритроцитов и, в случае положительного терапевтического эффекта, достоверно повышалась на 20-30%.

Приведенные в третьей и четвертой главе результаты исследования спектральных характеристик цельной крови и ее компонентов показывают, что, при внутривенном лазерном облучении крови, первичными акцепторами фотонов излучения являются порфирины и порфириносодержащие соединения и структуры (в частности, протопорфирин IX и его производные, гемоглобины, активные центры антиок-

сидантных ферментов и цитохромов). Поглощение фотонов этими акцепторами вызывает целый ряд окислительно-восстановительных реакций, протекающих с участием молекул кислорода, атомов водорода и электронов. Участие молекул кислорода приводит к возникновению кислородоактивных частиц, например, O_2^- , H_2O_2 , 1O_2 , OH и т.д.



Последние инициируют цепные радикальные реакции ненасыщенных жирных кислот мембран, что вызывает в первую очередь деструкцию патологически измененных клеток, повышение общей активности антиоксидантной системы, усиление пролиферативной активности нормальных клеток тканей и костного мозга и опосредованное изменение иммунологического и гормонального статусов, нормализацию регуляторных функций ВНС. Вызванные этими явлениями рост количества ретикулоцитов, эритроцитов, гемоглобина, цветного показателя, осмотической резистентности и антиоксидантной активности эритроцитов, приводит к росту оксигенации крови, а усиление фибринолитической активности и уменьшение агрегационной активности эритроцитов, понижение CO_2 , расширение сосудов приводят к уменьшению вязкости крови и улучшению ее реологических свойств. В результате повышается скорость микроциркуляции, улучшается оксигенация тканей, что и приводит к росту интенсивности энергетических, синтетических и пролиферативных процессов в клетках крови и тканей.

В этой главе изложены результаты исследования предложенного и разработанного нами метода лечения ЯБЖ путем облучения циркулирующей крови от светодиодной терапевтической установки, излучающей на длинах волн (650 + 20) нм в красной области спектра. Применение этой установки позволяет создать внутри сосудистого русла ту же мощность излучения, что и при использовании луча лазера. Для доказательства схожести терапевтического действия внутрисосудистого лазерного облучения крови и чрезкожного облучения крови от светодиодной установки нами было выполнено клиническое исследование в трех группах пациентов, страдающих язвенной болезнью желудка и ДПК. Первую группу составили больные ЯБ (35 чел.), получавшие комплексную медикаментозную терапию (антациды, H_2 -блокаторы, репаранты). Во вторую группу вошли пациенты (32 чел.) с ЯБ, которым наряду с комплексной медикаментозной терапией проводилось внутрисосудистое

лазерное облучение крови. И, наконец, третья группа (30 чел.) включала в себя больных с ЯБ, у которых комплексное лечение было дополнено чрезкожным облучением крови от широкополосного излучателя электромагнитных волн видимого диапазона. Контрольную группу составили 15 практически здоровых мужчин в возрасте от 28 до 40 лет, безотягощенной наследственности и вредных условий труда. Состояние изучаемых параметров гомеостаза у всех обследованных оценивалось нами в динамике до лечения, в середине курса терапии и после ее окончания. Исходные данные сравнивались с результатами, полученными у здоровых лиц, что позволяло выявить, как изменяются эти показатели при обострении язвенной болезни. В этих исследованиях было установлено, что реакция крови и основных гомеостатов организма на чрезкожное облучение циркулирующей крови широкополосным светом в диапазоне 630—660 нм аналогично тем, которые наблюдаются при внутривенном облучении крови при сравнимых дозах облучения крови.

В данной главе проведены оценки спектра солнечного излучения и его интенсивности за пределами атмосферы, на поверхности Земли и на глубине подкожного капиллярного слоя (3 ± 1) мм (рис. 8). Расчет функции распределения фотонов солнечного излучения по формуле Планка показало, что максимум количества фотонов приходится на длину волны 632,7 нм и практически совпадает с длиной волны He-Ne-лазера 632,8 нм. Показано, что на глубину 2-5 мм проходит солнечное излучение в красном и ближнем ИК-диапазонах спектра, которое поглощается в основном периферической циркулирующей кровью. Численные оценки показывают, что доза солнечного излучения, поглощаемая циркулирующей кровью в области 630-660 нм,

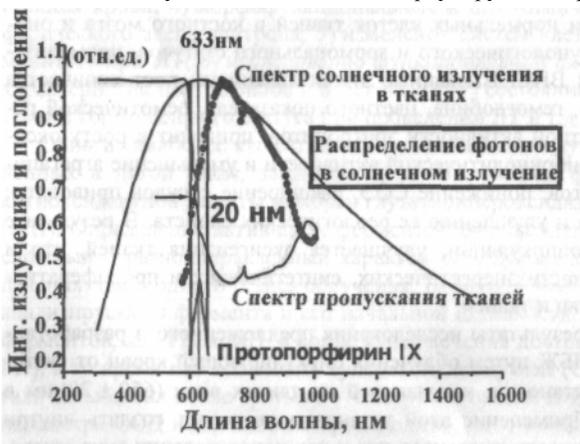


Рис. 8

через открытые участки тела человека в средних широтах в течение времени порядка 3-4 ч сравнима или даже выше тех доз света, которые может получить человек в результате БЛОК или локальном чрезкожном облучении широкополосным источником красного диапазона.

В шестой главе приведены результаты исследования спектральных характеристик слизистой желудка в норме и при злокачественных новообразованиях *in vitro* и рассмотрены некоторые методы идентификации тканей по спектральным характеристикам. Многочисленные измерения спектров поглощения (отражения) и флуоресценции различных образцов слизистой желудка (более 2000 спектров) в норме и при патологиях позволили выяснить, что их вид в большей степени зависит от длины волны возбуждения, чем от состояния тканей. Поэтому при выборе оптимальной X_d для возбуждения флуоресценции использовались основная

X_d для возбуждения флуоресценции использовались основная (1064 нм), вторая (532 нм), третья (353 нм) и четвертая (266 нм) гармоники неодимового лазера, азотного лазера с $X = 337,1$ нм, а также излучение He-Ne и аргонового лазеров, генерирующих соответственно на длинах волн 632,8 нм, 514,5 нм, 488 нм. Для микроскопических наблюдений (микроскоп И-2) изображений клеток, гистологических препаратов и отмытых от крови и посторонних включений образцов биопсийного материала в свете отражения и флуоресценции использовалась видеосистема, работающая в режиме счета фотонов, описанная во второй главе. Полученные в этой части работы результаты позволили выяснить основные закономерности и характерные особенности и отличия спектров тканей слизистой желудка в норме и при злокачественных новообразованиях, которые состоят в следующем.

1. При облучении тканей излучением четвертой гармоники неодимового лазера (266 нм), расположенной в области полос поглощения ароматических аминокислот, спектры флуоресценции опухолевых тканей смещены в длинноволновую сторону по отношению к спектрам нормальных тканей. Этот факт можно объяснить селективным накоплением в опухолевых тканях аминокислот тирозина и триптофана и увеличением в них содержания коллагеновых и фибриллярных волокон и молекул.

2. Абсолютная интенсивность флуоресценции злокачественных тканей в синезеленой области при возбуждении ближним УФ (337, 355 нм) значительно ниже, чем нормальных. Это указывает на накопление восстановленных форм НАД и уменьшение окисленных флавопротеидов в опухолевых тканях по сравнению с нормальными, и подтверждает принцип Варбурга о переходе метаболизма злокачественных клеток от кислородного дыхания к гликолизу и брожению [22]. При этом в области спектра 400-500 нм для первых наблюдается относительное превышение интенсивности флуоресценции по сравнению со вторыми (нормальными), а в области 500—580 нм наоборот.

3. При облучении тканей излучением с $X = 532$ нм для злокачественных новообразований наблюдается относительное превышение интенсивности флуоресценции в области 535-580 нм по сравнению с нормальными, а в области 580-800 нм наблюдается обратное соотношение интенсивностей.

4. В красной области спектра, как правило, наблюдается не только относительное, но и абсолютное превышение интенсивности флуоресценции по сравнению с нормой. Этот результат мы объясняем накоплением свободных эндогенных порфириновых соединений в опухолевых тканях и клетках слизистой оболочки желудка.

5. Впервые, если судить по известной нам литературе, получено «выжигание провалов» в спектрах флуоресценции биологических тканей при их облучении лазером с $X = 532$ нм совпадающих, с одной из полос поглощения гемоглобинов и порфириновых молекул (рис. 9.) При интенсивности падающего излучения на $X = 532$ нм более 20 мВт/см² в спектрах флуоресценции возникают узкие провалы интенсивности с центрами вблизи длин волн 571, 577, 590, 617, 632, 677 нм, совпадающими с максимумами полос поглощения порфириновых молекул.

6. При облучении образцов сфокусированным инфракрасным излучением основной гармоники неодимового лазера на $X = 1064$ нм значительной, однако не разрушающей ткани мощности, слабая флуоресценция тканей наблюдалась во всем видимом диапазоне спектра, с максимальной интенсивностью на длине волны второй гармоники излучения накачки $X = 532$ нм. Интенсивность флуоресценции на

$\lambda = 532$ нм при этом была на один-два порядка больше, чем на других длинах волн. Следует отметить, что возникновение излучения на длине волны второй гармоники неодимового лазера в сложных органических средах является скорее правилом, чем исключением [23] и наблюдалось нами ранее на сетчатке глаза человека *in vivo*.

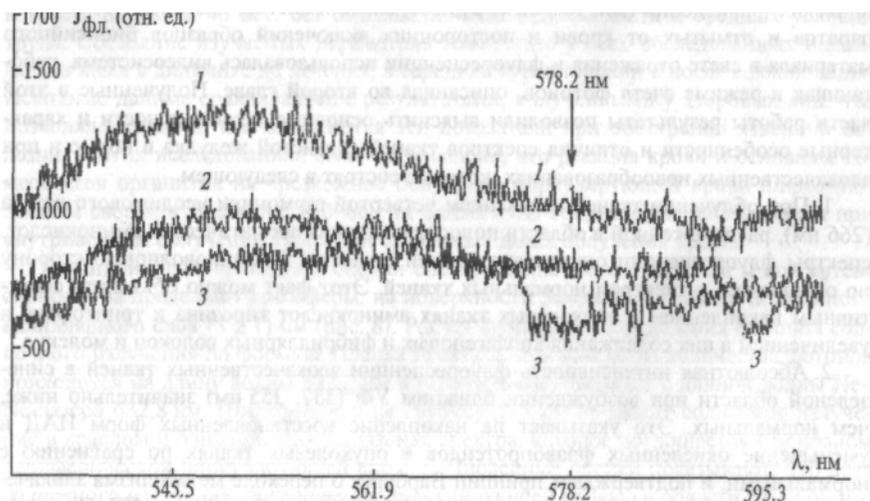


Рис. 9. Изменения спектров флуоресценции образца ткани слизистой желудка при непрерывном облучении излучением на $\lambda = 532$ нм мощностью 20 мВт/см². Общее время облучения 5 мин. Время записи одного спектра 1 мин

7. Измеренная нами длительность флуоресценции образцов ткани слизистой желудка не превышала 10 нс при длительности импульса возбуждения 1 нс и временном разрешении системы регистрации 2 нс. При этом мы не обнаружили значимых различий в длительности флуоресценции между опухолевыми и нормальными тканями. На высушенных образцах тканей, кроме описанной выше флуоресценции, мы наблюдали слабое излучение в области 400-500 нм, с максимумом интенсивности в области длин волн 440-450 нм, которая длится в течение нескольких минут, после возбуждения этих тканей УФ-излучением ($\lambda < 350$ нм). При облучении тканей излучением с $\lambda > 350$ нм мы не обнаружили подобного послесвечения. Большая длительность послесвечения и совпадение спектров фосфоресценции и возбуждения фосфоресценции с аналогичными параметрами триптофана и белков, содержащих триптофан, указывают, что в нашем случае (отсутствие воды) мы наблюдаем фосфоресценцию последних.

8. Полученные в этой главе экспериментальные результаты по спектрам позволили нам создать первую версию программы по распознаванию нормальных и злокачественных тканей, основанную на методе корреляционного анализа спектров,

Основным хирургическим методом лечения поверхностного рака мочевого пузыря в последние годы стала трансуретральная резекция (ТУР), практически вытеснившая другие органосохраняющие методы оперативного лечения. Особой проблемой в лечении этой формы рака является частое рецидивирование. При двухлетнем

наблюдении рецидивы возникают у 39% пациентов со стадией T_a и в 61% - с T₁ [24]. Одной из главных причин рецидивирования поверхностного рака мочевого пузыря является мультицентричный характер роста опухоли, и, как следствие, наличие множественных опухолевых образований, невидимых при обычной цистоскопии. При этом доказано, что при развитии рецидива снижается степень дифференцировки опухоли, возрастает глубина инвазии, увеличивается резистентность опухоли к консервативному лечению. Все это значительно ухудшает прогноз лечения больных поверхностным раком мочевого пузыря. В связи с этим актуальной проблемой является разработка метода, позволяющего объективно оценить степень распространенности опухоли в слизистой оболочке мочевого пузыря, что дает возможность выполнения радикальной резекции и, как следствие, снижения частоты рецидивирования. Привлекательным в этом отношении является метод диагностики и контроля состояния слизистой мочевого пузыря путем измерения и анализа спектральных характеристик, обусловленных накоплением в опухолевых тканях эндогенных и экзогенных фотосенсибилизаторов. В последнем случае фотосенсибилизатор вводится в организм внутривенно или перорально и селективно накапливается в опухоли [25].

В седьмой главе проведены исследования спектральных характеристик поглощения и флуоресценции слизистой мочевого пузыря *in vivo et vitro*. Целью этих исследований было создание методов, позволяющих определять истинные границы опухоли, очагов рака *in situ* и дополнительные очаги рака при множественном поражении мочевого пузыря. Для достижения этой цели был выполнен ряд исследований, направленных на оценку участия эндогенных и экзогенных фотосенсибилизаторов в формировании специфических отличительных признаков для спектрометрической диагностики состояния слизистой оболочки мочевого пузыря в норме и при злокачественных патологиях. Для корректного научного анализа основных хромофоров биологических тканей необходимо одновременное исследование спектров отражения; флуоресценции и спектра возбуждения флуоресценции в широком диапазоне длин волн. Кроме того, определение хромофоров должно быть проведено и другими независимыми методами, например путем микроскопического анализа тканей. Поэтому наши исследования выполнялись в три этапа.

Первый этап состоял в измерении и анализе спектральных характеристик операционного и биопсийного материала. Ткань для исследования забиралась из здорового участка, на границе «опухоль-здоровая ткань» и из центра опухолевого очага. При исследованиях *in vitro*, сразу после операции, отмытые от крови и слизи в физиологическом растворе или дистиллированной воде образцы тканей размещались в измерительной кювете MPF-4 на поверхности тонкой металлической сетки для проведения спектроскопических измерений. Кроме того, для микроскопических исследований параллельно с обычными гистологическими препаратами тканей подготавливали микротомные неокрашенные образцы тканей. Наблюдения флуоресцентных изображений образцов тканей с помощью флуоресцентного микроскопа и TV-систем, описанных выше, позволяло нам идентифицировать центры свечения препаратов при освещении последних УФ- или синими лучами.

На втором этапе *in vivo* изучались спектральные характеристики слизистой мочевого пузыря (тканей) непосредственно перед трансуретральной резекцией у 57 пациентов со злокачественными новообразованиями, а также у 93 пациентов во

время плановых цистоскопических осмотров. Тридцати семи пациентам из этого числа за 2-4 ч до операции или дополнительного цистоскопического осмотра внутривезикулярно вводился свежеприготовленный 3%-й раствор 5-АЛК. Это позволило провести сравнение результатов диагностического осмотра не только с результатами обычной гистологии, но и флуоресцентной диагностики с применением экзогенного «фотосенсибилизатора» 5-АЛК.

Для исследования спектральных характеристик как *in vivo*, так и *in vitro* использовался модернизированный нами спектрофлуориметр Hitachi MPF-4, акустооптический спектроанализатор Кварц-3012 и КСВУ-23. При исследовании *in vivo* излучение от канала (монохроматора) возбуждения спектрофлуориметра MPF-4 через кварцевый световод подавалось через осветительный или операционный каналы цистоскопа на поверхность ткани, а излучение флуоресценции или отражения через наблюдательный канал и гибкий кварцевый световод выводилось на вход монохроматора регистрации спектрофлуориметра.

Для регистрации спектра флуоресценции при возбуждении на длине волны $\lambda_{ex} = 405$ нм использовался операционный цистоскоп, операционный канал которого использовался для облучения поверхности слизистой мочевого пузыря через кварцевый моноволоконный световод. Наблюдение спектра флуоресценции тканей *in vivo* при возбуждении излучением $\lambda = 285$ нм не проводилось в силу сильной собственной флуоресценции моноволоконного световода и незначительного пропускания оптики наблюдательного канала цистоскопа для УФ-лучей в диапазоне 300-400 нм.

Для регистрации спектров отражения тканей в операционной в видимой области спектра 400-800 нм использовался оптико-акустический спектроанализатор «Кварц 3102-ВЭ», а для возбуждения спектров флуоресценции использовались малогабаритная ртутная лампа и разработанный нами азотный лазер, работающий на длине волны 337 нм с энергией в импульсе 1 мДж и частотой следования до 100 Гц.

Трансуретральная диагностика слизистой мочевого пузыря по естественным спектрам отражения и флуоресценции тканей. На рис. 10, для примера, приведены спектры диффузного отражения нормальных участков пяти пациентов, снятые на акустооптическом спектрофотометре «Кварц-3012-ВЭ» во время диагностического осмотра. Как видно из этого рисунка, интенсивность отражения света вблизи $\lambda = 620$ нм для различных случаев отличается почти на порядок величины (8 раз). Однако форма кривых при этом почти одинакова. Поэтому в качестве эталонного спектра нормальной ткани брался спектр диффузного отражения, найденный путем усреднения спектров отражения 45 отдельных случаев, нормированных на максимальное значение отраженного света на длине волны 620 нм (рис. 11, кривая 2.).

Аналогичные действия (операции) для определения эталонных спектров патологических тканей были проведены со спектрами отражения злокачественных участков тканей 50 пациентов, у которых был взят биопсийный материал и гистологически установлен рак мочевого пузыря (рис. 11, кривая 1.). В результате вычитания этих спектров мы получим спектральную кривую, не зависящую от спектральных характеристик и особенностей диагностических установок. Таким образом, экспериментально были определены длины волн в видимой области спектра, для которых интенсивности диффузного отражения на длинах волн падающего света значительно различаются для опухолевых и нормальных тканей.

При облучении светом в диапазоне 400—800 нм интенсивность сигналов диффузного отражения и рассеяния назад на длинах волн 500-600 нм больше, чем для нормальных, а для длин волн 530-590 нм это различие в интенсивности максимальное. Интенсивность флуоресценции злокачественных тканей на длинах волн больше

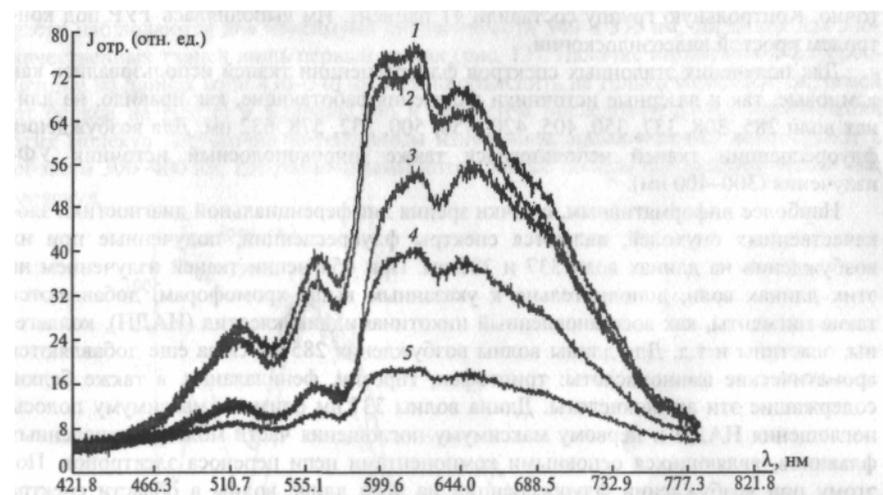


Рис. 10

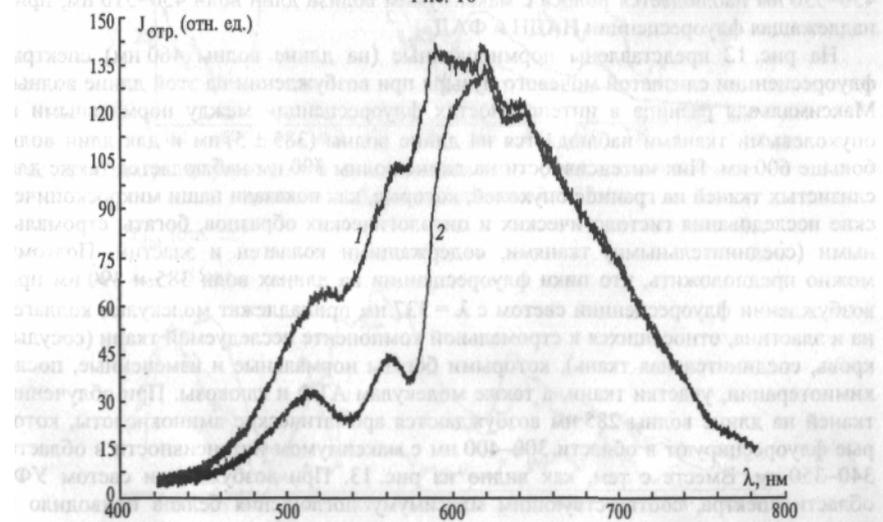


Рис. 11

600 нм при облучении поверхности слизистой на длине волны 405 нм, как правило, была больше, чем нормальных. Поэтому опухолевая ткань наблюдается визуально или на экране монитора как ярко светящаяся область на фоне относительно темной

нормальной поверхности слизистой оболочки. Максимальный контраст изображения поверхности мочевого пузыря в отраженном свете между опухолевыми и нормальными тканями достигается на длинах волн 530-590 нм. Именно на этих длинах волн граница между опухолевой и нормальной тканями определялась наиболее точно. Контрольную группу составили 41 пациент. Им выполнялась ТУР под контролем простой видеэндоскопии.

Для получения эталонных спектров флуоресценции тканей использовались как ламповые, так и лазерные источники излучения работающие, как правило, на длинах волн 285, 308, 337, 350, 405, 420, 450, 500, 532, 578, 632 нм. Для возбуждения флуоресценции тканей использовался также широкополосный источник УФ-излучения (300-400 нм).

Наиболее информативным, с точки зрения дифференциальной диагностики злокачественных опухолей, являются спектры флуоресценции, полученные при их возбуждении на длинах волн 337 и 285 нм. При облучении тканей излучением на этих длинах волн, дополнительно к указанным выше хромофорам, добавляются такие пигменты, как восстановленный никотинамиддинуклеотид (НАДН), коллагены, эластины и т.д. Для длины волны возбуждения 285 нм сюда еще добавляются ароматические аминокислоты: триптофан, тирозин, фенилаланин, а также белки, содержащие эти аминокислоты. Длина волны 337 нм близка к максимуму полосы поглощения НАДН и первому максимуму поглощения части молекул окисленных флавинов, являющихся основными компонентами цепи переноса электронов. Поэтому при возбуждении флуоресценции на этой длине волны в области спектра 430-530 нм наблюдается полоса с максимумом вблизи длин волн 450-510 нм, принадлежащая флуоресценции НАДН и ФАД.

На рис. 12 представлены нормированные (на длине волны 460 нм) спектры флуоресценции слизистой мочевого пузыря при возбуждении на этой длине волны. Максимальная разница в интенсивностях флуоресценции между нормальными и опухолевыми тканями наблюдается на длине волны (385 ± 5) нм и для длин волн больше 600 нм. Пик интенсивности на длине волны 390 нм наблюдается также для слизистых тканей на границе опухолей, которые, как показали наши микроскопические исследования гистологических и цитологических образцов, богаты стромальными (соединительными) тканями, содержащими коллаген и эластин. Поэтому можно предположить, что пики флуоресценции на длинах волн 385 и 390 нм при возбуждении флуоресценции светом с $\lambda = 337$ нм принадлежат молекулам коллагена и эластина, относящихся к стромальной компоненте исследуемой ткани (сосуды, кровь, соединительная ткань), которыми богаты нормальные и измененные, после химиотерапии, участки ткани, а также молекулам АТФ и глюкозы. При облучении тканей на длине волны 285 нм возбуждаются ароматические аминокислоты, которые флуоресцируют в области 300-400 нм с максимумом интенсивности в области 340-350 нм. Вместе с тем, как видно из рис. 13. При возбуждении светом УФ-области спектра, соответствующим максимуму поглощения белков приводило к свечению тканей практически во всем видимом диапазоне спектра (стрелкой показан момент переключения чувствительности спектрофлуориметра). Причем в красной области $\lambda > 600$ нм между нормальными и опухолевыми тканями наблюдается принципиальная разница, заключающаяся в том, что интенсивность флуоресценции злокачественных тканей в этой области спектра растет, в то время как для нормаль-

ных участков падает. Кроме того, только при возбуждении на длине волны 285 нм интенсивность флуоресценции раковых тканей в области 300-400 нм в 2-3 раза выше, чем для нормальных тканей. Значительно отличаются также форма и вид спектров флуоресценции в области 350-450 нм. Для нормальных тканей в этой области наблюдаются два максимума интенсивности 340 и 375 нм, тогда как для злокачественных тканей лишь первый из них (рис. 13). Наличие интенсивной флуоресценции на длинах волн 430-540 нм можно объяснить не только переносом энергией от белков на НАДН и флавины, но и эффектом последовательного возбуждения этих молекул достаточно интенсивным излучением ароматических аминокислот в области 300-400 нм, где расположены интенсивные полосы поглощения указанных молекул.

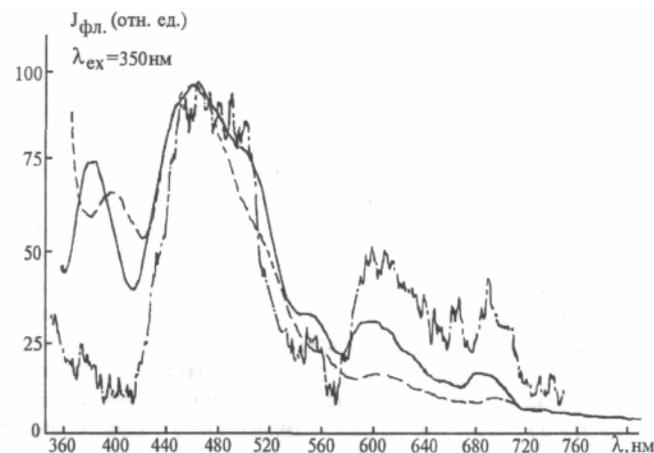


Рис. 12. Спектры флуоресценции тканей: нормальных (—), злокачественных (- · -) и их границы (- -) при возбуждении $\lambda = 337$ нм

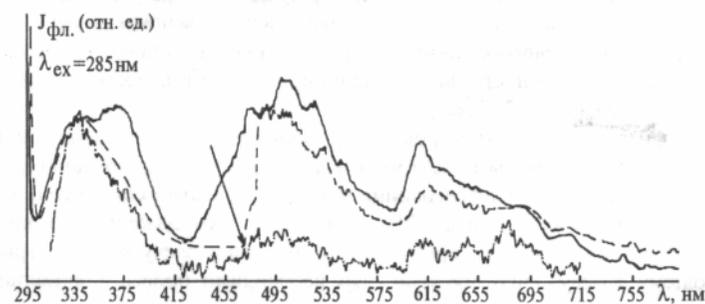


Рис. 13. Спектры флуоресценции тканей: нормальных (-----), злокачественных (- · -) и их границы (—) при возбуждении $\lambda = 285$ нм

Заслуживают внимания результаты, полученные при измерении флуоресценции в красной области спектра $\lambda > 600$ нм, возбуждаемой УФ-излучением. Наличие флуоресценции в красной области спектра при 685 и 720 нм, при возбуждении на

$X = 285$ нм, можно рассматривать как указание на наличие миграции энергии от белков на порфирины и, возможно, на тесную связь порфиринов с белковыми компонентами мембраны.

Обнаруженные нами значительные различия в форме кривых спектров автофлуоресценции нормальных и опухолевых тканей, при их облучении излучением с длинами волн 337 нм (азотный лазер) и 334 нм (ртутная лампа), позволили нам получить простой спектроскопический алгоритм для дифференциации нормальной и раковой тканей. Например, для длины волны возбуждения $X=337$ нм, спектры флуоресценции для которой представлены на рис. 12, мы измеряли интенсивности сигналов флуоресценции $I(\lambda)$ на длинах волн $X_1 = 360$, $X_2 = 380$, $X_3 = 460$ нм и вычисляли следующие отношения [2]: $R_1 = I(\lambda_1)/I(\lambda_2)$, $R_2 = I(\lambda_2)/I(\lambda_3)$. Для нормальных тканей $R_1 > 1$, тогда как для злокачественных тканей $R_1 < 1$. Однако один параметр R_1 сам по себе не является достаточным критерием для определения опухолевой ткани. Поскольку флуоресцентный сигнал, особенно для раковых тканей, может быть предельно слабым, и в частности, в районе 380-420 нм, где находится максимум поглощения различных форм гемоглобинов. В этом случае отношение сигнала к уровню шумов на этих длинах волн сильно изменяется от эксперимента к эксперименту, что приводит к большим вариациям диагностического параметра R_1 . Поэтому необходимо иметь, как минимум, второе отношение R_2 , которое меньше зависит от уровня шумов.

В частности, наши эксперименты показали, что произведение $F = I(\lambda)/I(\lambda_2)$ является наиболее точным численным диагностическим критерием, с помощью которого были наиболее успешно поставлены диагнозы (в этом случае не было ложноположительных результатов, так же, как и ложно-отрицательных результатов).

Результаты диагностики пациентов, полученные при возбуждении флуоресценции на длине волны 337 (334) нм, по рассматриваемой методике совпали с результатами корреляционного анализа в 97% и гистологических исследований в 94% случаях. Различие отношения F_H/F_D между нормальными и раковыми тканями лежит в пределах от 3 до 14. Это значительно лучше того результата, который мы получили при фотодинамической диагностике с использованием внутривенного введения экзогенного фотосенсибилизатора - аминолевулиновой кислоты (ALK), когда контраст интенсивности флуоресценции между нормальной и злокачественной тканями не превышал 2-5 раз.

Аналогичная обработка спектров флуоресценции была проведена и для линии возбуждения ртутной лампы на $X = 365$ нм. Проведенный корреляционный анализ нормированных спектров флуоресценции показал, что в этом случае точность диагностики не высока и не превышает 75%. Выяснилось, что даже простое визуальное сравнение спектров позволяет гораздо точнее отнести исследуемые спектры к соответствующему классу. Поэтому ясно, что необходимо провести дополнительное уточнение классификации спектральных образов по каким-либо существенным признакам. Идея обработки экспериментальных зависимостей интенсивности излучения от длины волны (спектральные кривые) предполагает, что эти кривые на своих крыльях касаются оси нулевого уровня сигнала (оси длин волн) и вместе с этой осью образуют геометрический сюжет или образ, подлежащий числовому описанию. Такой образ может быть промоделирован кривой второго порядка $-f(x, y)$.

Для числового описания таких изображений наиболее простой системой признаков являются моменты инерции различных порядков, который был нами реализован при идентификации нормальных и злокачественных тканей в случае возбуждения тканей на длинах волн 337 и 365 нм. При этом если в первом случае точность диагностики не улучшилась, то во втором случае возросла на 10-15 и достигла 85-90%. При облучении тканей широкополосным УФ-излучением (300—400 нм) было обнаружено, что нормированные спектры флуоресценции нормальных и раковых тканей визуально очень похожи друг на друга, в то время как абсолютные интенсивности излучения при прочих одинаковых условиях наблюдения (регистрации) отличаются почти на порядок.

Трансуретральная резекция и диагностика слизистой мочевого пузыря под контролем экзогенной флуоресценции. Как показали наши исследования, к побочным эффектам данного метода, которые наблюдались почти у всех пациентов, является выраженное жжение при двухчасовой экспозиции раствора фотосенсибилизатора в пузыре, что часто приводит к преждевременному опустошению мочевого пузыря. Кроме того, послеоперационные циститы различной степени выраженности наблюдались у всех больных, которым проводились ТУР под контролем флуоресценции. Эти факты уменьшают положительный эффект от флуоресцентной диагностики при введении экзогенных фотосенсибилизаторов.

Сравнение результатов лечения было выполнено нами на основании общей и безрецидивной выживаемости больных. Учитывая тот факт, что группы больных, вошедших в исследование, сопоставимы по основным прогностическим признакам, мы сочли возможным сравнить кумулятивную выживаемость в этих группах. Наивысшие результаты выживаемости были зарегистрированы в группе больных, которым была выполнена трансуретральная резекция опухоли мочевого пузыря под контролем искусственной флуоресценции. Двухлетняя выживаемость составила (82,3 ± 5,2)%, трехлетняя (79,1 ± 5,8)%. Общая двух- и трехлетняя выживаемость при выполнении трансуретральной резекции опухоли мочевого пузыря под контролем естественной флуоресценции и ТУР, выполняемой под контролем обычной видеоэндоскопии, оказалась ниже по сравнению с предшествующей группой. Нами этот факт объясняется тем, что при проведении метода флуоресцентной диагностики, основанной на введении экзогенных фотосенсибилизаторов, реализуется фотодинамический эффект и Часть раковых клеток и очагов опухоли небольшого размера, не видимые глазом, погибают.

Таким образом, можно сделать вывод, что при облучении тканей УФ-излучением наиболее ранние и значительные изменения в спектре флуоресценции при возникновении злокачественных новообразований (I, II стадии) наблюдаются на следующих длинах волн: $X_1 = 350 \pm 10$; $X_2 = 395 \pm 5$; $X_3 = 450 \pm 10$; $A_{\dots} = 520 \pm 10$; $X_5 = 630 \pm 5$; $X_6 = 712 \pm 5$; $X_7 = (760 \pm 5)$ нм.

Полученные в этой части работы данные позволили впервые разработать алгоритмы и программы диагностики злокачественных новообразований, основанные на методах корреляционного анализа спектров и методах распознавания спектральных образов изображений биологических тканей и клеток с помощью системы технического зрения.

Основные результаты и выводы

1. Впервые обнаружены и исследованы спектры катодо- и рентгенолюминесценции сухих образцов цельной крови в видимой области спектра и проведено их сравнение со спектрами флуоресценции при возбуждении оптическим излучением на длинах волн вблизи 400 нм. При этом показано, что активаторами излучения двух наиболее сильных полос флуоресценции крови с центрами на длине волны $\lambda_1 = 710$ и $\lambda_2 = 760$ нм являются трехвалентные ионы железа, находящиеся в различных координационных положениях в активных центрах металлопорфиринов белковых молекул крови. Установлено, что при всех видах возбуждения образцов крови больных интенсивность флуоресценции длинноволновой полосы с $\lambda_1 = 760$ нм повышается по сравнению с кровью здоровых доноров.

2. Впервые показано, что изменения во времени спектральных характеристик компонентов крови здоровых доноров, онкологических больных и пациентов с ЯБЖ, исходные их различия и возможность индуцированной лазерным излучением их инверсия могут быть объяснены следующим причинам: 1) нарушениями синтеза металлопорфиринов при заболеваниях желудочно-кишечного тракта и повышением концентрации их промежуточных продуктов (уропорфиринов, копропорфиринов; протопорфирина); 2) высокой потенциальной безметалльных порфиринов в водных растворах и мембранных структурах к димеризации и агрегации; 3) спектроскопическими различиями поглощения и флуоресценции мономерных и димерных форм порфиринов; 4) фотодиссоциацией димеров и олигомеров (агрегатов) порфиринов при лазерном воздействии.

3. Впервые показано, что изменение содержания иммунокомпетентных клеток периферической крови (лимфоцитов, моноцитов, сегментоядерных лейкоцитов и т.д.) в течение первых четырех сеансов лазерного воздействия может быть охарактеризовано как неустойчивый колебательный процесс с дальнейшим (при продолжении сеансов воздействия) аperiодическим уменьшением до нормальных значений. Такое поведение объясняется взаимодействием депонированных клеток и процессами их пролиферации в костном мозге. После четвертого сеанса лечения растет активность Т-субпопуляции (Т_a, Т_x, Т_c) лимфоцитов.

4. Максимум функции спектрального распределения Планка для фотонов солнечного излучения, приходящийся на длину волны $\lambda = 632,7$ нм, совпадает с максимумом полосы поглощения протопорфирина IX, накапливающегося в мембранах патологически измененных и старых клеток, а также с терапевтическим окном прозрачности кожи и цельной крови. Общая доза света, поглощаемая циркулирующей периферической кровью через открытый участок кожи площадью 500 ч- 1000 см² в диапазоне спектра 600 т 700 нм в течение светового времени суток в средних широтах, составляет около нескольких джоулей и близка к оптимальной дозе светотерапии на длине волны $\lambda = 632,8$ нм.

5. Обнаружено, что при облучении тканей излучением четвертой гармоники неодимового лазера спектры флуоресценции опухолевых тканей смещены в длинноволновую сторону по отношению к спектрам нормальных тканей, что связано с селективным накоплением в опухолевых тканях аминокислот тирозина и триптофана. б. Обнаружено, что при воздействии на злокачественно трансформированные ткани излучением с $\lambda = 355$ или $\lambda = 532$ нм, в областях спектра флуоресценции 400-

500 или 535-580 нм наблюдается более высокая интенсивность по сравнению с нормальными тканями, а в области 500-580 или 580-800 нм соответственно наблюдается обратное соотношение интенсивностей флуоресценции. 7. В случае облучения светом с длиной волны $\lambda = 337$ нм здоровых и злокачественно трансформированных тканей слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки, для последних наблюдается значительное понижение интенсивности флуоресценции в спектральной области на $\lambda = (390 \pm 5)$ нм, которое обусловлено понижением концентрации молекул глюкозы (сахаров) и АТФ.

8. При облучении тканей излучением ультрафиолетового диапазона ($\lambda = 286$; 337; 405 нм) наиболее ранние и значительные изменения в спектре автофлуоресценции злокачественно трансформированных тканей происходят на следующих длинах волн: $\lambda_1 = 350 \pm 10$; $\lambda_2 = 395 \pm 5$; $\lambda_3 = 450 \pm 10$; $\lambda_4 = 520 \pm 10$; $\lambda_5 = 630 \pm 5$; $\lambda_7 = 712 \pm 5$; $\lambda_7 = 760 \pm 5$ нм.

Основные материалы диссертации опубликованы в работах

1. Бычков Ю.И., Клишкин В.М., Федоричев В.Г., Удуд В.В., Прокопьев В.Е. Спектральные и временные характеристики флуоресценции слизистой желудка в норме и при патологиях // Тезисы докладов II Всесоюзного семинара «Лазерная биофизика и новые применения лазеров в медицине». Тарту, 1989. С. 16.
2. Тютрин И.И., Удуд В.В., Прокопьев В.Е., Наумов С.А., Татарников В.А., Карпов А.В., Бородулина Е.В. Лазерная фототерапия (теория и практика). Под общей редакцией проф. Н.В. Васильева и И.И. Тютрина//Томск: Изд. «Граффити», 1992. С. 252.
3. Прокопьев В.Е. О механизме восприятия ИК-излучения лазеров невооруженным глазом человека//Биофизика. 1980. XXV. № 5. С. 927-928
4. Прокопьев В.Е. Нелинейные и параметрические резонансы в органах зрения и слуха человека//Биофизика. 1985. XXX. Вып. 1. С. 129-132.
5. Верховский В.С., Клишкин В.М., Прокопьев В.Е., Тарасенко В.Ф., Соколов В.Г., Федоров А.И. Исследование ВКР-излучения эксимерных лазеров на электронных переходах атомов металлов//Квантовая электроника. 1982. 9. № 11. С. 2151-2155.
6. Бычков Ю.И., Иванов Н.Г., Коваленко С.Е., Лосев В.Ф., Панченко Ю.Н., Прокопьев В.Е. Эффективность преобразования излучения ХеС 1 -лазера при ВКР на парах металлов // ЖПС. 1990. 55. № 1. С. 80-83.
7. Bychkov Yu.I., Ivanov N.G., Kovalenko S.E., Losev V.F., Panchenko Yu.N. and Prokop'ev V.E. //I. Russian Laser Research. 1994. V. 15. № 1. P. 18-24.
8. Иванов Н.Г., Коваленко С.Е., Лосев В.Ф., Панченко Ю.Н., Прокопьев В.Е. О спектральной яркости излучения ВКР пучка ХеС 1-лазера в парах металлов // Оптика атмосферы и океана. 1996. Т. 9. №2. С. 211-216.
9. Прокопьев В.Е. К вопросу о восприятии инфракрасного излучения лазеров глазом человека//Биофизика. 1980. XXV. Вып. 2. С. 305-306.
10. Удуд В.В., Наумов С.А., Карпов А.Б., Прокопьев В.Е., Якушев В.П. Внутривенное лазерное облучение крови. Точки приложения и эффекты // Действие низкоэнергетического лазерного излучения на кровь. Киев, 1989. С. 200-202.
11. Удуд В.В., Наумов С.А., Карпов А.Б., Прокопьев В.Е., Сулова Т.Е. О механизмах внутрисосудистого лазерного облучения крови (БЛОК) // Низкоинтенсивные лазеры в медицине. Обнинск, 1991. Ч. 2. С. 120-123.
12. Удуд В.В., Наумов С.А., Карпов А.Б., Прокопьев В.Е., Сулова Т.Е. Внутрисосудистая лазеротерапия в онкологии // Нетрадиционные методы в онкологии. Ростов на Дону, 1991. С. 33-35.

13. Удут В.В., Наумов С.А., Карпов А.Б., Якушев А.В., Прокопьев В.Е., Зырянов Б.Н. Лазерное излучение в диагностике и лечении предрака желудка // Тезисы докл. II Международной конференции «Лазеры и медицина». Ташкент, 1989. Ч. 2. С. 69.
14. Удут В.В., Наумов С.А., Карпов А.Б., Прокопьев В.Е., Якушев В.П. Внутривенное лазерное облучение крови. Точки приложения и эффекты // Действие низкоэнергетического лазерного излучения на кровь. Киев, 1989. С. 200-202.
15. Удут В.В., Наумов С.А., Карпов А.Б., Прокопьев В.Е., Суслова Т.Е. О механизмах внутрисосудистого лазерного облучения крови (БЛОК) // Низкоинтенсивные лазеры в медицине. Ч. 2. Обнинск, 1991. С. 120-123.
16. Прокопьев В.Е., Клишкин В.М., Чикуров В.А., Удут В.В. Лазерная спектрофлуориметрическая система в диагностике злокачественных опухолей желудка // Тезисы докладов 111 Всесоюзного научно-технического семинара «Применение лазеров в науке и технике». Иркутск, 1990. С. 123-124.
17. Удут В.В., Наумов С.А., Карпов А.Б., Прокопьев В.Е. и др. Лазерное излучение в диагностике и лечении предрака желудка // Материалы II Всероссийской конференции «Механизмы развития патологических процессов». Кемерово, 1994. С. 10-11.
18. Karpov A.B., Uдут V.V., Prokop'ev V.E., Savina E.V., Yalova M.F. Low-energy laser radiation in correction of gastric precancer. Medical and biological effects // J. de Physique IV. V. 4. 1994, P. 215-217.
19. Способ облучения циркулирующей крови электромагнитным излучением видимого диапазона. N4931632/14 (23616) от 19.03.91. Решение о выдаче патента России по заявке на изобретение от 15.09.92. Удут В.В., Прокопьев В.Е., Наумов С.А., Карпов А.Б.
20. Игла для электромагнитного облучения крови. №4866511/14 (095293). Решение о выдаче патента России по заявке на изобретение от 13.10.92. Удут В.В., Прокопьев В.Е., Наумов С.А., Карпов А.Б.
21. Способ диагностики злокачественных новообразований и устройство для его осуществления № 94010321/14 (009925). Решение о выдаче патента России по заявке на изобретение от 23.03.1994. Прокопьев В.Е., Удут В.В.
22. Способ обнаружения злокачественных новообразований и определения границ их распространения. №96! 19671/14 (02620S). Приоритет от 01.10.96. Зырянов Б.Н., Селиванов С.П., Прокопьев В.Е.
23. Способ восстановления трофики тканей и активный электрофотостимулятор для его осуществления. № 2003129698. Приоритет от 26.09.03. Прокопьев В.Е., Удут В.В.
24. Kolomiyets L.A., Savina Ye.V., Prokop'ev V.E., Suslova T.Ye. Mechanism of treatment effect low-energy laser irradiation // Proc. SPIE. 1996. V. 2728. P. 63-67.
25. Коломиец Л.А., Савина Е.В., Суслова Т.Е., Прокопьев В.Е. Механизмы внутривенной лазерной терапии // Физическая медицина. 1996. Т. 5. № 1-2. С. 11-12.
26. Зырянов Б.Н., Прокопьев В.Е., Селиванов С.П. Проблемы и перспективы спектрометрического метода диагностики рака мочевого пузыря // Тезисы докладов 1-го Всероссийского съезда онкологов. Москва, 1996. С. 250.
27. Andrienko O.S., Prokop'ev V.E. Study of capability to television screen detrimetal radiation into the useful radiation // Abs. 17th Congress of the International Commission for Optics (ICO-XVH), Taejon, 1996. P. 123.
28. Прокопьев В.Е., Суслов А.И. Оптический компьютерный спектроанализатор изображения для определения микроколичеств урановых соединений и ионов тяжелых металлов // Материалы Международной конференции «Радиоактивность и радиоактивные элементы в среде обитания человека». Томск, 1996. С. 447-450.
29. Юдин Н.А., Клишкин В.М., Прокопьев В.Е. Оптогальванический эффект в лазерах на сомоограниченных переходах атома меди // Квантовая электроника. 1999. Т. 28. № 3. С. 273—276.
30. Юдин Н.А., Клишкин В.М., Прокопьев В.Е., Калайда В.Т. Экспериментальные наблюдения ступенчатой ионизации атома Си в активной среде Си-лазера // Известия высших учебных заведений. Физика. 1999. Т. 42. № 8. С. 57-62.
31. Герасимов В.А., Прокопьев В.Е. Одновременная генерация на трех длинах волн $X = 510,6; 578,2; 780,8$ нм в лазерах на парах меди // Оптика атмосферы и океана. 1997. Т. 10. №11. С. 1316-1318.
32. Иванов Н.Г., Лосев В.Ф., Прокопьев В.Е. Преобразование высококогерентного излучения ХеСl-лазера при ВКР в газообразном водороде // Оптика атмосферы и океана. Т. 12. № 11, 1999, С. 1056-1063.
33. Селиванов С.П., Прокопьев В.Е., Удут В.В., Карасева В.В., Исаева С.Н., Ковалик Т.А. Фотодинамическая терапия поверхностного рака мочевого пузыря // Клиническая онкология и гематология. 2001. Т. 1. № 3. С. 16-20.
34. Селиванов С.П., Прокопьев В.Е., Удут В.В., Исаева С.Н. Трансуретральная резекция по верхностного рака мочевого пузыря под контролем флуоресценции // Клиническая онкология и Гематология. 2001. Т. 1. № 1. С. 3-6.
35. Удут В.В., Прокопьев В.Е., Дирин В.Н. Акцепторный «аппарат» лазерный фотомодификации крови // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической фармакологии. Томск: Изд. ТГУ, 2001. С. 160-162.
36. Селиванов С.П., Прокопьев В.Е., Ялова М.Я., Исаева С.Н., Ковалик Т.А. Комплексное лечение поверхностного рака мочевого пузыря // Туберкулез и рак мочевой системы: вопросы дифференциальной диагностики и лечения. Материалы научно-технической конференции. Новосибирск, 2002. С. 30-38.
37. Prokop'ev V.E., Selivanov S.P. Spectroscopic criterion of diagnostics of malignant neoplasms of the mucous membrane of the bladder // Technical digest International Quantum Electronics Conference on Lasers, Applications, and Technologies. (IQEC/LAT 2002), Moscow, Russia, June 24-27. 2002. P. 180.
38. Prokop'ev V.E., Gerdt L.V., Selivanov S.P., Uдут V.V. Photodynamic effects of 5 - aminolevulinic acid porphyrin on human leukemic cells (K-562) // Technical digest IQEC/LAT 2002. Moscow, Russia, June 24-27. 2002. P. 181.
39. Prokop'ev V.E., Uдут V.V. Endogenic porphirin of plasmatic membranes of erythrocytes as primary acceptors of photons at an intravenous laser therapy // Technical digest IQEC/LAT 2002. Moscow, Russia, June 24-27. 2002. P. 157.
40. Удут В.В., Прокопьев В.Е. Микроспектральный анализ в изучении состояния периферической крови. Новые технологии в медицине // II Объединенная научная сессия СО РАН и СО РАМН. Новосибирск, 2002. С. 45.
41. Карпов А.Б., Наумов С.А., Прокопьев В.Е., Удут В.В. Методы внутрисосудистой лазерной терапии в лечении язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки // Методические рекомендации. Томск: НИИ онкологии ТНЦ РАМН, 1990. 4 с.
42. Бородулина Е.В., Кректуна А.В., Ратанова Н.Г., Прокопьев В.Е., Наумов С.А., Удут В.В. Сравнительные аспекты влияния низкоэнергетического электромагнитного излучения видимого диапазона на элементы крови // Тезисы докл. конференции «Лазерная и магнитная терапия в эксперименте и клинических исследованиях». Обнинск, 1993. Ч. 2. С. 130.
43. Prokop'ev V.E., Uдут V.V., Modyev V.P., Naymov S.A., Chicurov V.I., Fedorischev V.A., Stafeev S.A., Sakharov V.I. and Vovk S.M. Laser Spectrofluorimetric divide for clinical identification of malignances and their microscopic diagnosis // Proc. SPIE. 1992. V. 1972. P. 433-440.
44. Prokop'ev V.E., Uдут V.V., Naymov S.A. Spectra of laser fluorescence normal to malignantmucous membrane of the stomach // J. Russian Laser Research. 1994. V. 15. № 1. P. 90-100.
45. Uдут V.V., Prokop'ev V.E., Karpov A.B., Naumov S.A., Suslova T.E. Mechanisms and effects Low-energy He-Ne-laser radiation on circulating blood // J. de Physique IV. Colloque C7. Supplement au J. de Physique 111. 1991. V. 1. P. 257-260.

46. Prokop'ev V.E., Udut V.V., Selivanov S.P. Primary acceptors photons of intravenous of ulcer diseases stomach by radiation He-Ne laser // Abstracts the third International symposium "Modern problems of laser physics (MPLP). Akademgorodok, Novosibirsk, Russia, July 2-7 2000 P. 157.
47. Oferkin A.L., Prokop'ev V.E., Pokushalov E.A., Suchanov V.B. Influence of laser radiations on myocard // Abstracts the third International symposium "Modern problems of laser physics" (MPLP). Akademgorodok, Novosibirsk, Russia, July 2-7, 2000. P. 174.
48. Yeliseev A.A., Prokop'ev V.E., Udut V.V. Study on chances in spectral characteristics of blood and its components under He-Ne-laser radiations // Abstracts V International Conference "Atomic and molecular pulsed lasers". Tomsk, Russia, September 10-14, 2001. P. 87.
- J 49. Karpov A.B., Yalova M.F., Naumov S.A., Prokop'ev V.E., Udut V.V. Low - energy laser radiation in correction of immunometabolic and morphologic damages in patients with gastric precancer // Proc. of the International cancer congress. New Delhi (India), Oct. 30 - Nov. 5. 1994. P. 1633-1638.
50. Бородулина Е.В., Прокопьев В.Е., Наумов С.А., Удут В.В. Широкополосные источники электромагнитного излучения видимого диапазона в комплексной терапии язвенной болезни // Материалы юбилейной конф. НИИ фармакологии РАМН «Актуальные проблемы фармакологии и поиска новых лекарственных препаратов». Т. 7. Томск, 1994. С. 124-125. •> 51. Карпов А.Б., Савина Е.В., Сусллова Т.Е., Панкова О.В., Прокопьев В.Е., Каракешишо-ва М.Б., Коломиец Л.А., Удут В.В. Излучение He-Ne-лазера в лечении предопухолевых патологии желудка // Материалы юбилейной конф. НИИ фармакологии РАМН «Актуальные проблемы фармакологии и поиска новых лекарственных препаратов». Т. 7. Томск, 1994. С. 129-130.
52. Бородулина Е.В., Прокопьев В.Е., Наумов С.А., Удут В.В. Фотобиологические механизмы воздействия электромагнитного излучения красного диапазона и возможности использования в терапевтической практике // Материалы объединенного пленума патофизиологов и фармакологов Сибири и Дальнего Востока «Механизмы развития патологических процессов». Кемерово, 1994. С. 10-11.
53. Прокопьев В.Е., Селиванов С.П., Удут В.В., Ковалик Т.А. Флуоресцентный контроль во время трансуретральной резекции опухоли мочевого пузыря // Научно-практическая конференция урологов Сибири «Актуальные вопросы урологии». Томск, 1998. С. 50-51.
54. Прокопьев В.Е., Удут В.В., Борозновская Н.Н. Рентгенолюминесцентная диагностика состояния цельной крови // Межд. науч.-практич. конф. «Медицинские и экологические аспекты ионизирующей радиации»: Тез. докл. Томск, 2001. С. 125-126.
55. Удут В.В., Прокопьев В.Е. Биологические эффекты лазерного воздействия в диапазоне 280-1000 нм // Там же, с. 155-156.
- у 56. Карпов А.В., Наумов С.А., Савина Е.В., Прокопьев В.Е. Возможности лазерного излучения в коррекции предрака желудка // Материалы всесоюзной конференции «Актуальные вопросы совершенствования онкологического компонента диспансеризации». Томск, 1990. С. 60-61.
57. Prokop'ev V.E. The Role of spectroscopic characteristic of biological tissues in a laser therapy and diagnostics // Proc. SPIE, 1996. V. 2778. P. 1035.
- // 58. Удут В.В., Карпов А.Б., Прокопьев В.Е., Наумов С.А., Зырянов Б.Н. О механизмах внутрисосудистого лазерного облучения крови He-Ne-лазерным излучением // Бюллетень ТНЦ АМН СССР. 1990. Вып. 2. С. 65-78.
59. Селиванов С.П., Прокопьев В.Е., Исаева С.Н., Усынин Е.А., Удут В.В. Двухволновая лазерная терапия хронических простатитов и уретритов // Оптика атмосф. и океана. 1998. Т. 11. №2-3. С. 262-263.
60. Prokop'ev V.E., Selivanov S.P. Transurethral urine bladder diagnostics using spectrometric video-system // Abstracts X conference on laser Optics. St. Petersburg, Russia, June 26-30, 2000 P. 57.

61. Прокопьев В.Е. Роль полос поглощения воды в эволюции пигментного состава фотосинтезирующих и зрительных систем живых организмов // Тезисы докл. XII Международного симпозиума по распространению лазерного излучения в атмосфере и водных средах. Томск, 1993. С. 163.

Цитируемая литература

1. Мешалкин Е.Н., Сергиевский В.С. Применение прямого лазерного излучения в экспериментальной и клинической медицине // Новосибирск: Наука, 1981.
2. Действие низкоинтенсивного лазерного излучения на кровь // Тезисы Всесоюзной конференции 27-29 сентября, Киев, 1989.
3. Гамалея Н. Ф., Шишко Е.Д., Яниш Ю.В. Чувствительность неретинальных клеток животных и человека к видимому свету // Молекулярные механизмы биологического действия оптического излучения. М.: Наука, 1988. С. 189.
4. Девятков Н.Д., Зубкова С.М., Лапрун И.Б., Макеева Н.С. Физико-химические механизмы биологического действия лазерного излучения // Успехи совр. биол. 1987. Т. 103. № 1. С. 31^3.
5. Горбатенкова Е.А., Владимиров Ю.А., Парамонов Н.В., Азизова О.А. Красный свет гелий-неонового лазера реактивирует супероксиддисмутазу // Бюлл. эксп. биол. мед. 1989. Т. 57. №3. С. 302-305.
6. Жеманкулов М.С., Шабуневич Л.В., Басиладзе Л.И., Александрова Л.А. Фотореактивация церулоплазмينا как один из механизмов действия гелий-неонового лазера на кровь // Лазеры и медицина. М., 1989. С. 73-74.
7. Кару Т.И. Клеточные механизмы низкоинтенсивной лазерной терапии // Усп. совр. биол. 2001. Т. 121. № 1. С. 110-120.
8. Захаров С.Д., Иванов А.В. Светоокислородный эффект в клетках и перспективы его применения в теории опухолей // Квантовая электроника. 1999. 29. № 3. С. 192-214.
9. Владимиров Ю.А. Три гипотезы о механизме действия лазерного облучения на клетки и организм человека // Эфферентная медицина. М.: ИБМХ РАМН, 1994. С. 51-67.
10. Владимиров Ю.А. Лазерная терапия: настоящее и будущее // Сорос, образ, журн. 1999. № 2. С. 2-8.
11. Кару Т.И. Primary end secondary mechanism of action of visible and near infra red radiation on cells // J. Photochem. Photobiol. 1999. V. 2. N 1. P. 1-17.
12. Захаров С.Д., Еремеев Б.В., Перов С.Н., Панасенко М.А. Методы изучения и механизм действия излучения на эритроциты с участием кислорода // Методы лазерной биофизики и их применения в биологии и медицине / Под ред. О.К. Скобелкина. Тарту, 1989. С. 59-92.
13. Захаров С.Д., Скопинов С.А., Чудновский В.М. Первичные механизмы воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения в биологических системах: слабо поглощающие фотоакцепторы и структурное усиление локального фотовоздействия в биологических жидкостях // Лазеры и медицина. М., 1989. С. 81-82.
14. Механизмы биостимуляции низкоинтенсивного лазерного излучения // Под. ред. д.м.н. И.Г. Ляндрес. Минск, 1998. 116с.
15. Корякин А.В., Анисимовой И.Н. Флуоресценция легочной ткани в норме и при раке легкого // Биофизика. 1962. Т. VII. Вып. 2. С. 145-149.
16. Alfano R.R., Tata D.B., Cordero J.J., Tomashefsky P., Longo F.W. and Alfano M.A. Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissues // IEEE J. Quantum Electron QE-20. P. 1507-1511.
17. Jichlinski P., Forrer M., Mizere J. Clinical evaluation detecting superficial transition cell carcinoma of the bladder. Preliminary results // Laser in Surgery and Medicine. 1997. 20. P. 402-408.
18. Комолов В.Ф., Степанова Н.В., Черняева Е.Б., Чикишев А.Ю. Избирательное воздействие лазерного излучения на раковые клетки и лазерная спектроскопия клетки [обзор] // Квантовая электроника. 1985. Т. 12. № 10. С. 1997-2023.

19. *Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.* Arch. Biochem. Biophys. 1963. V. 100. N 1. P. 119-130.
20. *Murphy J.R.* III. Lab. Clin. Med. 1973. V. 82. P. 334-341.
21. *Красновский А.А.* Фотохимия хлорофилла и его аналогов // Элементарные фотопроцессы в молекулах. М.: Наука, 1966. С. 213.
22. *Чане Б.* Наблюдение быстрых метаболических сдвигов как подход к изучению химических механизмов регуляции обмена // Теоретическая и математическая биология. Под ред. Т.Г. Уотермэн и Г.Дж. Моровица. М.: Мир, 1968. С. 363.
23. *Нелинейные* и оптические свойства органических молекул и кристаллов // Под ред. Д. Шеплы, Ж. Зисса. М.: Мир. 1989.-С.528.
24. *Матвеев Б.П., Кудашев Б.В., Бухаркин Б.В., Романов В.А., Рубанов Ю.В.* Роль флуоресцентного контроля в повышении радикализма оперативного лечения поверхностного рака мочевого пузыря // Урология. 2000. № 3. С. 22-24.
25. *Лопаткин Н.А., Комолов А.А., Кудрявцев Ю.В., Токарев Ф.В.* Флуоресцентная диагностика рака мочевого пузыря // Урология. 2000. № 4. С. 3-6.

Печ. л. 2,6. Усл. печ. л. 2,47. Уч.-изд. л. 3,7.
Тираж 100 экз. Заказ № 37.

Тираж отпечатан в типографии
Издательства Института оптики атмосферы СО РАН