



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

Гусева И.А.^{1,2} • Куликова П.А.¹ • Быченков О.А.¹ • Рогаткин Д.А.¹ • Куликов Д.А.¹ • Чурсинова Ю.В.¹ • Бобров М.А.¹

Гусева Ирина Андреевна – техник лаборатории медико-физических исследований¹, аспирант факультета экспериментальной и теоретической физики²

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

Куликова Полина Александровна – клинический ординатор отделения терапевтической эндокринологии, лаборант по разделу «Наука» лаборатории медико-физических исследований¹

Быченков Олег Александрович – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., отделение радиологии¹

Рогаткин Дмитрий Алексеевич – д-р техн. наук, заведующий лабораторией медико-физических исследований¹

Куликов Дмитрий Александрович – канд. мед. наук, ученый секретарь¹

Чурсинова Юлия Владимировна – науч. сотр., отделение планирования и координации научных исследований; ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики факультета усовершенствования врачей¹

Бобров Максим Александрович – науч. сотр., патологоанатомическое отделение¹

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Материал и методы

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

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



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

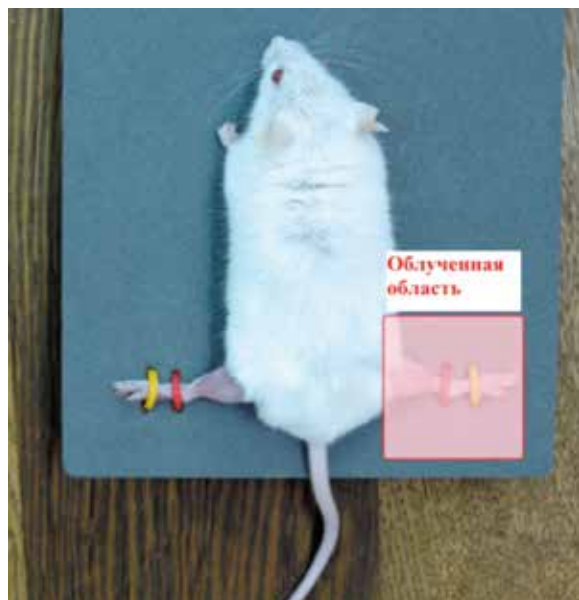


Рис. 2. Расположение облученной области

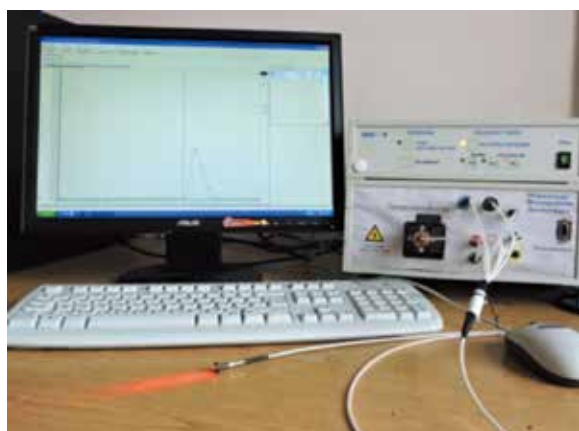


Рис. 3. Диагностический комплекс «ЛАКК-М»

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

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

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

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

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

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

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

Результаты и обсуждение

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

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

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

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

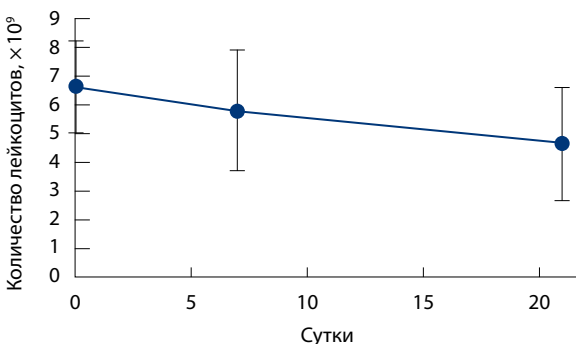


Рис. 5. Среднее количество лейкоцитов в клиническом анализе крови у экспериментальных животных

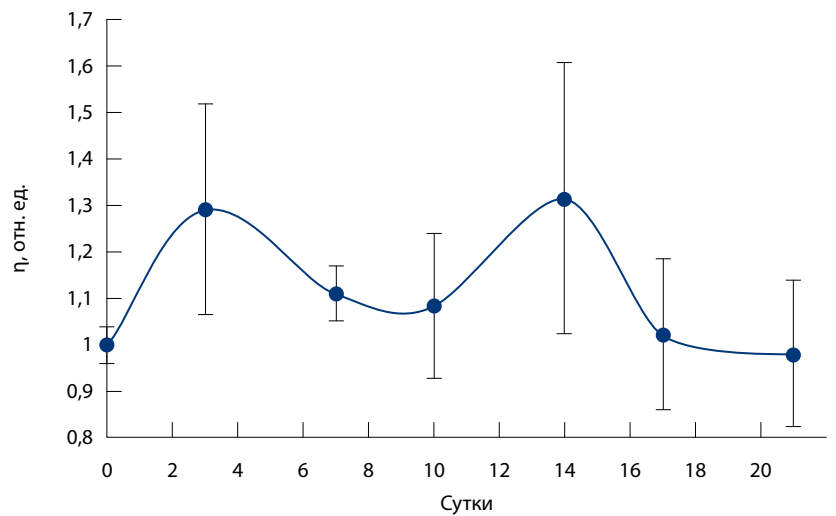


Рис. 4. Динамика индекса интенсивности воспаления

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

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

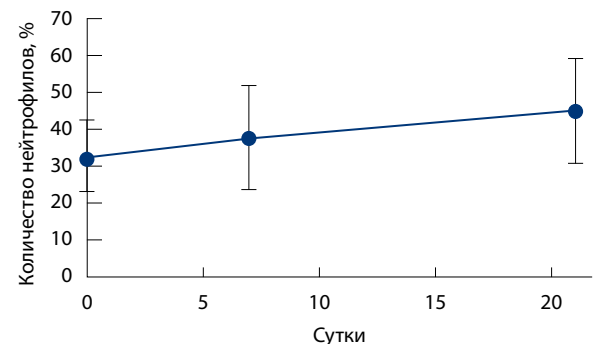


Рис. 6. Среднее процентное содержание нейтрофилов в клиническом анализе крови у экспериментальных животных

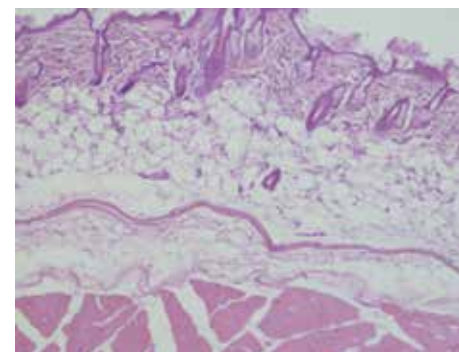
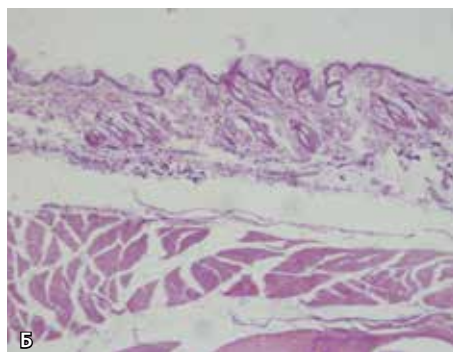
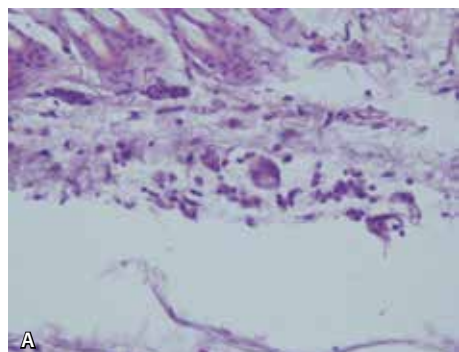


Рис. 7. Седьмой день после облучения. Мелкоочаговые лимфоплазмочитарные инфильтраты в коже. Окраска гематоксилином и эозином. **А** – $\times 400$, **Б** – $\times 100$

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

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

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

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

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

Заключение

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



Литература

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

References

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



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

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

Guseva I.A.^{1,2} • Kulikova P.A.¹ • Bychenkov O.A.¹ • Rogatkin D.A.¹ • Kulikov D.A.¹ • Chursinova Yu.V.¹ • Bobrov M.A.¹

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

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

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

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

Guseva Irina A. – Technician, Laboratory of Medical and Physics Research¹; PhD Student, Faculty of Experimental and Theoretical Physics²
 ✉ 61/2–9 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 681 89 84.
 E-mail: gusevairinaand@gmail.com

Kulikova Polina A. – Clinical Resident, Department of Medical Endocrinology; Research Assistant, Laboratory of Medical and Physics Research¹

Bychenkov Oleg A. – MD, PhD, Senior Research Fellow, Department of Radiology¹

Rogatkin Dmitry A. – PhD (in Engineering), Head of Laboratory of Medical and Physics Research¹

Kulikov Dmitry A. – MD, PhD, Scientific Secretary¹

Chursinova Yuliya V. – Research Fellow, Department of Planning and Coordination of Research; Assistant, Clinical Laboratory Diagnostics Department, Postgraduate Training Faculty¹

Bobrov Maksim A. – Research Fellow, Pathology-anatomy Department¹

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

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