

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

*На правах рукописи*



Ширяев Артем Анатольевич

**Методология фототераностики стенозирующего холангиоцеллюлярного рака**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

Диссертация  
на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Научные консультанты:  
доктор медицинских наук,  
профессор, академик РАН  
Решетов Игорь Владимирович  
доктор физико-математических наук, профессор  
Лощенов Виктор Борисович

Москва – 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	6
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	19
1.1. Современные подходы в диагностике и лечение нерезектабельного холангиоцеллюлярного рака.....	19
1.2. Диагностика холангиоцеллюлярного рака .....	21
1.2.1. Современные методы диагностики холангиоцеллюлярного рака.....	21
1.2.2. Сложности диагностики холангиоцеллюлярного рака.....	26
1.3. Лечение холангиоцеллюлярного рака .....	37
1.3.1. Способы желчеотведения при опухолевом стенозе желчных протоков ...	37
1.3.2. Методы лечения холангиоцеллюлярного рака.....	43
1.4. Фотодинамическая тераностика ... ..	52
1.4.1. Механизм противоопухолевого действия фотодинамической терапии.....	52
1.4.2. Экспериментальные модели для лечения холангиокарциномы <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> .....	56
1.4.3. Оптические свойства тканей в механизме фотодинамической тераностики .....	58
1.4.4. Фотодинамическая терапия билиарного стеноза .....	61
1.5. Выводы по анализу обзора литературы .....	65
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	70
2.1. Организация (дизайн) работы .....	70
2.2. Используемое оборудование и методики для проведения исследования....	70
2.2.1. Чрескожное чреспеченочное желчеотведение .....	72
2.2.2. Стентирование желчных протоков .....	79
2.2.3. Внутрипротоковая фототераностика .....	81
2.2.4. Морфологическое исследование и определение внутритканевого распределение фотосенсибилизатора .....	99

2.3.	Предклиническое исследование .....	102
2.3.1.	Создание моделей биологической ткани – биологических сред и in vitro исследование оптических свойств .....	102
2.3.2.	Исследование оптических свойств тканей на лабораторной модели.....	104
2.3.3.	Исследования на приматах .....	107
2.4.	Клиническое исследование .....	123
2.4.1.	Фототераностика при опухолях доступных локализаций (отработка методики) .....	125
2.4.2.	Дизайн клинического исследования фототераностики в минимально инвазивном лечении стенозирующего холангиоцеллюлярного рака (организация работы) .....	126
2.4.3.	Основные характеристики больных вошедших в исследование .....	128
2.4.4.	Инструментальные методы исследования .....	138
2.5.	Статистическая обработка результатов .....	141
	<b>ГЛАВА 3. ПРЕДКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	142
3.1.	Оценка оптимальных доз облучения по фотоблинингу фотосенсибилизатора, производного хлорина Е6, на модельных образцах – биологических средах .....	142
3.2.	Исследования обратного рассеяния лазерного излучения и аутофлуоресценции тканей на лабораторных моделях – гепатобилиарном комплексе кабана .....	147
3.2.1.	Спектральные исследования .....	147
3.2.2.	Исследования оптических свойств тканей с помощью видеосистемы.....	150
3.3.	Спектральные исследования по поиску эффективной глубины зондирования на лабораторных моделях – гепатобилиарном комплексе кабана .....	153
3.4.	Исследования накопления фотосенсибилизатора в тканях гепатобилиарной зоны у лабораторных животных .....	156
3.4.1.	Спектральные исследования динамики накопления фотосенсибилизатора в гепатобилиарном комплексе приматов .....	156

3.4.2. Оценка глубины зондирования лазерного излучения в печени приматов по спектрам обратного рассеяния в тканях, содержащих и не содержащих фотосенсибилизатор.....	158
3.5. Исследование на примате оценки безопасности применяемых и эффективных энергетических доз при фотодинамической терапии.....	163
3.5.1. Спектральные исследования .....	163
3.5.2. Морфологическое обоснование результатов фотодинамической терапии печени и желчных протоков приматов .....	164
3.6. Выводы .....	168
<b>ГЛАВА 4. ОБОСНОВАНИЕ МЕТОДОЛОГИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ ФОТОТЕРАНОСТИКИ .....</b>	<b>170</b>
4.1. Использование методов лазерной спектроскопии и видеофлуоресцентной диагностики до и после фотодинамической терапии при опухолях доступных локализаций (результат внедрения и клинической апробации методики).....	170
4.2. Желчеотведение у больных с опухолевой стриктурой желчных протоков .....	177
4.3. Внутрипротоковая фотодинамическая тераностика холангиоцеллюлярного рака .....	196
4.3.1 Оценка безопасности применения фотосенсибилизаторов при проведении фототераностики холангиоцеллюлярного рака.....	199
4.3.2. Внутрипротоковая флуоресцентная диагностика .....	201
4.3.2.1 Внутрипротоковая лазерная спектроскопия холангиоцеллюлярного рака .....	201
4.3.2.2. Внутрипротоковая видеофлуоресцентная диагностика .....	207
4.3.2.3. Сравнительные результаты внутрипротоковой лазерно-спектроскопической и видеофлуоресцентной диагностики .....	210
4.4. Эндопротоковая фотодинамическая терапия .....	218
4.4.1 Эндопротоковая фотодинамическая терапия для реканализации опухолевого стеноза .....	218



4.4.2. Стентирование желчных протоков и внутрипротоковая фотодинамическая терапия с целью антибластики .....	224
4.4.3 Обоснование применения фотобличинга для персонализированного контроля проведения фототераностики .....	229
4.5. Результаты применения фототераностики у больных нерезектабельным стенозирующим холангоцеллюлярным раком с использованием фотодинамической тераностики .....	233
<b>ГЛАВА 5. АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ</b> .....	<b>249</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	<b>284</b>
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	<b>289</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ</b> .....	<b>292</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ</b> .....	<b>294</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	<b>296</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования**

Рак желчных протоков (холангиоцеллюлярный рак – ХЦР) – относится к редко встречающимся новообразованиям, но характеризующимся тяжело протекающей клинической картиной [21, 22]. Злокачественное поражение желчных протоков относится к сложным локализациям, отчасти из-за этого нередкой является поздняя диагностика и, соответственно, снижается вероятность успешного радикального лечения [67, 321]. Именно поэтому ХЦР представляет одну из наиболее сложных проблем современной онкологии.

Радикальное хирургическое лечение является приоритетным, однако резектабельность опухоли невысока. По мнению разных авторов, она составляет от 10 до 40% [72, 133, 359]. Причиной этому является как распространенность процесса к моменту своего выявления, так и снижение функциональных резервов, делающие риск радикальных операций крайне высоким [370]. В случае успешного хирургического лечения пятилетняя выживаемость остается низкой, также высока частота послеоперационных рецидивов заболевания [32, 56, 147, 192, 259, 299, 337].

Первым симптомом заболевания, как правило, бывает механическая желтуха, из-за появления которой пациент обращается в стационар. Поэтому первые лечебные мероприятия направлены на декомпрессию желчных протоков [32, 65, 133, 382]. С учетом того, что чаще всего при развитии механической желтухи специалисты сталкиваются с нерезектабельной холангиокарциномой, в таких ситуациях на первый план выходит паллиативное лечение, заключающееся в налаживании желчеотведения [44, 270, 382].

Определить протяженность стриктуры и ее локализацию во время желчеотведения позволяет прямая холангиография [21, 22, 319]. Выяснить природу стеноза удастся не всегда, поскольку существуют трудности с биопсией непосредственно из желчных протоков либо взятый материал малоинформативен [52, 72, 113, 263, 347]. Нередко, диагноз приходится устанавливать на основании

клинико-инструментальных данных, а морфологическая верификация необходима при нерезектабельных опухолях или у неоперабельных больных [32, 84, 180, 367].

При нерезектабельном ХЦР продолжительность жизни редко превышает один год, и эти сроки уменьшаются при развитии механической желтухи [138, 284, 381].

Вышеизложенное свидетельствует об актуальности проблемы лечения нерезектабельного ХЦР, осложненного механической желтухой, и диктует необходимость поиска путей совершенствования хирургического и комбинированного лечения этого заболевания [209].

### **Степень научной разработанности проблемы**

В последние десятилетия очевидна тенденция развития минимально инвазивных лечебно-диагностических технологий, в том числе и в онкологии. Применительно к нерезектабельному ХЦР, осложненному механической желтухой, первостепенной задачей является снижение желчной гипертензии [39]. Достигается это различными вариантами желчеотведения – ретроградными и антеградными. Наиболее предпочтительным вариантом желчеотведения с точки зрения качества жизни пациента является стентирование желчных протоков [17, 19, 21, 98, 382]. Однако большой проблемой является прорастание опухолью непокрытого стента или распространение опухолевой инфильтрации за его границы. Это приводит к повторной механической желтухе [163, 188, 210, 386].

В подобной ситуации способы воздействия непосредственно на опухоль с целью стабилизации процесса или хотя бы замедления прогрессирования в настоящее время ограничены.

Для предотвращения прогрессирования заболевания применяются различные методики локального воздействия, в частности дистанционная и внутрипротоковая лучевая терапия, фотодинамическая терапия (ФДТ), методы термической абляции [28, 36, 191, 257, 370, 382]. При лучевой терапии, к сожалению, необходимость подведения больших доз излучения несет в себе

потенциальные риски развития осложнений и повреждений окружающих тканей и органов как во время лечения, так и в отдаленном периоде [193, 257, 328].

Методы локальной термической деструкции в комбинации с декомпрессией желчных протоков описаны в литературе, в небольших исследованиях. Отмечается улучшение результатов по сравнению с группами пациентов без локального противоопухолевого лечения, однако для того, чтобы оценить результаты и сравнить методики, необходимо проводить проспективные многоцентровые исследования [332, 370, 382].

В случае применения химиотерапии в качестве самостоятельного метода лечения ХЦР она малоэффективна, частичный эффект не превышает 20–30% [36, 72, 228, 267, 299, 357, 371]. Кроме того, желтуха, печеночная недостаточность, сопутствующий холангит затрудняют ее применение у такой категории больных.

Фотодинамическая терапия – известный локо-регионарный метод лечения злокачественных новообразований [61, 87, 116, 154, 159, 170, 364]. Основывается на способности злокачественной опухоли специфически накапливать фотоактивное вещество (фотосенсибилизатор), которое разрушает опухоль под воздействием подходящего лазерного света [2, 87, 170]. Это комбинированный способ, включающий флуоресцентную диагностику (ФД) и фотодинамическую терапию (ФДТ). Одним из решений вопроса локальной диагностики и лечения злокачественных заболеваний является использование фотодинамической тераностики [54].

Успешные результаты применения ФДТ в комбинации с декомпрессией желчных протоков продемонстрировали исследователи как в нашей стране, так и за рубежом [13, 14, 212, 224, 253, 277]. Несмотря на то, что фотодинамическая терапия ХЦР применяется в клинической практике уже более 30 лет [36, 245], в литературе нет описания методик внутрипротоковой диагностики с возможностью получать видеофлуоресцентное изображение и измерять индекс флуоресценции, символизирующий концентрацию фотосенсибилизатора в отличие от нормальных тканей. Практически все работы по применению ФДТ ХЦР проводились без флуоресцентного контроля, и дозы облучения подбирались

эмпирически или на основании лабораторных исследований [38, 115, 353]. Практическое значение имеет измерение распространения лазерного излучения в тканях на расстоянии, при котором наблюдается возбуждаемая эндогенная флуоресценция тканей (глубина зондирования) во внутри- и внепеченочных желчных протоках, для оптимизации ФД и ФДТ этой локализации с использованием оборудования отечественного производства.

Несмотря на то, что в периодической печати есть данные о многоцентровых исследованиях, все они включают в основном описания клинических наблюдений и результатов лечения больных нерезектабельным ХЦР, в том числе комбинированные методы: стентирование желчных протоков и ФДТ. Однако эти сообщения не содержат каких-либо научных обобщений и критических замечаний по применяемым дозам лазерного излучения. До конца неясна возможная глубина распространения лазерного излучения при нахождении оптического волокна непосредственно в просвете желчного протока, отсутствует методология персонализированного контроля за проводимой ФДТ. Сообщений о проведении внутрипротоковой фототераностики с видеофлуоресцентным контролем злокачественного поражения желчных протоков в литературных источниках не найдено.

Безусловно, минимально инвазивные технологии не способны решить все проблемы лечения больных ХЦР, осложненным механической желтухой, но могут существенно повысить качество жизни и ее продолжительность [38, 253].

Многолетний опыт Сеченовского университета, успешное применение методик фотодинамической тераностики при злокачественных опухолях более доступных локализаций, чем гепатобилиарная зона [57, 58, 129, 130, 143, 231, 232, 324], актуальность разработки комплекса лечебно-диагностических мероприятий, включающих минимально инвазивные технологии и противоопухолевое лечение при стенозирующем нерезектабельном холангиоцеллюлярном раке, осложненном механической желтухой, послужило основанием для выполнения настоящего исследования.

**Цель и задачи исследования:**

Целью настоящего исследования являлось улучшение результатов диагностики и лечения больных стенозирующим холангиоцеллюлярным раком методами фототераностики.

Для достижения поставленной цели определены следующие задачи:

1) Изучить основные проблемы в диагностике и лечении стенозирующего холангиоцеллюлярного рака и возможные пути решения.

2) Разработать на основании эксперимента новый метод фототераностики и определить оптимальные параметры дозы, времени и способ подведения световой энергии в гепатобилиарную область с целью диагностики и лечения стенозирующего холангиоцеллюлярного рака.

3) Апробировать новый метод фототераностики с использованием видеофлуоресцентного модуля УФФ-630/675-0–БИОСПЕК на опухолях визуально доступных локализаций, для ее унификации.

4) Применить новый метод внутрипротоковой видеофлуоресцентной диагностики у больных основной группы, провести сравнительную оценку его эффективности.

5) Оценить клиническую эффективность и безопасность методики эндопротезирования с внутрипротоковой фотодинамической тераностикой опухолевого стеноза желчных протоков, по сравнению с контрольной группой.

6) На основании полученных данных разработать методологический подход (алгоритм) комбинированного минимально инвазивного лечения нерезектабельного стенозирующего ХЦР, осложненного механической желтухой, включающего чрескожное желчеотведение под контролем УЗИ и рентгеноскопии с фотодинамической тераностикой.

**Научная новизна**

В представленной работе разработан комплексный подход к внутрипротоковому лечению нерезектабельного рака желчных протоков, осложненного механической желтухой, включающий в себя чрескожное

желчеотведение под контролем УЗИ и рентгеноскопии, внутрипротоковую эндовидеофлуоресцентную диагностику и ФДТ.

Впервые проведена оценка оптических свойств тканей желчных протоков *in vivo* в эксперименте на приматах вида *Papio Hamadryas* для дальнейшей оптимизации флуоресцентной диагностики и ФДТ холангиокарциномы у человека. Будут определена глубина зондирования лазерного излучения для улучшения результатов ФДТ, измерены величины обратного рассеивания лазерного излучения в тканях гепатобилиарной зоны для усовершенствования флуоресцентной диагностики.

Впервые в Российской Федерации разработан и внедрен способ эндовидеофлуоресцентной диагностики злокачественного поражения желчных протоков с использованием эндовидеофлуоресцентного модуля для эндоскопии и минимально инвазивной хирургии, позволяющий получить видеофлуоресцентное изображение опухоли желчных протоков. Также определена степень накопления фотосенсибилизатора в ней, что в ряде случаев является единственно возможным достоверным способом диагностики злокачественного поражения желчных протоков у неоперабельных больных.

Усовершенствованы минимально инвазивные технологии в лечении нерезектабельного ХЦР, осложненного механической желтухой, проводимые чрескожно под контролем УЗИ, рентгено- и эндоскопии, за счет применения внутрипротоковой фототераностики. Изучена целесообразность их комбинированного использования, эффективность, также проведен сравнительный анализ результатов лечения и качества жизни этой группы больных.

Доказано, что продолжительность жизни больных при использовании комбинированного минимально инвазивного метода лечения нерезектабельного ХЦР, включающего стентирование желчных протоков и ФДТ, достоверно выше, чем при билиарном стентировании как окончательном варианте лечения без ФДТ.

Таким образом, в настоящей работе сформировано и внедрено в клиническую практику новое направление в диагностике и лечении больных

нерезектабельным раком желчных протоков, осложнённым механической желтухой, основанное на применении современных медицинских и лазерных технологий с оптимальным их сочетанием.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Разработанный алгоритм для диагностики и лечения пациентов с нерезектабельным стенозирующим ХЦР, осложненным механической желтухой, или у функционально неоперабельных больных, позволяет эффективно применять внутрипротоковую видеофлуоресцентную диагностику для выявления злокачественного поражения протоков, с последующей локальной фотодинамической терапией опухолевой стриктуры и стентированием билиарного тракта как окончательного варианта чрескожного желчеотведения. Создана концепция использования оптических (в частности поглощающих, рассеивающих и флуоресцентных) свойств тканей с оценкой возможности применения отечественного видеофлуоресцентного модуля для эндоскопии и минимально инвазивной хирургии (УФФ-630/675-0 – БИОСПЕК) при фотодинамической тераностике злокачественных опухолей, а также персонализированного контроля проведения фотодинамической терапии с использованием эффекта снижения интенсивности флуоресценции ФС (фотобличинга) в зависимости от дозы облучения.

Даны и проведены обоснование, разработка и внедрение в клиническую практику метода диагностики злокачественного поражения с применением отечественного оборудования (модуля УФФ-630/675-0 – БИОСПЕК) для получения видеофлуоресцентного изображения опухоли, а также определения индекса флуоресценции, свидетельствующего о количестве (концентрации) фотосенсибилизатора в тканях.

Разработанные методологические аспекты при нерезектабельном стенозирующем ХЦР, осложненном механической желтухой, позволяют повысить информативность диагностики и качество лечения больных, повысить медиану выживания и длительность безжелтушного периода без снижения качества жизни.



Практическим значением данного диссертационного исследования является обоснование использования видеофлуоресцентного исследования опухолевого поражения желчных протоков, позволяющего одновременно получить флуоресцентную визуализацию и концентрацию фотосенсибилизатора до проведения фотодинамической терапии и после с целью контроля за необходимой (достаточной) дозой и временем лазерного облучения. Внедрение результатов работы в клиническую практику повышает эффективность билиарного стентирования как оптимального способа желчеотведения, увеличивая проходимость стента, обеспечивая более длительный безжелтушный период, что позволит пациентам дополнительно провести различные варианты системного противоопухолевого лечения.

Практическая значимость работы подтверждается патентами РФ:

- на изобретение «(19)RU(11)2767264(13)C1 Способ проведения внутрипротоковой фототераностики холангиоцеллюлярного рака от 24.06.2021»;
- на полезную модель RU203175U1 «Видеофлуоресцентное устройство для анализа внутритканевого распределения фотосенсибилизаторов дальнего красного и ближнего инфракрасного диапазонов злокачественных новообразований головы и шеи».

Подана заявка ((19)RU(11)2021127035(13)A)) на изобретение «Устройства для проведения фотодинамической терапии с возможностью одновременного спектрально-флуоресцентного контроля фотобличинга фотосенсибилизатора».

Материалы диссертации могут стать основой для подготовки аналитических сообщений, а также учебно-методических пособий, могут использоваться в учебном процессе по курсу обучения онкологии в медицинских вузах.

### **Методология и методы исследования**

Диссертационная работа включала проспективное многоцентровое рандомизированное контролируемое исследование с предклиникой.

## **Основные положения, выносимые на защиту**

1. В экспериментальном исследовании определены оптические свойства фантомов биологической ткани, тканей печени, внутри- и внепеченочных желчных протоков на биологической модели *in vitro*, а также приматов рода Павиан Гамадрил *statim post mortem* и интраоперационно *in vivo*, с измерением распространения лазерного излучения в тканях на расстоянии, при котором наблюдалась возбуждаемая эндогенная флуоресценция тканей (глубина зондирования), что позволило определить исходные параметры облучения различных тканей гепатобилиарной системы, а также установить порядок обработки спектральных и видеофлуоресцентных данных для избежания ошибок измерения с учетом особенностей оптических свойств тканей. Эти данные помогут оптимизировать алгоритмы локальной диагностики и лечения холангиоцеллюлярного рака человека и повысят качество диагностической информации, оптимизируют параметры лазерного излучения опираясь на динамику фотобличинга ФС.

2. Показано, что предложенная методика внутрипротоковой лазерной спектроскопии при стенозирующем ХЦР с использованием источника излучения терапевтическим лазером длиной волны 660 нм позволяет эффективно проводить на одном оборудовании флуоресцентную диагностику и фотодинамическую терапию, что значительно упрощает методологию. Впервые использованное в клинической практике внутрипротоковое видеофлуоресцентное исследование с использованием отечественного модуля для эндоскопии и минимально инвазивной хирургии (УФФ-630/675-0 – БИОСПЕК, Москва, Россия) позволяет получать видеофлуоресцентное изображение опухоли и оценивать индекс флуоресценции, свидетельствующей о накоплении фотосенсибилизатора в области стриктуры желчных протоков.

3. Исследованная прямая корреляция между двумя технически различными способами оценки концентрации фотосенсибилизатора: внутрипротоковой видеофлуоресцентной диагностикой злокачественного поражения желчных протоков с методикой лазерной спектроскопии

статистически достоверна ( $p < 0,05$ ). Зафиксировано, что разработанная методика внутрипротоковой видеофлуоресцентной диагностики не менее чем в 94 % случаев позволяет установить накопление фотосенсибилизатора в опухолевой стриктуре (чувствительность).

4. Продемонстрировано, что предложенный методологический подход при фотодинамической терапии с интраоперационной флуоресцентной навигацией (оценка фотобличинга) является эффективным и безопасным способом реканализации нерезектабельного стенозирующего ХЦР, позволившим у 100% пациентов основной группы получить реканализацию желчных протоков, увеличить медиану выживания, длительность безжелтушного периода, а также показатели качества жизни (ECOG и индекс Карновски) по сравнению с группой больных, где внутрипротоковая фотодинамическая тераностика не проводилась.

5. Разработан алгоритм, для диагностики и лечения пациентов с нерезектабельным стенозирующим ХЦР, осложненным механической желтухой, или функционально неоперабельных больных с данной патологией, при котором целесообразно применение внутрипротоковой видеофлуоресцентной диагностики, для выявления злокачественного поражения протоков, с последующей локальной фотодинамической терапией опухолевой стриктуры и стентированием желчных протоков, как окончательного варианта чрескожного желчеотведения.

#### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертационное исследование **«Методология фототераностики стенозирующего холангиоцеллюлярного рака»** соответствует формуле специальности 3.1.6. Онкология, Лучевая терапия и области исследования: п. 4 «Дальнейшее развитие оперативных приемов с использованием всех достижений анестезиологии, реаниматологии и хирургии».

### **Степень достоверности и апробация работы**

Проведение диссертационной работы одобрено локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) 22.06.2022 года выписка из протокола № 13-22.

Основные положения диссертационной работы обсуждены на XXI Международном конгрессе Ассоциации Гепатопанкреатобилиарных хирургов стран СНГ (Пермь, 9–12 сентября 2014); IV Всероссийской конференции «Актуальные вопросы фотодинамической терапии и фотодиагностики (25–26 сентября 2015, Санкт-Петербург); III съезде хирургов-гастроэнтерологов России и стран СНГ (ноябрь 2016, Геленджик); VI Всероссийской конференции «Фотодинамическая терапия и Фотодиагностика» (14–16 сентября 2017, Ростов-на-Дону); XXIV Международном Конгрессе ассоциации гепатопанкреатобилиарных хирургов стран СНГ «Актуальные проблемы гепатопанкреатобилиарной хирургии» (19–22 сентября 2017 года, Санкт-Петербург); Общероссийском хирургическом форуме с международным участием (3–6 апреля 2018, Москва); Втором международном форуме онкологии и радиологии (23–27 сентября 2019 года, Москва); IX Международном конгрессе Ассоциации директоров центров и институтов онкологии и рентгенорадиологии стран СНГ и Евразии «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (23–24 октября 2020 года (online)); X Международном Конгрессе «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (10–11 июня 2021 года (online)); Photodynamic Therapy and Photodiagnosis Update E-CONGRESS 2020 (5–6 ноября 2020, Мюнхен); ESSO 39 Congress (The European Society of Surgical Oncology) (9–10 октября, Роттердам); Международной научной конференции «Инновационные исследования в биологии и медицине» (25–27 ноября 2020 года, Сочи).

Апробация проведена 20 июня 2022 года на заседании кафедры (ПРОТОКОЛ № 6/22) онкологии, радиотерапии и реконструктивной хирургии Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО

«Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет).

### **Внедрение результатов работы**

Положения диссертационной работы используются в работе хирургических и онкологических отделений Университетской клинической больницы № 1 ФГАОУ ВО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова», ГБУ РД «Республиканская клиническая больница» г. Махачкала. Полученные в результате исследования данные используются в учебном процессе кафедры онкологии, радиотерапии и реконструктивной хирургии, а также факультетской хирургии № 1 Сеченовского университета, школах-семинарах образовательного проекта по фотодинамической терапии и фотодиагностики НИЯУ МИФИ совместно с Институтом общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук, МНИОИ им. П.А. Герцена (филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России) и Российской фотодинамической ассоциацией. Организовано участие в разработке образовательной программы повышения квалификации и учебно-методического комплекса по заданию Фонда инфраструктурных и образовательных программ – «Разработка образовательной программы повышения квалификации и учебно-методического комплекса в области флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии для лечения онкологических заболеваний», договор № 630 от 25.06.2014 г.

### **Публикации результатов исследования**

По теме диссертационного исследования опубликовано 26 работ, в том числе 7 научных статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых изданий Сеченовского Университета (Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук; 10 статей в изданиях, индексируемых

в международных базах Web of science, Scopus, PubMed, MathSciNet, zbMATH, Chemical Abstracts, Springer), 1 иные публикации по результатам исследования, 3 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций, 2 монографии, 3 патента.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 331 странице, состоит из введения, обзора литературы, характеристики клинических наблюдений и методов исследования, четырех глав, посвященных результатам собственных исследований, заключения (обсуждения полученных результатов), выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы, включающего 397 источников, в том числе 49 отечественных и 348 зарубежных. Работа иллюстрирована 23 таблицами и 143 рисунками, 3 формулами.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Современные подходы в диагностике и лечение нерезектабельного холангиоцеллюлярного рака

Опухоли желчевыводящей системы составляют примерно 3% от всех опухолей желудочно-кишечного тракта. Из их числа наиболее часто встречается воротная холангиокарцинома (опухоль Клатскина) – порядка 50%, остальное – это рак дистальных отделов билиарного тракта (40%) и внутripеченочная холангиокарцинома (10%) [5].

Последние десятилетия наметилась тенденция увеличения частоты холангиоцеллюлярного рака (ХЦР) во многих странах мира [15, 102, 187].

Главной причиной, вероятнее всего, служит увеличение в глобальном масштабе количества факторов риска, которые могут способствовать повышению частоты ХЦР [72, 102].

Вероятность более благоприятного исхода болезни значительно возрастает при своевременной диагностике и лечении на ранней стадии заболевания, но на практике чаще приходится сталкиваться с распространенным опухолевым процессом. Причиной является то, что ХЦР – опухоль, медленно растущая, но при этом инвазивный рост ограничивает возможности хирургического лечения, что влияет на прогноз [67, 304, 321].

Радикальное хирургическое лечение больных со злокачественным поражением желчных протоков является приоритетным, однако это возможно только у 20–30% больных [72, 133, 359]. Но, даже при успешном хирургическом лечении пятилетняя выживаемость низка (7–40%), а частота рецидивов опухоли после резекции по-прежнему высока [32, 56, 72, 147, 192, 259, 299, 337].

Без лечения большинство больных погибают в первый год после установления диагноза [138, 284, 381].

Основным и, как правило, первым клиническим симптомом холангиоцеллюлярного рака является механическая желтуха, которая и является

причиной обращения в стационар [65, 133, 382]. Но, несмотря на то, что это манифестный синдром, появление его чаще свидетельствует о распространенном процессе, когда радикальное оперативное лечение маловероятно [142, 354].

На этапе решения первостепенных задач – устранения желчной гипертензии и налаживания адекватного желчеотведения – встает вопрос о характере механической желтухи (опухолевая или нет).

Несмотря на развитие различных инструментальных диагностических методов (УЗИ, МРТ с МР-холангиографией, МСКТ), в настоящее время по-прежнему остаются вопросы к своевременной и топической диагностике при механической желтухе и выбору оптимальной лечебной тактики [17].

Протяженность стриктуры, характер блока контрастирования (полный, неполный) желчных протоков можно определить уже на стадии проведения желчеотведения [21, 22, 319]. Однако установить морфологическую природу поражения бывает трудно из-за сложности забора материала в желчных протоках и, нередко, малой его информативности [55, 72, 113, 263, 347].

В большинстве медицинских учреждений желчеотведение остается окончательным методом лечения, и после купирования явлений желтухи пациенты выписываются под наблюдение врачей по месту жительства либо с дренажом, либо с установленным стентом [44, 270, 382]. Также окончательно не решена основная задача – дальнейшее противоопухолевое лечение, так как опыт многих авторов показывает резистентность ХЦР к лучевой и химиотерапии, однако совершенствование этих методов позволяет надеяться на хорошие результаты [79, 84, 146, 162, 166, 180, 242, 325].

Говоря обо всех этих задачах, специалисты должны принимать во внимание и необходимость обеспечить наилучшее качество жизни больного. Чаще всего результаты лечения оцениваются измерением только продолжительности жизни, без оценки ее качества. А обеспечение оптимального качества жизни – также важная задача при выборе варианта паллиативного лечения [270, 382]. Анализ литературы показывает, что существуют определенные аспекты в диагностике и лечении больных нерезектабельным холангиоцеллюлярным раком, осложненным



механической желтухой, требующие улучшения результатов. Этого можно достигнуть по следующим направлениям:

1. Улучшение диагностики злокачественного поражения желчных протоков при развитии механической желтухи путем совершенствования имеющихся методик, а также разработки и внедрения новых методов.

2. Применение локальной деструкции рака желчных протоков с использованием фотоники в комбинации с минимально инвазивными желчеотводящими методиками.

3. Изучение оптических свойств тканей для повышения возможностей фотодинамической тераностики при злокачественном поражении.

3. Разработка персонализированного локального контроля фотодинамической терапии, для оценки оптимальных параметров лечения (световая доза, время облучения).

Огромное значение для улучшения результатов лечения имеет увеличение медианы выживания больных без снижения качества жизни. Важно не только сколько, но и как прожил больной подаренное ему время.

## **1.2. Диагностика холангиоцеллюлярного рака**

### **1.2.1. Современные методы диагностики холангиоцеллюлярного рака**

Как уже отмечалось, результаты лечения рака желчных протоков напрямую зависят от своевременной диагностики заболевания. К сожалению, у большинства первично выявленных больных заболевание диагностируют на III–IV стадиях, что ограничивает возможности хирургического лечения. Причин позднего выявления ХЦР несколько: отсутствие критериев формирования групп риска среди населения, отсутствие патогномичных симптомов на ранних стадиях болезни и, соответственно, несвоевременное обращение за медицинской помощью, недостаточно хорошая техническая оснащенность медицинских учреждений на

всей территории страны, сложности в морфологической верификации и интерпретации инструментальных данных.

На ранних стадиях ХЦР обычно протекает бессимптомно. Выявление его на этой стадии является случайной находкой примерно в 20–25%, когда проводится обследование по поводу других заболеваний [65, 327]. Как уже указывалось выше, наиболее часто первым симптомом является механическая желтуха, но до ее появления могут беспокоить боли в животе, тошнота, слабость, снижение массы тела [65].

Определение этиологии стриктуры при механической желтухе часто требует сочетания нескольких диагностических методов, включая клиническую оценку, лабораторные данные, а также эндоскопическую и рентгенологическую визуализацию [367, 127].

Общепринятыми диагностическими методами выявления ХЦР являются УЗИ, МСКТ, магнитно-резонансная холангиография (МРХГ), ретроградная холангиопанкреатография (РХПГ) и чрескожная чреспечочная холангиография (ЧЧХ) [172, 348]. Достоинства этих методов неоспоримы и общеизвестны. Они играют существенную роль в диагностике, стадировании, а также в последующем наблюдении результатов лечения. Их диагностическая точность зависит от анатомической локализации опухолевого поражения и характера роста.

Ультразвуковое исследование гепатобилиарной зоны является наиболее доступным, в то же время информативным и безопасным методом диагностики обтурационного характера желтухи [348]. УЗИ позволяет выявить локализацию блока желчных протоков, что является предиктором дальнейших диагностических методов для установления причины механической желтухи [28, 42]. Основными признаками опухолей билиарного тракта являются расширение внутривнутрипеченочных желчных протоков выше места стриктуры и сужение протока в области новообразования [12]. Выявление этих признаков, особенно при обычном скрининговом обследовании, является важным поводом для применения других информативных методов исследования. В случае подозрения на неопластический процесс с дистальным уровнем блока целесообразным считается

проводить МСКТ с внутривенным контрастированием и эндоскопическое ультразвуковое исследование [12, 42]. Для диагностики проксимального блока желчных протоков выполняют МРТ с МРХГ для уточнения степени вовлечения внутрипеченочных желчных протоков, а также распространенности опухолевого процесса [42, 145, 178].

МСКТ с болюсным контрастированием предоставляет информацию относительно местного распространения ХЦР, инвазии в сосуды, вовлеченности лимфатических узлов, отдаленных метастазов [394]. При исследовании ХЦР представлен гиподенсными образованиями с накоплением контрастного препарата в обе фазы, артериальную и венозную, в отличие от гепатоцеллюлярного рака, с характерным уменьшением контрастирования в венозную фазу [68, 160, 303]. Мультипланарное изображение с 3D-реконструкцией позволяет эффективно совмещать все фазы контрастирования на одном единственном изображении и дает полную информацию об особенностях опухолевого поражения [48]. Точность МСКТ для диагностики ХЦР по разным данным составляет от 78 до 92% [125, 136, 272, 308, 317].

МРТ в сочетании с МРХГ позволяет получить и оценить трехмерную архитектуру билиарного тракта, определить локализацию патологического очага, наличие сосудистой инвазии, лимфаденопатию и отдаленные метастазы. Последние десятилетия многие исследователи для диагностики опухолевого поражения желчных протоков отдают предпочтение МРХГ, считая ее сопоставимой с инвазивными РХПГ и ЧЧХ [12, 42, 145]. Все же, не умаляя диагностические достоинства МРХГ, для морфологической верификации злокачественного поражения необходимо проводить инвазивные РХПГ или ЧЧХ [178].

Современные методы визуальной диагностики, такие как МРТ с гепатоспецифическим контрастным веществом (гадоксетовой кислотой), позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), показали хорошие результаты для оценки распространенности опухолевого процесса [185, 190, 201, 283]. Однако эти методы исследования применяются по показаниям, когда исследование может

существенно изменить тактику лечения, а препараты на основе гадооксетовой кислоты для диагностики опухолевого поражения печени не входят в перечень жизненно необходимых препаратов Российской Федерации [5, 16, 289].

Все же окончательным методом диагностики уровня билиарного блока при механической желтухе являются чрескожная или эндоскопическая холангиографии (ЧЧХ и РХПГ), которые проводят только во время декомпрессии желчных. Это инвазивные диагностические методы, позволяющие определить архитектуру желчных протоков, протяженность и локализацию стриктуры [51, 172].

Эти методы зависимы от технического оснащения и подготовки персонала, поэтому нередко вариант холангиографии во время декомпрессии желчных протоков применяется в соответствии с возможностями лечебного учреждения [21, 44, 208, 237]. Нельзя не отметить, что целесообразным считается использование ЧЧХ при проксимальном блоке желчных протоков, соответственно, при дистальном предпочтение следует отдавать РХПГ [22, 60, 151, 300]. Хотя бывают успешные случаи применения РХПГ при проксимальном блоке, а также ЧЧХ при дистальной стриктуре [31, 186]. Точность прямой холангиографии составляет примерно 95% [356]. Еще одним неоспоримым преимуществом методик является возможность проведения биопсии во время исследования [87, 305].

Но также эти методы не лишены недостатков, так как являются инвазивными и имеют риск развития осложнений: например, желчеистечение, холангит, панкреатит, кровотечение, сепсис [208].

Эндоскопическое УЗИ (ЭУЗИ) проводят во время эндоскопического исследования двенадцатиперстной кишки. ЭУЗИ выполняется с помощью высокочастотного ультразвукового датчика, помещенного в эндоскоп, что позволяет провести осмотр желчного пузыря и желчевыводящих протоков до бифуркации, сосудов и лимфатических узлов с высокой точностью. Показанием к проведению ЭУЗИ может быть диагностический поиск для определения природы

стриктуры желчных протоков у больных без определенного диагноза после неуспешного проведения УЗИ, МСКТ, МРТ и РХПГ с биопсией [12, 99].

Внутрипротоковое УЗИ – техника внутрипротоковой ультрасонографии с помощью высокочастотных ультразвуковых датчиков, помещенных в общий желчный проток через эндоскопический транспапиллярный доступ, обеспечивает изображение как желчных протоков, так и перидуктальных структур [338]. Признаками злокачественной стриктуры является инфильтрация стенок протока с неровными контурами [181]. Во время исследования возможно проведение внутрипротоковой биопсии после эндоскопической ретроградной холангиографии. В диагностически сложных случаях, когда при имеющейся стриктуре желчных протоков при МСКТ опухоль не обнаруживается, внутрипротоковое УЗИ позволяет увеличить диагностическую точность РХПГ с 58 до 90% [178, 183].

**Холангиоскопия.** Пероральная холангиоскопия и чрескожная чреспеченочная холангиоскопия были впервые разработаны в 1970-х годах, с тех пор постепенно происходили технические разработки и клиническое внедрение методик [271]. В настоящее время применяется способ оценки поражения желчных протоков при помощи системы прямой визуализации SpyGlass [286]. Данная методика продемонстрировала точность визуальной оценки 95,1% (при 100% чувствительности и 89,5% специфичности). В ряде случаев холангиоскопия с помощью SpyGlass позволила изменить стадию заболевания по классификации Bismuth-Corlette, определенную при предшествующих лучевых методах исследования. При использовании данного метода также возможно проводить внутрипротоковую биопсию патологического очага, однако точность биопсии SpyBite составила 80,5% (63,6% чувствительность и 100% специфичность) [271]. Безусловно, это перспективная методика, которая в будущем может позволить оптимизировать диагностику и результаты хирургического лечения.

Следует отметить, что до сих пор не существует идеального метода визуализации, при помощи которого возможно всесторонне оценить ХЦР. Каждый из методов в той или иной ситуации может иметь определенные

преимущества. В связи с этим оптимальным является мультимодальный подход и сочетание методов исследования, чтобы объединить их преимущества, обеспечить более точную информацию о распространенности опухолевого процесса [155, 203]. Инвазивные методы, такие как РХПГ, эндоскопическое УЗИ, ЧЧХ, могут быть выполнены в зависимости от клинической необходимости для оценки внутрипротокового поражения, протяженности стриктуры и морфологической верификации диагноза [172, 178].

Важно провести оценку всех диагностических методов посредством продолжающихся исследований и разработать диагностический алгоритм, который сочетает экономическую эффективность с диагностической точностью [376].

### **1.2.2. Сложности диагностики холангиоцеллюлярного рака**

Холангиокарцинома является гетерогенной опухолью с точки зрения этиологии, патогенеза, морфологических и молекулярно-генетических факторов. Все эти особенности, безусловно, влияют на тактику лечения больного [299, 305].

ХЦР чаще всего представлен холангиокарциномой, хотя и описаны другие виды рака, встречающиеся реже (плоскоклеточный/аденосквамозно-клеточный рак, муцинозный/перстневидно-клеточный рак, светлоклеточный тип, недифференцированный тип, нейроэндокринная карцинома) [266]. Также (примерно 2–5% среди первичных злокачественных новообразований печени) встречается смешанная форма, включающая признаки гепатоцеллюлярного и холангиоцеллюлярного рака [86, 128].

Холангиокарцинома разделяется на внутривнутрипеченочную и внепеченочную: ХЦР ворот печени (опухоль Клатсткина) и дистальную карциному [42].

Внутрипеченочная холангиокарцинома представлена тремя формами роста: масс-образующий тип, перидуктальный и внутрипротоковый [71].

В случае выявления масс-образующего типа ХЦР, когда имеется достаточный объем ткани, с хорошей визуализацией при ультразвуковом

исследовании, для морфологического подтверждения заболевания возможно проведение чрескожной чреспеченочной пункционной биопсии. Для этого должен быть безопасный ЭХО-доступ к образованию, минуя протоковые структуры печени [25]. J.K. Heimbach и соавторы (2011) установили высокую частоту имплантационных метастазов после трансперитонеальной биопсии холангиокарциномы и рекомендовали ее выполнение только, если в дальнейшем планируется трансплантация печени [153].

При перидуктальном и внутривнутрипротоковом типах ХЦР проведение чрескожной чреспеченочной биопсии сопряжено с определенными трудностями, прежде всего с отсутствием безопасного ультразвукового доступа и риска повреждения элементов ворот печени, в связи с чем для верификации этих типов рака применяют способы диагностики под контролем эндоскопического исследования и/или рентгеноскопии [18, 25, 250].

Определение этиологии стриктуры часто требует сочетания нескольких диагностических методов, включая клиническую оценку, лабораторные данные, а также эндоскопическую и рентгенологическую визуализацию [127, 367]. Уровень сывороточных опухолевых маркеров, в частности СА-19.9 и РЭА (СЕА), часто оценивается в клинической практике при оценке билиарных стриктур, однако следует отметить, что повышение уровней этих маркеров бывает как при доброкачественных, так и злокачественных поражениях желчных протоков. Поэтому при оценке опухолевых маркеров необходимо учитывать возможность получения ложноположительного результата, и окончательная интерпретация потребует комбинации с другими диагностическими методами визуализации [349]. Морфологическая верификация стриктуры билиарного тракта имеет первостепенное значение [216]. Некоторые авторы считают, что морфологическая верификация необходима при нерезектабельных опухолях или у неоперабельных больных, а также предоперационно, при сомнительном диагнозе [32, 84, 180, 367].

Большинство причин стриктуры желчных протоков связано со злокачественной природой, однако некоторые доброкачественные заболевания, такие как первичный склерозирующий холангит или иммуноглобулин G4-

ассоциированный склерозирующий холангит, могут мимикрировать холангиокарциному, в связи с чем дифференциальный диагноз может вызывать сложности [6, 177, 235, 318].

Несмотря на сочетание вышеперечисленных методов диагностики стриктур желчевыводящих путей, диагностическая точность остается низкой. В результате около 20% билиарных стриктур остаются неverified, что может негативно повлиять на тактику лечения [235, 376]. Кроме того, важность высокой специфичности методов диагностики подтверждается данными о том, что у 15–24% пациентов с подозрением на злокачественную билиарную стриктуру, перенесших радикальное хирургическое лечение, при гистологическом исследовании выявлено доброкачественное поражение [103, 140, 219, 361].

Несмотря на то, что морфологическая верификация остается основным способом дифференциальной диагностики стриктур желчных протоков, существуют сложности для ее осуществления, главным образом – за счет недостаточного количества материала из протоков для цито- и гистологической оценки, а также сложности трактовки полученных биоптатов, особенно на фоне хронического воспаления. Поэтому оптимизация диагностических стратегий актуальна в настоящее время и требует разработки и внедрения новых диагностических способов [52, 113, 123, 263, 347].

Внутрипротоковая биопсия во время эндоскопических и/или чрескожных чреспеченочных процедур является наиболее распространенным методом постановки окончательного диагноза холангиокарциномы [85, 216]. Brush-биопсия, выполняемая с использованием эндоскопической щеточки, впервые описана в 1975 году, она по-прежнему является актуальным способом взятия проб тканей у пациентов с подозрением на стриктуры желчных протоков [279, 287]. В целом она безопасна, требует мало времени и технически проще по сравнению с биопсией щипцами [367]. В результате brush-биопсии полученный материал направляется на цитологическое исследование.

Чувствительность brush-цитологии для диагностики злокачественных стриктур желчевыводящих путей колеблется от 30% до 60% [167, 241, 236].



Другим способом внутрипротоковой биопсии является забор тканей при помощи эндоскопических щипцов. Этот метод позволяет получить материал не только для цитологического исследования, но и гистологического. Частота выявления злокачественной природы стриктуры при биопсии щипцами составляет от 43% до 81% [197, 293, 295]. В одном из исследований чувствительность транспапиллярной brush-биопсии при проксимальной стриктуре желчных протоков составила всего 41.4%, щипцовой биопсии – 53.4%, а комбинация этих методов повысила чувствительность только лишь до 60.3% [368].

В приведенном метаанализе указано, что чувствительность и специфичность диагностики злокачественных билиарных стриктур с помощью brush-цитологии составили 45% и 99% соответственно, а при помощи транспапиллярных щипцов для биопсии – 48,1% и 99,2% соответственно. Сочетание этих способов незначительно повышало чувствительность (59,4%) при специфичности 100% [269].

В своей работе Kayvan Mohkam совместно с соавторами (2017) сравнил эндоскопическую ультразвуковую тонкоигольную аспирацию и чрескожную чреспеченочную эндобилиарную щипцовую биопсию под контролем рентгеноскопии. Оба метода показали специфичность и положительную прогностическую ценность 100%, а также чувствительность (69% против 75%,  $p = 0,45$ ), отрицательную прогностическую ценность (58% против 38%,  $p = 0,15$ ) и точность (78% против 79%,  $p = 1,00$ ). По мнению авторов, при планируемом желчеотведении предпочтение следует отдавать чрескожной чреспеченочной биопсии под контролем рентгеноскопии [250]. Однако в литературе имеются указания о том, что при локализации опухоли в области ворот печени можно столкнуться с трудностями забора материала для морфологической верификации диагноза при внутрипротоковой биопсии [161, 174].

Для оптимизации диагностики злокачественного поражения желчных протоков в литературе описаны множество методик. Многочисленные исследования направлены на модификацию методик и новые конструкции

щеточки для brush-биопсии, например, использование эндоскопических щеточек с различным типом щетинок, расположенных под большим углом (большим, чем обычный угол 45 градусов). Однако это более дорогие щетки Infinity® (Infinity sampling device, US Endoscopy, Mentor, OH, USA) и Cytolong® (Cook Endoscopy, Winston-Salem, NC, USA), которые не продемонстрировали значимых улучшений и не получили широкого применения в клинической практике [73, 132, 198].

Изучалось использование нового устройства для внутрипротоковой биопсии, имеющего в своей конструкции металлические направляющие, которые позволяют зафиксировать инструмент в желчном протоке для соскоба материала, однако из-за небольшого клинического материала результаты оказались неубедительными [123, 264].

Как уже сообщалось выше, у некоторых пациентов получение цито- или гистологических образцов с помощью brush- или щипцовой биопсии сопряжено с техническими трудностями, связанными со сложной локализацией билиарной стриктуры. В этих случаях применяется внутрипротоковый аспирационный забор желчи для цитологического исследования. Это несложный способ изучения морфологии билиарных эпителиальных клеток [305, 350]. Аспирация желчи может быть выполнена во время РХПГ и ЧЧХ [50]. Недостатками этого метода, влияющими на результат морфологического исследования, являются малое количество клеточного материала, которое может быть связано с недостаточным объемом собранной желчи, или неверно выбранная внутрипротоковая локализация для сбора материала [107].

Seung June Lee и соавторы (2014) продемонстрировали увеличение точности диагностики холангиокарциномы за счет комбинированного метода внутрипротокового забора материала для морфологического исследования с поочередным использованием аспирации желчи, brush- и щипцовой биопсии, эта методика требует дальнейшего проспективного исследования [207].

Методика внутрипротоковой аспирационной тонкоигольной биопсии также описана в литературе. Выполняется с помощью эндоскопического билиарного катетера с выдвигной иглой, при помощи которой производится биопсия под

рентгеноскопическим контролем [158, 316]. Этот метод рутинно не применяется в клинической практике, так как не доказаны его преимущества для цитологического исследования [123].

Для эндоскопической внутрипротоковой биопсии Y. Yamashita и соавторы (2016) оптимизировали возможность транспапиллярного забора материала за счет использования щипцов, которые имели функцию поворота и изменения угла рабочей части, что уменьшало трение в канале. Данный способ значительно улучшил получение образцов тканей для морфологического исследования (100% против 50% при обычной щипцовой биопсии). Однако исследование проведено на небольшом количестве пациентов и требует дальнейшего изучения [379].

Внедрение в клиническую практику метода холангиоскопии (Spyglass®) позволило проводить целенаправленную биопсию под визуальным контролем стриктуры, что обеспечило диагностическую точность brush- и щипцовой биопсии, по сравнению с забором материала при обычной РХПГ [117, 179]. Холангиоскопия и биопсия проводятся через тонкий эндоскоп, который через рабочий канал дуоденоскопа вводится в просвет желчного протока. Сообщается, что точность биопсии при холангиоскопии достигает до 80–90% [195, 271, 326]. В свою очередь, сочетание стандартных методов внутрипротоковой биопсии при холангиоскопии повысило чувствительность диагностики до 100%, при специфичности 87% [137, 199].

Несмотря на то, что внутрипротоковая эндоскопическая визуализация (Spyglass®) увеличила точность диагностики, следует отметить, что примерно в 15% случаев не удается провести холангиоскоп к стриктуре [176, 179]. Также представленные исследования включали небольшое количество материала для оценки клинических характеристик, тем не менее методика является перспективной для верификации характера стриктуры билиарного тракта, и, несмотря на то, что применение ее ограничивается только специализированными медицинскими центрами, возможно ее более широкое применение в ближайшие годы [123].

Новым методом дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных билиарных стриктур является конфокальная лазерная эндомикроскопия, которая обеспечивает оценку поражения слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта *in vivo* [175, 182, 329]. За счет поглощения лазерного света длиной волны 488 нм флуорофорами отраженная флуоресценция фиксируется оптическим зондом, что позволяет провести трехмерную реконструкцию ткани в реальном времени [320]. Этот метод продемонстрировал высокую чувствительность до 89–98% для выявления злокачественных стриктур, однако специфичность оказалась низкой (67%), в основном из-за ложноположительных результатов в случаях с доброкачественной воспалительной стриктурой [246, 329, 341]. Для более рутинного применения этого метода необходимо проведение проспективных исследований [123].

Относительно высокую точность диагностики при гилусной холангиокарциноме продемонстрировал способ биопсии при помощи катетер направленной биопсии TurboHawk при чрескожном чреспеченочном дренировании. Чувствительность метода составила 100%, специфичность метода – 89% [18, 42]. Данное устройство применяется для направленной катетерной артерэктомии с целью восстановления проходимости артерий нижних конечностей [388]. Методика позволяет получить столбик ткани из области билиарной стриктуры в достаточном для полноценного гистологического исследования количестве [315]. Для проведения биопсии этим способом необходимо зафиксировать TurboHawk за стенозом протока, после чего осуществляется медленное продвижение его вдоль стриктуры. Таким образом, при движении в обратном направлении совершается забор ткани. Прогностическая ценность метода составила 92% для воротной холангиокарциномы [18]. Таким образом, при помощи катетер-направленной биопсии TurboHawk возможно получить столбик ткани для морфологического исследования, однако для этого необходима проходимость стеноза либо его реканализация.

Нельзя не отметить, что помимо усовершенствования методик внутрипротоковой биопсии также внедряются новые способы морфологического анализа биоптатов.

Vaidehi Avadhani и соавторы (2017) описали цитологические признаки характерных для злокачественной стриктуры желчных протоков, при этом авторы отметили, что выявление трех и более признаков рака значительно повышает точность диагностики [69].

Одним из способов улучшить цитологическую диагностическую оценку для выявления злокачественных стриктур стало применение флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) [33]. Этот метод позволяет обнаружить полисомию хромосом 3, 7 и 17, а также делеции хромосомного локуса 9p21, генетические аномалии типичных для многих типов эпителиального рака, в том числе поражающих билиарный эпителий [52]. При применении этого метода для щеточной цитологии и образцов аспирата желчи у 131 пациента со стриктурами желчных протоков (включая 71 пациента с первичным склерозирующим холангитом) анализ FISH показал чувствительность 35% и специфичность 91%. После исключения пациентов с первичным склерозирующим холангитом чувствительность для выявления злокачественных новообразований с помощью FISH составила всего 16% [362]. Это указывает на то, что для более высокой чувствительности потребуется более широкая панель исследований, специфичных для билиарных новообразований. Однако не все злокачественные опухоли имеют анеуплоидию, в частности опухоли билиарного тракта с анеуплоидией составили примерно 80% [81].

В ряде работ оценены возможности молекулярно-генетических исследований для верификации злокачественного поражения желчных протоков.

Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) является широкодоступным методом для изучения специфической экспрессии белка в биоптатах. В нескольких исследованиях для верификации были оценены: инсулиноподобный фактор роста II мРНК-связывающий белок-3 (IMP3), Мас-2-связывающий белок (Мас-2BP), опухоль-ассоциированный белок p53, интерферон  $\alpha$ -индуцируемый

белок 27 (IFI27), урокиназный активатор плазминогена (uPA) и S100P. Чувствительность и специфичность методов ИГХ представлена в таблице 1 [152, 387].

Таблица 1.1 – Показатели чувствительности и специфичности иммуногистохимического исследования при холангиокарциноме

<b>Авторы</b>	<b>Белок</b>	<b>Количество образцов</b>	<b>Чувствительность %</b>	<b>Специфичность %</b>
Yeо и соавт. [383]	P53	139	65	93
Hart и соавт. [152]	IMP3	64	64	100
Chiang и соавт. [97]	IFI27	96	45	-
Riener и соавт. [302]	IMP3	113	47	100
Gibbs и соавт. [141]	uPA	11	73	-
Koopmann и соавт. [194]	MAC-2	36	94	-
Yu и соавт. [387]	Mesothelin	24	33	-
Ordonez и соавт. [275]	Mesothelin	19	37	-
Diamantis и соавт. [110]	P53	39	54	-

Продолжение Таблицы 1.1

Stewart и соавт. [336]	P53	66	46	98
Tascilar и соавт. [345]	P53	49	40	100
Ali и соавт. [59]	KOC S100P Mesothelin MUC1	99	67 81 55 33	99 100 98 86
Levy и соавт. [218]	S100P IMP3 VHL S100P+IMP3+ VHL	72	90 78 93 70	100 94 94 97
Ligato и соавт. [225]	KOC S100A4 KOC+S100A4	44	92 79 100	95 95 95

Как видно из результатов, иммуногистохимические опухолевые маркеры были исследованы с разной точностью. Изучение этих маркеров является перспективным методом, однако доступность его в настоящее время ограничена, поэтому он не рекомендуется для рутинного использования в клинической практике [123].

Современным методом верификации ХЦР является исследование мутации генов TP53, KRAS, ARID1A и IDH1 в биоптатах [83, 118, 366, 385]. Исследование мутаций генов в настоящее время используется и для лечения, в частности назначения таргетной терапии [200, 297, 396]. Выяснилось, что эти показатели

могут различаться для внутри- и внепеченочной холангиокарциномы. Так, мутации TP53 и KRAS чаще встречаются во внепеченочном ХЦР, чем при внутривпеченочном поражении (45% против 35%; 40% против 24% – соответственно). Кроме того, мутации в IDH1, ARID1A, BAP1, MCL1, NRAS и PBRM1 в основном выявляются при внутривпеченочном ХЦР, в то время как изменения ERBB2, SMAD4, FBXW7, BRAF и CDKN2A характерны для внепеченочной холангиокарциномы [100, 171, 296, 369].

Молекулярно-генетические исследования в настоящее время еще не оптимальны для ХЦР, но постоянно совершенствуются, становясь многообещающими и перспективными, однако они являются дорогостоящими и возможны для применения только в специализированных медицинских центрах [123].

ХЦР обычно выявляется на поздней стадии и имеет плохой прогноз. Основными методами внутривпеченочного забора материала остаются brush- и щипцовая биопсия, поскольку они являются наиболее доступными в медицинских учреждениях. Безусловно, анализ флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) или иммуногистохимическое исследование p53 повышают точность диагностики. Различные способы молекулярно-генетической диагностики могут помочь в верификации и своевременной диагностике ХЦР, однако они еще несовершенны и дорогостоящи.

Несмотря на активное развитие методов морфологической верификации, оборудования и методик при стриктурах желчевыводящих путей, диагностическая ценность остается недостаточно высокой. Основной причиной частоты ложноотрицательных результатов является недостаточное количество ткани при биопсии из-за технических проблем, включая сложную анатомическую локализацию и неудовлетворительную визуализацию [123, 293].

Кроме того, патологическая оценка затруднена, о чем свидетельствуют сообщения о значительных межсерверных разногласиях [287, 350]. В связи с этим необходимо внедрение новых способов диагностики злокачественного поражения желчных протоков.



### **1.3. Лечение холангиоцеллюлярного рака**

#### **1.3.1. Способы желчеотведения при опухолевом стенозе желчных протоков**

Эндоскопические ретроградные и чрескожные антеградные методы декомпрессии желчных протоков в настоящее время являются приоритетными при механической желтухе. Эти методы применяются в клинической практике уже несколько десятилетий и в настоящее время практически являются альтернативой наложению билиодигестивных анастомозов при механической желтухе [25, 70, 331].

Длительное время отсутствовал консенсус по поводу того, какой вариант желчеотведения предпочтительно применять при опухолевой стриктуре желчных протоков, а также сложности выбора варианта дренирования: дренаж или стент [21, 208].

В настоящее время основой для выбора варианта желчеотведения служит уровень стеноза билираного тракта. При дистальном поражении предпочтительнее эндоскопическое ретроградное желчеотведение, независимо от того, планируется ли хирургическое лечение или нет [42, 105, 126, 314]. Вариантами дренирования могут быть назобилиарное дренирование, установка пластикового или саморасширяющегося металлического стента [42, 208].

Назобилирное дренирование проводят как предоперационный вариант декомпрессии при резектабельных опухолях дистального отдела билиарного тракта, когда есть возможность зафиксировать кончик дренажа выше области стеноза желчных протоков [42, 174]. Как окончательный вариант желчеотведения этот способ применять нецелесообразно.

Чаще всего при препапиллярном уровне стеноза желчных протоков используют ретроградное стентирование пластиковыми или короткими нитиноловыми стентами [17, 44, 262]. В последние годы многие специалисты предпочитают отказаться от дренирования пластиковыми стентами для

предоперационного желчеотведения в пользу коротких нитиноловых саморасширяющихся стентов. Это связано с лучшей проходимостью последних, меньшей частотой повторных вмешательств и снижением количества послеоперационных осложнений [105, 314, 346].

Чрескожное чреспеченочное желчеотведение также применяется и при дистальных стриктурах. В условиях гипербилирубинемии, холангита, наличии дуоденальной непроходимости для предоперационной декомпрессии билиарного тракта предпочтительнее ЧЧХ, от траспапиллярных вмешательств целесообразно воздержаться [21, 42, 373]. Чрескожная наружная холангиостомия позволяет адекватно санировать желчные протоки, контролировать снижение желтухи [9, 25]. Также антеградное желчеотведение при дистальном билиарном стенозе применяется при неудачных попытках ретроградного дренирования [157].

При проксимальной билиарной стриктуре целесообразным считается чрескожное (антеградное) желчеотведение [339]. При этом варианте дренирования желчных протоков отмечено значительно меньше осложнений, таких как холангит и панкреатит [55, 229, 343].

При внутripеченочной холангиокарциноме или опухоли Клатскина для декомпрессии желчных протоков необходимо адекватное дренирование обеих долей печени, что не может обеспечить ретроградное желчеотведение [42, 151, 252].

Вариантами антеградного желчеотведения могут быть наружное и наружно-внутреннее.

При первом варианте дренаж фиксируется над стенозом, и отток практически всей желчи осуществляется наружу. Существенный недостаток наружного варианта дренирования – в постоянной потере желчи, приводящей к электролитным расстройствам, дегидратации и нарушению всасывания в ЖКТ [19, 42].

Первое сообщение об успешном наружно-внутреннем желчеотведении под рентгеноскопическим контролем появилось в 1974 году [251]. Этот вариант дренирования способствует уменьшению потери желчи за счет того, что

дистальный конец дренажа располагается ниже стриктуры, в просвете кишечника или в неизменной части общего желчного протока [42]. Этот метод является более удобным по сравнению с наружным желчеотведением, так как сохраняется постоянный доступ в протоки и не нарушается пассаж желчи в просвет двенадцатиперстной кишки [19, 76].

Недостатками наружно-внутренней холангиостомии являются отсутствие возможности адекватно контролировать объем выделяемой желчи, проводить полноценную санацию билиарного тракта, а также высокий риск контаминации желчных протоков при расположении кончика дренажа в просвете двенадцатиперстной кишки [4]. Кроме того, некоторые авторы сообщают о риске развития острого панкреатита за счет нарушения оттока панкреатического сока при транспапиллярном дренировании [19]. Принято считать, что при неизменном большом сосочке двенадцатиперстной кишки и нижней (БСДПК) трети общего желчного протока целесообразнее дистальный конец наружно-внутренней холангиостомы фиксировать супрапапиллярно. Это снижает риск травматизации БСДПК и является профилактикой холангита [22].

Японские специалисты выделяют недостатки ЧЧХ, связанные с возможными имплантационными метастазами по ходу дренажного канала и брюшине [378]. Данные других исследователей не подтверждают увеличение частоты имплантационных метастазов при воротной холангиокарциноме после ЧЧХ [374, 391, 391].

В опубликованном российском консенсусе по актуальным вопросам диагностики и лечения синдрома механической желтухи рекомендовано при высоком уровне билиарного блока для декомпрессии желчных протоков применять чрескожную холангиостомию [42].

Как выше указывалось, большинство случаев ХЦР в области ворот печени относятся к неоперабельным, поэтому для этой группы пациентов паллиативные вмешательства являются единственным и доступным в настоящее время методом лечения [91, 135, 384].

Для определения способа желчеотведения ориентируются на уровень и протяженность стеноза, имеющийся холангит, наличие атрофии долей печени, а также продолжительность жизни [109, 217].

По мнению многих авторов, стентирование целесообразно при предполагаемой продолжительности жизни пациента более трех месяцев [19, 208, 265]. По мнению Masafumi Chiba и соавторов (2020), использовать металлический стент при желтухе опухолевого генеза целесообразно, если предполагаемая медиана выживания составляет более одного месяца [98].

При нерезектабельных опухолях билиарной системы или у неоперабельных больных желчеотведение является окончательным вариантом восстановления пассажа желчи путем эндоскопического или чрескожного дренирования [42, 135, 384]. Оптимальным вариантом желчеотведения является стентирование [208, 333, 382, 384].

Принято считать, что при проксимальной стриктуре желчных протоков следует использовать тот способ билиарной декомпрессии, для которого имеются соответствующее оборудование и специалисты с опытом выполнения в конкретном лечебном учреждении, но при равных возможностях предпочтительнее чрескожный чреспеченочный доступ [21].

Существуют споры относительно использования одного или нескольких (односторонних или двусторонних), а также пластиковых или металлических стентов для оптимального способа желчеотведения [208].

Пластиковые стенты имеют некоторые преимущества: меньшую стоимость, технически более простую установку и удаление для замены при его окклюзии. Однако пластиковые стенты при проксимальных стриктурах имеют ограниченную проходимость. Окклюзия пластикового стента диаметром от двух до трех мм может наступать в сроки от 3–4 месяцев, приводя к рецидиву желтухи [17]. Кроме того, окклюзия стента часто приводит к холангиту. При проксимальном блоке бывает технически сложно установить два и более пластиковых стента, также имеется риск его миграции в дистальном направлении [184, 208, 239]. Эти недостатки нивелирует применение саморасширяющихся

металлических стентов, которые имеют больший диаметр до 10 мм. Срок функционирования саморасширяющихся металлических стентов может достигать 7–10 месяцев, а применение стентов с полимерным внутренним покрытием из полиуретана или силикона увеличивает срок службы до 12 месяцев [17].

Саморасширяющиеся металлические стенты выполнены чаще всего из титано-никелевого сплава (нитинола), имеют ячеистую структуру. После установки они самостоятельно принимают заданный диаметр, после раскрытия дилатируя структуру [119, 196, 330].

Как уже выше указано, покрытые стенты имеют больший период проходимости, нежели непокрытые, однако преимуществом непокрытого нитинолового стента является возможность избежать окклюзии сегментарных протоков при установке его в области конfluence и долевого протока за счет ячеистой структуры [17, 21, 64, 208, 314].

Кроме этого, с целью обеспечения адекватного дренирования обеих долей печени часто приходится устанавливать два стента – в каждый из долевого протока. В этом случае существуют варианты стентирования «бок в бок» когда стенты соединяются в области конfluence и далее параллельно располагаются в общем печеночном протоке. Другой способ – когда устанавливается один стент, а второй в области конfluence проводят через ячейку первого. Эти варианты применяются при поражении конfluence с переходом на долевого протока и осуществляются непокрытыми металлическими стентами [104, 206].

Основными причинами окклюзии непокрытых стентов являются рост опухоли, прорастание ею ячеек, а также развитие грануляционной ткани внутри стента [20, 215]. Ограничивающим фактором установки непокрытого металлического стента является сложность его удаления после установки. Как правило, удалить их можно только хирургическим путем [208]. Покрытые стенты, в случае установки их таким образом, что дистальный конец располагается в просвете двенадцатиперстной кишки, возможно удалить эндоскопическим способом [208].

Еще один недостаток металлического стента – это его большая стоимость по сравнению с пластиковыми стентами. Однако установка металлического стента обеспечивает более высокую проходимость по сравнению с пластиковыми, во многом за счет большего диаметра просвета, что в конечном итоге экономически более эффективно, поскольку пациентам необходимо меньшее количество повторных вмешательств [285, 298].

Согласно рекомендациям Азиатско-Тихоокеанского консенсуса 2013 года, для паллиативного лечения пациентам с поражением билиарного тракта по классификации Bismuth – Corlette II–IV типа с прогнозируемой выживаемостью более трех месяцев целесообразно применять металлические стенты как с точки зрения результатов, так и экономической эффективности [300].

Металлические стенты могут рассматриваться в качестве первоначального вмешательства у пациентов с нерезектабельными злокачественными опухолями билиарного тракта для обеспечения более длительного безжелтушного периода и возможности обеспечения адъювантной терапии [335].

Клинический успех всех процедур дренирования желчевыводящих путей при опухолевом стенозе билиарного тракта зависит от его локализации и протяженности.

При проксимальных и дистальных стриктурах выполнимы как ретроградные, так и антеградные варианты желчеотведения. Во многом эти способы зависят от возможностей и оснащенности лечебного учреждения, однако при равных составляющих при проксимальном блоке предпочтительнее чрескожные вмешательства, соответственно при дистальном – эндоскопические. Стентирование считается оптимальным вариантом желчеотведения. При прогнозируемой продолжительности жизни пациента более трех месяцев, а также для возможности осуществления адъювантного лечения целесообразна установка саморасширяющегося нитинолового стента.

### 1.3.2. Методы лечения холангиоцеллюлярного рака

В последние годы способы лечения холангиокарциномы становятся все более разнообразными, включая хирургические, химиолучевые, также иммунные и таргетные методы, включая их комбинации. Тем не менее окончательно проблема не решена, и ХЦР по-прежнему считается трудно поддающейся лечению опухолью [222].

Для холангиокарциномы радикальное хирургическое лечение считается единственным действительно эффективным методом лечения в случае, когда удастся достигнуть свободного от опухоли края резекции с сохранением достаточного объема неизменной части печени и ее функции. Медиана общей выживаемости после радикальной резекции составляет около 30 месяцев, а пятилетняя общая выживаемость после операции обычно составляет до 40%, но при успешно выполненной операции с отрицательными краями (резекция R0) и отсутствием пораженных лимфатических узлов возможно достичь показатели выживаемости до 63% [390]. В связи с этим многие центры для лучшего прогноза исхода заболевания используют расширенную резекцию с лимфаденэктомией [213]. Безусловно, радикальное хирургическое лечение должно проводиться только в тех случаях, когда имеются данные о потенциально резектабельной опухоли и функциональное состояние пациента позволяет провести операцию [124].

Следует отметить, что холангиокарцинома является противопоказанием для трансплантации печени, хотя в некоторых случаях явилась альтернативой хирургическому лечению [11]. Исследования показали, что при наличии холангиокарциномы размером менее 2–3 см и при отсутствии внутripеченочных или внепеченочных метастазов трансплантация позволяет получить показатели одно-, трех- и пятилетней выживаемости соответственно 93%, 84% и 65% [307, 313]. Результаты, опубликованные в 2016 году, также поддерживают трансплантацию печени при внутripеченочной холангиокарциноме на ранней стадии. По сравнению с другими методами лечения трансплантация печени

оказалась более эффективной, а пятилетняя выживаемость пациентов с ранней ИККА составила 82% [311].

Радикальная резекция при воротной холангиокарциноме является оптимальным вариантом лечения пациентов при отсутствии следующих критериев: поражения долевых протоков обеих долей печени, двустороннего или контралатерального вовлечения сосудов, наличия метастазов и фонового первичного склерозирующего холангита [304]. Основными принципами радикальной операции являются R0 резекция и регионарная лимфодиссекция, при необходимости с реконструкцией воротной вены и/или печеночной артерии, а также восстановление пассажа желчи при помощи вариантов билиодигестивного анастомоза [222]. Расширение объема операции с выполнением полисегментарной резекции, реконструкции сосудов и при необходимости гепатопанкреатодуоденальной резекции может стать альтернативой трансплантации и обеспечить хорошие результаты [260].

К.Л. Chen и соавторы (2018) в своей работе продемонстрировали результаты лечения 176 пациентов с распространенной воротной холангиокарциномой. Общая одно-, двух- и трехлетняя выживаемость всей когорты составила 53%, 24% и 13% соответственно. В группе радикального хирургического лечения через один, два и три года она была 65%, 38% и 38%, в группе паллиативной резекции – 63%, 30% и 20%. Соответственно, несмотря на небольшие отличия, можно сделать вывод, что хирургическое лечение по-прежнему является лучшим методом лечения воротной холангиокарциномы [93].

В целом большинство зарегистрированных трех- и пятилетних показателей выживаемости после резекции воротной холангиокарциномы составляют приблизительно 45% (от 35% до 60%) и 30% (от 15% до 40%) [101]. С учетом большой встречаемости позитивного (R1) края резекции при холангиокарциноме будущие исследования должны быть направлены на усовершенствование хирургической тактики, позволяющей увеличить частоту R0 резекции [72, 222, 261].



При резектабельной дистальной холангиокарциноме хирургическим вариантом обычно является панкреатикодуоденальная резекция с реконструкцией желчевыводящих [80]. Средняя медиана выживания по результатам клиники Мейо составила 22 месяца [306]. V. Sallinen и соавторы (2020) опубликовали результаты хирургического лечения резектабельного ХЦР с медианой выживания 40,4 месяца (95% ДИ: 19,1–61,7 месяца) [312]. В исследовании W.W. Zhou (2020) средняя медиана выживания у всех пациентов была 45,5 месяцев (95% ДИ 13,5–77,5 месяцев), а одно-, трех и пятилетняя после резекции составила 82,6%, 55,2% и 47,2% соответственно [395].

**Химиотерапия** играет определенную роль в стабилизации заболевания у неоперабельных пациентов. В то же время она также является одним из адъювантных методов лечения после хирургической операции. В настоящее время проводится большое количество клинических испытаний и разрабатываются различные комбинированные схемы лечения ХЦР. В соответствии с рекомендациями NCCN 2021 года, независимо от анатомического подтипа заболевания, резектабельности опухоли, комбинация гемцитабина и цисплатина остается режимом химиотерапии первой линии для пациентов с распространенным ХЦР [222]. Известны побочные свойства этой схемы, такие как дегидратация, диспепсические расстройства, в связи с чем, в 33 лечебных учреждениях Японии проведена III фаза клинического испытания, при которой сравнивали гемцитабин в сочетании с S-1 (производное фторпиримидина) и гемцитабин в сочетании с цисплатином. Исследование продемонстрировало, что гемцитабин в сочетании с S-1 не уступает гемцитабину в сочетании с цисплатином (средняя медиана выживания: 13,4 и 15,1 месяца соответственно) при лучшей переносимости лечения. В связи с этим гемцитабин в сочетании с S-1 можно рассматривать как новый стандарт химиотерапии первой линии для распространенного и рецидивирующего ХЦР [254, 380]. По результатам III фазы исследования для оценки комбинированной терапии гемцитабин + цисплатин + S-1 по сравнению с терапией гемцитабин + цисплатин, первая схема продемонстрировала лучшие результаты [380].

В рандомизированном контролируемом многоцентровом исследовании III фазы в 44 специализированных гепатопанкреатобилиарных центрах Великобритании оценена возможность применения капецитабина в адьювантном лечении больных ХЦР. Исследование включало 447 послеоперационных пациентов, рандомизированных в группу с приемом капецитабина (223 пациента) и группу наблюдения (224 пациента). Результаты исследования показали, что средняя медиана выживания в группе капецитабина составила 51,1 месяца (95% ДИ 34,6–59,1 месяца) и 36,4 месяца (95% ДИ 29,7–44,5 месяца) в группе наблюдения. Безрецидивная выживаемость составила в этих же группах 24,4 месяца (95% ДИ 18,6–35,9 месяца) и 17,5 месяца (95% ДИ 12,0–23,8 месяца). Основываясь на полученных данных, можем заключить, что применение капецитабина может способствовать повышению медианы выживания больных ХЦР [294].

Клиническое испытание II фазы альбумин-конъюгированного паклитаксела в сочетании с гемцитабином при прогрессирующем ХЦР продемонстрировало хорошие результаты и переносимость лечения, что может стать альтернативным выбором в клинической практике [310].

Остается пока окончательно нерешенным вопрос о схеме второй линии химиотерапии [357]. Цель исследования ABC-06 состояла в том, чтобы оценить эффективность химиотерапии по схеме FOLFOX (фолиновая кислота, фторурацил и оксалиплатин) для второй линии при распространенном раке желчевыводящих путей. Результаты улучшили среднюю общую выживаемость у пациентов с распространенным раком желчевыводящих путей после прогрессирования на цисплатине и гемцитабине с клинически значимым увеличением шестимесячной и 12-месячной общей выживаемости. Основываясь на этих результатах, авторы считают, что схема FOLFOX должна стать стандартной второй линией химиотерапии у этой когорты больных [202].

В обзоре пяти опубликованных рандомизированных клинических исследований, в которые включен 931 взрослый (от 18 до 83 лет), оценивали адьювантную химиотерапию. В четырех исследованиях сравнивалась

послеоперационная адъювантная химиотерапия (митомин-С и 5-фторурацил (5-ФУ); гемцитабин; гемцитабин плюс оксалиплатин; капецитабин) в сравнении с хирургическим лечением холангиокарциномы. В пятом исследовании сравнивалась послеоперационная адъювантная химиотерапия S-1 по сравнению с гемцитабином. Общие результаты продемонстрировали, что послеоперационная адъювантная химиотерапия может увеличить серьезные побочные эффекты по сравнению с группой без адъювантной химиотерапии. Авторы отмечают низкие достоверные данные в первых четырех исследованиях, отсюда отсутствует уверенность в эффективности адъювантной химиотерапии у этих больных. Ни в одном из включенных исследований у больных холангиокарциномой не сообщалось о качестве жизни, смертности от рака, времени до рецидива опухоли и несущественных побочных явлениях. В связи с этим существует необходимость в дальнейших рандомизированных клинических исследованиях, изучающих адъювантное химиотерапевтическое лечение у больных ХЦР [234].

Артериальная химиоэмболизация (АХЭ) является одним из вариантов лечения пациентов с нерезектабельной внутрипеченочной холангиокарциномой [232]. В исследовании, в которое включили 283 пациента с внутрипеченочной холангиокарциномой, после резекции R0 адъювантная АХЭ не только не улучшала общую выживаемость пациентов на I стадии (по TNM) ( $P = 0,508$ ), но и достоверно способствовала рецидиву ( $P = 0,006$ ). Только у пациентов на стадии (по TNM) II, III и IV АХЭ способствовала более длительной выживаемости, без изменения частоты рецидивов. Сообщается, что АХЭ может способствовать образованию локальных сосудистых факторов роста, что способствует метастазированию опухоли [221].

В клинической практике АХЭ для лечения внутрипеченочного ХЦР используют в комбинации с чрескожной термической абляцией. Возможность чрескожной термической абляции для достижения полной регрессии уменьшается по мере увеличения размера опухоли, в комбинации методы позволяют улучшить совокупные показатели [222]. Основными ограничениями чрескожной термической абляции являются высокая частота местных рецидивов, главным

образом при поражениях размером более трех см, и потенциальная неполная абляция поражения вблизи крупных сосудов ( $> 3$  мм в диаметре) [164, 358].

Изучаются также новые передовые технологии лучевой терапии ХЦР для улучшения результатов лечения и увеличения медианы выживания пациентов [309]. Е.Т. Shinohara и соавторы (2008) ретроспективно проанализировали результаты лечения 3839 пациентов с внутripеченочной холангиокарциномой. Пациентам проводили только хирургическое вмешательство (25%), только лучевую терапию (10%), хирургическое вмешательство и адъювантную лучевую терапию (7%), никакого лечения (58%). В результате общая медиана выживания составила 11 месяцев (95% доверительный интервал [ДИ], 9–13), 6 (95% ДИ, 5–6), 7 (95% ДИ, 6–8) и три месяца соответственно для операции и адъювантной лучевой терапии, только хирургия, только лучевая терапия и в группе без лечения.

Результаты исследования показывают, что хирургическое лечение и адъювантная лучевая терапия могут увеличить выживаемость пациентов по сравнению с лучевой терапией или просто хирургической операцией, хотя показатели излечения остаются низкими [322].

Обнадеживающие результаты демонстрирует стереотаксическая лучевая терапия (СТЛТ). А. Mahadevan и соавторы (2015) провели анализ эффективности СТЛТ для ХЦР и показали улучшение общей выживаемости пациентов, а также меньшую радиационную токсичность [238]. В результатах нескольких проспективных и ретроспективных исследованиях СТЛТ привела к локальному контролю от 65% до 100% пациентов с общей медианой выживания от 1 до 35,5 месяцев (15 месяцев) [134].

К.М. Leng и соавторы (2017) проанализировали общую выживаемость 1917 пациентов с воротной холангиокарциномой, получавших адъювантную лучевую терапию и хирургическое лечение. Общая выживаемость составила всего 23 месяца и 22 месяца ( $P=0,651$ ). Авторы сделали вывод, что адъювантная лучевая терапия не улучшает выживаемость пациентов [214].

У пациентов с механической желтухой после ее купирования для большей продолжительности проходимости стента применяется стентирование с паллиативной лучевой терапией и/или брахитерапией [257]. Внутрипротоковая брахитерапия может увеличить риск холангита, болевой синдром, дуоденит и кровотечение. Также наблюдались поздние осложнения, такие как стеноз или стриктура желчных протоков [257, 328]. Пациентам с билиарной обструкцией для последующего противоопухолевого лечения необходимо обеспечить максимально длительный безжелтушный период, а также повысить медиану выживания [209].

M.S. Koedijk и соавторы (2018) отметили, что СТЛТ не показала убедительных результатов при нерезектабельной воротной холангиокарциноме, однако комбинация химиотерапии со стереотаксической лучевой терапией продемонстрировала увеличение общей выживаемости до 33–35 месяцев [189].

В настоящее время, хотя и нет убедительных доказательств того, что лучевая терапия имеет значительные преимущества для больных ХЦР, ее применение у неоперабельных больных и послеоперационных пациентов возможно в комбинированной терапии [108, 222].

**Таргетная терапия** – это современный метод лечения опухоли на клеточном и молекулярном уровне, с минимальным воздействием на здоровую периопухолевую ткань. Исследования в этой области демонстрируют обнадеживающие результаты [222]. С развитием технологии секвенирования генов и открытием новых мишеней таргетная терапия становится актуальной в лечении ХЦР. Исследование молекулярного профиля опухоли у пациентов, которые подходят для участия в клинических испытаниях, может способствовать дополнительным перспективным вариантам лечения. Однако получение достаточного количества ткани для таких анализов может быть затруднено, что снижает возможности назначения этого лечения [357].

Как уже ранее сообщалось, с учетом медленного роста первым проявлением ХЦР бывает механическая желтуха, которая развивается из-за опухолевого стеноза билиарного тракта и, как правило, свидетельствует уже о запущенной стадии. Кроме того, пациенты с механической желтухой страдают множеством

нарушений гомеостаза и требуют интенсивной терапии [304]. С учетом того, что лучшим вариантом желчеотведения является стентирование металлическим стентом, многие исследователи констатировали необходимость проведения локальной деструкции опухоли, чтобы максимально увеличить проходимость стента, особенно при воротной холангиокарциноме, когда отсутствует возможность установки покрытого стента [382].

При радиочастотной абляции (РЧА) используют высокочастотный переменный ток для передачи тепловой энергии через иглы электродов к тканям. Возможно применение РЧА как внутрипротоково, так и чрескожно [191, 332]. А.А. Sofi и соавторы (2018) опубликовали метаанализ, включающий девять исследований с участием 505 пациентов. В результате у больных, получавших РЧА до имплантации билиарного стента, по сравнению с пациентами, не получавшими РЧА, средняя разница в проходимости стента составила 50,6 дней (95% доверительный интервал [ДИ], 32,83–68,48) в пользу РЧА. Также анализ выживаемости пациентов показал улучшение ее у этой группы, однако РЧА сопровождался высоким риском послеоперационного болевого синдрома (31% против 20%,  $P = 0.003$ ) [332]. А.Р. Kolarich и соавторы (2018) отметили, что улучшение результатов лечения больных ХЦР с применением РЧА следует ожидать только на I стадии заболевания [191].

Еще один способ локального лечения нерезектабельной холангиокарциномы – необратимое электропорационное лечение (НЭЛ). Это новая методика абляции опухоли за счет воздействия слабого тока высокого напряжения с целью повреждения клеток и стимулирование апоптоза [95, 382]. В исследовании Po-Chih Yang и соавторов (2021) на небольшом количестве пациентов продемонстрирована возможность интраоперационного использования НЭЛ, которое проводили после лапаротомии и итраоперационного УЗИ, при котором выявляли опухоль в области ворот печени, после чего устанавливали электроды. После проведения НЭЛ через культю пузырного протока устанавливали пластиковые эндоскопические стенты, которые заменяли через три месяца на саморасширяющиеся металлические при РХПГ. В течение 90 дней

после операции не было зарегистрировано случаев побочных явлений. Медиана выживаемости без прогрессирования составила 21,5 месяца, а медиана общей выживаемости – 27,9 месяца [382]. Е.К. Martin и соавторы (2018) осуществляли НЭЛ, в том числе через билиарный дренаж, после чего холангиостому удаляли, продолжая наблюдение за больными. Средний безжелтушный период после проведенного НЭЛ составил 122 дня, в конечном итоге всем пациентам потребовалось желчеотведение [243]. Это явный признак того, что одного НЭЛ недостаточно для поддержания долгосрочной билиарной проходимости при ХЦР, следует провести анализ причины повторной обструкции: вследствие рецидива опухоли или в результате воздействия НЭЛ [382].

В работе Lin Jia и соавторов (2021) оценена эффективность и безопасность применения билиарных стентов, снабженных радионуклидсодержащим сегментом, в сравнении с обычными стентами у пациентов с нерезектабельной воротной холангиокарциномой. Высокие технические и клинические показатели успеха наблюдались в обеих группах, что свидетельствует о том, что как обычные, так и радиоактивные стенты надежны и безопасны при оказании паллиативной помощи пациентам с неоперабельным ХЦР. Средняя продолжительность проходимости стента составила 165 дней (нормальная группа) и 226 дней (радиоактивная группа) ( $P < 0,001$ ). Медиана выживаемости составила 198 дней (нормальная группа) и 256 дней (радиоактивная группа) ( $P < 0,001$ ). Только у 15,4% пациентов наблюдались осложнения, связанные с холангитом и холециститом [227]. Авторы отмечают, что, несмотря на успешные результаты, размер выборки пациентов для этого исследования невелик, а в сочетании с ретроспективным характером клинического исследования он приводит к многочисленным искажениям в анализе данных. Однако стентирование с радионуклидсодержащим сегментом эффективно и безопасно для пациентов с неоперабельной холангиокарциномой и может продлить проходимость стента, но для окончательного подтверждения этих выводов необходимо провести дальнейшие проспективные многоцентровые клинические исследования [227]. Следует отметить, что применение радионуклидсодержащих стентов является

высокотехнологичной и дорогостоящей процедурой, требующей соблюдения условий радиационной безопасности в медицинском учреждении, что может ограничивать ее рутинное применение.

Больным с обтурационной желтухой и противопоказаниями к хирургическому лечению производят паллиативные вмешательства: дренирующие эндоскопические или чрескожные процедуры с установкой стентов. Однако эндопротезы не лишены недостатков, так как могут быстро обтурироваться опухолью, приводя к рецидиву желтухи. Средняя продолжительность жизни этих больных после паллиативных операций составляет от 4 до 12 месяцев. Дистанционная лучевая терапия и внутривенная брахитерапия сопряжены с техническими трудностями и недостаточной эффективностью. Химиотерапия в лечении данной патологии тоже пока еще не достигла желаемого уровня, несмотря на положительные первоначальные результаты [36, 72, 228, 267, 299, 357].

Данная ситуация заставила искать менее травматичные, но более эффективные методы лечения больных с механической желтухой, вызванной опухолевым стенозом билиарного тракта. Одним из таких способов стала фотодинамическая терапия [36].

## **1.4. Фотодинамическая тераностика**

### **1.4.1. Механизм противоопухолевого действия фотодинамической терапии**

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – это своего рода абляционная терапия. Принцип заключается в том, что фотосенсибилизатор (ФС), введенный в организм, может преимущественно накапливаться в опухолевых клетках. После того, как эти накопившие ФС опухолевые клетки облучаются лазерным светом определенной длиной волны, соответствующей выбранному фотосенсибилизатору, в тканях активируются фотохимические реакции, в результате которых образуются свободные радикалы, такие как синглетный



(активный) кислород, повреждающий опухолевые клетки, без повреждения соседних, здоровых клеток [1, 2, 87, 170].

Механизмы, которые обеспечивают избирательное распределение ФС в опухоли, по-прежнему остаются не до конца изученными. В литературе можно встретить предположения, что механизм проникновения фотосенсибилизатора в опухолевые клетки осуществляется диффузно и/или посредством фагоцитоза (рецепторно-опосредованного эндоцитоза). Также возможно участие рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), который обладает внутренней тирозинкиназной активностью [149, 173]. Одну из ведущих ролей в транспортировке фотосенсибилизатора ФС несут липопротеиды плазмы крови. Активно пролиферирующие клетки, такие как опухолевые и эндотелий сосудов, имеют большое число рецепторов к липопротеидам [1].

Нельзя не отметить, что различные ФС имеют свой преимущественный путь проникновения в опухолевых клетках [89]. Производные хлорина Е6 (фотолон, фоторан, радохлорин, фотодитазин) накапливаются преимущественно в митохондриях. Другой препарат этой группы (фоскан) накапливается в цитоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи [249]. Производные порфирина (фотогем и фотофрин) избирательно фиксируются как в белках и липопротеидах клеточных мембран, так и внутриклеточных органеллах, преимущественно митохондриях [273].

Как уже выше указывалось, при воздействии лазерным светом происходит поглощение фотонов атомами фотосенсибилизатора, что способствует переходу их в активное состояние. При этом часть полученной энергии теряется атомами ФС, сопровождаясь излучением света, т.е. флуоресценцией. Это механизм лег в основу флуоресцентной диагностики (ФД), которая применяется для локальной визуализации патологических очагов [1]. При более длительном воздействии лазерным светом активная молекула фотосенсибилизатора вступает в фотохимическую реакцию, образуя свободные радикалы, в частности синглетный кислород, которому приписывают основную роль в разрушении опухоли и питающих ее сосудов [148]. Этот процесс циклический и происходит до тех пор,

пока молекулы ФС не перестают активироваться под воздействием лазерного света (так называемый эффект выгорания – фотобличинг) [393].

Во время ФДТ в организме происходят как локальные, так и системные изменения, играющие важную противоопухолевую роль. На данный момент выделяют три основных противоопухолевых эффекта ФДТ: непосредственно прямое повреждение раковых клеток, нарушение целостности стромы питающих опухоль сосудов, активация аутоиммунного противоопухолевого действия [1, 256].

По какому типу будет происходить разрушение клеток при ФДТ (некроз или апоптоз), зависит от концентрации ФС и суммарной световой дозы облучения [274]. Под воздействием большой дозы облучения происходит некроз клеток, в результате чего нарушается целостность клеточной мембраны, содержимое некротизированных опухолевых клеток может передаваться на соседние клетки, что также провоцирует их гибель [106, 112, 154].

При небольших дозах лазерного облучения последствием ФДТ становится апоптоз клеток. В этом случае опухолевая клетка перестает функционировать, запускается эффект самоликвидации, без разрыва клеточной мембраны как при активации некроза [53].

Сосудистый противоопухолевый механизм при ФДТ осуществляется за счет нарушения кровоснабжения опухоли, путем повреждения эндотелия паталогических сосудов [90]. Помимо этого, происходит активация и агрегация тромбоцитов, что способствует тромбозу этих сосудов [92, 131].

При разрушении опухолевых клеток активируются регионарные и системные иммунные реакции. Происходит выделение цитокинов, факторов некроза опухоли [145]. В области ФДТ активируются лейкоциты, нейтрофилы и макрофаги. Макрофаги фагоцитируют поврежденные раковые клетки, а также способствуют передаче информации о белковой структуре опухоли CD4 Т-хелперам, которые распознаются CD8 Т-киллерами, в связи с чем иммунный механизм запускается не только в области ФДТ, но и в лимфатических узлах, что подтверждается результатами гистологического исследования биоптатов не

только опухоли, но лимфатических узлов [40, 63]. О возможности активации противоопухолевых системных иммунных реакций при локальном воздействии ФДТ сообщали разные исследователи [13, 255, 290].

Помимо противоопухолевого эффекта, в литературе описаны антибактериальный [88, 66] и антифибротический эффекты ФДТ. В частности, антифибролитический эффект осуществляется за счет ингибирования пролиферации и апоптоза активированных фибробластов [247, 365, 389]. В перитуморальной ткани ХЦР также находят опухоль-ассоциированные фибробласты (Cancer-associated fibroblasts (CAFs)), усиливают пролиферацию клеток и инвазивную способность холангиокарциномы непосредственно или путем влияния на активность других клеток в микроокружении опухоли. CAFs стимулируют опухоль-ассоциированный лимфангиогенез (лимфатические эндотелиальные клетки, поддерживают поляризацию опухоль-ассоциированных макрофагов активацию регуляторных Т-клеток, одновременно ослабляя активность CD8 Т-киллеров). CAFs индуцируют ремоделирование внеклеточного матрикса, делая его более жестким, снижая эластичность и повышая ригидность опухолевой стриктуры [72]. Осуществляя антифибротический эффект, ФДТ может способствовать, наоборот, снижению ригидности и повышению эластичности опухолевой билиарной стриктуры, способствуя пассажу желчи [38].

Следует отметить, что клинические исследования показали, что ФС также имеет способность накапливаться в здоровых клетках организма. Высокие концентрации ФС, возбужденного под воздействием света, в том числе солнечного, может вызывать побочную реакцию, такую как кожная фототоксичность, в связи с чем пациенты вынуждены соблюдать режим ограничения инсоляции до полного выведения ФС из организма, а неизмененные участки перитуморальной ткани следует закрывать непроницаемой для света материей во время ФДТ [29, 62].

### **1.4.2. Экспериментальные модели для лечения холангиокарциномы *in vitro* и *in vivo***

За последнее десятилетие был создан ряд моделей холангиокарциногенеза *in vitro* и *in vivo* для уточнения фенотипических, биохимических и биологических событий, происходящих при трансформации нормальных клеток в полностью злокачественные холангиоциты [72].

Клеточные линии *in vitro*, в основном полученные из образцов ХЦР человека, широко использовались в качестве инструмента для изучения этого заболевания [244, 360].

Клеточные линии демонстрируют различные преимущества по сравнению с животными моделями: они свободны от неопухолевых и некротических тканей, их рост может быть синхронизирован до необходимого количества клеток, определены пролиферация и апоптоз, молекулярная модификация [72]. Однако исследование в рамках *in vitro* делает клеточные линии более отличными от исходных опухолей. Кроме того, к этой системе также относятся важные недостатки; в частности, первичные культуры требуют много времени, а элиминация неопухолевых клеток может быть сложной. Кроме того, первичные культуры могут быть созданы только из хирургически резецированных образцов, ограничивая применимость к подгруппе пациентов с ХЦР, перенесших операцию. Кроме того, в клетках первичной культуры отсутствуют реальные межклеточные и клеточно-матричные взаимодействия [248].

Важным отличием моделей *in vivo* является то, что они позволяют изучать холангиокарциному, начиная с ранних предопухолевых до полностью прогрессирующих поражений. Это означает, что исследователи могут анализировать специфические молекулярные взаимодействия, происходящие на различных стадиях холангиокарциногенеза. Поскольку ХЦР человека может развиваться в различных условиях состояния ткани печени, были разработаны различные методы для имитации изменений печени, таких как изменения, вызванные у людей вирусным гепатитом, хроническим воспалением и холестазом, что еще больше увеличивает аналогию с ситуацией у человека. Кроме

того, модели *in vivo* позволяют в режиме реального времени контролировать развитие опухоли и ответ на терапию с использованием методов визуализации, таких как КТ и МРТ или других методов [72].

Исследования по изучению влияния ФДТ на опухолевые клетки *in vitro* продемонстрировали возможности их некроза и апоптоза в зависимости от концентрации ФС и суммарной дозы облучения [94, 363].

Исследование применения ФДТ в экспериментах *in vivo* заключалось в основном в имплантации ХЦР или аденокарциномы других локализаций животным [115, 230, 353].

Samuel Douillard и соавторы (2009) для исследований *in vivo* прививали мышам карциному легких человека линии A549 за 15 дней до внутривенной инъекции фотосенсибилизатора Radachlorin® в дозе 20 мг/кг. Флуоресценцию регистрировали через волоконно-оптический спектрофлуориметр и пиком на 666 нм для детектирования. Максимальная флуоресценция Radachlorin® в опухоли наблюдалась через два часа после инъекции ( $1412 \pm 313$  AU). ФДТ проводили облучением световой дозой  $200 \text{ Дж/см}^2$  ( $0,3 \text{ Вт/см}^2$ ), что позволило получить полный ответ трансплантированной опухоли, без рецидива в течение 15 дней. [115].

D.A. Tzerkovsky (2017) в своей работе изучал *in vivo* противоопухолевую эффективность многополевой интерстициальной фотодинамической терапии. 15 белым крысам подкожно имплантировали холангиоцеллюлярную карциному RS-1. Использовали ФС на основе хлорина Е6 в дозе 2.5 мг/кг внутривенно. ФДТ проводили через три часа, семью установленными оптическими диффузорами и диодным лазером с длиной волны  $660 \pm 5$  нм с суммарной световой дозой 150 и  $300 \text{ Дж/см}^2$ , с экспозицией 12 и 24 минуты. В результате получены некрозы опухолевых тканей, которые оценивали через 24 и 96 часов после лечения. Регрессия опухоли составляла  $83,78 \pm 4,25$  и 100% ( $p = 0,00074$ ) соответственно [353].

Таким образом, авторам удалось продемонстрировать эффективность фотодинамической терапии при лечении опухолей, в том числе и холангиокарциноме, на экспериментальных моделях.

### **1.4.3. Оптические свойства тканей в механизме фотодинамической тераностики**

Фотодинамическая тераностика – термин, включающий в себя флуоресцентную диагностику и фотодинамическую терапию [2]. Это диагностический и лечебный комплекс визуализации и терапии патологических очагов.

Флуоресцентная диагностика в клинической практике применяется при опухолях различной локализации [10, 34, 35, 43]. Оценка концентрации ФС в патологическом очаге напрямую влияет на эффективность терапии [54].

Широко используются различные методы интраоперационной флуоресцентной навигации с использованием в качестве опухолевого маркера протопорфирина IX (ПпIX) [292]. Повышенное накопление его в опухоли индуцировано введением 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК). Однако в клинической практике в большинстве случаев применение ПпIX ограничивается использованием диагностических видеосистем с низким спектральным разрешением, что позволяет фиксировать либо флуоресцентное излучение, либо отраженное.

Активно используются на настоящий момент видеофлуоресцентные системы Karl Storz и Carl Zeiss, рассчитанные на возбуждение флуоресценции нескольких ФС, но поочередно [78, 139]. Недостатком является отсутствие возможности определять их концентрацию (количественный анализ), ограничиваясь лишь качественным анализом, чего бывает недостаточно для маркировки границ опухолевого поражения [35].

С учетом этих недостатков для объективизации таких исследований начались разработки методов количественного анализа флуоресцентной визуализации [355].

Современные методы визуализации с субклеточным разрешением, основанные на применении микроструктурированных волокон, передающих излучение к ткани и фиксирующих флуоресцентное отображение на фотоприемник, например, конфокального микроскопа [114]. Однако у таких методик есть минус: они позволяют визуализировать проникновения на небольшой глубине и имеют ограниченную контрастность [27].

Следует отметить, что до сих пор в клинической практике имеются единичные исследования оптических мультимодальных методик, которые способны не только анализировать распределение в тканях экзогенной флуоресценции, но фиксировать и эндогенные флуорофоры [240, 334]. Сложности решения этой задачи заключаются в том, что для осуществления этого анализа требуется регистрировать изображения в нескольких спектральных диапазонах, характерных для исследуемых хромофоров [35].

Тем не менее в нашей стране начато создание видеофлуоресцентных систем, позволяющих интраоперационно проводить флуоресцентную диагностику.

Представленное оборудование позволяет проводить качественный анализ в зависимости от интенсивности флуоресцентного изображения [54, 281]. Единственный вопрос, который остался нерешенным, – это возможность количественного отображения концентрации ФС, так называемого индекса флуоресценции.

Решить указанные недостатки помогла видеофлуоресцентная система, позволяющая проводить как качественный, так и количественный анализ, с возможностью работы в спектральных диапазонах нескольких фотосенсибилизаторов, оценивая не только флуоресцентное картирование, но и индекс флуоресценции [2, 39, 58, 130, 232]. Авторы продемонстрировали успешные возможности данного оборудования для флуоресцентной диагностики и мониторинга ФДТ при опухолевом поражении различных локализаций (мочевой пузырь, желудок, органы головы и шеи). Методика видеофлуоресцентной диагностики осуществлялась во время рутинных

исследований: цистоскопия, эндоскопическое исследование желудка, ротоглотки и гортани.

По мнению В. Li (2016), в настоящий момент актуальна разработка методов интраоперационного контроля процесса терапии и дозиметрии при проведении ФДТ [220]. Контроль и оценка данных процессов осуществима мониторингом фотобличинга ФС во время ФДТ. Реализация возможна под контролем интенсивности флуоресцентного сигнала, зарегистрированного в исследуемой ткани с ФС [280, 375]. Так как фотодинамический эффект достигается за счет передачи энергии с ФС на кислород, переводя его в синглетную цитотоксическую форму, интраоперационный мониторинг фотобличинга ФС может давать количественную оценку продукции синглетного кислорода и, тем самым, позволяет контролировать процесс проводимой терапии [168].

В работе E. et al Belykh (2018) представлен количественный метод интраоперационной оценки фотобличинга 5-АЛК-индуцированного протопорфирина IX (ПпIX) [77]. В.W. Rogue в своей обзорной статье выявил положительную корреляцию между фотобличингом ФС и эффективностью проводимой ФДТ [291]. В другом научном труде было показано, что у пациентов с актиническим кератозом, болезнью Боуэна и базальноклеточной карциномой фотобличинг ФС порядка 50% вызывал частичный, а при 60% – полный положительный эффект после первой процедуры ФДТ [351]. Авторами было предложено использовать порог фотобличинга в 60% за оптимальный, так как при данном значении был продемонстрирован наибольший уровень значимости между числом полных и частичных опухолевых ответов на ФДТ ( $P < 0,01$  и  $P < 0,001$  для 50% и 60% фотобличинга, соответственно). Установлено, что у пациентов при фотобличинге ФС на уровне более 50% в 40 раз больше шансов достичь полной деструкции опухолевой ткани, чем у пациентов с фотобличингом менее 50% [352]. В свою очередь, уровень фотобличинга ФС в 60% и более также характеризовал высокую эффективность проводимой ФДТ у пациентов с дисплазией шейки матки и лейкоплакией вульвы [120, 143]. Ранее проведенные исследования [129] позволили доказать эффективность проводимой ФДТ



опухолей головы и шеи с внутривенным введением Себ путем оценки фотобличинга ФС (фотобличинг Себ приблизительно наблюдался на уровне 50%). Эффективность проводимой Себ-ФДТ у пациентов с дисплазией и раком шейки матки также оценивалась регистрацией фотобличинга ФС [57].

Таким образом, достижение фотобличинга порядка 60% при различных локализациях злокачественного процесса (кожные покровы, органы головы и шеи, шейка матки) позволяло получить регрессию опухоли и лечебный патоморфоз с хорошим клиническим эффектом, однако данное значение уровня фотобличинга, безусловно, зависит от объема опухоли, ее гетерогенности и особенностей кровотока, а также оптических свойств исследуемых тканей.

До начала данной работы мы не встретили в литературе исследований, посвященных количественному и качественному анализу флуоресценции при опухолевом стенозе билиарного тракта. В связи с активным применением ФДТ при опухолевом поражении желчных протоков у неоперабельных больных оценка уровня накопления ФС несет практическое значение. Необходимость решения данного вопроса также отражена у других исследователей [38].

#### **1.4.4. Фотодинамическая терапия билиарного стеноза**

ФДТ внесла существенный вклад в лечение онкологических больных, прежде всего за счет высокой избирательности, малой токсичности и низкого риска осложнений [61, 87, 116, 159, 170, 364].

Первое сообщение об использовании ФДТ при неоперабельном раке общего желчного протока относится к 1991 году [36, 245]. Через несколько лет только начали появляться немногочисленные сообщения о клинических наблюдениях по применению ФДТ рака желчевыводящих протоков [277, 278]

Первые рандомизированные исследования о применении ФДТ в лечении холангиоцеллюлярного рака начали появляться в начале этого века, которые продемонстрировали успешность данной методики [277, 397]. Авторы сообщали о существенном увеличении общей медианы выживания у больных, которым

проводили внутривидеотерапевтическую фотодинамическую терапию после билиарной декомпрессии, в сравнении с пациентами без ФДТ.

В настоящий момент во многих медицинских центрах нашей страны и мира для лечения нерезектабельного ХЦР в комбинации с декомпрессией желчных протоков используется ФДТ [36, 39, 211, 224, 253, 314, 392]. Данное комбинированное лечение входит в практические рекомендации по лекарственному лечению рака желчных протоков [5].

В результатах исследования М.Е. Ortner и соавторов (2003) медиана выживания у больных после проведения внутривидеотерапевтической фотодинамической терапии составила 493 дней (n=20), по сравнению с группой больных просто с билиарной декомпрессией – 98 дней (n=19) [277].

Т.У. Lee и соавторы (2012) опубликовали отчет о результатах лечения небольшой группы больных, которым проводили внутривидеотерапевтическую ФДТ в комбинации с декомпрессией желчных протоков с пациентами без фотодинамической терапии, результат составил  $356 \pm 213$  дней (n=18), против  $230 \pm 73$  дней (n=15) [212].

L. Zongyan и соавторы (2021) через 42 месяца наблюдения отметили, что медиана времени выживаемости была значительно больше в группе ФДТ + стентирование желчных протоков, чем в группе только со стентированием (14,2 против 9,8 месяцев,  $P = 0,003$ ). При этом отметили, что в первой группе медиана выживания была выше у шести пациентов с рецидивным ХЦР после хирургического лечения, чем у остальных 24 пациентов, которым не проводилось радикальное лечение (20,0 против 13,0 месяцев,  $P = 0,017$ ) [224].

Narsha Moole и соавторы (2017) опубликовали метаанализ, в который вошли 10 исследований (n=402), в которых сравнивали результаты стентирования с ФДТ при нерезектабельной холангиокарциноме с одной декомпрессией желчных протоков. Период выживаемости в группах стент+ФДТ и стент составил 413,04 дней (95% ДИ: 349,54–476,54) и 183,41 (95%ДИ: 136,81–230,02) соответственно. Изменение показателей индекса Карновски после вмешательства в тех же группах

составило +6,99 (95%ДИ: 4,15–9,82) и -3,93 (95%ДИ: -8,63–0,77) соответственно [253].

В работе S.P. Pereira и соавторов (2012) получена средняя медиана выживаемости у пациентов с ФДТ холангиокарциномы – 12 (1–84) месяцев. ФДТ в одном протоке проведена 50% больных, остальным билатерально, с последующей установкой стента. Пациенты были выписаны в среднем через 6 (диапазон 1–33) дней после лечения [288].

Б.И. Долгушин и соавторы (2016) сообщают, что при проведении периодических сеансов внутрипротоковой ФДТ через установленную чрескожную чреспеченочную холангиостому медиана выживаемости составила 16 месяцев (2–47 месяцев) от первого сеанса внутрипротоковой ФДТ [13].

В следующей работе также отражен успех многократной ФДТ при ХЦР. При среднем количестве процедур = 2,8 на пациента (диапазон 1–10), медиана = 2. Средняя общая выживаемость составила 588 дней во всей когорте при медиане равной 553 дня [156].

Помимо увеличения медианы выживания важным аспектом является обеспечение максимальной проходимости стента [243]. Многие авторы указывают довольно быструю обтурацию опухолью стента без противоопухолевого лечения [17, 96, 233].

К.Л. Lee и соавторы (2012) сообщали, что и проходимость стента у больных после ФДТ в сравнении с пациентами только со стентом составила  $244 \pm 66$  дней, против  $177 \pm 45$  дней [212].

Л.Р. Talreja и соавторы (2013) опубликовали результаты лечения пациентов, которым проводили комбинированное лечение: ФДТ с химиолучевой терапией и просто ФДТ. Средняя выживаемость всей когорты больных составила  $293 \pm 266$  дней (медиана – 190; диапазон от 25 до 1332). Не было отмечено различий во времени выживания между пациентами, получавшими только ФДТ, и пациентами, получавшими ФДТ в сочетании с химио- или лучевой терапией. Однако, несмотря на хорошие результаты по выживаемости больных, с ФДТ связано увеличение частоты послеоперационных осложнений, в основном

холангита (примерно 50% пациентов), потребовавшего санации билиарных протоков и стента. Высокая частота холангита после ФДТ, вероятно, связана с некротическими изменениями в области опухолевого стеноза, образующимися в результате терапии [340].

К ранним послеоперационным осложнениям после внутрипротоковой ФДТ относят холангит (до 36,5 %), также сообщают о возможности появления острого холецистита (~2 %), панкреатита (1,3 %), абсцессов печени (3,4 %), кровотечения (2,7 %), сепсиса (5,4 %). Кроме того, как ранее уже указывалось, пациентам следует соблюдать режим ограничения инсоляции, так как у больных, перенесших ФДТ по поводу ХЦР, фототоксическая реакция отмечалась до 11,1 % случаев. Среди всех осложнений причиной смерти (до 8,18% случаев) являлся холангиогенный сепсис [39].

Некоторые авторы считают, что само по себе стентирование или длительное дренирование имеют негативные моменты, связанные с возможной окклюзией стента и постоянной заменой холангиостомы, не говоря уже о дискомфорте и снижении качества жизни с дренажем [243, 382].

В ряде исследований ФДТ применялась как способ локальной противоопухолевой деструкции в монорежиме, так и в комбинации с другими методами. По мнению авторов, комбинация ФДТ с химиотерапией может повысить эффективность, продлить выживаемость и снизить смертность [282, 371]. Однако для того чтобы обеспечить соблюдение графика химиотерапии, сначала необходимо наладить длительную и эффективную декомпрессию желчевыводящих путей, устранить холангит, желательна не снижая качества жизни больного [96].

На сегодняшний день развитие и внедрение новых технологий в клинической практике позволили усовершенствовать методики билиарной декомпрессии, увеличить медиану выживания больных с обструктивной механической желтухой, вызванной опухолевым стенозом желчных протоков. Одним из таких методов является фотодинамическая тераностика, которая стала одним из этапов маршрутизации оказания медицинской помощи сложной когорте

пациентов, оказание помощи которым до недавнего времени было ограничено только лишь билиарной декомпрессией.

### **1.5. Выводы по анализу обзора литературы**

Анализ обзора литературы демонстрирует, что трудности диагностики и лечения холангиоцеллюлярного рака считаются актуальными и нуждаются в дальнейшей разработке и совершенствовании.

Суммируем наиболее значимые нюансы проблемы.

1. Первоначальным и, как правило, основным симптомом холангиоцеллюлярного рака является механическая желтуха, которая требует срочного проведения декомпрессии билиарного тракта. Выбор способа желчеотведения (антеградный или ретроградный) зависит от возможности лечебного учреждения, но с учетом локализации при дистальном блоке предпочтительнее ретроградное желчеотведение, при проксимальном – чрескожное [21, 42, 105, 126, 314]. Окончательным оптимальным вариантом декомпрессии желчных протоков считается стентирование саморасширяющимся нитиноловым стентом. Однако существует проблема довольно быстрой обтурации стента опухолью с развитием рецидива желтухи без проведения локального противоопухолевого лечения [208, 382]. Основные методы противоопухолевого лечения, такие как химио- и лучевая терапия, при ХЦР малоэффективны, имеют риски осложнений, и их место в комбинированном лечении этого заболевания только предстоит определить [72, 257, 328, 357]. Локальные термические методы воздействия внедряются в клиническую практику, подтверждение их эффективности требует проведения проспективных исследований [277].

2. Фотодинамическая тераностика – известный локо-регионарный метод лечения злокачественных новообразований [61, 87, 116, 154, 159, 170, 364]. Основывается на способности злокачественной опухоли специфически накапливать фотоактивное вещество (фотосенсибилизатор), который разрушает

опухоль под воздействием подходящего лазерного света [2, 87, 170]. Это комбинированный способ, включающий флуоресцентную диагностику (ФД) и фотодинамическую терапию (ФДТ). Для улучшения диагностики злокачественной природы билиарного стеноза, по аналогии с другими локализациями, большие перспективы и преимущества имеют флуоресцентные методы диагностики [10, 34, 35, 43]. Известно, что локализацию, протяженность стриктуры желчных протоков позволяют выявить лучевые методы исследования (МСКТ, МРТ с МР-холангиографией), непосредственно прямая холангиография при выполнении этапа желчеотведения. Но как подтвердить причину стеноза, а в случае подтверждения злокачественной природы, провести локальное противоопухолевое лечение? Во многих ситуациях остаются технические сложности с биопсией из-за трудной локализации, и нередко диагноз приходится устанавливать на основании клинико-инструментальных данных [52, 113, 263].

Одним из решений этого вопроса является использование фотодинамической терапистики [54].

3. Несмотря на то, что фотодинамическая терапия ХЦР применяется в клинической практике уже более 30 лет, в литературе нет описания методик внутрипротоковой диагностики с возможностью получать видеофлуоресцентное изображение и измерять индекс флуоресценции, символизирующий концентрацию фотосенсибилизатора в отличие от нормальных тканей. Практически все работы по применению ФДТ ХЦР проводились без флуоресцентного контроля, и дозы облучения подбирались эмпирически или на основании лабораторных исследований [38, 115, 353]. Для совершенствования флуоресцентной диагностики проводились исследования по оценке оптических свойств тканей (поглощение и рассеяние света) на различных локализациях в лабораторных условиях [115, 230, 353]. Практическое значение имеет измерение распространения лазерного излучения в тканях на расстоянии, при котором наблюдается возбуждаемая эндогенная флуоресценция тканей (глубина зондирования) во внутри- и внепеченочных желчных протоках для оптимизации ФД и ФДТ этой локализации, с использованием отечественного оборудования.

4. Для проведения флуоресцентной диагностики в клинической практике чаще всего используются фотосенсибилизаторы, производные протопорфирина IX, например, 5-АЛА [58, 77, 231, 292]. Под воздействием лазерного света с длиной волны  $630 \pm 5$  нм, участки опухоли, накопившие этот фотосенсибилизатор, флуоресцируют, позволяя исследователю оценить границы опухолевого поражения. Однако в клинической практике в большинстве случаев применение протопорфирина IX ограничивается использованием диагностических систем с низким спектральным разрешением, что позволяет фиксировать либо флуоресцентное излучение, либо отраженное [35]. Для проведения ФДТ использование данного ФС возможно только при поверхностных не инвазивных формах рака [24]. По этой причине применяют другие группы препаратов именно с лечебной целью (производные хлорина еб, фталоцианины), которые требуют дополнительного оборудования, в частности источники лазерного излучения с соответствующей им длиной волны (660 и 675 нм) [49, 324]. Использование любого ФС сопряжено с риском развития специфической фототоксической реакции, поэтому пациенты вынуждены соблюдать ограничение воздействия солнечного света и яркого дневного в течение трех-пяти дней при использовании хлориновых ФС и несколько недель при фталоцианинах [29, 62]. Сопоставив все ограничения (соблюдение светового режима, возможность использовать как для ФД, так и ФДТ, экономическая выгода ввиду применения одного оборудования для диагностики и лечения), мы считаем целесообразным оценить возможности применения производных хлорина еб для диагностики и лечения ХЦР.

5. В источниках литературы начали появляться первые данные о необходимости контроля ФДТ путем оценки снижения концентрации ФС, к сожалению, это единичные сообщения [10, 54]. Ни одно из существующих исследований не сопровождалось оценкой фотодинамической терапии путем фиксации эффекта снижения интенсивности флуоресценции ФС (фотобличинга) в зависимости от дозы облучения для персонализации ФДТ ХЦР в клинической практике.

6. Улучшению непосредственных результатов хирургического лечения нерезектабельного холангиоцеллюлярного рака, осложненного механической желтухой, может способствовать создание наиболее длительного периода билиарной декомпрессии для максимального времени безжелтушного периода, чтобы обеспечить возможность проведения адьювантного противоопухолевого лечения, которое ограничено проявлением высокой билирубинемии и другими, связанными с этим, функциональными нарушениями [209].

Таким образом, анализ литературы позволяет сделать вывод о том, что, несмотря на современное развитие высокотехнологичных и минимально инвазивных технологий, проблемы диагностики и лечения нерезектабельного стенозирующего ХЦР остаются до конца нерешенными.

Хирургическое лечение при опухолевой стриктуре билиарного тракта является оптимальным лечением, однако большинство пациентов, у которых развивается механическая желтуха, признаются неоперабельными [72, 133, 359]. В этом случае на первое место выходят паллиативные методы, которые заключаются в декомпрессии желчных протоков с локальным противоопухолевым воздействием [335]. Безусловно, для лечения ХЦР нужен системный подход, несмотря на то, что, по мнению некоторых авторов, химио- и лучевая терапия в настоящее время малоэффективны, ведутся разработки и исследования новых способов лучевого воздействия и лекарственных препаратов с обнадеживающими первичными результатами [72, 228, 267, 299].

Можно видеть, что внутрипротоковое применение ФДТ у пациентов с нерезектабельным ХЦР может облегчить клинические симптомы, уменьшить объем опухоли, задержать ее рост, улучшить качество жизни и продлить выживаемость пациентов [36, 222]. С учетом сложной локализации холангиокарциномы для инструментальных методов исследования, проблем морфологического подтверждения интересным является комбинированный способ внутрипротоковой диагностики с использованием видеофлуоресцентного оборудования, позволяющего получить как флуоресцентное изображение опухоли, так и определить концентрацию фотосенсибилизатора в тканях. Кроме



того, важным является персонализация фотодинамической тераностики путем интраоперационного контроля этапов диагностики и лечения.

Все эти аспекты послужили основанием для осуществления нашего исследования.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Организация (дизайн) работы

Общий дизайн проспективного многоцентрового рандомизированного контролируемого исследования с предклиникой (рисунок 2.1):

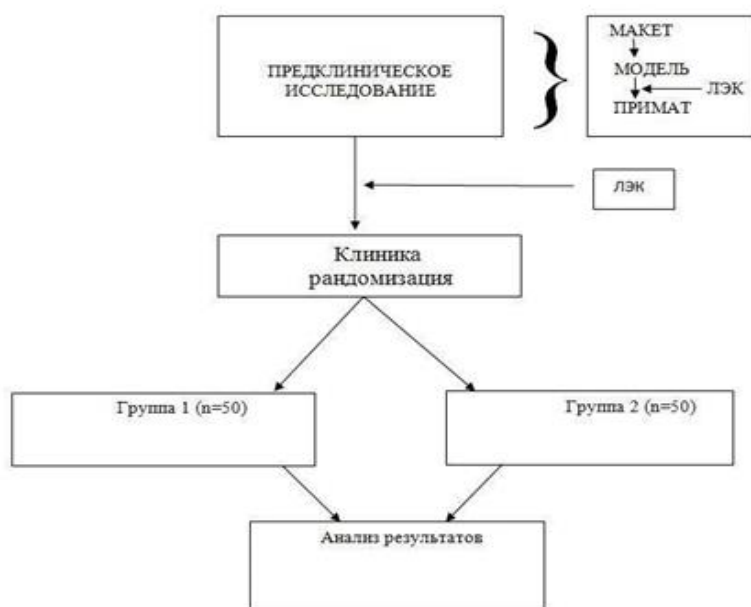


Рисунок 2.1 - Общий дизайн проспективного двухцентрового рандомизированного контролируемого исследования с предклиникой

### 2.2. Используемое оборудование и методики для проведения исследования

На Рисунке 2.2 представлены общий план и оснащение операционной, положение больного на операционном столе. За два часа до начала операции больному внутривенно-капельным методом вводили фотосенсибилизатор хлоринового ряда в дозе 1 мг/кг веса, разведенного в 150–200 мл физиологического раствора в течение 20–30 минут. После введения препарата ограничивали инсоляцию и яркое освещение, соблюдался «световой режим» для предотвращения фототоксической реакции. Операционное поле обрабатывалось согласно правилам асептики и антисептики, стандартно, с использованием стерильного белья.

Положение больного на спине, рентгеновская С-дуга устанавливалась стандартным способом, напротив хирурга размещалась видеофлуоресцентная система для диагностики.

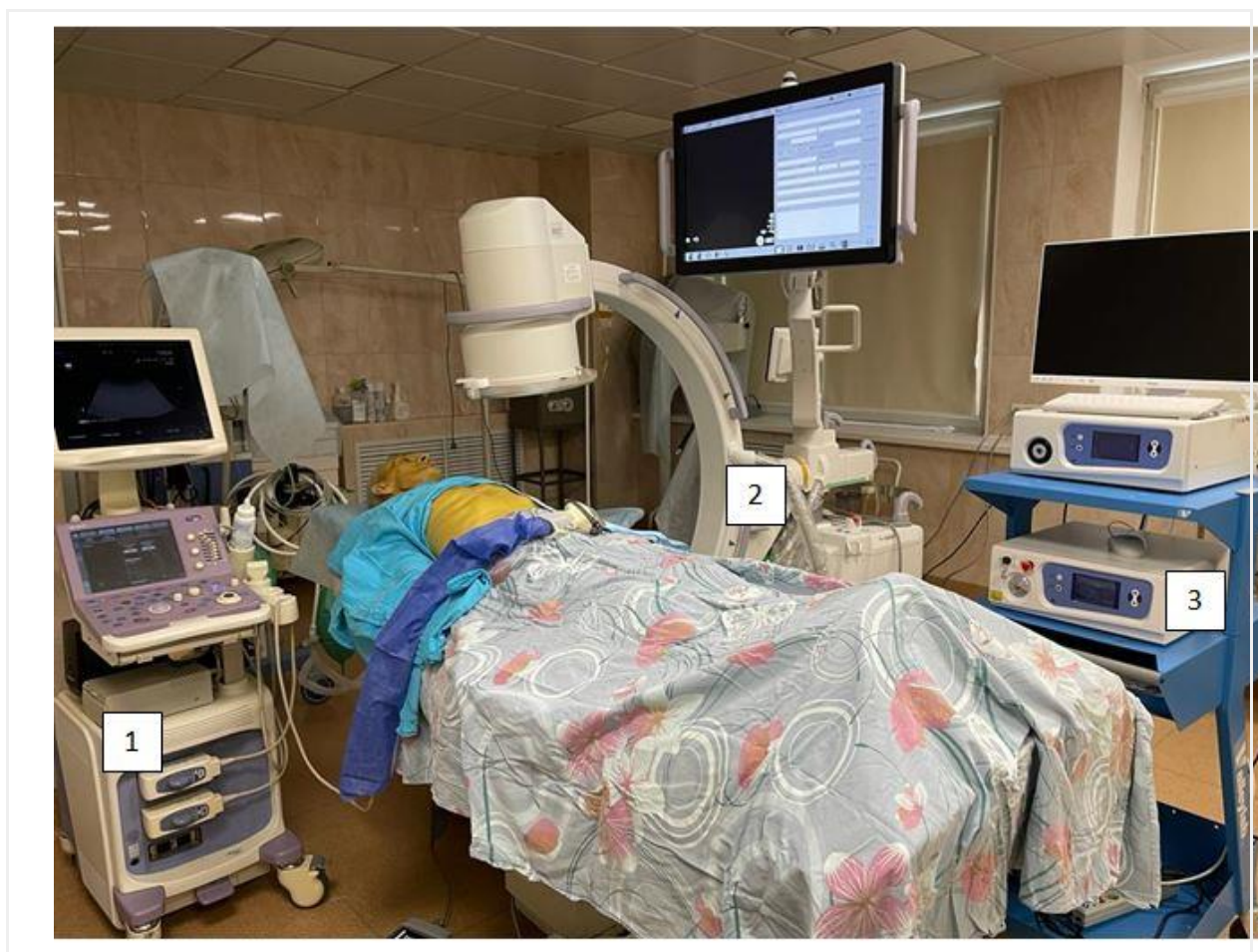


Рисунок 2.2 – Ультразвуковой аппарат (1); Рентгеновская С-дуга (2); Комплекс: видеофлуоресцентный модуль УФФ-630/675-0–БИОСПЕК, светодиодный лазер, лазерный спектроанализатор ЛЭСА-01–БИОСПЕК (3)

Используемые инструменты:

- J-образный мягкий проводник 0.035 inch;
- гидрофильный проводник 0.035 inch;
- манипуляционный катетер 5–6 Fr;
- интродьюсер с клапаном Чек-Фло 8-9 Fr
- гибкий эндоскоп диаметром 1.2 и/или 2.8 мм;
- терапевтический лазер с длиной волны возбуждения 660 нм;
- модифицированный Y-образный световод для доставки лазерного излучения и регистрации флуоресценции с ткани пациента;

- оптический диффузор с цилиндрическим облучателем на дистальном конце;
- спектроскопическая система LESA-01-Biospec;
- Видеофлуоресцентный модуль для эндоскопии и минимально инвазивной хирургии УФФ-630/675-0–БИОСПЕК.

### 2.2.1. Чрескожное чреспеченочное желчеотведение

Для купирования механической желтухи пациентам применено чрескожное чреспеченочное дренирование желчных протоков.

Для выполнения чрескожных минимально инвазивных вмешательств использовали пункционную насадку на конвексный датчик с частотой 3,5 МГц (Рисунок 2.3).



Рисунок 2.3 – Конвексный датчик с пункционной насадкой

Датчики, насадку и иглы стерилизовали в спиртовом растворе хлоргексидина (гебитана) в течение 25 минут. Для минимально инвазивных

вмешательств использовали наборы для чрескожного доступа через один прокол, с возможностью проведения проводников диаметром до 0.038 inch (0.97 мм), с целью осуществления интервенционных радиологических процедур. Комплект для чрескожного доступа Neff Percutaneous Access Set NPAS-100-RB-NT (рисунок 2.4 и 2.5), состоящий из проводника (0.018 inch – 0.46 мм, длиной 60 см), жесткой канюли (22G, длиной 21.7 см), расширителя (4Fr – длиной 20 см), интродьюсера (6Fr, длиной 20 см) с рентгеноконтрастной меткой (шириной до 5 мм), иглы Chiba со стилетом (20 G – 0.71 мм, длиной 15 см) для доступа в желчные протоки.

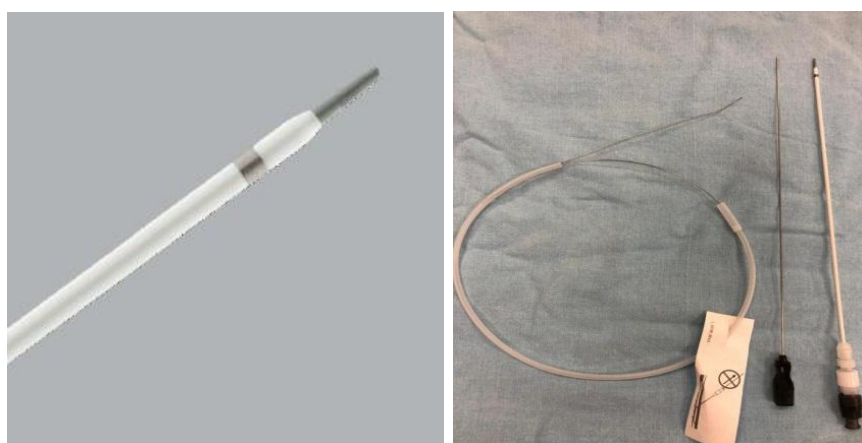


Рисунок 2.4 – Набор интродьюсеров в сборе

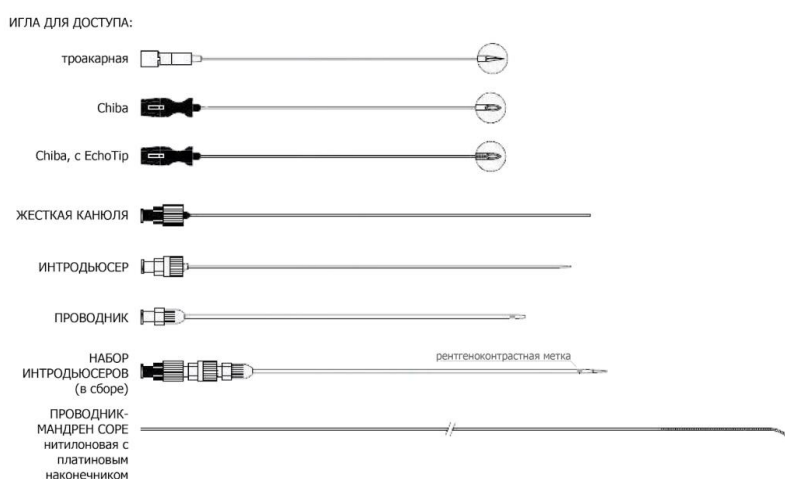


Рисунок 2.5 – Компоненты комплекта интродьюсеров для чрескожного доступа в желчные протоки



Под контролем УЗИ проводили пункцию расширенного сегментарного протока по методике Сельдингера (рисунки 2.6 и 2.7). После визуализации кончика иглы в просвете желчного протока, удаляли ее мандрен; вводили металлический проводник, который проводили по ходу желчного протока до его фиксации (Рисунок 2.8). После этого под рентгеноскопическим контролем оценивали нахождение проводника в протоковой системе печени и, убедившись в том, что проводник расположен в проекции долевого протока, удаляли иглу. По проводнику под контролем рентгеноскопии устанавливалась система интродьюсеров Neff (Рисунок 2.9). Удерживая позицию интродьюсера, удаляли проводник, жесткую канюлю и расширитель интродьюсера. После удаления жесткой части интродьюсера через его просвет поступала желчь (Рисунок 2.10), затем проводили холангиографию, при которой уже оценивали локализацию блока контрастирования. Для холангиографии в желчные протоки вводили водорастворимые контрастные вещества, разведенные 1:1 с физиологическим раствором.



Рисунок 2.6 – Датчик с насадкой и иглой для доступа в желчные протоки



Рисунок 2.7 – Эхограмма пункции расширенного желчного протока (стрелкой указан конец иглы в просвете протока)



Рисунок 2.8 – Проводник-мандрен СОРЕ проведен через иглу в просвет желчного протока



Рисунок 2.9 – Набор интродьюсеров Neff в сборе проведен по проводнику в желчные протоки



Рисунок 2.10 – Поступление желчи из протоков через интродьюсер

Дренирование осуществляли на проводнике; тип устанавливаемого дренажа определяли в зависимости от протяженности стриктуры и характера блока контрастирования (полный или частичный). Использовали варианты как наружного и наружно-внутреннего желчеотведения, так и их комбинации, при билобарном поражении.



Все операции выполняли под рентгеноскопическим контролем с использованием рентген-хирургической передвижной установки типа С-дуга Omniscop Rk5 (производства компании Stephanix (Франция), серийный номер 020055912) или рентгеновского аппарата для интервенционных процедур «РЕНЕКС» (по ТУ 26.60.11-045-54839165-2018).

Для дренирования применяли универсальный дренажный катетер Dawson-Mueller (Рисунок 2.11).



Рисунок 2.11 – Наружный дренажный катетер Dawson-Mueller в сборе

Дренажный катетер состоит из троакарного стилета, жесткой канюли для введения катетера, непосредственно дренажного катетера диаметром 8.5 Fr, длиной 15 или 25 см (Рисунок 2.12). Гидрофильное покрытие внутренней части дренажа обеспечивает хорошее скольжение, что уменьшает трение при введении катетера, конструкция Intro-Tip® предотвращает сморщивание катетера гармошкой при сопротивлении тканей во время введения. Десятимиллиметровый дистальный конец дренажа по типу Pig Tail «свиной хвост» фиксируется механизмом Mac-Loc®.

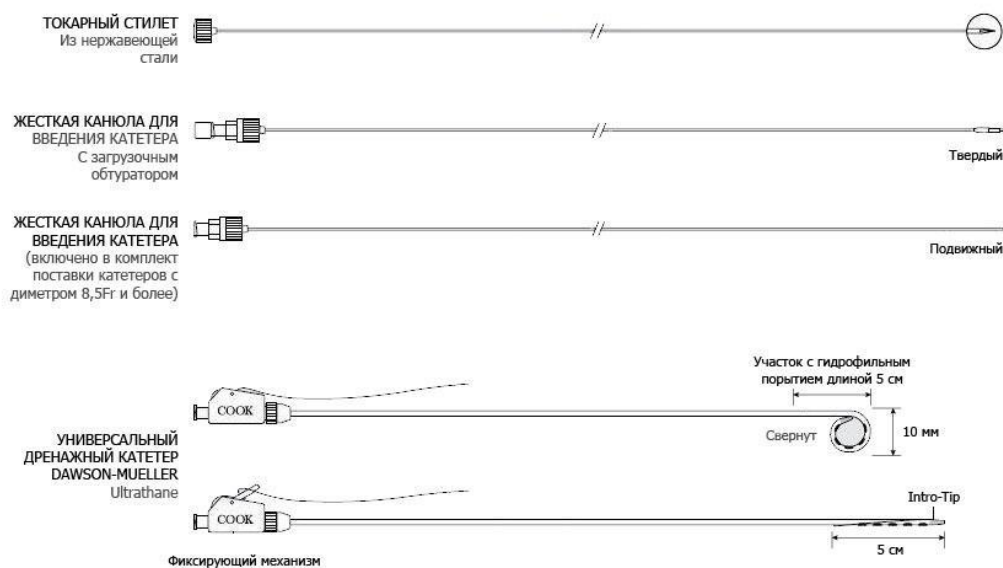


Рисунок 2.12 – Схема дренажного катетера Dawson-Mueller для наружной холангиостомии

Катетер по проводнику устанавливали в просвете желчного протока под рентгеноскопическим контролем. Как только дистальный конец дренажа достигал необходимой части протоков, извлекали все проводники, усилители, после чего катетер формировал свою конфигурацию. Далее для окончательного формирования и фиксации дистальной петли катетера (Pig Tail) использовали механизм Mac-Loc®. Для этого одной рукой захватывали втулку фиксирующего устройства, а другой тянули назад нить, которая фиксировала кончик дренажа. После этого проводили фистулографию, контролировали положение дренажа и его функцию, фиксировали дренаж к передней брюшной стенке на атравматичной игле. Наружный дренаж подключали на отток желчи через желчеприемник (мочеприемник).

Наружно-внутренний дренаж имеет аналогичное строение. Мы использовали две модели ультратановых дренажей производства Cook: ULT8.5-38-40-P-32S-CLB-RH и ULT10.2-38-40-P-32S-CLB-RH, соответственно, с диаметрами 8.5 и 10.2 Fr. Каждый набор включает две проводниковых канюли (гибкую и жесткую). Длина катетера 40 см, имеет 32 боковых отверстия и рентгеноконтрастную метку, расположенную тотчас же у первого проксимального отверстия (Рисунок 2.13 а, б).

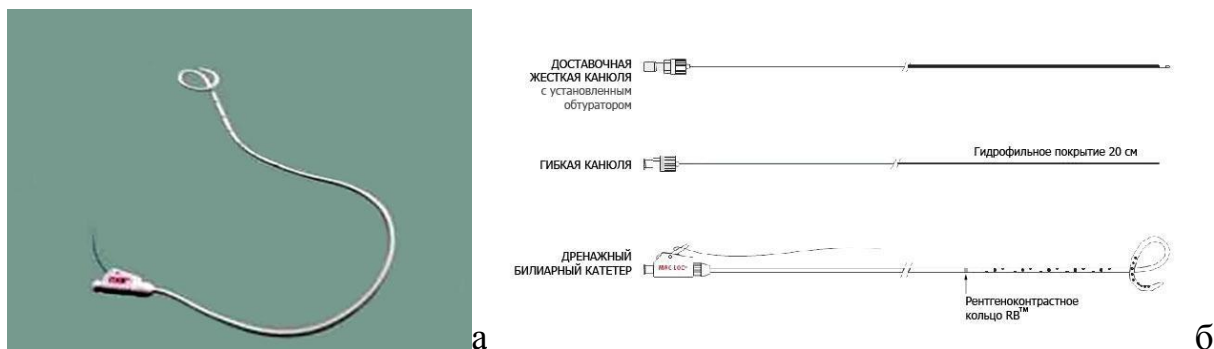


Рисунок 2.13 – Наружно-внутренний дренаж для холангиостомии: а) дренаж в сборе; б) схема строения дренажа

Дренирование желчных протоков проводили аналогично наружной холангиостомии, за исключением того, что отверстия дренажа устанавливались выше и ниже места стеноза, при этом рентгеноконтрастная метка располагалась в просвете желчных протоков. Варианты фиксации дистального конца (Pig Tail) могут быть следующими: транспапиллярная (в просвете кишки) и супрапапиллярная, если позволяет длина дренажа и ширина общего желчного протока. Второй вариант является предпочтительным лишь с той позиции, что при нем отсутствует необходимость травматизации области большого сосочка двенадцатиперстной кишки при проведении дренажа, а также имеется меньший риск развития энтерогенного холангита.

### 2.2.2. Стентирование желчных протоков

Всем пациентам обеих групп проведено стентирование желчных протоков. Варианты стентов представлены на Рисунке 2.14.

С учетом высокого блока устанавливали непокрытый нитиноловый саморасширяющийся стент. Условием проведения стентирования являлось наружно-внутреннее желчеотведение.

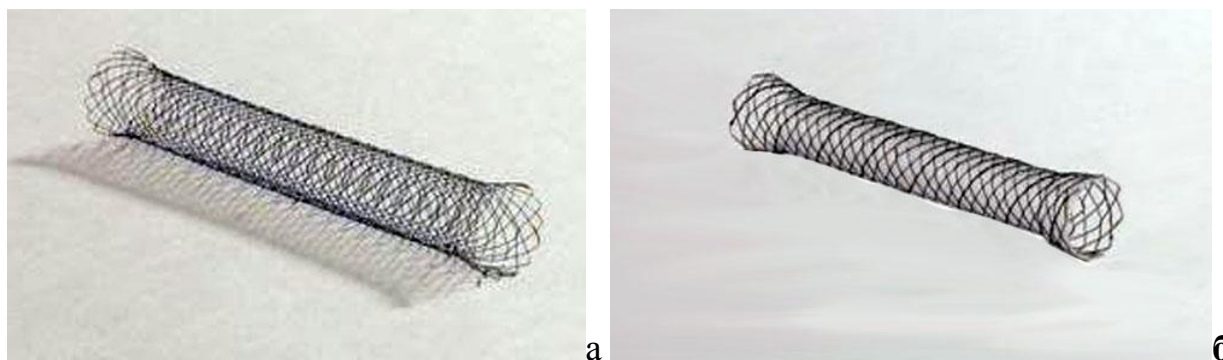
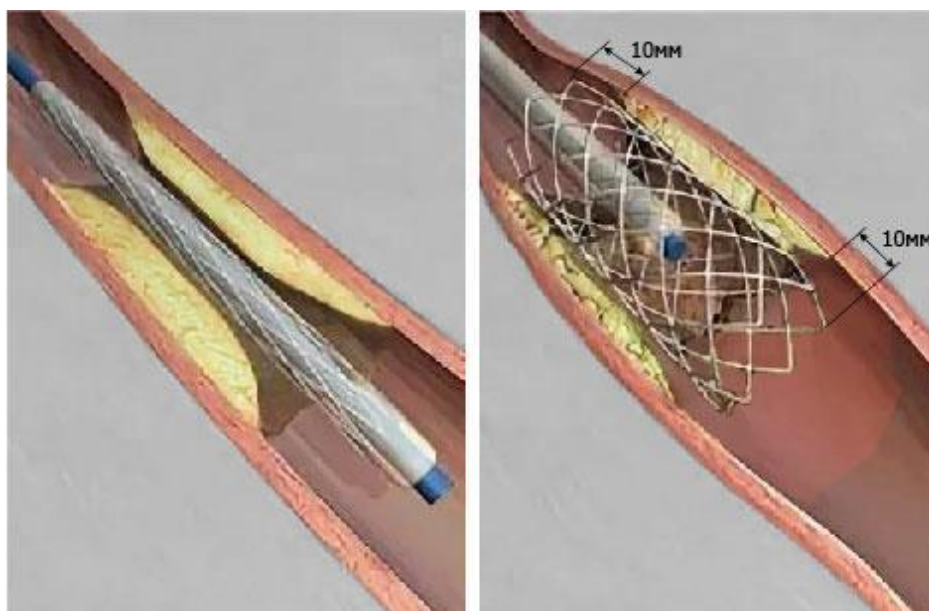


Рисунок 2.14 – Саморасширяющийся нитиноловый стент: а) непокрытый; б) покрытый оболочкой (графт-стент)

Для прохождения через опухолевую стриктуру использовали металлический проводник 0.38 Inch, который устанавливали через холангиостому. Предварительно проводили фистулографию, при которой оценивали протяженность стриктуры. После удаления билиарного дренажа по проводнику устанавливали систему для эндопротезирования. В то время как проводник находился внутри желчного протока, ассистент фиксировал его наружный конец для предотвращения дальнейшего продвижения проводника. Эндопротез и толкатель вводили по проводнику в желчный проток через стриктуру и далее в двенадцатиперстную кишку. После этого проводник и толкатель использовали для более точного расположения катетера внутри протока выше и ниже стриктуры. Толкатель и проводник удаляли. После введения эндопротеза на два-три дня оставляли страховочный наружный дренаж. Стент устанавливали таким образом, чтобы проксимальный и дистальный концы находились вне стриктуры минимум на 10 мм (Рисунок 2.15).



а

б

Рисунок 2.15 – Схематичное изображение установленного билиарного стента: (а) проведение доставляющей системы через стриктуру в неизмененную часть протока; (б) раскрытие стента, с отступом от дистального и проксимального краев опухолевого стеноза  $\leq 10$  мм

### 2.2.3. Внутрипротоковая фототераностика

Фотодинамическая тераностика (ФТ) включает в себя флуоресцентную диагностику (ФД) и фотодинамическую терапию (ФДТ). Фотодинамическая терапия применяется в разных областях клинической онкологии. Она обеспечивает прекращение пролиферативного роста опухоли в зоне лазерного воздействия за счет активации процессов апоптоза или некроза, а также оказывает местное и системное иммуномодулирующее действие. Для осуществления ФДТ пациентам вводили фотосенсибилизаторы, производные хлорина еб, которые избирательно накапливались в опухолевой ткани.

#### Используемые фотосенсибилизаторы и способ введения

Препараты Фотолон, Фоторан и Радахлорин являются фотосенсибилизаторами, производными Хлорина Еб. Выбраны нами, поскольку предоставляют возможность проводить флуоресцентную диагностику и ФДТ

после одного введения препарата. После введения соблюдали светозащитный режим в течение трех дней (обработка открытых участков кожных покровов солнцезащитным кремом, избегание инсоляции и яркого комнатного освещения, ношение солнцезащитных очков).

**Фотолон** (Photolon) выпускается во флаконах по 50 мг или 100 мг. Препарат представляет собой пористую массу зеленовато-черного цвета (допускается фиолетовый оттенок). Действующее вещество – тринатриевая соль хлорина Е6. В стерильной упаковке, хранится в защищенном от света месте, при температуре не выше от 0 до +8°C. Препарат в дозе 1,2 мг/кг разводили в 150 - 200 мл физиологического раствора и вводили внутривенно капельно в течение 30 мин.

**Фоторан Е6** (действующее вещество – Хлорин Е6 (Chlorin Е6)). Лиофилизированная масса в форме таблетки зеленовато-черного цвета (допускается фиолетовый оттенок). Выпускается в стерильных флаконах по 50 мг и 100 мг. Хранится при температуре не выше 8°C. Препарат в дозе 1,2 мг/кг разводили в 150–200 мл физиологического раствора и вводили внутривенно капельно в течение 30 минут.

**Радахлорин®** (сумма натриевых солей хлорина е6, хлорина р6, пурпурина 5–0,35 г) выпускается в виде стерильного 0,35% раствора по 10 мл во флаконе. Препарат вводили однократно в виде внутривенной капельной инфузии в течение 30 минут. Хранится в защищенном от света месте при температуре от 0 до +8° С. Перед внутривенным капельным введением терапевтическую дозу Радахлорина (1–1,2 мг/кг) разводили в 200 мл 0,9% раствора натрия хлорида.

За счет тропности ФС к опухолевой ткани максимальное накопление препарата происходит в патологических очагах.

Проводили оценку безопасности применения фотосенсибилизаторов у больных ХЦР. Исследовали следующие критерии:

- частота побочных реакций;
- дискомфорт и/или боли при введении препарата;
- наличие какой-либо местной реакции на введение;

- наличие системных реакций в первые сутки после введения фотосенсибилизатора.

### **Флуоресцентная диагностика**

ФД проводили непосредственно перед ФДТ и сразу же после нее для оценки снижения интенсивности флуоресценции ФС (фотобличинга) в зависимости от дозы облучения.

ФТ проводили через установленный в желчных протоках интродьюсер (Рисунок 2.16) с клапаном ЧЕК-ФЛЮ диаметром 8–9 F (3 F (Френч) = 1 мм). Все инструменты устанавливали в желчные протоки под рентгеноскопическим контролем.



Рисунок 2.16 – Интродьюсер с клапаном Check-Flo

Интродьюсер использовался для введения инструментов в желчные протоки для проведения фотодинамической терапии. Двупросветное строение позволяет проводить промывание внутри интродьюсера, за счет вливания растворов через боковое ответвление. Клапан Check-Flo, при этом, предотвращает аспирацию воздуха и рефлюкс раствора. Диаметр 9 Fr гарантировал прохождение инструментов через интродьюсер (Рисунок 2.17).



Рисунок 2.17 – Интродьюсер (черная стрелка) с введенным в него гибким эндоскопом диаметром 2.8 мм (оранжевая стрелка)

При этом на дистальном конце интродьюсера имеется рентгеноконтрастная метка, которая позволяет контролировать положение кончик инструмента в просвете желчных протоков и фиксации его в нужном месте.

Оценку накопления фотосенсибилизаторов в тканях осуществляли при помощи лазерной электронно-спектральной установки (ЛЭСА (LESA-01-Biospec)) (Рисунок 2.18) и видеофлуоресцентного модуля для минимально инвазивной хирургии (УФФ-630/675-01 – БИОСПЕК). Лазерный флуоресцентно-спектроскопический метод исследования применяли для определения тканевого распределения ФС в опухоли и неизмененных тканях при разработке режимов внутрипротоковой фототераностики. Также данный метод применяли во время проведения сеансов ФД для уточнения границ опухолевого поражения, определения уровня накопления ФС в опухоли и в очагах флуоресценции, регистрируемых с помощью аппаратуры для получения флуоресцентного изображения.



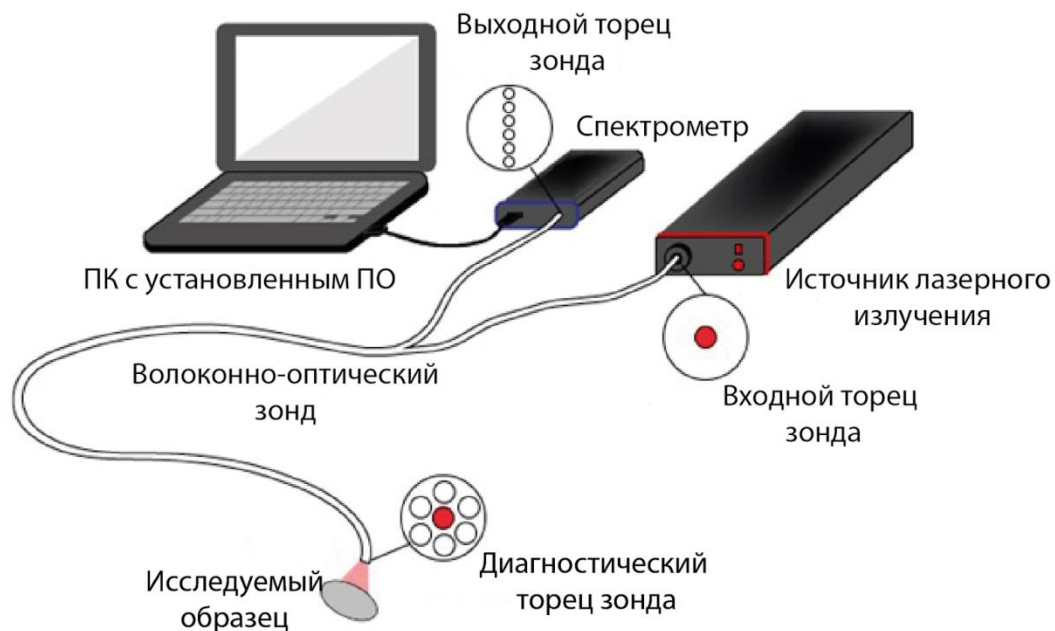


Рисунок 2.18 – Схема лазерной электронно-спектральной установки ЛЭСА-01-БИОСПЕК

Данная установка включает в себя:

1. Многоканальный оптический спектроанализатор с волоконным входом;
2. Специальное программное обеспечение в среде Windows с возможностью мониторинга концентрации ФС;
3. Диагностическая лазерная установка;
4. Комплект волоконно-оптических зондов для диагностики (3 шт., диаметр 1,8 мм, входит в инструментальный канал любого стандартного эндоскопического оборудования);
5. Компьютер с необходимым программным обеспечением;
6. Руководство по эксплуатации.

С использованием данного устройства интраоперационно проводилась спектрально-флуоресцентная диагностика с установкой волоконно-оптического диагностического диффузора под углом 90 градусов к исследуемой ткани в режиме «мягкого контакта» (Рисунок 2.19).



Рисунок 2.19 – Этап проведения лазерного спектрального анализа (стрелкой указан оптический диагностический диффузор)

При «мягком» контакте дистального конца оптоволоконного катетера с поверхностью ткани происходит фиксация и запись спектров флуоресценции с первичной обработкой с помощью программного обеспечения, работающего в среде Windows. Это дает возможность сравнивать степень накопления фотосенсибилизатора в опухоли и в здоровой ткани. Программное обеспечение дает возможность в масштабе реального времени анализировать динамику накопления препарата в сравнении опухоль/норма (Рисунок 2.20).

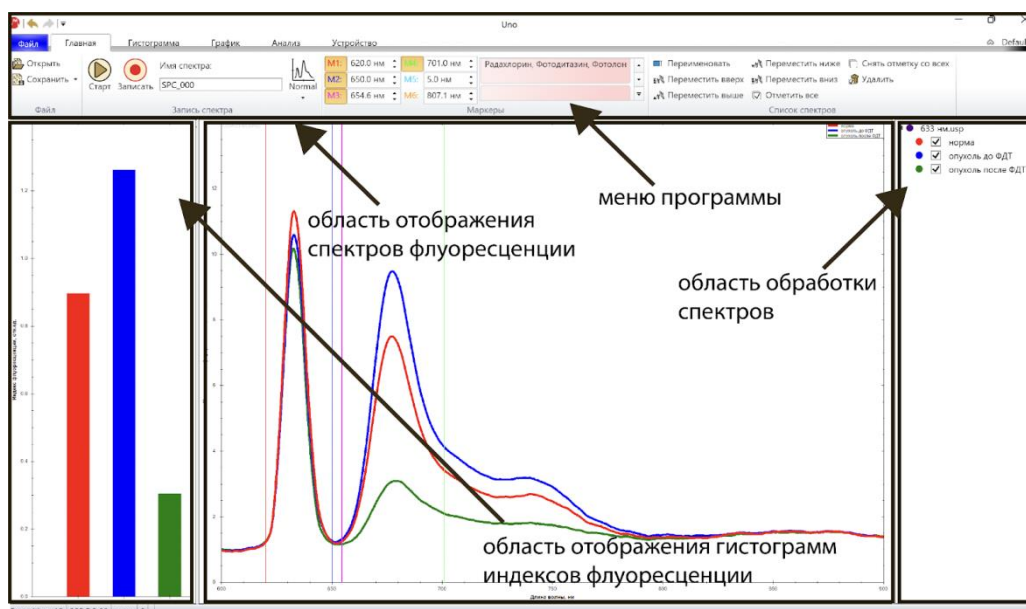


Рисунок 2.20 – Пример регистрации и обработки программным обеспечением UnoMomento данных, регистрируемых лазерно-волоконным спектральным анализатором ЛЭСА-01-БИОСПЕК

Флуоресцентную контрастность опухоль/норма рассчитывали как отношение флуоресценции опухоли к флуоресценции нормальной ткани. Средняя плотность мощности лазерного излучения для спектральной флуоресцентной диагностики составила  $2\text{--}5 \text{ мВт/см}^2$ . Длина волны лазерного излучения для проведения ФД составляла  $632,8 \text{ нм}$  или  $665 \pm 5 \text{ нм}$ .

Был проведен анализ накопления ФС, производного хлорина е6, у 14 пациентов с подтвержденной холангиокарциномой. Измеряли флуоресценцию в нормальной ткани желчных протоков, а также в опухоли до введения ФС, затем через 60 и 120 минут после введения хлорина е6. Все препараты готовили к применению *ex tempore* и вводили в затемненной палате внутривенно капельно за два часа до операции.

Для измерений дистальный конец оптического волокна фиксировали в области неизменной части желчных протоков и регистрировали индекс флуоресценции. Затем проводили измерения в области опухолевой стриктуры.

При неполном блоке желчного протока применяли волоконно-оптический катетер с боковым окном фиксации обратного излучения (Рисунок 2.21 а, б), который располагался по ходу протока. При полном блоке, когда не удается

провести инструменты за область стеноза, использовался аналогичный диагностический диффузор, только с торцевым окном фиксации излучения.

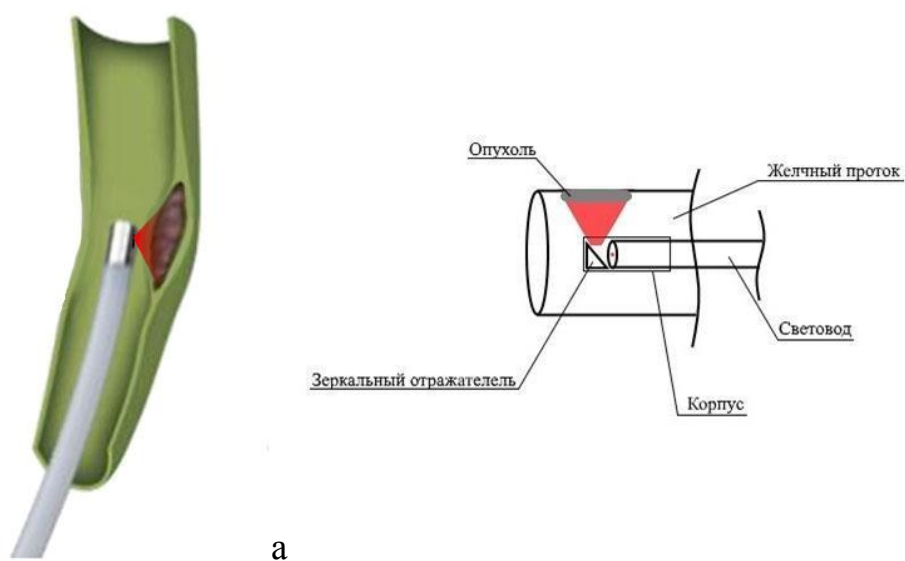


Рисунок 2.21 – Расположение диагностического волокна при проведении спектрально флуоресцентного анализа внутри желчного протока, (а) схема расположения волоконно-оптического зонда в желчном протоке, (б) схема модифицированного световода с зеркальным отражателем

Исследования проводились под рентгеноскопическим контролем (Рисунок 2.22 а,б).

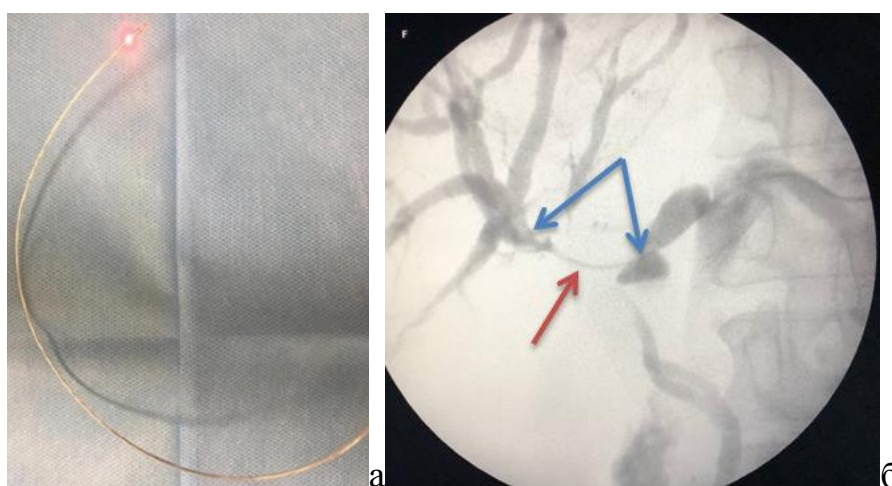


Рисунок 2.22 – (а) волоконно-оптический катетер с боковым окном фиксации обратного излучения, (б) проведение лазерного спектрального анализа опухолевой стриктуры желчных протоков (синие стрелки) с применением волоконно-оптического катетера с боковым окном фиксации обратного излучения (красная стрелка)

Полученные результаты анализировались с помощью программного обеспечения UnoMomento с выводом результатов в виде графиков на мониторе (Рисунок 2.20). Оценка концентраций ФС по спектрам флуоресценции с использованием источника лазерного излучения с длиной волны 660 нм с соответствующей системой фильтров была апробирована и опубликована в результатах [406]. Задача данного исследования состояла в возможности использования  $\lambda_{exc}=660$  нм для оценки концентрации ФС Себ с применением его длинноволнового крыла флуоресценции. Эта задача является важной, так как длина волны излучения 660 нм, которая ранее использовалась только для проведения ФДТ, может быть использована и для ФД (патент (19)RU(11)2021127035(13)A). При расчете индексов флуоресценции выполняли нормирование на рассеянное назад лазерное излучение (РНЛИ) ( $\lambda_{exc}=632,8$  нм или  $\lambda_{exc}=660$  нм) (левый пик на Рисунке 2.23 а, б) спектров флуоресценции ФС (правый(е) пик(и) на Рисунке 2.23 а, б) в момент максимальной концентрации препарата в опухоли до, а также после ФДТ. При этом получали гистограммы индексов флуоресценции (Рисунок 2.24 а, б), выражаемые как отношение площадей под спектральной кривой флуоресценции хлорина еб к спектральной кривой РНЛИ.

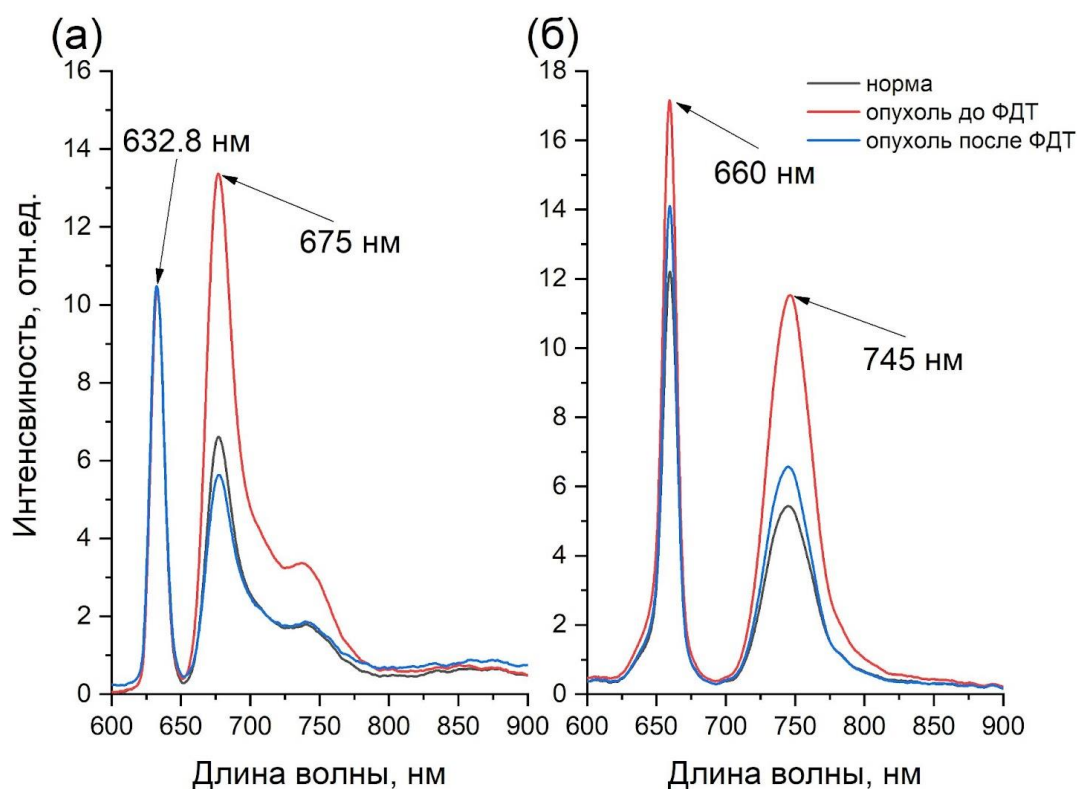


Рисунок 2.23 – Спектры флуоресценции здоровой (норма) и опухолевой ткани (опухоль) в момент максимального накопления ФС в опухоли до ФДТ (спустя 3 часа после введения) и после ФДТ, (а) при возбуждении флуоресценции Себ источником лазерного излучения с длиной волны 632.8 нм (левый пик) детектируются пики на 675 нм правее, отражающий сигнал флуоресценции, (б) при возбуждении флуоресценции Себ источником лазерного излучения с длиной волны 660 нм (левый пик) детектируется пик на 745 нм, отражающий сигнал флуоресценции

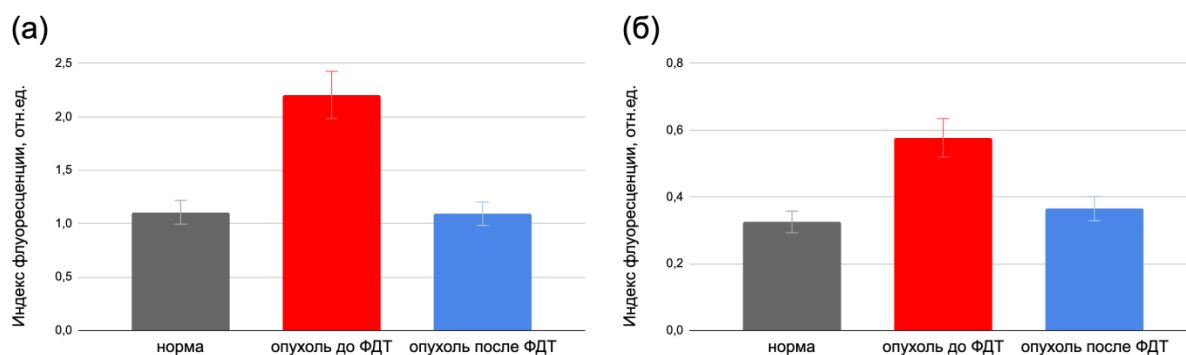


Рисунок 2.24 – Распределение индексов флуоресценции, рассчитанных как отношение площадей под спектральной кривой флуоресценции хлорина еб и под спектральной кривой РНЛИ: (а) при возбуждении флуоресценции Себ лазерным источником с длиной волны 632.8 нм; (б) при возбуждении флуоресценции Себ лазерным источником с длиной волны 660 нм

Сравнительный анализ представленных графических результатов (Рисунок 2.23) показывает адекватность использования лазерного излучения с длиной волны 660 нм и регистрации флуоресцентного сигнала в ближнем ИК диапазоне.

Параллельно с внутривидеопротоковой лазерной спектроскопией проводили видеофлуоресцентную диагностику модулем УФФ-630/675-0–БИОСПЕК (Рисунок 2.25 а, б) с оценкой индекса флуоресценции до и после ФДТ.

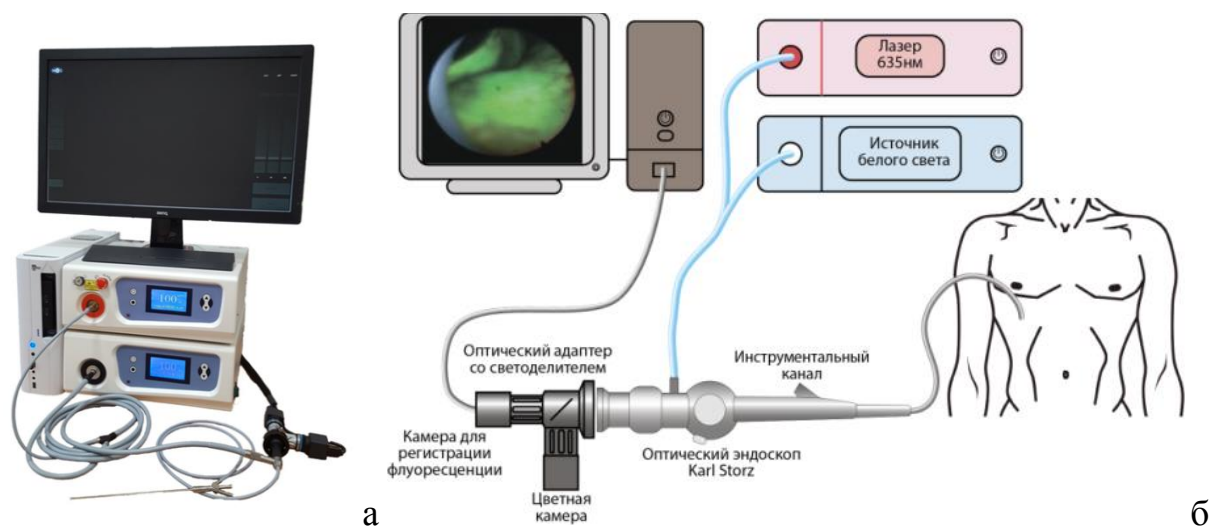


Рисунок 2.25 – а) видеофлуоресцентный модуль для минимально инвазивной хирургии и эндоскопии УФФ-630/675-01-БИОСПЕК, б) схема установки и принцип работы

Были получены изображения участков желчных протоков до и после ФДТ в цветном и флуоресцентном свете, и в режиме наложения при помощи видеофлуоресцентной системы для эндоскопии УФФ-630/675-01-БИОСПЕК и гибкого оптического эндоскопа диаметром 1,2 и 2,8 мм (Рисунок 2.26 а, б). Эндоскопы разработаны и изготовлены компанией ALMICRO (Германия) по заказу ООО «БИОСПЕК», для комплектации модуля УФФ-630/675-01-БИОСПЕК с целью возможности проведения минимально инвазивных вмешательств под видеофлуоресцентным контролем.



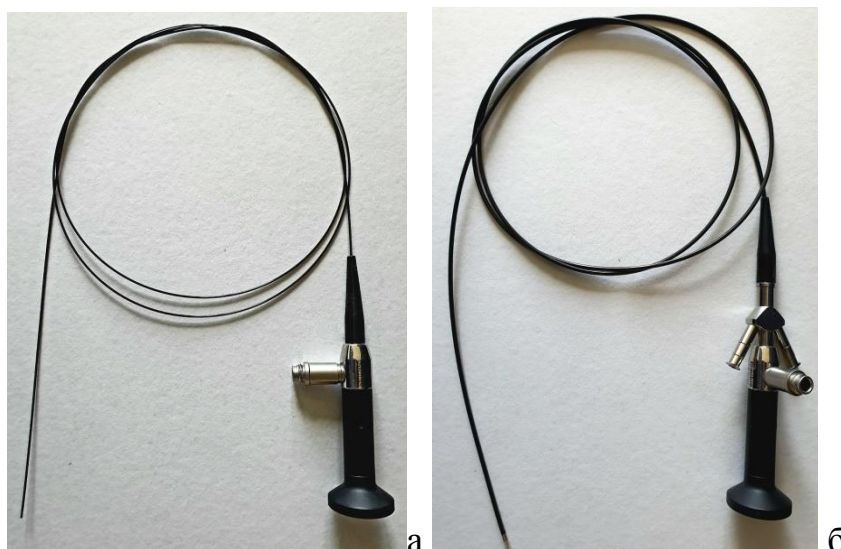


Рисунок 2.26 – (а) эндоскоп диаметром 1,2 мм, (б) эндоскоп диаметром 2,8 мм

Устройство видеофлуоресцентного модуля:

- адаптер эндоскопа с дихроичным зеркалом, к которому подсоединены цветная цифровая камера с коротковолновым фильтром и монохромная цифровая камера с длинноволновым фильтром;
- источник белого (широкополосного) освещения с коротковолновым фильтром для получения базового цветного изображения в натуральных цветах;
- лазерный источник света (635 нм) с узкополосным фильтром для возбуждения флуоресценции;
- блок регистрации и обработки, к которому подключены обе камеры;
- U-образный световод, предназначенный для доставки излучения от лазера и белого света к осветительному каналу эндоскопа;
- оптический эндоскоп.

Основная концепция в основе видеофлуоресцентного эндоскопического модуля – построение изображения в режиме обычного освещения, с флуоресцентным изображением и с расчетом индекса флуоресценции в заданной точке.

В клинической практике возникает необходимость численной оценки флуоресценции. Для этого в системе предусмотрен расчет индекса флуоресценции. Его использование необходимо для получения абсолютного



значения концентрации ФС или для оценки контраста накопления ФС относительно схожего по оптическим свойствам здорового участка биологической ткани. Для расчета абсолютных значений в начале исследования нормировали индекс флуоресценции на значение этого индекса, полученное с эталонного образца (биологической оптической среды) с различными концентрациями ФС в растворе жировой эмульсии (Интралипид®), имитирующей светорассеивающие свойства биологической ткани. Для оценки контраста накопления ФС индекс флуоресценции нормировался на значение, зарегистрированное с непораженного участка желчного протока.

Режим комбинированного наложения основан на совмещении двух изображений: цветного и, поверх него, изображения (полученного изначально в черно-белом цвете) с участками флуоресценции в зеленом псевдоцвете (Рисунок 2.27 а, б). Изображения были получены в максимуме накопления ФС в области злокачественного новообразования. Изменение индекса флуоресценции оценивали с использованием комбинированного изображения, сформированного программным обеспечением видеосистемы.

### **Методика проведения видеофлуоресцентной диагностики**

В положении пациента лежа на спине после проведенного желчеотведения под контролем рентгеноскопии проводили видеофлуоресцентную диагностику опухолевой стриктуры желчных протоков.

На J-образном проводнике 0.035 inch проводили замену дренажа на интродьюсер с клапаном Чек-Фло диаметром 9 Fr (3 мм). Интродьюсер фиксировали дистальным концом над опухолевой стриктурой, далее в желчные протоки проводили эндоскоп с подключенным видеофлуоресцентным модулем. Эндопротоковую видеофлуоресцентную диагностику у пациентов начинали проводить с неизменной части желчных протоков, где выполняли нормирование интенсивности флуоресценции. Далее продвигались в проксимальном направлении до появления участков флуоресцентного

изображения или повышения интенсивности флуоресценции выше, чем в здоровых участках желчных протоков.

При полной обструкции желчного протока, когда невозможно провести эндоскоп дистальнее опухоли, выполняли видеофлуоресцентное исследование, начиная от неизменной проксимальной части желчных протоков. Через интродьюсер промывали поля зрения от поступающих крови и желчи.

Во время диагностики в режиме совмещения флуоресцентного и цветного изображений на мониторе присутствует интерактивная мишень (Рисунок 2.27 а, б). При наведении на различные участки исследуемой области рассчитывается и отображается индекс флуоресценции, соответствующий данной области, что позволяет с большей точностью определить патологические участки. При проведении видеофлуоресцентной диагностики плотность мощности лазерного излучения составляла 5–10 мВт/см<sup>2</sup>, плотность энергии лазерного излучения не превышала 1 Дж/см<sup>2</sup> для исключения фотодинамического эффекта. Длина волны лазерного возбуждения составляла 632,8 нм или 660 нм, в зависимости от фотосенсибилизатора.

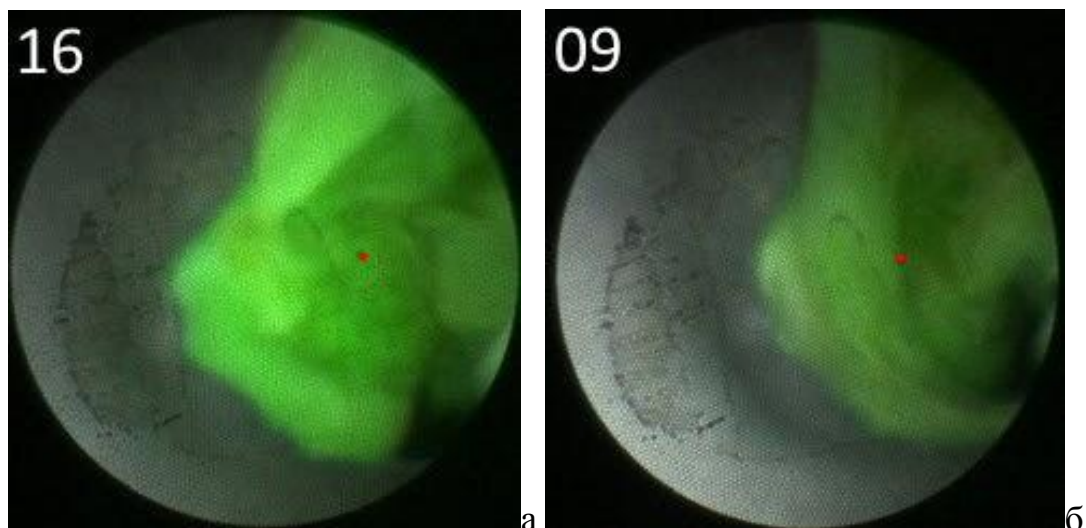


Рисунок 2.27 – (а) видеофлуоресцентное изображение опухоли до ФДТ; (б) видеофлуоресцентное изображение опухоли после ФДТ. Индекс флуоресценции указывается в левом верхнем углу

Цветное изображение формируется в диапазоне от 410 нм до 620 нм. В этом случае оно приближено к натуральным цветам и, при должной настройке функции баланса белого, мало отличается от привычного изображения. Флуоресцентное изображение строится в диапазоне от 650 нм до 800 нм.

Возбуждение флуоресценции производится в диапазоне  $635\pm 5$  нм, регистрация – в диапазоне от 650 до 800 нм. Это позволяет регистрировать флуоресцентное свечение от ФС на основе производных хлорина е6 (а также при необходимости фталоцианина алюминия и 5-АЛК-индуцированного протопорфирина IX). При необходимости для построения флуоресцентного изображения может быть задействован диапазон 400–410 нм для возбуждения флуоресценции в тонких пленках. Однако в настоящей работе данный диапазон не рассматривается, т.к. возбуждение флуоресценции в красном диапазоне видимого спектра имеет преимущество существенно более глубокого проникновения возбуждающего излучения в окне прозрачности биологической ткани. Кроме того, при использовании возбуждения в красном диапазоне длин волн, присутствие незначительного количества крови не снижает контрастность регистрируемой флуоресценции.

При помощи коэффициента Пирсона (Pearson's  $r$ ) проводили статистический анализ полученных результатов на спектроскопической и видеофлуоресцентной системах с определением корреляции между данными о концентрации флуорофора, определяемой двумя этими методами исследования. Кроме того, с использованием расчета парного  $t$ -критерия Стьюдента получали сведения о наличии статистически значимых различий между интенсивностью флуоресценции. Достоверными считались результаты при  $p < 0.05$ .

### **Оборудование для фотодинамической терапии и принцип работы**

Во время проведения сеансов ФДТ использовали диодный лазер с длиной волны, соответствующей пику поглощения использованных фотосенсибилизаторов  $665\pm 3$  нм ЛФТ-01-БИОСПЕК (выходная мощность лазерного излучения составляет 2,5 Вт, рисунок 2.28).



Рисунок 2.28 – Диодный лазер ЛФТ-01-БИОСПЕК с длиной волны  $665 \pm 3$  нм

Для доставки терапевтического лазерного излучения использовались оптические диффузоры с цилиндрическим облучателем на дистальном конце длиной 20 мм (Рисунок 2.29) с рассеивающей средой на основе диоксида титана ( $\text{TiO}_2$ ), который создает определенную прочность оптическому волокну, не снижая его светопрозрачность и гибкость, что очень важно при использовании его в просвете желчных протоков.



Рисунок 2.29 – Оптический диффузор с цилиндрическим облучателем на дистальном конце

У некоторых больных ( $n=11$ ) использовали двухканальный баллонный катетер (Рисунок 2.30 а, б, в). Через основной канал проводили гибкий

оптоволоконный световод с цилиндрическим облучателем на дистальном конце. При этом облучатель устанавливался в области баллонной части катетера. Для улучшения равномерности облучения баллон наполняли 1,5% раствором Интралипид®а. Интралипид® является стандартной рассеивающей средой. Использовались баллонные катетеры с размерами баллона от 1 до 2 см, в зависимости от протяжённости опухолевой стриктуры.

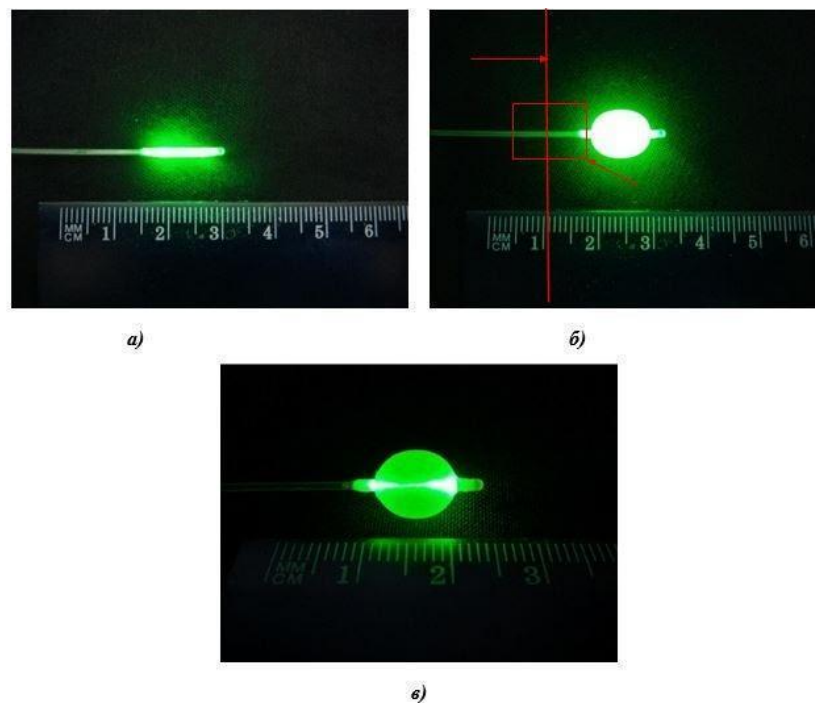


Рисунок 2.30 – Схема баллонного катетера для проведения ФДТ: а) сдутый баллон, б) баллон наполнен Интралипид®ом, в) баллон наполнен физиологическим раствором

Перечисленные варианты оптических диффузоров применялись для облучения протоковых стриктур, при котором распределение света происходит равномерно по цилиндрической поверхности желчного протока. Таким образом, возможно провести ФДТ на всем протяжении стеноза желчного протока.

В случае полного блока проходимости желчных протоков, ФДТ проводили с использованием оптического волокна с торцевым облучателем на дистальном конце (Рисунок 2.31), которое создает световое пятно, покрывающее поверхность опухоли, блокирующей пассаж желчи.

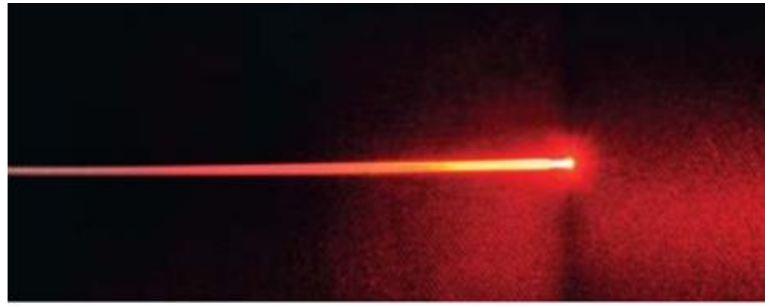


Рисунок 2.31 – Оптический диффузор с торцевым облучателем на дистальном конце

ФДТ проводили на всем протяжении опухолевого стеноза обязательным облучением минимум 1 см проксимальнее и дистальнее стриктуры (Рисунок 2.32).

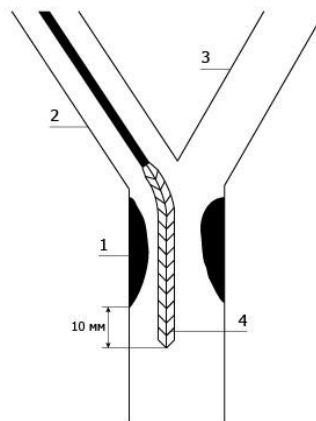


Рисунок 2.32 – Схема расположения оптического диффузора с цилиндрическим облучателем на дистальном конце в просвете желчного протока: 1) опухоль; 2) правый долевой проток; 3) левый долевой проток; 4) оптический диффузор

При поражении правого и левого долевых протоков фотодинамическую терапию поочередно проводили через холангиостомы обеих долей печени (Рисунок 2.33).

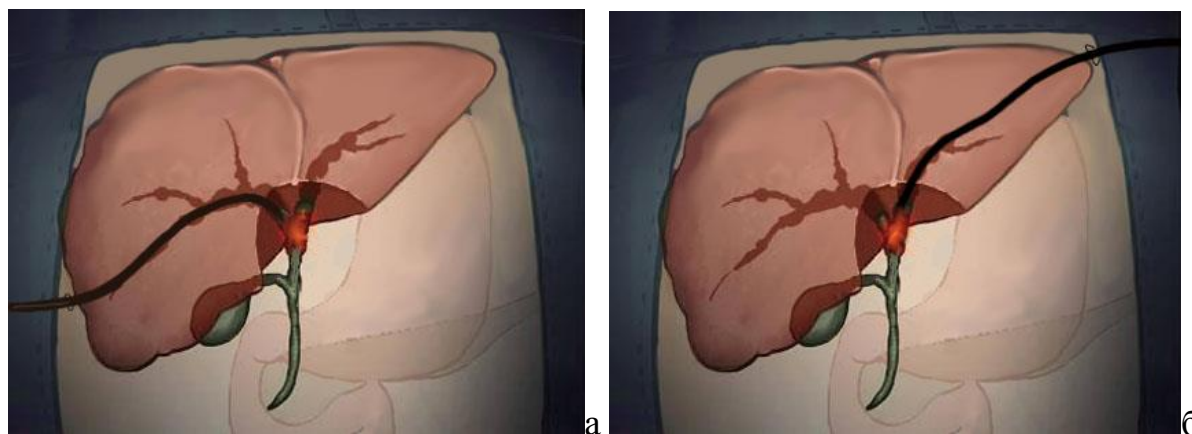


Рисунок 2.33 – Схема проведения внутрипротоковой ФДТ при билобарном поражении: а) Оптический диффузор установлен через правую долю печени; б) оптический диффузор проведен через левую долю печени

#### **2.2.4. Морфологическое исследование и определение внутритканевого распределение фотосенсибилизатора**

Как уже отмечено выше, стеноз желчных протоков, особенно в области ворот печени, является труднодоступной локализацией для осуществления забора материала на морфологическое исследование. Несмотря на это, всем пациентам была проведена биопсия, с целью верификации заболевания.

Забор материала осуществляли внутрипротоково при помощи одноразовой цитологической щетки (brush) и эндоскопических щипцов (forceps) (Рисунок 2.34 а, б).

При brush-биопсии материал исследовался путем стандартного цитологического исследования. Forceps-биопсия более предпочтительна, так как она позволяла получить фрагмент ткани достаточный для гистологического исследования.

Инструмент для биопсии проводили в область стриктуры желчного протока через интродьюсер. При этом brush-биопсия была возможна только в тех случаях, когда можно провести щеточку через стеноз, после этого небольшими тракционными (возвратно-поступательными) движениями совершается забор материала. Биопсию щипцами проводили при контакте браншей с опухолью, после этого их раскрывали, толчкообразным движением погружали бранши в



ткань, далее их сжимали и резким движением осуществляли забор материала. Все манипуляции осуществлялись под рентгеноскопическим контролем.

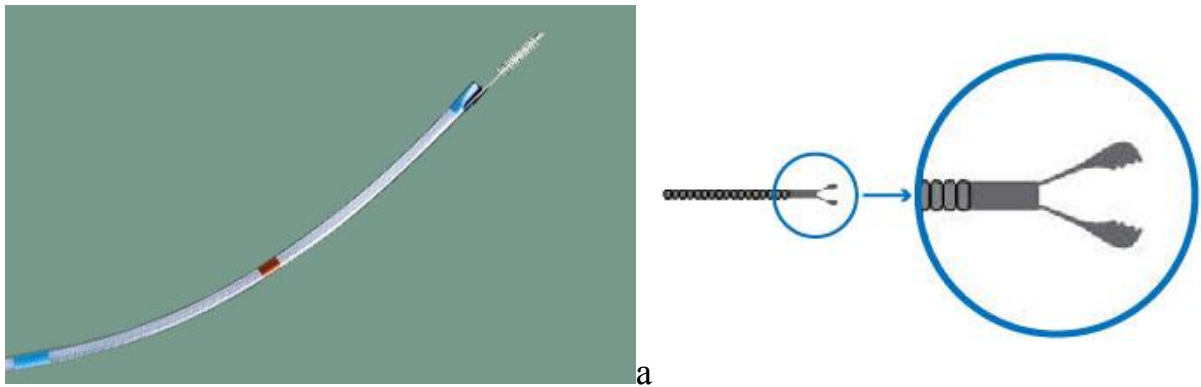


Рисунок 2.34 – а) цитологическая щетка б) эндоскопические щипцы

Гистологические и цитологические материалы исследовались в патологоанатомических отделениях. Морфологический анализ биопсионного и аутопсийного материала экспериментальной части на животных проводился в патологоанатомическом отделе НИИ Медицинской приматологии, г. Сочи (руководитель подразделения – к.м.н. Д.В. Булгин).

После проведенной ФДТ оценивали патоморфоз, основываясь на гистологической классификации, предложенной Е.Ф. Лушниковым [405], согласно которой выделяют четыре степени лечебного патоморфоза:

- I (слабый) – дистрофические изменения отдельных опухолевых клеток;
- II (умеренный) – появление очагов некроза и дистрофические изменения опухолевых клеток;
- III (выраженный) – обширные поля некроза, резко выраженные дистрофические изменения опухолевых клеток, сохраняют жизнеспособность немногочисленные опухолевые клетки;
- IV (резко выраженный, полный) – отсутствие опухолевых элементов.



Локализацию флуоресценции ФС в тканях определяли с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM-710-NLO (Carl Zeiss Microscopy, Германия) (Рисунок 2.35).



Рисунок 2.35 – Лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM-710-NLO

При помощи эндоскопически подведенного волоконно-оптического спектрометра ЛЭСА-01-БИОСПЕК регистрировали спектры флуоресценции участков протоков при возбуждении лазером с длиной волны генерации 632,8 нм. Биопсийными щипцами отбирали кусочки тканей опухоли протока с максимальной флуоресценцией до и после процедуры ФДТ. Полученные кусочки тканей размером 1x1 мм без предварительной фиксации дополнительно окрашивали на ДНК 2 нМ раствором Hoechst 33342 (Invitrogen, США) в течение 10 мин при 37°C непосредственно перед визуализацией. Образцы помещали между двух покровных стекол и исследовали под микроскопом с использованием масляного иммерсионного 63-кратного объектива Plan-Apochromat (NA = 1.4). Возбуждение аутофлуоресценции ткани проводили лазером с длиной волны 488 нм, регистрацию – в диапазоне 500–600 нм (зеленый канал). Возбуждение флуоресценции хлорина еб проводили лазером с длиной волны 633 нм, регистрацию – в диапазоне 650–750 нм (красный канал). Проходящий лазерный свет регистрировали отдельным Т-РМТ детектором. Hoechst возбуждали двухфотонно с помощью перестраиваемого лазера Chameleon Ultra II (Coherent,

США) на 700 нм, и излучение было зарегистрировано в диапазоне 400–500 нм (синий канал). Аутофлуоресценцию и флуоресценцию хлорина еб регистрировали параллельно, флуоресценцию Hoechst – при последовательном сканировании. По интенсивности сигнала в красном канале оценивали концентрацию хлорина еб. Для этого были проанализированы по три изображения до и после ФДТ и вычислена средняя интенсивность флуоресцентного сигнала.

### **2.3. Предклиническое исследование**

Для решения поставленных задач по оптимизации процедуры фототераностики ХЦР были исследованы оптические свойства тканей внутри- и внепеченочных желчных протоков *in vitro* и *in vivo*, оценена возможность использования отечественного видеофлуоресцентного модуля для эндоскопии и минимально инвазивной хирургии с возможностью проведения фототераностики нерезектабельного стенозирующего ХЦР. Для оценки безопасности и эффективности метода фототераностики ХЦР проведено предклиническое исследование.

#### **2.3.1. Создание моделей биологической ткани – биологических сред и *in vitro* исследование оптических свойств**

Для исследования оптических свойств биологических тканей *in vitro* и определения метрологических характеристик применяемого при анализе тканей оборудования созданы оптические среды, которые, в зависимости от исследуемой ткани, характеризовались определенными оптическими свойствами.

В лабораторном исследовании были использованы оптические среды, имитирующие рассеивающие свойства биологических тканей, содержащие раствор 1,8% жировой эмульсии (Интралипид®) и хлорин Е6 (Сe6) в концентрации от 0.1 до 1 мг/кг (Рисунок 2.36). Биологические среды имели спектроскопические свойства, близкие к реальным биологическим тканям. Использованный 1,8% водный раствор жировой эмульсии был выбран из-за

близких коэффициентов рассеяния и фактора анизотропии [42]. Данные среды исследованы при помощи видеофлуоресцентного модуля, для получения флуоресцентных изображений в черно-белом и цветном режимах, а также определения индекса флуоресценции.

Полученные параметры индекса флуоресценции для определенной концентрации ФС в биологическом образце в дальнейшей практике использовали для калибровки видеофлуоресцентного модуля перед работой, а также для оценки степени накопления ФС в патологических тканях до и после ФДТ.

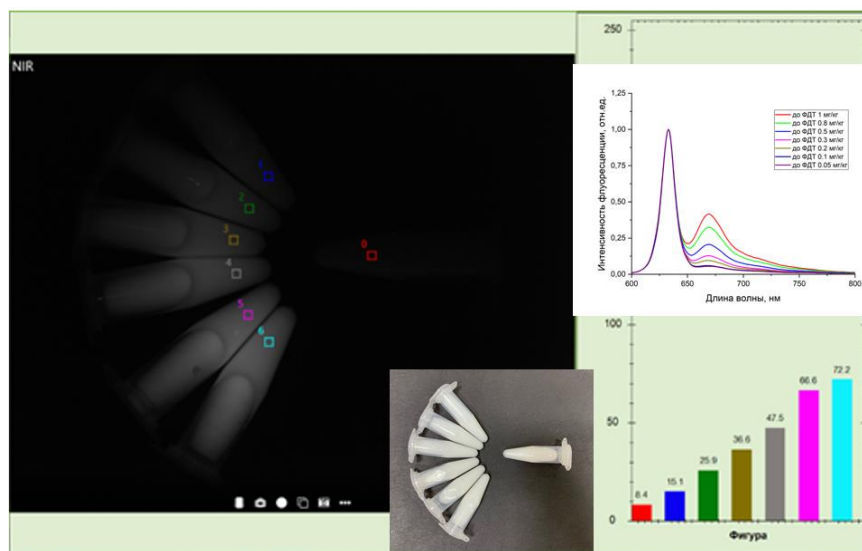


Рисунок 2.36 – Изображение модельных сред (1,8 % Интралипид®) с различными концентрациями Себ (0,1–1 мг/кг)

Оптимальную дозу облучения для ФДТ определяли по фотобликингу (уменьшение интенсивности флуоресценции ФС при облучении) флуоресценции Себ. Спектральная кривая с пиком флуоресценции на длине волны 660 нм соответствует наличию Себ в модельном образце. Для оценки фотобликинга Себ были выбраны плотности энергетической дозы облучения: 0; 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 225; 250 Дж/см<sup>2</sup>, что соответствует клиническим дозам облучения злокачественных новообразований (кроме нулевого значения; минимальные дозы – для диагностических целей, максимальные – для терапевтических). Облучение проводилось терапевтическим лазером с длиной волны генерации 660 нм и с

плотностью мощности  $700 \text{ мВт/см}^2$  до выявления фотобличинга Себ на 60% и более.

Спектральные данные обрабатывались с помощью программного обеспечения UnoMomento с отображением спектров флуоресценции Себ и гистограмм интегрального отношения пика флуоресценции Себ к лазерному пику.

### **2.3.2. Исследование оптических свойств тканей на лабораторной модели**

Объектом исследования *ex vivo* для апробирования и оптимизации методологии ФД и ФДТ был гепатобилиарный комплекс дикого кабана (лат. *Sus scrofa post mortem*). Гепатобилиарный комплекс с перевязанным общим желчным протоком в течение пяти часов после извлечения доставлен в лабораторию при температуре  $5\text{--}7^\circ\text{C}$ .

Измерялись спектры флуоресценции эндогенных флуорофоров различных сегментов гепатобилиарной системы кабана (Рисунок 2.37). Апробирована возможность проведения внутрипротоковой видеофлуоресцентной диагностики внутри- и внепеченочных желчных протоков в красном и ближнем инфракрасном (БИК) диапазонах с использованием двухканальной флуоресцентной видеосистемы УФФ-630/635-01-БИОСПЕК. Получены изображения в трех режимах: цветном (изображение, получаемое цветной камерой), флуоресцентном (изображение, получаемое ИК-камерой) и совмещенном (комбинация двух предыдущих режимов). Излучение доставлялось на поверхность исследуемой ткани через гибкий эндоскоп диаметром 1,2 и 2,8 мм. Плотность мощности находилась в диапазоне  $90\text{--}130 \text{ мВт/см}^2$ . Регистрация изображений производилась при фиксированной экспозиции – 65 мс. Количественная оценка интенсивности флуоресценции эндогенных флуорофоров стенки желчного пузыря, поверхности печени и внутренней поверхности желчного протока проводилась по индексам флуоресценции. Посредством лазерной спектроскопии осуществлялось разделение флуоресценции ФС и эндогенных флуорофоров для оценки влияния последних на величину индекса флуоресценции.

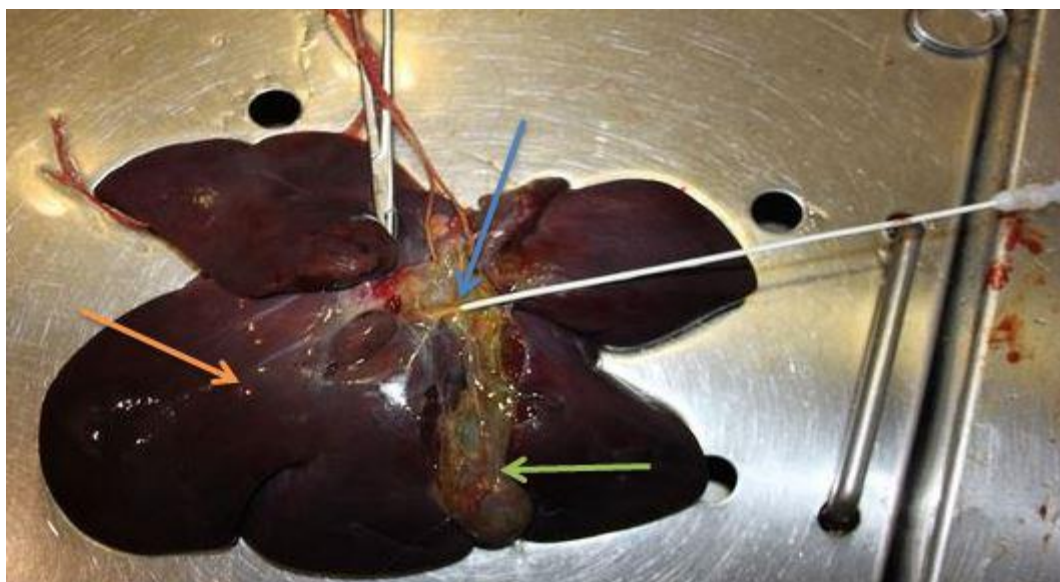


Рисунок 2.37 – Гепатобилиарный комплекс дикого кабана в эксперименте. Стрелки: желтая – печень; зеленая – желчный пузырь; синяя – интродьюсер установленный через пузырный в общий печеночный проток

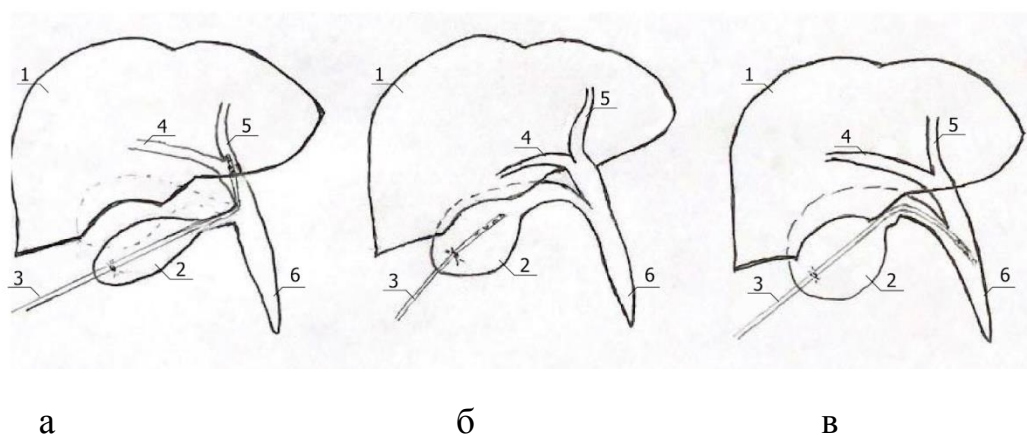


Рисунок 2.38 – Схема расположения интродьюсера, через который проводилась ФД: а) исследование внутripеченочных желчных протоков; б) исследование стенки желчного пузыря; в) исследование внепеченочного желчного протока. 1 – печень; 2 – желчный пузырь; 3 – интродьюсер; 4 – правый долевой проток; 5 – левый долевой проток; 6 – общий желчный проток

Для создания необходимой плотности мощности с целью получения фотодинамического эффекта определяли глубину зондирования (probing depth) лазерного излучения, на которой наблюдается возбуждаемая флуоресценция эндогенных флуорофоров. Данное исследование проводили во вне- и внутripеченочном протоках.

Флуоресценция возбуждалась полупроводниковым лазером с рабочей длиной волны  $\lambda_{\text{exc}} = 660$  нм, оценивалась возможность проведения ФД и ФДТ (фототераностики).

Для доставки лазерного излучения применялся гибкий оптоволоконный световод с цилиндрическим облучателем длиной 10 мм и диаметром 1.3 мм на дистальном конце, проводимый в протоки через интродьюсер (Рисунки 2.38, 2.39).

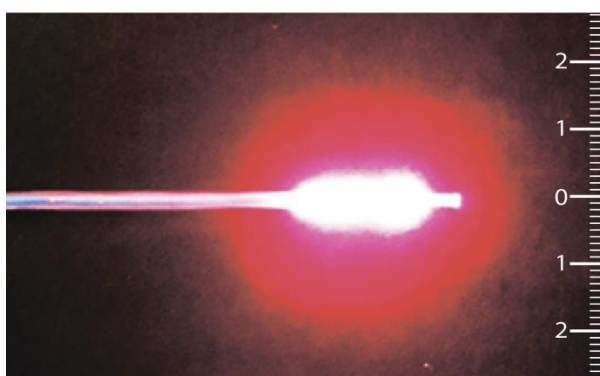


Рисунок 2.39 – Профиль распространения лазерного излучения от волокна с цилиндрическим диффузором

Глубина зондирования лазерного излучения в тканях измерялась в каждой позиции в двух вариантах: дистальный конец оптического волокна с цилиндрическим диффузором от полупроводникового лазера устанавливался внутри дренажа и вне его, свободно в просвете желчного протока. Далее с помощью спектрального анализатора регистрировались спектры флуоресценции на различных расстояниях от источника лазерного излучения, находящегося внутри протоков. Исследование проводилось при мощностях лазерного излучения  $P = 5$  мВт при плотности мощности лазерного излучения на поверхности желчного протока  $12$  мВт/см<sup>2</sup> (на пределе чувствительности спектрометра) и  $P = 300$  мВт при плотности мощности лазерного излучения на поверхности желчного протока  $714$  мВт/см<sup>2</sup> (ниже порогового значения чувствительности спектрометра) для сопоставления результатов в одном динамическом диапазоне, с шагом 1 и 2



мм от источника лазерного излучения. Регистрация спектров проводилась с установленной экспозицией – 100 мс.

### 2.3.3. Исследования на приматах

Приматы – лабораторные двойники человека. Результаты, полученные при биомедицинских исследованиях на этих животных, с высокой долей успешности могут быть экстраполированы на пациентов.

На приматах проводили исследование спектрально-флуоресцентных свойств тканей внутри- и внепеченочных желчных протоков для оптимизации алгоритмов фототераностики злокачественных новообразований гепатобилиарной системы человека.

Расчет количества животных на эксперимент проводился по «ресурсному уравнению» по Mead (формула 1):  $E = N - T$  (1), где  $E$  – ошибка степени свободы  $df$  (от 10 до 20);  $N$  – общее количество животных;  $T$  – число групп.

Экспериментальные работы выполнены на желчных протоках нечеловекообразных приматов *Papio hamadryas* в соответствии с требованиями Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или иных целей, ETS № 123 и Директивы №2010/63/EU, принятой Европейским Парламентом 22 сентября 2010 г., что позволит с высокой степенью точности перенести полученные данные на человека.

В рамках следующего этапа исследования изучены возможности и методологические аспекты фототераностики на 13 приматах рода Павиан Гамадрил (лат. *Papio hamadryas*) в возрасте от 10 до 22 лет (Рисунок 2.40). Исследование было разрешено локальным биоэтическим комитетом НИИ «Медицинской Приматологии» (протокол № 67А от 29.03.2021). В эксперименте участвовали взрослые особи, имеющие заболевания, не позволяющие находиться в общих вольерах и подверженные медицинской эвтаназии. Эксперимент на одиннадцати приматах проводился *statim post mortem* и на двух – *in vivo*.



Рисунок 2.40 – Павиан Гамадрил (лат. *Papio hamadryas*)

Критерии включения животных:

Павианы Гамадрилы (*Papio hamadryas*); возраст, вес и пол значения не имеют, не используемые в размножении.

Группы животных (Таблица 2.1):

А – (n=5) группа исследования оптических свойств тканей без ФС;

В – (n=6) группа исследования глубины зондирования лазерного излучения с использованием ФС-производных хлорина еб;

С– (n=2) экспериментальное исследование *in vivo* с проведением эндобилиарной ФД и ФДТ с ФС хлорин еб.

Таблица 2.1 – Основные параметры исследования на приматах

<b>Идентификационный номер примата</b>	<b>Фотосенсибилизатор (внутривенно)</b>	<b>Состояние примата</b>	<b>Исследование</b>
41760	Отсутствовал	statim post mortem	Ткани, взятые для контроля



Продолжение Таблицы 2.1

36810	Отсутствовал	statim post mortem	Ткани, взятые для контроля
38825	Отсутствовал	statim post mortem	оценка глубины зондирования 660 нм
45247	Отсутствовал	statim post mortem	оценка глубины зондирования 660 нм
41086	Отсутствовал	statim post mortem	оценка глубины зондирования 660 нм
39734	хлорин еб в воротную вену за 30 минут до исследования	statim post mortem	оценка глубины зондирования 660 нм и динамики накопления Себ в тканях печени, желчного пузыря и желчных протоков
32647	хлорин еб в воротную вену за 40 минут до исследования	statim post mortem	оценка глубины зондирования 660 нм и динамики накопления Себ в тканях печени, желчного пузыря и желчных протоков
34138	хлорин еб в воротную вену за 60 минут до исследования	statim post mortem	оценка глубины зондирования 660 нм и динамики накопления Себ в тканях печени, желчного пузыря и желчных протоков
41130	хлорин еб в воротную вену за 30 минут до исследования	statim post mortem	оценка глубины зондирования 660 нм и динамики накопления Себ в тканях печени, желчного пузыря и желчных протоков
41626	хлорин еб в воротную вену за 30 минут до исследования	statim post mortem	оценка глубины зондирования 660 нм и динамики накопления Себ в тканях печени, желчного пузыря и желчных протоков
38809	хлорин еб в воротную вену за 30 минут до исследования	statim post mortem	оценка глубины зондирования 660 нм и динамики накопления Себ в тканях печени, желчного пузыря и желчных протоков

## Продолжение Таблицы 2.1

39336	хлорин е6 в воротную вену	in vivo	оценка глубины зондирования 660 нм и динамики накопления Се6 в тканях печени, безопасные режимы ФДТ
42212	хлорин е6 за 2.5 часа до операции	in vivo	оценка глубины зондирования 660 нм и динамики накопления Се6 в тканях печени, безопасные режимы ФДТ

Все исследования в группах А и В проводились *statim post mortem*, положение на спине (Рисунок 2.41), после обработки передней грудной и брюшной стенки проводили лапаротомию, мобилизацию печени.



Рисунок 2.41 – Положение примата во время эксперимента, вскрытие брюшной полости

Мобилизовывали печеночно-дуоденальную связку и общий желчный проток (Рисунок 2. 42).

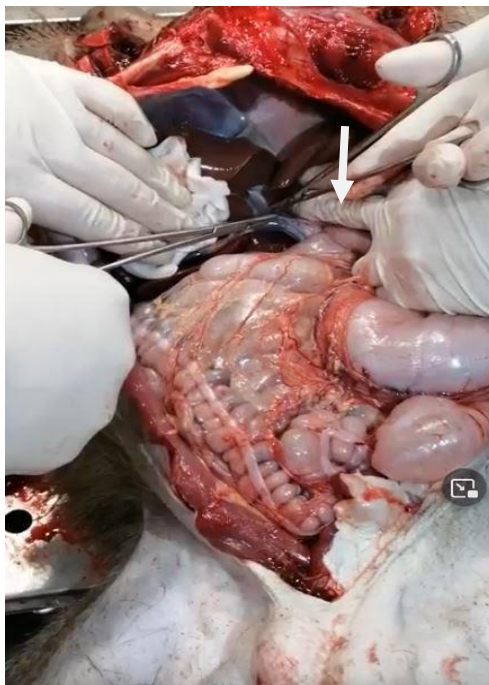


Рисунок 2.42 – Мобилизация ворот печени (стрелкой указана печеночно-дуоденальная связка)

В начале исследования проводили спектральную оценку эндогенных флуорофоров (Рисунок 2.43), после чего вводили ФС Себ в дозе 1 мг/кг в воротную вену (Рисунок 2.44). После введения оценивали пик накопления ФС в паренхиме печени, внутри- и внепеченочном желчном протоке при помощи лазерной спектроскопии с временными интервалами 0, 10, 20, 30, 40, 50 и 60 минут.

Для исследования динамики накопления Себ использовались: ЛЭСА-01-БИОСПЕК; сдвоенное волокно, состоящее из двух оптических волокон (кварцевое волокно диаметром 200 мкм, для регистрации обратно рассеянного и флуоресцентного излучения и кварцевое волокно диаметром 400 мкм, для доставки лазерного излучения); полупроводниковый лазер с длиной генерации 660нм и максимальной выходной мощностью 1 Вт.

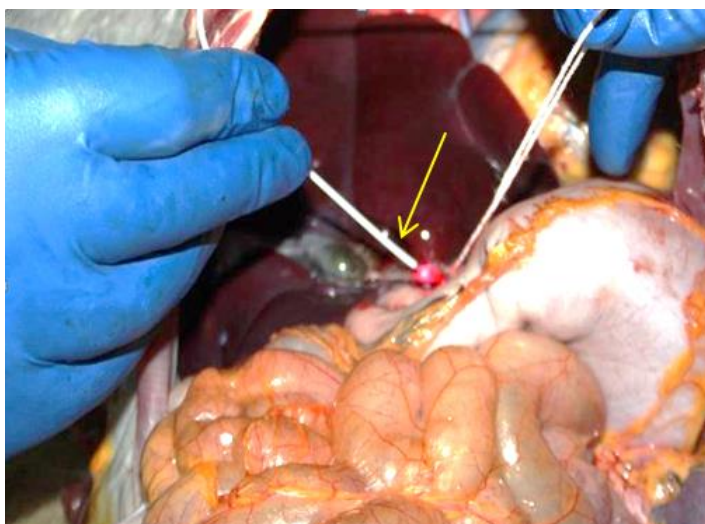


Рисунок 2.43 – Лазерная спектроскопия с оценкой эндогенных флуорофоров желчного протока. Стрелкой указано диагностическое волокно ЛЭСА-01-БИОСПЕК



Рисунок 2.44 – Введение фотосенсибилизатора в воротную вену. Голубая стрелка – шприц с разведенным фотосенсибилизатором Себ; зеленая стрелка – воротная вена

В процессе исследования определялось максимальное значение интенсивности флуоресценции ФС в гепатобилиарной зоне для оптимизации фотодинамической дозы. С этой целью, после мобилизации общего желчного протока, проводили холедохотомию. В просвет желчных протоков устанавливали дренаж 5 Fr (Рисунок 2.45 а, б).

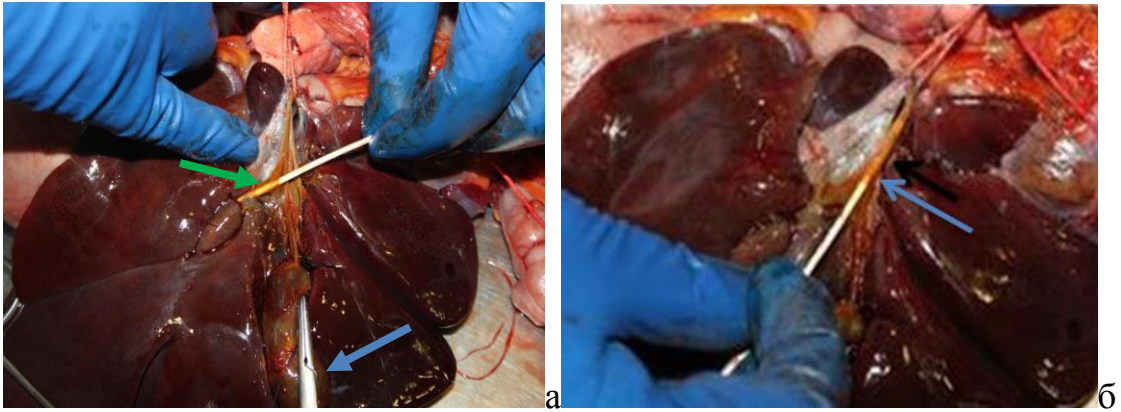


Рисунок 2.45 – Дренаживание желчных протоков через холедохотомическое отверстие: а) зеленая стрелка – интродьюсер проведен к конfluence, расположенному внутрипеченочно; голубая стрелка – желчный пузырь; б) стрелкой указан интродьюсер, установленный во внепеченочных желчных протоках

Для отработки методики внутрипротоковой видеофлуоресцентной диагностики, через интродьюсер устанавливали эндоскопы диаметром 1.2 и 2.8 мм (Рисунок 2.46).



Рисунок 2.46 – Гибкий эндоскоп (голубая стрелка) через интродьюсер (черная стрелка) проведен в просвет желчных протоков



Через дренаж установлен оптический диффузор с цилиндрическим облучателем на дистальном конце 20 мм (Рисунок 2.47).



Рисунок 2.47 – Оптический диффузор установлен в просвете общего печеночного протока (стрелкой указан интродьюсер, через который в просвет протока установлен оптический диффузор)

Затем проводили измерение индексов флуоресценции, рассчитанных как отношение интегральной интенсивности флуоресценции в диапазоне 720–780 нм к интегральной интенсивности РНЛИ в диапазоне 650–670 нм, в разных временных точках в тканях печени, желчного протока и желчного пузыря.

Далее для корректной регистрации профиля распределения проходящего излучения на определенной толщине к поверхности печени прикладывалась линейка перпендикулярно ходу протока. Нулевая отметка линейки фиксировалась на предполагаемом центре протока, и с шагом в 1 мм регистрировался профиль проходящего лазерного излучения от 0 до 10 мм (Рисунки 2.48; 2.49 а, б).

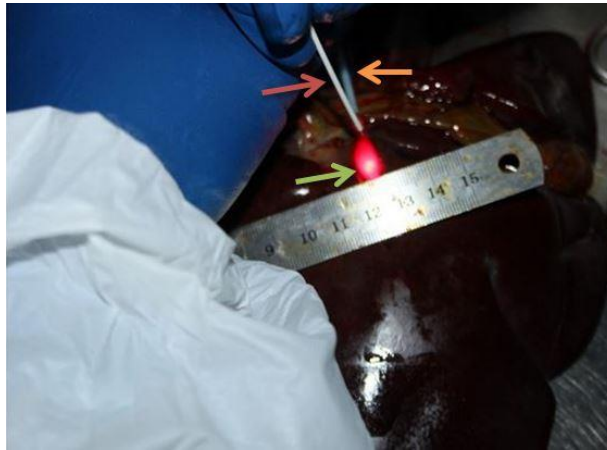


Рисунок 2.48 – Измерение глубины зондирования лазерного излучения в тканях печени и печеночно-дуоденальной связки. Стрелки: желтая – дренаж и установленный в него оптический диффузор, подающий лазерное излучение; красная – диагностический оптический зонд ЛЭСА; зеленая – внутритканевое распространение лазерного излучения из протока в окружающую паренхиму печени

Положение рассеивающего свет диффузора в протоке оценивали в двух положениях: внутри дренажа и при свободном расположении диффузора в центре желчного протока.

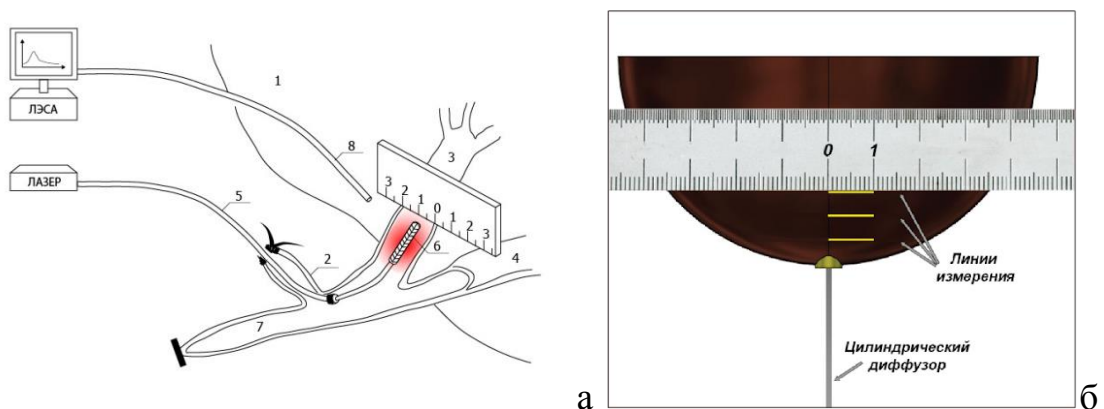


Рисунок 2.49 – Схема и модель проведения измерений глубины распространения лазерного излучения в желчных протоках и окружающих тканях: (а) схема эксперимента, 1 – печень; 2 – культя пузырного протока; 3 – правый долевого проток; 4 – левый долевого проток; 5 – интродьюсер; 6 – оптический диффузор с цилиндрическим рассеивателем на дистальном конце; 7 – общий желчный проток; б) модель проведения эксперимента: в желчный проток вводился цилиндрический диффузор с длиной излучательной части 20 мм и диаметром 0,8 мм. На определенной толщине к поверхности печени прикладывалась стерильная линейка перпендикулярно ходу протока, и с поверхности печени регистрировался сигнал лазерного излучения

После оценки всех необходимых параметров эксперимент завершали медицинской эвтаназией (ксилоэзолетил), для забора биологических тканей с целью дальнейшего морфологического исследования.

**Экспериментальные животные группы С исследования in vivo** – приматы вида Павиан Гамадрил:

1. Вес: 25.30 кг; Идентификационный номер: № 39336 Пол: М; Возраст: 15 лет. Введение Себ в концентрации 5 мг/мл интраоперационно в воротную вену с оценкой накопления препарата в тканях печени и желчных протоках;

2. Вес: 23.75 кг; Идентификационный номер: № 42212 Пол: М; Возраст: 10 лет. Введение Себ до начала операции внутривенно (капельно) в концентрации 1 мг/кг в течение часа.

После накопления препарата проводилось облучение трех областей тканей печени с разными энергетическими дозами, а также участка общего печеночного протока.

Каждая область облучения промаркирована коагулятором для дальнейшего забора образцов с целью морфологического исследования изменений.



Рисунок 2.50 – Положение примата на операционном столе



Исследование проводили под комбинированным эндотрахеальным наркозом, с выводом из эксперимента путем медикаментозной эвтаназии через 72 часа для забора препаратов и последующего патоморфологического исследования.

Положение примата на операционном столе – горизонтальное, на спине, на плотном резиновом матрасе, покрытом простыней, под голову уложена клеенчатая подушка (Рисунок 2.50). Нижние конечности фиксированы выше коленных суставов ремнями. Верхние конечности уложены на специальную подставку для осуществления анестезиологического пособия. Голова закрыта над изголовьем стерильной простыней для защиты дыхательных путей.

Брюшная стенка побрита, обработана многократно растворами антисептиков. Операционное поле укрыто и отгорожено от нестерильных зон одноразовым операционным бельем.

Анестезиологическое пособие включало в себя вариант общей анестезии с ингаляционным наркозом с подачей лекарственных препаратов и внешнее дыхание через интубационную трубку, введенную в трахею.

Комплект хирургических инструментов состоял из классического набора для проведения лапаротомии, холецистэктомии. Дополнительно для дренирования желчных протоков и проведения фототераностики использовались интродьюсер с клапаном Чек-Фло 8 Fg, гибкий эндоскоп 1,2 мм, волоконно-оптический спектрометр ЛЭСА, диагностическое волокно, HeNe лазер, источник лазерного света 660 нм, терапевтическое волокно.

После лапаротомии проведена мобилизация печечно-дуоденальной связки с выделением ее элементов (Рисунки 2.51 и 2.52).



Рисунок 2.51 – Мобилизация общего желчного и общего печеночного протоков (стрелки: оранжевая – желчный пузырь; черная – общий желчный проток; голубая – общий печеночный проток)

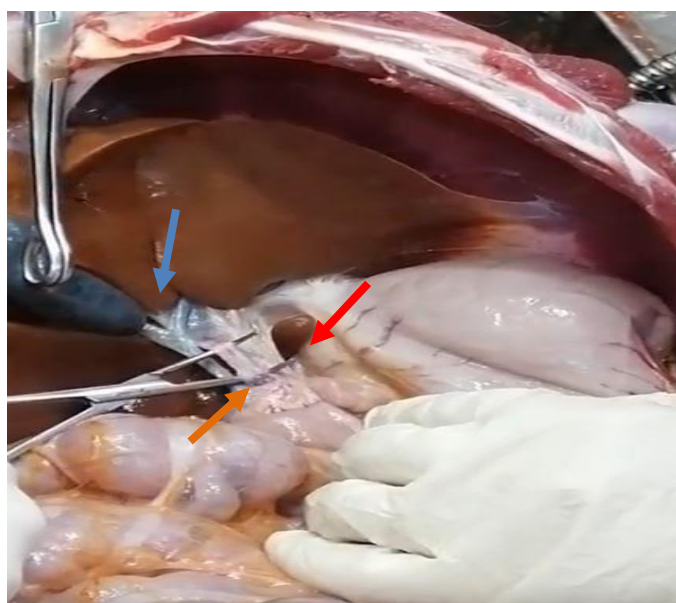


Рисунок 2.52 – Выделение элементов печеночно-дуоденальной связки (стрелки: синяя – желчный пузырь; оранжевая – общий желчный проток; красная – воротная вена)

Через холедохотомическое отверстие в желчный проток установлен интродьюсер с клапаном Чек-Фло 8 Fr, дистальный конец которого фиксировался в проксимальных отделах желчных протоков. Через интродьюсер в желчные протоки проведен дренаж 5Fr с оптическим диффузором с цилиндрическим облучателем на дистальном конце (20 мм) (Рисунок 2.53).



Рисунок 2.53 – Дренаж (синяя стрелка) и оптический диффузор (черная стрелка) через интродьюсер (оранжевая стрелка) проведены в просвет желчного протока

Проведено измерение спектров накопления ФС в тканях печени и желчных протоков с измерением глубины зондирования лазерного излучения (Рисунок 2.54).

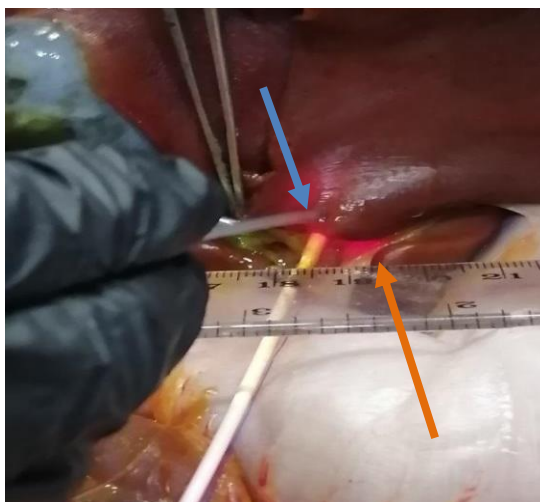


Рисунок 2.54 – Измерение спектров флуоресценции Себ у примата после введения ФС в воротную вену (синяя стрелка – диагностический зонд; оранжевая стрелка – оптический диффузор, установленный через дренаж в просвет желчных протоков)

Примату № 2 аналогичным образом проведена лапаротомия с мобилизацией печени.

ФС (хлорин е6) введен заранее, внутривенно; через 2,5 часа после введения препарата проведена лазерная спектроскопия с целью подтверждения накопления ФС паренхимой печени и желчным протоком.

Для изучения возможных доз лазерного облучения паренхимы печени и желчных протоков проведено ФДТ с источником лазерного излучения с плотностью мощности  $805 \text{ мВт/см}^2$  и длиной волны  $665 \pm 3 \text{ нм}$ .

Обоим приматам проводили лазерное облучение паренхимы в области ворот печени с суммарной световой дозой 50, 150 и 300  $\text{Дж/см}^2$ , с использованием оптического волокна с торцевым облучателем на дистальном конце (рисунок 2.55).

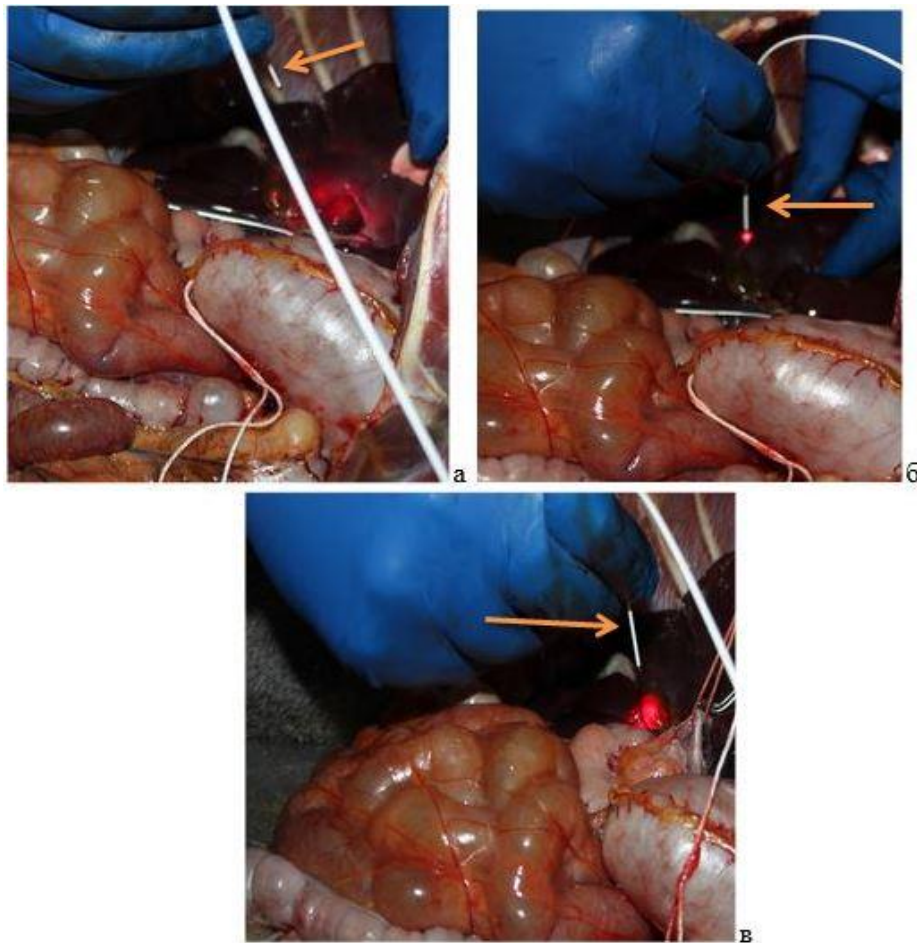


Рисунок 2.55 – Полипозиционная фотодинамическая терапия паренхимы печени с суммарной световой дозой: а)  $50 \text{ Дж/см}^2$ ; б)  $150 \text{ Дж/см}^2$ ; в)  $300 \text{ Дж/см}^2$  (стрелками указано оптическое волокно с торцевым облучателем на дистальном конце)

Облучение внутри- и внепеченочного протоков проводили с суммарной световой дозой  $150 \text{ Дж/см}^2$  с применением оптического диффузора с цилиндрическим облучателем на дистальном конце длиной 20 мм (Рисунок 2.56).

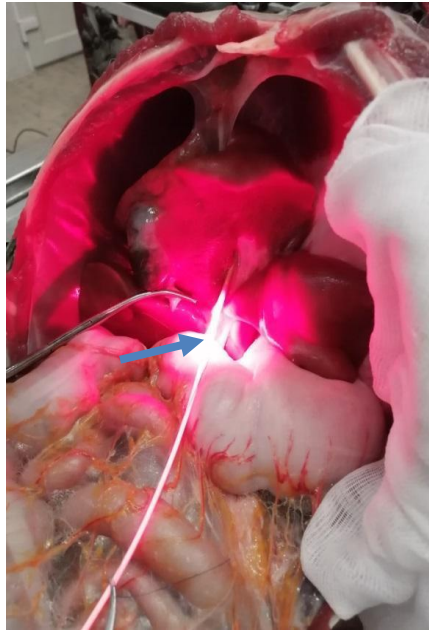


Рисунок 2.56 – Внутрипротоковое фотодинамическое воздействие, оптический диффузор (указан стрелкой) установлен в просвете общего печеночного протока, суммарная световая доза  $150 \text{ Дж/см}^2$

Первая область паренхимы печени облучалась в течение 62 секунд с выходной плотностью мощности  $805 \text{ мВт/см}^2$ . Доза облучения составила  $50 \text{ Дж/см}^2$ .

Вторая область паренхимы печени облучалась в течение 3 минут 6 секунд с выходной плотностью мощности  $805 \text{ мВт/см}^2$ . Доза облучения составила  $150 \text{ Дж/см}^2$ .

Третья область паренхимы печени облучалась в течение 6 минут 12 секунд с выходной плотностью мощности  $805 \text{ мВт/см}^2$ . Доза облучения составила  $300 \text{ Дж/см}^2$ .

Общий печеночный проток облучали в течение 3 минут 6 секунд с выходной плотностью мощности  $805 \text{ мВт/см}^2$ . Доза облучения составила  $150 \text{ Дж/см}^2$ .

Через три дня после операции при аутопсии производили забор тканей печени и желчных протоков для морфологического исследования. Материал, взятый для гистологического исследования, фиксировался в 10% нейтральном растворе формалина. Материал помещался в специальные промаркированные (с указанием инвентарного номера животного и даты проведения вскрытия) пластиковые контейнеры. Далее проводилась стандартная гистологическая обработка материала с последующей заливкой в парафиновую среду HISTOMIX (ООО «БиоВитрум», Санкт-Петербург, Россия). Из полученных парафиновых блоков приготавливали срезы толщиной 5–7 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином. Обзорный морфологический анализ выполнен на биологическом микроскопе для лабораторных исследований AXIO LAB.A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Для микрофотографирования использовалась цифровая камера AxioCam 105 color (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). У всех животных патологических изменений (на макро- и микроскопическом уровнях), обусловленных токсичностью, местно-раздражающим действием, иммунотоксичностью, иммуногенностью фотосенсибилизаторов, в исследуемых внутренних органах и тканях выявлено не было. Все исследуемые органы и ткани сохраняли типичную анатомическую и гистологическую структуру.

Для анализа процессов, произошедших в тканях вследствие лазерного воздействия, у приматов брали биоптат из участка желчного протока, в котором располагался цилиндрический диффузор, и фиксировали его в 10% растворе формалина. Зафиксированный препарат помещали на платформу со средой для заморозки Neg-50™ (Richard-Allan Scientific™, США) и быстро замораживали при -26°C непосредственно в камере криостата микротомы Microm HM 540 (Thermo Fisher Scientific Microm International GmbH, USA). Замороженный препарат нарезался толщиной 15 μm. Анализ образцов проводили сразу же после их приготовления с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM-710-NLO (Carl Zeiss Microscopy, Germany).



## 2.4. Клиническое исследование

В работе были реализованы два метода флуоресцентной диагностики с использованием спектроскопического анализа тканей и видеофлуоресцентного модуля для минимально инвазивного вмешательства.

С целью обоснования использования видеофлуоресцентной диагностики злокачественных новообразований данная методика была отработана в клинической практике при опухолях доступных локализаций.

Получен патент на полезную модель (RU203175U1 Видеофлуоресцентное устройство для анализа внутритканевого распределения фотосенсибилизаторов дальнего красного и ближнего инфракрасного диапазонов злокачественных новообразований головы и шеи).

Ключевая концепция заключалась в возможности ФД злокачественных опухолей, с использованием ФС хлоринового ряда (хлорин еб) в масштабе реального времени. Данное устройство позволило интраоперационно получать флуоресцентное изображение патологического очага, отличаемое от неизменной нормальной ткани.

В данной работе разработаны и внедрены в клиническую практику способы ФД опухолевого поражения различных локализаций (кожные покровы, органы головы и шеи, шейка матки, желудок), доступных для проведения исследования с целью отработки методов и последующего их использования при более сложных локализациях, к которым относится рак желчных протоков.

В работе представлен разработанный метод персонализированного контроля по изменению интенсивности флуоресценции в процессе облучения (фотобличинг). Показана возможность применения видеофлуоресцентной системы как альтернативного метода оценки концентрации ФС в тканях.

Патент на изобретение (19)RU(11)2767264(13)C1 – Способ внутрипротоковой фототераностики холангиоцеллюлярного рака.

Продемонстрировано первое в клинической практике применение способа интраоперационной внутрипротоковой видеофлуоресцентной диагностики ХЦР с

последующей ФДТ. Предложен способ фототераностики, состоящий из флуоресцентной диагностики во время фотодинамической терапии ХЦР рака в режиме реального времени, с контролем фотобличинга с применением фотосенсибилизаторов на основе хлорина еб.

Предложен способ проведения фототераностики, включающий в себя флуоресцентную диагностику во время фотодинамической терапии холангиоцеллюлярного рака в режиме реального времени с фотосенсибилизаторами производными хлорина еб. Метод позволяет в режиме реального времени одновременно проводить фотодинамическую терапию и флуоресцентную диагностику, уменьшая время процедуры, увеличивая ее эффективность за счет визуального контроля.

Получен патент на изобретение (19)RU(11)2021127035(13)А – Устройство для проведения фотодинамической терапии с возможностью одновременного спектрально-флуоресцентного контроля фотобличинга фотосенсибилизатора.

Техническим результатом изобретения является повышение эффективности фотодинамической терапии за счет обеспечения возможности одновременного контроля процесса фотодинамической терапии в режиме реального времени и упрощения эксплуатации. Предлагаемое устройство для проведения фотодинамической терапии с возможностью одновременного спектрально-флуоресцентного контроля фотобличинга фотосенсибилизатора позволяет прицельно облучать выделенные зоны патологической ткани с одновременной оценкой фотобличинга фотосенсибилизатора в процессе лазерного облучения. Данное изобретение является важным, так как длина волны излучения 660 нм, которая ранее использовалась только для проведения ФДТ, может быть использована и для ФД.



### **2.4.1. Фототераностика при опухолях доступных локализаций (отработка методики)**

Данная методика использована у больных, находившихся на лечении в Университетской клинической больнице №1 Первого МГМУ им. Сеченова с 2011 года.

Все пациенты, ознакомленные с целью исследования, протоколом лечения, подписали согласие на участие в нем.

#### **В исследовании приняли участие 32 пациента с диагнозом:**

- рак кожи (n=18): плоскоклеточный (n=2) и базальноклеточный рак (n=16); возраст пациентов от 22 до 53 лет;

- рак органов головы и шеи (n=4): правой голосовой связки (n=1), трахеи (n=1), боковой поверхности языка (n=1), левой околоушной слюнной железы и левой голосовой связки (n=1); возраст больных от 58 до 94 лет;

- дисплазия и рак шейки матки, ассоциированная с вирусом папилломы человека (n=10): дисплазия CIN III (n=6); CIN II (n=2), CIN I (n=1), CIS (n=1); возраст от 26 до 46 лет.

Диагнозы были подтверждены биопсией, которая получена до ФДТ.

Границы патологических областей уточнялись с помощью совместного применения спектрально- и видеофлуоресцентной диагностики.

Лечение пациентов методом ФДТ осуществлялось в 4 этапа: 1) внутривенное введение в организм больного ФС (хлорин е6); 2) проведение видеофлуоресцентной диагностики; 3) проведение спектрально-флуоресцентной диагностики; 4) облучение опухолевой ткани, накопившей ФС, светом с соответствующей длиной волны, контроль фотобличинга.

Результаты будут представлены в соответствующей главе.

## **2.4.2 Дизайн клинического исследования фототераностики в минимально инвазивном лечении стенозирующего холангиоцеллюлярного рака (организация работы)**

Для достижения поставленной цели проведен анализ результатов обследования и лечения 100 пациентов, находившихся на лечении в двух медицинских центрах: ФГАО ВО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)» в университетской клинической больнице № 1 с 2011 по 2020 годы и Государственном бюджетном учреждении Республики Дагестан «Республиканская клиническая больница» (ГБУ РД «РКБ») в тот же период времени.

В исследование были включены пациенты, которые поступали в клинику с клинической картиной механической желтухи вследствие опухолевого стеноза (стриктурой) проксимальных отделов желчных протоков, обусловленным холангиоцеллюлярным раком.

Критерии включения в исследование:

- мужчины и женщины в возрасте старше 18 лет;
- наличие опухолевой стриктуры желчных протоков с механической желтухой;
- поражение общего печеночного протока, конfluence долевых протоков, правого и/или левого долевых протоков;
- поражение долевого и не более двух сегментарных протоков;
- распространенность опухолевого процесса, не позволяющего выполнить радикальную операцию или функционально-неоперабельные больные;
- функциональный статус по индексу Карновски 40% и более; по ECOG 3 балла и менее.

Критерии исключения:

- опухоль в желчном пузыре или пузырном протоке;
- резектабельные опухоли желчных протоков, по решению онкологического консилиума;

- любые другие злокачественные новообразования, которые могут повлиять на ожидаемую двухлетнюю выживаемость или могут вызвать затруднения при дифференциации с ХЦР;

- врожденный или приобретенный иммунодефицит, психические расстройства, сопутствующий цирроз печени с паренхиматозной желтухой;

- проводившаяся когда-либо фотодинамическая терапия опухоли желчных протоков или любые другие хирургические операции на печени и желчных протоках, связанные с ХЦР.

Пациенты, соответствующие вышеуказанным критериям включения/исключения, при помощи рандомизационной таблицы включены в две группы, основную и группу сравнения (контрольную):

- группа А (основная n=50) – обследование и лечение проведено с использованием комбинированного способа, включающего чрескожное чреспеченочное желчеотведение под контролем УЗИ и рентгеноскопии, с последующей внутрипротоковой видеофлуоресцентной диагностикой и фотодинамической терапией (фототераностикой), билиарное стентирование желчных протоков как окончательный вариант желчеотведения;

- группа Б (сравнения n=50) – обследование и лечение проведено с использованием чрескожного чреспеченочного желчеотведения под контролем УЗИ и рентгеноскопии, с окончательным вариантом желчеотведения – стентирование желчных протоков саморасширяющимся билиарным стентом.

Контрольный осмотр пациентов проводился через 1, 3, 6 месяцев, далее каждые 6 месяцев, в зависимости от медианы выживания. Проводилось УЗИ гепатобилиарной зоны, при необходимости МСКТ с в/в контрастированием и лабораторные исследования.

Оценка результата лечения проводилась по реканализации стеноза, длительности безрецидивного безжелтушного периода и медианы выживания больных.

Для обработки материалов исследования и их последующего анализа была создана база данных, в которую вносились анамнестические данные, результаты

клинических, лабораторных, лучевых инструментальных методов, данные эндовидеофлуоресцентного исследования до и после ФДТ, данные морфологического исследования биопсийного материала, способ лечения больного, сроки появления рецидивов, продолжительность жизни больного.

#### **2.4.3. Основные характеристики больных, вошедших в исследование**

В клиническую группу включены 100 пациентов, которые разделены на две группы по 50 больных. Все больные поступили на лечение с клинической картиной механической желтухи, вследствие опухолевого стеноза (стриктуры) проксимальных отделов желчных протоков, обусловленным холангиоцеллюлярным раком. Первая группа – основная (n=50) – находилась на лечении в ФГАО ВО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)» в университетской клинической больнице № 1 с 2011 по 2020 годы. Вторая группа – сравнения (n=50) – состояла из больных ГБУ РД «РКБ», находившихся на лечении в тот же период времени.

Пациентам обеих групп для купирования явлений желтухи проводилось чрескожное чреспеченочное желчеотведение под контролем УЗИ и рентгеноскопии. Окончательным вариантом желчеотведения стало эндопротезирование опухолевой стриктуры нитиновым саморасширяющимся стентом. При этом больным в основной группе проведено комбинированное лечение: желчеотведение с локальной противопухоловой фотодинамической терапией и стентированием желчных протоков.

Мужчин было 47, женщин – 53 (Таблица 2.2).

Таблица 2.2 – Распределение больных по полу

Пол	Группы		ВСЕГО
	Основная	сравнения	
мужчины	23	24	47
женщины	27	26	53
ИТОГО	50	50	100

Таблица 2.3 – Распределение больных по возрасту

Возраст	Группы		ВСЕГО
	основная	сравнения	
до 40 лет	2	1	3 (3%)
41–50 лет	5	6	11 (11%)
51– 60 лет	7	7	14 (14%)
61–70 лет	13	14	27 (27%)
71–80 лет	15	13	28 (28%)
81–90 лет	7	8	15 (15%)
свыше 90	1	1	2 (2%)
ИТОГО	50	50	100 (100%)

Из Таблицы 2.3 видно, что почти 2/3 больных приходится на возраст от 61 до 90 лет. Средний возраст в основной группе составил 64.5 [95% ДИ: 60.9–68.1], в группе сравнения 65.1 [95% ДИ: 61.3–68.8].

Распределение больных с опухолями проксимальных желчных протоков в зависимости от стадии заболевания, основанной на классификации TNM 7 издания 2010 года, представлено в Таблице 2.4.

Таблица 2.4 – Распределение больных с опухолями проксимальных желчных протоков по классификации TNM

Стадия (TNM)	Группы		ВСЕГО
	основная	сравнения	
0	-	-	0
I	-	-	0
II	1	2	3 (3%)
IIIA	3	3	6 (6%)
IIIB	22	23	45 (45%)
IVА	14	13	27 (27%)
IVB	10	9	19 (19%)
ИТОГО	50	50	100 (100%)

Основную группу составляли больные с механической желтухой, обусловленной опухолевым поражением проксимальных желчных протоков

(96%). У двух больных (4%) обнаружен ХЦР общего желчного и общего печеночного протока, однако пациенты признаны неоперабельными из-за пожилого возраста с наличием сопутствующих заболеваний. Длительность желтухи у 35 больных (70%) составила более одного месяца. Тяжесть состояния зависела от степени холестаза, сопровождающегося у 34 больных (68%) холангитом. Все пациенты были признаны неоперабельными по наличию сопутствующих заболеваний и/или распространенностью опухолевого процесса на обе доли печени.

Группу сравнения (n=50) составили неоперабельные пациенты с поражением проксимальных желчных протоков в 46 случаях (92%), у 8 % (четырёх больных) был рак общего печеночного и общего желчного протока без поражения супрапапиллярной части. Длительность желтухи у 33 больных (66%) составила более одного месяца. Тяжесть состояния зависела от степени холестаза, сопровождающегося у 32 больных (64%) холангитом. В обеих группах преобладал проксимальный билиарный блок.

При высоком блоке имеются особенности ведения больных и выполнения чрескожных чреспеченочных манипуляций связанные с локализацией стриктуры.

Оценивали билиарный стеноз при холангиографии согласно пяти вариантам обструкции желчевыводящих путей при этой локализации по классификации Bismuth-Corlette (Рисунок 2.57, Таблица 2.5).

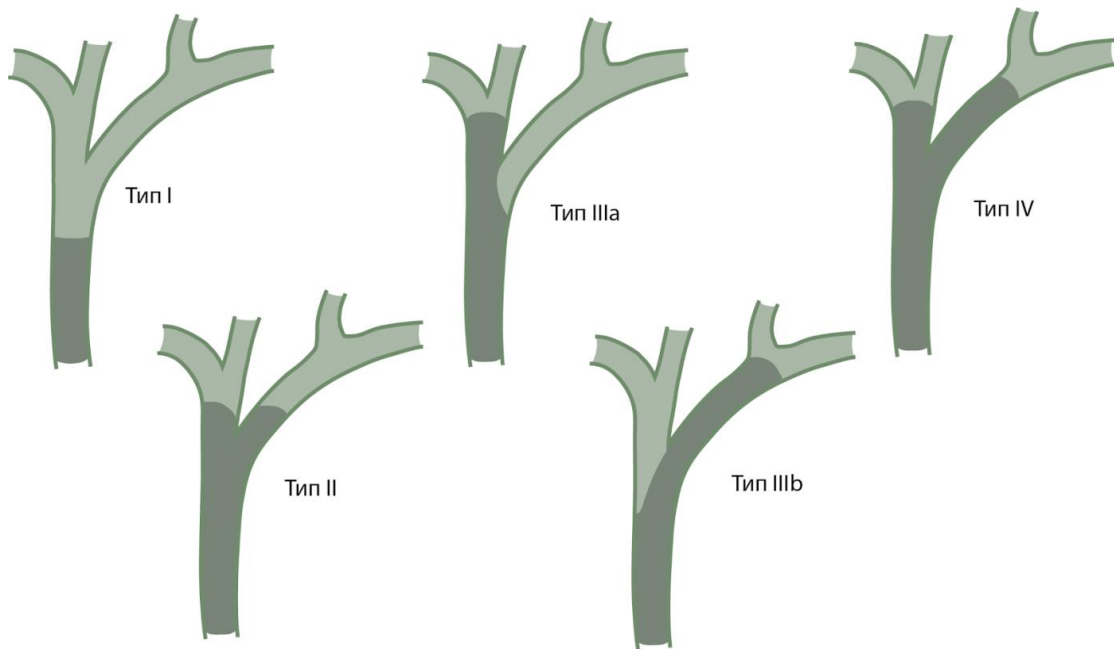


Рисунок 2.57 – Типы опухоли ворот печени по классификации Bismuth-Corlette

Таблица 2.5 – Распределение больных в зависимости от локализации опухолевого стеноза

Локализация опухоли согласно классификации Bismuth-Corlette	Группы		ВСЕГО
	основная	сравнения	
1 тип	4	6	10 (10%)
2 тип	6	5	11 (11%)
3А тип	8	8	16 (16%)
3Б тип	9	11	20 (20%)
4 тип	23	20	43 (43%)
ИТОГО	50	50	100 (100%)



Опухолевая стриктура с локализацией в общем печеночном протоке (Bismuth-Corlette I тип) у 10, с локализацией в конfluence долевых протоков (Bismuth-Corlette II тип) – 11 больных; стриктура с переходом на правый долевой проток (Bismuth-Corlette IIIA тип) – у 16, на левый долевой проток (Bismuth-Corlette IIIB тип) – 20 больных; при поражении обоих долевых протоков одновременно (Bismuth-Corlette IV тип) – у 43 пациентов, при этом при IV типе у 26 больных отмечено полное разобщение долевых протоков, потребовавшее билобарного желчеотведения.

У 90% пациентов преобладал перидуктальный тип поражения желчных протоков, у шести (6%) – нодулярный (масс-образующий), внутрипротоковый – у четырех (4%) больных. У 91% больных выявлено поражение лимфатических узлов на основании инструментальных методов исследования.

Все пациенты поступали в стационар с механической желтухой (МЖ) опухолевого генеза, выявленной на основании клинико-инструментальных данных. Тяжесть состояния этих больных напрямую зависит от тяжести механической желтухи. Кроме того, летальность и послеоперационные осложнения напрямую зависят от тяжести механической желтухи и ее причины: опухолевой или неопухолевой. Механическая желтуха не имеет какого-либо одного оценочного критерия, это совокупность факторов. Для оценки этой тяжести МЖ мы использовали классификацию, предложенную в 2012 году Э.И. Гальпериным [9], в которой выделяют три группы больных, в зависимости от уровня общего билирубина, общего белка сыворотки крови, наличия осложнений механической желтухи (Таблица 2.6) и этиологический фактор. Оценка производится в баллах, которые потом суммировались.

Уровень общего билирубина (мкмоль/л):

<60 – 1 балл,

60–200 – 2 балла,

>200 – 3 балла.

Уровень общего белка сыворотки крови (мкмоль/л):

>65 – 1 балл;

65–55– 2 балла;

<55 – 3 балла.

Каждому осложнению на фоне механической желтухи присваивали два балла.

Таблица 2.6 – Сопутствующие механической желтухе осложнения, выявленные у пациентов обеих групп (n=100)

Осложнение (клинические проявления)	группа А	группа Б
Холангит	34	32
Гепатоцеребральная недостаточность	47	46
Почечная недостаточность	11	14
Желудочно-кишечное кровотечение	2	1
Полиорганная недостаточность (3 и более осложнений)	13	15

У всех больных была желтуха опухолевого генеза, согласно принятой классификации, критерий – этиологический фактор, подразумевал добавление такого же количества баллов состоянию больного, сколько и осложнение, в зависимости от уровня билирубина. С учетом того, что чем выше уровень общего билирубина, соответственно длительность МЖ, тем изменения в организме,

связанные с этим, значительно утяжеляют состояние больного, наличие опухоли и осложнений увеличивали кратно уровню общего билирубина.

При уровне общего билирубина 1 балл осложнение или опухоль оценивались в 2 балла; при билирубинемии 2 бала – осложнение и опухоли оценивались в 4 балла и, соответственно, при билирубинемии 3 – в 6 баллов.

Таким образом, согласно классификации, пациенты включены в классы тяжести механической желтухи:

A  $\leq$  5 баллов,

B – 6–12 баллов,

C – более 12 баллов.

### **Примеры расчета:**

Желтуха опухолевого генеза (2 балла), уровень общего билирубина 60 мкмоль/л (1 балла), уровень общего белка сыворотки крови 66 мкмоль/л (1 балла), отсутствуют осложнения (0 баллов): в сумме получается 4 балла, класс А.

Желтуха опухолевого генеза (4 баллов), уровень общего билирубина 180 мкмоль/л (2 балла), уровень общего белка сыворотки крови 58 мкмоль/л (2 балла), имеется холангит (4 баллов): в сумме получается 12 баллов, класс В.

Желтуха опухолевого генеза (6 баллов), уровень общего билирубина 237 мкмоль/л (3 балла), уровень общего белка сыворотки крови 56 мкмоль/л (2 балла), имеется холангит (6 баллов): в сумме получается 17 баллов, класс С.

Кроме того, у всех пациентов были выявлены от двух до пяти сопутствующих заболеваний различной степени тяжести: ишемическая болезнь сердца, постинфарктный кардиосклероз, атеросклероз аорты, стенокардия, нарушение ритма сердца, гипертоническая болезнь, дисциркуляторная энцефалопатия, сахарный диабет, хронический аутоиммунный тиреоидит, хронический бронхит, хронический холецистит, мочекаменная болезнь, вирусные гепатиты, панкреонекроз и другие.

Отказ от радикального хирургического лечения обусловлен наличием тяжелых соматических заболеваний и/или преклонным возрастом у 71 пациента, классом С тяжести механической желтухи, распространенностью опухолевого

процесса, с билобарным поражением паренхимы печени и элементов печеночно-дуоденальной связки, регионарных лимфатических узлов.

Состояние больных оценивали по шкале ECOG (Таблица 2.7) и индексу Карновски (Таблица 2.8).

Таблица 2.7 – Оценка состояния больных по шкале ECOG

Шкала ECOG	Балл
Больной полностью активен, способен выполнять все, как и до заболевания	0
Больной неспособен выполнять тяжелую, но может выполнять легкую или сидячую работу	1
Больной лечится амбулаторно, способен к самообслуживанию, но не может выполнять работу. Более 50% времени бодрствования проводит активно – в вертикальном положении	2
Больной способен лишь к ограниченному самообслуживанию, проводит в кресле или постели более 50% времени бодрствования	3
Инвалид, совершенно не способен к самообслуживанию, прикован к креслу или постели	4

Таблица 2.8 – Оценка состояния больных по индексу Карновски

Индекс Карновски %	Значение
100	Состояние нормальное, нет жалоб и симптомов заболевания

Продолжение Таблицы 2.8

90	Нормальная активность сохранена, но имеются незначительные симптомы заболевания
80	Нормальная активность возможна при дополнительных усилиях, при умеренно выраженных симптомах заболевания
70	Больной обслуживает себя самостоятельно, но не способен к нормальной деятельности или работе
60	Больной иногда нуждается в помощи, но в основном обслуживает себя сам
50	Больному часто требуется помощь и медицинское обслуживание
40	Большую часть времени больной проводит в постели, необходим специальный уход и посторонняя помощь
30	Больной прикован к постели, показана госпитализация, хотя терминальное состояние не обязательно
20	Сильные проявления болезни, необходима госпитализация и поддерживающая терапия
10	Умиравший больной, быстрое прогрессирование заболевания

100% по индексу Карновски соответствует 0 баллов по ECOG. 90–80% равно 1 баллу; 70–60% – 2 балла; 50–40% – 3 балла; 30–10% – 4 балла.

#### 2.4.4. Инструментальные методы исследования

Хирургическое лечение начинали с выполнения декомпрессии желчных протоков.

Всем пациентам обеих групп проведено чрескожное чреспеченочное дренирование желчных протоков (ЧЧХ). Данный вариант желчеотведения принят как основной, поскольку в данной работе мы разрабатывали методологию и оценивали возможности внутрипротоковой фотодинамической тераностики стенозирующего ХЦР с локализацией в проксимальных отделах желчных протоков, чрескожный доступ к которым считали оптимальным. Окончательным вариантом восстановления пассажа желчи по протокам у всех больных было стентирование стриктуры саморасширяющимся нитиноловым стентом.

Все больным в обеих группах проводили инструментальные методы исследования (таблица 2.9).

Таблица 2.9 – Методы инструментальной диагностики

<b>Метод исследования</b>	<b>Количество больных (n=100)</b>
ультразвуковое исследование (УЗИ)	100
мультиспиральную КТ (МСКТ) с в/в контрастированием	100
чрескожная чреспеченочная холангиография (ЧЧХГ)	100

УЗИ выполняли конвексными датчиками электронного сканирования с частотой 3,5 МГц. В основной группе проводили исследование на аппарате Hitachi Aloka ProSound Alpha 6 Premier (Япония), в группе сравнения – LOGIQ S7

Expert General Electric (США). Оба аппарата экспертного уровня позволяли проводить исследование в В-режиме, цветного и энергетического доплеровского картирования.

Всем пациентам выполняли компьютерную томографию с использованием двух различных мультиспиральных компьютерных томографов: широкодетекторный томограф Canon Aquilion One (Япония) – основная группа, и General Electric Revolution EVO (США) – контрольная. Всем обследуемым были разъяснены цель и необходимость проведения рентгеновской компьютерной томографии с внутривенным контрастированием, а также объяснены возможные последствия и осложнения в результате этого исследования. Проведено изучение аллергоанамнеза с целью исключения из исследования пациентов с непереносимостью йодсодержащих контрастных препаратов. Перед проведением исследования для каждого пациента рассчитан показатель скорости клубочковой фильтрации.

Параметры сканирования представлены в таблице 2.10.

Таблица 2.10 – Параметры компьютерно-топографического сканирования

Параметр	Значение для компьютерного томографа Canon Aquilion One	Значение для компьютерного томографа General Electric Revolution EVO
Режим сканирования	Спиральный	Спиральный
Ширина детектора	160 мм	40 мм
Толщина среза	0,625 мм	0,5 мм
Время одного оборота рентгеновской трубки	0,5 сек	0,4 сек

Продолжение Таблицы 2.10

Сила тока на трубке	60 мА	60 мА
Напряжение на трубке	100 кВ	100 кВ
Угол наклона гентри	0 °	0 °

Вначале получали две томограммы – ориентировочные изображения в корональной и сагиттальной проекциях, используемые для разметки зоны дальнейшего сканирования. После определения зоны сканирования на томограмме выполнялась МСКТ в артериальную, венозную и отсроченную фазы с захватом всей брюшной полости и органов малого таза.

Для контрастного усиления сосудов использовалось внутривенное введение водорастворимого йодсодержащего контрастного препарата, с содержанием йода не менее 370 миллиграмм на миллилитр. Контрастное вещество вводилось в заранее установленную венозную бранюлю при помощи автоматического инъектора. Объем болюсного введения контрастного препарата рассчитывался согласно весу пациента – один миллилитр на один килограмм массы. Скорость введения равнялась не менее четырех миллилитров в секунду. Затем для проталкивания контрастного вещества сразу же следовала болюсная инъекция физиологического раствора в объеме 50 миллилитров с аналогичной скоростью.

В результате проведенного сканирования получали диагностические данные, состоящие из срезов в аксиальной плоскости. Далее осуществлялась постобработка полученной информации на рабочей станции с построением корональных, сагиттальных, а также трехмерных реконструкций.

Необходимо отметить, что в настоящей работе мы не останавливались на подробном разборе и анализе результатов лабораторных и инструментальных методов исследования, так как это не входило в поставленные задачи.



## 2.5. Статистическая обработка результатов

Для обработки полученных результатов использованы методы непараметрической статистики. Анализ выживаемости проведен с помощью метода Каплан-Мейера. Сравнительный анализ методов диагностики проводился с использованием методов математической статистики. Коэффициент корреляции Пирсона использовался для определения линейной зависимости между спектроскопическим и видеофлуоресцентным методами. Для определения разницы между средними значениями индекса флуоресценции в разные промежутки времени использовали t-критерий Стьюдента. С помощью методов описательной статистики были получены значения медианы, нижней и верхней квартиля для исходных групп данных. Критерий Вилкоксона использовался для анализа различий для попарно связанных переменных. Достоверность полученных результатов считалась значимой при  $p \leq 0,05$  (не менее 95% точности).

### **Используемые программные средства:**

1. Пакет прикладных программ Statistica для статистической обработки данных;
2. Программа UNO MOMENTO для обработки спектров;
3. Программное обеспечение для анализа данных и построения графиков Origin.

### **ГЛАВА 3. ПРЕДКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В данной главе изучаются возможности спектральных и видеоизмерений на различных лабораторных моделях, имитирующих ткани гепатобилиарной системы человека или некоторые их свойства. Таким образом, происходит настройка параметров измерений и обработки данных для последующего переноса в клинические условия.

#### **3.1. Оценка оптимальных доз облучения по фотобличингу Фотосенсибилизатора, производного хлорина Еб, на модельных образцах – биологических средах**

Были изучены спектральные свойства молекулярного раствора хлорина еб на модельных образцах (оптических средах), которые воспроизводили свойства рассеяния тканей желчных протоков и содержали точные концентрации фотосенсибилизатора (ФС). Сначала получали спектральные сигналы от оптических сред с ФС, что позволяло выявлять их корреляцию с концентрацией ФС. Затем спектральные сигналы соотносились с получаемыми интенсивностями флуоресценции на видеоизображениях и индексами флуоресценции, получаемыми бимодальной видеосистемой.

Были получены изображения модельных сред в трех режимах: в видимом свете, флуоресцентном и в режиме наложения. Режим наложения, создаваемый программным обеспечением, заключается в совмещении изображений исследуемой области, полученных с навигационной и флуоресцентной камер. На видимое изображение накладывается флуоресцентное, окрашенное в псевдо-зеленый цвет, для визуальной оценки областей с накопленным ФС на основе Себ.

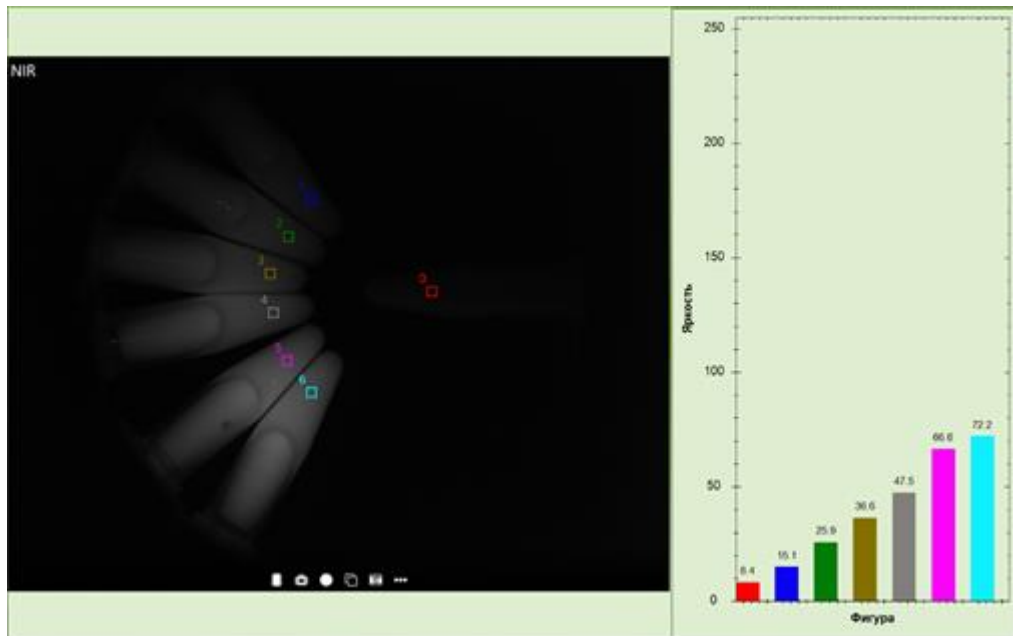


Рисунок 3.1 – Флуоресцентное изображение модельных образцов: сред, имитирующих рассеивающие свойства биологической ткани (1,8% Интралипида), с различным содержанием Се6

Образцы (среды) с различными концентрациями Се6 на изображениях, полученных с помощью цветной камеры, не имели разницы в цвете в видимом свете (Рисунок 2.36 (врезка по центру), Глава 2). Флуоресцентное изображение, в свою очередь, продемонстрировало изменение интенсивности сигнала флуоресценции ФС между образцами с различными концентрациями Се6 под воздействием лазерного излучения с длиной волны 635 нм (Рисунок 3.1). Чем выше концентрация ФС, тем интенсивнее становится регистрируемый флуоресцентный сигнал. Программное обеспечение, разработанное для данной видеофлуоресцентной системы, позволяет количественно оценить флуоресцентный сигнал в выбранной области на изображении. Количественный рост сигнала говорит о большей концентрации ФС в регистрируемом месте, что в клиническом случае характерно для опухолевой ткани, селективно накапливающей ФС (Рисунок 3.1). Режим наложения обеспечивает получение изображений в естественном цвете с псевдо-зеленым цветом окрашивания флуоресцентных участков исследуемой области. Зеленый цвет был выбран для контрастирования с естественным цветом органов и крови.

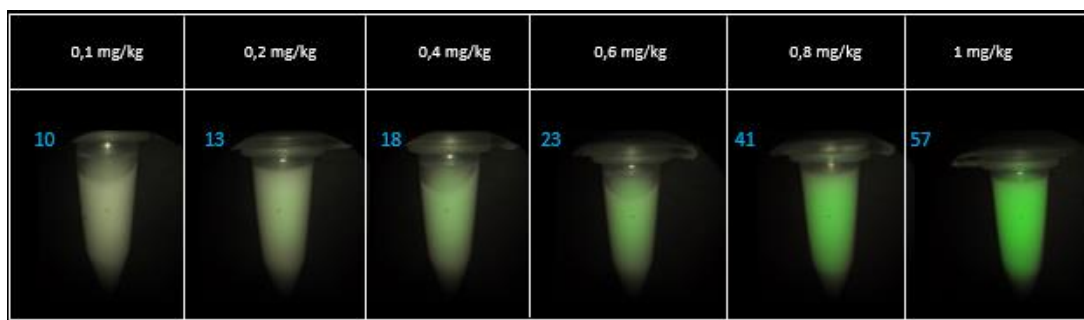


Рисунок 3.2 – Изображение модельных сред (1,8% Интралипида) с различным содержанием СеБ в режиме флуоресцентного изображения

Для количественного определения флуоресцентного сигнала в выбранной области в центр экспериментального образца был направлен флуоресцентный маркер. Флуоресцентный сигнал коррелирует с концентрацией ФС. При видеофлуоресцентной диагностике степень накопления ФС в ткани оценивается по индексу флуоресценции, который рассчитывается по следующему принципу: вычисляется среднее значение интенсивности пикселей изображения, полученного с ИК-камеры, в области, выделенной диагностическим курсором, и нормируется на параметры ИК-камеры. Затем вычисляется среднее значение интенсивности пикселей изображения красного канала цветной камеры в области, выделенной диагностическим курсором, и он нормируется на параметры цветной камеры. После этого происходит нормировка первого значения на второе и, таким образом, получается индекс флуоресценции. При оценке индекса флуоресценции необходимо учитывать, что измерения в центральной визуализируемой зоне подвержены минимальной ошибке, менее 10%, включающей неравномерность распределения лазерного излучения и aberrации оптической системы. Значение флуоресцентного сигнала выбранной области отображается в верхнем левом углу монитора в цифровом значении (Рисунок 3.2).

Для оценки по фотобликингу (то есть уменьшению интенсивности флуоресценции СеБ при облучении) СеБ оптимальной дозы облучения проведено экспериментальное исследование оценки выгорания препарата во время воздействия лазерного света с длиной волны 660 нм на биологические среды. Концентрация СеБ в 1,8% интралипиде составила 1; 0,8; 0,5; 0,3; 0,2; 0,1 и 0,05

мг/кг, что воспроизводит различное возможное накопление препарата в опухоли желчных протоков. Оценка выгорания Себ биологических образцах проводилась при помощи спектроскопической системы.

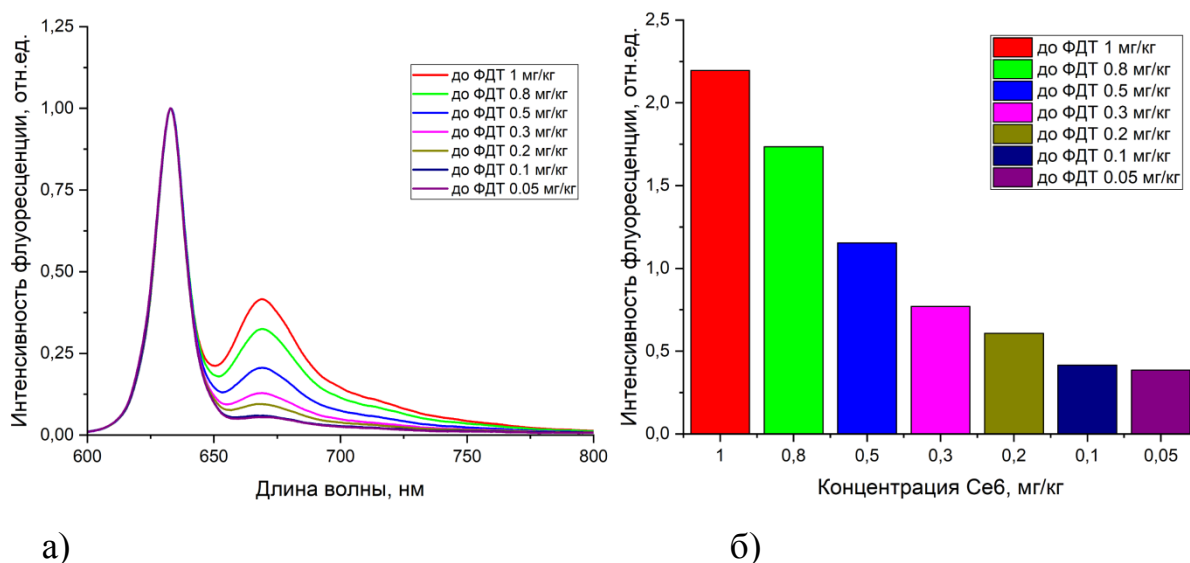


Рисунок 3.3 – а) спектры флуоресценции биологических сред с различной концентрацией Се6; б) гистограммы интегрального отношения пика флуоресценции Се6 к лазерному пику

Рисунок 3.3 демонстрирует уменьшение интенсивности флуоресцентного сигнала Се6 с понижением концентрации ФС в биологической среде. Пик флуоресценции на спектральной кривой на длине волны 660 нм соответствует наличию Се6 в модельном образце. Для оценки фотобликинга Се6 были выбраны дозы облучения (плотности энергии) 0; 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 225; 250 Дж/см<sup>2</sup>. Ненулевые дозы соответствуют клиническим дозам облучения для различных злокачественных новообразований. Облучение проводилось терапевтическим лазером с длиной волны генерации 660 нм и плотностью мощности 700 мВт/см<sup>2</sup>.

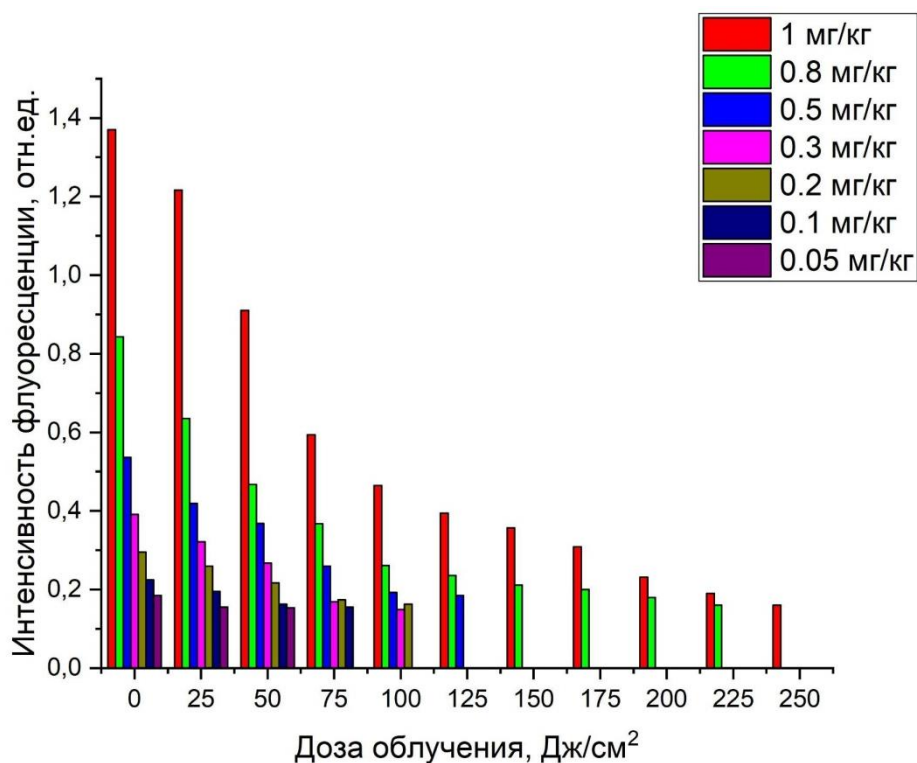


Рисунок 3.4 – Гистограммы интегрального отношения пика флуоресценции Се6 к лазерному пику в зависимости от дозы облучения длиной волны 660 нм

На Рисунке 3.4 показано уменьшение флуоресцентного сигнала Се6 биологической среды с увеличением дозы облучения. Для получения выгорания препарата более 50–60% (что является достаточным для эффективного фотодинамического воздействия на опухолевую ткань) были определены следующие дозы облучения: для концентрации Се6 1 мг/кг достаточной дозой облучения является 75 Дж/см<sup>2</sup>, для концентраций Се6 0,8 и 0,5 мг/кг – 50 Дж/см<sup>2</sup>, для концентраций Се6 0,3; 0,2; 0,1; 0,005 мг/кг – 25 Дж/см<sup>2</sup>.

Таким образом были первично определены минимальные дозы облучения для различных концентраций Се6 на упрощенных моделях – биологических средах. На следующем этапе необходимо проверить данные дозы на безопасность и эффективность на тканях, более приближенных к тканям гепатобилиарной системы человека.

## **3.2. Исследования обратного рассеяния лазерного излучения и аутофлуоресценции тканей на лабораторных моделях – гепатобилиарном комплексе кабана**

### **3.2.1. Спектральные исследования**

В данной части изучаются оптимальные параметры измерений и обработки сигналов, исходя особенностей гепатобилиарной системы. Так, например, небольшие изменения в геометрии регистрации спектров могут радикально изменить интенсивность регистрируемого рассеянного лазерного излучения. Вследствие этого была выбрана методика расчета и анализа флуоресценции по спектрам интенсивности флуоресценции в режиме «мягкого контакта» оптического волокна с поверхностью ткани. Режим «мягкого контакта» подразумевает, что рабочий конец оптического волокна устанавливается в контакте с тканью при давлении на зону воздействия величиной  $0,1-0,5 \text{ кг/см}^2$  [3].

Рассеянное назад лазерное излучение (РНЛИ), характеризующее плотность, поглощающие и рассеивающие свойства ткани, часто используется для оценки индекса флуоресценции исследуемых биологических тканей и сопоставления интенсивности флуоресценции различных тканей при проведении спектрально-флуоресцентной диагностики, т.е. при оценке степени накопления ФС и для дальнейшего сопоставления со значениями в различных тканях. С учетом того, что поглощающие и рассеивающие свойства желчного пузыря, паренхимы печени и желчных протоков существенно различаются от свойств большинства тканей других органов человека [165, 259], такое сопоставление нормированных на сигнал РНЛИ данных для различных тканей может привести к большой ошибке. Кроме того, различные сегменты гепатобилиарной системы также могут по-разному отражаться в спектральных сигналах ввиду различий в оптических свойствах. Поэтому требуется изучить, как такие различия будут отражаться в спектральных сигналах.

На Рисунке 3.5а представлены полученные спектры РНЛИ (левый пик между маркерами 1 и 2) и собственной флуоресценции эндогенных флуорофоров (правый пик между маркерами 3 и 4) в желчном пузыре, поверхности печени и желчном протоке. Проведенные измерения показали, что в спектрально-флуоресцентных сигналах от тканей гепатобилиарной системы кабана наблюдается существенная разница в интенсивности РНЛИ в зависимости от сегмента (желчный пузырь, поверхность печени или желчный проток). Поэтому в данном случае сравнение между собой индексов флуоресценции тканей, обладающих сильными различиями в интенсивности РНЛИ, может приводить к большим погрешностям в оценке экзогенной флуоресценции ФС. Чтобы избежать этого, при проведении видео- и спектрально-флуоресцентной диагностики пациентов с ХЦР нормировку полученных сигналов следует проводить на сигналы именно от тканей желчного протока, а не от других.

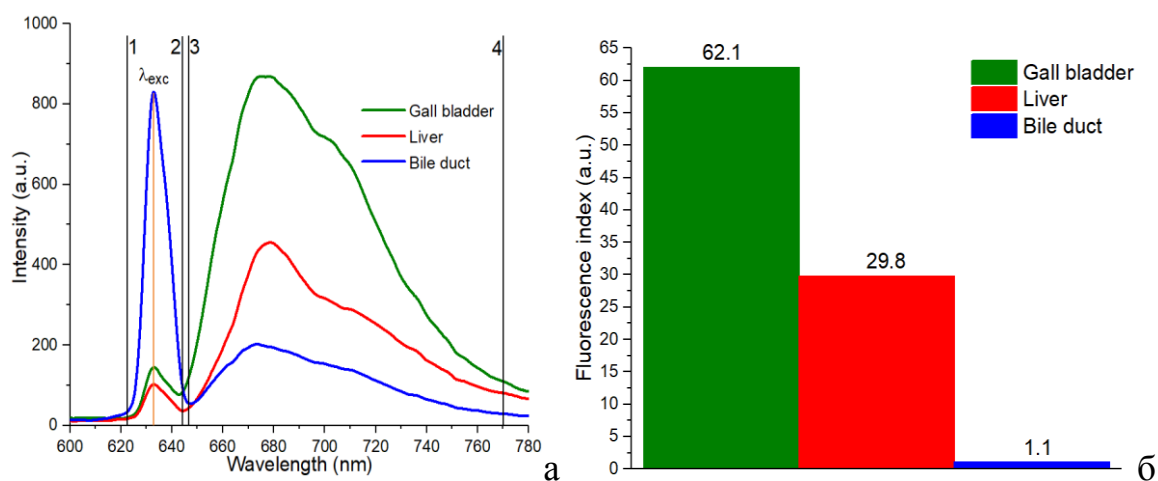


Рисунок 3.5 – Результаты спектрально-флуоресцентной диагностики исследуемых областей: (а) спектры собственной флуоресценции эндогенных флуорофоров различных сегментов гепатобилиарной системы кабана: желчного пузыря, поверхности печени и желчного протока, не нормированные на лазерную линию. Длина волны возбуждения  $\lambda_{exc}=632,8$  нм. Между маркерами 1 и 2 заключены спектры РНЛИ, между 3 и 4 – спектры флуоресценции эндогенных флуорофоров; (б) индексы флуоресценции исследуемых тканей

В свою очередь, флуоресценция эндогенных флуорофоров является ухудшающим фактором оценки степени накопления ФС при проведении как



спектральной диагностики, так и видеофлуоресцентной (ВФД). Это связано с тем, что сигнал аутофлуоресценции от эндогенных составляющих может пересекаться или даже перебивать сигнал от ФС, что может привести к ложноположительному результату диагностики. При использовании спектрометра возможно спектроскопическое разделение составляющих флуоресценции эндогенных флуорофоров и ФС, что позволяет минимизировать ошибки, возникающие из-за наложения сигналов эндогенной и экзогенной флуоресценции тканей.

Эндогенная флуоресценция оценивалась по индексам флуоресценции. Индекс флуоресценции (FI, формула 2) рассчитывается как отношение площади под спектром флуоресценции ( $I_{34}$ ) в диапазоне 3–4 к площади под спектром РНЛИ в диапазоне 1–2 на Рисунок-3. 5. а ( $I_{12}$ ):

$$FI = \frac{I_{34}}{I_{12}},$$

Наибольшая интенсивность флуоресценции эндогенных флуорофоров была отмечена в таких областях, как желчный пузырь и поверхность печени, тогда как самая низкая интенсивность – в желчном протоке (Рисунок 3.5).

В процессе анализа спектрально-флуоресцентных свойств паренхимы печени, внутри- и внепеченочных желчных протоков гепатобилиарной системы получены спектры флуоресценции эндогенных флуорофоров и РНЛИ. Оценка эндогенной флуоресценции позволила увеличить точность количественной оценки накопления ФС. Отмечена существенная разница в интенсивности РНЛИ в различных сегментах гепатобилиарной системы (желчный пузырь, паренхима печени или желчный проток). Исходя из этого, предложена методика проведения спектрально-флуоресцентной оценки степени накопления ФС в гепатобилиарной системе в режиме «мягкого контакта». Кроме этого, при необходимости нормировки спектрального сигнала флуоресценции на РНЛИ, следует строго придерживаться нормировки на сигнал РНЛИ от того же сегмента гепатобилиарной системы, от которого и происходит измерение флуоресцентного сигнала. То есть, как минимум, для каждого типа ткани определять свой «эталон» нормировки.

### 3.2.2. Исследования оптических свойств тканей с помощью видеосистемы

Весьма актуальной задачей является оценка влияния эндогенных флуорофоров при проведении видеофлуоресцентной диагностики (ВФД) на получаемый сигнал от различных областей гепатобилиарной системы. Учет такого вклада аутофлуоресценции в результирующий видеосигнал флуоресценции позволит увеличить точность количественной оценки накопления ФС по индексам флуоресценции. На Рисунке 3.6 представлены флуоресцентные изображения желчного пузыря, поверхности печени и желчного протока, полученные с помощью двухканальной видеосистемы. Изображения были зафиксированы в флуоресцентном режиме (1), цветном (2) и в режиме совмещения (3).

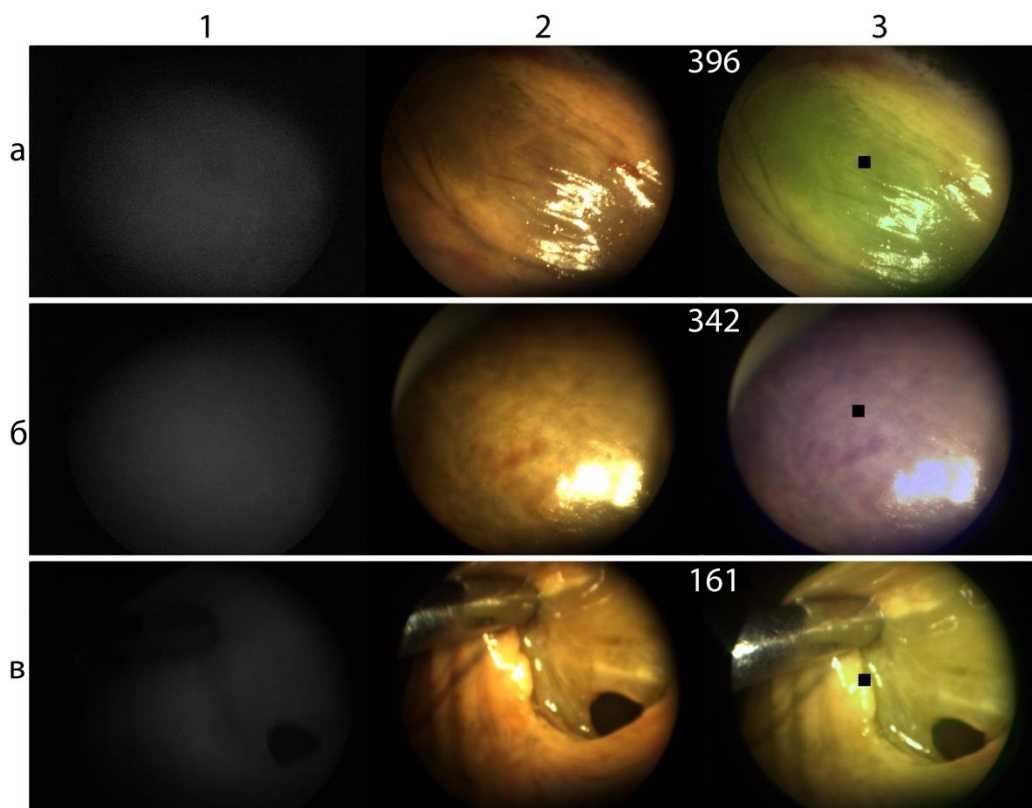


Рисунок 3.6 – Результаты видеофлуоресцентной диагностики исследуемых областей: (а) изображения стенки желчного пузыря; (б) изображения поверхности печени; (в) изображения стенки внутренней поверхности желчного протока; (1) флуоресцентный режим; (2) цветной режим; (3) совмещенный режим (в верхнем левом углу изображения отображается индекс флуоресценции)

Количественная оценка интенсивности флуоресценции эндогенных флуорофоров стенки желчного пузыря, поверхности печени и внутренней поверхности желчного протока по индексам флуоресценции составила 396, 342 и 161 отн. ед., соответственно, при норме в 10 отн. ед., полученных от тканей, практически не обладающих собственной аутофлуоресценцией на применяемой длине волны лазерного излучения. Нормирование проводилось на паренхиме печени (поперечном срезе). Выбор данной области был обусловлен низкой интенсивностью РНЛИ ткани печени (Рисунок 3.5а) и присутствием в данной области большого количества дополнительных флуорохромов.

Проведение ВФД в ближнем инфракрасном диапазоне (БИК) диапазоне позволило получать флуоресцентные изображения очагов накопления ФС с большей контрастностью. Однако на основании полученных изображений (Рисунок 3.7) можно сделать вывод, что с увеличением длины волны изменение интенсивности флуоресценции ФС в БИК диапазоне происходит медленнее, чем изменение интенсивности флуоресценции эндогенных флуорофоров печени (фоновое свечение вокруг кровеносного сосуда на Рисунке 3.7).

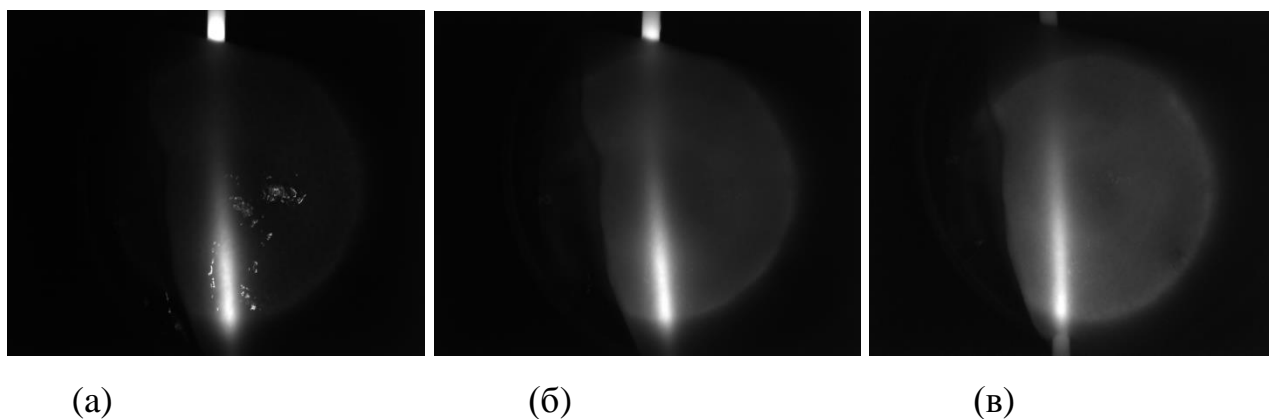


Рисунок 3.7 – Флуоресцентные изображения фантома кровеносного сосуда с Себ, расположенного в толще образца печени кабана, полученные при установке различных полосовых фильтров: (а) с центральной длиной волны пропускания 710 нм; (б) с центральной длиной волны пропускания 794 нм; (в) с центральной длиной волны пропускания 832 нм

Поэтому соотношение интенсивностей эндогенной флуоресценции и экзогенной флуоресценции Себ в БИК диапазоне хуже, чем в красном диапазоне.

Также при переходе в БИК диапазон увеличивается время экспозиции, что препятствует проведению видеофлуоресцентной диагностики в режиме реального времени.

Таким образом, можно учитывать сигнал аутофлуоресценции тканей и отделять его от сигнала от ФС при подсчете индекса флуоресценции по изображениям.

По результатам проведенной видеофлуоресцентной диагностики, дана количественная оценка флуоресценции эндогенных флуорофоров стенки желчного пузыря, поверхности печени и стенки внутренней поверхности желчного протока. Определена корреляция между данными о концентрации флуорофора, определяемой двумя разными способами (спектроскопически и с помощью видеосистемы) и доказана возможность эффективного проведения видеофлуоресцентной диагностики злокачественных новообразований гепатобилиарной системы человека с учетом вклада эндогенной флуоресценции. Показано, что для данной локализации возможно применение обоих методов диагностики, однако для повышения точности диагностики в сложно доступной локализации наиболее перспективен метод видеофлуоресцентного анализа. Кроме этого, при анализе флуоресцентных сигналов с видеосистемы от тканей гепатобилиарного комплекса возможна и необходима нормировка на сигнал от эндогенных флуорофоров при расчете индексов флуоресценции: вычитание значения интенсивности аутофлуоресценции из общего сигнала.

Исходя из результатов проведенной видеофлуоресцентной диагностики в БИК диапазоне, можем заключить, что контрастность флуоресцентных изображений гепатобилиарной системы в красном диапазоне выше.

### 3.3. Спектральные исследования по поиску эффективной глубины зондирования на лабораторных моделях – гепатобилиарном комплексе кабана

Согласно результатам, представленным в работе [82], ФДТ холангиокарциномы с внутрипротоковым расположением оптического волокна с цилиндрическим рассеивателем вызывает некроз опухоли на расстоянии до 4 мм от источника излучения.

В нашем исследовании получены следующие результаты по оценке глубины зондирования лазерного излучения  $\lambda = 660$  нм путем регистрации флуоресценции эндогенных флуорофоров, содержащихся в тканях печени и стенках желчных протоков, при мощностях лазерного излучения 5 и 300 мВт, и дальнейшей оценке площади под спектральной кривой флуоресценции ( $S_{M1-M2}$ ) в пределах установленных маркеров M1–M2. Максимальная глубина распространения лазерного излучения считалась достигнутой, когда не наблюдалось изменений значений площади под спектральной кривой при пошаговом удалении диагностического волокна (Optical fiber 2).

На Рисунке 3.8 представлены спектры флуоресценции, полученные на различных расстояниях, при расположении оптического волокна с цилиндрическим диффузором вне дренажа во внепеченочном протоке, при мощностях излучения 5 мВт и 300 мВт.

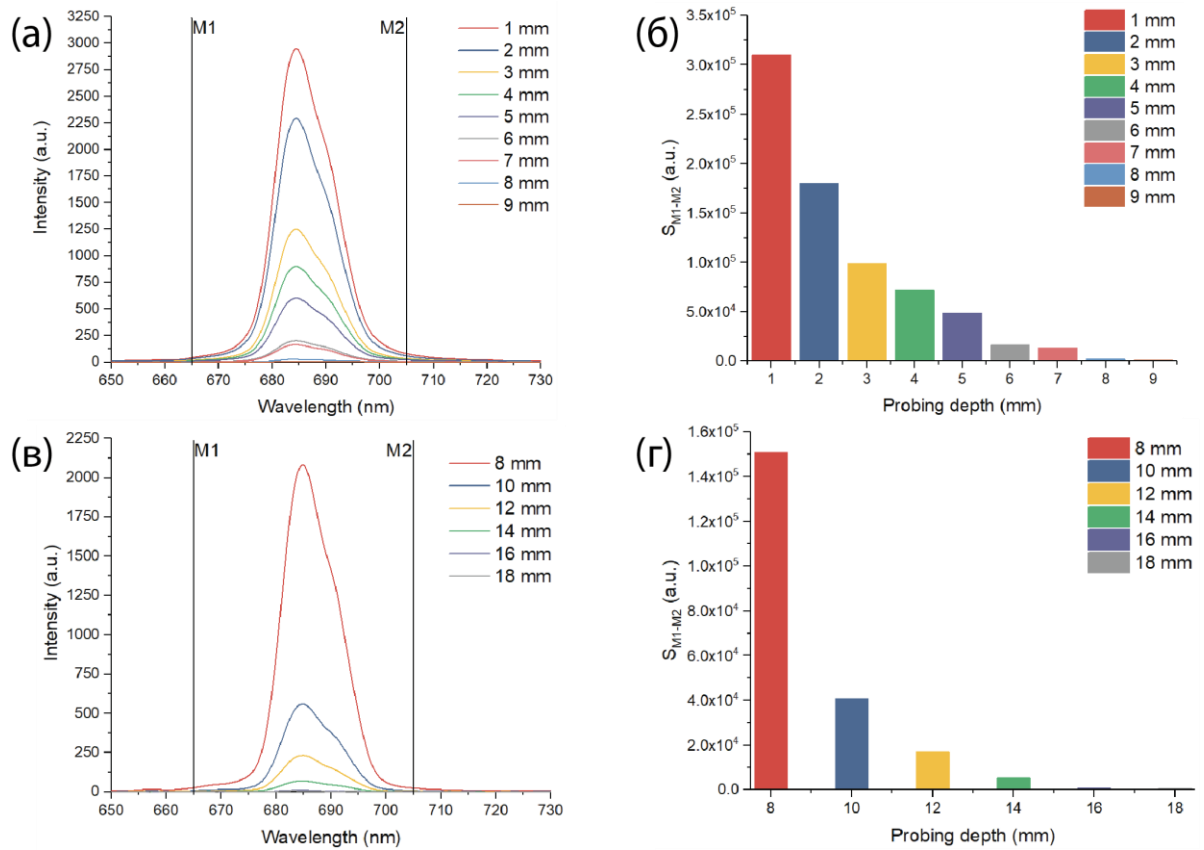


Рисунок 3.8 – Результаты спектрально-флуоресцентной диагностики глубины зондирования: (а), (в) спектры флуоресценции эндогенных флуорофоров при расположении оптического волокна вне дренажа во внепеченочном протоке при мощности лазерного излучения 5 и 300 мВт, соответственно; (б), (г) зависимости площадей под спектральными кривыми флуоресценции ( $S_{M1-M2}$ ) от глубины зондирования в пределах установленных маркеров М1–М2 при мощности лазерного излучения 5 и 300 мВт соответственно

С целью сравнительного анализа на Рисунке 3.9 представлены зависимости интенсивностей флуоресценции эндогенных флуорофоров, возбуждаемых лазерным излучением, проводящимся через оптическое волокно с цилиндрическим диффузором, от глубины распространения излучения при мощности излучения 5 и 300 мВт.

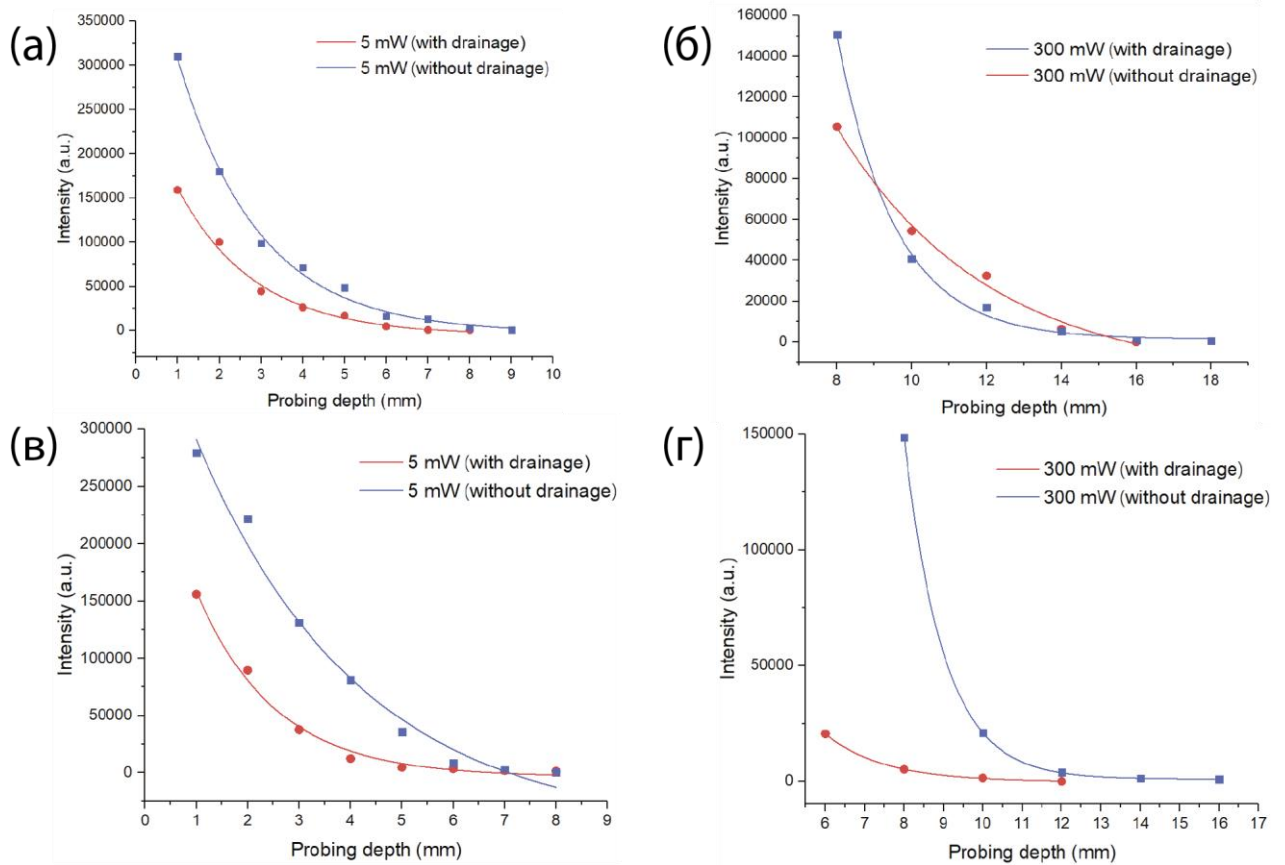


Рисунок 3.9 – Анализ глубины зондирования излучения: зависимости интенсивности флуоресценции, (а) внепеченочного протока от глубины зондирования излучения при мощности 5 мВт; (б) внепеченочного протока от глубины зондирования излучения при мощности 300 мВт; (в) внутрипеченочного протока от глубины зондирования излучения при мощности 5 мВт; (г) внутрипеченочного протока от глубины зондирования излучения при мощности 300 мВт. Красная линия – измерения в просвете дренажа, синяя линия – вне дренажа

Таблица 3.1 – Глубина проникновения лазерного излучения (в точке падения интенсивности в  $e$  раз) во внепеченочные и внутрипеченочные протоки при разной мощности

	Глубина проникновения лазерного излучения (в точке падения интенсивности в $e$ раз), мм			
	5		300	
Мощность излучения, мВт	5		300	
Наличие дренажа	+	-	+	-
Внепеченочный проток	2,8	3	9	11
Внутрипеченочный проток	2,5	3,5	7,5	9,5

Максимальная глубина зондирования лазерного излучения во внепеченочном протоке в просвете дренажа и вне дренажа при мощности 5 мВт составила 2,8 и 3 мм, при мощности 300 мВт – 9 мм и 11 мм соответственно. Максимальная глубина зондирования лазерного излучения во внутрипеченочном протоке в просвете дренажа и вне дренажа при мощности 5 мВт составила 2,5 мм и 3,5 мм, при мощности 300 мВт – 7,5 и 9,5 мм соответственно (Таблица 3.1).

Данный эксперимент и полученные результаты позволили приступить к проведению следующей фазы исследований *in vitro* и *in vivo* на приматах.

Отработана методика измерения глубины зондирования тканей внутри- и внепеченочного протока. Определены глубины проникновения лазерного излучения (в точке падения интенсивности излучения в  $e$  раз) в терапевтической и диагностических дозах в ткани печени кабана во внепеченочном и внутрипеченочном протоках с дренажем и без дренажа. Показано, что проведение ФДТ с расположением оптического волокна с цилиндрическим диффузором вне дренажа способствует увеличению глубины зондирования ( $\lambda = 660$  нм) на 0,2–1 мм при мощности в 5 мВт и на 2 мм при мощности в 300 мВт, что может повысить эффективность проводимой терапии.

### **3.4. Исследования накопления фотосенсибилизатора в тканях гепатобилиарной зоны у лабораторных животных**

#### **3.4.1. Спектральные исследования динамики накопления фотосенсибилизатора в гепатобилиарном комплексе приматов**

С целью оценки динамики накопления ФС – Себ – в тканях печени, желчного пузыря и желчных протоков, было проведено интраоперационное исследование на 13 приматах вида *Papio Hamadryas*. Одиннадцать приматов использовались в эксперименте в статусе *statim post mortem* и два – *in vivo*, интраоперационно. После введения ФС проводился спектроскопический контроль



накопления ФС в тканях печени, желчного пузыря и желчных протоков в определенных временных точках (см. Главу 2).

Усредненные данные по динамике накопления препарата в печени представлены на Рисунке 3.10. Для определения накопленной концентрации ФС в ткани печени были исследованы биологические среды с известными концентрациями Себ. Была определена интенсивность флуоресценции участка печени в различные временные точки, а также биологических образцов (пунктирная линия) для дальнейшего определения концентрации препарата, накопленного в ткани печени.

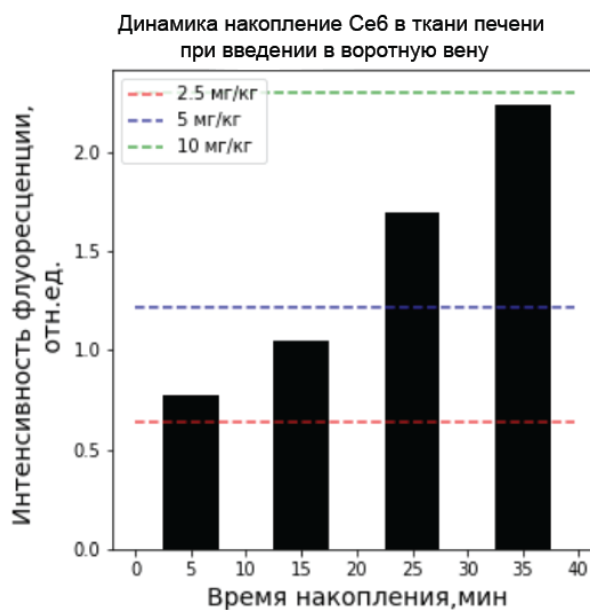


Рисунок 3.10 – Временной график накопления препарата в печени при введении в воротную вену

На Рисунке 3.11 представлено распределение индексов флуоресценции тканей гепатобилиарной системы павиана, полученных в ходе проведения спектрально-флуоресцентной диагностики, после внутривенного введения Себ (торговая марка «Фотолон») в концентрации 2 мг/кг.

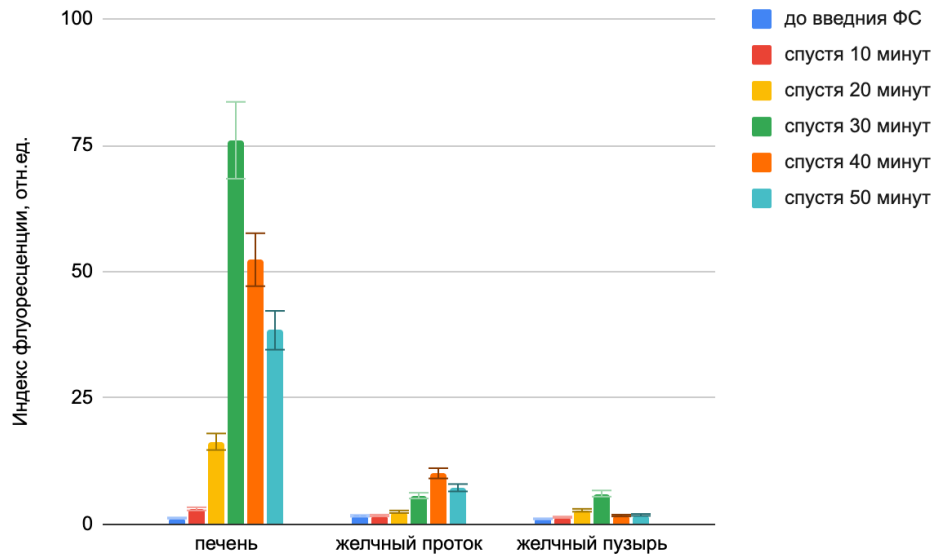


Рисунок 3.11 – Распределение индексов флуоресценции тканей печени, желчного протока и желчного пузыря

В тканях печени максимальное значение индекса флуоресценции было зарегистрировано спустя 30 минут после внутривенного введения Себ, как и в тканях желчного пузыря. При этом в тканях желчного протока максимальное значение индекса флуоресценции наблюдалось спустя 40 минут после введения Себ. На диаграмме заметно, что печень накапливает ФС в значительно большей степени, чем другие органы гепатобилиарной системы.

В проведенном исследовании оценено время накопления ФС в тканях для оптимального подбора времени начала ФДТ для достижения наиболее эффективного результата. Наиболее оптимальной экспозицией накопления препарата для ткани печени, желчного протока и желчного пузыря является 30–35, 40 и 30 минут соответственно.

### 3.4.2. Оценка глубины зондирования лазерного излучения в печени приматов по спектрам обратного рассеяния в тканях, содержащих и не содержащих фотосенсибилизатор

В результате обработки спектральных данных по оценке интенсивности обратного рассеяния лазерного излучения в печени приматов (с ФС и без ФС) были получены следующие распределения интенсивности проходящего лазерного

излучения через ткань печени с использованием лазерного источника света с длиной волны 660 нм с трех глубин: 8.5, 6 и 2 мм (Рисунки 3.12 и 3.13).

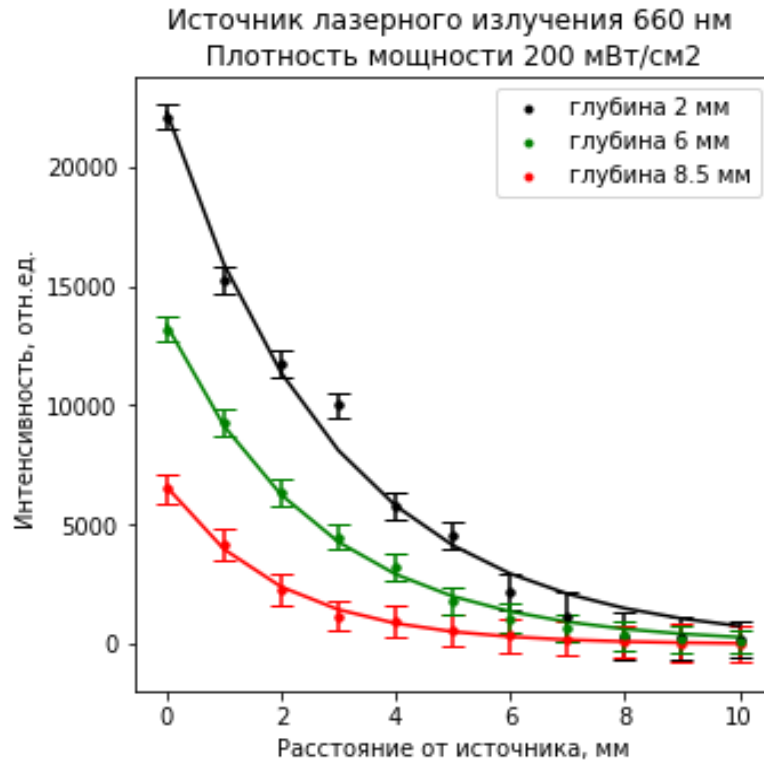


Рисунок 3.12 – Распределение проходящего лазерного излучения с длиной волны 660 нм через различную глубину печени

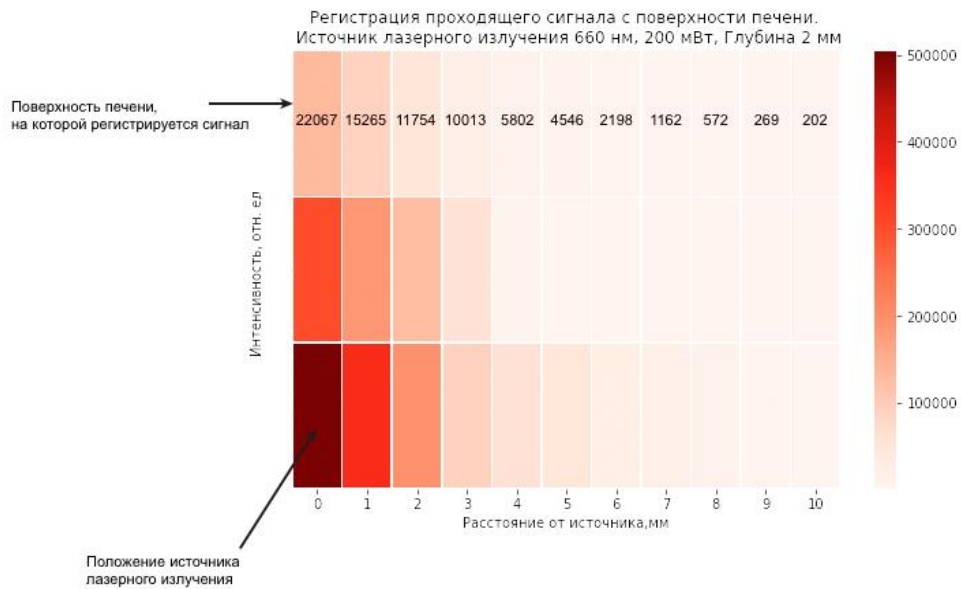


Рисунок 3.13 – Распределение проходящего лазерного излучения с длиной волны 660 нм при глубине ткани печени над протоком 2 мм

Исследуя полученные распределения интенсивности лазерного излучения по глубине, можем видеть, что при падении интенсивности излучения в  $e$  раз глубина проникновения лазерного излучения при толщине слоя печени 2 мм в два раза больше, чем при 6 мм, и составляет до 4 мм, что является существенным для анализа ткани печени.

Ниже представлены результаты оценки глубины зондирования лазерного излучения  $\lambda = 660$  нм путем регистрации рассеянного излучения при мощности лазерного излучения 300 мВт. В дальнейшей оценке площади под спектральной кривой рассеянной лазерной линии в диапазоне 650-670 нм максимальная глубина распространения лазерного излучения считалась достигнутой, когда не наблюдалось изменений значений площади под спектральной кривой при пошаговом удалении диагностического волокна. Результаты представлены для тканей печени приматов, содержащих ФС Себ (Рисунки 3.14, 3.15) и не содержащих ФС (Рисунки 3.16, 3.17). Так, на Рисунке 3.14 представлены распределения интенсивности рассеянного лазерного излучения 660 нм в тканях печени, содержащих Себ, полученные на различных расстояниях, при расположении оптического волокна с цилиндрическим диффузором с дренажем и без дренажа во внепеченочном протоке.



Рисунок 3.14 – Распределения рассеянного лазерного излучения 660 нм в тканях печени, содержащих Себ, при расположении оптического волокна во внепеченочном протоке

На рисунке 3.15 представлены распределения интенсивности рассеянного лазерного излучения 660 нм, содержащих Себ, полученные на различных расстояниях, при расположении оптического волокна с цилиндрическим диффузором с дренажем и без дренажа во внутрипеченочном протоке.

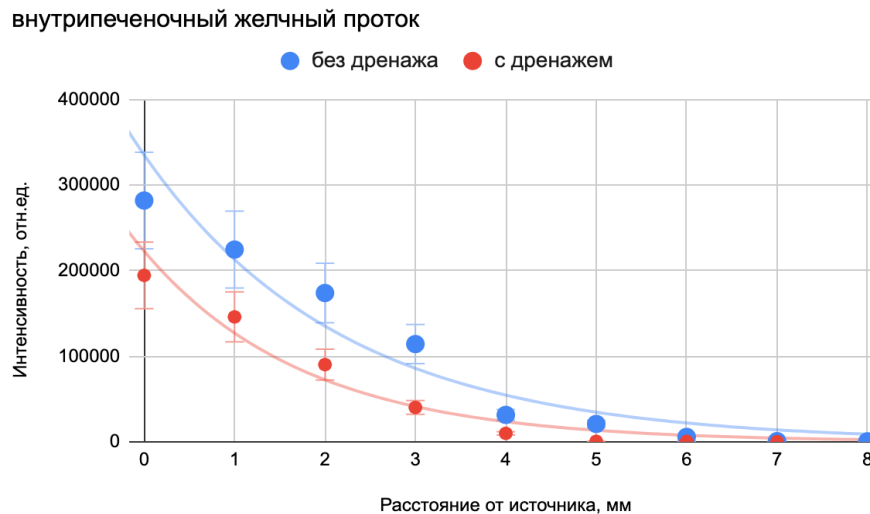


Рисунок 3.15 – Распределения рассеянного лазерного излучения 660 нм в тканях печени, содержащих Себ, при расположении оптического волокна во внутрипеченочном протоке

Максимальная глубина зондирования лазерного излучения 660 нм в сенсibilизированных тканях печени при расположении оптического диффузора во внепеченочном и внутрипеченочном протоке без дренажа и с дренажем составила 8 и 7 мм соответственно. Также следует отметить, что применение дренажа способствовало уменьшению интенсивности регистрируемого сигнала.

На Рисунке 3.16 представлены распределения интенсивности рассеянного лазерного излучения 660 нм в тканях печени, не содержащих Себ, полученные на различных расстояниях, при расположении оптического волокна с цилиндрическим диффузором с дренажем и без дренажа во внепеченочном протоке.

## внепеченочный желчный проток

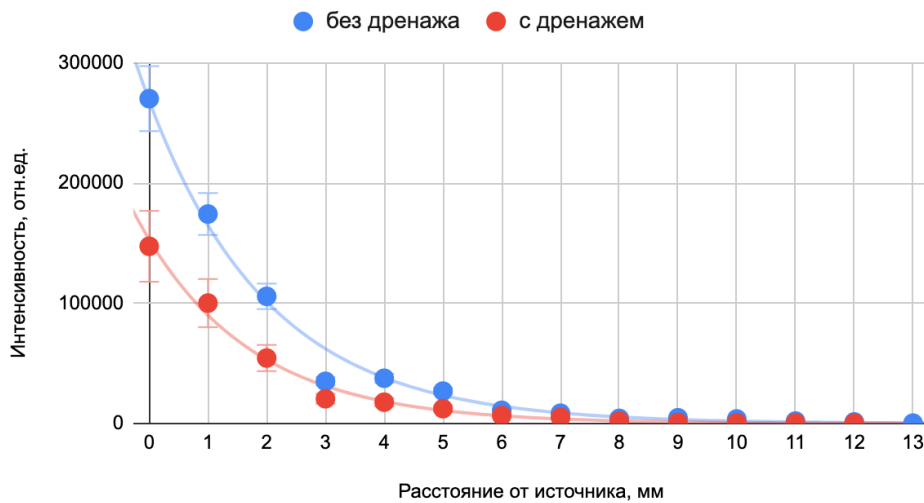


Рисунок 3.16 – Распределения рассеянного лазерного излучения 660 нм в тканях печени, не содержащих Себ, при расположении оптического волокна во внепеченочном протоке

На Рисунке 3.17 представлены распределения интенсивности рассеянного лазерного излучения 660 нм в тканях печени, не содержащих Себ, полученные на различных расстояниях, при расположении оптического волокна с цилиндрическим диффузором с дренажем и без дренажа во внутривпеченочном протоке.

## внутрипеченочный желчный проток

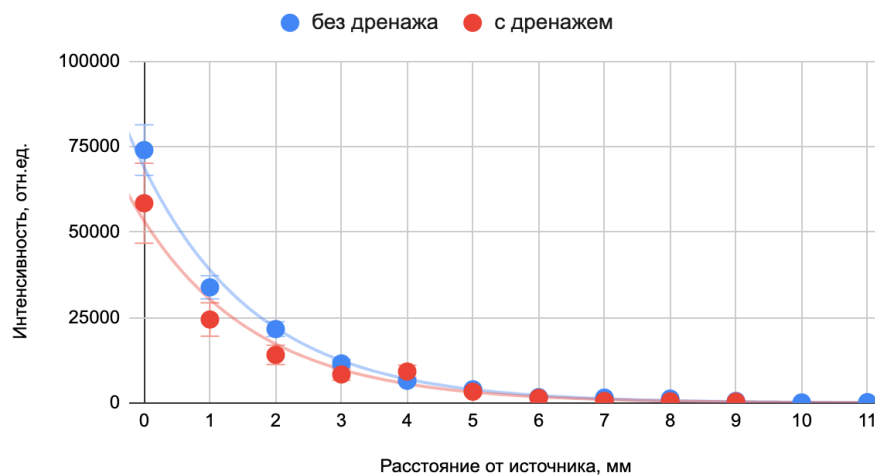


Рисунок 3.17 – Распределения рассеянного лазерного излучения 660 нм в тканях печени, не содержащих Себ, при расположении оптического волокна во внутривпеченочном протоке

Максимальная глубина зондирования лазерного излучения 660 нм в несенсибилизированных тканях печени при расположении оптического диффузора во внепеченочном и внутripеченочном протоке без дренажа и с дренажем составила 13 и 11 мм соответственно. В данном случае наблюдалось увеличение глубины зондирования вследствие отсутствия вклада поглощения Себ. Также следует отметить, что применение дренажа способствовало уменьшению интенсивности регистрируемого сигнала.

Таким образом, была определена глубина проникновения лазерного излучения в различные ткани гепатобилиарной системы (в точке падения интенсивности излучения внутри ткани в  $e$  раз). Эти данные необходимы для дальнейшего применения метода в интраоперационных условиях для расчета глубины воздействия ФДТ.

### **3.5. Исследование на примате оценки безопасности применяемых и эффективных энергетических доз при фотодинамической терапии**

#### **3.5.1. Спектральные исследования**

В первой части данной главы в исследовании на биологических средах была отработана методика оценки эффективности фотодинамического воздействия на моделях биологических тканей с ФС хлоринового ряда путем оценки фотобличинга препарата в зависимости от выбранной энергетической дозы. Эти данные важны для дальнейшего контроля процесса ФДТ. Однако полученные результаты в ходе такого эксперимента соответствуют модели биологической ткани с весьма ограниченным набором оптических параметров, имитирующих оптические параметры биотканей. Так, например, в исследуемой модели не учитывалось поглощение тканями (которое является довольно сильным в печени на применяемых длинах волн 635–660 нм, несмотря на близость к окну прозрачности биологических тканей), присутствие кровотока, а также не соблюдалась геометрия биотканей. Поэтому полученный результат по выявлению

оптимальных доз облучения (плотностей энергии) для эффективной и безопасной ФДТ на биологических средах будет являться отправной точкой для исследований на моделях, более приближенных к биотканям гепатобилиарного комплекса человека.

Для определения энергетической дозы, т.е. плотности энергии одного сеанса ФДТ, достаточной для достижения фотобличинга, был проведен *in vivo* эксперимент на примате. После внутривенного введения ФС была оценена интенсивность флуоресценции Себ в тканях печени. Накопленная концентрация составила 1 мг/кг. Далее на трех различных участках проводилась ФДТ с энергетическими дозами лазерного излучения 50, 150 и 300 Дж/см<sup>2</sup>. Данные по фотобличингу препарата представлены на рисунке 3.18.

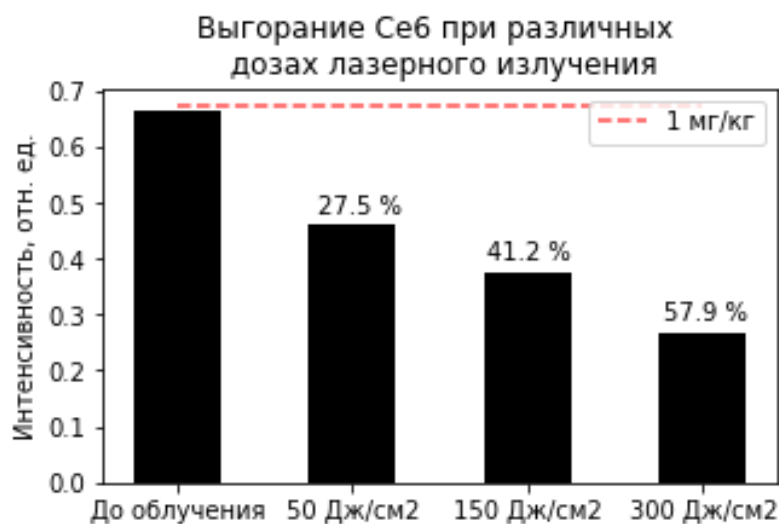


Рисунок 3.18 – Изменение интенсивности флуоресценции при облучении трех участков печени различными дозами лазерного излучения с длиной волны 660 нм. В процентном соотношении показана степень выгорания препарата, относительно интенсивности флуоресценции до облучения

### **3.5.2. Морфологическое обоснование результатов фотодинамической терапии печени и желчных протоков приматов**

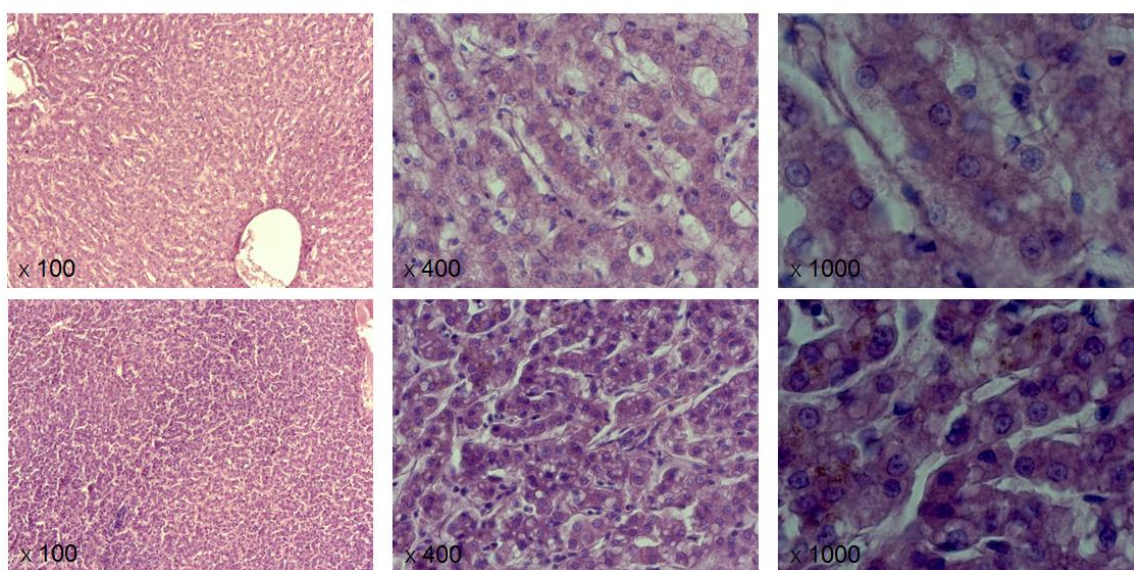
Ниже представлены результаты стандартной гистологической обработки материалов с последующей заливкой в парафиновую среду HISTOMIX (ООО



«БиоВитрум», Санкт-Петербург, Россия). Исследовали ткань печени, а также внутри- и внепеченочный желчные протоки.

На Рисунке 3.19 представлены микрофотографии паренхимы печени до и после проведенной ФДТ. Согласно протоколу (методологические аспекты) проведения ФДТ, облучение проводят в пределах неизмененных тканей. Таким образом, суммарная световая доза облучения воздействует как на опухоль, так и окружающую здоровую ткань. Были исследованы изменения в здоровой паренхиме печени для оценки безопасного воздействия лазерным излучением (Рисунок 3.20).

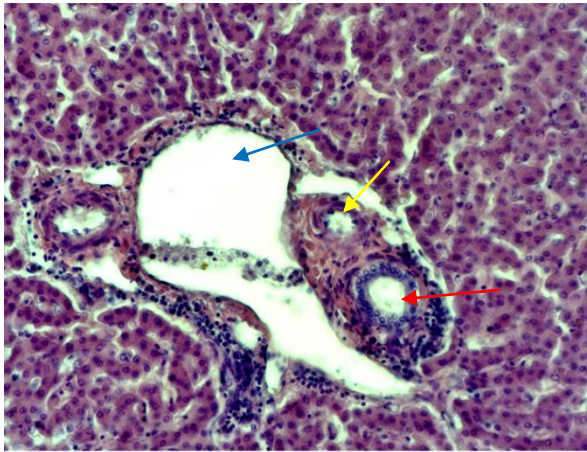
Микрофотографии в верхнем ряду – ткань печени до облучения, окраска гематоксилин и эозин



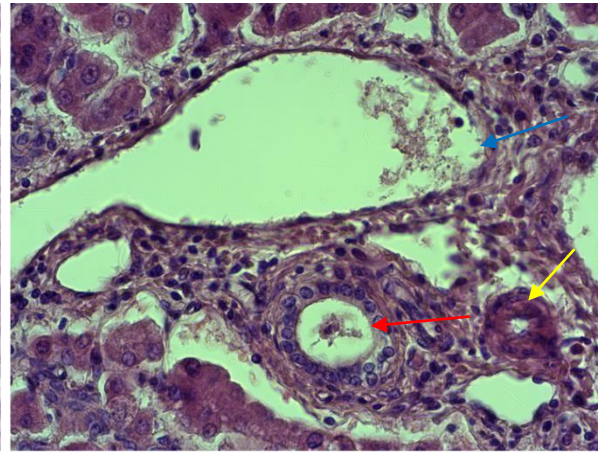
Микрофотографии в нижнем ряду – ткань печени после облучения, окраска гематоксилин и эозин

Рисунок 3.19 – Паренхима печени до и после ФДТ

По данным морфологического исследования, получены следующие результаты. У всех приматов, которым проведено лазерное облучение после введения фотосенсибилизатора хлоринового ряда, получены признаки, характерные для зернистой дистрофии. Кроме того, в области облучения отмечен микротромбоз сосудов (Рисунок 3.21 а, б), что соответствует патогенетическому механизму ФДТ, а именно повреждению эндотелия сосудов.

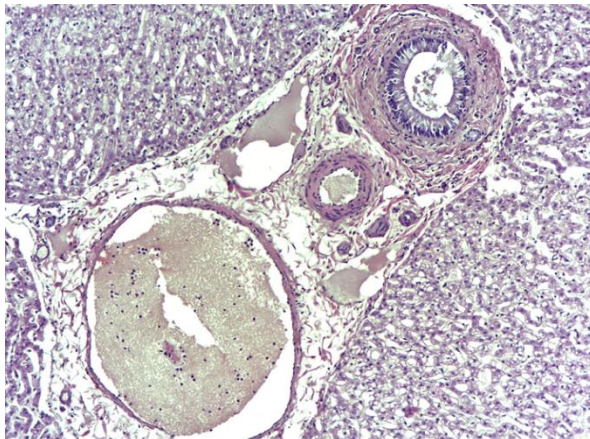


Триада печени.  
Типичное гистологическое строение (норма).  
окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 200

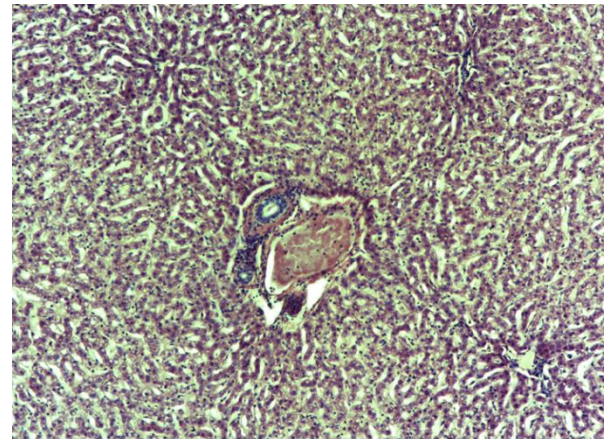


Триада печени.  
Типичное гистологическое строение (норма).  
окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 400

Рисунок 3.20 – Триада печени, норма (стрелками указаны: красная – желчный проток; синяя – вена; желтая – артерия)



Триада печени.  
Формирование микротромбов в просвете сосудов после ФДТ.  
окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 100

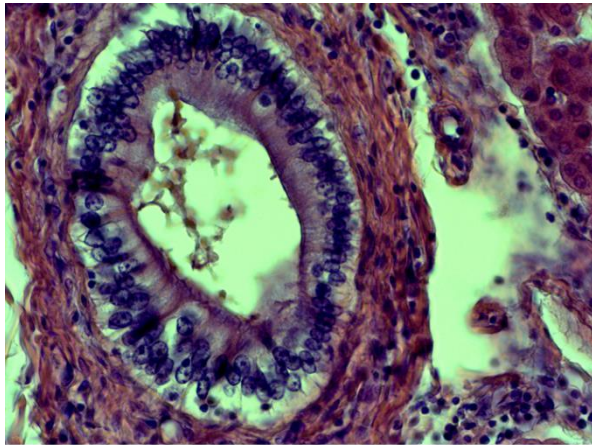


Триада печени.  
Формирование микротромбов в просвете сосудов после ФДТ.  
окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 100

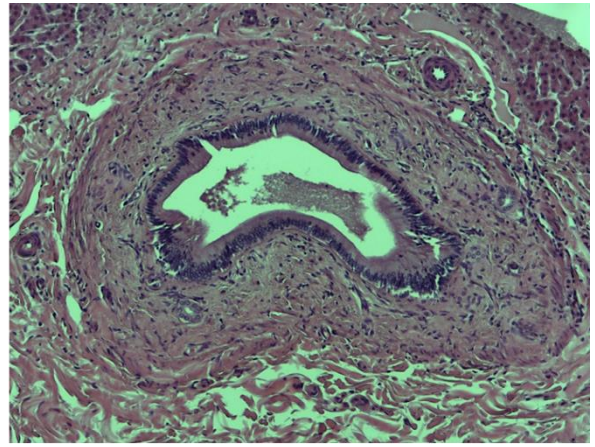
Рисунок 3.21 – Микротромбоз сосудов в паренхиме печени после ФДТ

Аналогичным образом выполнено исследование желчных протоков у приматов без воздействия лазерного излучения и после ФДТ. На Рисунке 3.22 представлены микрофотографии внутри- и внепеченочного желчных протоков без ФДТ.





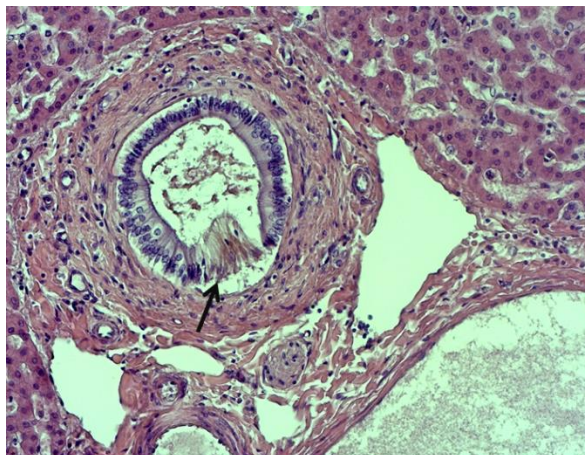
Внутрипечёночный желчный проток.  
Типичное гистологическое строение (норма).  
окраска гематоксилином и эозином, увеличение  $\times 400$



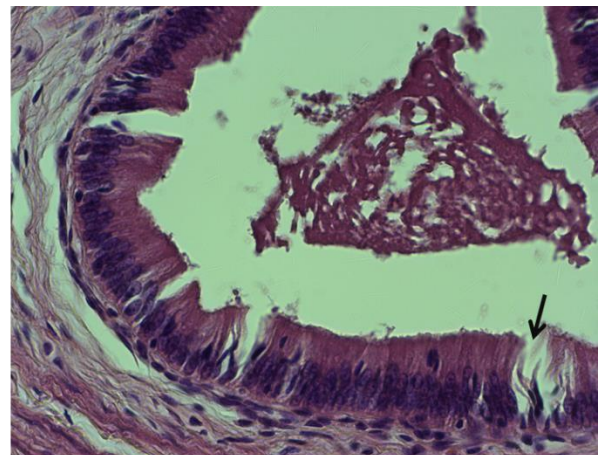
Внепечёночный желчный проток.  
Типичное гистологическое строение (норма).  
окраска гематоксилином и эозином, увеличение  $\times 100$

Рисунок 3.22 – Типичное гистологическое строение желчных протоков

После проведённой ФДТ, через 72 часа после операции, выделены желчные протоки для гистологического исследования (Рисунок 3.23). У обоих приматов гистологических признаков некроза в стенках желчных протоков выявлено не было. Однако были выявлены дистрофические изменения эпителия в области нахождения (непосредственного контакта) оптического диффузора для ФДТ.



Внутрипечёночный желчный проток.  
Дистрофические изменения эпителия (указано стрелкой).  
окраска гематоксилином и эозином, увеличение  $\times 200$



Внепечёночный желчный проток.  
Дистрофические изменения эпителия (указано стрелкой).  
окраска гематоксилином и эозином, увеличение  $\times 400$

Рисунок 3.23 – Желчные протоки печени. Дистрофические изменения эпителия

Таким образом, получено, что у всех животных не было выявлено патологических изменений (на макро- и микроскопическом уровнях),

обусловленных токсичностью, местно-раздражающим действием, иммунотоксичностью, иммуногенностью фотосенсибилизаторов, в исследуемых внутренних органах и тканях. Все исследуемые органы и ткани сохраняли типичную анатомическую и гистологическую структуру. В образцах были обнаружены минимальные изменения после ФДТ при дозе  $75 \text{ Дж/см}^2$ , при дозе от  $150 \text{ Дж/см}^2$  – более выраженные, но не приводящие к деструкции. Рекомендуемой эффективной и безопасной дозой для ФДТ желчных протоков при ХЦР является плотность энергии для одного сеанса в  $150\text{--}300 \text{ Дж/см}^2$ .

С учетом того, что ткани печени и желчных протоков содержат значительную концентрацию биоорганических молекул, поглощающих излучение в области  $660 \text{ нм}$ , часть энергии расходуется на эти акцепторы. Соответственно, на ФС приходится пропорционально меньшее количество энергии, что требует увеличение световой дозы для достижения фотобличинга выше  $50\text{--}60\%$ .

Опухолевые ткани печени и желчных протоков обычно содержат существенно меньшее количество акцепторов и, соответственно, необходимый фотобличинг будет достигаться при меньших значениях световой дозы. Надо отметить, что используемая при анализе спектральная информация, кроме спектра флуоресценции содержит значение интенсивности РНЛИ, которую необходимо использовать для оценки световой дозы достаточной для фотобличинга более  $50\text{--}60\%$ . Т.е., если РНЛИ увеличивается, то необходимо пропорционально уменьшать дозу лазерного излучения и наоборот.

### **3.6. Выводы**

Проведенные исследования на лабораторных моделях (биологических средах) позволили определить исходные параметры облучения различных тканей гепатобилиарной системы, а также установить порядок обработки спектральных и видеофлуоресцентных данных для избежания ошибок измерения с учетом особенностей оптических свойств тканей. Эти результаты являются исходными

для проведения корректных измерений и воздействий на ткани человека в клинических условиях.

Изучены возможности спектральных и видеофлуоресцентных измерений на различных лабораторных моделях (гепатобилиарный комплекс кабана), имитирующих ткани гепатобилиарной системы человека или некоторые их свойства. Таким образом, производится настройка параметров измерений и обработки данных для последующего переноса в клинические условия.

Продемонстрированы методологические особенности фототерапии при ее применении в гепатобилиарной зоне павианов гамадрилов (*Papio hamadryas*). Эти данные помогут оптимизировать алгоритмы локальной диагностики и лечения холангиоцеллюлярного рака человека и повысят качество диагностической информации, оптимизируют параметры лазерного излучения, опираясь на динамику фотобличинга ФС.

Все процедуры были выполнены в соответствии с этическими стандартами, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующих поправках.

## **ГЛАВА 4. ОБОСНОВАНИЕ МЕТОДОЛОГИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ ФОТОТЕРАНОСТИКИ**

### **4.1. Использование методов лазерной спектроскопии и видеофлуоресцентной диагностики до и после фотодинамической терапии при опухолях доступных локализаций (результат внедрения и клинической апробации методики)**

Данное исследование было направлено для клинической апробации методики флуоресцентной диагностики (ФД) и фотодинамической терапии (ФДТ) с видеофлуоресцентным контролем на доступных локализациях эпителиальных опухолей (органы головы и шеи, шейка матки, кожные покровы).

Все пациенты, включенные в исследование, хорошо перенесли внутривенное введение ФС хлоринового ряда. Не наблюдалось побочных эффектов и аллергических реакций. Однако отмечалась легкая фототоксичность кожи в течение суток после инъекции, которая выражалась гиперемией и отеком на открытых поверхностях тела, которые проходили после приема антигистаминных препаратов через 24–48 часов.

Фотодинамическую терапию проводили с применением источника лазерного излучения с длиной волны генерации 660 нм и выходной мощностью на проксимальном торце оптического волокна 1200–1500 мВт.

Через два-три часа после введения фотосенсибилизатора (хлорин еб) у всех пациентов наблюдалось повышение интенсивности флуоресценции в области новообразования по сравнению со здоровой тканью. Флуоресцентная контрастность экзогенных флуорофоров говорит об избирательности накопления препарата в патологических очагах по отношению к неизменным тканям.

У всех пациенток с заболеванием шейки матки (n=10), включенных в исследование, были получены изображения патологической ткани до и после ФДТ в трех режимах: черно-белом (флуоресцентном), цветном и совмещенном (Рисунок 4.1).

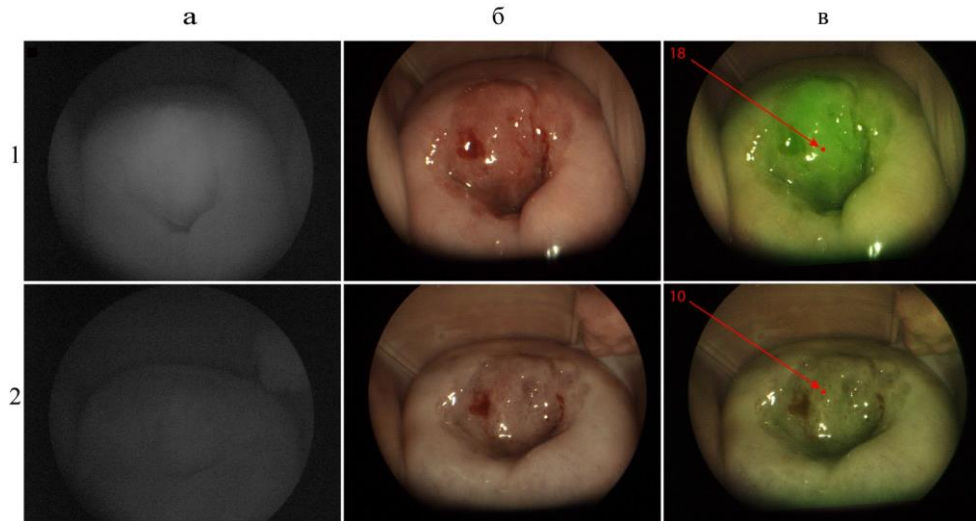


Рисунок 4.1 – Изображения слизистой шейки матки пациента с CIN III, осложненной лейкоплакией: (1) до ФДТ; (2) после ФДТ; (а) черно-белый режим; (б) цветной режим; (в) совмещенный режим (в верхнем левом углу изображения отображается индекс контрастности в отн.ед.)

Концентрацию фотосенсибилизатора определяли при помощи спектрально-флуоресцентной диагностики до и после ФДТ. На Рисунке 4.2 представлены диаграмма и график спектров накопления фотосенсибилизатора в неизменной шейке матки и участков преинвазивного рака.

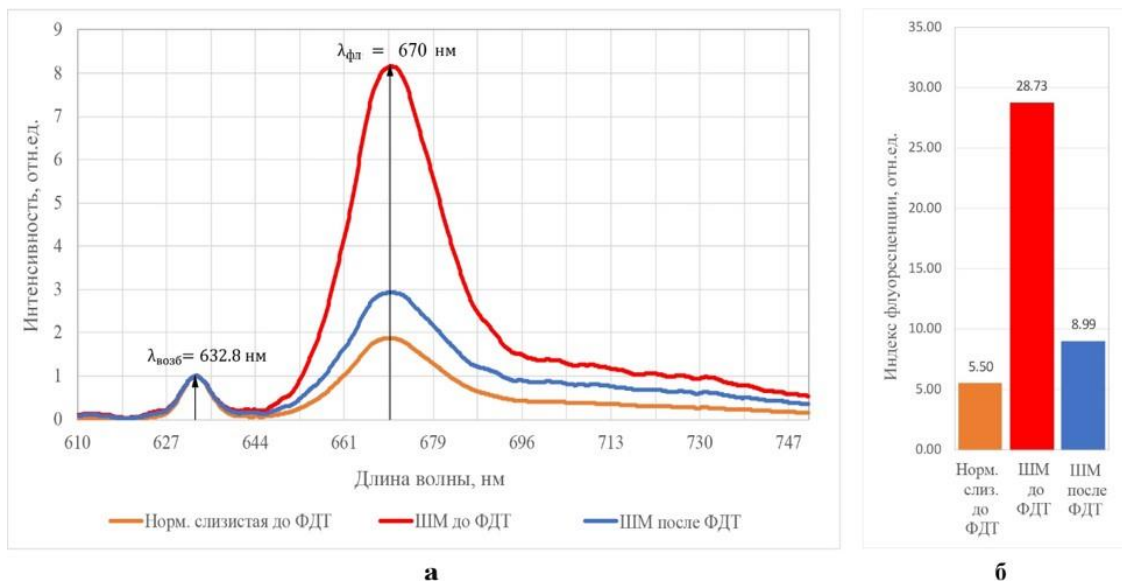


Рисунок 4.2 – Результаты спектральной диагностики пациента с CIS: а) спектры флуоресценции нормальной и патологической слизистой шейки матки до и после ФДТ. Использовался лазер с длиной волны 632,8 нм; б) индексы флуоресценции



После проведенной флуоресцентной диагностики, подтверждения накопления фотосенсибилизатора в патологической ткани проводили ФДТ (Рисунок 4.3).



Рисунок 4.3 – Фотодинамическая терапия CIS шейки матки

Визуальный осмотр шейки матки после ФДТ у всех пациенток выявил трофические изменения в зоне облучения в виде отека, гиперемии и синюшного окраса (Рисунок 4.4).

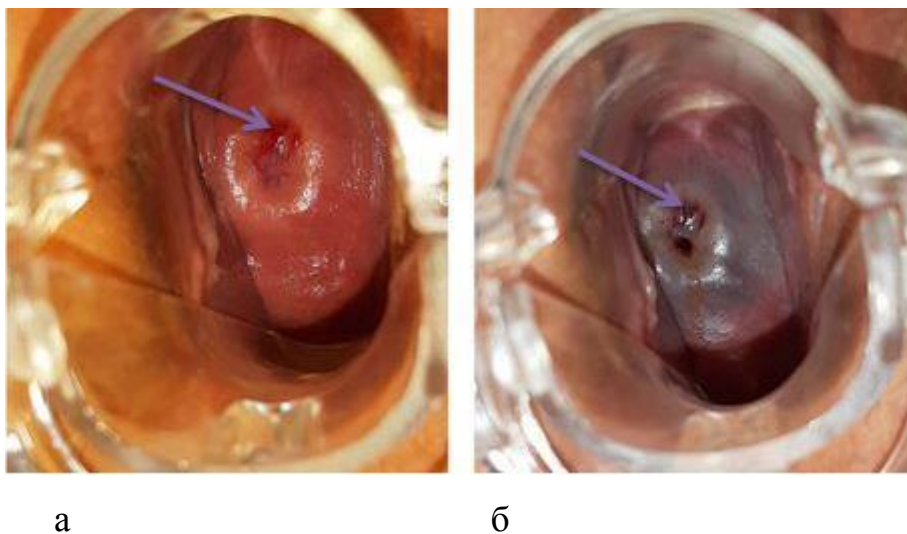


Рисунок 4.4 – Шейка матки до (а) и после (б) ФДТ (стрелками указан CIS)



Успешное лечение и полная регрессия патологически измененных тканей у всех больных подтверждены морфологическим исследованием материалов биопсии шейки матки, взятых у пациентов через 3 месяца после ФДТ с применением ФС хлоринового ряда. У 9 из 10 пациентов не наблюдались ранее выявленные типы ВПЧ и признаки CIN. У одной больной отмечена регрессия CIN III в CIN I и потребовалась повторная процедура ФДТ, в результате которой не наблюдалось признаков ВПЧ и CIN (исследование проведено совместно с врачами-гинекологами Гилядовой А.В. и Ищенко А.А.) [57, 143].

При злокачественном поражении кожных покровов также оценивали распределение ФС методами видеофлуоресцентной диагностики (Рисунок 4.5) и лазерной спектроскопии (Рисунок 4.6) до и после ФДТ с фиксацией индекса флуоресценции исследуемых тканей.

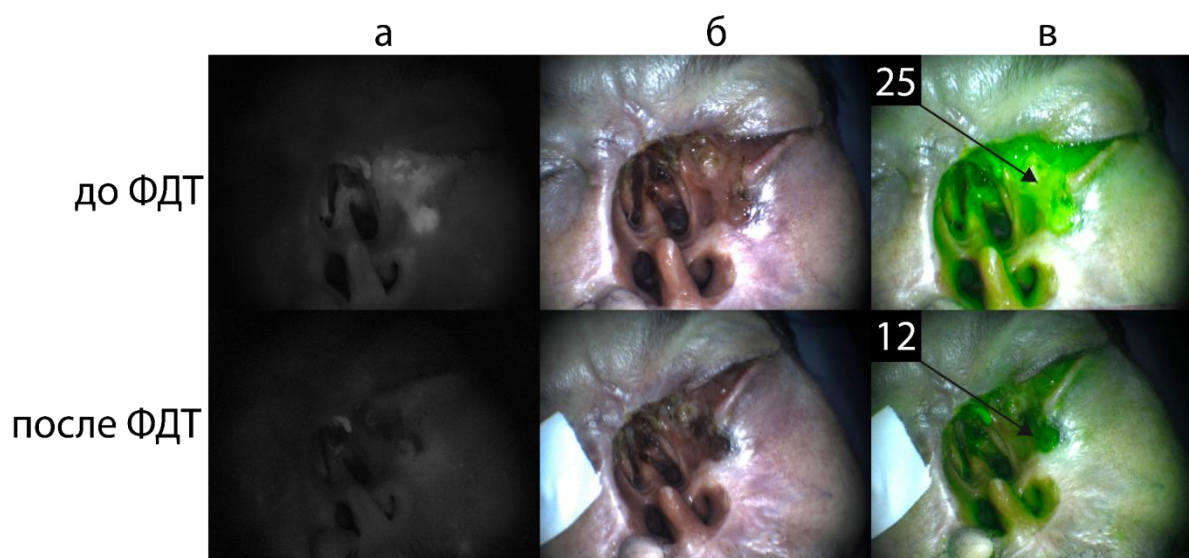


Рисунок 4.5 – Изображения кожи пациента с базальноклеточным раком (рецидив после хирургического лечения), полученные при проведении видеофлуоресцентной визуализации, до и после ФДТ: (а) в цветном режиме; (б) в черно-белом режиме; (в) в совмещенном режиме (в верхнем левом углу изображения отображается индекс контрастности в отн.ед.)

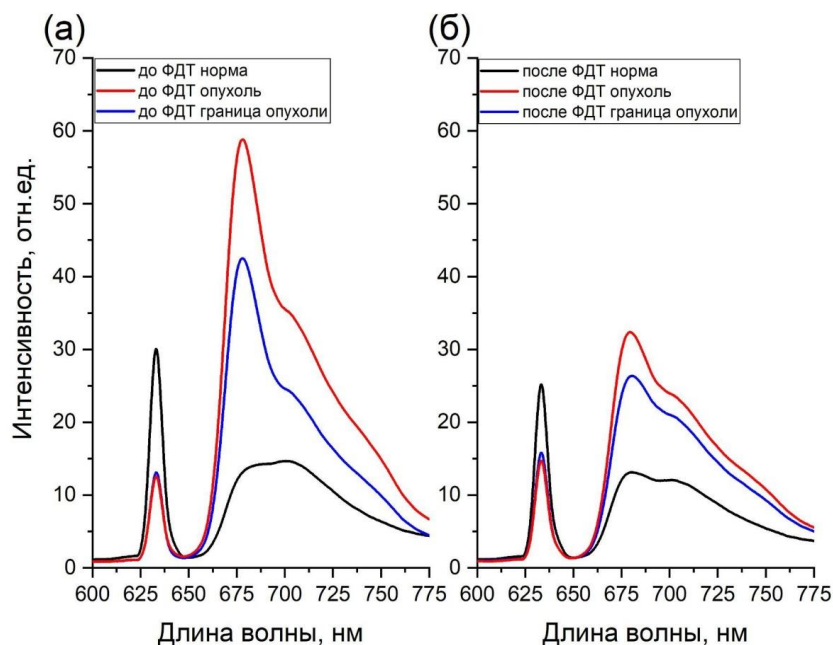


Рисунок 4.6 – Результаты спектрально-флуоресцентной диагностики рака кожи у пациента: (а) до ФДТ; (б) после ФДТ с плотностью мощности  $310 \text{ мВт/см}^2$  и плотностью энергии  $100 \text{ Дж/см}^2$

У всех пациентов со злокачественными новообразованиями кожных покровов отмечалась регрессия опухоли после первого курса ФДТ.

Решением онкологического консилиума рекомендовано проведение всем второго курса ФДТ с целью антибластики с последующим удалением ложа опухоли (тотальная биопсия) для определения патоморфоза. После второго курса фототерапии отмечалась полная регрессия опухоли (Рисунок 4.7).



Рисунок 4.7 – Клинический пример результата примененного способа фототерапии: базальноклеточный рак кожи носа T1N0M0 (указано стрелками) до (а) и после (б) лечения

При контрольном морфологическом исследовании лечебный патоморфоз (по Е.Ф. Лушникову) IV степени отмечен у 16 пациентов [122]. У двоих патоморфоз оценен как III степень, но с удалением в пределах неизмененных тканей. Все больные находятся на динамическом наблюдении.

Аналогичным образом проводили фототеранестику пациентам со злокачественными опухолями органов головы и шеи [129].

После проведенной флуоресцентной диагностики (Рисунок 4.8) выполняли ФДТ с контролем фотобличинга ФС.

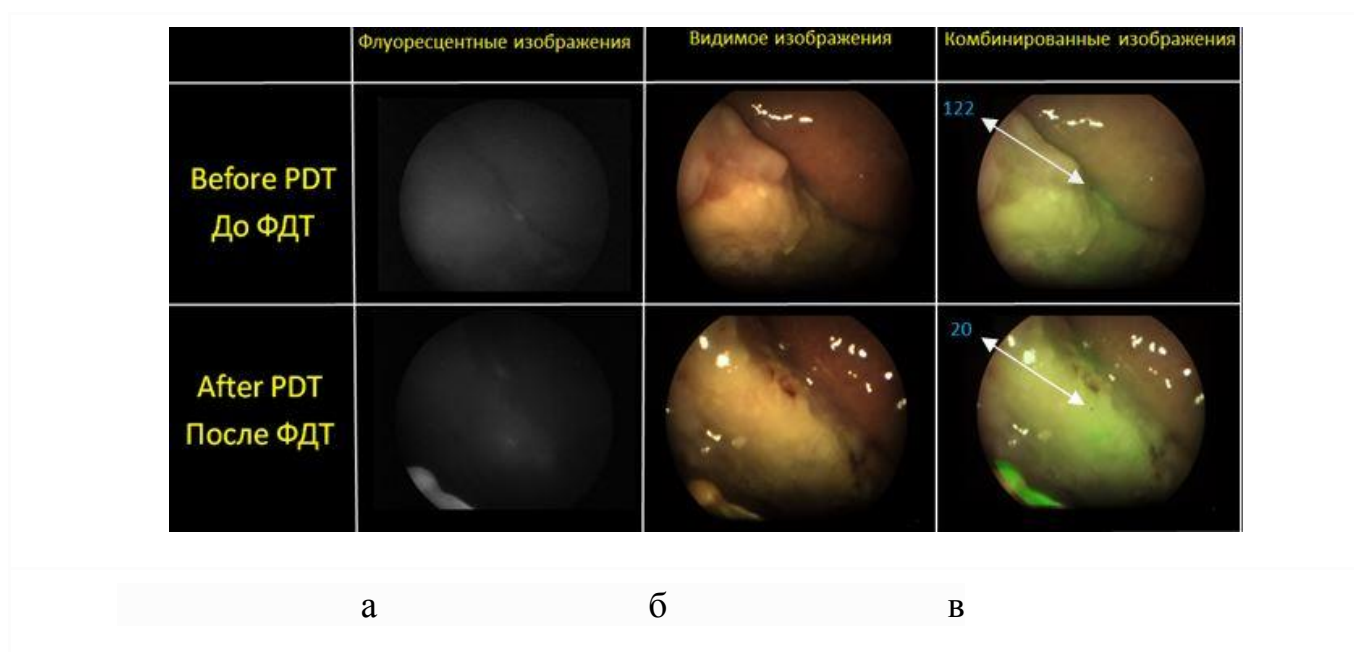


Рисунок 4.8 – Видеофлуоресцентная диагностика рака корня языка до и после ФДТ: а) черно-белое изображение; б) эндоскопическое исследование в обычном режиме; в) флуоресцентное изображение с оценкой индекса (стрелками указан индекс флуоресценции, соответствующий центральной зоне)

После проведенной ФДТ при контрольной видеофлуоресцентной диагностике отмечался фотобличинг на уровне 84%, снижение индекса флуоресценции с 122 до 20 отн.ед. в результате проведенного облучения.

Всем больным раком органов головы и шеи (n=4) фототеранестика проводилась в неoadьювантном режиме, регрессия опухоли позволила провести органосохраняющие операции, а при гистологическом исследовании получен патоморфоз от II до IV степени по Е.Ф. Лушникову.

Всем пациентам с заболеванием шейки матки и кожных покровов фототераностика проведена под местной анестезией. Больным опухолями головы и шеи проводили внутривенную седацию. Во время проведения ФДТ ряд пациентов наблюдал некоторые дискомфортные ощущения, такие как жжение в области облучения или незначительные болевые реакции. Орошение лидокаином слизистой оболочки или инъекции 0.5% раствора новокаина подкожно в области патологии способствовало достаточному обезболиванию для дальнейшего проведения ФДТ пациента.

Полученные в ходе проведения исследования данные свидетельствуют о том, что ФДТ с применением ФС хлоринового ряда является эффективным и малоинвазивным методом лечения заболеваний шейки матки, кожных покровов и органов головы и шеи. Данный метод является локальным, не вызывающим повреждения окружающих тканей, грубого рубцевания. Проведение видеофлуоресцентной диагностики с оценкой индекса контрастности в исследуемой области позволяет оперативно выявить границы патологической ткани. Параллельное применение спектрально-флуоресцентной диагностики позволяет выявить флуоресценцию, характерную для фотосенсибилизатора хлорина еб и оценить его распределение в исследуемых тканях.

Клиническая апробация продемонстрировала возможность использования одного и того же лазерного источника как для фотодиагностики, так и для ФДТ. Это выполнено впервые в клинической практике и позволило в режиме реального времени оценивать индекс флуоресценции и контролировать фотобличинг ФС в облучаемой области. Разработанное оборудование и методика обеспечивали равномерное распределение световой энергии, максимизируя эффект контроля и минимизируя повреждения соседних тканей.

Отработанная при доступных новообразованиях методика фототераностики с использованием видеофлуоресцентного модуля, лазерного спектроанализатора позволила перейти к использованию на более сложнодоступных локализациях, к которым относится холангиоцеллюлярный рак, лечению которого посвящена данная работа.

## 4.2. Желчеотведение у больных с опухолевой стриктурой желчных протоков

Всем пациентам, вошедшим в работу, радикальное хирургическое лечение не проводили по причине распространенности опухолевого процесса в области ворот печени, с поражением желчных протоков обеих долей, лимфатических узлов, паренхимы печени, а также функционального состояния больных с тяжелыми сопутствующими заболеваниями и пожилого возраста.

Состояние пациентов при поступлении оценивали по шкале ECOG и индекса Карновски (Таблица 4.1), проводили первичные анализы крови (общий клинический и биохимический), а также инструментальные методы диагностики: УЗИ и МСКТ с внутривенным контрастированием. У всех больных механическая желтуха была манифестным синдромом, что и послужило причиной обращения в стационар.

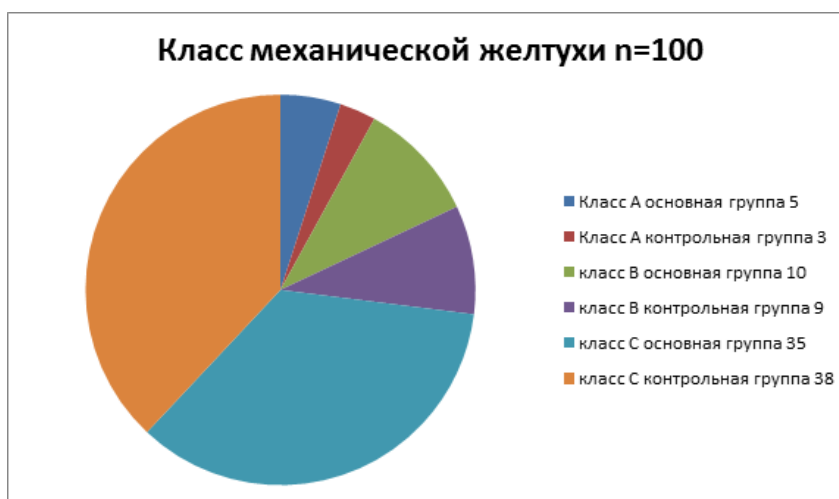


Рисунок 4.9 – Диаграмма распределения класса механической желтухи опухолевого генеза в группах исследования

Таким образом, в нашем исследовании преобладали пациенты с тяжелой механической желтухой, класс С (по применяемой классификации представленной в Главе 2) – в основной группе 70% и группе сравнения 76% (Рисунок 4.9).

Данная классификация позволила оценить тяжесть состояния пациента в совокупности с другими критериями (возраст, сопутствующие заболевания,

распространенность опухолевого процесса) для определения операбельности больного.

Таблица 4.1 – Оценка состояния больных при госпитализации по шкале ECOG и индекса Карновски

Показатель	Группы наблюдения	
	Основная (n=50)	Сравнения (n=50)
Индекс Карновски	59,4 (56,7–62,1)	57 (54,5–59,2)
ECOG	2,6 (2,5–2,8)	2,6 (2,4–2,7)

Таким образом, в основной и контрольной группах существенного различия между общим состоянием больных не получено.

Для оценки резектабельности опухоли проводили УЗИ и МСКТ с внутривенным контрастированием. МРТ с МР-холангиографией проводили в тех случаях, когда предполагалась возможность радикального хирургического лечения.



Рисунок 4.10 – УЗИ-признаки внутрипеченочной желчной гипертензии (стрелкой указаны расширенные желчные протоки)



Ультразвуковое исследование проводили с целью выявить патологические изменения гепатобилиарной зоны для определения дальнейшей тактики обследования и лечения.

У всех больных (100%) выявлены признаки внутрипеченочной желчной гипертензии, что свидетельствовало о наличии билиарного блока на уровне ворот печени или дистальнее расширенных протоков (Рисунок 4.10).

При распространении опухоли на паренхиму печени (n= 47) во время УЗИ определялось образование с нечеткими контурами и отсутствующей четко определяемой на всем протяжении границы с нормальной паренхимой печени (Рисунок 4.11).

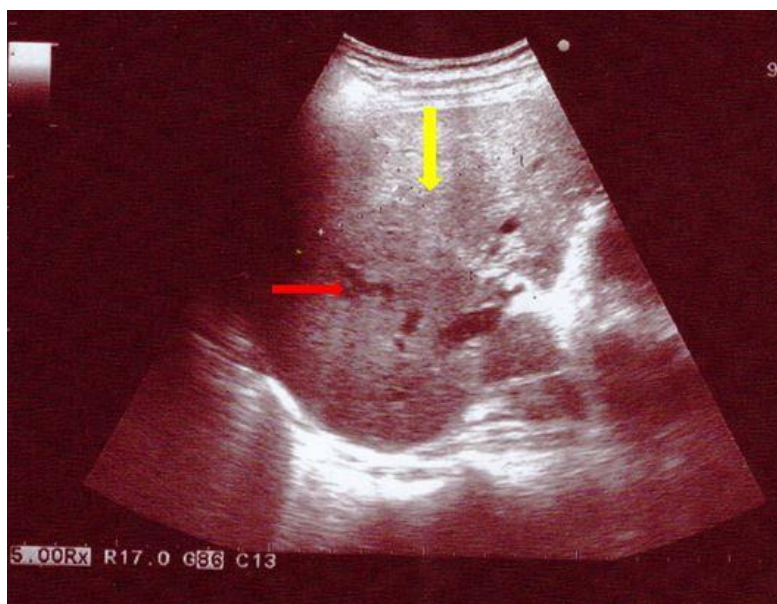


Рисунок 4.11 – ЭХОграмма опухолевого поражения в области ворот печени (стрелки: желтая – опухоль; красная – расширенные сегментарные желчные протоки)

При доплеровском цветовом картировании в области выявленных изменений отсутствовал специфический сосудистый рисунок, определялись зоны как гипер- так и гиповаскуляризации.

При выявлении признаков желчной гипертензии (100% случаев) проводилась оценка безопасного ЭХО-доступа для чрескожной пункции билиарного протока.

После проведенного УЗИ пациентам выполняли мультиспиральную компьютерную томографию с внутривенным контрастированием (n=100). Это исследование проводили до этапа желчеотведения, так как внутрипросветные дренажи за счет артефактов на изображениях могут затруднить диагностику. При МСКТ определяли локализацию и границы опухоли, ее тип по классификации Bismuth-Corlette, а также признаки сосудистой инвазии, поражение лимфатических узлов и отдаленные метастазы. По результатам МСКТ у 100 пациентов выявлен билиарный стеноз на уровне проксимальных отделов (Таблица 4.2, Рисунок 4.12).

Таблица 4.2 – Оценка типа билиарного блока при МСКТ по классификации Bismuth – Corlette

Bismuth–Corlette	Пациенты (n=100)
I	10
II	11
IIIА	18
IIIВ	21
IV	40

По результатам исследования, у всех больных в зоне поражения отмечались сужение и деформация просвета протока, расширение желчных протоков проксимальнее стеноза. Опухоль максимально накапливала контрастный препарат в отсроченную фазу.



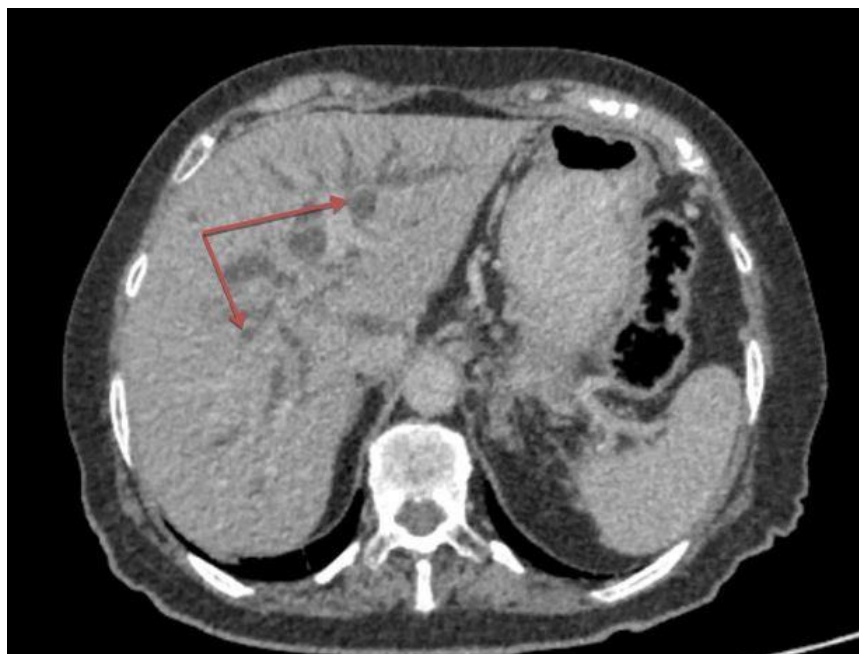


Рисунок 4.12 – Компьютерная томография, аксиальная плоскость (стрелки – расширенные желчные протоки обеих долей печени)

У всех больных выявлено поражение лимфатических узлов ворот печени и печеночно-дуоденальной связки; они были увеличены в размерах, неоднородной структуры, умеренно накапливали контрастное вещество. У 67% больных отмечалось поражение забрюшинных лимфатических узлов.

Признаки сосудистой инвазии в ветви воротной вены и/или печеночной артерии отмечены у 72 (72%) больных: у 34 в основной группе и 38 – в группе сравнения.

Полученные данные исследований исключали радикальное хирургическое лечение у всех 100 пациентов, включенных в работу.

На первом этапе лечения всем больным основной группы и группы сравнения проводилась декомпрессия желчных протоков. Для пациентов, вошедших в исследование как основной, так и группы сравнения (n=100), применяли чрескожное чреспеченочное желчеотведение под контролем УЗИ и рентгеноскопии. Учитывая, что пациенты поступали в клинику в тяжелом состоянии, обусловленном длительным периодом желтухи, выполнялась декомпрессия желчных путей в первые сутки после поступления больного. С момента госпитализации начинали комплексную многокомпонентную

дезинтоксикационную терапию, а также коррекцию других нарушений гомеостаза.

Всем пациентам с механической желтухой, вошедшим в исследование, мы стремились выполнить наружно-внутреннюю холангиостомию в обеих группах (79 больных), что, к сожалению, не всегда технически возможно. Наружно-внутреннее желчеотведение позволяет временно восстановить пассаж желчи в просвет кишечника, избавляя больного от постоянного сбора желчи в желчеприемник. Однако у 21 больного по причине распространенности опухолевой стриктуры, ее плотной консистенции, не позволяющей провести инструмент ниже места сужения, изначально выполняли чрескожное наружное желчеотведение.

Вариантами чрескожной чреспеченочной холангиостомии являлись наружное и наружно-внутреннее дренирование желчных протоков (Рисунок 4.13 а, б).

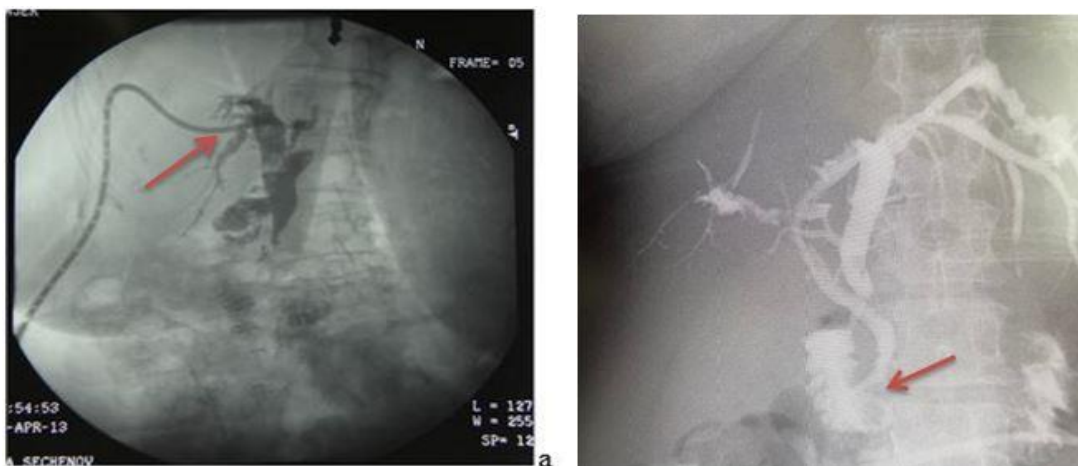


Рисунок 4.13 – Чрескожное чреспеченочное желчеотведение: а) наружное желчеотведение (наружный дренаж фиксирован в правом долевым протоке – указан стрелкой); б) наружно-внутреннее желчеотведение (наружно-внутренний, дистальный кончик дренаж в просвете двенадцатиперстной кишки – указан стрелкой)

Для осуществления безопасного доступа чрескожную пункцию желчных протоков, проведение струны, бужирование канала и дренирование у всех больных выполняли только под УЗИ-контролем.

При выполнении доступа к желчным протокам мы руководствовались следующими принципами. Доступ выполняли только под ультразвуковой навигацией, при этом основным являлась безопасность траектории ЭХО-линии пункционного канала и хорошая визуализация желчного протока. Исключалась возможность прохождения этой линии через сосуды, опухолевую ткань, плевральный синус, желудок, желчный пузырь. Кроме того, целесообразно, чтобы паренхима печени в месте входа в сегментарный проток имела толщину более 1,5–2 см во избежание возможного желчеистечения.

Как показали наблюдения нашей клиники, при чрескожном чреспеченочном дренировании желчных протоков под контролем ультразвука предпочтительным являлся доступ через правую долю. Это обусловлено анатомо-топографическими особенностями расположения желчных протоков по отношению к портальной системе печени и снижает риск повреждения сосудов. Оптимальным для дренирования являлась пункция сегментарного желчного протока, впадающего под наименьшим углом к общему печеночному протоку в продольном направлении.

Однако нередко доступ через протоки правой доли печени выполняется через межреберные промежутки, что влечет за собой риск повреждения иглой легочного синуса и легких. Для визуализации легочного синуса необходим глубокий вдох пациента – тогда на ультразвуковой картине хорошо видна заполняемая воздухом легочная ткань, выполняющая синус. В этом случае необходим контакт с пациентом, что не всегда возможно, так как часть операций выполняется под наркозом. Кроме того, сложности возникали из-за дыхательной экскурсии грудной клетки, что затрудняет работу хирургов. Также нельзя не сказать, что установка дренажа через межреберье несет риск повреждения нервных окончаний и сосудов межреберного промежутка, что влечет за собой болевой синдром и возможное кровотечение в послеоперационном периоде.

Предпочтительный доступ в протоки правой доли печени достигался при пункции 6 и 5 сегментарных протоков. Бесспорным преимуществом этого доступа является меньший риск облучения рук хирурга при рентгеноскопической части работы по сравнению с доступом через левую долю печени, когда руки располагаются непосредственно под С-дугой.

Доступ к сегментарным протокам левой доли печени нивелирует возможность повреждения легочного синуса, снижает болевой синдром в послеоперационном периоде, позволяет осуществить вход в желчные протоки более проксимально, что снижает риск миграции дренажа за счет более протяженного его расположения по ходу протока. С другой стороны, при доступе через левые сегментарные протоки, как правило, возникает острый угол между левым долевым протоком и общим печеночным, что обусловлено анатомическим расположением. Это может затруднять дальнейшие манипуляции с инструментами для последующей реканализации стриктуры. Оптимальными для доступа через левую долю печени являлись 2 и 3 сегментарные протоки.

Пункцию желчного протока всегда проводили иглой 22G. После удаления стилета иногда уже по игле поступала желчь, что свидетельствовало о правильном расположении кончика иглы и не требовало, на этом этапе, введение контрастного препарата. В дальнейшем через иглу вводили металлический проводник 0.038 Inch, который проводили без усилий до появления препятствия (Рисунок 2.7 – Глава 2).

После этого операцию продолжали под рентгеноскопическим контролем. Иглу удаляли, по тонкому проводнику устанавливали систему коаксиальных интродьюсеров Neff на жесткой канюле с просветом 0.018 длиной 200мм NPAS-100-RB-NT (Рисунок 2.8 – Глава 2).

После извлечения проводника, внутреннего катетера и жесткой канюли через просвет интродьюсера поступала желчь, после чего выполняли холангиографию, при которой определяли архитектуру желчных протоков, локализацию блока контрастирования, его характеристики: полный или частичный (Рисунок 4.14 а, б).

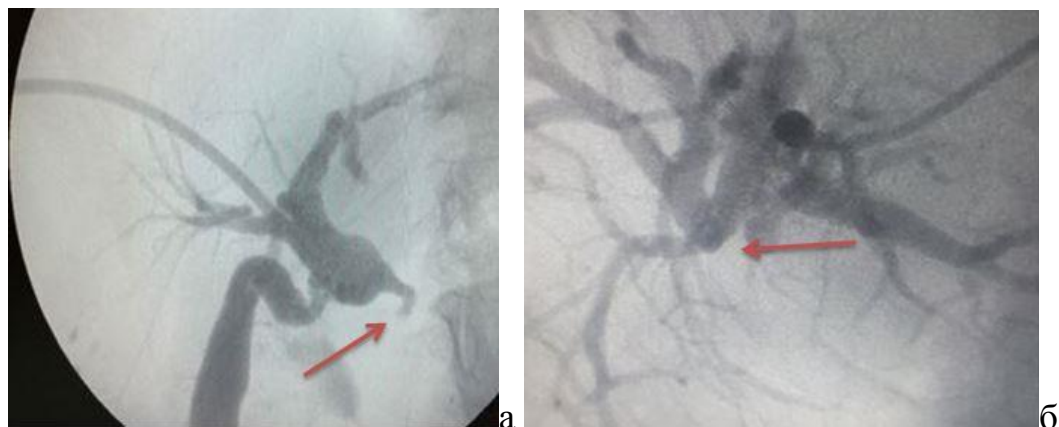


Рисунок 4.14 – Холангиография: а) частичный блок контрастирования в области стеноза б) полный блок. Стрелками указан опухолевый стеноз желчных протоков

После этого в желчные протоки проводили плетеный J-образный проводник 0.035 (THSF-35-90) либо гидрофильный (скользящий) проводник RPS 0.035-145. На проводнике в желчные протоки устанавливали манипуляционный катетер HNBR 5.0-35-40-P-NS-KMP (Рисунок 4.15).



Рисунок 4.15 – Установка в желчные протоки манипуляционного катетера HNBR 5.0-35-40-P-NS-KMP

Под контролем холангиографии манипуляционный катетер подводят к месту стриктуры и выполняют динамическую гидравлическую дилатацию физиологическим раствором с водорастворимым контрастным препаратом с

целью выявления сброса контрастного препарата через стеноз в неизмененную часть желчных протоков под контролируемым давлением.

У 36 больных (36%) получали нитевидный сброс контрастного препарата за место сужения, что позволило без труда провести манипуляционный катетер, а затем сразу выполнить наружно-внутреннее желчеотведение. Перед установкой холангиостомы, после проведения манипуляционного катетера в неизмененную часть желчных протоков повторно проводили фистулографию, при которой оценивали локализацию и протяженность опухолевого поражения и своевременное поступление контрастного препарата в просвет кишки.

У 64 больных при первичной холангиографии получили полный блок контрастирования, однако всегда выполняли попытку провести манипуляционный катетер и гидрофильный проводник за место сужения. В этом случае через манипуляционный катетер проводили гидрофильный (скользящий) проводник RPS 0.035-145 и под рентгеноскопическим контролем выполняли тракционные движения последовательно проводником и манипуляционным катетером. Все движения выполнялись без усилий, так как был риск образования ложного хода и кровотечения. Таким образом, удавалось провести скользящий проводник и манипуляционный катетер еще у 43 пациентов.

У 21 больного не удалось провести инструменты за область стеноза, что вынудило установить наружное желчеотведение.



Рисунок 4.16 – Установка наружной холангиостомы ультратановым дренажем 8.5F

Для дренирования желчных протоков после удаления гидрофильного проводника через манипуляционный катетер устанавливали J-образный проводник и после удаления катетера в желчные протоки вводили мультиперфорированный катетер 8.5 F (Рисунок 4.16). Катетер устанавливали так, чтобы вся часть катетера, несущая отверстия, находилась в протоке, что исключало возможность кровотечения и желчеистечения. Катетер фиксировали к коже, чтобы предотвратить его смещение. При наружном желчеотведении после тщательной санации желчных протоков 0.9% раствором натрия хлорида с разведённым антибиотиком цефалоспоринового ряда дренаж присоединяли к закрытой дренажной системе на отток. При наружно-внутреннем, когда дистальный конец дренажа находится в просвете кишки, совершать аспирацию нецелесообразно, так как в этом случае происходит эвакуация кишечного содержимого через желчные протоки наружу, что дополнительно инфицирует желчь и способствует прогрессированию холангита. В связи с этим, при наружно-внутреннем желчеотведении производили санацию желчных путей только дозированным введением раствора без аспирации. При этом введение совершали толчкообразными короткими движениями с целью заброса раствора в сегментарные протоки. Первые сутки продолжали санацию капельным промыванием с малой скоростью 4 капли в минуту. В дальнейшем наружно-внутренний дренаж перекрывали, а санацию выполняли один раз в сутки.

В обеих группах (n=100) при чрескожной чреспеченочной холангиостомии у 32 больных выполнили дренирование протоков правой доли через правый аксиллярный доступ. Через эпигастральный доступ по средней линии живота дренирование протоков левой доли печени проведено 42 пациентам. 26 больным устанавливали две холангиостомы через правую и левую доли печени. Окончательным вариантом желчеотведения было эндопротезирование протоков нитиноловым саморасширяющимся стентом.

При обструкции правого долевого и общего печеночного протока достаточно часто в процесс вовлекаются желчные сегментарные протоки правой доли в связи с их близким расположением к воротам печени. Если два или более

сегментарных протока правой доли обтурированы опухолью, предпочитали вначале дренировать левую долю, оставляя правую долю не дренированной. Дренирования одной левой доли часто бывало достаточно для снижения уровня билирубина и устранения зуда за счет расширения мелких коммуникантных протоков. В случае выявления при холангиографии распространения опухоли на второй долевым протоком с полным разобщением конfluence выполняли дренирование обеих долей печени.

Восемь больных в основной и 11 в группе сравнения, у которых наблюдались сочетанные обструкции сегментарных и общего печеночного протоков, не вошли в группы исследования, поскольку использование минимально инвазивных вмешательств на желчных протоках считалось бесперспективным. Как правило, у таких больных желтуха носит смешанный характер вследствие распространения опухолевой инфильтрации на паренхиму печени. К тому же, имеющиеся признаки полиорганной недостаточности несли риск интра- и послеоперационных осложнений (например, кровотечение). К сожалению, в данной ситуации возможно проведение лишь симптоматической терапии в специализированном стационаре.

Противопоказанием к лечению желчной обструкции в области ворот печени минимально инвазивными способами являлись множественные билобарные метастазы в печени, асцит, а также тяжелые расстройства дыхания и сердечной деятельности, свидетельствующие о терминальной стадии заболевания.

При I варианте (Рисунок 4.17) обструкции выявлены в 10 случаях. У 4 больных проведено наружное желчеотведение, а у 6 – наружно-внутреннее.





Рисунок 4.17 – Наружно-внутренняя холангиостомия при опухоли Клатскина (Bismuth I тип стрелками указана опухолевая стриктура)

При II варианте (11 больных) в 4 случаях установлена наружная холангиостома, в 7 – наружно-внутренняя (Рисунок 4.18а).

При стриктуре IIIb варианте (Рисунок 4.18б) обструкции четверем больным установлена наружная, а в 16 – наружно-внутренняя холангиостома.

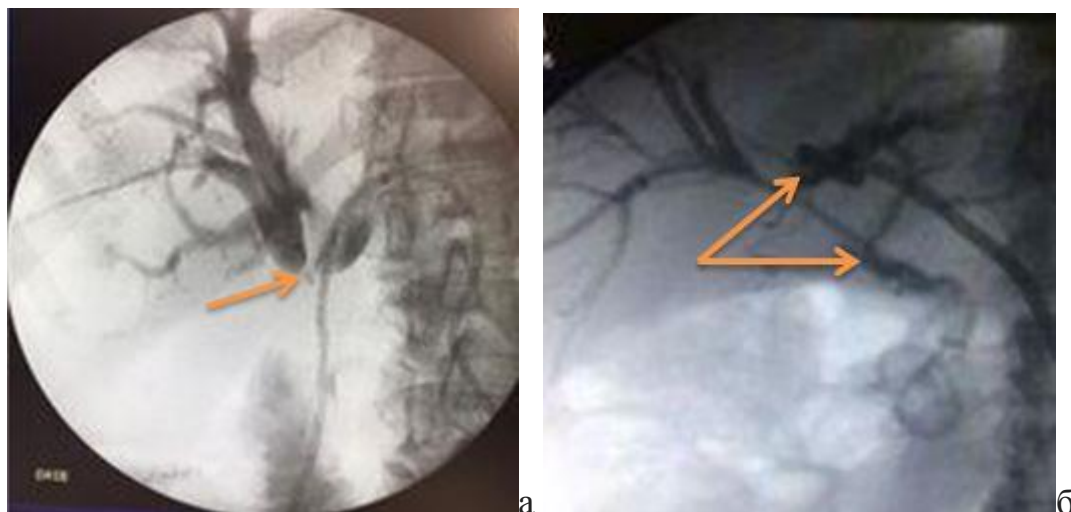


Рисунок 4.18 – Поражение желчных протоков по классификации Bismuth-Corlette (указано стрелками): а) II тип, б) IIIb тип

При IIIa варианте (Рисунок 4.19) – 16 пациентов в 10 наблюдениях установлена наружно-внутренняя холангиостома, а в шести – наружная.

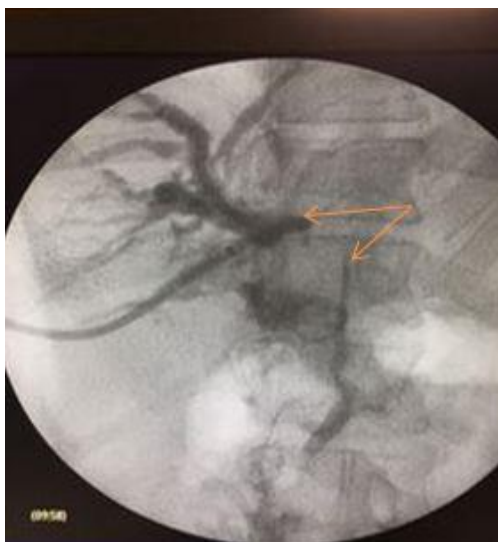


Рисунок 4.19 – Поражение желчных протоков по классификации Bismuth-Corlette (указано стрелками) IIIA тип

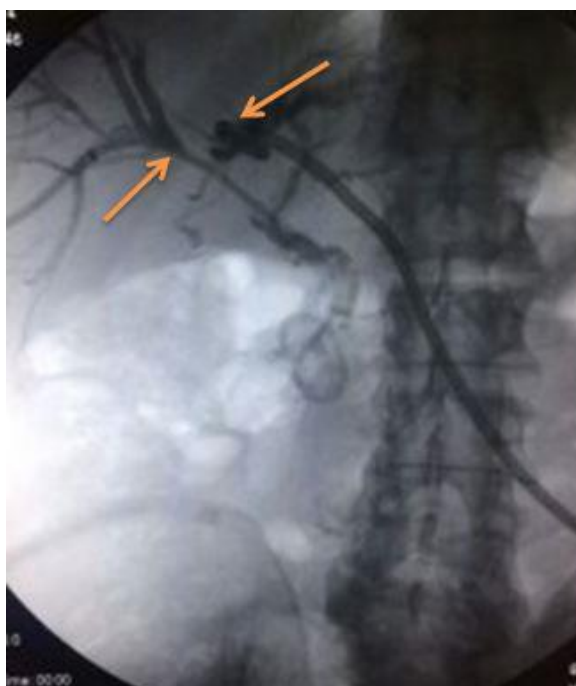


Рисунок 4.20 – Поражение желчных протоков по классификации Bismuth-Corlette (указано стрелками) IV тип, полное разобщение долевых протоков (блок на уровне правого и левого долевого протока указан стрелками)

При IV варианте обструкции, наблюдавшейся у 43 больных, вошедших в исследование (Рисунок 4.20), проведено билобарное желчеотведение при полном разобщении долевых протоков – 26 пациентов. У остальных 17 больных проводили дренирование через правую или левую доли печени, так как при фистулографии выявляли частичное разобщение долевых протоков, но

позволяющее наложить холангиостомию через одну долю, в том случае, когда контрастируются сегментарные протоки обеих долей печени. У этой группы пациентов в 14 случаях установлена наружно-внутренняя холангиостомия и в трех – наружная.

Окончательный вариант желчеотведения выбирали только после интраоперационной холангиографии.

Всего в двух группах проведено 126 чрескожных чреспеченочных холангиостомий у 100 больных.

В Таблице 4.3 указаны варианты желчеотведения, выполненные всем больным в зависимости от полученной интраоперационной холангиографии.

Следует отметить, что по результатам прямой холангиографии во время желчеотведения получен IV тип по классификации Bismuth-Corlette у 43 пациентов, тогда как при МСКТ данный вариант отмечен у 40 больных. Таким образом, прямая холангиография продемонстрировала не намного, но более точную картину билиарного стеноза, чем МСКТ.

Этим больным выполнено билобарное желчеотведение. Из них 26 установлен наружно-внутренний дренаж через протоки обеих долей печени; 17 пациентам наружно-внутренний дренаж установлен через правую или левую доли печени, а протоки контрлатеральной доли дренировали наружной холангиостомой по причине плотности стриктуры и невозможности проведения через нее наружно-внутреннего дренажа.

Таблица 4.3 Варианты желчеотведения у пациентов с механической желтухой

Варианты желчеотведения n=100	Расположение опухоли по классификации Bismuth-Corlette				
	Bismuth I n = 10(10%)	Bismuth II n = 11(11%)	Bismuth IIIa n = 16(16%)	Bismuth IIIb n = 20(20%)	Bismuth IV n = 43(43%)
Наружное желчеотведение через правую долю печени n=7 (7%)	2	2	1	1	1
Наружное желчеотведение через левую долю печени n=14 (14%)	2	2	5	3	2
Наружно-внутреннее желчеотведение через правую долю печени n=25 (25%)	3	4	3	9	6
Наружно-внутреннее желчеотведение через левую долю печени n=28 (28%)	3	3	7	7	8
Билобарное наружно-внутреннее желчеотведение n=26 (26%)					26

Осложнения, связанные с желчеотведением, выявленные после операции у пациентов представлены в Таблице 4.4.

Таблица 4.4 – Осложнения, возникающие после чрескожной холангиостомии

№	Осложнение	Тип желчеотведения	
		Наружное	Наружно-внутреннее
	Желчеистечение	1 (1%)	1 (1%)
	Нагноение раны	1 (1%)	2 (2%)
	Кровотечение	2 (2%)	4 (4%)
	Печеночная недостаточность	3 (3%)	1 (1%)
	Миграция дренажа	9 (9%)	11 (11%)

После чрескожного желчеотведения у ряда больных возникли осложнения. Изначально признаки холангита выявлены, более чем у половины пациентов (n=66). Внутрипротоковые манипуляции у больных с инфицированной желчью могут привести к восходящему холангиту, который отягощает общее состояние больных и ограничивает варианты лечения (стентирование, ФДТ). Для коррекции состояния все внутрипротоковые вмешательства проводили на фоне многокомпонентной дезинтоксикационной и антибактериальной терапии. При холангите на фоне механической желтухи желчеотведение способствует санации желчных протоков.

При наружном (n=21) и наружно-внутреннем желчеотведении (n=79) промывание желчных протоков проводили всем пациентам. Однако при холангите всегда выполняли тщательную санацию желчных протоков физиологическим раствором с добавлением антибактериального препарата цефалоспоринового ряда, с продолжением антибактериальной терапии в

послеоперационном периоде как системно, так и капельно внутривосветно через дренаж.

В двух случаях при возможности провести наружно-внутреннее желчеотведение вследствие выраженного холангита (замазкообразная желчь, со сгустками) первым этапом провели наружное желчеотведение, с целью более тщательной санации желчных протоков в послеоперационном периоде. Второй этап лечения – фотодинамическая тераностика с установкой наружно-внутреннего дренажа – был проведен после получения отрицательных результатов посева желчи на микрофлору через 5–7 дней.

У всех больных с признаками холангита, после желчеотделения, на фоне проводимого противовоспалительного лечения и санации желчных протоков отмечена положительная динамика и стабилизация состояния. При наружно-внутреннем желчеотведении у 67 (85%) пациентов фиксировали дистальный конец дренажа в просвете кишечника, из них у 11 (16%) больных сохранялись признаки холангита на протяжении 3–4 дней, что вероятно связано было с рефлюксом кишечного содержимого в просвет протоков. У 12 (15%) больных, у которых дистальный конец наружно-внутреннего дренажа фиксирован супрапапиллярно в неизменной дистальной части общего желчного протока, признаков холангита не наблюдалось.

Проведение пункции желчных протоков выполняли под контролем УЗИ – это нивелирует возможные осложнения, однако следует помнить, что при прохождении проводника через ворота печени, общий желчный проток и периапулярную опухоль травмируется слизистая, что в ряде случаев приводит к венозному кровотечению с образованием сгустков крови выше области обструкции. С учетом того, что у этой группы больных существуют нарушения в системе гемостаза, повышается риск кровотечения. В нашей группе больных кровотечение не требовало каких-либо дополнительных вмешательств. Гемостаз осуществлялся консервативными способами, а само кровотечение ограничилось гемобилией. Так же целесообразно проводить профилактику нарушений системы

гемостаза (этамзилат, викасол, при необходимости переливание свежезамороженной плазмы, тромбомассы).

Технически для снижения рисков кровотечения необходимо, чтобы из пунктируемого протока был достаточно легкий способ для прохождения металлического проводника в неизмененную часть желчных протоков без существенных изгибов, что может затруднить дальнейшие манипуляции с проводником. Если имелось несколько безуспешных попыток пройти через, например, правый печеночный проток, лучше попытаться сделать это, используя левый проток, при этом уходя проводником из просвета желчного протока в брюшную полость. Также целесообразно оставить страховочный дренаж в месте пункционного канала для контроля за гемо- и билистазом.

Миграция дренажа из просвета протоков являлась причиной желчеистечения. Смещение дренажа с выходом его кончика из желчного протока в паренхиму печени и/или свободную брюшную полость, всегда было связано с уменьшением размеров печени и отека паренхимы после разрешения желчной гипертензии при фиксированном к коже дренаже. При миграции дренажа, появлялся сброс желчи по ходу дренажного канала на переднюю брюшную стенку и подкожную клетчатку, что вызывало нагноение последней. Это требовало коррекции положения дренажа под рентгеноскопическим контролем. При нагноении выполняли рассечение кожи и санации подкожно-жировой клетчатки растворами антисептиков и оставлением мазей с антибактериальными препаратами. Заживление происходило вторичным натяжением.

Печеночная недостаточность у четырех больных (4%) после проведенного желчеотведения была связана с быстрой желчной декомпрессией (так называемый синдром «быстрой декомпрессии», который более характерен для наружного желчеотведения). У каждого больного свои безопасные темпы снижения желчной гипертензии, для профилактики быстрой декомпрессии необходимо замедлить этот темп. Мы достигали этого за счет удлинения дренажной трубки и ее расположением на уровне или выше проекции желчного протока. В первые сутки

после наружного желчеотведения совершали отток желчи дозированно, до 400–500 мл, с перекрыванием дренажа на 3–4 часа.

Следует отметить, что фатальных осложнений, независимо от холангиостомии, нами отмечено не было.

После проведенного желчеотделения проводилось разделение больных на группы.

Пациентам группы сравнения после стабилизации состояния проводили стентирование опухолевой стриктуры. Основной группе выполняли внутрипротоковую фототераностiku со стентированием желчных протоков.

### **4.3. Внутрипротоковая фотодинамическая тераностика холангиоцеллюлярного рака**

После дренирования желчных протоков и снижения желтухи 50 больным основной группы провели флуоресцентную диагностику и фотодинамическую терапию опухолевой стриктуры.

Методология фотодинамической тераностики включала несколько этапов. Первый этап – это внутривенное введение фотосенсибилизатора хлоринового ряда. На втором этапе проводилась экспозиция для необходимого накопления препарата опухолевой тканью. На третьем этапе выполняли флуоресцентную диагностику с последующей фотодинамической терапией. Четвертым этапом являлся процесс оценки фотобличинга, используемого ФС.

Для флуоресцентной диагностики используется метод лазерной спектроскопии (описанный в Главе 2). Однако применяемые в клинической практике диагностические зонды для лазерного спектрального анализа имели лишь торцевое окно для фиксации обратного излучения, что затрудняло диагностику в просвете протока, поскольку при нем необходимо фиксировать зонд строго под углом  $90^\circ$  к исследуемой поверхности. Для улучшения диагностики, возможности оценивать поражение желчных протоков использовали оптическое волокно с боковым окном фиксации флуоресцентного сигнала.



Внедрение в клиническую практику видеофлуоресцентного модуля для эндоскопии и минимально инвазивной хирургии позволило выполнять диагностику под визуальным контролем с оценкой индекса флуоресценции в режиме реального времени.

Полученные в ходе экспериментального исследования, *in vitro* и *in vivo*, данные, а также работы по внедрению данной методики при опухолевом поражении органов более доступной локализации позволили использовать видеофлуоресцентную диагностику для выявления злокачественного поражения желчных протоков, проводя ее через холангиостому.

ФДТ выполняли сразу после флуоресцентной диагностики. Использовали источник лазерного излучения с длиной волны 660 нм, соответствующей максимуму поглощения используемых ФС (производные хлорина Е6) в красной области спектра. Под воздействием облучения в опухолевых клетках, накопивших фотосенсибилизатор, происходит фотохимическая реакция с образованием синглетного кислорода, приводящая к повреждению и гибели этих клеток, а также повреждению эндотелия сосудов, кровоснабжающих опухоль.

Одной из важных составляющих успешного проведения ФД и ФДТ является достаточная концентрация фотосенсибилизатора в патологическом очаге. В связи с чем важно определить пик накопления ФС перед ФДТ.

Во время ФДТ проводили контроль фотобличинга (снижение концентрации ФС под действием лазерного излучения, т.е. выгорание).

Суммарная световая доза ФДТ, установленная в ходе предклинического исследования, составила 150–300 Дж/см<sup>2</sup>. Данная доза является безопасной и эффективной при внутрипротоковой ФДТ. Время проведения ФДТ зависело от уровня интенсивности флуоресценции и скорости ее уменьшения. Согласно результатам наших исследований [336, 337, 338, 389, 404], фотобличинг для подобных типов опухолей с препаратом Себ является величиной непостоянной и варьируется от пациента к пациенту. Значения фотобличинга должны лежать в диапазоне 50–100%, что с высокой степенью вероятности обеспечивает положительный результат лечения.

Начальные проявления фотодинамического эффекта чаще всего наблюдали на 3–5 день. При фистулографии отмечали реканализацию стриктуры за счет уменьшения объема опухоли.

Таким образом, для эффективного применения фотодинамической терапии стенозирующего ХЦР важным является:

- эффективный доступ к билиарному стенозу;
- достаточная концентрация фотосенсибилизатора в опухоли, которая должна составлять не менее 0.2 мг/кг;
- проведение ФДТ на всем протяжении стриктуры, что достигается путем использования оптического волокна с цилиндрическим излучателем;
- достижение фотобличинга ФС не менее 50-60 %\*.

На данный момент отсутствуют исследования по измерению концентрации ФС в холангиокарциноме при чрескожных рентген-интервенционных вмешательствах до и после ФДТ. Также в литературе практически отсутствуют данные объективного контроля процесса проведения фотодинамического воздействия.

Соответственно, для достижения положительного результата при разработке методики фототераностики, внимание было обращено на следующие аспекты:

1. определение оптимального времени начала проведения фототераностики после внутривенного введения ФС;
2. возможность использования лазера с длиной волны 660 нм как для диагностики, так и для ФДТ, с использованием ФС;
3. проведение сравнительного анализа методов внутрипротоковой диагностики: лазерного спектрального анализа и видеофлуоресцентной оценки;
4. определение оптимального способа подведения световой энергии в область стеноза;
5. возможность оценки фотобличинга после ФДТ стенозирующего ХЦР.

---

\* Расхождение значений фотобличинга *in vivo* и *in vitro* заключается в том, что в модели *in vitro* кислород расходуется намного быстрее и, следовательно, в меньшей степени окисляет ФС

Желчеотведение в основной группе больных являлось как способом декомпрессии желчных протоков для стабилизации состояния больного, так и подготовительным этапом к внутрипротоковой фототераностике. Для проведения внутрипротоковой флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии необходимо наличие рентгеноперационной, оснащенной рентгеновской С-дугой. В зависимости от болевой чувствительности больного, тяжести состояния, ФД и ФДТ возможно выполнять под местной инфильтрационной анестезией, но необходимо иметь возможность проведения общего и/или внутривенного наркоза.

На первом этапе для осуществления фототераностики заменяли ранее установленную холангиостому на интродьюсер с клапаном Чек-Фло, дистальный конец которого устанавливали над стриктурой (Рисунок 4.21).

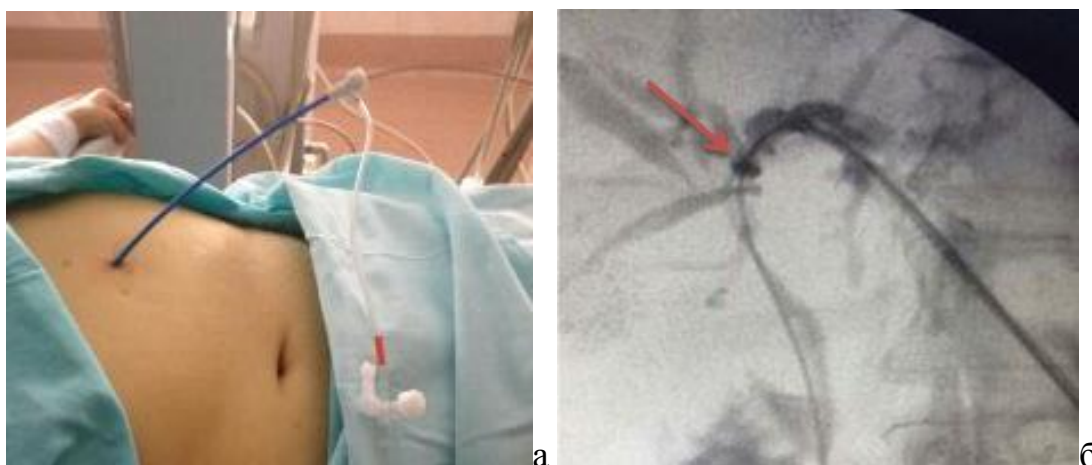


Рисунок 4.21 – а) интродьюсер установленный в просвет желчных протоков; б) холангиограмма, стрелкой указана рентгеноконтрастная метка на дистальном конце интродьюсера

#### **4.3.1 Оценка безопасности применения фотосенсибилизаторов при проведении фототераностики холангиоцеллюлярного рака**

Для проведения фототераностики применяли внутривенные фотосенсибилизаторы, производные хлорина Е6: радахлорин (7 больных) Фотолон (23 пациента) и Фоторан (20 больных) в дозе 1.0 мг/кг внутривенно за 2 часа до операции. Препарат разводили в 150 мл 0.9% раствора натрия хлорида, инфузию совершали в течение 20–30 минут. После введения препарата все

пациенты соблюдали световой режим: ношение солнцезащитных очков, свободные от одежды участки тела покрывали солнцезащитным кремом. Режим соблюдения светового режима составлял 3 дня.

ФС, производные хлорина еб, выбраны нами поскольку предоставляется возможность проводить внутрипротоковую ФД и ФДТ после однократного введения препарата. Характеристики препаратов представлены в Главе 2.

В рамках работы проведена оценка безопасности применения ФС у больных ХЦР. Полученные данные приведены в Таблице 4.5.

Таблица 4.5 – Частота проявлений непереносимости фотосенсибилизаторов (n=50)

Фотосенсибилизатор	Критерии			
	Побочные явления	Дискомфорт или боль	Местные реакции	Общие реакции
Радахлорин (n=7)	Нет	Нет	Нет	Нет
Фотолон (n=23)	Нет	Нет	Нет	Аллергическая реакция 1 (2%)
Фоторан (n=20)	Нет	Нет	Нет	Аллергическая реакция 2 (4%)

Полученные данные свидетельствуют о хорошей переносимости всех ФС, при этом аллергические реакции отмечены всего у трех пациентов, что, скорее всего, связано с индивидуальной непереносимостью препаратов. Проявление аллергической реакции в виде крапивницы купировали в первые же сутки

введением антигистаминных препаратов. При этом аллергическая реакция не мешала проведению запланированных лечебно-диагностических манипуляций и самочувствие больных не усугубляла.

Результаты проведенного исследования продемонстрировали безопасность использованных ФС для фототераностики ХЦР, а также преимущество подхода, который заключается в возможности перевода диагностического этапа в лечебное воздействие в рамках одного хирургического вмешательства.

### **4.3.2. Внутрипротоковая флуоресцентная диагностика**

В работе применено два подхода флуоресцентной диагностики. При помощи лазерной спектроскопии оценивали концентрацию ФС в исследуемом участке желчного протока. Видеофлуоресцентная диагностика использовалась для оценки распределения ФС по опухоли и окружающим ее тканям.

В нашей стране методы лазерной спектроскопии применяются для исследования концентрации фотосенсибилизатора при злокачественном поражении различных органов, в том числе и желчных протоков. В свою очередь видеофлуоресцентный модуль для эндоскопии и минимально инвазивной хирургии, позволяющий одновременно определять очаги накопления ФС, получать видеофлуоресцентное изображение и оценивать его фотобличинг после ФДТ, был впервые применен в Российской Федерации в нашей клинике.

#### **4.3.2.1 Внутрипротоковая лазерная спектроскопия холангиоцеллюлярного рака**

Одним из перспективных методов, повышающий эффективность диагностики опухолевого поражения, является метод лазерной спектроскопии.

Группу больных составили 14 пациентов с нерезектабельным ХЦР, осложненным механической желтухой. Данным пациентам была проведена

внутрипротоковая лазерная спектроскопия под рентгеноскопическим контролем (Рисунок 4.22).

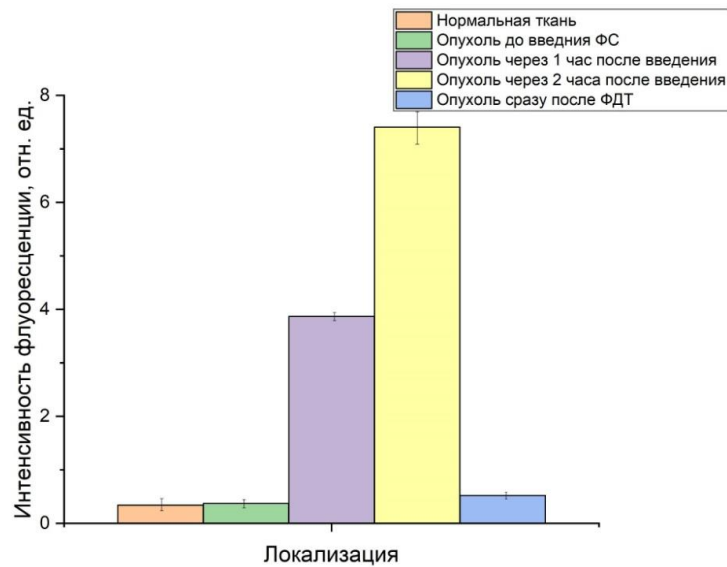


Рисунок 4.22 – Интенсивности флуоресценции нормальной ткани и области ХЦР в разные промежутки времени

Пациентам вводился Себ в концентрации 1 мг/кг внутривенно капельно. Каждый час проводилось измерение интенсивности флуоресценции до момента достижения максимума накопления ФС (2 часа).

Данное исследование проводилось в условиях рентгеноперационной после ранее выполненного желчеотведения. Операция проводилась под местной анестезией после установки в просвет желчного протока интродьюсера с клапаном чек-фло 9 F (Рисунок 4.23). Время рентгеноскопии в момент проведения диагностики составляло в среднем 5 секунд. За это время дистальный конец оптического волокна фиксировали в области неизменной части желчных протоков и фиксировали индекс флуоресценции, а затем в области опухолевой стриктуры. Перед регистрацией интенсивности флуоресценции через второй канал интродьюсера проводили промывание просвета желчных протоков 0.9% физиологическим раствором для удаления желчи, которая экранирует лазерное излучение.

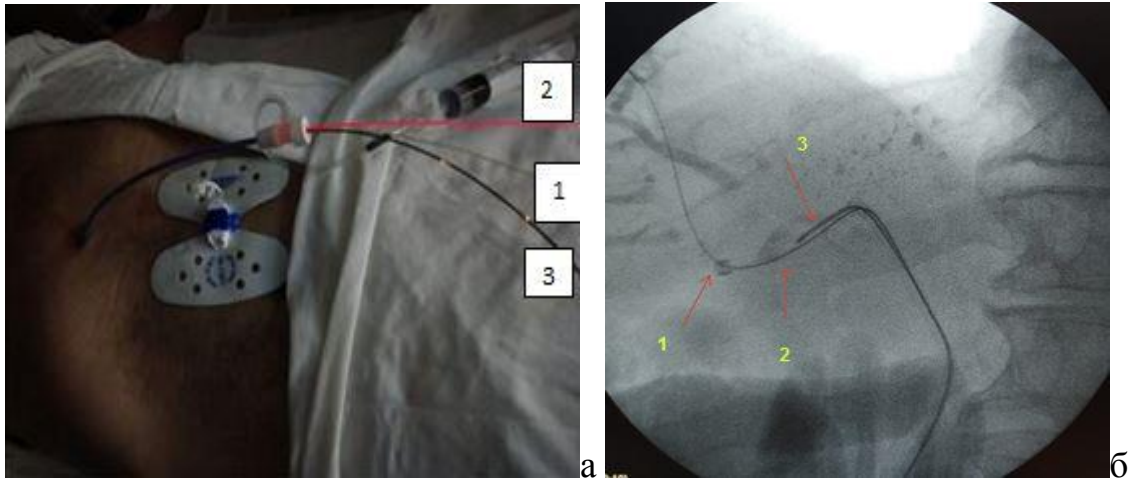


Рисунок 4.23 – Холангиограмма: расположение интродьюсера в просвете желчных протоков, через который проведены инструменты: 1) гидрофильный проводник; 2) оптическое волокно; 3) гибкий эндоскоп диаметром 1.2 мм

Пример исследования отдельных участков опухолевой стриктуры в сравнении с неизменной частью желчных протоков методами локальной лазерной спектроскопии до и после ФДТ для оценки фотобликинга представлены на Рисунке 4.24.

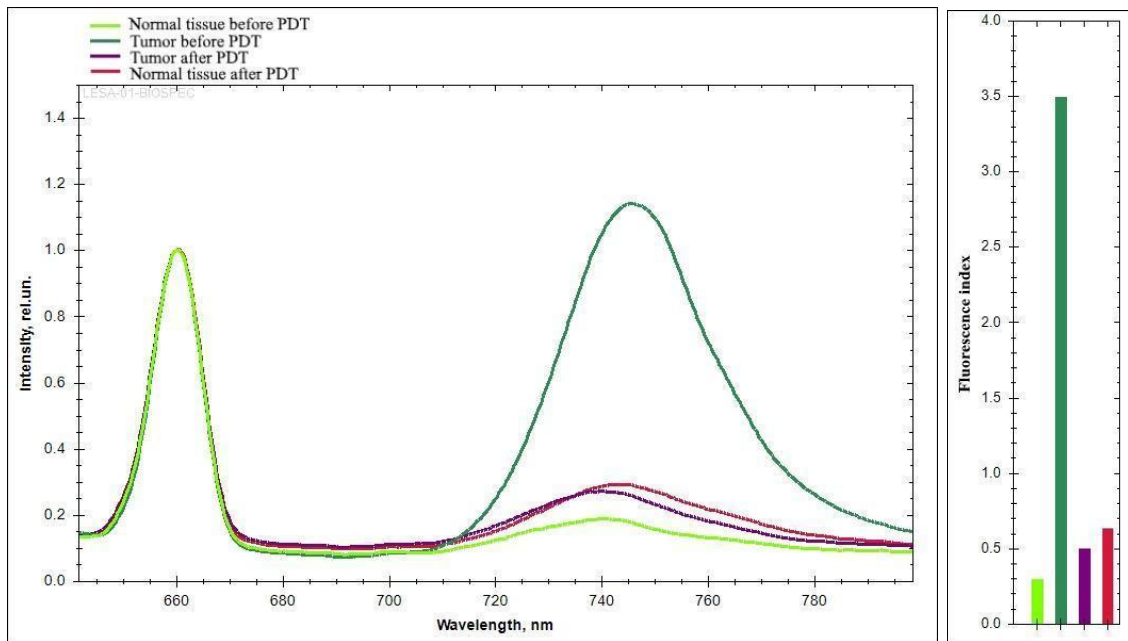


Рисунок 4.24 – Гистограмма. Пример исследования участков опухолевой стриктуры в сравнении с неизменной частью желчных протоков лазерного спектрального анализа

Данные исследования всех 14 пациентов были проанализированы с помощью статистических методов. Получены значения медианы, нижнего и

верхнего квартилей для исходных групп данных (Таблица 4.6). Параметры сняты через 1 и 2 часа после введения ФС до и после ФДТ для оценки концентрации ФС и фотобличинга.

Таблица 4.6 – Значения медианы, нижнего и верхнего квартилей индексов флуоресценции различных локализаций

<b>Признаки</b>	<b>25% квартиль</b>	<b>Медиана (50%)</b>	<b>75% квартиль</b>
Нормальная ткань	0,12	0,12	0,19
Опухоль до введения ФС	0,19	0,20	0,29
Опухоль через 1 час после введения ФС	4,55	4,86	5,68
Опухоль через 2 часа после введения ФС	7,72	7,82	8,57
Опухоль после ФДТ	0,74	0,93	1,89

На Рисунке 4.25 представлены индексы эндогенной флуоресценции нормальной и патологической ткани по 14 пациентам.



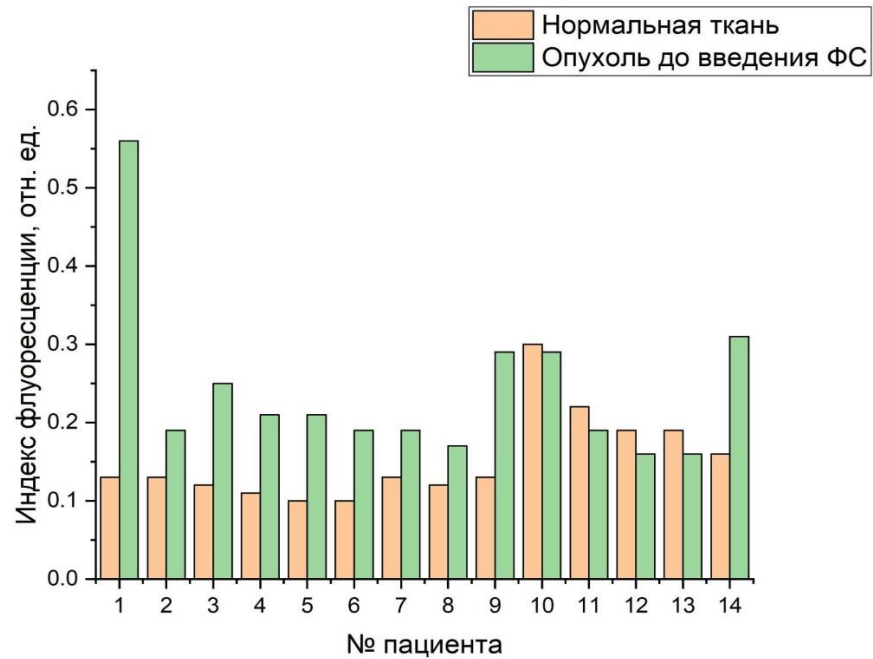


Рисунок 4.25 – Индексы эндогенной флуоресценции в нормальной и опухолевой тканях до введения ФС

Полученный результат сравнения индексов эндогенной флуоресценции в двух видах ткани свидетельствует о достоверно более высоком уровне аутофлуоресценции ткани опухоли: 0,2 [0,19;0,29] против 0,12 [0,12;0,19] ( $p=0,008$ ).

На Рисунке 4.26 приведена диаграмма распределения индексов флуоресценции по пациентам в опухолевой ткани до и через 1 час после введения ФС.

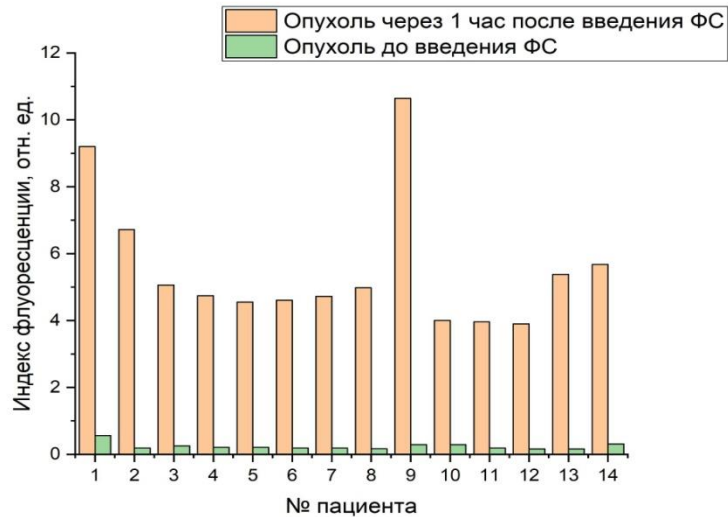


Рисунок 4.26 – Индексы флуоресценции, зарегистрированные в опухолевой ткани до и через 1 час после введения ФС

Полученный результат сравнения аутофлуоресценции ткани опухоли с интенсивностью флуоресценции спустя 1 час после введения ФС свидетельствует о достоверном повышении уровня флуоресценции ткани опухоли со значения 0,2 [0,19; 0,29] до 4,86 [4,55; 5,68] ( $p=0,001$ ).

Сравнение интенсивности флуоресценции опухоли до и спустя 2 часа после введения ФС отражены в диаграмме распределения индексов флуоресценции (Рисунок 4.27).

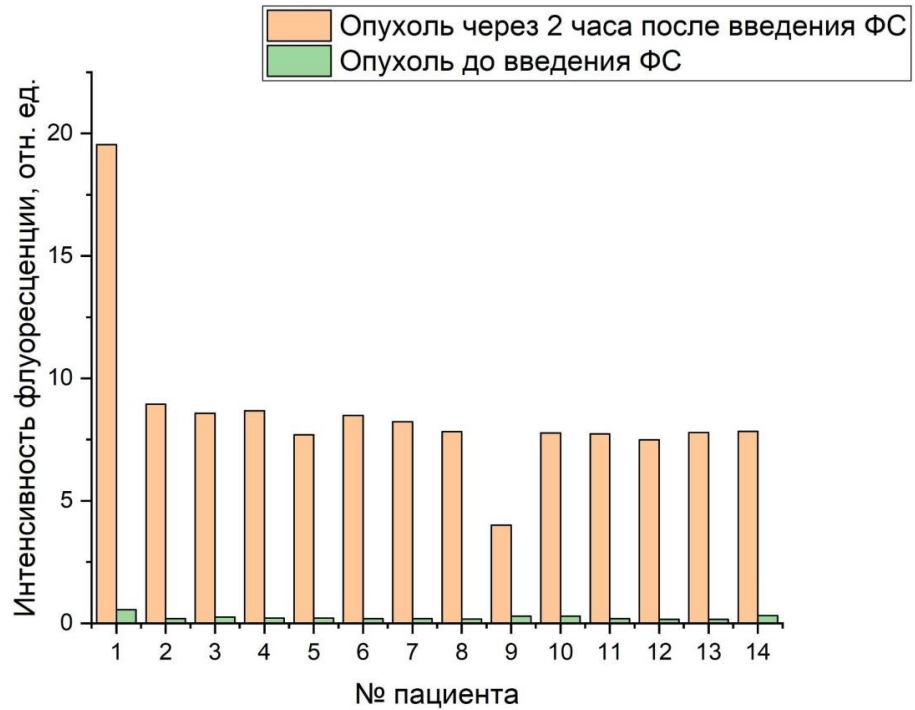


Рисунок 4.27 – Флуоресценция в опухоли через 2 часа после введения ФС и опухоли до введения ФС

Полученный результат сравнения исходного (фонового) уровня флуоресценции ткани опухоли с уровнем флуоресценции спустя 2 часа после введения ФС свидетельствует о достоверном увеличении уровня флуоресценции ткани опухоли со значения 0,2 [0,19; 0,29] до 7,83 [7,72; 8,57] ( $p=0,001$ ).

Полученные результаты сравнения индексов флуоресценции опухолевой ткани через один и два часа после внутривенного введения ФС свидетельствует об увеличении накопления ФС со временем, с изменением значения с 4,86 [4,55; 5,68] до 7,83 [7,72; 8,57] ( $p=0,013$ ), что говорит о необходимости экспозиции в течение 120 минут после введения фотосенсибилизатора пациентам с ХЦР.

#### 4.3.2.2. Внутривидеопроцедурная видеофлуоресцентная диагностика

Видеофлуоресцентную диагностику осуществляли при помощи видеофлуоресцентного модуля для эндоскопии и минимально инвазивной хирургии. Флуоресцентный сигнал в опухолевой стриктуре желчного протока и

значения индекса флуоресценции получали с интерактивной мишени на мониторе, коррелирующей с относительной концентрацией хлорина еб в тканях. Измерение индекса флуоресценции проводились в относительных единицах (отн.ед.), где величина  $\leq 10$  принималась за нормальную ткань. Соответственно, индекс флуоресценции выше значения 10 отн. ед. уже свидетельствует о повышенном накоплении ФС в исследуемой области.

Для доступа в желчные протоки с целью проведения внутрипротоковой видеофлуоресцентной диагностики использовали интродьюсер с клапаном Чек-Фло 8–9 F. Интродьюсер фиксировали дистальным кончиком в исследуемой области и проводили фистулографию, при которой оценивали протяженность и локализацию поражения.

Через интродьюсер проводили гидрофильный проводник 0.035 inch и манипуляционный катетер 5 Fr, которые старались провести через стриктуру в неизмененную часть желчных протоков. Данную манипуляцию удалось выполнить в основной группе у 38 (76%) пациентов. У 12 пациентов провести инструменты через стриктуру не удалось из-за высокой плотности последней.

После удаления манипуляционного катетера и проводника через интродьюсер в желчные протоки проводили эндоскоп с подключенным видеофлуоресцентным модулем. Эндопротоковую видеофлуоресцентную диагностику у пациентов после наружно-внутреннего желчеотведения начинали проводить с неизмененной части желчных протоков, где выполняли калибровку отображаемого индекса флуоресценции.

Далее продвигались в проксимальном направлении, до выявления участков с интенсивностью флуоресценции тканей, превышающей интенсивность здоровых участков желчных протоков. Проводили как визуальный обзор, так и осмотр во флуоресцентном режиме (Рисунок 4.28 а, б).

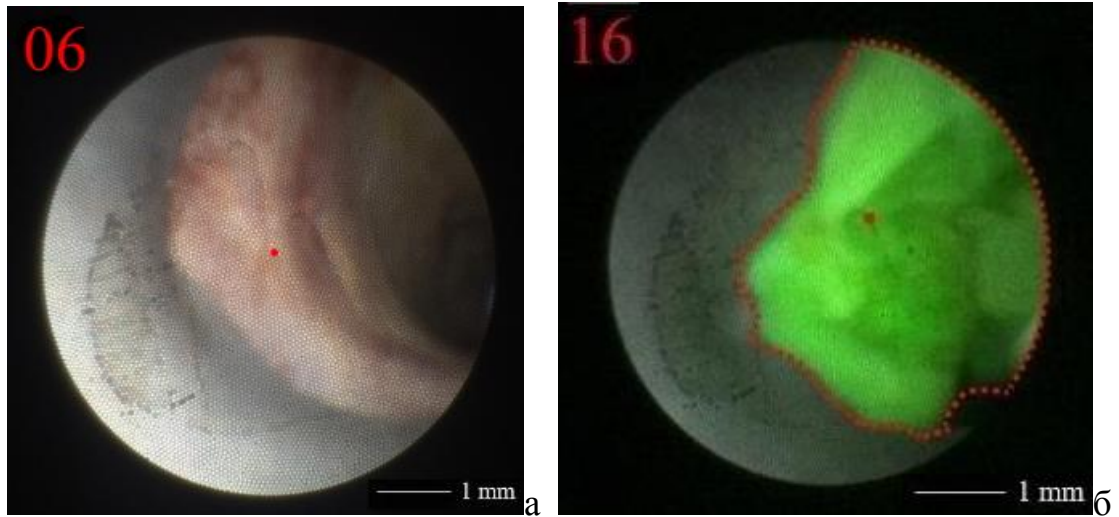


Рисунок 4.28 – (а) видеофлуоресцентное изображение опухоли до введения фотосенсибилизатора; (б) видеофлуоресцентное изображение опухоли через 2 часа после введения ФС (граница указана пунктиром)

С применением видеофлуоресцентного модуля для эндоскопии и минимально инвазивной хирургии в основной исследуемой группе (50 пациентов) в 94% случаев (47 пациентов) получены флуоресцентные изображения опухоли и зарегистрированы индексы флуоресценции, свидетельствующие о более интенсивном накоплении ФС в области стриктуры, чем в нормальных тканях желчных протоков. У трех больных (6%) не были получены высококонтрастные флуоресцентные изображения, однако были зарегистрированы повышенные индексы флуоресценции, превышающие в три раза значения для нормы. Также следует отметить, что при морфологическом исследовании материала, взятого при щипцовой и браш-биопсии у этих больных, был подтвержден диагноз ХЦР. У всех пациентов основной группы индекс флуоресценции составил 20 и выше отн. ед. (среднее значение составило  $31 \pm 11$  отн. ед.), при нормировке оборудования на интенсивность флуоресценции нормальных тканей (10 отн. ед.). Отсутствие флуоресцентного изображения опухоли, возможно, было связано с техническими погрешностями.

### 4.3.2.3. Сравнительные результаты внутривидеоскопической лазерно-спектроскопической и видеофлуоресцентной диагностики

У 14 пациентов основной группы параллельно проведены лазерная спектроскопия и флуоресцентная диагностика видеосистемой. Были получены изображения участков желчных протоков до и после ФДТ (Таблица 4.7, Рисунок 4.29).

Таблица 4.7 – Статистический анализ полученных результатов на спектроскопической системе ЛЭСА-01-БИОСПЕК и видеофлуоресцентной системе УФФ-660 / 675-01-БИОСПЕК

Пациент	Интенсивность флуоресценции (ЛЭСА-01-БИОСПЕК до ФДТ) (отн. ед.)	Интенсивность флуоресценции (ЛЭСА-01-БИОСПЕК после ФДТ) (отн. ед.)	Интенсивность флуоресценции (Видео система до ФДТ) (отн. ед.)	Интенсивность флуоресценции (Видео система после ФДТ) (отн. ед.)
1	19,55	6,57	76	11
2	8,94	1,89	38	8
3	8,57	1,99	36	7
4	8,68	1,89	33	7
5	7,69	1,71	26	6
6	8,23	0,92	31	5
7	8,49	0,95	33	5
8	7,82	0,77	28	4
9	4	0,75	19	5

Продолжение Таблицы 4.7

10	7,77	0,77	27	5
11	7,72	0,49	25	3
12	7,49	0,59	28	4
13	7,8	0,63	28	4
14	7,83	1,95	29	7

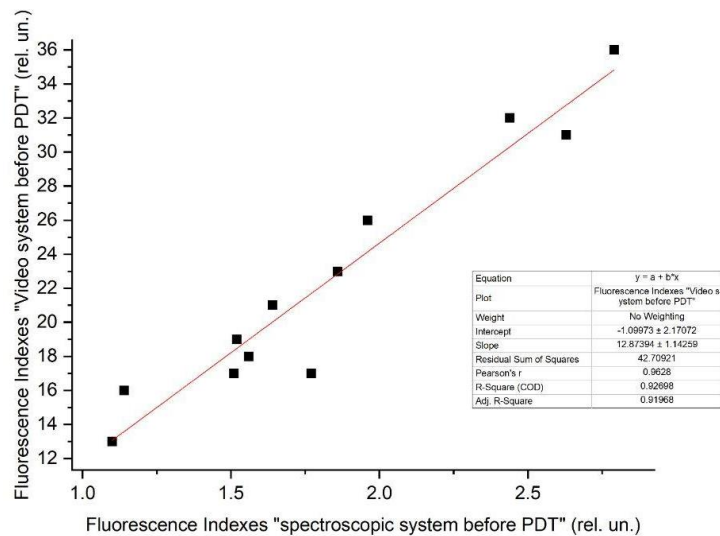


Рисунок 4.29 – Линия регрессии для двух типов полученных данных: индексы флуоресценции, полученные до ФДТ видеосистемой и спектроскопической системой

Для группы сравнения «До ФДТ на видеофлуоресцентной системе UFF-630 / 675-01-BIOSPEC – до ФДТ на ЛЭСА-01-БИОСПЕК» коэффициент Пирсона (Pearson's r) составляет ~ 0,96.

Проводился расчет парного t-критерия Стьюдента до и после ФДТ для каждого из методов диагностики (таблицы 4.8, 4.9).

Таблица 4.8 – Расчет парного t-критерия Стьюдента для «До ФДТ на ЛЭСА-01-БИОСПЕК» и «После ФДТ на ЛЭСА-01-БИОСПЕК»

<b>Пациент</b>	<b>Выборка 1 «До ФДТ на ЛЭСА-01- БИОСПЕК» (В.1) (отн. ед.)</b>	<b>Выборка 2 «После ФДТ на ЛЭСА-01- БИОСПЕК» (В.2) (отн. ед.)</b>
1	19.55	6.57
2	8.94	1.89
3	8.57	1.99
4	8.68	1.89
5	7.69	1.71
6	8.23	0.92
7	8.49	0.95
8	7.82	0.77
9	4	0.75
10	7.77	0.77
11	7.72	0.49
12	7.49	0.59
13	7.8	0.63
14	7.83	1.95
<b>Суммы:</b>	120.58	21.87



Полученное эмпирическое значение  $t = 13.3$  больше критического ( $t_{0.01} = 3.01$ ,  $t_{0.05} = 2.16$ ), поэтому делаем вывод о наличии статистически значимых различий между интенсивностью флуоресценции на «До ФДТ на ЛЭСА-01-БИОСПЕК» и «После ФДТ на ЛЭСА-01-БИОСПЕК».

Таблица 4.9 – Расчет парного t-критерия Стьюдента для «До ФДТ на видеофлуоресцентной системе UFF-630 / 675-01-BIOSPEC» и «После ФДТ на видеофлуоресцентной системе UFF-630 / 675-01-BIOSPEC»

<b>Пациент</b>	<b>Выборка 1</b> <b>«До ФДТ на видеофлуоресцентной системе UFF-630 / 675-01-BIOSPEC» (B.1)</b>	<b>Выборка 2</b> <b>«После ФДТ на видеофлуоресцентной системе UFF-630 / 675-01-BIOSPEC» (B.2)</b>
1	76	11
2	38	8
3	36	7
4	33	7
5	26	6
6	31	5
7	33	5
8	28	4
9	19	5
10	27	5
11	25	3

Продолжение Таблицы 4.9

12	28	4
13	28	4
14	29	7
Суммы:	457	81

Полученное эмпирическое значение  $t = 8,6$  больше критического ( $t_{0,01} = 3.01$ ,  $t_{0,05} = 2.16$ ), поэтому делаем вывод о наличии статистически значимых различий между интенсивностью флуоресценции «До ФДТ на видеофлуоресцентной системе» и «После ФДТ на видеофлуоресцентной системе».

Для каждого метода оценки фотобличинга фотосенсибилизатора рассчитывали доверительный интервал. Среднее значение фотобличинга для спектроскопической системы составило 76% (с вероятностью 95% фотообесцвечивание, наблюдаемое этим методом, варьировалось от 72 до 80%), а среднее значение для видеофлуоресцентной системы – 74% (с вероятностью 95% фотообесцвечивание, наблюдаемое этим методом, колебалось от 68% до 78%).

Была отмечена прямая корреляция между спектроскопическим и видеофлуоресцентным методами диагностики ( $p < 0.05$ ).

Для сопоставления данных внутрипротоковой флуоресцентной диагностики и морфологического исследования образцов тканей получены данные о соответствии исследуемых спектроскопических характеристик типу ткани в области стеноза желчных протоков.

Забор материала осуществлен посредством внутрипротоковой щипцовой или браш-биопсии (Рисунок 4.30 а, б).

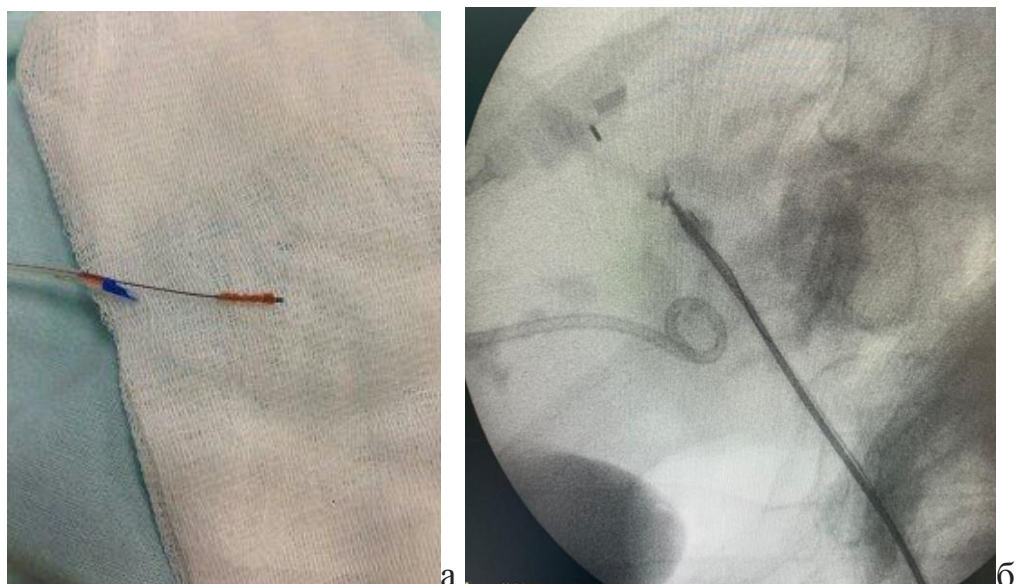


Рисунок 4.30 – а) Внутрипротоковая браш-биопсия; б) щипцовая биопсия

У всех 14 больных, которым проведена лазерная спектроскопия и видефлуоресцентный мониторинг, диагноз ХЦР подтвержден морфологически (Рисунок 4.31). Таким образом, методики внутрипросветной флуоресцентной диагностики эффективны для подтверждения злокачественного поражения желчных протоков.

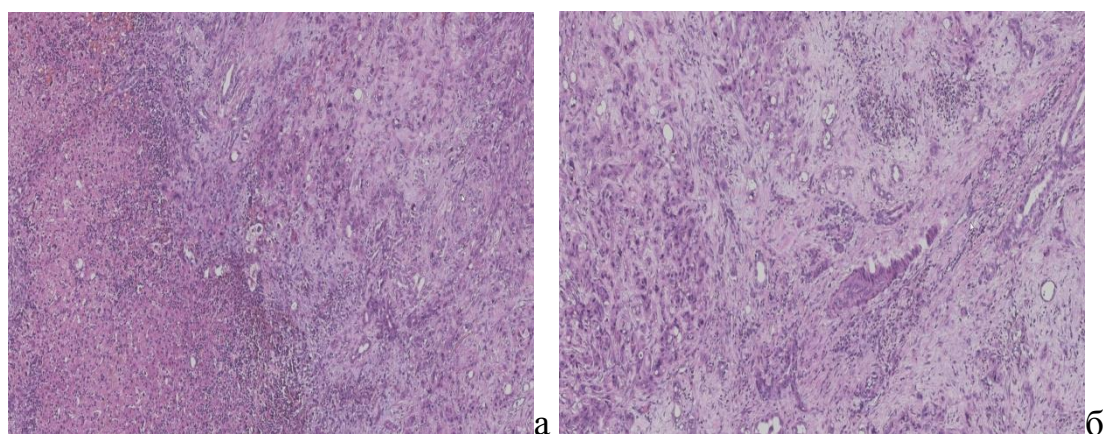
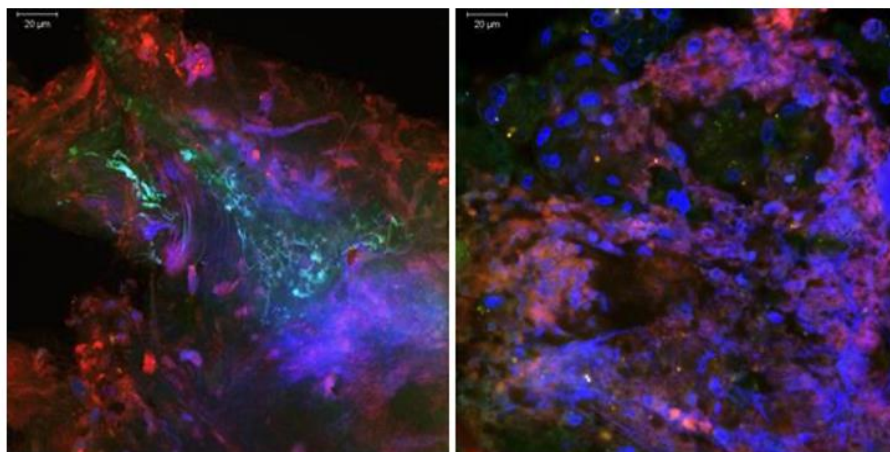


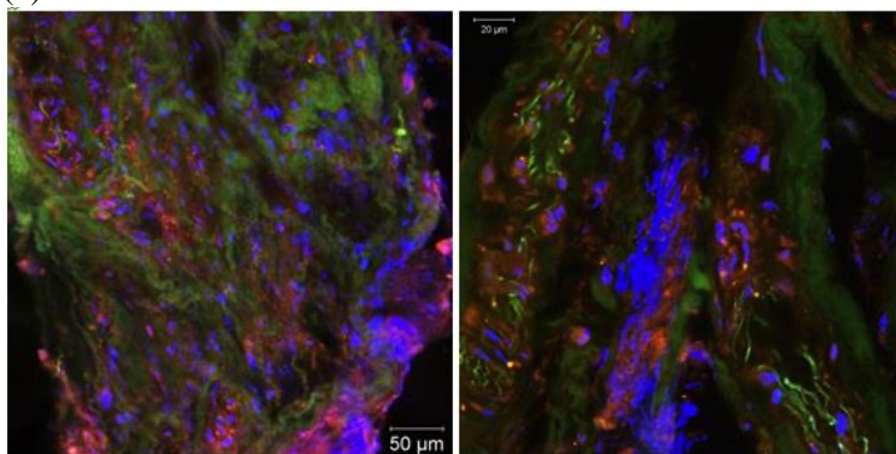
Рисунок 4.31 – Микрофотографии: а и б – з холангиокарцинома окраска гематоксилин-эозином, увеличение на 20

Кроме этого, у всех пациентов исследовалось распределение фотосенсибилизатора хлорина еб непосредственно в опухолевой стриктуре до и после ФДТ.

Получены флуоресцентные изображения биоптатов опухоли желчного протока до и после процедуры ФДТ (Рисунок 4.32). До и после процедуры ФДТ наиболее интенсивный сигнал флуоресценции хлорина еб наблюдается преимущественно в цитоплазме раковых клеток.



(a)



(б)

Рисунок 4.32 – Микрофотографии: Флуоресцентные изображения биоптатов рака желчного протока: а – до, б – после процедуры ФДТ. Зеленый – аутофлуоресценция, красный – флуоресценция хлорина еб, синий – ДНК

Количественный анализ интенсивностей сигнала флуоресценции хлорина еб выявил, что большую в полтора раза флуоресценции фотосенсибилизатора до ФДТ, чем после ФДТ (Рисунок 4.33).

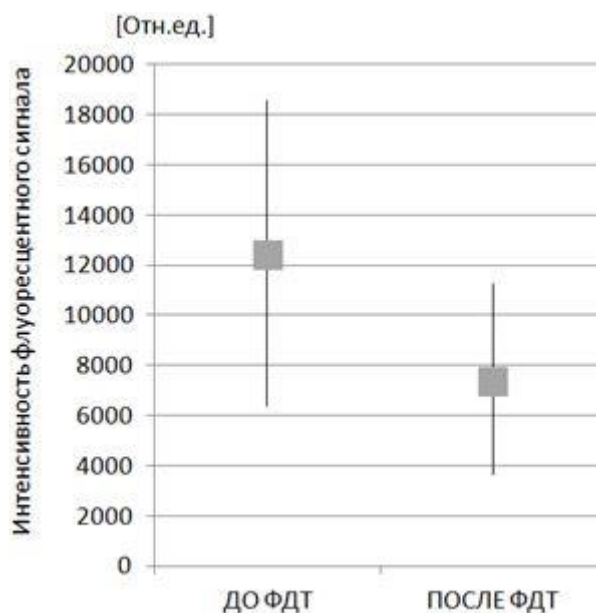


Рисунок 4.33 – Интенсивность флуоресцентного сигнала хлорина еб на изображениях рака желчных протоков: а – до процедуры ФДТ, б – после процедуры ФДТ

В нашем исследовании всем больным (n=100) предпринималась попытка взятия биопсии из области опухолевой стриктуры желчных протоков. Чрескожная диагностическая пункция опухолевой стриктуры желчных протоков не выполнялась из-за отсутствия безопасного ЭХО-доступа. В группе сравнения при помощи биопсийных щипцов или браш-биопсии через холангиостому удалось получить материал у 37 (74%) пациентов, был подтвержден ХЦР. Морфологическое подтверждение у основной группы больных ХЦР получено у 42 (84%) больных. У 8 пациентов (16%) технически взять биопсионный материал не удалось из-за сложной локализации в области конfluence и невозможности технически совершить забор материала инструментами.

С учетом полученных данных корреляции методов флуоресцентной диагностики возможности исследования при помощи видеофлуоресцентной системы являлись более предпочтительными. Эти преимущества заключались в том, что нами получено видеофлуоресцентное изображение опухолевого поражения, а также индекс флуоресценции, демонстрирующий повышенную концентрацию ФС в исследуемых участках. При этом видеофлуоресцентная система позволяет контролировать положение оптического диффузора в области

стриктуры, осуществляя контроль за дальнейшей ФДТ. Это позволяет оптимизировать лечебную тактику и сокращать время операции. В связи с этим, всем оставшимся пациентам основной группы для внутрипротоковой ФД проводили видеофлуоресцентную диагностику.

#### **4.4. Эндопротоковая фотодинамическая терапия**

##### **4.4.1 Эндопротоковая фотодинамическая терапия для реканализации опухолевого стеноза**

После проведенной внутрипротоковой флуоресцентной диагностики и подтверждения накопления фотосенсибилизатора опухолевой тканью всем пациентам основной группы выполнили фотодинамическую терапию.

Полученные в результате экспериментальных исследований глубины зондирования лазерного излучения, имеющейся эндогенной флуоресценции, а также параметров распределения фотосенсибилизаторов в ткани печени и желчных протоков, позволили уточнить оптимальные режимы и параметры ФДТ, необходимые для достижения регрессии опухолевого стеноза.

При наружно-внутренней холангиостомии имеется возможность провести ФДТ на всем протяжении опухолевой стриктуры. В этом случае применялись оптические диффузоры с цилиндрическим облучателем на дистальном конце длиной 20 мм.

При различных локализациях опухолевого процесса часто границы опухоли, видимые в белом свете, меньше, чем при флуоресцентной диагностике. Также важной является перифокальная ткань, которая может иметь признаки дисплазии или микроокружение (опухоль-ассоциированные макрофага, фибробласты), способствующее прогрессии заболевания. В связи с этим в область проведения ФДТ включали перифокальную неизмененную часть желчных протоков дистальнее и проксимальнее опухоли на 1 см (с плотностью энергии в два раза меньше, чем основной) (Рисунок 4.34). При отсутствии возможности облучения



диффузором всей зоны интереса сразу (протяженность стриктуры более 2 см) мы использовали полипозиционное облучение, при этом световод последовательно перемещается по всей поверхности стриктуры так, чтобы последующая зона облучения перекрывала предыдущую.

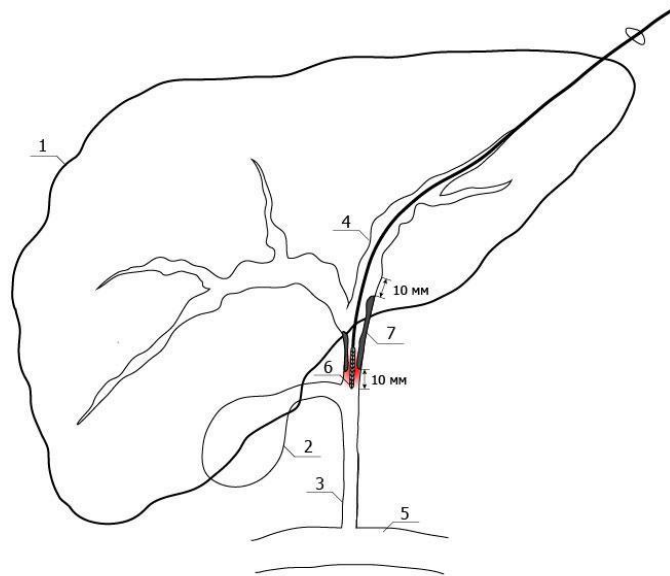


Рисунок 4.34 – Схема проведения внутрипротоковой ФДТ с оптическим диффузором с цилиндрическим облучателем на дистальном конце. 1. Печень; 2. Желчный пузырь; 3. Общий желчный проток; 4. Левый доленой проток, через который установлен, проводилась холангиостомия; 5. Двенадцатиперстная кишка; 6. Оптический диффузор; 7. Холангиокарцинома

Целесообразно устанавливать оптический диффузор непосредственно в просвете желчного протока, не проводя облучение через стенки дренажа, поскольку в этом случае происходит потеря мощности и уменьшается глубина фотодинамического воздействия в ткани; по данным экспериментального исследования разница составляет  $23 \pm 1$  мм.

Достигнуть необходимой плотности мощности в этом случае возможно, только увеличив экспозицию терапии, что значительно удлиняет время операции. Положительным является лишь только тот момент, что расположение оптического диффузора внутри дренажа защищает его от возможного излома и/или пригорания кончика при соприкосновении с биологическими жидкостями и тканями.

С целью нивелирования этого эффекта мы использовали баллонные катетеры и оптические диффузоры с титановым покрытием, которые располагали в проекции опухолевого стеноза, без использования дренажа как защитного покрытия. Мощность лазерной системы (активной для применяемой группы фотосенсибилизаторов) излучения ЛФТ-01-БИОСПЕК с длиной волны 660 нм равнялась 1,5 Вт, что позволило достигнуть плотность мощности излучения около 100–200 Дж/см<sup>2</sup> (среднем 150 Дж/см<sup>2</sup>) за 6–7 минут.

Использование баллона для ФДТ применено 11 пациентам. Всем пациентам удалось провести ФДТ, однако у 4 пациентов (36%) при плотной структуре возникло нарушение целостности раздуваемой части баллона, что потребовало замены инструмента. Из них же у одного больного возникла гемобилия, что потребовало проведения гемостатических мероприятий. Все это удлинило время операции и наркоза.

Для того чтобы упростить задачу без снижения эффективности, мы начали применять разработанные оптические диффузоры с рассеивающей средой на основе диоксида титана (TiO<sub>2</sub>) (Рисунок 4.35). Это гибкие и прочные на излом волокна не пригорают при контакте с тканями при мощности источника лазерного излучения 1.5 Вт. Оптические диффузоры того типа возможны для многократного использования после стерилизации.

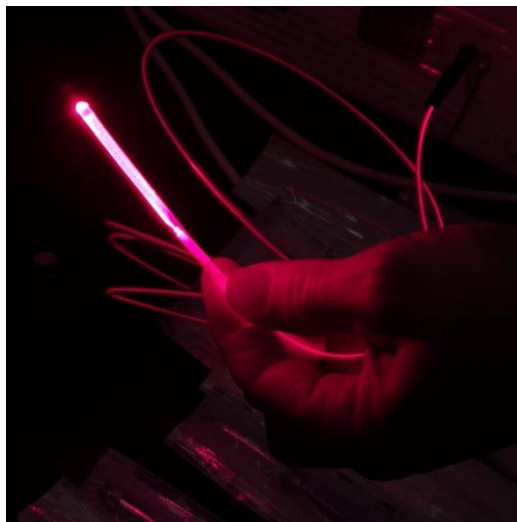


Рисунок 4.35 – Оптический диффузор с цилиндрическим рассеивателем света на дистальном конце



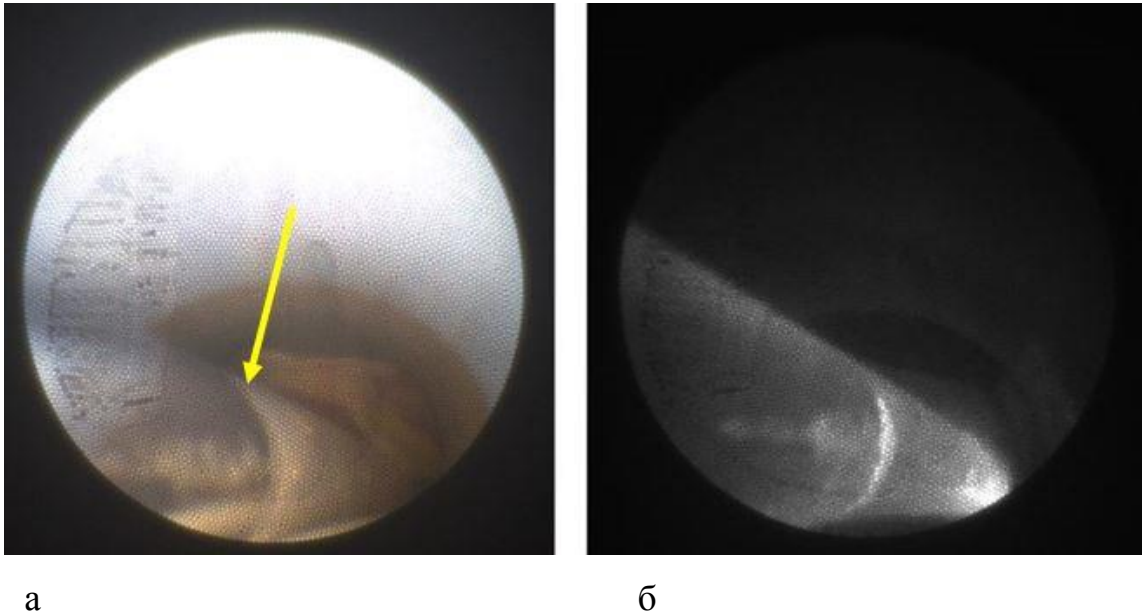


Рисунок 4.36 – Установка оптического диффузора в просвете желчного протока под контролем эндоскопии: а) стрелкой указана граница рассеивающего лазерный свет дистального конца диффузора; б) внутрипротоковая ФДТ под контролем видеофлуоресцентного исследования в черно-белом цвете

Перед началом процедуры обязательным моментом было определение плотности мощности излучения для каждого конкретного используемого диффузора для оценки возможных потерь мощности лазерного излучения. Это позволяло рассчитать необходимую дозу энергии для проведения терапии.

Через интродьюсер в просвет желчных протоков проводили эндоскоп диаметром 1.2 мм, выполняли холангиоскопию, под контролем которой в область опухолевого поражения устанавливали оптический диффузор (Рисунок 4.36).

После этого проводили облучение лазерным светом длиной волны 660 нм, с мощностью источника лазерного излучения 1.5 Вт. Следует отметить, что разработанная нами модель и оборудование, с использованием для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии только лазера с длиной волны 660 нм значительно уменьшает затраты и время для выполнения манипуляции. Преимущество заключалось в том, что для флуоресцентной диагностики применяется низкоинтенсивный полупроводниковый лазер с длиной волны 635 нм, а для ФДТ используется терапевтический полупроводниковый лазер с длиной волны 660 нм. Соответственно, существовала необходимость, во-

первых, иметь оба лазера с разной длиной волны и, во-вторых, во время операции каждый раз для этапа диагностики или лечения переключать оборудование на необходимую длину волны. Это требовало дополнительного нормирования и временных затрат. С использованием в видеосистеме для диагностики и лечения полупроводникового лазера с длиной волны 660 нм значительно облегчило техническую задачу, сократило время операции без снижения эффективности.

После расчета времени, необходимого для достижения суммарной световой дозы  $150 \text{ Дж/см}^2$ , проводили контрольную внутрипротоковую видеофлуоресцентную диагностику через эндоскоп. Отмечали величину фотобличинга, при достижении параметра более 60%, оптический диффузор перемещали проксимальнее зоне облучения, с захватом предыдущего светового пятна.

Первым этапом фотодинамическая терапия с целью реканализации стриктуры 38 (76%) больным проведена с использованием оптического диффузора с цилиндрическим облучателем на дистальном конце, из них 11 – через баллонный катетер, 27 – диффузором с рассеивающей средой на основе диоксида титана.

У 12 (24%) пациентов, которым изначально удалось установить только наружную холангиостому, на первом этапе необходимо достигнуть реканализации стриктуры, для того чтобы получить адекватное контрастирование желчных протоков, затем, провести наружно-внутреннее желчеотведение, которое позволяет ФДТ на всем протяжении стриктуры. Этим больным ФДТ проводили при помощи оптического диффузора с торцевым облучателем на дистальном конце – в этом случае световое пятно распространяется не по окружности, а на проксимальную часть опухоли, обтурирующей просвет протока.

Время окончания ФДТ зависела от выгорания фотосенсибилизатора – фотобличинга.

У 48 пациентов, которым проводили ФДТ, фотобличинг в 70–90% был достигнут при суммарной световой дозе  $150\text{--}250 \text{ Дж/см}^2$ , среднее время экспозиции составляло 6 минут в одной позиции, при использовании оптического

диффузора с цилиндрическим облучателем на дистальном конце длиной 20 мм. У большинства больных указанные параметры фотобличинга достигнуты при суммарной световой дозе 150 Дж/см<sup>2</sup>.

После проведения ФДТ проводили контрольную внутрипротоковую флуоресцентную диагностику для оценки фотобличинга.

В двух случаях, при суммарной световой дозе 150 Дж/см<sup>2</sup>, фотобличинг составил 40 и 59% соответственно, что потребовало увеличения времени лазерного облучения до достижения фотобличинга более 60%. В этих случаях время ФДТ составило больше на 11 и 13 минут соответственно. Суммарная световая доза составила 200 и 250 Дж/см<sup>2</sup>.

После проведения ФДТ у трех пациентов наблюдали реканализацию стриктуры, что позволило провести интродьюсер дистальнее стеноза и провести ФД и ФДТ на всем протяжении стриктуры. У остальных 47 больных реканализация отмечена через 3–5 дней, но у всех пациентов удалось в конечном итоге выполнить наружно-внутреннее желчеотделение и внутрипротоковую ФДТ с дальнейшим стентированием.

После проведения внутрипротоковой ФДТ у 30% пациентов в первые сутки отмечались явления холангита, сопровождающиеся подъемом температуры тела, ознобом. Обычно это непродолжительное нежелательное явление, купирующееся приемом НПВС, санацией протоков, антибактериальными препаратами. Для коррекции этого состояния сразу же после ФДТ проводили капельное промывание желчных протоков физиологическим раствором с антибактериальными препаратами цефалоспоринового ряда. Скорость промывания: 4 капли в минуту в течение 6–8 часов. Это лечебное мероприятие позволило исключить осложнения в виде длительного холангита – более 1 суток. У большинства пациентов обошлось без проявления холангита.

#### **4.4.2. Стентирование желчных протоков и внутрипротоковая фотодинамическая терапия с целью антибластики**

При механической желтухе опухолевого генеза наиболее оптимальным окончательным вариантом желчеотведения является эндопротезирование протоков. После установки стента, его саморасширяющаяся металлическая структура фиксирует заданный размер, расправляя стриктуру, что дает возможность решить две задачи: первая – окончательно восстановить пассаж желчи, избавляя пациента от дренажей на передней брюшной стенке, вторая – провести равномерное лазерное облучение опухолевой стриктуры, закрепив лечебный эффект.

В основной группе установлено 70 билиарных стентов во время операции чрескожного чреспеченочного эндопротезирования у 50 больных. В 20 наблюдениях (40%) проводилась установка двух стентов через обе доли печени, вследствие поражения конfluence и обоих долевого протоков.

В группе сравнения у 50 больных в 23 (46%) случаях стент установлен с формированием конfluence через обе доли печени. Всего в этой группе установлено 73 билиарных стента.

После желчной декомпрессии, санации желчных протоков и стихания признаков холангита не ранее чем через 2–3 дня переходили ко второму этапу дренирования и выполняли эндопротезирование металлическими стентами.

Стентирование проводили под рентгеноскопическим контролем. Через ранее установленный дренаж проводили J-образный плетеный проводник или жесткий проводник Lunderquist 0.38 Inch. Дренаж удаляли. По проводнику устанавливали маркировочный катетер с делениями по 1 см, при помощи которого определяли протяженность стриктуры и оценивали необходимую длину стента. После чего удаляли маркировочный катетер. При этом ассистент у места контрапертуры плотно фиксировал проводник с целью предотвращения его миграции из желчных протоков, а в случае применения жесткого проводника еще

дальнейшего продвижения проводника и возможной перфорацией двенадцатиперстной кишки.

С учетом ранее выполненного дренирования, перед стентированием отсутствовала необходимость в бужировании канала, поэтому по проводнику сразу же устанавливали доставляющую систему стента в желчный проток через стриктуру (Рисунок 4.37).

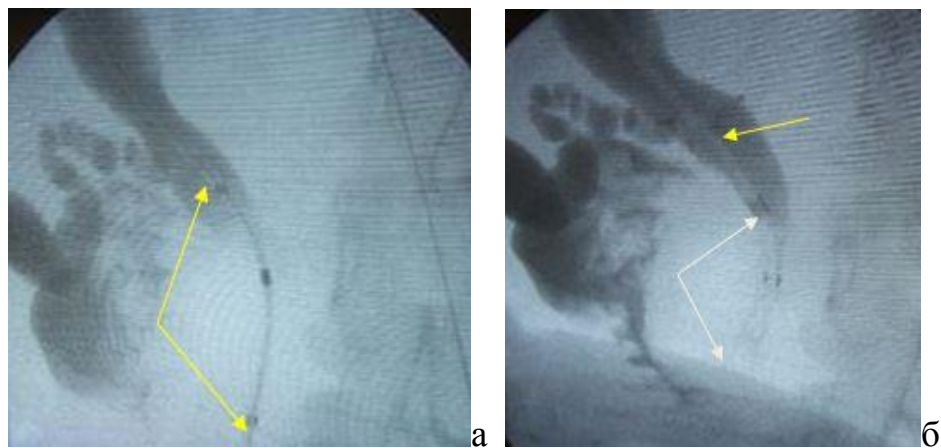


Рисунок 4.37 – Холангиография: а) доставляющая стент система имеет три рентгеноконтрастные метки расположения границ стента (указана стрелками); б) белые стрелки – дистальный и проксимальный край стента, желтая стрелка – интродьюсер с рентгеноконтрастной меткой на дистальном конце, установлен тотчас же над стентом

Раскрытие стента начинали постепенно, подтягивая доставляющую часть проксимально, а толкатель стента – дистально. Под контролем рентгеноскопии освобождали дистальную часть стента, установленную на 1 см ниже дистального края стриктуры. При этом раскрытая часть стента принимала форму по типу «воланчика». В этот момент целесообразным считали остановиться на 10–20 секунд, чтобы часть стента полностью раскрылась и зафиксировалась в неизменной части желчных протоков или просвете двенадцатиперстной кишки. Далее продолжали поступательно раскрывать стент до его полного освобождения и фиксации минимум на 1 см выше и ниже краев стриктуры (Рисунок 4.38).

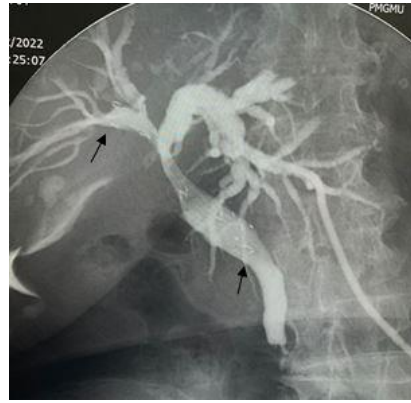


Рисунок 4.38 – Холангиограмма. Стентирование стриктуры правого долевого и общего печеночного протока (стрелками указаны края стента)

Толкатель и проводник удаляли. С учетом саморасширяющейся структуры стента отсутствовала необходимость в дополнительной дилатации стента при помощи баллонного катетера сразу же после установки.

20 пациентам основной группы и 23 в контрольной проведено стентирование двумя стентами с формированием ими конfluence долевых протоков. В этом случае применяли только непокрытые саморасширяющиеся стенты. Стенты устанавливали параллельно друг другу или проводили один из стентов через ячейку и просвет другого. После установки первого стента по проводнику параллельно устанавливали второй стент. Вариант стентирования через правый и левый долевые протоки представлен на Рисунке 4.39.

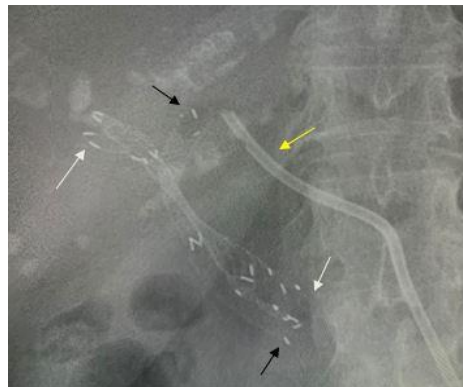


Рисунок 4.39 – Холангиограмма. Билобарное билиарное стентирование. Стелками указано: черные – края стента установленного через левый долевой проток; белые стрелки – края стента установленного через правый долевой проток; желтая – страховочный билиарный дренаж в сегментарном протоке левой доли печени

Другой вариант – проведение второго стента через ячейку и просвет первого – представлен на Рисунке 4.40.

Билиарный стент всегда устанавливали таким образом, чтобы его края выступали на 10 мм и более за проксимальную и дистальную границу стеноза.

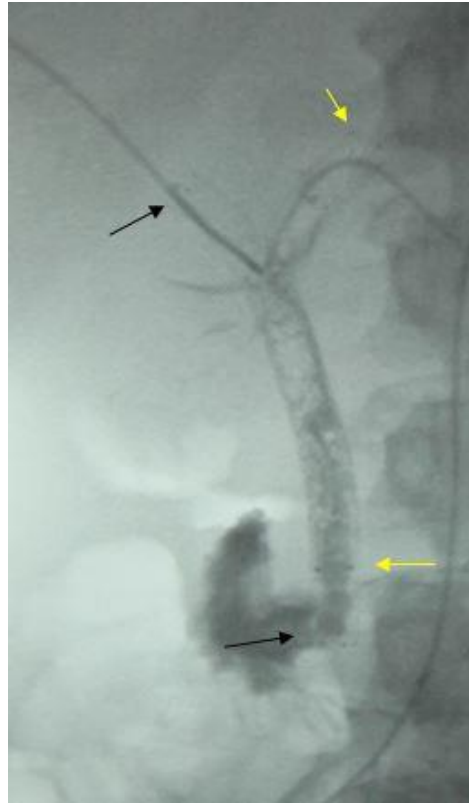


Рисунок 4.40 – Холангиограмма. Стентирование желчных протоков с формированием конfluence долевых протоков по типу «стент в стент». Стрелками указано: черные – края стента, установленного через правый долевой проток; желтые – края стента, установленного через ячейку и просвет первого

После введения эндопротеза оставляли страховочный наружный дренаж. При контрольной фистулографии после установки стента у всех пациентов отмечено адекватное и своевременное поступление контрастного препарата из дренажа через просвет установленного стента в просвет кишки. В течение послеоперационного периода проводили промывание желчных протоков со скоростью 4–5 капель в минуту на протяжении 4–6 часов 0.9% физиологическим

раствором с гепарином 5 тысяч ЕД. с целью профилактики возможной ранней обструкции стентов кровяными сгустками.

В этот период проводили билиолитическую терапию, осуществляли контроль над проходимостью и стабилизацией положения эндопротеза, «тренировку эндопротеза». На следующий день проводили контрольную фистулографию, при которой отмечалось практически полное расправление стентов. При введении контрастного препарата отмечалось своевременное поступление контрастного препарата в сегментарные протоки обеих долей печени, а также через стент в просвет кишки.

Всем пациентам успешно проведено стентирование. В 13 случаях (26%) отмечен холангит в первые сутки после лечения, который купировался приемом антибактериальных средств, проведением инфузионной терапии и санацией желчных протоков.

После эндопротезирования, фиксации положения стента, санации желчных протоков и стихания признаков холангита не ранее чем через 2–3 дня переходили ко второму этапу внутрипротоковой фотодинамической терапии.

Аналогичным образом вводили фотосенсибилизатор за 2 часа до операции. Страховочный дренаж меняли на интродьюсер, устанавливали оптический диффузор и проводили ФДТ на всем протяжении установленного стента.

Проведение флуоресцентной диагностики на втором этапе ФДТ нецелесообразно по той причине, что провести ее мы можем только через ячейки стента, что, как правило, затруднительно, равно как и сам стент дает ложную флуоресценцию.

В то время, как показало наше исследование в эксперименте, сам стент существенно не снижает глубину зондирования и распространения лазерного света. Учитывая, что, расправляясь, он делает поверхность стриктуры более ровной, позволяет выполнить терапию более равномерно. ФДТ после установки стента целесообразно проводить с целью антибластики.

После окончания ФДТ оставляли страховочный дренаж для санации желчных протоков. Продолжали холелитическую терапию. При адекватном



функционировании эндопротеза и положительной динамике состояния больного наружный дренаж удаляли.

У пяти пациентов в первые дни после удаления страховочного дренажа отмечалось подтекание желчи через контрапертуру, что было связано с длительным дренированием. На фоне продолжения приема Урсофалька и стимуляции кишечной деятельности подтекание желчи прогрессивно уменьшалось и прекращалось через 2–3 суток.

#### **4.4.3 Обоснование применения фотобличинга для персонализированного контроля проведения фототераностики**

У каждого больного наблюдалась определенная концентрация фотосенсибилизатора в опухоли, определяемая по индексу флуоресценции. Соответственно, с учетом полученных различных значений индекса, гетерогенности опухолей проводился индивидуальный (персонализированный) подбор суммарной световой дозы при ФДТ.

При равной мощности исходящего лазерного излучения, длины оптического диффузора у всех пациентов, в зависимости от времени воздействия ткани суммарная световая доза различная. Соответственно, известно, что фотохимическая реакция, лежащая в основе фототераностики, происходит до тех пор, пока фотосенсибилизатор способен активироваться под действием лазерного света. Затем происходит его выгорание (фотобличинг). Максимальный фотобличинг 100%. Лечебный патоморфоз происходит при получении значений 60–100%. Таким образом, всем пациентам основной группы проводили фотодинамическую терапию до появления фотобличинга более 60% (что является свидетельством «выгорания» фотосенсибилизатора и синглетного кислорода).

При проведении ФДТ рассчитывали время и параметры ФДТ, необходимые для получения суммарной световой дозы 150–250 Дж/см<sup>2</sup>. При достижении указанной дозы облучения проводится внутрипротоковая флуоресцентная диагностика. При выявлении фотобличинга более 60% дополнительного

облучения не проводили. В случае недостаточного фотобличинга, менее 60%, увеличивали суммарную световую дозу до 250 Дж/см<sup>2</sup>, с повторной флуоресцентной диагностикой.

В основной группе только у 2 пациентов потребовалось дополнительное облучение: для одного пациента потребовалось 200 Дж/см<sup>2</sup> для получения фотобличинга, для второго больного суммарная световая доза составила 250 Дж/см<sup>2</sup>.

У всех больных при контрольной видеофлуоресцентной диагностике достигнут фотобличинг  $84\% \pm 11$  [ДИ 70–96] в тканях опухоли, что позволило завершить процедуру ФДТ.

У 14 больных, которым проведено исследование и сравнительный анализ применения лазерной спектроскопии и видефлуоресцентного мониторинга на диагностическом этапе, морфологически верифицирован диагноз ХЦР.

Из них у 6 (43%) после первого курса ФДТ и реканализации стриктуры на 4–5 сутки провели контрольную внутрипротоковую биопсию. При гистологическом исследовании у всех пациентов получен лечебный патоморфоз опухоли  $3 \pm 1$  степени (по Е.Ф. Лушникову) (Рисунок 4.41 а, б).

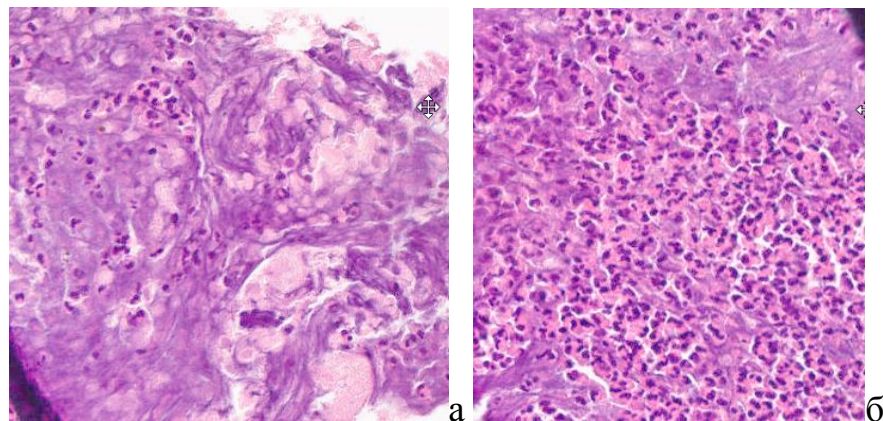


Рисунок 4.41 – Микрофотографии. Некроз (а) и воспалительные изменения (б) в области выполненной внутрипротоковой ФДТ, окраска гематоксилин-эозином, увеличение на 20

### Клинические примеры:

**Пример 1:** Опухолевая стриктура Bismuth-Corlette IIIВ тип. Состояние после наружно-внутреннего желчеотведения.

При ФД диагностике до фотодинамической терапии получено видеофлуоресцентное изображение опухоли с индексом флюоресценции в 35 раз превышающий норму. Фотодинамическая терапия с контролем фотобличинга (рисунок 4.42 а, б) при помощи оптического диффузора с цилиндрическим облучателем с суммарной световой дозой 150 Дж/см<sup>2</sup>. Фотобличинг после ФДТ составил 93%. После ФДТ на пятые сутки проведена биопсия с целью морфологической верификации патоморфоза (Рисунок 4.43).

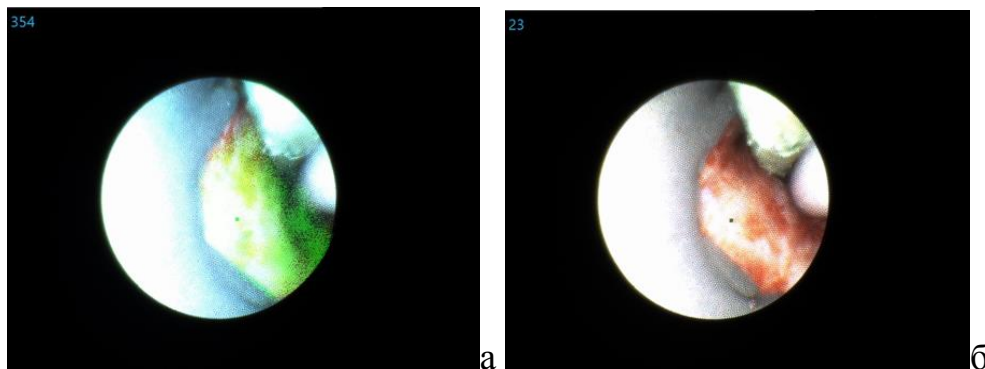


Рисунок 4.42 – Внутрипротоковая видеофлуоресцентная диагностика через интродьюсер и гибкий эндоскоп. Внутрипросветно установлен оптический диффузор и страховочный гидрофильный проводник. а) до ФДТ; б) фотобличинг после проведенного лечения

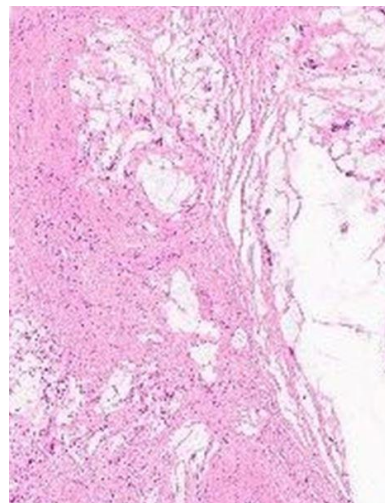


Рисунок 4.43 – Микрофотография – некроз после внутрипротоковой ФДТ, окраска гематоксилин-эозин. Лечебный патоморфоз 4 степени по Е.Ф. Лушникову

**Пример 2:**

Опухолевая стриктура общего печеночного протока Bismuth-Corlette IIIA тип. Видеофлуоресцентная диагностика до ФДТ, индекс флуоресценции 185 (Рисунок 4.44 а, б, в).

Фотодинамическая терапия при помощи оптического диффузора с торцевым облучателем с суммарной световой дозой 150 Дж/см<sup>2</sup>. Фотобличинг 40% (4.44б). Дополнительно проведена фотодинамическая терапия до суммарной световой дозы до 200 Дж/см<sup>2</sup>, при контрольной ФД – фотобличинг более 90% (4.44в). После ФДТ на пятые сутки проведена биопсия с целью морфологической верификации патоморфоза (Рисунок 4.45).

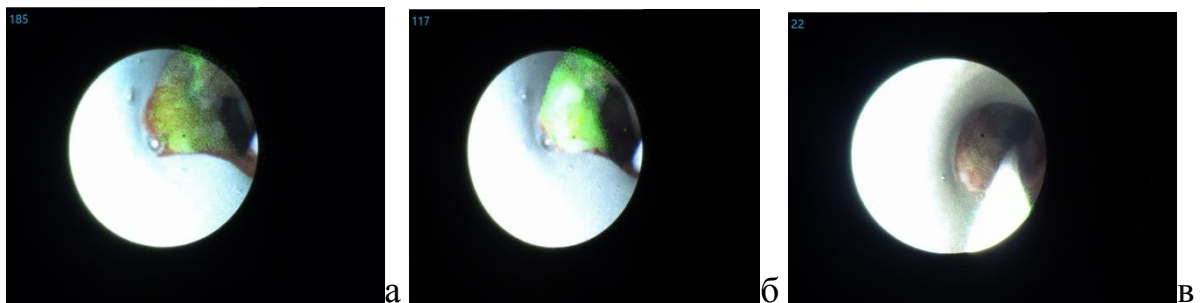


Рисунок 4.44 – Видеофлуоресцентная диагностика: а) до ФДТ; б) после суммарной световой дозы 150 Дж/см<sup>2</sup> (фотобличинг составил 60%); в) фотобличинг после суммарной световой дозы 200 Дж/см<sup>2</sup> (фотобличинг на 90%)

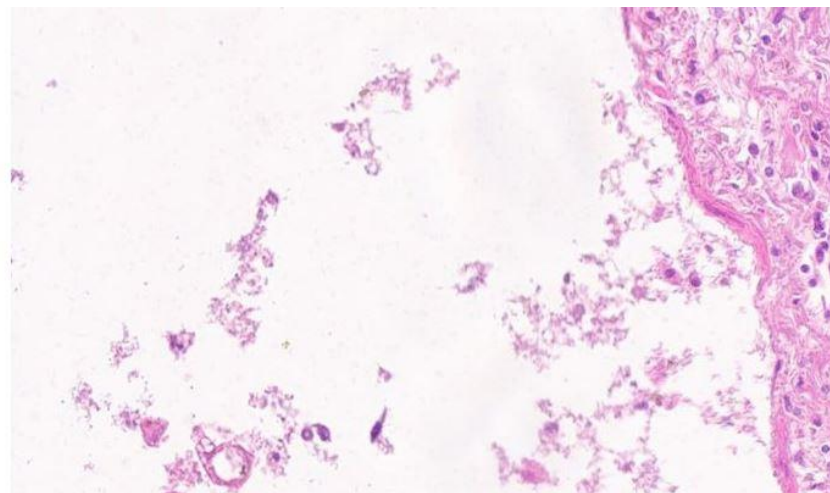


Рисунок 4.45 – Микрофотография – некроз после внутрипротоковой ФДТ, окраска гематоксилин-эозин. лечебный патоморфоз 4 степени по Е.Ф. Лушникову

Данные клинические примеры демонстрируют методологические аспекты персонализированного контроля внутривидеопроцедурной ФДТ при помощи видеофлуоресцентного исследования. Результаты гистологического исследования подтверждают лечебный патоморфоз после проведенного лечения в рамках принятой концепции.

#### **4.5. Результаты применения фототераностики у больных нерезектабельным стенозирующим холангиоцеллюлярным раком с использованием фотодинамической тераностики**

В нашем исследовании ФДТ применена для реканализации опухолевой стриктуры, локального противорецидивного лечения стеноза и обеспечения возможности проведения стентирования как окончательного желчеотведения, которое значительно улучшает качество жизни больного. Мы пролечили таким образом 50 пациентов с нерезектабельным холангиоцеллюлярным раком или у функционально неоперабельных пациентов.

В группе контроля 50 больным проведено желчеотведение с последующим стентированием желчных протоков без ФДТ.

Основным условием для проведения стентирования опухолевой стриктуры саморасширяющимся нитиноловым стентом является наружно-внутреннее желчеотведение, т.е. возможность установить стент дистальнее и проксимальнее стеноза.

Даже минимальное поступление контрастного препарата дистальнее стриктуры не гарантировало успешное проведение наружно-внутреннего дренирования. Реканализация опухолевого стеноза значительно улучшает условия для стентирования.

При имеющемся холангите до или после желчеотводящей операции, перед внутривидеопроцедурной ФДТ добивались клинической стабилизации состояния, так как после проведения ФДТ часто возникает холангит из-за эндобилиарных

вмешательств и формирования воспалительных изменений стенки протока и некроза опухоли. В связи с чем проведение ФДТ на фоне имеющегося холангита может спровоцировать выраженную системную воспалительную реакцию. Всем пациентам при холангите, проводили санацию желчных протоков через страховочный дренаж, НПВС и антибактериальные препараты группы цефалоспоринов.

После внутрипротоковой ФДТ явления холангита удавалось купировать в первые сутки на фоне проводимой многокомпонентной терапии и санации желчных протоков.

Первую контрольную холангиографию через страховочный дренаж проводили через 24–48 часов. Оценивали положение страховочного дренажа и отсутствие осложнений (сброс контрастного препарата в свободную брюшную полость).

Последующие холангиографии проводили на 3–5 сутки после ФДТ. По результатам у всех (100%) больных основной группы получена реканализация опухолевого стеноза.

Для клинической оценки реканализации опухолевого стеноза желчных протоков после проведенной фотодинамической терапии мы впервые применили следующую классификацию:

- 1 тип – восстановление свободного пассажа контрастного препарата дистальнее стеноза или увеличение просвета 25 – до 50% просвета протока – 12 (24%) (рисунок 4.46);
- 2 тип – пассаж контрастного препарата при динамической гидродилатации или восстановление менее 25% просвета протока – 28 (56%) (рисунок 4.47);
- 3 тип – отсутствие пассажа контрастного препарата через стеноз, но реканализация стриктуры за счет возможности проведения инструментов в дистальную неизмененную часть протоков – 10 (20%) (рисунок 4.48);
- 4 тип – отсутствие реканализации – не было.

Следует отметить, что 12 больным, которым первым этапом проведена ФДТ через наружную холангиостому (Рисунок 4.46а), удалось реканализировать стеноз и выполнить терапию на всем протяжении стриктуры и установить наружно-внутренний дренаж. У этих 14 пациентов получены следующие типы реканализации: 1 тип – 2 (14%), 2 тип – 5 (36%), 3 тип – 7 (50%).

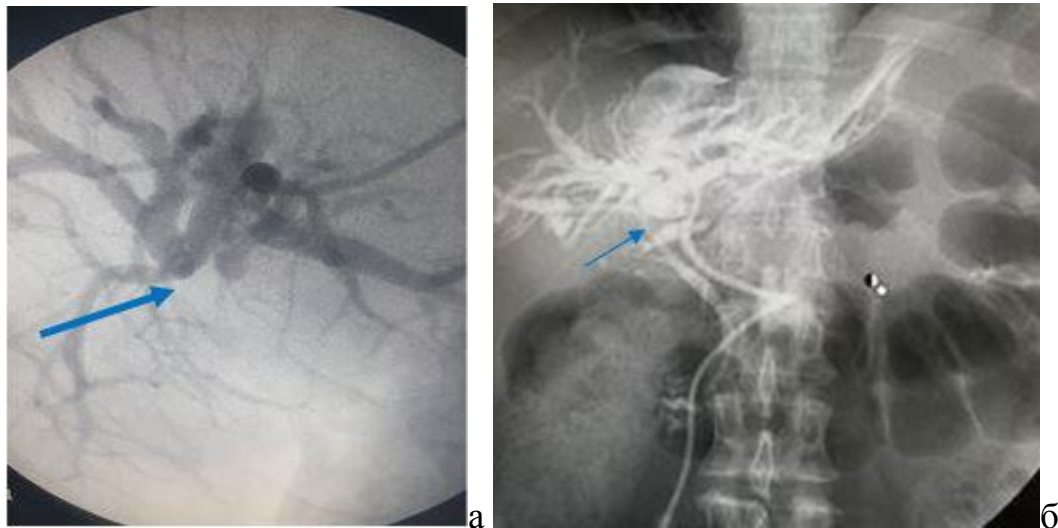


Рисунок 4.46 – Холангиография: а) до ФДТ (стрелкой указан билиарный стеноз); б) после ФДТ отмечена реканализация 1 типа – свободный сброс контрастного препарата через стриктуру (указан стрелкой)

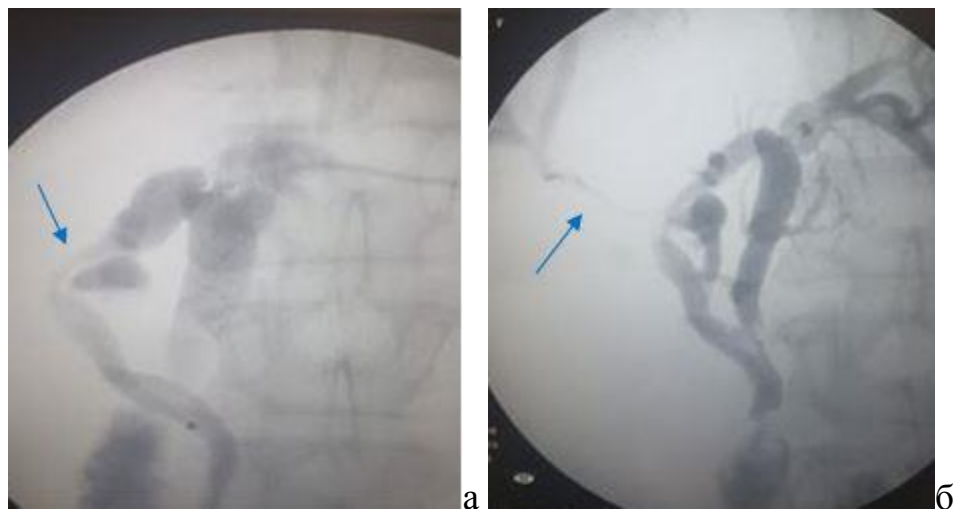


Рисунок 4.47 – Холангиография. Второй тип реканализация стриктуры после проведенной ФДТ: а) до ФДТ (стрелкой указан билиарный блок); б) после ФДТ. Стрелкой указан нитевидный сброс контрастного препарата в протоки правой доли печени



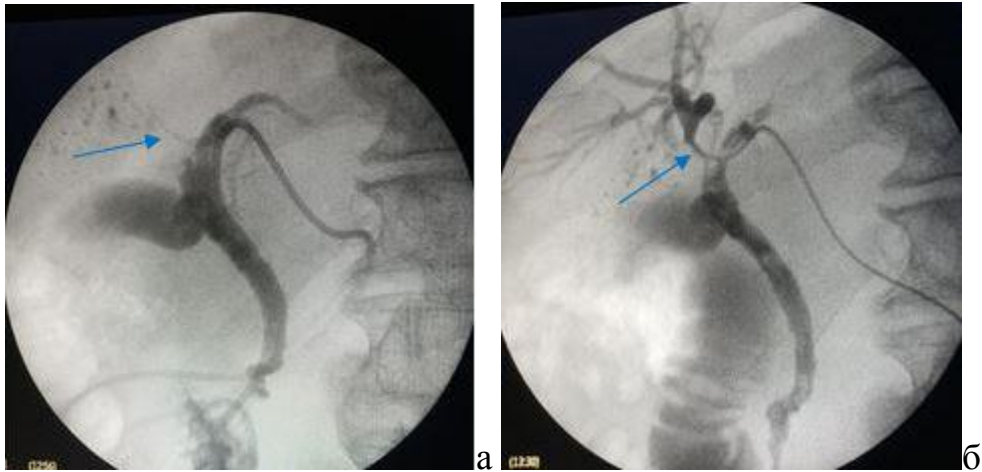


Рисунок 4.48 – Холангиография. Тип 3 – реканализации опухолевого стеноза после ФДТ: а) до ФДТ (стрелкой указана стриктура правого долевого протока); б) после ФДТ указана стрелкой реканализация с проведением манипуляционного катетера через стриктуру

Таким образом, у всех 50 больных основной группы после первого сеанса ФДТ получена реканализация опухолевого стеноза.

Следует отметить, что иногда в результате наружного дренирования при полном билиарном блоке, после проводимой санации желчных протоков и противовоспалительной терапии, уменьшается отек и происходит реканализация, позволяющая провести наружно-внутреннее желчеотделение. Это подтверждают результаты в группе сравнения, где 32 (64%) больным проведено наружно-внутреннее желчеотведение. У 6 из 18 пациентов с наружным желчеотведением наступила реканализация стеноза на  $6 \pm 2$  сутки, что позволило провести гидрофильный проводник и манипуляционный катетер дистальнее блока, с последующим наружно-внутренним желчеотведением или стентированием. У оставшихся 12 пациентов реканализации не наступило, они были выписаны с наружным желчеотведением и, соответственно, исключены из исследования.

После установки стента в желчные протоки всем повторно проведена ФДТ с целью антибластики. 12 больному проведено три сеанса ФДТ, поскольку на первом этапе из-за плотности стриктуры не удалось сразу установить наружно-внутренний дренаж, а ограничились наружной холангиостомой, через которую выполнен первый сеанс ФДТ для реканализации и возможности проведения



наружно-внутреннего дренажа через стеноз. Всего у 50 пациентов проведено 112 сеансов внутрипротоковой ФДТ.

Основными критериями оценки результатов лечения была продолжительность жизни, длительность безжелтушного периода и общее состояние больного, которое существенным образом влияет на качество жизни.

Медиана безжелтушного периода в основной группе составила 15,0 мес (95% ДИ: 13,7–16,2), а в группе сравнения 6,0 мес (95% ДИ: 5,2–6,8). При сравнении кривых выживаемости с помощью лог-ранг критерия Мантеля-Кокса, выявлено статистически значимое отличие ( $p < 0,001$ ).

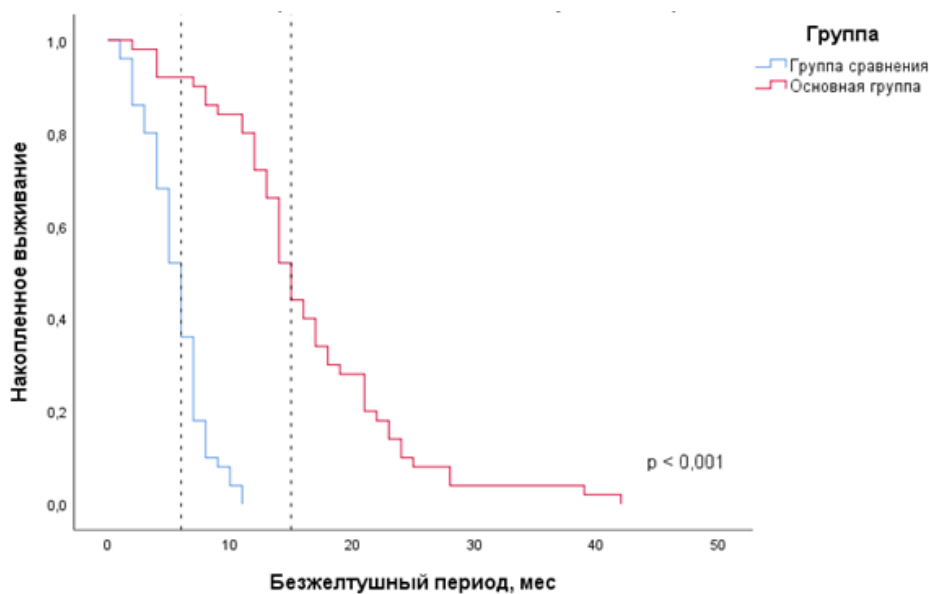


Рисунок 4.49 – Медиана безжелтушного периода

В основной группе средний срок безжелтушного периода составил  $16,3 \pm 1,1$  мес., а в группе сравнения  $5,6 \pm 0,3$  (Рисунок 4.49). При исследовании показателей безжелтушного периода с помощью t-критерия Стьюдента в модификации Уэлча выявлены статистически значимые отличия ( $p < 0,001$ ).

Повторная желтуха в основной группе возникла у 9 (18%) пациентов, что потребовало проведения повторного дренирования желчных протоков. При этом у трех пациентов была частичная обтурация опухолью стента, у пяти – распространение ее выше или ниже зоны стентирования и проведенной ФДТ. У

одной больной отмечено как прорастание через ячейки стента, так и распространение дистальнее его в сегментарные протоки. Стентирование у этой больной при распространении опухоли в сегментарные и субсегментарные протоки нецелесообразно, поэтому ей проведен один курс внутрипротоковой ФДТ с положительным эффектом (клинический пример 4.2), была выписана с наружно-внутренним дренажем.

8 пациентам выполнено повторное стентирование по типу «стент в стент» и внутрипротоковая ФДТ с целью антибластики.

В группе сравнения повторная желтуха возникала у 26 пациентов на среднем сроке  $5,6 \pm 0,3$  месяцев, что потребовало проведение повторного желчеотведения. При этом 12 пациентам проведено стентирование с установкой стента по типу «стент в стент», остальным – холангиостомия.

Анализ данных выживаемости пациентов, прошедших лечение по поводу ХЦР, осложненного механической желтухой, показал ряд отличий в двух группах.

С целью подтверждения правомочности избранной нами диагностической и лечебной тактики был проведен анализ выживаемости больных обеих групп (Рисунок 4.50; Таблица 4.10).

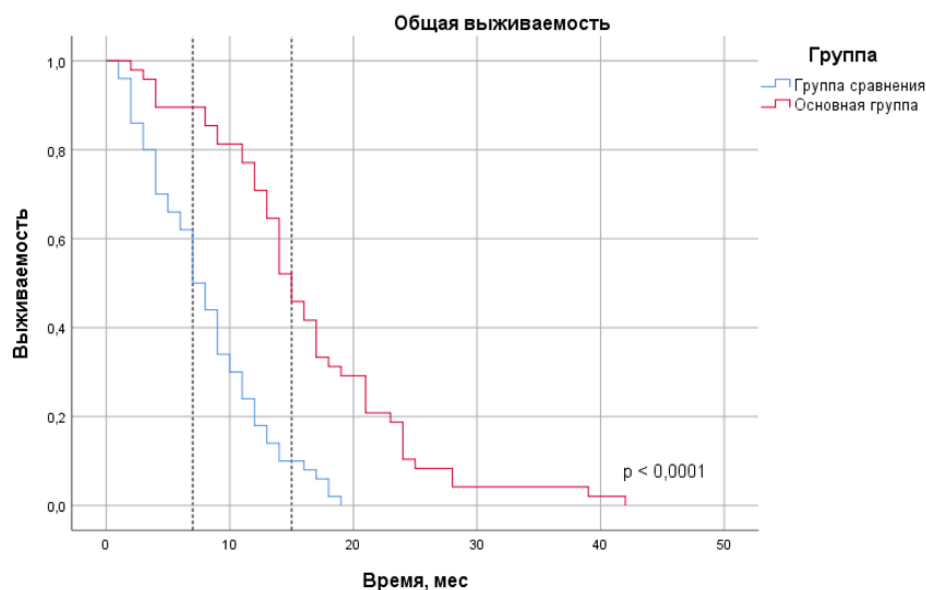


Рисунок 4.50 – Медиана выживаемости в сравниваемых группах

Таблица 4.10 – Статистическое описание медианы выживания в группах

	Однолетняя выживаемость, %	Двухлетняя выживаемость, %	Медиана выживаемости, мес
Группа сравнения	18	0	7,0 (5,5–8,5)
Основная группа	71	10	15,0 (13,1–16,8)

Медианы выживаемости в сравниваемых группах, оцененные с помощью лог-ранк критерия Мантеля-Кокса, статистически значимо отличаются ( $p < 0,001$ ).

Таким образом, полученные данные статистического анализа свидетельствуют о том, что выживаемость пациентов, прошедших лечение по поводу нерезектабельного ХЦР в течение одного или двух лет, существенно выше в группе больных, где проводилась внутривидеотерапевтическая фотодинамическая терапия. Сравнение данных обеих групп показало, что у пациентов основной группы характерна более высокая выживаемость, в отличие от контрольной.

На качество жизни больных существенно влияет их самочувствие и общее состояние, возможность самостоятельно себя обслуживать. С этой целью оценено состояние больных до и после лечения по индексам Карновски и шкале ECOG.

Наше исследование подтвердило улучшение качества жизни пациентов, за счет улучшения самочувствия больше в основной группе (Таблица 4.11).

Таблица 4.11 – Оценка состояния пациентов по индексу Карновски и шкале ECOG до и после лечения

Показатель	Этапы наблюдения					
	Основная группа			Группа сравнения		
	До лечения	После лечения	<i>p</i>	До лечения	После лечения	<i>p</i>
Индекс Карновски	59,4 (56,7–62,1)	69,8 (66,6–73,0)	<0,0 01	57 (54,5–59,2)	59,4 (56,9–61,9)	0,011
ECOG	2,6 (2,5–2,8)	1,9 (1,8–2,1)	<0,0 01	2,6 (2,4–2,7)	2,4 (2,3–2,6)	0,033

При помощи критерия Колмагорва-Смирнова было установлено ненормальное распределение данных, поэтому для сравнения связанных выборок, был использован критерий Уилкоксона. Установлено статистически значимое улучшение индекса Карновски и шкалы ECOG в результате проведенного лечения как в основной, так и в группе сравнения пациентов. Однако в основной группе улучшение индекса Карновски и ECOG было у 66% и 64% соответственно, а в группе сравнения у 26% и 18%, соответственно. После лечения в основной и группе и группе сравнения показатели повысились, что связано с регрессией желтухи, коррекцией гомеостаза и улучшением общего самочувствия пациентов. Однако в основной группе эти показатели оказались лучше: индекс Карновского – 69,8 (66,6–73,0) против 59,4 (56,9–61,9); ECOG – 1,9 (1,8–2,1) баллов против 2,4 (2,3–2,6). Полученные результаты достоверные ( $p < 0,05$ ).

Представленные нами данные свидетельствуют о лучших результатах при комбинированном методе лечения, включающем чрескожное стентирование желчных протоков и эндопротоковую фототераностику, перед одним стентированием. Это объясняется тем, что фотодинамическая терапия позволяет

провести локальное противопухолевое лечение и профилактику рецидива; кроме того, нельзя исключить и системное действие ФДТ за счет активации иммунного ответа, что, в конечном итоге, увеличивает продолжительность жизни у этой тяжелой категории больных.

Эффективность выработанного нами подхода в лечении больных нерезектабельным холангиоцеллюлярным раком, осложненным механической желтухой представлена в клинических примерах.

### **Клинические примеры:**

#### **Пример 4.1:**

Больной Я., 77 лет. Опухоль ворот печени по классификации Bismuth-Corlette IV тип (морфологически холангиокарцинома) T4N1M0.

Сопутствующие заболевания: ИБС, постинфарктный кардиосклероз. Острое нарушение мозгового кровообращения в 2015 году. Гипертоническая болезнь 2 ст., риск ССОЗ, ХСН 2А, хроническая обструктивная болезнь легких. Состояние при поступлении ECOG 3, индекс Карновски 50. Класс С механической желтухи.

**22.03.2016 операция** – наружное дренирование желчных протоков под УЗИ-контролем и рентгеноскопии через правую и левую доли печени (Рисунок 4.51).

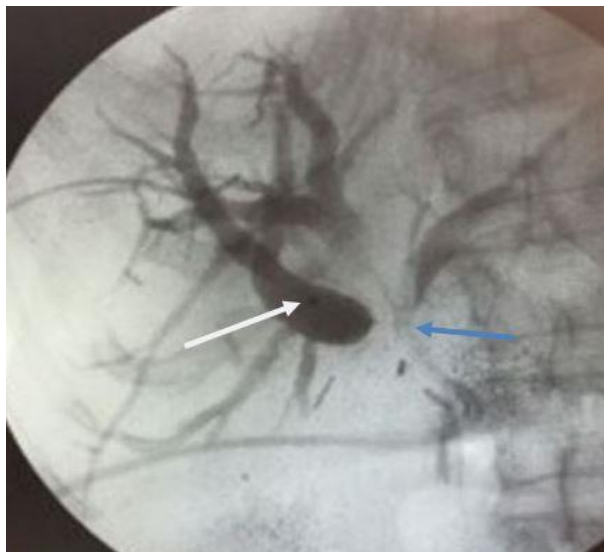


Рисунок 4.51 – Холангиография. Белая стрелка – рентгеноконтрастная метка интродьюсера в проекции места слияния сегментарных протоков правой доли печени. Синяя стрелка – блок контрастирования на уровне конfluence долевых протоков

Через 3 дня проведена внутривидеопротоковая видеофлуоресцентная диагностика (Рисунок 4.52) и фотодинамическая терапия (Рисунок 4.53).

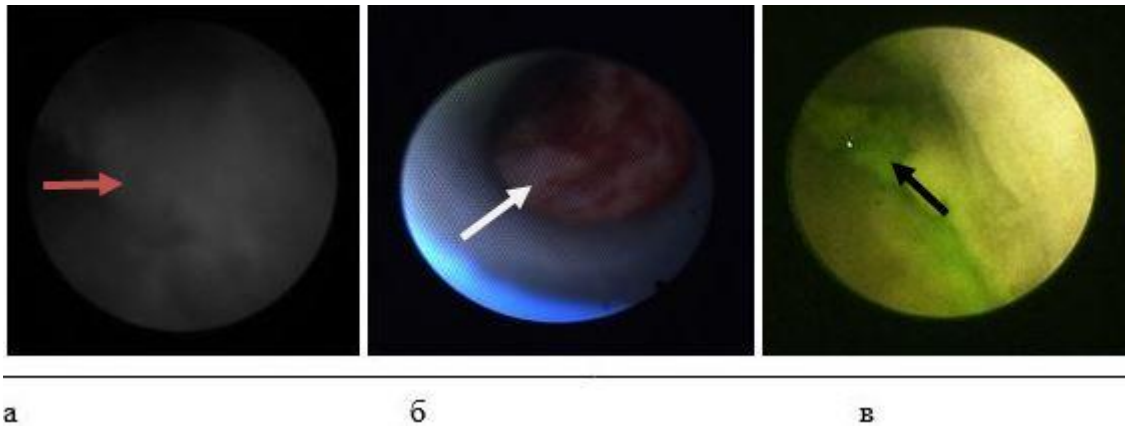


Рисунок 4.52 – Видеофлуоресцентная диагностика. Стрелками указано: красная – флуоресцентное изображение опухоли в черно-белом цвете; белая – естественное изображение без флуоресценции; черная – цветное (зеленое) флуоресцентное изображение опухоли

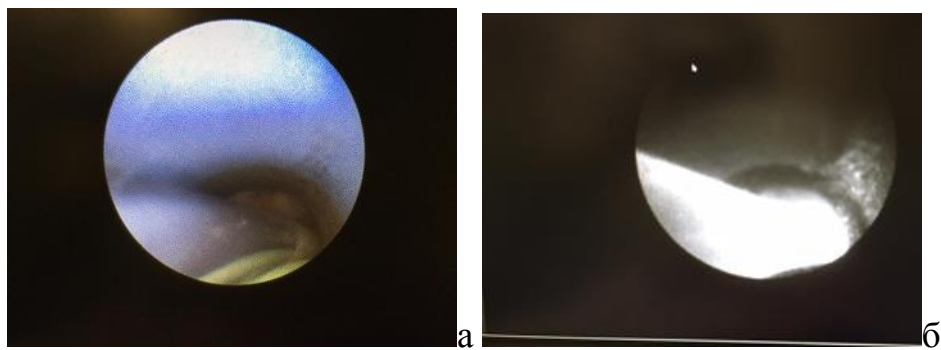


Рисунок 4.53 – Установка оптического диффузора для ФДТ в просвет желчных протоков через интродьюсер под контролем холангиоскопии: а) установка диффузора в область стриктуры; б) внутривидеопротоковая фотодинамическая терапия (видеоэндоскопический контроль в черно-белом свете)

При контрольной фистулографии получен свободный сброс контрастного препарата в просвет кишечника и протоки контрлатеральной доли печени (Рисунок 4.54).



Рисунок 4.54 – Холангиография на четвертые сутки после ФДТ. Стрелками указана реканализация желчных протоков Тип 1, свободное поступление контрастного препарата в просвет кишечника

На пятые сутки выполнено стентирование желчных протоков с формированием конfluence непокрытыми нитиноловыми стентами и проведена повторно внутрипротоковая фотодинамическая терапия с целью антибластики (Рисунок 4.55).

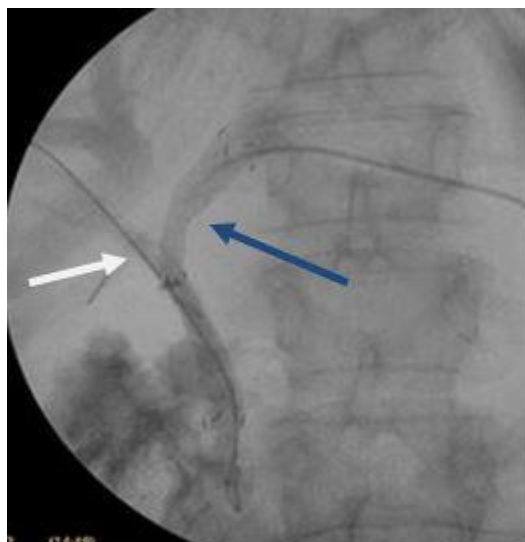


Рисунок 4.55 – Холангиография. Формирование конfluence долевых протоков непокрытыми саморасширяющимися нитиноловыми стентами. Стрелками указаны: белая – стент установленный из правого долевого протока в общий желчный; синяя – аналогичный стент установлен из левого долевого протока через ячейку первого в его просвет

Страховочный дренаж удален на вторые сутки. Медиана выживания составила 16 месяцев, рецидива желтухи не было. Умер от остановки сердечной деятельности на фоне сердечно-сосудистой недостаточности.

**Пример 4.2:**

Больная Б., 48 лет. Клинический пример прогрессирования холангиокарциномы через 16 месяцев после проведенной внутрипротоковой фототераностики со стентированием желчных протоков непокрытыми нитиноловыми стентами по поводу опухоли Клатскина Bismuth-Corlette IV тип.

При холангиографии определяется расширение желчных протоков правой доли печени, расширение сегментарного протока левой доли печени проксимальнее стента (Рисунок 4.56). Сброса контрастного препарата в просвет кишки нет.

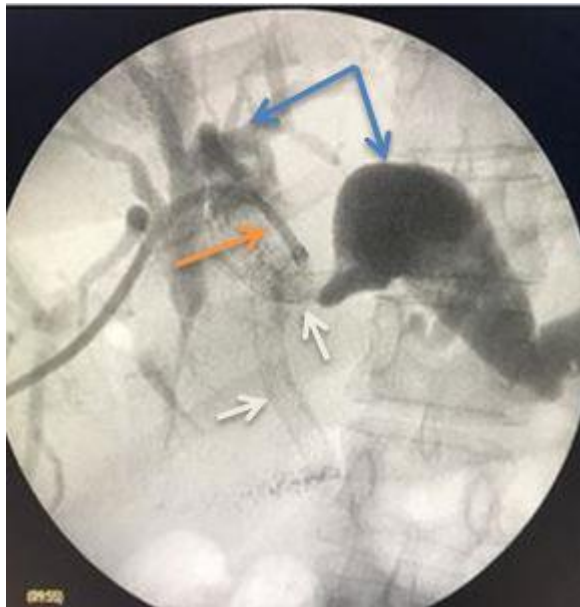


Рисунок 4.56 – Холангиография. Расширение сегментарных протоков правой и левой доли печени. Стрелками указано: белые – ранее установленные стенты; синие – расширенные сегментарные протоки обеих долей печени; желтая – интродьюсер в просвете протоков

Проведена внутрипротоковая браш-биопсия (Рисунок 4.57) под рентгеноскопическим контролем. При морфологическом исследовании получены данные за холангиокарциному.





Рисунок 4.57 – Браш-биопсия опухолевой стриктуры через интродьюсер (эндоскопическая браш-щеточка в просвете протока, указана стрелкой)

Больной проведена внутривидеофлуоресцентная диагностика (Рисунок 4.58 а, б).

При видеофлуоресцентном исследовании получена картина прорастания опухолью ячеек стента (Рисунок 4.59), а также распространение опухоли проксимальнее стента левого долевого протока на сегментарный проток (Рисунок 4.60).

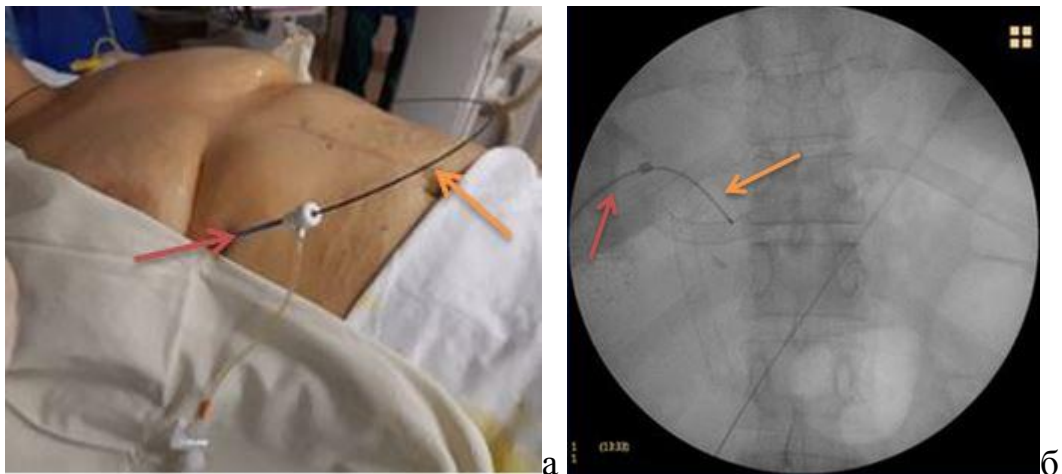


Рисунок 4.58 – Внутривидеофлуоресцентное эндоскопическое исследование: а) эндоскоп (желтая стрелка) проведен в желчные протоки через интродьюсер (красная стрелка); б) холангиография. желтая стрелка – эндоскоп в просвете протока, красная стрелка – интродьюсер

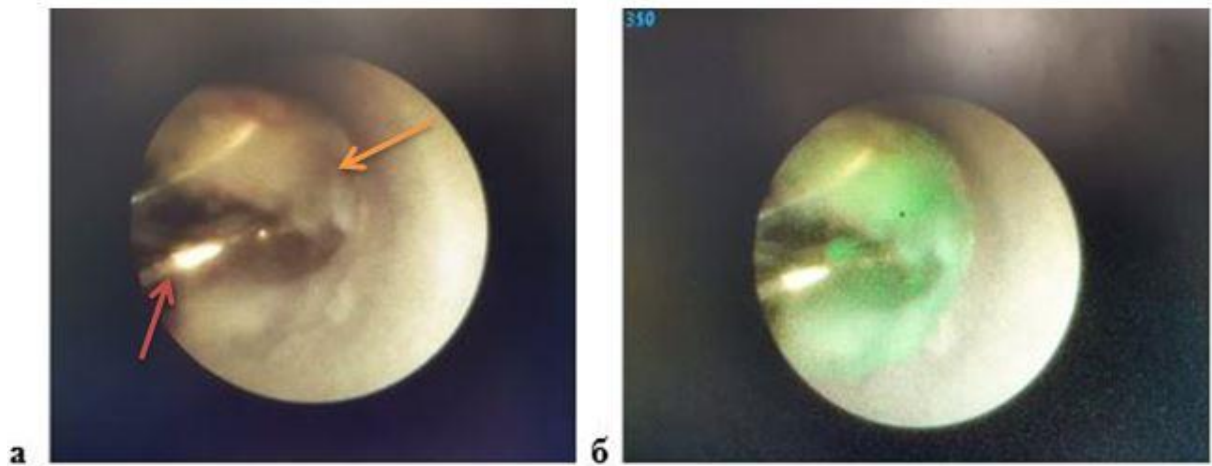


Рисунок 4.59 – Внутриводочное эндоскопическое исследование: а) эндоскоп (желтая стрелка) проведен в желчные протоки через интродьюсер (красная стрелка); б) холангиография. желтая стрелка – эндоскоп в просвете протока, красная стрелка – интродьюсер

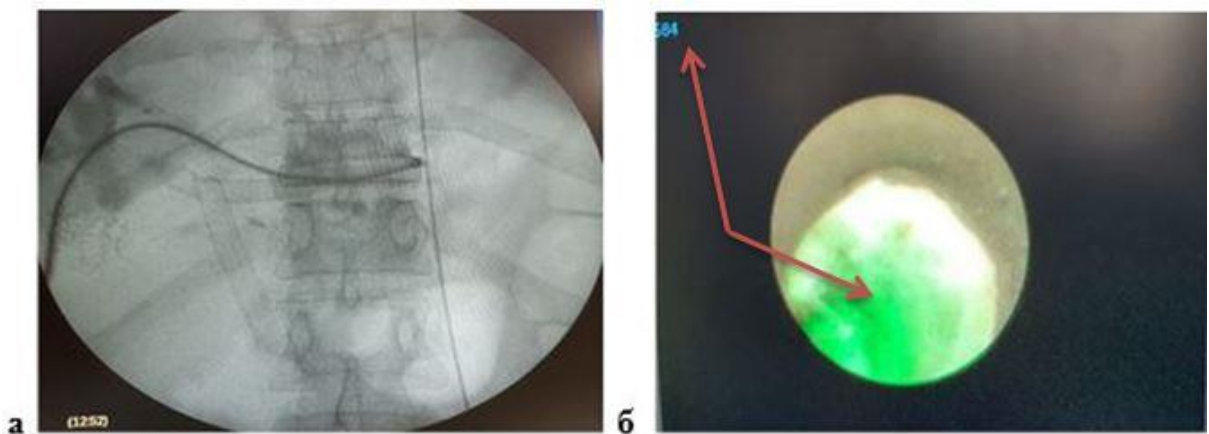


Рисунок 4.60 – а) Холангиография. Интродьюсер установленный в области полного блока левого долевого протока, проксимальнее стента; б) видеофлуоресцентное изображение опухолевой обструкции левого долевого протока (стрелками указан индекс флуоресценции в опухоли)

Пациентке проведена внутриводочная фотодинамическая терапия (Рисунок 4.61).

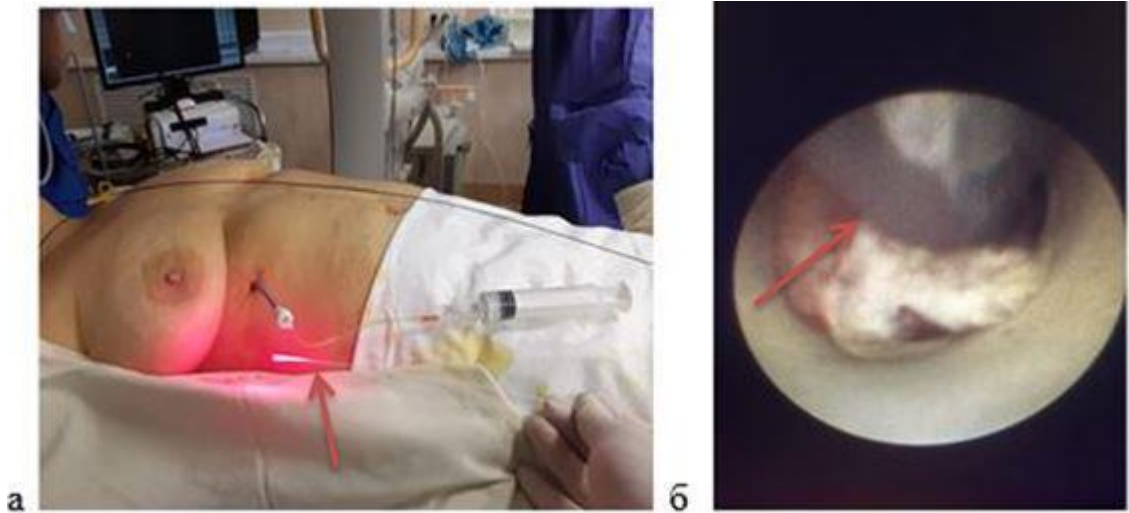


Рисунок 4.61 – а) оптический диффузор с цилиндрическим облучателем для внутрипротоковой ФДТ (указан стрелкой); б) оптический диффузор (указан стрелкой) установлен в область опухолевой стриктуры под видеоэндоскопическим контролем

На третьей сутки отмечена реканализация стеноза и восстановление проходимости стентов, что позволило установить наружно-внутренний дренаж, кончик которого фиксирован в просвете двенадцатиперстной кишки (Рисунок 4.62).



Рисунок 4.62 – Страховочный наружно-внутренний дренаж дистальный конец его установлен в просвете двенадцатиперстной кишки (указан стрелкой)

На фоне проведенного лечения состояние больной улучшилось; стул коричневого цвета, уровень билирубина практически нормализовался. С учетом распространенности опухоли на сегментарные протоки, наружно-внутренний дренаж оставлен как страховочный. Больная выписана с рекомендацией повторной госпитализации через три месяца. Однако на госпитализацию не явилась. Катамнез ее отслежен, наружно-внутренний дренаж был заменен через три месяца в областном центре по месту жительства. Продолжительность жизни после первого этапа лечения составила 23 месяца. Все это время была активной, самостоятельно посещала онколога в диспансере по месту жительства. Эпизодов желтухи не было. Со слов родственников умерла от воспаления легких характерных для новой коронавирусной инфекции.

Полученные нами данные убеждают, что чрескожные минимально инвазивные технологии при механической желтухе, обусловленной ХЦР, могут выполняться совместно с внутрипротоковой фототераностикой для достижения более длительного безжелтушного периода и повышения медианы выживания больных, не снижая их качество жизни.

## ГЛАВА 5 АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В последние десятилетия в России, как и во многих других странах мира, наметилась отчетливая тенденция к увеличению частоты злокачественного поражения желчных протоков [15, 102, 187].

Известно, что результаты лечения любого онкологического заболевания зависят, прежде всего, от его своевременной диагностики. При холангиоцеллюлярном раке (ХЦР), вследствие медленного роста, клинические проявления возникают чаще всего, когда опухоль имеет распространенное поражение, что снижает вероятность успешного радикального лечения [304].

Механическая желтуха чаще всего является первым симптомом ХЦР, по причине ее возникновения пациент обращается к врачу. Несмотря на то, что это манифестный синдром, как правило, его появление свидетельствует уже о распространенности опухолевого процесса на элементы ворот печени или окружающую паренхиму [21, 142, 354].

Пациенты с механической желтухой требуют срочных лечебно-диагностических мероприятий, направленных на снижение желтухи и коррекцию гомеостаза. Первоначальной задачей при поступлении пациента с механической желтухой в стационар является ее купирование. Вариантами этого может быть чрескожное чреспеченочное желчеотведение или ретроградное стентирование. Обычно вариант желчеотведения применяют в зависимости от технических возможностей лечебного учреждения, но для проксимального блока с поражением конfluenceа целесообразна чрескожная холангиостомия. В свою очередь, при дистальном блоке предпочтение отдают ретроградному желчеотведению [17, 21, 382].

Последние десятилетия в литературе достаточно хорошо описаны варианты желчевыводящих минимально инвазивных операций, которые практически пришли на смену хирургическому наложению билиодигестивных анастомозов [25, 70]. Из вариантов желчеотведения оптимальным признано стентирование опухолевой стриктуры. По мнению большинства авторов, стентирование

целесообразно, если предполагаемая продолжительность жизни пациента превышает три месяца [19, 265]. В свою очередь, Masafumi Chiba и соавторы сообщили о возможности применения металлического стента при желтухе опухолевого генеза, даже когда предполагаемая медиана выживания составляет более одного месяца [98]. Доказано преимущество металлических саморасширяющихся нитиноловых стентов перед пластиковыми, требующими периодической замены. [21, 64, 314].

Средняя продолжительность периода до появления повторной обструкции после эндопротезирования металлическими саморасширяющимися стентами составляет от трех до семи месяцев [163, 188, 210, 386]. В связи с этим актуальным является разработка эффективных методов локального лечения опухолевой стриктуры [382].

После купирования явлений желтухи встает вопрос о причине возникновения билиарного блока. Протяженность стриктуры, ее локализация, полный или неполный блок контрастирования желчных протоков – все это можно оценить на этапе проведения холангиографии. Проблемы возникают с морфологической трактовкой, так как существуют сложности как с забором биопсийного материала, так и с относительно высокой частотой ложноотрицательных результатов [52, 113, 263]. Нередко приходится устанавливать диагноз на основании клинико-инструментальных данных.

Несмотря на успешное применение желчеотводящих операций, после купирования механической желтухи больные чаще всего выписываются домой без проведения какого-либо противоопухолевого лечения. Большинство пациентов с механической желтухой опухолевого генеза, как правило, имеют распространенный процесс. Нерезектабельность опухоли из-за ее распространенности и/или неоперабельное состояние больного, подвергающее неоправданному риску не только хирургическое лечение, но и химиолучевую терапию, являются ограничивающими факторами. Безусловно, для лечения ХЦР нужен системный подход, несмотря на то, что, по мнению авторов, химио- и лучевая терапия в настоящее время малоэффективны, ведутся разработки и

исследования с обнадеживающими первичными результатами новых лекарственных препаратов [72, 228, 267, 284, 299]. В связи с чем для последующего противоопухолевого лечения имеется необходимость обеспечения максимально длительного безжелтушного периода больных этой группы, а также повышения медианы выживания [209].

В настоящее время одним из перспективных методов диагностики и лечения злокачественных опухолей, в том числе и ХЦР, являются флуоресцентная диагностика (ФД) и фотодинамическая терапия (ФДТ), которые объединяют в понятие фотодинамической тераностики (фототераностики). Фототераностика внесла существенный вклад в лечение онкологических больных, прежде всего за счет высокой избирательности, малой токсичности и низкого риска осложнений [61, 87, 116, 154, 159, 170, 364]. ФД применяется для дифференцировки патологического очага от здоровой ткани за счет преимущественного накопления фотосенсибилизатора (ФС) [2, 87, 170].

В настоящий момент представляется актуальным оценить возможность применения фототераностики у больных нерезектабельным ХЦР, осложненным механической желтухой, или в тех случаях, когда хирургическое лечение рискованно из-за соматического состояния пациента, с использованием новых подходов, технологий и оборудования.

Для решения поставленных задач по оптимизации процедуры фототераностики ХЦР были исследованы оптические свойства тканей внутри- и внепеченочных желчных протоков *in vitro* и *in vivo*, оценена возможность использования отечественного видеофлуоресцентного модуля для эндоскопии и минимально инвазивной хирургии с возможностью проведения фототераностики нерезектабельного стенозирующего ХЦР. Для оценки безопасности и эффективности метода фототераностики ХЦР было проведено предклиническое исследование. Также методика эндопротоковой фототераностики при стенозирующем ХЦР, осложненном механической желтухой, внедрена в клиническую практику.

На сегодняшний день для исследования оптических свойств биологических тканей *in vitro* и определения метрологических характеристик применяемого при анализе тканей оборудования создаются оптические среды. Данные среды в зависимости от исследуемой ткани могут характеризоваться определенными свойствами поглощения и рассеяния [37, 74].

Для определения метрологических характеристик применяемого для ФД и ФДТ оборудования проведены лабораторные исследования на оптических средах, имитирующих свойства рассеяния биологической ткани за счет содержания раствора 1,8% жировой эмульсии (Интралипид®) [37]. Кроме этого, среды содержали определенную концентрацию ФС – хлорина Е6 (Сe6) – 0,1 до 1 мг/кг. Данные оптические образцы нами исследованы при помощи видеофлуоресцентного модуля УФФ-630/675-01 (ООО БИОСПЕК, Москва, Россия), что позволило получить изображения в черно-белом и цветном режимах, при наложении которых флуоресцирующие зоны окрашиваются в зеленый псевдоцвет для визуальной оценки границ опухолевых очагов, а также определить индекс флуоресценции в биологической среде. При облучении оптических образцов лазерным светом с длиной волны 635 нм, фиксировали индекс флуоресценции, значение которого увеличивалось при увеличении концентрации ФС.

Полученные параметры индекса флуоресценции для определенной концентрации ФС в образце в дальнейшей практике использовали для калибровки видеофлуоресцентного модуля УФФ-630/675-01 (ООО БИОСПЕК, Москва, Россия) перед работой, а также для оценки степени накопления ФС в патологических тканях до и после ФДТ.

В настоящий момент актуальна разработка методов интраоперционного контроля процесса терапии и дозиметрии при проведении ФДТ [327]. Контроль и оценка данных процессов возможны путем мониторинга фотобличинга ФС во время ФДТ. Это возможно реализовать контролируя интенсивность флуоресцентного сигнала, зарегистрированного с исследуемой ткани с ФС [280, 375]. Так как фотодинамический эффект достигается за счет передачи энергии с



возбужденных молекул ФС на кислород, переводя его в синглетную цитотоксическую форму, интраоперационный мониторинг фотобличинга ФС может давать количественную оценку продукции синглетного кислорода и, тем самым, позволяет контролировать процесс проводимой терапии [168]. В работе Belykh E. et al (2018) представлен количественный метод интраоперационной оценки фотобличинга 5-АЛК-индуцированного протопорфирина IX (ПпIX) [77]. Rogue B. W. et al. в своей обзорной статье выявили положительную корреляцию между фотобличингом ФС и эффективностью проводимой ФДТ [291]. В другом научном труде [351] было показано, что у пациентов с актиническим кератозом, болезнью Боуэна и базальноклеточной карциномой фотобличинг ФС порядка 50% вызывал частичный, а при 60% – полный положительный эффект после первой процедуры ФДТ. Авторами было предложено использовать порог фотобличинга в 60% за оптимальный, так как при данном значении был продемонстрирован наибольший уровень значимости между числом полных и частичных опухолевых ответов на ФДТ ( $P < 0,01$  и  $P < 0,001$  для 50% и 60% фотобличинга, соответственно). Установлено, что у пациентов при фотобличинге ФС на уровне более 50% в 40 раз больше шансов достичь полной деструкции опухолевой ткани, чем у пациентов с фотобличингом менее 50% [352]. В свою очередь, уровень фотобличинга ФС в 60% и более также характеризовал высокую эффективность проводимой ФДТ у пациентов с дисплазией шейки матки и лейкоплакией вульвы [120, 143]. Ранее проведенные исследования [129] позволили доказать эффективность проводимой ФДТ опухолей головы и шеи с внутривенным введением Себ путем оценки фотобличинга ФС (фотобличинг Себ наблюдался на уровне приблизительно 50%). Эффективность проводимой Себ-ФДТ у пациентов с дисплазией и раком шейки матки также оценивалась регистрацией фотобличинга ФС [57].

Таким образом, достижение фотобличинга порядка 60% при различных локализациях злокачественного процесса (кожные покровы, органы головы и шеи, шейка матки) позволяло получить регрессию опухоли и лечебный патоморфоз с хорошим клиническим эффектом, однако данное значение уровня

фотобличинга, безусловно, зависит от объема опухоли, ее гетерогенности и особенностей кровотока, а также оптических свойств исследуемых тканей.

Для определения оптимальной энергетической дозы для достижения 60% фотобличинга при различных концентрациях ФС проведен эксперимент на оптических средах. Оптические образцы облучали с помощью источника лазерного излучения с длиной волны 660 нм и плотностью мощности  $700 \text{ мВт/см}^2$ . Фотобличинг Себ оценивался при дозах облучения от 0 до  $250 \text{ Дж/см}^2$ , соответствующим дозам облучения злокачественных новообразований, применяемым в клинической практике (минимальные дозы – для диагностических целей, максимальные – для терапевтических). В рамках проводимого *in vitro* эксперимента определено, что для выгорания 60% Себ в образцах необходимы следующие дозы облучения: для концентрации 1 мг/кг фотобличинг 60% достигнут при дозе облучения в  $75 \text{ Дж/см}^2$ , для концентраций Себ 0,8 и 0,5 мг/кг доза облучения для выгорания препарата составила  $50 \text{ Дж/см}^2$ , для концентраций Себ 0,3; 0,2; 0,1; 0,005 мг/кг –  $25 \text{ Дж/см}^2$ . Таким образом, чем выше концентрация ФС в условной ткани, тем больше должна быть плотность мощности энергии для получения его выгорания.

Так, была отработана методика оценки эффективности фотодинамического воздействия на оптических средах с ФС хлоринового ряда путем оценки фотобличинга препарата в зависимости от выбранной энергетической дозы. Данный результат позволил в дальнейшем контролировать процесс ФДТ, что было далее использовано в клинической практике при опухолевом поражении более доступных и удобных для изучения локализаций, чем рак желчных протоков [39, 57, 58, 120, 129, 130, 143]. Полученные результаты в ходе эксперимента соответствуют модели биологической ткани в отсутствие кровотока. Соответственно данный результат воздействия лазерным излучением на оптические среды с различной энергетической дозой возможно перенести на модель *in vivo* в приближении отсутствия кровотока.

Необходимо отметить, что ХЦР относят к сложно доступным локализациям, поскольку опухоль располагается в желчных протоках в непосредственной

близости сосудистых структур, органов гастро-гепато-дуоденального комплекса. Соответственно методология проведения внутривидеотераностики ХЦР и оценка возможности ее применения должны базироваться на минимально инвазивном чрескожном чреспеченочном доступе, который возможен только при развитии желчной гипертензии вследствие билиарного стеноза. Так как основными применяемыми диагностическими методами интраоперационного визуального контроля являются только УЗИ и рентгеноскопия, разработка алгоритмов ФД и ФДТ позволит существенно расширить лечебно-диагностические возможности.

В связи с этим было проведено *in vitro* исследование для апробирования и оптимизации методологии ФД и ФДТ ХЦР на лабораторной модели гепатобилиарного комплекса дикого кабана (лат. *Sus scrofa*). Для определения интенсивности флуоресценции ФС в исследуемой ткани ( $I_{\text{экз}}$ ) учитывали эндогенную флуоресценцию ( $I_{\text{энд}}$ ) в результирующем флуоресцентном сигнале ( $I_{\text{общ}}$ ).

$$I_{\text{общ}} = I_{\text{энд}} + I_{\text{экз}} \quad (3)$$

Формула 3, где  $I_{\text{общ}}$  – общая интенсивность,  $I_{\text{энд}}$  – интенсивность эндогенной флуоресценции,  $I_{\text{экз}}$  – интенсивность экзогенной флуоресценции

В случае, когда интенсивность экзогенной флуоресценции много больше интенсивности эндогенной флуоресценции ( $I_{\text{экз}} \gg I_{\text{энд}}$ ), вкладом эндогенных флуорофоров в результирующий сигнал можно пренебречь. Однако, когда сигнал экзогенной флуоресценции сравним по интенсивности с эндогенным ( $I_{\text{экз}} \approx I_{\text{энд}}$ ), необходимо учитывать вклад последнего, что требует использования специального программного обеспечения и высокоточного оборудования [388]. Для решения данной проблемы было проведено исследование эндогенной флуоресценции различных сегментов лабораторной модели гепатобилиарного комплекса (желчных протоков, желчного пузыря, паренхимы печени) с использованием источников лазерного излучения в красном и ближнем инфракрасном (БИК) диапазонах.

При анализе рассеянного назад лазерного излучения (РНЛИ) была получена существенная разница в интенсивности в зависимости от сегмента гепатобилиарной системы кабана (желчный пузырь, поверхность печени или желчный проток). РНЛИ, характеризующее плотность и поглощение ткани, используется для оценки концентрации ФС и сопоставления концентраций в различных тканях.

Нами получены параметры аутофлуоресценции с поверхности печени, слизистой желчного пузыря и просвета желчных протоков с использованием видеофлуоресцентного модуля. Для внутрипузырного и внутрипротокового исследования проведена холецистотомия с установкой интродьюсера 8F в просвет, через который проведен гибкий эндоскоп диаметром 2,8 мм. Желчный пузырь для большей подвижности мобилизован от дна. После опорожнения желчного пузыря, проведена тщательная санация физиологическим раствором и выполнено видеофлуоресцентное исследование, после чего интродьюсер через пузырьный проток проведен в общий печеночный проток до конfluence. Проводились измерения параметров эндогенной флуоресценции из области бифуркации долевых протоков.

Установлена наибольшая интенсивность эндогенной флуоресценции в тканях желчного пузыря и паренхимы печени (индекс флуоресценции – 62,1 отн.ед.) и наименьшая интенсивность – в стенке желчного протока (индекс флуоресценции 1,1 отн.ед.). В связи с большими различиями уровней эндогенной флуоресценции, в зависимости от исследуемой ткани, при проведении оценки накопления ФС в патологической ткани необходимо проводить калибровку флуоресцентного сигнала относительно сигнала, регистрируемого с несенсибилизированных здоровых тканей той же локализации, что и опухоль. Соответственно, истинная флуоресценция ФС, исходя из формулы (3), будет являться разностью регистрируемого сигнала с области патологии и сигнала с условно здоровой ткани той же локализации. Таким образом, данная методология проведения ФД позволяет повысить точность количественной оценки накопленной концентрации ФС в патологических тканях.

Нами проанализированы результаты, полученные как с помощью ВФД, так и спектральной диагностики, оценены их метрологические характеристики, в связи с тем, что при использовании различных методов доставки лазерного излучения к биологическим тканям характер распространения лазерного излучения различается.

Исследуя ткани гепатобилиарного комплекса дикого кабана, мы смогли оценить возможности ВФД различных сегментов гепатобилиарной системы кабана в красном и ближнем инфракрасном диапазонах. При видеодиагностике оценка эндогенной флуоресценции тканей производилась по индексу флуоресценции. Количественная оценка интенсивности флуоресценции по индексам флуоресценции эндогенных порфиринов стенки желчного пузыря, паренхимы печени и стенки внутренней поверхности желчного протока составила 396, 342 и 161 относительных единиц (отн.ед.), соответственно, при норме в 10 отн.ед. [323]. Нормирование проводилось на паренхиме печени (поперечном срезе). Выбор данной области был обусловлен низкой интенсивностью рассеянного назад лазерного излучения ткани печени и присутствием в данной области большого количества дополнительных флуорохромов.

Глубина воздействия лазерного излучения на биологическую ткань является важным параметром при проведении терапии. Согласно результатам, представленным в работах [82, 372], внутрипротоковая ФДТ холангиокарциномы с фотосенсибилизатором Photofrin (QLT Pharmaceuticals, Vancouver, Canada) в дозе 2 мг/кг веса при дозе облучения  $250 \text{ Дж/см}^2$  с длиной волны 630 нм позволила получить некроз опухоли на глубину до 4 мм, но при послеоперационном гистологическом исследовании неизмененные опухолевые клетки выявлены глубже, до 5–8 мм. Соответственно, для увеличения глубины лазерного воздействия необходимо менять подход проведения ФДТ. Для решения данной проблемы было оценено распространение лазерного излучения в тканях по регистрации рассеянного сигнала и вклада эндогенной флуоресценции. Было введено понятие глубины зондирования (probing depth) лазерного излучения. Проведено измерение глубины зондирования лазерного излучения ( $\lambda = 660 \text{ нм}$ ) во

внепеченочном и внутripеченочном протоках гепатобилиарного комплекса кабана через установленный дренаж и вне его с мощностью облучения в 5 и 300 мВт. Максимальная глубина зондирования лазерного излучения экстрапаренхиматозной части желчных протоков в просвете холангиостомы и вне дренажа при мощности 5 мВт составила 2,8 и 3 мм, при мощности 300 мВт – 9 мм и 11 мм соответственно. Максимальная глубина зондирования лазерного излучения во внутripеченочном протоке в просвете дренажа и вне дренажа при мощности 5 мВт составила 2,5 и 3,5 мм, при мощности 300 мВт – 7,5 мм и 9,5 мм соответственно.

Основываясь на полученных результатах, можем заключить, что свободное расположение оптического диффузора в просвете желчного протока позволяет увеличить глубину распространения лазерного света до 2 мм, что является значительным показателем для достижения терапевтического эффекта.

В рамках следующего этапа исследования изучены возможности и методологические аспекты фототераностики на 13 приматах рода Павиан Гамадрил (лат. *Pario hamadryas*). Исследование было разрешено локальным биоэтическим комитетом НИИ «Медицинской Приматологии». В эксперименте участвовали взрослые особи, имеющие заболевания, не позволяющие находиться в общих вольерах и подверженные медицинской эвтаназии. Эксперимент на 11 приматах проводился *statim post mortem*. Также было проведено интраоперационное *in vivo* исследование на двух приматах рода Павиан Гамадрил.

Выбор приматов в качестве лабораторных животных обусловлен их физиологическим и анатомическим сходством с человеком. Данное сходство позволяет аппроксимировать полученные экспериментальные результаты непосредственно или с минимальной коррекцией на человека и рассматривать полученные данные как наиболее точное отражение закономерностей, происходящих в человеческом организме [23].

На 11 приматах были изучены интенсивность эндогенной флуоресценции и глубина зондирования тканей, в которых возможно возникновение

фотохимической реакции при дальнейшем проведении ФДТ. На двух приматах проведена оценка данных параметров во время интраоперационного эксперимента во внутри- и внепеченочном желчном протоке, оценено накопление ФС, а также определение безопасных доз ФДТ. Было показано, что суммарная световая доза лазерного излучения от 150 до 300 Дж/см<sup>2</sup> не приводит к деструкции нормальной ткани, содержащей как эндогенные, так и экзогенные флуорофоры.

Также получены результаты спектрально-флуоресцентной диагностики по распределению индексов флуоресценции в тканях гепатобилиарной системы павиана после внутривенного введения Себ в концентрации 2 мг/кг, что соответствует в перерасчете на вес человека 1 мг/кг. Введение ФС лабораторному животному осуществлялось в воротную вену. На момент введения ФС животные были в состоянии глубокой седации.

Динамика накопления Себ исследовалась в тканях правой и левой доли печени и в желчных протоках и желчном пузыре с временными точками: до введения и спустя 10, 40, 60, 75 минут после введения ФС Себ. Получены усредненные значения индексов флуоресценции, зарегистрированных при экспозиции 50 мс и мощности лазерного излучения  $P = 10\text{--}15$  мВт.

Максимальное значение индекса флуоресценции было зарегистрировано в паренхиме печени спустя 40 минут после внутривенного введения Себ, как и в стенке желчного пузыря. Тогда как в желчных протоках правой доли печени максимальное значение индекса флуоресценции было зарегистрировано спустя 60 минут.

В рамках интраоперационного эксперимента на двух приматах во время хирургического вмешательства под эндотрахеальным наркозом, после лапаротомии, мобилизации правой и левой доли печени, холецистэктомии, проведены дренирование общего желчного протока через культю пузырного и интраоперационная холангиография.

После установки интродьюсера 6 F под рентгеноскопическим контролем в конfluence долевых протоков оптический диффузор вводился в просвет интра- и

экстрапаренхиматозной части желчных протоков для определения глубины зондирования лазерного излучения, а также проведения лазерного облучения с мощностью 1,5 Вт, длиной волны 660 нм с энергетической дозой 50, 150 и 300 Дж/см<sup>2</sup> для достижения фотодинамического эффекта на стенке желчного протока. Также оценивалась безопасность воздействия лазерного излучения на биологическую ткань при данных параметрах облучения.

С помощью ВФД была проведена контролируемая ФДТ путем оценки степени фотобличинга ФС в области проведенной терапии. Разработанная методика позволила осуществить диагностику и лечение при более доступных локализациях опухолей, чем гепатобилиарная зона. Получены хорошие результаты в виде регрессии опухолей и лечебном патоморфозе при локализации на кожных покровах, в органах головы и шеи, шейки матки [57, 58, 120, 129, 130, 143, 324]. О важности определения концентрации ФС в области патологии по интенсивности флуоресценции, а также определения степени фотобличинга ФС, которые целесообразно учитывать при проведении фототерапии, сообщали и другие авторы [54].

Для оценки ФД и ФДТ при лечении ХЦР было проведено проспективное двухцентровое клиническое исследование. Использование методологии и кадровый состав унифицированы, что позволило провести исследование в двух центрах. В основу его положен анализ клинических наблюдений за 100 больными с механической желтухой, обусловленной опухолевым поражением проксимальных желчных протоков в период с 2011 по 2021 год. Все больные основной группы (n=50) находились на лечении в УКБ № 1 Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет). Пациентам в качестве окончательного желчеотведения проводили установку нитинолового саморасширяющегося стента с локальной ФД и ФДТ. Группа сравнения состояла из пациентов ГБУ РД «РКБ» (n=50) с ХЦР, которым в качестве окончательного желчеотделения применяли внутрипротоковое эндопротезирование без локальной ФД и ФДТ. Группы были сопоставимы по полу, возрасту и тяжести состояния. Средний возраст в основной группе составил 64.5 [95% ДИ: 60.9–68.1], в группе



сравнения 65.1 [95% ДИ: 61.3–68.8]. Отмечалось небольшое преобладание в анализируемой группе женщин – 53 больных, мужчин – 47. Диагноз ХЦР (n=100) был верифицирован посредством внутривенной биопсии после налаживания желчеотведения у 79 пациентов (79%). У 21% больных из обеих групп не удалось взять материал для морфологического исследования, и/или он был неинформативен из-за технических сложностей забора биоптата из желчных протоков. О сложностях диагностики ХЦР сообщают многие авторы [113, 263, 48]. Инструментальные методы диагностики, использованные при выполнении данного исследования, включали: УЗИ, МСКТ с внутривенным контрастированием, внутривенную ФД, внутривенную биопсию опухоли. Наиболее информативным и универсальным методом диагностики, в связи с его безопасностью, высокой разрешающей способностью и доступностью, являлось УЗИ, которое было скрининговым методом для больных с хирургическими заболеваниями органов гепатобилиарной области. Его проводили на этапе госпитализации без специальной подготовки больного.

Мы удостоверились в отсутствии типичных убедительных ультразвуковых признаков злокачественного поражения желчных протоков. У всех пациентов удалось установить признаки желчной гипертензии в виде расширения желчных протоков выше места стриктуры. Всем больным проводили УЗИ зоны интереса с цветовым доплеровским картированием, МСКТ с внутривенным контрастированием. В основной группе дополнительно проведена обработка МСКТ DICOM-изображений с построением 3D-моделей печени [48].

Показаниями к чрескожным диагностическим пункциям под УЗ-контролем являлись очаговые поражения органов гепатобилиарной области с имеющимся безопасным ЭХО-доступом, т.е. когда проекция пункционного канала не проходила через жизненно важные структуры (элементы печечно-дуоденальной связки, сосуды). Противопоказанием к чрескожной биопсии являлись: некорригируемое нарушение свертывающей системы крови, высокая билирубинемия, отсутствие безопасного ЭХО-доступа к новообразованию. В группах больных чрескожную диагностическую пункцию для верификации ХЦР

успешно выполнили в 6% случаев (трем пациентам в каждой группе). Это было возможно при наличии у больных распространения опухоли на окружающую протоки паренхиму печени (масс-форма ХЦР). У всех этих больных получено подтверждение диагноза морфологическим исследованием.

Все минимально инвазивные вмешательства выполняли под местной анестезией или внутривенным наркозом в условиях рентгеноперационной.

Основную группу составляли больные с механической желтухой, обусловленной опухолевым поражением проксимальных желчных протоков (96%). У двух больных (4%) обнаружен ХЦР общего желчного и общего печеночного протока, однако пациенты признаны неоперабельными из-за пожилого возраста с наличием сопутствующих заболеваний. Длительность желтухи у 35 больных (70%) составила более одного месяца. Тяжесть состояния зависела от степени холестаза, сопровождающегося у 34 больных (68%) холангитом. Все пациенты были признаны неоперабельными по наличию сопутствующих заболеваний и/или распространенностью опухолевого процесса на обе доли печени.

Группу сравнения (n=50) составили неоперабельные пациенты с поражением проксимальных желчных протоков в 46 случаях (92%), у 8% (четыре больных) был рак общего печеночного и общего желчного протока без поражения супрапапиллярной части. Длительность желтухи у 33 больных (66%) составила более одного месяца. Тяжесть состояния зависела от степени холестаза, сопровождающегося у 32 больных (64%) холангитом. В обеих группах преобладал проксимальный билиарный блок.

Учитывая, что при высоком блоке имеются некоторые особенности ведения больных и выполнении малоинвазивных операций, мы оценили поражение желчных протоков на основании интраоперационных холангиограмм по общепринятой классификации типов по Bismuth–Corlette [21, 39, 382]. Определено пять вариантов обструкции желчевыводящих путей:

1. изолированное поражение общего печеночного желчного протока;
2. поражение конfluence долевых протоков;

3. поражение общего печеночного и левого долевого желчных протоков;
4. поражение общего печеночного и правого долевого желчных протоков;
5. поражение общего печеночного, правого и левого долевых желчных протоков.

Целесообразно выделить еще один вариант – тотальное поражение ворот печени с разобщением сегментарных желчных протоков. В этом случае проведение лечебных мероприятий, направленных на устранение желчной гипертензии, считали бесперспективным и сопряженным с риском возникновения летального исхода, поскольку в случае обструкции более трех сегментарных протоков и общего печеночного протока наладить адекватное желчеотведение не представляется возможным. Таким образом, такого рода распространение опухолевого процесса является противопоказанием к желчеотведению. Также некорректируемое нарушение свертывающей системы крови являлось отягчающим синдромом, не позволяющим выполнить даже минимально инвазивное пособие.

Прицельная пункция и дренирование желчных протоков под УЗ-контролем снижает риск осложнений, значительно уменьшает лучевую нагрузку на пациента и медперсонал, а также сокращает время вмешательства [25]. Холангиографию выполняли только после декомпрессии и санации желчных протоков. При чрескожном чреспеченочном дренировании желчных протоков под УЗ-контролем предпочтительным является доступ через правую долю, что обусловлено анатомо-топографическими особенностями расположения желчных протоков по отношению к портальной системе. Оптимальным вариантом для дальнейшего дренирования являлась пункция желчного протока, впадающего под наименьшим углом к общему печеночному протоку или долевого протоку. Дренаж устанавливался так, чтобы вся его часть, несущая отверстия, находилась в протоке, что исключало возможность кровотечения и желчеистечения. Во всех случаях механической желтухи стремились выполнить наружно-внутреннее дренирование. Однако, если по разным причинам при плотном блоке не удавалось выполнить чрескожное наружно-внутреннее дренирование желчных протоков, выполняли чрескожную наружную холангиостомию. Учитывая тяжесть состояния

больных, длительный период желтухи и холангит, декомпрессию желчных путей выполняли в первые двое суток после поступления больного. При наружной холангиостомии желчеотводные проводили с учетом возможного развития симптома «быстрой декомпрессии» [93]. В этом случае удлиняли трубку от дренажа до резервуара для желчи и/или помещали резервуар (мешок – желчеприемник) на уровне фиксации дренажа на брюшной стенке.

В рамках исследования основной группы в клинике было выполнено 38 чрескожных наружно-внутренних дренирований желчных путей и 12 чрескожных наружных холангиостомии. Всем больным выполнена операция чрескожного билиарного эндопротезирования как окончательный вариант желчеотведения. В группе сравнения было проведено 41 чрескожное наружно-внутреннее дренирование желчных путей. 9 пациентам проведена чрескожная наружная холангиостомия, после чего пациенты выписаны. При динамическом наблюдении, после стабилизации состояния, вследствие уменьшения отека и плотности стриктуры, отмечена реканализация, что при повторной госпитализации позволило провести наружно-внутреннее желчеотведение. Также окончательным вариантом желчеотведения было чрескожное билиарное эндопротезирование. 10 больных этой группы были заменены по ходу исследования, так как окончательным вариантом лечения была наружная холангиостомия вследствие невозможности проведения наружно-внутреннего желчеотведения.

В отличие от контрольной группы, в основной всем пациентам с первоначальным наружным желчеотведением успешно проведена фототераностика для реканализации стриктуры, которая включала внутрипротоковую ФД и ФДТ.

Внутрипротоковая ФД проводилась в два подхода с использованием лазерной спектроскопии (ЛС) (ЛЭСА-01-БИОСПЕК, БИОСПЕК, Москва, Россия) и видеофлуоресценного модуля (УФФ-630/675-0 – БИОСПЕК, Москва, Россия).

С помощью ЛС оценивалась концентрация ФС в исследуемом участке желчного протока, а при помощи видеофлуоресцентной диагностики регистрировали флуоресцентное изображение опухоли с оценкой индекса

флуоресценции. ЛС применяется для определения концентрации ФС при злокачественном поражении различных органов [34, 231]. Методика флуоресцентной ЛС при опухолевом поражении ЖКТ позволяет повысить эффективность стандартного эндоскопического исследования. Этот метод оказался настолько информативным, что получил название «оптической биопсии» [324].

Использование для эндоскопии и минимально инвазивной хирургии видеофлуоресцентного модуля, дающего возможность одновременного определения очагов накопления ФС, получения флуоресцентного изображения и оценки его фотобличинга после ФДТ, было впервые применено в Российской Федерации в нашей клинике [45].

Первоначальные результаты с применением методики видеофлуоресцентной диагностики опухолевого стеноза желчных протоков оказались обнадеживающими [30, 45, 46, 47], в связи с чем мы провели корреляцию между двумя методами внутрипротоковой ФД до и после ФДТ. У 14 пациентов основной группы параллельно проведены ЛС и видеофлуоресцентная диагностика. Были получены изображения участков желчных протоков до и после ФДТ в цветном, флуоресцентном и дополненном режимах при помощи видеофлуоресцентной системы для эндоскопии УФФ-630/675-01 и гибких эндоскопов диаметром 1.2 и 2.8 мм. В качестве ФС были использованы производные хлорина Е6 (радахлорин, фотолон, фоторан), разрешенные для клинического применения в России и являющиеся регламентированными. Применение препаратов этой группы позволяет реализовать сразу оба процесса: ФД и ФДТ.

В рамках работы оценена безопасность использования ФС по характеру и частоте побочных эффектов, местных реакций и аллергических проявлений. Все препараты продемонстрировали хорошую переносимость. Были оценены временные параметры, которые необходимо соблюдать для максимального накопления ФС в области стриктуры желчных протоков.

Данные исследования всех 14 пациентов проанализированы при помощи статистических методов. Были получены значения медианы, нижнего и верхнего квартилей. Параметры сняты через один и два часа после введения ФС до и после ФДТ для оценки концентрации и фотобличинга ФС до лечения и после ФДТ.

Проведено сравнение интенсивностей флуоресценции в опухоли через один и два часа после введения ФС и опухоли до введения ФС.

Полученный результат сравнения уровня флуоресценции опухоли через два часа после введения ФС с уровнем флуоресценции в опухоли через один час после введения ФС свидетельствует об увеличении накопления ФС в ткани опухоли со значения 0,2 [0,19; 0,29] до 7,83 [7,72; 8,57] ( $p=0,001$ ). Полученные нами результаты сравнения уровней флуоресценции опухолевой ткани до введения ФС и два часа после внутривенного введения ФС свидетельствуют об увеличении накопления ФС со временем, а также о необходимости экспозиции в течение 120 минут после введения ФС пациенту с ХЦР.

ФС вводили внутривенно в концентрации 1 мг/кг. Преимуществом данных ФС является время достижения максимума накопления в два часа, а также быстрый период выведения из организма (48 часов), благодаря чему срок соблюдения светового режима для пациента становится небольшим. Контактную ФД проводили при помощи спектроскопического устройства ЛЭСА-01-«БИОСПЕК» и Y-образного оптического волокна с боковым облучателем, через установленный в желчный проток интродьюсер 9 F с диаметром 3 мм. Длина волны лазерного возбуждения составляла 660 нм для регистрации флуоресценции Себ в патологической ткани. При работе с ХЦР впервые был использован терапевтический лазер с длиной волны 660 нм для проведения тераностики. В дальнейшем использование установки данного типа позволило регистрировать фотобличинг ФС в опухоли в режиме реального времени. Мониторинг процессов, происходящих в области патологии, с использованием данных устройств проводится при помощи диагностического волоконно-оптического зонда с боковым облучателем.

Параллельно работе со спектрометром, с помощью двухканальной видеосистемы для проведения ФД (УФФ-630/675-01) и гибкого оптического эндоскопа были получены изображения участков желчных протоков до и после ФДТ в цветном и флуоресцентном режимах, а также в режиме наложения. Режим комбинированного наложения основан на совмещении цветного изображения с флуоресцентным изображением (наложено поверх цветного) с окраской участков флуоресценции в зеленый псевдоцвет. Изображения и индексы флуоресценции были зарегистрированы в максимуме накопления ФС в области злокачественного новообразования. Двухканальная видеосистема для ФД состоит из источника белого света, лазерного источника света с длиной волны 635 нм для возбуждения ФС на основе Себ и системы оптических фильтров. Также видеосистема включает в себя блок регистрации, содержащий две камеры для регистрации цветного и черно-белого (флуоресцентного) изображений. Y-образный волоконно-оптический световод использовался для доставки излучения от двух источников излучения к гибкому эндоскопу. Гибкий эндоскоп использовался для доставки излучения к исследуемому объекту и регистрации рассеянного отраженного света. Оптическое разрешение эндоскопа составляет 0,5 мм. Камеры и источники излучения управляются с помощью специального программного обеспечения. При помощи данной системы были получены флуоресцентные изображения исследуемой зоны интереса. Во время диагностики в режиме наложения на экране монитора присутствует интерактивная мишень, при наведении которой на различные участки исследуемой области рассчитывается и отображается индекс флуоресценции, что позволяет с большей точностью определить патологические участки. При проведении видеофлуоресцентной диагностики плотность мощности лазерного излучения составляла  $5 \text{ мВт/см}^2$ , энергетическая доза не превышала  $1 \text{ Дж/см}^2$ , что исключало фотодинамический эффект.

В процессе исследования для возможности проведения всех внутрипротоковых лечебно-диагностических манипуляций в желчные протоки устанавливали интродьюсер с клапаном check-flo диаметром 8–9 F, что являлось

принципиальным моментом, давая возможность одновременного нахождения в протоках нескольких инструментов.

Кроме того, рентгеноконтрастная метка на дистальном конце интродьюсера позволяла успешно ориентироваться в желчных протоках при холангиоскопии, а двухканальное строение – промывать зону интереса от поступающих желчи и крови, которые дают ложный флуоресцентный сигнал.

Нормирование получаемого флуоресцентного сигнала на неповрежденную часть желчных протоков также является принципиальным моментом. На основе полученных данных по исследованию различных сегментов гепатобилиарной системы кабана предложена методика проведения спектрально-флуоресцентной оценки степени накопления ФС в гепатобилиарной системе в режиме «мягкого контакта». Кроме этого, при необходимости нормировки спектрального сигнала флуоресценции на РНЛИ, следует строго придерживаться нормировки на сигнал РНЛИ от того же сегмента гепатобилиарной системы, от которого и происходит измерение флуоресцентного сигнала.

Представим результат статистического анализа двух методов исследования у группы из 14 пациентов. До ФДТ для видеофлуоресцентной системы и лазерно-спектроскопической установки коэффициент Пирсона (Pearson's  $r$ ) составил  $\sim 0,96$ . После ФДТ  $\sim 0,88$ . Кроме того, определен парный  $t$ -критерий Стьюдента при лазерной спектроскопии до ФДТ и после ФДТ, такая же оценка проведена для видеофлуоресцентного исследования. Полученное эмпирическое значение  $t = 13,3$  больше критического ( $t_{0,01} = 3,01$ ,  $t_{0,05} = 2,16$ ), поэтому можно сделать вывод о наличии статистически значимых различий между интенсивностью флуоресценции «до ФДТ на ЛЭСА-01-БИОСПЕК» и «после ФДТ на ЛЭСА-01-БИОСПЕК». Полученное эмпирическое значение  $t = 8,6$  больше критического ( $t_{0,01} = 3,01$ ,  $t_{0,05} = 2,16$ ), поэтому можно сделать вывод о наличии статистически значимых различий между интенсивностью флуоресценции «до ФДТ на видеофлуоресцентной системе УФФ-630 / 675-01-БИОСПЕК» и «после ФДТ на видеофлуоресцентной системе УФФ-630 / 675-01-БИОСПЕК». Таким образом



отмечена прямая корреляция между спектроскопическим и видеофлуоресцентным методами диагностики ( $p < 0,05$ ).

У всех этих больных диагноз ХЦР подтвержден морфологически. Для морфологической оценки патоморфоза у шестерых пациентов удалось взять биопсию после проведенного лечения, получен лечебный патоморфоз от второй до четвертой степени (по Е.Ф. Лушникову). Всем пациентам не проводили контрольную биопсию, поскольку из-за сложной локализации опухоли была возможность развития кровотечения на фоне воспалительных изменений после ФДТ, соответственно, забор биопсии представлял собой неоправданный риск, тем более что у шести (43%) больных из 14 получили подтверждение лечебного патоморфоза в опухолевом стенозе после ФДТ. Кроме того, исследование на конфокальном лазерном микроскопе позволило оценить накопление ФС до ФДТ и после, а также получить микроскопическую флуоресцентную картину уменьшения концентрации ФС после терапии на 70%, что подтверждает возникновение фотообесцвечивания тканей (фотобличинга) у данных больных.

Выявление прямой корреляции между данными о концентрации флуорофора, определяемой двумя разными способами, доказывает возможность применения для данной локализации обоих методов диагностики, однако для повышения точности диагностики в труднодоступной локализации наиболее перспективен метод видеофлуоресцентного анализа. Видеофлуоресцентная диагностика позволяет значительно уменьшить время проведения диагностики, а также получать флуоресцентное изображение опухоли с оценкой индекса флуоресценции и визуальным контролем за ФДТ.

Все вышеизложенное дает основания рекомендовать внутривидеофлуоресцентную диагностику для более широкого применения у больных стенозирующим ХЦР, осложненным механической желтухой, для визуальной оценки накопления ФС до проведения ФДТ и исследования фотобличинга с целью контроля эффективности лечения (патент (19)RU(11)2 767264(13)С1 Способ проведения внутривидеофлуоресцентной фототераностики холангиоцеллюлярного рака).

При проведении диагностики модулем для эндоскопии и минимально инвазивной хирургии в основной исследуемой группе (50 пациентов) в 94% случаев получены видеофлуоресцентные изображения опухоли и зарегистрирован индекс флуоресценции, свидетельствующий о более интенсивном накоплении ФС в области стриктуры, чем в нормальных тканях желчных протоков. У 3 пациентов (6%) не были получены высококонтрастные флуоресцентные изображения, однако были зарегистрированы повышенные индексы флуоресценции, превышающие в три раза значения для нормы. Также следует отметить, что при морфологическом исследовании материала, взятого при щипцовой и браш-биопсии у этих больных, был подтвержден диагноз ХЦР. Таким образом, установлено, что повышение индекса флуоресценции в два и более раз относительно нормы свидетельствует о высокой вероятности новообразования даже без получения контрастного видеофлуоресцентного изображения опухоли. Чувствительность используемого метода и оборудования составляет практически 100%. Определение специфичности методики внутрипротоковой ФД не представляется возможным, так как оценить ложноотрицательные результаты нельзя ввиду отсутствия практической возможности проведения этой процедуры у здоровых пациентов или пациентов без механической желтухи. У всех пациентов основной группы индекс флуоресценции составил 20 и выше отн. ед. (среднее значение составило  $31 \pm 11$  отн. ед.) при нормировке оборудования на интенсивность флуоресценции нормальных тканей (10 отн. ед.).

Морфологическое подтверждение диагноза в основной группе осуществлено у 42 пациентов (84%). В восьми случаях технически не удалось получить достаточный материал для морфологического исследования, поскольку локализация опухолевой стриктуры в области конfluence, угол впадения сегментарных протоков по отношению к долевым и плотность стриктуры ограничивали возможности манипулировать инструментами в просвете протоков. О сложностях морфологической верификации ХЦР сообщали и другие авторы [52, 72, 113, 347]. В случаях, когда технически не удастся сделать биопсию, ФД может быть единственным возможным методом диагностики злокачественного

поражения. ФД в сочетании с клиническими данными позволяет оценить характер поражения желчных протоков, а также определить точную локализацию поражения для дальнейшего проведения ФДТ.

Следующим этапом работы было проведение ФДТ. ФДТ проводили непосредственно после видеофлуоресцентной диагностики. Выбор параметров проведения ФДТ основывался на полученных данных в ходе экспериментов *in vitro* и *in vivo*. В ходе исследования по определению оптических свойств тканей желчных протоков и печени (глава 3) установлено, что глубина зондирования (распространения излучения по окружающим тканям) лазерного излучения с длиной волны 660 нм в желчных протоках различна: при расположении оптического диффузора в просвете желчного протока вне холангиостомы глубина распространения лазерного излучения повышается на 2 мм, что является существенным параметром для достижения лучшего терапевтического эффекта. В случае проведения ФДТ через дренаж, установленный в желчных протоках, холангиостома выполняет роль защитного каркаса для диффузора, исключающего излом и пригорание излучательной части диффузора к стенкам протока, что является существенным преимуществом. Недостатком данного способа является поглощение энергетической дозы дренажем, в связи с чем снижается эффективность. Увеличение энергетической дозы возможно за счет повышения плотности мощности излучения или времени облучения. Однако это может значительно увеличить время операции и повысить риск пригорания излучающей части оптического диффузора к стенкам самого дренажа.

Для снижения рисков повреждения оптического волокна или стенок желчного протока без снижения эффективности ФДТ было использовано два вида оптических диффузоров: баллонный катетер со световодом и оптическое волокно с цилиндрическим диффузором с рассеивающей средой на основе диоксида титана. Использовали оптический диффузор с цилиндрическим облучателем на дистальном конце 2 см в виду его большей мобильности в сравнении с более длинным диффузором и возможности проведения полипозиционной ФДТ опухолевого стеноза любой протяженности.

Всем больным ФДТ проводили через интродьюсер с клапаном чек-фло в качестве «входных ворот» для инструментов, применяемых для фототераностики. Диаметр интродьюсера 9F позволял одновременно проводить в желчные протоки гибкий эндоскоп диаметром 1.2 мм, страховочный проводник и оптический диффузор для ФДТ. Таким образом, оптический диффузор устанавливали в область стеноза под визуальным контролем.

У 12 пациентов с наружной холангиостомой для первого этапа реканализации проводили ФДТ при помощи оптического диффузора с торцевым облучателем на дистальном конце, который фиксировали тотчас же над стенозом. Для ФДТ на всем протяжении стриктуры использовали оптическое волокно с цилиндрическим облучателем на дистальном конце. Изначально, мы проводили ФДТ (11 пациентов), устанавливая облучатель через страховочный дренаж диаметром 6F (2 мм). Однако столкнулись с трудностями, обусловленными пригоранием кончика диффузора при контакте с желчью и стенками протока. Это требовало замены волокна, а также вызывало риск повреждения протоков. У 28 пациентов для ФДТ использовался цилиндрический диффузор с рассеивающей средой на основе диоксида титана, позволяющий многократно проводить ФДТ, не теряющий оптические свойства после стерилизации и не пригорающий к тканям за счет поступающей желчи и крови.

11 пациентам ФДТ выполнено через баллонный катетер, разработанный совместно с ООО «БИОСПЕК». Один его просвет – основной, для проведения манипуляций, второй – для дилатации баллона на дистальном конце катетера. В основной канал устанавливался гибкий оптоволоконный световод, при этом цилиндрический облучатель располагали в баллонной части катетера. Расширяли баллон путем введения через второй канал катетера разведенного 1% раствора липофундина (Lipofundin MCT/LCT® 10% разведенный в физиологическом растворе). Длина баллонной части катетера составляла от 1 до 4 см.

Баллонные катетеры позволяли проводить ФДТ на всем протяжении стриктуры, однако в 30% случаях мы столкнулись с тем, что их силиконовая структура не выдержала давления в раздуваемой части из-за плотности

стриктуры, в связи с чем целостность его нарушалась. В свою очередь, использование оптического диффузора с рассеивающей средой на основе диоксида титана позволило решить многие технические проблемы, так как это оптическое волокно не пригорает к тканям, оно стойкое к излому, достаточно гибкое и имеет диаметр всего 2 мм.

Все вышеизложенное позволяет рекомендовать применение оптического диффузора с цилиндрическим излучателем на дистальном конце, имеющим защитное титановое покрытие, для доставки необходимой лечебной световой энергии в области опухолевого стеноза, без рисков как нарушения целостности диффузора, так и повреждения окружающих тканей.

Нами проанализировано влияние суммарной энергетической дозы облучения на фотобличинг ФС в основной группе больных. Для ФДТ использовался терапевтический лазер мощностью 1.5 Вт с длиной волны 660 нм, которая соответствует пику поглощения ФС в красном диапазоне длин волн. Суммарная энергетическая доза подбиралась в зависимости от степени фотобличинга (выгорания фотосенсибилизатора). ФДТ проводилась с суммарной энергетической дозой  $100 \text{ Дж/см}^2$  на протяжении всего стеноза, после чего с помощью ФД оценивалось уменьшение индекса флуоресценции. У всех пациентов основной группы при указанной световой дозе не был достигнут порог фотобличинга в 50%. При суммарной световой дозе в  $150 \text{ Дж/см}^2$  фотобличинг более 70–90 % отмечен у 48 больных, у двух пациентов суммарная энергетическая доза, для получения соответствующего параметра фотобличинга составила  $200 \text{ Дж/см}^2$  и –  $250 \text{ Дж/см}^2$ . Временная экспозиция, необходимая для достижения энергетической дозы в  $150 \text{ Дж/см}^2$ , в зоне облучения 2 см составляла  $6 \pm 1$  минут. Необходимо отметить, что у всех 50 больных протяженность опухолевого стеноза требовала проведения полипозиционной ФДТ, условно разбивая стриктуру на сегменты по 2 см. При этом диффузор всегда устанавливался так, что он частично перекрывал предыдущую зону облучения, а также проксимальный и дистальный от стриктуры участок неизмененного желчного протока с целью антибластики.

Таким образом, у 12 (24%) больных с поражением желчных протоков ниже конfluence проводилось облучение в трех зонах. У 19 (38%) с поражением конfluence и одного из долевого протоков ФДТ выполнялась, исходя из четырех областей облучения. 19 (38%) пациентам с билобарным поражением потребовалось проведение ФДТ пяти участков стеноза. После установки стента аналогичным образом полипозиционная ФДТ проводилась для каждого больного. Показатели фотобличинга у 50 больных оценивались в процентах. После проведенной ФДТ средний показатель фотобличинга составил  $84 \pm 11\%$ .

После внутривнутрипротоковой ФДТ проводилась профилактика возможного холангита: проводили санацию желчных протоков через страховочный дренаж, НПВС, а при первых проявлениях холангита (озноб, гипертермия) назначались антибактериальные препараты группы цефалоспоринов (12 пациентов). Явления холангита удавалось купировать в первые сутки после ФДТ. Через сутки после проведенной ФДТ оценивалось положение страховочного дренажа и отсутствие осложнений (сброс контрастного препарата в свободную брюшную полость). На 3–5 день после ФДТ при фистулографии у всех больных основной группы получена реканализация опухолевого стеноза (100%).

Для клинической оценки реканализации опухолевого стеноза желчных протоков после проведенной фотодинамической терапии мы применили следующую классификацию:

- 1 тип – восстановление свободного пассажа контрастного препарата дистальнее стеноза или увеличение просвета от 25 до 50% просвета протока – 12 (24%) пациентов;
- 2 тип – пассаж контрастного препарата при динамической гидродилатации или восстановление менее 25% просвета протока – 28 (56%) случаев;
- 3 тип – отсутствие пассажа контрастного препарата через стеноз, но реканализация стриктуры за счет возможности проведения инструментов в дистальную неизмененную часть протоков – 10 (20%) больных;
- 4 тип – отсутствие реканализации – не было.

Следует отметить, что 14 больным, которым первым этапом проведена ФДТ через наружную холангиостому, удалось реканализировать стеноз и выполнить терапию на всем протяжении стриктуры и установить наружно-внутренний дренаж. У этих 12 пациентов получены следующие типы реканализации: 1 тип – два (17%) случая, 2 тип – шесть (50%) пациентов, 3 тип – четыре (33%) больных.

10 пациентам, которые находились на лечении в нашей клинике, устанавливали от двух до трех наружных холангиостом вследствие распространения опухолевого стеноза на сегментарные протоки. Они имели отдаленные метастазы, индекс Карновски составлял 40–50%. Этим больным также проводили внутрипротоковую ФДТ, однако не удалось получить реканализацию всех протоков из-за распространенности опухоли и невозможности проведения терапии на всем протяжении. Они были исключены из исследования, выписаны для проведения минимально поддерживающей терапии под наблюдением онколога по месту жительства. Несмотря на четвертую стадию заболевания, после проведенного лечения продолжительность жизни у шести составила более шести месяцев, без прогрессирования желтухи. Данных о катамнезе четырех больных нет. Основным предиктором, влияющим на положительный результат внутрипротоковой ФДТ желчных протоков, является стадия заболевания и протяженность опухолевого стеноза. Мы считаем, что распространение опухолевой стриктуры на два и более сегментарных протока одной доли печени или три сегментарных протока при билобарном поражении значительно ухудшает прогноз и результат желчеотводящих операций.

Таким образом, удалось клинически доказать эффективность фотодинамической терапии при злокачественном поражении желчных протоков, позволяющей добиться реканализации опухоли.

В качестве окончательного метода желчеотведения всем больным выполнено эндопротезирование. Саморасширяющийся нитиноловый стент фиксировали в область стриктуры так, чтобы его края отступали от границ стриктуры проксимально и дистально минимум на 1 см. Стенты устанавливали в зависимости от локализации и протяженности стриктуры. Большинству больных

(n = 38) установлен непокрытый саморасширяющийся нитиноловый стент. Из них 20 установлено два стента Y-образно с формированием конfluence долевых протоков. При этом в 17 случаях один из стентов проходил через ячейку другого. У троих два стента из долевых протоков правой и левой доли печени располагали параллельно в общем печеночном и общем желчных протоках. У этих больных опухолевая стриктура локализовалась в области конfluence и долевых протоках. Однако установка покрытого стента в этом случае вызывала риск блокирования стентом сегментарных протоков и возникновения желчной гипертензии в них. В свою очередь, известно, что непокрытый стент может обтурироваться опухолью, в результате чего возникает рецидив желтухи. Однако увеличить время функционирования непокрытых стентов позволяет ФДТ за счет локального противоопухолевого лечения, о чем свидетельствуют полученные нами результаты по сравнению с контрольной группой.

Все пациенты после стентирования желчных протоков выписывались с рекомендацией проведения системного лечения под наблюдением химиотерапевта онкологического диспансера.

Медиана безжелтушного периода в основной группе составила 15,0 мес (95% ДИ: 13,7–16,2), а в группе сравнения – 6,0 мес (95% ДИ: 5,2–6,8). При сравнении кривых выживаемости с помощью лог-ранг критерия Мантеля-Кокса, выявлено статистически значимое отличие ( $p < 0,001$ ).

В основной группе средний срок безжелтушного периода составил  $16,3 \pm 1,1$  мес., а в группе сравнения –  $5,6 \pm 0,3$ . При исследовании показателей безжелтушного периода с помощью t-критерия Стьюдента в модификации Уэлча выявлены статистически значимые отличия ( $p < 0,001$ ).

У 12 больных с локализацией опухолевой стриктуры ниже конfluence установлены покрытые нитиноловые саморасширяющиеся стенты. При этом необходимо учитывать, что проксимальный край стента должен располагаться минимум на 1 см выше стеноза и не должен перекрывать конfluence долевых протоков. Однако нельзя не сказать, что при расположении покрытого стента в общем печеночном и общем желчном протоке возрастает риск обтурации устья



пузырного протока и развития клинической картины острого холецистита. У шести пациентов в анамнезе уже выполнена холецистэктомия, у двух больных покрытый стент блокировал устье пузырного протока, что потребовало в последующем проведение чрескожной пункции и санации желчного пузыря, антибактериальной терапии. Воспалительные явления купированы без холецистостомии.

Известно, что опухолевый стеноз неоднородный в своем строении, поэтому, устанавливая стент, мы делали область стеноза более равномерной. После стентирования, всем пациентам основной группы через страховочный дренаж проводили ФДТ на всем протяжении стентов, а также на 1 см дистальнее и проксимальнее. ФДТ выполняли аналогичным образом, полипозиционно, используя те же параметры у каждого пациента, что и на первом этапе эндопротоковой фотодинамической тераностики.

При проведении ФДТ через покрытые стенты расположение оптического диффузора с цилиндрическим облучателем параллельно положению стента не вызывает повреждения прозрачной оболочки стента (при использовании графт-стента).

Благодаря соблюдению светового режима (ограничение прямого солнечного и комнатного света) фототоксических реакций не отмечено.

Реканализация стриктуры также является объективным ответом внутрипротоковой ФДТ за счет некроза опухоли, уменьшения плотности стриктуры [13]. Еще в 70-х годах XX века Д.Л. Пиковский и Э.И. Гальперин в своих работах указали, что достаточно 1–1.5 мм для восстановления проходимости общего желчного протока [7, 33]. Многие авторы в своих исследованиях оценивали длительность периода реканализации опухолевой стриктуры, темпы снижения уровня билирубина, продолжительность жизни и показатели индекса Кановски больных нерезектабельным ХЦР в качестве основных критериев оценки внутрипротоковой ФДТ [204, 212, 224, 253, 344].

Большинство пациентов с нерезектабельным холангиоцеллюлярным раком, осложненным механической желтухой, погибают в первый год после выявления

заболевания; даже при своевременно начатом лечении продолжительность жизни может достигать всего нескольких месяцев, вероятность чего возрастает при распространенном опухолевом процессе [138, 169, 223, 284, 381].

С целью подтверждения правомочности избранной нами диагностической и лечебной тактики был проведен анализ выживаемости больных обеих групп.

Медианы выживаемости в сравниваемых группах, оцененные с помощью лог-ранк критерия Мантеля-Кокса, статистически значимо отличаются ( $p < 0,001$ ).

Наибольшая продолжительность жизни в основной группе составила 36 и 42 месяца у больных ХЦР первой стадии и с локализацией опухолевого стеноза по классификации Bismuth-Corlette I и II типа. В контрольной группе наибольшая продолжительность жизни составила 19 месяцев у больной ХЦР также первой стадии и с локализацией опухолевого стеноза по классификации Bismuth-Corlette II типа.

Такая разница между результатами лечения в основной и контрольной группах обусловлена проведенным локальным противоопухолевым лечением. Помимо лечебного патоморфоза опухоли, после ФДТ вероятнее всего возникает и системная реакция иммунитета, направленная на неопластический процесс. О возможности активации противоопухолевых системных иммунных реакций при локальном воздействии ФДТ сообщали разные исследователи [13, 255, 290], но детальное изучение этого вопроса требует проведения отдельного клинического исследования и не входило в задачи нашей работы.

Представленные результаты проведенного исследования свидетельствуют о целесообразности избранной диагностической и лечебной тактики ведения больных нерезектабельным стенозирующим холангиоцеллюлярным раком, осложненным механической желтухой, или у неоперабельных пациентов. Наш опыт подтверждает, что при невозможности радикального лечения наиболее предпочтительной из минимально инвазивных операций является эндопротезирование желчевыводящих протоков. Установленный стент позволяет избавить больного от дренажа и рутинного ежедневного ухода за ним, что, несомненно, повышает качество жизни. В настоящее время имеет значение не

только, сколько прожил онкологический больной, но и как, поэтому обеспечить оптимальное качество жизни пациента является также приоритетной задачей при определении лечебной тактики.

С этой целью оценены качество жизни больных до и после лечения по индексам Карновски и шкале ECOG.

При помощи критерия Колмагорова-Смирнова было установлено ненормальное распределение данных, поэтому для сравнения связанных выборок, был использован критерий Уилкоксона. Установлено статистически значимое улучшение индекса Карновски и шкалы ECOG в результате проведенного лечения как в основной, так и в контрольной группе пациентов. Однако в основной группе улучшение индекса Карновски и ECOG было у 66% и 64% соответственно, а в группе сравнения у 26% и 18% соответственно. После лечения в основной и группе сравнения показатели повысились, что связано с регрессией желтухи, коррекцией гомеостаза и улучшением общего самочувствия пациентов. Однако в основной группе эти показатели оказались лучше: индекс Карновского – 69,8 (66,6–73,0) против 59,4 (56,9–61,9); ECOG – 1,9 (1,8–2,1) баллов против 2,4 (2,3–2,6). Полученные результаты достоверные ( $p < 0,05$ ).

Представленные нами данные свидетельствуют о лучших результатах при комбинированном методе лечения, включающем чрескожное стентирование желчных протоков и эндопротоковую фототераностику перед одним стентированием. Это объясняется тем, что фотодинамическая терапия позволяет провести локальное противовопухоловое лечение и профилактику рецидива, кроме того, нельзя исключить и системное действие ФДТ за счет активации иммунного ответа, что в конечном итоге увеличивает продолжительность жизни у этой тяжелой категории больных.

Мы сравнили наши данные с результатами, полученными в других работах. По результатам Т.У. Lee и соавторов (2012), при использовании ФДТ в комбинации с декомпрессией желчных протоков в сравнении с пациентами без фотодинамической терапии медиана выживания составила  $356 \pm 213$  дней ( $n=18$ ), против  $230 \pm 73$  дней ( $n=15$ ). Проходимость стента у больных после ФДТ в

сравнении с пациентами только со стентом составила  $244 \pm 66$  дней против  $177 \pm 45$  дней [212].

По результатам работы S.P. Pereira и соавторов (2012), средняя медиана выживаемости у пациентов с ФДТ холангиокарциномы – 12 (1–84) месяцев. ФДТ в одном протоке проведена 50% больным, остальным билатерально с последующей установкой стента [288].

В 2017 году Harsha Moole с соавторами опубликовали мета-анализ, в который вошли 10 исследований ( $n=402$ ), при сравнении результатов период выживаемости в группах стент+ФДТ и стент составил 413,04 дней (95% ДИ: 349,54–476,54) и 183,41 (95% ДИ: 136,81–230,02) соответственно. Изменение показателей индекса Карновски после вмешательства в тех же группах составило +6,99 (95% ДИ: 4,15–9,82) и -3,93 (95% ДИ: -8,63–0,77) соответственно [253].

L. Zongyan и соавторы (2021) отметили, что медиана выживаемости была значительно больше в группе ФДТ + стентирование желчных протоков, чем в группе только со стентированием (14,2 против 9,8 месяцев,  $P = 0,003$ ) [224].

В нашей стране Б.И. Долгушин и соавторы (2016) сообщают, что при проведении периодических сеансов внутрипротоковой ФДТ через установленную чрескожную чреспеченочную холангиостому медиана выживаемости составила 16 месяцев (2–47 месяцев) от первого сеанса внутрипротоковой ФДТ [13].

Таким образом, наши результаты демонстрируют медиану выживания пациентов обеих групп, сопоставимую с мировыми. При этом в основной группе отмечается увеличение показателей продолжительности и качества жизни за счет проведения фототераностики и стентирования желчных протоков.

Метод фотодинамической тераностики получил новые возможности с внедрением в клиническую практику высокоточного видеофлуоресцентного модуля УФФ-630/675-01 (ООО БИОСПЕК, Москва, Россия), совместимого со стандартными эндоскопами, позволяющего регистрировать интенсивную флуоресценцию злокачественной опухоли относительно окружающих тканей, а также определить количество фотосенсибилизатора по индексу флуоресценции.

Нами продемонстрирована высокая диагностическая эффективность метода для подтверждения злокачественного поражения желчных протоков. При проведении эндовидеофлуоресцентного исследования желчных протоков было получено отчетливое флуоресцентное изображение опухоли у 47 (94%) из 50 исследованных больных. При помощи диагностического индикатора (метки) зарегистрирован индекс флуоресценции, в два и более (среднее  $31 \pm 11$  отн ед) раз превышающий нормальное значение у всех 50 больных, что вероятнее всего свидетельствует о малигнизации.

Следует сказать, что методика лазерной спектроскопии также является высокоточным методом диагностики злокачественного поражения [10, 34, 43, 231]. 14 пациентам основной группы проведено внутрипротоковое диагностическое исследование при помощи видеофлуоресцентного модуля и лазерной спектроскопии (ЛЭСА-01-БИОСПЕК) с применением источника лазерного излучения с длиной волны 660 нм. Получена прямая корреляция этих методов для диагностики злокачественного поражения желчных протоков ( $p < 0.05$ ) и подтверждена морфологическим исследованием биоптатов. Использование источника лазерного излучения с длиной волны 660 нм для фотосенсибилизаторов хлоринового ряда с целью флуоресцентной диагностики и ФДТ значительно упрощает лечебно-диагностическую тактику и экономические затраты. Эти данные позволили нам заключить, что применение видеофлуоресцентного модуля УФФ при опухолевом стенозе желчных протоков является оптимальным, позволяет отказаться от применения дополнительного оборудования и уменьшает время операции.

У 42 (89%) пациентов в основной группе из 47, у которых получено видеофлуоресцентное изображение опухоли и высокий индекс флуоресценции, диагноз подтвержден морфологически. У пяти (11%) пациентов из 47 данные морфологического исследования неинформативны из-за малого количества материала и технических сложностей при внутрипротоковой биопсии. При опухолевом поражении желчных протоков нередко возникают технические сложности с биопсией, поэтому решение о хирургическом лечении принимается

без морфологического подтверждения и основывается на клинико-инструментальных данных [32, 84, 180, 367].

При видеофлуоресцентной диагностике у трех (6%) больных из 50 не получено достоверного видеофлуоресцентного изображения опухоли, однако определен индекс флуоресценции в области стеноза, в два-три раза превышающий значение нормальных тканей, а также при биопсии подтвержден ХЦР. Таким образом, отсутствие видеофлуоресцентного изображения опухоли может быть вызвано неоптимальными настройками модуля, требующими технического усовершенствования.

Следует отметить, что для лечения механической желтухи, обусловленной стенозирующим ХЦР, при имеющемся чрескожном чреспеченочном доступе в желчные протоки возможно выполнение внутрипротоковой фототераностики как с целью верификации злокачественного поражения, так и последующего локального лечения опухолевой стриктуры для антибластики.

Таким образом, полученные нами данные лечения больных с ХЦР, осложненным механической желтухой, с применением минимально инвазивных хирургических операций в сочетании с локальным лечением методами фототераностики, дают основание отметить их высокую эффективность, малое количество осложнений и лучшие результаты по сравнению с обычными желчеотводящими операциями.

Данные методики могут широко применяться в клиниках для эффективного снижения желтухи, диагностики злокачественного поражения и локального противоопухолевого лечения с увеличением качества жизни больного, продолжительности жизни и безжелтушного периода.

Подводя итог нашей работы, мы считаем возможным предложить следующий лечебно-диагностический алгоритм у больных с механической желтухой, обусловленной опухолевым поражением желчных протоков, который позволит оптимизировать диагностику и лечение, в том числе с использованием инновационных технологий:

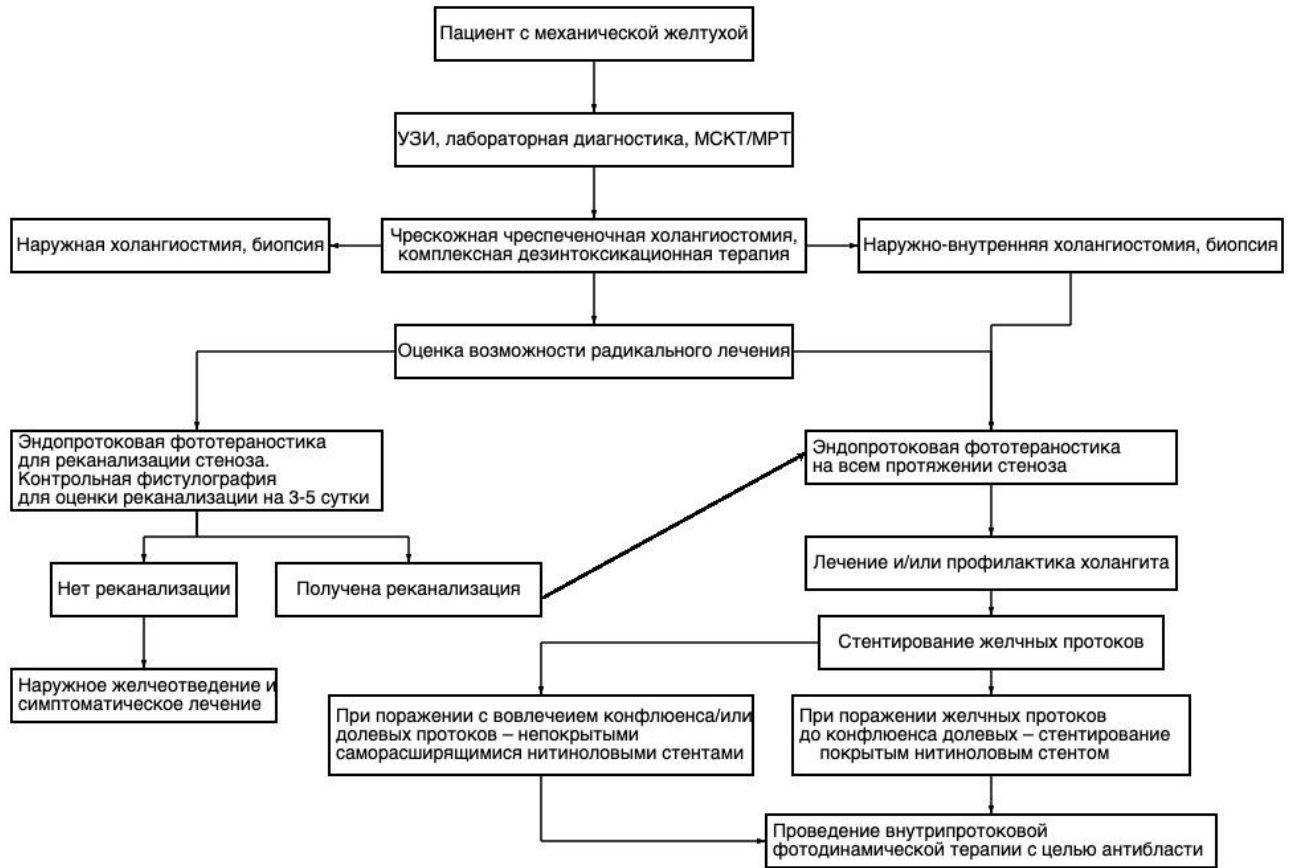


Рисунок 5.1 – Лечебно-диагностический алгоритм у больных с механической желтухой, обусловленной нерезектабельным опухолевым поражением желчных протоков

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе разработан комплексный подход к внутрипротоковому лечению нерезектабельного рака желчных протоков, осложненного механической желтухой, включающий в себя чрескожное желчеотведение под контролем УЗИ и рентгеноскопии, внутрипротоковую эндовидеофлуоресцентную диагностику и ФДТ.

Проведена предклиническая экспериментальная часть, в которой впервые оценены оптические свойства тканей гепатобилиарной зоны *in vitro* (лабораторные фантомы и модель) и *in vivo* (приматы вида *Papio Hamadryas*).

Представлен новый способ флуоресцентной диагностики злокачественного поражения желчных протоков с использованием видеофлуоресцентного модуля для эндоскопии и минимально инвазивной хирургии.

Усовершенствованы минимально инвазивные технологии в лечении нерезектабельного стенозирующего ХЦР, включающие стентирование желчных протоков с внутрипротоковой фототераностикой, проведен сравнительный анализ результатов лечения и качества жизни этой категории больных.

Таким образом, в настоящей работе сформировано и внедрено в клиническую практику новое направление в диагностике и лечении больных нерезектабельным раком желчных протоков, осложненным механической желтухой, основанное на применении современных медицинских и лазерных технологий с оптимальным их сочетанием.

Представим основные итоги выполненного исследования.

В экспериментальном исследовании определены оптические свойства фантомов биологической ткани, тканей печени, внутри- и внепеченочных желчных протоков на биологической модели *in vitro*, а также приматов вида Павиан Гамадрил *statim post mortem* и интраоперационно *in vivo*, с измерением распространения лазерного излучения в тканях на расстоянии, при котором наблюдалась возбуждаемая эндогенная флуоресценция тканей (глубина зондирования), что позволило определить исходные параметры облучения



различных тканей гепатобилиарной системы, а также установить порядок обработки спектральных и видеофлуоресцентных данных для избежания ошибок измерения с учетом особенностей оптических свойств тканей. Эти данные помогут оптимизировать алгоритмы локальной диагностики и лечения холангиоцеллюлярного рака человека и повысят качество диагностической информации, оптимизируют параметры лазерного излучения. Опираясь на динамику фотобличинга ФС:

- определено, что фотобличинг 60% достигается в созданном макете опухолевой ткани, при отсутствии кровотока (фантом), с концентрацией фотосенсибилизатора Хлорин Е6 1 мг/кг, при облучении источником лазерного излучения с длиной волны 660 нм и плотностью мощности  $700 \text{ мВт/см}^2$  при дозе облучения  $75 \text{ Дж/см}^2$  в течение 1,8 минут;

- в исследовании *in vitro* диагностирована возбуждаемая эндогенная флуоресценция тканей лазерного излучения ( $\lambda = 660 \text{ нм}$ ) во внепеченочном и внутripеченочном протоках лабораторной модели – гепатобиларного комплексе дикого кабана (лат. *Sus scrofa*) с расположением оптического диффузора внутри холангиостомы и без нее, которую необходимо учитывать при оценке концентрации фотосенсибилизатора;

- установлено, что глубина зондирования лазерного света при свободном расположении оптического диффузора на 2 мм превышает значения, полученные при исследовании через просвет дренажа, что дает возможность повысить глубину фототераностики.

- доказано в экспериментах на приматах рода Павиан Гамадрил (лат. *Pario hamadryas*), что у животных отсутствовали патологические изменения (на макро- и микроскопическом уровнях), обусловленные токсичностью, местно-раздражающим действием, иммунотоксичностью, иммуногенностью фотосенсибилизаторов, в исследуемых внутренних органах и тканях. Все исследуемые органы и ткани сохраняли типичную анатомическую и гистологическую структуру. В образцах были обнаружены минимальные

изменения после ФДТ при дозе 150–300 Дж/см<sup>2</sup>, но не приводящие к деструкции нормальной ткани.

Таким образом, продемонстрированы методологические особенности фототераностики при ее применении в гепатобилиарной зоне. Эти данные способствовали оптимизации алгоритмов локальной диагностики, таких как параметры лазерного излучения, опираясь в основном на динамику фотобличинга фотосенсибилизатора.

Результаты клинической апробации методики флуоресцентной диагностики (ФД) и фотодинамической терапии (ФДТ) с видеофлуоресцентным контролем на доступных локализациях эпителиальных опухолей (органы головы и шеи, шейка матки, кожные покровы) позволили оценить возможность получения видеофлуоресцентного изображения с учетом аутофлуоресценции, патологических очагов с определением концентрации ФС в них за счет измерения индекса флуоресценции как до ФДТ, так и после, с контролем фотобличинга, который является определяющим фактором, приводящим к регрессии опухоли.

Эти результаты позволили аппроксимировать методологию на более сложную локализацию, к которой относится ХЦР.

Разработанная и внедренная в клиническую практику методика внутрипротоковой лазерной спектроскопии при стенозирующем ХЦР с использованием источника излучения – терапевтического лазера с длиной волны 660 нм – позволила проводить на одном и том же оборудовании флуоресцентную диагностику и фотодинамическую терапию, что значительно упрощает методологию. Примененное впервые в клинической практике внутрипротоковое видеофлуоресцентное исследование с использованием отечественного модуля для эндоскопии и минимально инвазивной хирургии УФФ-630/675-0 – БИОСПЕК (Москва, Россия) позволило в 94% случаев получить видефлуоресцентное изображение опухоли и, соответственно, увеличение индекса флуоресценции фотосенсибилизатора в опухолевом стенозе желчных протоков, свидетельствующего о малигнизации. ХЦР подтвержден при морфологическом

исследовании биоптата у 84% основной группы (у всех, у кого технически удалось получить биопсийный материал).

Установлено, что оба метода оценки концентрации фотосенсибилизатора – лазерная спектроскопия и видеофлуоресцентная диагностика – имеют достоверную прямую корреляцию между собой. Однако при этом, несмотря на то, что методика лазерной спектроскопии является более точной, она менее удобная и более времязатратная. Получены результаты, свидетельствующие, что методика видеофлуоресцентной диагностики при стенозирующем ХЦР в 94% случаев позволила получить видеофлуоресцентное изображение опухоли, а в 100% – определить индекс флуоресценции в области стеноза, более чем в два раза выше по сравнению с неизменной тканью желчного протока.

В работе продемонстрировано, что предложенная методология фотодинамической терапии с интраоперационным видеофлуоресцентным контролем является эффективным и безопасным способом реканализации нерезектабельного стенозирующего ХЦР, позволившим у 100% пациентов основной группы получить реканализацию желчных протоков.

Получено достоверное увеличение медианы выживания больных в основной группе 15,0 (13,1–16,8) месяцев по сравнению с контрольной 7,0 (5,5–8,5) месяцев. Медианы выживаемости в сравниваемых группах, оцененные с помощью логранк критерия Мантеля-Кокса, статистически значимо отличаются ( $p < 0,001$ ). В основной группе средний срок безжелтушного периода составил  $16,3 \pm 1,1$  месяцев, а в группе сравнения –  $5,6 \pm 0,3$ . При исследовании показателей безжелтушного периода с помощью t-критерия Стьюдента в модификации Уэлча выявлены статистически значимые отличия ( $p < 0,001$ ). Исследованием подтверждено улучшение состояния качества жизни пациентов после проведенного лечения: установлено статистически значимое улучшение индекса Карновски и шкалы ECOG в результате проведенного лечения как в основной, так и в контрольной группе пациентов. Однако в основной группе эти показатели оказались лучше.

Таким образом, представленный метод минимально инвазивного лечения стенозирующего холангиоцеллюлярного рака, включающий в себя чрескожные варианты желчеотведения, стентирование билиарного стеноза с внутрипротоковой фототераностикой, является эффективным методом, позволяющим восстановить пассаж желчи, увеличивая время безжелтушного периода, давая тем самым «мост надежды» для проведения системного противоопухолевого лечения этой сложной группы больных. Методика внутрипротоковой видеофлуоресцентной диагностики до и после ФДТ позволяет персонализировать методику локальной диагностики и лечения стенозирующего ХЦР, тем самым улучшая результаты лечения, медиану выживания больных и качество их жизни.

## ВЫВОДЫ

1. По данным литературы, установлено, что у большинства больных холангиоцеллюлярным раком появление механической желтухи сопряжено с распространенностью опухолевого процесса, приводящего к отказу от радикального хирургического лечения в пользу минимально инвазивных желчеотводящих технологий, требующих локального противоопухолевого лечения после восстановления пассажа желчи. Перспективным методом, объединяющим диагностику и лечение этой группы больных, является фототераностика.

2. В экспериментальной части работы оценены метрологические характеристики разработанного метода фототераностики под контролем видеофлуоресцентного исследования. Установлено, что оптимальным способом доставки лазерного излучения в желчные протоки является оптический диффузор с цилиндрическим облучателем длиной 2 см на дистальном конце, установленный вне дренажа, что увеличивает глубину проникновения лазерного излучения в ткани на 2 мм, что также повышает глубину терапевтического воздействия при ФДТ. При лазерном облучении с длиной волны 660 нм снижение интенсивности флуоресценции (фотобликинг) на 50% и более достигается при суммарной световой дозе  $150 \text{ Дж/см}^2$ , оптимальное время облучения составляет  $6 \pm 1$  минут. Суммарная световая доза  $150\text{--}300 \text{ Дж/см}^2$  не приводит к деструкции неизмененных тканей печени и желчных протоков, содержащих как эндогенные, так и экзогенные флуорофоры.

3. Флуоресцентная диагностика при опухолях визуально доступных локализаций с применением модуля для эндоскопии и минимально инвазивной хирургии УФФ-630/675-0 – БИОСПЕК позволила оценить возможность получения видеофлуоресцентного изображения с учетом аутофлуоресценции патологических очагов с определением концентрации ФС в них за счет измерения индекса флуоресценции как до ФДТ, так и после, с контролем

фотобличинга, который является определяющим фактором, приводящим к регрессии опухоли.

4. Разработанная и внедренная в клиническую практику методика внутрипротоковой лазерной спектроскопии при стенозирующем ХЦР с использованием источника излучения – терапевтического лазера с длиной волны 660 нм – позволила проводить на одном и том же оборудовании флуоресцентную диагностику и фотодинамическую терапию, что значительно упрощает методологию. Примененное впервые в клинической практике внутрипротоковое видеофлуоресцентное исследование с использованием отечественного модуля для эндоскопии и минимально инвазивной хирургии УФФ-630/675-0 – БИОСПЕК позволило в 94% случаев получить видеофлуоресцентное изображение опухоли и, соответственно, достаточное увеличение индекса флуоресценции фотосенсибилизатора в опухолевом стенозе желчных протоков, что достоверно свидетельствовало о злокачественном поражении желчных протоков и подтверждено при гистологическом исследовании биоптата у 84% основной группы (у всех, у кого технически удалось получить биопсийный материал).

5. Продемонстрирована статистически достоверная прямая корреляция между двумя технически различными способами оценки концентрации фотосенсибилизатора: внутрипротоковой видеофлуоресцентной диагностикой злокачественного поражения желчных протоков и методикой лазерной спектроскопии, которая является более точной, но менее удобной и более времязатратной ( $p < 0,05$ ). Зафиксировано, что разработанная методика внутрипротоковой флуоресцентной диагностики в не менее чем 94% случаях позволяет установить накопление фотосенсибилизатора в опухолевой стриктуре (чувствительность).

6. Доказано, что предложенный методологический подход при фотодинамической терапии с интраоперационной флуоресцентной навигацией является эффективным и безопасным способом реканализации нерезектабельного стенозирующего ХЦР, позволившим у 100% пациентов

основной группы получить реканализацию желчных протоков. По результатам реканализации установлено: у 12 (24%) пациентов получено восстановление свободного пассажа контрастного препарата дистальнее стеноза или увеличение просвета от 25 до 50% просвета протока; у 28 (56%) больных получили пассаж контрастного препарата при динамической гидродилатации или восстановление менее 25% просвета протока; в 10 (20%) случаях при отсутствии пассажа контрастного препарата через стеноз реканализация стриктуры осуществлена за счет возможности проведения инструментов в дистальную неизмененную часть протоков – 10 (20%) больных.

7. Получено достоверное увеличение медианы выживания больных в основной группе 15,0 (13,1–16,8) месяцев по сравнению с контрольной 7,0 (5,5–8,5) месяцев. Медианы выживаемости в сравниваемых группах, оцененные с помощью логранк критерия Мантеля-Кокса, статистически значимо отличаются ( $p < 0,001$ ). В основной группе средний срок безжелтушного периода составил  $16,3 \pm 1,1$  месяцев, а в группе сравнения –  $5,6 \pm 0,3$ . Установлено статистически значимое улучшение индекса Карновски и шкалы ECOG в результате проведенного лечения, в основной группе у 66% и 64%, а в группе сравнения – у 26% и 18%.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В качестве окончательного метода желчеотведения при механической желтухе, обусловленной ХЦР, следует выполнять эндопротезирование саморасширяющимся нитиноловым стентом. В качестве срочного купирования явлений желтухи – один из вариантов наружной или наружно-внутренней холангиостомии, с последующей санацией желчных протоков для профилактики или лечения холангита.

2. Показаниями к проведению внутрипротоковой фотодинамической тераностики являются:

- наличие клинико-инструментальных данных за нерезектабельный стенозирующий ХЦР, осложненный механической желтухой;
- неоперабельное состояние больного ХЦР, осложненным механической желтухой;
- внутрипротоковая и инфильтративная форма ХЦР, с поражением не более трех сегментарных протоков.

3. Фотосенсибилизаторы, производные хлорина еб, следует использовать для внутривенного введения в дозе не менее 1 мг/кг веса больного, за два часа до начала фототераностики.

4. Для диагностики опухолевого стеноза желчных протоков, помимо клинико-инструментальных исследований, целесообразно проводить внутрипротоковую диагностику с применением видеофлуоресцентного модуля для минимально инвазивной хирургии УФФ-630/675-0 – БИОСПЕК и полупроводникового лазера с длиной волны генерации 660 нм с определением индекса флуоресценции, показывающего относительную интенсивность флуоресценции фотосенсибилизатора, накопленного в опухолевой ткани, с предварительной калибровкой (оценкой нормы) видеофлуоресцентной системы на тканях того же типа. Увеличение индекса флуоресценции в два раза и более от значения нормы следует принимать как объективную возможность злокачественного поражения с вероятностью не менее 94%.



5. Фотодинамическую терапию следует проводить всем пациентам с ХЦР, которым невозможно выполнить радикальную операцию. Следует использовать оптический диффузор с цилиндрическим излучателем на дистальном конце длиной не более 2 см и проводить лазерное воздействие на протяжении всей опухоли с захватом минимум 1 см дистальнее и проксимальнее стриктуры. Мощность лазерного излучения с длиной волны 660 нм 1.5 Вт, суммарная световая доза должна оцениваться по фотобличингу фотосенсибилизатора, но не менее 150 Дж/см<sup>2</sup>.

6. ФДТ в случае опухолевой стриктуры, не позволяющей выполнить наружно-внутреннее желчеотведение, а затем стентирование, проводится дважды: первый раз для реканализации стриктуры, второй – для локального лечения на протяжении всей стриктуры.

7. Контролем для проведенной внутрипротоковой фотодинамической терапии следует считать фотобличинг ФС, он определяется временем проведения ФДТ, параметр фотобличинга должен соответствовать не менее 60%, при которых можно говорить о достаточной дозе облучения опухоли желчных протоков для активации фотодинамической реакции, приводящей к лечебному патоморфозу опухоли.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- АХЭ – артериальная химиоэмболизация
- БИК – ближний инфракрасный спектр
- ВФД – видеофлуоресцентная диагностика
- ДИ – доверительный интервал
- ИГХ – иммуногистохимическое исследование
- ЛС – лазерная спектроскопия
- ЛЭСА – лазерный электронно-спектральный анализатор
- МЖ – механическая желтуха
- МРТ – магнитно-резонансная томография
- МРХГ – магнитно-резонансная холангиография
- МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография
- НПВС – нестероидные противовоспалительные средства
- НЭЛ – необратимое электропорационное лечение
- Отн. ед. – относительные единицы
- ПпIX – протопорфирин IX
- ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография
- РНЛИ – рассеянное назад лазерное излучение
- РХПГ – ретроградная холангиопанкреатография
- РЧА – радиочастотная абляция
- РЧА – радиочастотная абляция
- РЭА (СЕА) – раково-эмбриональный антиген (Carcinoembryonic antigen)
- СКФ – скорость клубочковой фильтрации
- СТЛТ – стереотаксическая лучевая терапия
- УЗИ – ультразвуковое исследование
- ФД – флуоресцентная диагностика
- ФДТ – фотодинамическая терапия
- ФС – фотосенсибилизатор
- ХЦР – холангиоцеллюлярный рак

ЧЧХ – чрескожная чреспеченочная холангиостомия

ЧЧХГ – чрескожная чреспеченочная холангиография

ЭУЗИ – эндоскопическое УЗИ

5-АЛК – 5- аминолевулиновая кислота

CAFs – опухоль-ассоциированные фибробласты (Cancer-associated fibroblasts)

Себ – хлорин еб

DICOM – стандарт Digital Imaging and Communications in Medicine

e (раз) – математическая константа, равна приблизительно 2.7

ECOG – шкала of Eastern Cooperative Oncology Group

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Акопов А.Л., Казаков Н.В., Русанов А.А., Карлсон А.А. Механизмы фотодинамического воздействия при лечении онкологических больных. Фотодинамическая терапия и фотодиагностика № 2/2015. С. 9–16.
2. Бабаев А.Б., Лоран О.Б. Фотодинамическая тераностика отечественной флуоресцентной видеосистемой немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря. РМЖ. – 2019. – С. 61–66.
3. Белый Ю.А. Патент RU (11)2 440 158(13)С2. Способ фотодинамической терапии субъектов, страдающих злокачественными опухолями. Заявл. 25.02.2010; опубл. 27.08.2011.
4. Борисова Н.А., Борисов А.Е., Кареев А.В. Эндобилиарные методы коррекции механической желтухи: Руководство по хирургии печени и желчевыводящих путей / Под ред. Борисова А.Е. СПб.: Скифия, 2003. – Т. 2. – С. 281–254.
5. Бредер В.В., Базин И.С., Косырев В.Ю., Ледин Е.В. Практические рекомендации по лекарственному лечению билиарного рака. Злокачественные опухоли : Практические рекомендации RUSSCO #3s2. – 2021. – Т. 11. – С. 26.
6. Винницкая Е.В., Хайменова Т.Ю., Сбикина Е.С., Александрова Р.И., Сандлер Ю.Г. IgG4-ассоциированный склерозирующий холангит – диагноз, который может изменить ход событий (обзор литературы и клиническое наблюдение). Альманах клинической медицины. – 2018. – № 46 (5). – С. 514–521.
7. Гальперин Э.И. Актуальные вопросы патологии внепеченочных желчных протоков (патогенез желчной гипертензии, диагностика, хирургическое лечение): Автореф. дис. ... д-ра мед. Наук, Москва, 1966.
8. Гальперин Э.И. Классификация тяжести механической желтухи // Анналы хирургической гепатологии. – 2012. – № 17 (2). – С. 26–33.
9. Гальперин Э.А., Котовский А.Е., Момунова О.Н. Темп декомпрессии желчных протоков при механической желтухе опухолевой этиологии // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2011. – № 8. – С. 33
10. Гамаюнов, С.В. Флуоресцентный мониторинг фотодинамической терапии рака кожи в клинической практике / С.В. Гамаюнов, Е.В. Гребенкина, А.А.Ермилина, В.А. Каров, К. König, К.С. Корчагина, Р.Р. Скребцова, В.М. Терехов И.Г. Терентьев, И.В. Турчин, Н.М. Шахова // Современные технологии в медицине. – 2015. – Т.7. – № 2. – С. 75–83.
11. Гранов Д.А., Тилеубергенов И.И., Жуйков В.Н., Шералиев А.Р., Поликарпов А.А., Моисеенко А.В. Комбинированное лечение нерезектабельной гиллюсной холангиокарциномы с последующей трансплантацией печени. Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2022. – № 24(1). – С. 7–14.

12. Данзанова Т.Ю., Синюкова Г.Т., Лепэдату П.И. Современные методы диагностики холангиоцеллюлярного рака. Медицинская визуализация. – 2014. – № 1. – С. 22–36.
13. Долгушин Б.И., Сергеева О.Н., Францев Д.Ю., Кукушкин А.В., Панов В.О., Виршке Э.Р., Косырев В.Ю., Черкасов В.А., Трофимов И.А., Чистякова О.В., Мороз Е.А., Погребняков И.В., Шишкина Н.А. Внутрипротоковая фотодинамическая терапия при воротной холангиокарциноме у неоперабельных больных // Анналы хирургической гепатологии. – 2016. – Т. 21. – № 3.
14. Жариков Ю.О., Пожарская А.А., Тупикин К.А., Байдарова М.Д., Николенко В.Н. Адьювантная фотодинамическая терапия в комплексном лечении больных воротной холангиокарциномой // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2018. – Т. 13(4). – С. 691–695.
15. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, – 2021.
16. Кармазановский Г.Г., Волобуева А.А. Фармакоэкономическое исследование применения магнитно-резонансной томографии с гадоксетовой кислотой в дополнение к компьютерной томографии с контрастированием при диагностике гепатоцеллюлярного рака // Вестник рентгенологии и радиологии | Journal of Radiology and Nuclear Medicine. – 2021. – Т. 102. – № 5. С. 284–295.
17. Карпов О.Э., Ветшев П.С., Маады А.С. Отдаленный результаты эндоскопического билиарного стентирования при помощи пластиковых и саморасширяющихся металлических стентов в лечении опухолевой механической желтухи // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. – 2015. – Т. 10. – № 2. – С. 50–55.
18. Коваленко Ю.А., Жариков Ю.О., Трифионов С.А., Калинин Д.В., Варава А.Б., Чжао А.В. Новые возможности ранней диагностики воротной холангиокарциномы с помощью катетера направленной биопсии TurboHawk // Практическая медицина. – 2017. – № 6 (107). – С. 55–59.
19. Кулезнева Ю.В., Бруслик С.В., Мусаев Г.Х., Израилов Р.Е., Кириллова М.С. Антеградные методы декомпрессии желчных протоков: эволюция и спорные вопросы // Анналы хирургической гепатологии. – 2011. – № 16 (3). – С. 35–43.
20. Кулезнева Ю.В., Израилов Р.Е., Уракова Н.А. Чрескожное чреспеченочное стентирование желчных протоков. Показания, методика, результаты // Диагн. и интервенц. радиол. – 2008. – Т. 2. – № 4. – С. 87–93.
21. Кулезнева Ю.В., Мелехина О.В., Ефанов М.Г., Алиханов Р.Б., Мусатов А.Б., Огнева А.Ю., Цвиркун В.В. Спорные вопросы билиарной декомпрессии при

- механической желтухе опухолевого генеза // *Анналы хирургической гепатологии*. – 2019. – № 24(4). – С. 111–122.
22. Кулезнева Ю.В., Мелехина О.В., Курмансеитова Л.И., Ефанов М.Г., Цвиркун В.В., Огнева А.Ю., Мусатов А.Б., Патрушев И.В. Антеградное желчеотведение: анализ осложнений и способы их профилактики // *Анналы хирургической гепатологии*. – 2018. – № 23 (3). – С. 37–46.
23. Лапин Б.А., Данилова И.Г. Перспективные направления экспериментального использования обезьян // *Вестник Российской Академии Наук*. – 2020. – Т. 90. – № 1. – С. 40–46.
24. Левкин В.В. Комплексная диагностика и хирургическое лечение рака тела проксимального отдела желудка : диссертация ... доктора медицинских наук : 14.01.17 / Левкин Владимир Вениаминович. – Москва, 2013. – 260 с.
25. Лотов А.Н. Малоинвазивные технологии в диагностике и лечении хирургических заболеваний органов гепатопанкреатобилиарной области / дисс. на соиск. ученой степени д.м.н. – Москва, 1998.
26. Лушников Е.Ф. Лечебный патоморфоз опухолей // *Патологоанатомическая диагностика опухолей человека*. Под ред. Н.А. Краевского, А.В. Смоляникова, Д.С. Саркисова М.: Медицина, 2015. – 560 с.
27. Макаров В.И., Ахлюстина Е.В., Фаррахова Д.С., Поминова Д.В., Рябова А.В., Лощенов В.Б. Методы фотоники для оценки качества приживления кожных трансплантатов. *BIOMEDICAL PHOTONICS*. – 2016. – № 3. – Т. 5. – С. 30–40.
28. Макаров Е.С., Нечушкин М.И., Вишневский В.А., Кукушкин А.В. Рак проксимальных желчных протоков. – Москва, 2018. – С. 98.
29. Мачинская Е.А., Иванова-Радкевич В.И. Обзор механизмов селективного накопления фотосенсибилизаторов различной химической структуры в опухолевой ткани // *Фотодинамическая терапия и фотодиагностика*. – 2013. – № 2(4). – С. 28–32.
30. Мусаев Г.Х., Ширяев А.А., Бекшоков А.С., Юриченко Ю.Ю., Ахмедова С.М., Жемерикин Г.А., Бабаев О.К. Малоинвазивное лечение механической желтухи при опухоли Клатскина. Клиническое наблюдение// *Вестник хирургической гастроэнтерологии*. – 2013. – № 4. – С. 69–73.
31. Охотников О.И., Яковлева М.В., Пахомов В.И. Чрескожная холангиостомия при воротной холангиокарциноме // *Хирургия*. – 2016. – № 9. – С. 21–31.
32. Патютко Ю.И., Поляков А.Н., Подлужный Д.В., Сыскова А.Ю., Сагайдак И.В., Котельников А.Г., Сергеева О.Н., Покатаев И.А. Холангиоцеллюлярный рак: состояние проблемы и пути улучшения хирургического лечения // *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. – 2018. – № 12. – С. 30–37.

33. Пиковский Д.Л. Желчная гипертензия и декомпрессия желчных путей // Вестник хирургии. – 1968. – Т. 101 – № 9. – С. 66–70.
34. Потапов А.А., Гаврилов А.Г., Горяйнов С.А., Гольбин Д.А., Зеленков П.В., Кобяков Г.Л., Охлопков В.А., Жуков В.Ю., Шишкина Л.В., Шурхай В.А., Лощенов В.Б., Савельева Т.А., Грачев П.В., Холодцова М.Н., Кузьмин С.Г., Ворожцов Г.Н. Интраоперационная флуоресцентная диагностика и лазерная спектроскопия в хирургии глиальных опухолей головного мозга // Вопросы нейрохирургии имени Н.Н. Бурденко. – 2012. – № 76(5). – С. 3–12.
35. Савельева Т.А. Комбинированный спектроскопический метод исследования сильно рассеивающих биологических сред. Дисс. На соиск уч степ к.ф-м.наук. – Москва. 2013.
36. Странадко Е.Ф., Баранов А.В., Дуванский В.А., Лобаков А.И., Морохотов В.А., Рябов М.В. Фотодинамическая терапия рака большого дуоденального сосочка и внепечёночных желчных протоков // Biomedical Photonics. – 2020. – № 9(2). – С. 18–28.
37. Тучин В.В. Оптическая биомедицинская диагностика // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика. – 2005. – Т. 5. – №. 1. – С. 39–53.
38. Францев Д.Ю. Методика и непосредственные результаты чрескожной эндобилиарной фотодинамической терапии неоперабельных больных гиллюсной холангиокарциномой. Дисс. на соиск. Уч.ст. канд. мед. наук. – Москва, 2019.
39. Францев Д.Ю., Сергеева О.Н., Долгушин Б.И. Лечение гиллюсной холангиокарциномы. Современное состояние вопроса // Сибирский онкологический журнал. – 2019. – № 18 (1). – С. 103–115.
40. Харнас С.С. Пути совершенствования диагностики и хирургического лечения рака желудка. дисс на соиск уч ст док.мед наук. – Москва, 1997.
41. Хатьков И.Е., Аванесян Р.Г., Ахаладзе Г.Г., Бебуришвили А.Г., Буланов А.Ю., Быков М.И., Виршке Э.Г., Габриэль С.А., Гранов Д.А., Дарвин В.В., Долгушин Б.И., Дюжева Т.Г., Ефанов М.Г., Коробко В.Л., Королев М.П., Кулабухов В.В., Майстренко Н.А., Мелехина О.В., Недолужко И.Ю., Охотников О.И., Погребняков В.Ю., Поликарпов А.А., Прудков М.И., Ратников В.А., Солодина Е.Н., Степанова Ю.А., Субботин В.В., Федоров Е.Д., Шабунин А.В., Шаповальянц С.Г., Шулуток А.М., Шишин К.В., Цвиркун В.Н., Чжао А.В., Кулезнева Ю.В. Российский консенсус по актуальным вопросам диагностики и лечения синдрома механической желтухи // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2020. – № 6. – С. 5–17.
42. Чжао А.В. Холангиоцеллюлярная карцинома / под ред. А. В. Чжао. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2021. – 368 с.

43. Чиссов В.И., Филоненко Е. В. Флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия в клинической онкологии. – М.: издательство Триумф, 2012. – 272 с.
44. Шевченко Ю.Л., Карпов О.Э., Ветшев П.С., Маады А.С., Алексеев К.И., Осипов А.С., Васильев И.В., Тюрбеев Б.Ц. Применение саморасширяющихся нитиноловых стентов при механической желтухи опухолевого генеза // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. – 2014. – Т. 9. – № 2. – С. 30–35.
45. Ширяев, А.А. Внутрпротоковая видеофлюоресцентная диагностика и комбинированное минимально инвазивное лечение холангиоцеллюлярного рака, осложненного механической желтухой: первый опыт в России / А. А. Ширяев, Г.Х. Мусаев, М.В. Лощенов, А.В. Бородкин, В.В. Левкин, Н.Л. Охотникова, В.В. Волков, В.Б. Лощенов, В.И. Макаров, С.П. Ветшев, Д.В. Булгин // Анналы хирургической гепатологии. – 2017. – № 1. – С. 71–81.
46. Ширяев А.А., Мусаев Г.Х., Левкин В.В., Решетов И.В., Лощенов М.В., Бородкин А.В., Волков В.В., Линьков К.Г., Макаров В.И., Жемерикин Г.А., Щекотуров И.О., Рубан М.А., Лощенов В.Б. Интервенционные методы лечения, флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия нерезектабельной холангиокарциномы, осложненной механической желтухой // REJR. – 2018. – № 8(4). – С. 124–133.
47. Ширяев А.А., Мусаев Г.Х., Лощенов М.В., Бородкин А.В., Левкин В.В., Охотникова Н.Л., Волков В.В., Макаров В.И., Лощенов В.Б. Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия в комбинированном лечении холангиоцеллюлярного рака // BIOMEDICAL PHOTONICS. – 2016. – Т. 5. – № 4. – С. 15–24.
48. Щекотуров И.О., Бахтиозин Р.Ф., Ширяев А.А., Корнев Д.О., Панина К.С. Возможности трехмерного компьютерного моделирования, выполненного на основе данных компьютерной томографии в планировании резекции печени при ее очаговых заболеваниях // REJR. – 2018. – № 8(2). – С. 72–78.
49. Ярославцева-Исаева, Е.В. Флуоресцентная диагностика злокачественных новообразований кожи с фотосенсибилизаторами хлоринового ряда / Е.В. Ярославцева-Исаева с соавт. // Biomedical Photonics. – 2018. – Т. 7. – № 1. – С. 13–20.
50. Abdelghani, YA, Arisaka, Y, Masuda, D, et al. Bile aspiration cytology in diagnosis of bile duct carcinoma: factors associated with positive yields // J Hepatobiliary Pancreat Sci. – 2012. – № 19. – P. 370–378.
51. Addlev J, Mitchell RM. Advances in the investigation of obstructive jaundice // Curr Gastroenterol Rep. – 2012. – № 14(6). – P. 511–519.



52. Adler D.G., Witt B. Cytologic Diagnosis of Biliary Strictures: FISH or Cut the Sensitivity Rate? // *Digestive Diseases and Sciences*. – 2018. – Vol. 63. – P. 549–550.
53. Agarwal M.L., Clay M.E., Harvey E.J., Evans H.H., Antunez A.R., Oleinick N.L. Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells // *Cancer Res*. – 1991. – Vol. 51. – P. 5993–5996
54. Akopov A.L., Rusanov A.A., Papayan G.V., Kazakov N.V., Gerasin A.V., Urtenova M.A. Endobronchial photodynamic therapy under fluorescence control: Photodynamic theranostics // *Photodiagnosis Photodyn Ther*. – 2017. – № 19. – P. 73–77.
55. Al Mahjoub A., Menahem B., Fohlen A., Dupont B., Alves A., Launoy G., Lubrano J. Preoperative biliary drainage in patients with resectable perihilar cholangiocarcinoma: is percutaneous transhepatic biliary drainage safer and more effective than endoscopic biliary drainage? A meta-analysis // *J. Vasc. Intervent. Radiol*. – 2017. – № 28 (4). – P. 576–582.
56. Alabraba E., Joshi H., Bird N., Griffin R., Sturgess R., Stern N., Sieberhagen C., Cross T, Camenzuli A, Davis R, Evans J, O'Grady E, Palmer D, Diaz-Nieto R, Fenwick S, Poston G, Malik H. Increased multimodality treatment options has improved survival for Hepatocellular carcinoma but poor survival for biliary tract cancers remains unchanged // *Eur J Surg Oncol*. – 2019. – № 45(9). – P. 1660–1667.
57. Alekseeva P.M. et al. Combined spectral-and video-fluorescent diagnostics of cervical neoplasms for photodynamic therapy // *Laser Physics Letters*. – 2020. – T. 17. – № 10. – P. 105602.
58. Alekseeva P.M., Efendiev K.T., Shiryayev A.A., Rusakov M.A., Simonova M.S., Samoylova S. I., Fatyanova A.S., Reshetov I.V., Loschenov V.B. Sublingual administration of 5-aminolevulinic acid for laser-induced photodiagnosics and photodynamic therapy of oral cavity and larynx cancers // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2021. – № 34. – P. 102289
59. Ali A., Brown V., Denley S. et al. Expression of KOC, S100P, mesothelin and MUC1 in pancreatico-biliary adenocarcinomas: development and utility of a potential diagnostic immunohistochemistry panel // *BMC Clin Pathol*. – 2014. – № 14. – P. 35.
60. Al-Kawas F., Aslanian H., Baillie J., Banovac F., Buscaglia J.M., Buxbaum J., Chak A., Chong B., Coté G.A., Draganov P.V., Dua K., Durkalski V., Elmunzer B.J., Foster L.D., Gardner T.B., Geller B.S., Jamidar P., Jamil L.H., Keswani R.N., Khashab M.A., Lang G.D., Law R., Lichtenstein D., Lo S.K., McCarthy S., Melo S., Mullady D., Nieto J., Bayne Selby J., Singh V.K., Spitzer R.L., Strife B., Tarnakxy P., Taylor J.R., Tokar J., Wang A.Y., Williams A., Willingham F., Yachimski P. In alphabetical order for the INTERCPT Study Group and the United States Cooperative for Outcomes Research in Endoscopy (USCORE). Percutaneous transhepatic vs. endoscopic

- retrograde biliary drainage for suspected malignant hilar obstruction: study protocol for a randomized controlled trial // *Trials*. – 2018. – № 19(1). – P. 108.
61. Allison R.R. Photodynamic therapy: oncologic horizons // *Future Oncology*. – 2013. – Vol. 10. – № 1.
62. Allison R.R., Downie G.H., Cuenca R., Hu X.H., Childs C.J., Sibata C.H. Photosensitizers in clinical PDT // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* – 2004. – № 1. – P. 27–42.
63. Allison R.R., Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms // *Clin. Endosc.* – 2013. – Vol. 46 – P. 24–29
64. Almadi M. A., Barkun A., Martel, M. Plastic vs. Self-Expandable Metal Stents for Palliation in Malignant Biliary Obstruction: A Series of Meta-Analyses // *Am. J. Gastroenterol.* – 2017. – № 112. – P. 260–273.
65. Alvaro D., Bragazzi M.C., Benedetti A., Fabris L., Fava G., Invernizzi P., Marzioni M., Nuzzo G., Strazzabosco M., Stroffolini T. AISF “Cholangiocarcinoma” committee. Cholangiocarcinoma in Italy: A national survey on clinical characteristics, diagnostic modalities and treatment. Results from the "Cholangiocarcinoma" committee of the Italian Association for the Study of Liver disease // *Dig Liver Dis.* – 2010. – № 43(1). – P. 60.
66. Alves F., Carmello J.C., Mima E.G.O. et al. Photodithazine-mediated antimicrobial photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* in vivo // *Medical Mycology*/ – 2019/ – Vol. 57(5). P. 609–617.
67. Andersen, J.B. et al. Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors // *Gastroenterology*. – 2012. – Vol. 142. – P. 1021–1031.
68. Asayama Y., Yoshimitsu K., Irie H., Tajima T., Nishie A., Hirakawa M., Nakayama T., Kakihara D., Taketomi A., Aishima S., Honda H. Delayed-phase dynamic CT enhancement as a prognostic factor for mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma // *Radiology*. – 2005. – Vol. 38(1). – P. 150.
69. Avadhani V., Hacıhasanoglu E., Memis B., Pehlivanoglu B., Hanley K.Z., Krishnamurti U., Krasinskas A.M., Osunkoya A.O., Daniels L.M., Freedman A.A., Goodman M., Adsay V., Reid M.D. Cytologic predictors of malignancy in bile duct brushings: a multi-reviewer analysis of 60 cases // *Modern Pathology*. – 2017. – № 30. – P. 1273–1286.
70. Avanesyan R.G., Korolev M.P., Fedotov L.E., Fedotov B.L., Lepekhin G.M., Amirkhanyan T.V. Percutaneous minimally invasive interventions for strictures of biliodigestive anastomoses after bile ducts repair // *Annals of HPB Surgery*. – 2017. – № 22(3). – P. 55–63.

71. Banales JM, Cardinale V, Carpino G, Marzioni M, Andersen JB, Invernizzi P, Lind GE, Folseraas T, Forbes SJ, Fouassier L, Geier A, Calvisi DF, Mertens JC, Trauner M, Benedetti A, Maroni L, Vaquero J, Macias RI, Raggi C, Perugorria MJ, Gaudio E, Boberg KM, Marin JJ, Alvaro D. Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA) // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2016. – № 13(5). – P. 261.
72. Banales, J.M., Marin, J.J.G., Lamarca, A. et al. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2020. – № 17. – P. 557–588.
73. Bank J., Witt B., Taylor L., Adler D. Diagnostic yield and accuracy of a new cytology brush design compared to standard brush cytology for evaluation of biliary strictures // *Diagn Cytopathol.* – 2018. – № 46. – P. 234–238.
74. Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V. Optical properties of skin, subcutaneous, and muscle tissues: a review // *Journal of Innovative Optical Health Sciences.* – 2011. – T. 4. – № 1. – C. 9–38.
75. Beek. J.F. In vitro double-integrating-sphere optical properties of tissues between 630 and 1064 nm // *Phys. Med. Biol.* – 1997. – № 42(11). – P. 2255
76. Beger H.G., Warshaw A.L., Büchler M.W. et al. *The Pancreas: An Integrated Textbook of Basic Science, Medicine, and Surgery, Second Edition* Blackwell Publishing Limited, 2008.
77. Belykh E. et al. Optical characterization of neurosurgical operating microscopes: quantitative fluorescence and assessment of PpIX photobleaching // *Scientific reports.* – 2018. – T. 8. – № 1. – C. 1–14.
78. Belykh E., Martirosyan N.L., Yagmurlu K., Miller E.J. et al. Intraoperative Fluorescence Imaging for Personalized Brain Tumor Resection: Current State and Future Directions // *Front. Surg.* – 2016.
79. Ben-Josef E., Guthrie K.A., El-Khoueiry A.B., Corless C.L., Zalupski M.M., Lowy A.M., Thomas C.R. Jr, Alberts S.R., Dawson L.A., Micetich K.C., Thomas M.B., Siegel A.B., Blanke C.D. SWOG S0809: A Phase II Intergroup Trial of Adjuvant Capecitabine and Gemcitabine Followed by Radiotherapy and Concurrent Capecitabine in Extrahepatic Cholangiocarcinoma and Gallbladder Carcinoma // *J Clin Oncol.* – 2015. – Vol. 33(24). – P 2617.
80. Benson A.B., D'Angelica M.I., Abbott D.E., Anaya D.A., Anders R., Are C. et al. *Hepatobiliary Cancers, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology* // *J Natl Compr Canc Netw.* – 2021. – Vol. 19. – P. 541–565.

81. Bergquist A., Tribukait B., Glaumann H., Broome U. Can DNA cytometry be used for evaluation of malignancy and premalignancy in bile duct strictures in primary sclerosing cholangitis? // *J Hepatol.* – 2000. – Vol. 33. – P. 873–877.
82. Berr F. et al. Neoadjuvant photodynamic therapy before curative resection of proximal bile duct carcinoma // *Journal of hepatology.* – 2000. – T. 32. – № 2. – P. 352–357
83. Braconi C., Roessler S., Kruk B., et al. Molecular perturbations in cholangiocarcinoma: is it time for precision medicine? // *Liver Int.* – 2019. – № 39 (1). – P. 32–42.
84. Bridgewater J., Galle P.R., Khan S.A., Llovet J.M., Park J.W., Patel T., Pawlik T.M., Gores G.J. Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma // *J Hepatol.* – 2014. – Vol. 60(6). – P. 1268–1289.
85. Brugge W.R. Endoscopic techniques to diagnose and manage biliary tumors // *J Clin Oncol.* – 2005. – № 23. – P. 4561–4565.
86. Brunt E., Aishima S., Clavien P.A., Fowler K., Goodman Z., Gores G., Gouw A., Kagen A., Klimstra D., Komuta M., Kondo F., Miksad R., Nakano M., Nakanuma Y., Ng I., Paradis V., Nyun Park Y., Quaglia A., Roncalli M., Roskams T., Sakamoto M., Saxena R., Sempoux C., Sirlin C., Stueck A., Thung S., Tsui W.M.S., Wang X.W., Wee A., Yano H., Yeh M., Zen Y., Zucman-Rossi J., Theise N. cHCC-CCA: Consensus terminology for primary liver carcinomas with both hepatocytic and cholangiocytic differentiation // *Hepatology.* – 2018. – Vol. 68(1). – P. 113–126.
87. Cai Y., Si W., Huang W., Chen P., Shao J., Dong X. Organic Dye Based Nanoparticles for Cancer Phototheranostics // *Small.* – 2018. – Vol. 14(25).
88. Carmello J.C., Dovigo L.N., Mima E.G. et al. Correction: In vivo evaluation of photodynamic inactivation using Photodithazine against *Candida albicans* // *Photochem Photobiol Sci.* – 2017. – Vol. 16(8). – P. 1336–1337.
89. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two: cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* – 2005. – Vol. 2. – P. 1–23
90. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part three: photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* – 2005/ – Vol. 2. – P. 91–106.
91. Chang G., Xia F.F., Li H.F., Niu S., Xu Y.S. Unilateral versus bilateral stent insertion for malignant hilar biliary obstruction // *Abdom Radiol (NY).* – 2017. – Vol. 42. – P.2745–2751.

92. Chen B., Pogue B.W., Goodwin I.A., et al. Blood flow dynamics after photodynamic therapy with verteporfin in the RIF-1 tumor // *Radiat. Res.* – 2003. – Vol. 160. – P. 452–459.
93. Chen K.J., Yang F.C., Qin Y.S., Jin J., Zheng S.S. Assessment of clinical outcomes of advanced hilar cholangiocarcinoma // *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* – 2018. – Vol. 17. – P. 155–162.
94. Chen Y.J. Influence of Photodynamic Therapy on Apoptosis and Invasion of Human Cholangiocarcinoma QBC939 Cell Line. / Y.J. Chen et al. // *Chin Med Sci J.* – 2015. – Vol. 30(4). – P. 252–259.
95. Cheng R.G., Bhattacharya R., Yeh M.M., Padia S.A. Irreversible Electroporation Can Effectively Ablate Hepatocellular Carcinoma to Complete Pathologic Necrosis // *JVIR.* – 2015. – Vol. 26. – Iss. 8.
96. Cheon Y.K. Recent advances of photodynamic therapy for biliary tract cancer // *Int J Gastrointest Interv.* – 2021. – № 10(3). – P. 96–100.
97. Chiang K.C., Huang S.T., Wu R.C., et al. Interferon alpha-inducible protein 27 is an oncogene and highly expressed in cholangiocarcinoma patients with poor survival // *Cancer Manag Res.* – 2019. – Vol. 11. – P. 1893–1905.
98. Chiba M., Kato M., Kinoshita Y., Shimamoto N., Tomita Y., Takahiro Abe T., Yosuke Kawahara Y., Koyama S., Kanazawa K., Takakura K., Tsukinaga S., Nakano M., Torisu Y., Toyozumi H., Ikeda K., Arakawa H., Sumiyama K. Best period to replace or change plastic stents with self-expandable metallic stents using multivariate competing risk regression analysis // *Scientific Reports.* – 2020. – Vol. 10.
99. Chung H.G., Chang J.-I., Lee K.H., Park J.K., Lee K.T., Lee J.K. Comparison of EUS and ERCP-guided tissue sampling in suspected biliary stricture // *PLoS ONE.* – 2021. – Vol. 16(10).
100. Churi C.R., Shroff R., Wang Y., et al. Mutation profiling in cholangiocarcinoma: prognostic and therapeutic implications // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9.
101. Cillo U., Fondevila C., Donadon M., Gringeri E., Mocchegiani F., Schlitt H.J., Ijzermans J.N.M., Vivarelli M., Zieniewicz K., Olde Damink S.W.M., Groot Koerkamp B. Surgery for cholangiocarcinoma. *Liver Int.* 2019 May;39 Suppl 1. – P. 143–155.
102. Clements O., Eliahoo J., Kim J.U., Taylor-Robinson S.D., Khan S.A. Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis // *J Hepatol.* – 2020. – Vol. 72(1). – P. 95–103.
103. Corvera C.U., Blumgart L.H., Darvishian F., et al. Clinical and pathologic features of proximal biliary strictures masquerading as hilar cholangiocarcinoma // *J Am Coll Surg.* – 2005. – № 201. – P. 862–869.

104. Corvino F., Centore L., Soreca E., Corvino A., Farbo V., Bencivenga A. Percutaneous «Y» biliary stent placement in palliative treatment of type 4 malignant hilar stricture // *JGO*. – 2016. – Vol.7. – № 2.
105. Crippa S., Cirocchi R., Partelli S., Petrone M.C., Muffatti F., Renzi C., Falconi M., Arcidiacono P.G. Systematic review and meta-analysis of metal versus plastic stents for preoperative biliary drainage in resectable periampullary or pancreatic head tumors // *Eur J Surg Oncol*. – 2016. – Vol. 42(9). – P. 1278–1280.
106. Dahle J., Kaalhus O., Moan J., Steen H.B. Cooperative effects of photodynamic treatment of cells in microcolonies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, Vol. 94, pp. 1773–1778.
107. De Bellis M., Sherman S., Fogel E.L., Cramer H., Chappo J., McHenry L.J., Watkins J.L., Lehman G.A. Tissue sampling at ERCP in suspected malignant biliary strictures (part 1) // *Gastrointest Endosc*. – 2002. – № 56. – P. 552–561.
108. De Jong MC, Nathan H, Sotiropoulos GC, Paul A, Alexandrescu S, Marques H, Pulitano C, Barroso E, Clary BM, Aldrighetti L, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: An international multi-institutional analysis of prognostic factors and lymph node assessment // *J Clin Oncol*. – 2011. – Vol. 29. – P. 3140–3145.
109. De Palma G.D., Galloro G., Siciliano S., Iovino P., Catanzano C. Unilateral versus bilateral endoscopic hepatic duct drainage in patients with malignant hilar biliary obstruction: Results of a prospective, randomized, and controlled study // *Gastrointest Endosc*. – 2001. – № 53(6). – P. 547–553.
110. Diamantis I., Karamitopoulou E., Perentes E., et al. p53 protein immunoreactivity in extrahepatic bile duct and gallbladder cancer: correlation with tumor grade and survival // *Hepatology*. – 1995. – Vol. 22. – P. 774–779.
111. Dierks J., Gaspersz M.P., Belkouz A., van Vugt J.L.A., Coelen R.J.S., de Groot J.W.B. et al. Translating the ABC-02 trial into daily practice: outcome of palliative treatment in patients with unresectable biliary tract cancer treated with gemcitabine and cisplatin // *Acta Oncol*. – 2018. – Vol. 57. – P. 807–812.
112. Ding X., Xu Q., Liu F., et al. Hematoporphyrin monomethyl ether photodynamic damage on HeLa cells by means of reactive oxygen species production and cytosolic free calcium concentration elevation // *Cancer Lett*. – 2004. – Vol. 216. – P. 43–54.
113. Domagk D., Poremba C., Dietl K.H., Senninger N., Heinecke A., Domschke W., Menzel J. Endoscopic transpapillary biopsies and intraductal ultrasonography in the diagnostics of bile duct strictures: a prospective study // *Gut*. – 2002. – Vol. 51(2). – P. 240–4.
114. Doronina-Amitonova L.V., Fedotov I.V., Efimova O., Chernysheva M., Fedotov A.B., Anokhin K.V., Zheltikov A.M. Multicolor in vivo brain imaging with a

- microscope-coupled fiber-bundle microprobe. // *Applied Physics Letters*. – 2012. – Vol. 101. – P. 233702–233702.
115. Douillard S., Olivier D., Patrice T. In vitro and in vivo evaluation of Radachlorin(R) sensitizer for photodynamic therapy / S. Douillard et al. // *Photochem Photobiol Sci*. – 2009. – № 8(3). – P. 405–413.
116. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbek M., Moan J., Peng Q. Photodynamic Therapy JNCI: Journal of the National Cancer Institute, Volume 90, Issue 12, 17 June 1998, Pages 889–905.
117. Draganov P.V, Chauhan S., Wagh M.S., Gupte A.R., Lin T., Hou W., Forsmark C.E. Diagnostic accuracy of conventional and cholangioscopy-guided sampling of indeterminate biliary lesions at the time of ERCP: a prospective, long-term follow-up study // *Gastrointest Endosc*. – 2012. – № 75. – P. 347–353.
118. Dudley J.C., Zheng Z., McDonald T. Next-generation sequencing and fluorescence in situ hybridization have comparable performance characteristics in the analysis of pancreaticobiliary brushings for malignancy // *J Mol Diagn*. – 2016. – Vol. 18. – P. 124–130.
119. Dumonceau J.M., Cremer M., Auroux J., Delhaye M., Devière J. A comparison of Ultraflex Diamond stents and Wallstents for palliation of distal malignant biliary strictures // *Am J Gastroenterol*. – 2000. – Vol. 95. – P. 670–676.
120. Efendiev K.T. Comparative investigation of 5-aminolevulinic acid and hexyl aminolevulinate-mediated photodynamic diagnostics and therapy of cervical dysplasia and vulvar leukoplakia // *Laser Physics Letters*. – 2021. – Vol. 18. – № 6.
121. Efendiev K.T. et al. Laser spectroscopic method for assessing the effectiveness of photodynamic therapy (controlled PDT) // 2020 International Conference Laser Optics (ICLO). – IEEE, 2020. – P. 1–10.
122. Efendiev K.T., Alekseeva P.M., Shiryayev A.A., Skobeltsin A.S., Solonina I.L., Fatyanova A.S., Reshetov I.V., Loschenov V.B. Preliminary low-dose photodynamic exposure to skin cancer with chlorin e6 photosensitizer // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2022. – Vol. 38.
123. Eline J.C., Kamp A., Winand N., Dinjens M., Doukas M., Bruno M.J., de Jonge P.J.F., Peppelenbosch M.P., de Vries A.C. Optimal tissue sampling during ERCP and emerging molecular techniques for the differentiation of benign and malignant biliary strictures // *Ther Adv Gastroenterol*. – 2021. – Vol. 14. – P. 1–24
124. Endo I, Gonen M., Yopp A.C., Dalal K.M., Zhou Q., Klimstra D. et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: rising frequency, improved survival, and determinants of outcome after resection // *Ann Surg*. – 2008. – Vol. 248. – P. 84–96.

125. Endo H., Shimada, Sugita M., Fujii Y., Morioka D., Takeda K., et al. Role of three-dimensional imaging in operative planning for hilar cholangiocarcinoma Surgery. – 2007. – P. 666–675.
126. ERCP Group, Chinese Society of Digestive Endoscopology; Biliopancreatic Group, Chinese Association of Gastroenterologist and Hepatologist; National Clinical Research Center for Digestive Diseases. Chinese guidelines for ERCP / *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. – 2018. – Vol. 57(11). – P. 772–801.
127. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: management of cholestatic liver diseases // *J Hepatol*. – 2009. – Vol. 51. P. 237–267.
128. European Association for the Study of the Liver. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma // *J Hepatol* 2012. – Vol. 56. – P. 908–943.
129. Farrakhova D. et al. Trials of a fluorescent endoscopic video system for diagnosis and treatment of the head and neck cancer // *Journal of Clinical Medicine*. – 2019. – T. 8. – № 12. – P. 2229.
130. Farrakhova D., Shiryaev A., Yakovlev D., Efendiev K., Maklygina Yu., Borodkin A., Loschenov M., Bezdetnaya L., Ryabova A., Amirkhanova L., Samoylova S., Rusakov M., Zavodnov V., Levkin V., Reshetov I., Loschenov V. Trials of a Fluorescent Endoscopic Video System for Diagnosis and Treatment of the Head and Neck Cancer // *J. Clin. Med*. – 2019. – № 8(12). – P. 2229.
131. Fingar V.H., Wieman T.J., Doak K.W. Role of thromboxane and prostacyclin release on photodynamic therapy-induced tumor destruction // *Cancer Res*. – 1990. – Vol. 50. – P. 2599–2603.
132. Fogel L.E., de Bellis M., McHenry L., Watkins J.L., Chappo J., Cramer H., Schmidt S., Lazzell-Pannell L., Sherman S., Lehman G.A. Effectiveness of a new long cytology brush in the evaluation of malignant biliary obstruction: a prospective study // *Gastrointestinal Endoscopy*. – 2006. – Vol. 63. – Iss. 1. – P. 71–77.
133. Forner A., Vidili G., Rengo M., Bujanda L., Ponz-Sarvisé M., Lamarca A. Clinical presentation, diagnosis and staging of cholangiocarcinoma // *Liver Int*. – 2019. – № 39. – P. 98–107.
134. Frakulli R., Buwenge M., Macchia G., Cammelli S., Deodato F., Cilla S., Cellini F., Mattiucci G.C., Bisello S., Brandi G., Parisi S., Morganti A.G. Stereotactic body radiation therapy in cholangiocarcinoma: a systematic review // *Br J Radiol*. – 2019. – № 92(1097).
135. Fu Y.F., Zhou W.J., Shi Y.B., Cao W., Cao C. Percutaneous stenting for malignant hilar biliary obstruction: a randomized controlled trial of unilateral versus bilateral stenting // *Abdom Radiol (NY)*. – 2019. – № 44. – P. 2900–2908.



136. Fukami Y., Ebata T., Yokoyama Y., Igami T., Sugawara G., Takahashi Y., et al. Diagnostic ability of MDCT to assess right hepatic artery invasion by perihilar cholangiocarcinoma with left-sided predominance // *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* – 2012. – № 19. – P. 179–186.
137. Fukuda Y., Tsuyuguchi T., Sakai Y., et al. Diagnostic utility of peroral cholangioscopy for various bile-duct lesions // *Gastrointest Endosc.* – 2005. – № 62. – P. 374–382.
138. Gaspersz M., Buettner S., van Vugt J.L.A., Roos E., Coelen R.J.S., Vugts J., Belt E.J., Jonge J., Polak W.G., Willemsen F.E.J.A., van Gulik T.M., Izermans J.N.M., Groot Koerkamp B.G. Conditional survival in patients with unresectable perihilar cholangiocarcinoma // *HPB.* – 2017. – Vol. 19. – Iss. 11. – P. 966–971.
139. Georges J.F., Valeri A., Wang H., Brooking A., Kakareka M., Cho S.S., Al-Atrache Z., Bamimore M., Osman H., Ifrach J., Yu S., Li C., Appelt D., Lee J.Y.K., Nakaji P., Brill K., Yocom S. Delta-Aminolevulinic Acid-Mediated Photodiagnoses in Surgical Oncology: A Historical Review of Clinical Trials // *Front. Surg.* – 2020. – P. 6–45.
140. Gerhards M.F., Vos P., van Gulik T.M., Rauws E.A., Bosma A., Gouma D.J. Incidence of benign lesions in patients resected for suspicious hilar obstruction // *Br J Surg.* – 2001. – № 88. P. 48–51.
141. Gibbs J.F., Schlieman M., Singh P., et al. A pilot study of urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) overexpression in the brush cytology of patients with malignant pancreatic or biliary strictures // *HPB Surg.* – 2009.
142. Gillen S., Schuster T., Meyer Zum, Büschenfelde C., Friess H., Kleeff J. Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages // *PLoS Med.* – 2010. – № 7 (4).
143. Gilyadova A., Ishchenko A., Shiryaev A. et al. Phototheranostics of Cervical Neoplasms with Chlorin e6 Photosensitizer // *Cancers.* – 2022. – № 14. – P. 211.
144. Gollnick S.O., Evans S.S., Baumann H., et al. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation // *Br. J. Cancer.* – 2003. – Vol. 88. – P. 1772–1779.
145. Gorycki T., Studniarek M. Bile Duct Strictures Caused by Solid Masses: MR in Differential Diagnosis and as a Prognostic Tool to Plan the Endoscopic Treatment // *Gastroenterol Res Pract.* – 2013.
146. Gkika1 E., Hawkins M.A., Grosu A.L., Brunner T.B. The Evolving Role of Radiation Therapy in the Treatment of Biliary Tract Cancer // *Front. Oncol.* – 2020.
147. Groot Koerkamp B., Wiggers J.K., Allen P.J., Besselink M.G., Blumgart L.H., Busch O.R., Coelen R.J., D'Angelica M.I., DeMatteo R.P., Gouma D.J., Kingham T.P., Jarnagin W.R., van Gulik T.M. Recurrence Rate and Pattern of Perihilar

Cholangiocarcinoma after Curative Intent Resection // *J Am Coll Surg.* – 2015. – № 221(6). – P. 1041–9.

148. Hamblin M.R., Newman E.L. On the mechanism of the tumourlocalising effect in photodynamic therapy // *J. Photochem. Photobiol.* – 1994. – Vol. 23. – P. 3–8.

149. Hamblin M.R., Rajadhyaksha M., Momma T., Soukos N.S., Hasan T. In vivo fluorescence imaging of the transport of charged chlorin e6 conjugates in a rat orthotopic prostate tumour // *Br. J. Cancer.* – 1999. – Vol. 81. P. 261–268.

150. Hameed A., Pang T., Chiou J., et al. Percutaneous vs. endoscopic preoperative biliary drainage in hilar cholangiocarcinoma – a systematic review and meta-analysis // *HPB.* – 2016. – № 18(7). – P. 400–410.

151. Hameed A., Pang T., Chiou J., Pleass H., Lam V., Hollands M., Johnston E., Richardson A., Yuen L. Percutaneous vs. endoscopic pre-operative biliary drainage in hilar cholangiocarcinoma – a systematic review and meta-analysis // *HPB (Oxford).* – 2016. – № 18(5). – P. 400–410.

152. Hart J., Parab M., Mandich D. et al. IMP3 immunocytochemical staining increases sensitivity in the routine cytologic evaluation of biliary brush specimens // *Diagn Cytopathol.* – 2012. – № 40. – P. 321–326.

153. Heimbach J.K., Sanchez W., Rosen C.B., Gores G.J. Trans-peritoneal fine needle aspiration biopsy of hilar cholangiocarcinoma is associated with disease dissemination // *HPB (Oxford).* – 2011. – № 13(5). – P. 356–360.

154. Henderson B.W., Owczarczak B., Sweeney J., Gessner T. Effects of photodynamic treatment of platelets or endothelial cells in vitro on platelet aggregation, *Photochem // Photobiol.* – 1992. – Vol. 56. – P. 513–521.

155. Henedige T.P., Neo W.T., Venkatesh S.K. Imaging of malignancies of the biliary tract – an update // *Cancer Imaging.* – 2014. – № 14(1). – P. 14.

156. Hocker B., Loren D. S0969 Photodynamic Therapy for Cholangiocarcinoma Improves Survival Compared to Standard of Care Chemotherapy – A Ten-Year Single U.S. Center Experience // *The American Journal of Gastroenterology.* – 2020. – Vol. 115. – Iss. – P. 494–495.

157. Hong S.K., Jang J.-Y., Kang M.J., Han I.W., Kim S.W. Comparison of clinical outcome and cost-effectiveness after various preoperative biliary drainage methods in periampullary cancer with obstructive jaundice // *J. Korean Med. Sci.* – 2012. – № 27 (4). – P. 356–362.

158. Howell D.A., Beveridge R.P., Bosco J., Jones M. Endoscopic needle aspiration biopsy at ERCP in the diagnosis of biliary strictures // *Gastrointest Endosc.* – 1992. – № 38. – P. 531–535.

159. Hu T., Wang Z., Shen W., Liang R., Yan D., Wei M. Recent advances in innovative strategies for enhanced cancer photodynamic therapy // *Theranostics*. – 2021. – № 11(7). – P. 3278–3300.
160. Iavarone M., Piscaglia F., Vavassori S., Galassi M., Sangiovanni A., Venerandi L., Forzenigo L.V., Golfieri R., Bolondi L., Colombo M. Contrast enhanced CT-scan to diagnose intrahepatic cholangiocarcinoma in patients with cirrhosis // *J Hepatol*. – 2013. – № 58(6). – P. 1188–1193.
161. Ierardi A.M., Mangini M., Fontana F., Floridi C., De Marchi G., Petrillo M., et al. Usefulness and safety of biliary percutaneous transluminal forceps biopsy (PTFB): our experience // *Minim Invasive Ther Allied Technol*. – 2014. – P. 96–101.
162. Imperatori M., D’Onofrio L., Marrucci E., Pantano F., Zoccoli A., Tonini G. Neoadjuvant treatment of biliary tract cancer: state-of-the-art and new perspectives // *Hepat Oncol*. – 2016. – № 3(1). – P. 93–99.
163. Inoue T., Okumura F., Naitoh I. et al. Feasibility of the placement of a novel 6-mm diameter threaded fully covered self-expandable metal stent for malignant hilar biliary obstructions (with videos) // *Gastrointest. Endosc.* – 2016. – № 84. – P. 352–357.
164. Izzo F., Granata V., Grassi R., Fusco R., Palaia R., Delrio P. et al. Radiofrequency Ablation and Microwave Ablation in Liver Tumors: An Update // *Oncologist*. – 2019. – № 24.
165. Jacques S.L. Optical properties of biological tissues: a review // *Physics in Medicine & Biology*. – 2013. – № 58(11). – P. 37.
166. Jaganmohan S., Lee J.H. Self-expandable metal stents in malignant biliary obstruction // *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. – 2012. – № 6(1). – P. 105–114.
167. Jailwala J., Fogel E.L., Sherman S., Gottlieb K., Flueckiger J., Bucksot L.G., Lehman G.A. Triple-tissue sampling at ERCP in malignant biliary obstruction // *Gastrointest Endosc.* – 2000. – № 51. – P. 383–390.
168. James N.S. et al. Measurement of cyanine dye photobleaching in photosensitizer cyanine dye conjugates could help in optimizing light dosimetry for improved photodynamic therapy of cancer // *Molecules*. – 2018. – T. 23. – № 8. – P. 1842.
169. Jha A.K., Jha P., Jha S.K., Keshari R. Plastic versus metal stents for inoperable gallbladder cancer with hilar biliary obstruction: the jury is still out // *Ann Gastroenterol*. – 2021. – № 34(1). – P. 12–19.
170. Jia Y., Wang X., Hu D., Wang P., Liu Q., Zhang X., Jiang J., Liu X., Sheng Z., Liu B., Zheng H. Phototheranostics: Active Targeting of Orthotopic Glioma Using Biomimetic Proteolipid Nanoparticles // *ACS Nano*. – 2019. – № 13 (1). – P. 386–398.
171. Jiao Y., Pawlik T., Anders R., et al. Exome sequencing identifies frequent inactivating mutations in BAP1, ARID1A and PBRM1 in intrahepatic cholangiocarcinomas // *Nat Genet*. – 2013. – № 45. – P. 1470–1473.

172. Joo I., Lee J.M., Yoon J.H. Imaging Diagnosis of Intrahepatic and Perihilar Cholangiocarcinoma: Recent Advances and Challenges // *Radiology*. – 2018. – № 288(1). – P. 7–13.
173. Jori G., Reddi E. The role of lipoproteins in the delivery of tumourtargeting photosensitizers // *Int. J. Biochem*. – 1993. – Vol. 25. – P. 1369–1375.
174. Jung G.-S., Huh J.-D., Lee S.U., Han B.H., Chang H.-K., Cho Y.D. Bile duct: analysis of percutaneous transluminal forceps biopsy in 130 patients suspected of having malignant biliary obstruction // *Radiology*. – 2002. – № 224. – P. 725–730.
175. Kahaleh M., Giovannini M., Jamidar P., et al. Probe-based confocal laser endomicroscopy for indeterminate biliary strictures: refinement of the image interpretation classification // *Gastroenterol Res Pract*. – 2015.
176. Kalaitzakis E., Webster G., Opong K., et al. Diagnostic and therapeutic utility of single-operator peroral cholangioscopy for indeterminate biliary lesions and bile duct stones // *Eur J Gastroenterol Hepatol*. – 2012. – № 24. – P. 656–664.
177. Karlsen T.H., Folseraas T., Thorburn D., et al. Primary sclerosing cholangitis – a comprehensive review // *J Hepatol*. – 2017. – № 67. – P. 1298–1323.
178. Katabathina V., Dasyam A., Dasyam N., Hosseinzadeh K. Adult bile duct strictures: role of MR imaging and MR cholangiopancreatography in characterization // *Radiographics*. – 2014. – № 34(3). – P. 565–586.
179. Kawakami H., Kuwatani M., Etoh K., et al. Endoscopic retrograde cholangiography versus peroral cholangioscopy to evaluate intraepithelial tumor spread in biliary cancer // *Endoscopy*. – 2009. – № 41. – P. 959–964.
180. Khan S.A., Davidson B.R., Goldin R.D., Heaton N., Karani J., Pereira S.P., Rosenberg W.M., Tait P., Taylor-Robinson S.D., Thillainayagam A.V., Thomas H.C., Wasan H. British Society of Gastroenterology. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update // *Gut*. – 2012. – № 61(12). – P. 1657–1669.
181. Khashab M.A., Fockens P., Al-Haddad M.A. Utility of EUS in patients with indeterminate biliary strictures and suspected extrahepatic cholangiocarcinoma (with videos) // *Gastrointest Endosc*. – 2012. – № 76. – P. 1024–1033.
182. Kiesslich R., Goetz M., Angus E.M., et al. Identification of epithelial gaps in human small and large intestine by confocal endomicroscopy // *Gastroenterology*. — 2007. – № 133. – P. 1769–1778.
183. Kim H., Park J., Kim K., Park M., Kim M., Park Y., Bang S., Song S., Chung J., Park S. Intraductal ultrasonography combined with percutaneous transhepatic cholangioscopy for the preoperative evaluation of longitudinal tumor extent in hilar cholangiocarcinoma // *J Gastroenterol Hepatol*. – 2010. – № 25(2). – P. 286–292.

184. Kim J.H. Endoscopic stent placement in the palliation of malignant biliary obstruction // *Clin Endosc.* – 2011. – № 44. – P. 76–86.
185. Kim J.Y., Kim M.H., Lee T.Y., Hwang C.Y., Kim J.S., Yun S.C., Lee S.K. Clinical role of 18F-FDG PET-CT in suspected and potentially operable cholangiocarcinoma: a prospective study compared with conventional imaging // *Official journal of the American College of Gastroenterology.* – 2008. – № 103(5). – P. 1145–1151.
186. Kim K.M., Park J.W., Lee J.K., Lee K.H., Lee K.T., Shim S.G. A Comparison of Preoperative Biliary Drainage Methods for Perihilar Cholangiocarcinoma: Endoscopic versus Percutaneous Transhepatic Biliary Drainage // *Gut Liver.* – 2015. – № 9(6). – P. 791–799.
187. Kish M., Chan K., Perry K., Ko Y.J. A Systematic Review and Network Meta-Analysis of Adjuvant Therapy for Curatively Resected Biliary Tract Cancers // *Curr. Oncol.* – 2020. – № 27. – P. 20–26.
188. Kitamura K., Yamamiya A., Ishii Y. et al. Side-by-side partially covered self-expandable metal stent placement for malignant hilar biliary obstruction // *Endosc. Int. Open.* – 2017. – № 5. – P. 1211–1217.
189. Koedijk M.S., Heijmen B.J.M., Groot Koerkamp B, Eskens FALM, Sprengers D, Poley J.W., van Gent D.C., van der Laan L.J.W, van der Holt B., Willemsen FEJA, Méndez Romero A. Protocol for the STRONG trial: stereotactic body radiation therapy following chemotherapy for unresectable perihilar cholangiocarcinoma, a phase I feasibility study // *BMJ Open.* – 2018. – № 8(10).
190. Koh J., Chung Y.E., Nahm J.H., et al. Intrahepatic mass-forming cholangiocarcinoma: prognostic value of preoperative gadoxetic acid-enhanced MRI // *Eur Radiol.* – 2016. – № 26(2). – P. 407–416.
191. Kolarich A.R., Shah J.L., George T.J., Hughes S.J., Shaw C.M., Geller B.S.. *et al.* Non-surgical management of patients with intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States, 2004-2015: an NCDB analysis // *J Gastrointest Oncol.* – 2018. – № 9. – P. 536–545.
192. Komaya K., Ebata T., Yokoyama Y., Igami T., Sugawara G., Mizuno T., Yamaguchi J., Nagino M. Recurrence after curative-intent resection of perihilar cholangiocarcinoma: analysis of a large cohort with a close postoperative follow-up approach // *Surgery.* – 2018. – № 163(4). – P. 732–738.
193. Koo T., Park H.J., Kim K. Radiation therapy for extrahepatic bile duct cancer: Current evidences and future perspectives // *World J Clin Cases.* – 2019. – № 7(11). – P. 1242–1252.

194. Koopmann J., Thuluvath P.J., Zahurak M.L., et al. Mac-2-binding protein is a diagnostic marker for biliary tract carcinoma // *Cancer*. – 2004. – № 101. – P. 1609–1615.
195. Korrapati P., Ciolino J., Wani S., et al. The efficacy of peroral cholangioscopy for difficult bile duct stones and indeterminate strictures: a systematic review and meta-analysis // *Endosc Int Open*. – 2016. – № 4. – P. 263–275.
196. Kozarek R.A. Metallic biliary stents for malignant obstructive jaundice: a review // *World J Gastroenterol*. – 2000. – № 6(5). – P. 643–646.
197. Kubota Y., Yamaguchi T., Tani K., Takaoka M., Fujimura K., Ogura M., Yamamoto S., Mizuno T., Inoue K.. Anatomical variation of pancreatobiliary ducts in biliary stone diseases. *Abdom Imaging*. – 1993. – № 18. – P. 145–149.
198. Kylänpää M.-L., Boyd S., Ristimäki A., Lindström O., Udd M., Halttunen J. A prospective randomised study of dense Infinity cytological brush versus regularly used brush in pancreaticobiliary malignancy // *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. – 2012. – Vol. 51. – № 5. – P. 590–593.
199. Laleman W., Verraes K., Van Steenberghe W., et al. Usefulness of the single-operator cholangioscopy system SpyGlass in biliary disease: a single-center prospective cohort study and aggregated review // *Surg Endosc*. – 2017. – № 31. – P. 2223–2232.
200. Lamarca A., Barriuso J. C targeted therapies: ready for «prime time» in biliary tract cancer // *J Hepatol*. – 2020. – № 73. – P. 170–185.
201. Lamarca A., Barriuso J., Chander A., McNamara M.G., Hubner R.A., ÓReilly D., Manoharan P., Valle J.W. 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (18FDG-PET) for patients with biliary tract cancer: Systematic review and meta-analysis // *J Hepatol*. – 2019. – № 71(1). – P. 115–129.
202. Lamarca A., Palmer D.H., Wasan H.S., Ross P.J., Ma Y.T., Arora A., Falk S., Gillmore R., Wadsley J., Patel K., Anthony A., Maraveyas A., Iveson T., Waters J.S., Hobbs C., Barber S., Ryder W.D., Ramage J., Davies L.M., Bridgewater J.A., Valle J.W. Advanced Biliary Cancer Working Group. Second-line FOLFOX chemotherapy versus active symptom control for advanced biliary tract cancer (ABC-06): a phase 3, open-label, randomised, controlled trial // *Lancet Oncol*. – 2021. – № 22(5). – P. 690–701.
203. Lee D.H., Kim B., Lee E.S., Kim H.J., Min J.H., Lee J.M., Choi M.H., Seo N., Choi S.H., Kim S.H., Lee S.S., Park Y.S., Chung Y.E., & Korean Society of Abdominal Radiology. Radiologic Evaluation and Structured Reporting Form for Extrahepatic Bile Duct Cancer: 2019 Consensus Recommendations from the Korean Society of Abdominal Radiology // *Korean journal of radiology*. – 2020. – № 22(1). – P. 41–62.

204. Lee H.H., Choi M.-G., Hasan T. Application of photodynamic therapy in gastrointestinal disorders: an outdated or re-emerging technique? // *Korean J Intern Med.* – 2017. – № 32(1). – P. 1–10.
205. Lee H.Y., Kim S.H., Lee J.M. et al. Preoperative assessment of resectability of hepatic hilar cholangiocarcinoma: combined CT and cholangiography with revised criteria // *Radiology.* – 2006. – № 239. – P. 113–121
206. Lee J.H., Kang D.H., Kim J.Y., et al. Endoscopic bilateral metal stent placement for advanced hilar cholangiocarcinoma: a pilot study of a newly designed Y stent // *Gastrointest Endosc.* – 2007. – № 66. – P. 364–369.
207. Lee S.J., Lee Y.S., Lee M.G., Lee S.H., Shin E. Triple-Tissue Sampling during Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography Increases the Overall Diagnostic Sensitivity for Cholangiocarcinoma // *Gut Liver.* – 2014. – № 8(6). – P. 669–673.
208. Lee T.H. Technical tips and issues of biliary stenting, focusing on malignant hilar obstruction // *Clin. Endosc.* – 2013. – № 46 (3). – P. 260–266.
209. Lee T.H., Moon J.M., Park S.H. A recent update on endoscopic drainage of advanced malignant hilar obstruction // *The Korean journal of gastroenterology.* – 2021. – № 2. – P. 94–104.
210. Lee T.H., Moon J.H., Park S.H. Biliary stenting for hilar malignant biliary obstruction // *Digestive Endoscopy.* – 2020. – № 32. – P. 275–286.
211. Lee T.Y. Photodynamic Therapy in Patients with Advanced Hilar Cholangiocarcinoma: Percutaneous Cholangioscopic Versus Peroral Transpapillary Approach / T.Y. Lee et al. // *Photomed Laser Surg.* – 2016. – № 34(4). – P. 150–156.
212. Lee T.Y., Cheon Y.K., Shim C.S., Cho Y.D. Photodynamic therapy prolongs metal stent patency in patients with unresectable hilar cholangiocarcinoma // *World Journal of Gastroenterology.* – 2012. – № 18(39). – P. 55–89.
213. Lendoire J.C., Gil L., Inventarza O. Intrahepatic cholangiocarcinoma surgery: the impact of lymphadenectomy // *Chin Clin Oncol.* – 2018. – № 7. – P. 53.
214. Leng K.M., Liu Y.P., Wang Z.D., Zhong X.Y., Liao G.Q., Kang P.C. et al. Results of adjuvant radiation therapy for locoregional perihilar cholangiocarcinoma after curative intent resection // *Onco Targets Ther.* – 2017. – № 10. – P. 2257–2266.
215. Leung J., Rahim N. The role of covered selfexpandable metallic stents in malignant biliary strictures // *Gastrointest Endosc.* – 2006. – Vol. 63. – № 7. – P. 1001–1003.
216. Levy M.J., Baron T.H., Clayton A.C., et al. Prospective evaluation of advanced molecular markers and imaging techniques in patients with indeterminate bile duct strictures // *Am J Gastroenterol.* – 2008. – № 103: 1263–1273.
217. Levy M.J., Baron T.H., Gostout C.J., Petersen B.T., Farnell M.B. Palliation of malignant extrahepatic biliary obstruction with plastic versus expandable metal stents:

- An evidence-based approach // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. – 2004. – № 2(4). – P. 273–285.
218. Levy M., Lin F., Xu H. et al. S100P, von Hippel-Lindau gene product, and IMP3 serve as a useful immunohistochemical panel in the diagnosis of adenocarcinoma on endoscopic bile duct biopsy // *Hum Pathol*. – 2010. – № 41. – P. 1210–1219.
219. Ley H.J., Cho K.B. Diagnosis of Malignant Biliary Stricture: More is Better // *Clin Endosc*. – 2018. – № 51. – P. 115–117.
220. Li B. et al. Photosensitized singlet oxygen generation and detection: Recent advances and future perspectives in cancer photodynamic therapy // *Journal of biophotonics*. – 2016. – T. 9. – № 11–12. – P. 1314–1325.
221. Li T., Qin L.-X., Zhou J., Sun H.-C., Qiu S.-J., Ye Q.-H. et al. Staging, prognostic factors and adjuvant therapy of intrahepatic cholangiocarcinoma after curative resection // *Liver Int*. – 2014. – № 34. – P. 953–960.
222. Li Y., Song Y., Liu S. The new insight of treatment in Cholangiocarcinoma. *J Cancer*. – 2022. – № 13(2). – P. 450–464.
223. Li Z., Jiao D., Han X., Liu Z. A. Comparative Study of Self-Expandable Metallic Stent Combined with Double 125I Seeds Strands or Single 125I Seeds Strand in the Treatment of Advanced Perihilar Cholangiocarcinoma with Malignant Obstructive Jaundice // *Onco Targets Ther*. – 2021. – № 14. – P. 4077–4086.
224. Li Z., Jiang X., Xiao H., Chen S., Zhu W., Lu H., Cao L., Xue P., Li H., Zhang D. Long-term results of ERCP- or PTCS-directed photodynamic therapy for unresectable hilar cholangiocarcinoma // *Surgical endoscopy*. – 2021. – № 35(10). – P. 5655–5664.
225. Ligato S., Zhao H., Mandich D., et al. KOC (K homology domain-containing protein overexpressed in cancer) and S100A4-protein immunoreactivity improves the diagnostic sensitivity of biliary brushing cytology for diagnosing pancreaticobiliary malignancies // *Diagn Cytopathol*. – 2008. – № 36. – P. 561–567.
226. Lin H., Li S., Liu X. The safety and efficacy of nasobiliary drainage versus biliary stenting in malignant biliary obstruction. A systematic review and meta-analysis // *Medicine (Baltimore)*. – 2016. – № 95 (46). – P. 5253.
227. Lin J., Wu A.-L., Teng F., Xian Y.-T., Xu X.-J. Stent insertion for inoperable hilar cholangiocarcinoma // *Medicine*. – 2021. – Vol. 100. – Iss. 21. – P. 261–292.
228. Lischalk J.W., Repka M.C., Keith Unger Radiation therapy for hepatobiliary malignancies // *J Gastrointest Oncol*. – 2017. – № 8(2). – P. 279–292.
229. Liu J.G., Wu J., Wang J., Shu G.M., Wang Y.J., Lou C., Zhang J., Du Z. Endoscopic biliary drainage versus percutaneous transhepatic biliary drainage in patients with resectable hilar cholangiocarcinoma: a systematic review and meta-analysis // *J. Laparoendosc. Adv. Surg. Tech. A*. – 2018. – № 28 (9). – P. 1053–1060.



230. Loeuillard E., Fischbach S.R., Gores G.J., Rizvi S. Animal models of cholangiocarcinoma // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* – 2019. – № 1865(5). – P. 982 – 992.
231. Loshchenov M.V., Levkin V.V., Chernousov A.F., Kalyagina N.A., Kharnas S.S., Zavodnov V.Y., Linkov K.G., Musayev G.H., Egorov A.V., Karpova R.V., Rybin V.K., Khorobrykh T.V. Laser video fluorescence diagnosis of stomach diseases // *Sovremennye tehnologii v medicine.* – 2018. – № 10(4). – P. 42–48.
232. Loshchenov M., Levkin V., Kalyagina N. et al. Laser-induced fluorescence diagnosis of stomach tumor // *Lasers Med Sci.* – 2020. – № 35. – P. 1721–1728.
233. Lu J., Guo J.-H., Zhu H.-D., et al. Palliative treatment with radiation – emitting metallic stents in unresectable Bismuth type III or IV hilar cholangiocarcinoma // *ESMO Open.* – 2017. – № 2.
234. Luvira V., Satitkarnmanee E., Pugkhem A., Kietpeerakool C., Lumbiganon P., Pattanittum P. Postoperative adjuvant chemotherapy for resectable cholangiocarcinoma // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2021. – № 9.
235. Ma M.X., Jayasekeran V., Chong A.K. Benign biliary strictures: prevalence, impact, and management strategies // *Clin Exp Gastroenterol.* – 2019. – № 12. – P. 83–92.
236. Macken E., Drijkoningen M., Van Aken E., Van Steenberghe W. Brush cytology of ductal strictures during ERCP // *Acta Gastroenterol Belg.* – 2000. – № 63. – P. 254–259.
237. Madhusudhan K.S., Gamanagatti S., Srivastava D.N., Gupta A.K. Radiological interventions in malignant biliary obstruction // *World J Radiol.* – 2016. – № 8(5). – P. 518–529.
238. Mahadevan A., Dagoglu N., Mancias J., Raven K., Khwaja K., Tseng J.F. et al. Stereotactic Body Radiotherapy (SBRT) for Intrahepatic and Hilar Cholangiocarcinoma // *J Cancer.* – 2015. – № 6. – P. 1099–1104.
239. Maillot N., Aucher P., Robert S., et al. Polyethylene stent blockage: a porcine model // *Gastrointest Endosc.* – 2000. – № 51. – P. 12–18.
240. Maitland D.J. Optical properties of human gallbladder tissue and bile // *Appl. Opt.* – 1993. – № 32(4). – P. 586–591.
241. Mansfield J.C., Griffin S.M., Wadehra V, Matthewson K. A prospective evaluation of cytology from biliary strictures // *Gut.* – 1997. – № 40. – P. 671–677.
242. Marin J.G., Lozano E., Briz O., Al-Abdulla R., Serrano M.A., Macias R.I.R. Molecular bases of chemoresistance in cholangiocarcinoma // *Curr. Drug Targets.* – 2015.
243. Martin E.K., Bhutiani N., Egger M.E., Philips P., Scoggins C.R., McMasters K.M., et al. Safety and Efficacy of Irreversible Electroporation in the Treatment of

- Obstructive Jaundice in Advanced Hilar Cholangiocarcinoma // HPB (Oxford). – 2018. – № 20. – P. 1092–1097.
244. Massani M. et al. Isolation and characterization of biliary epithelial and stromal cells from resected human cholangiocarcinoma: a novel in vitro model to study tumor-stroma interactions // *Oncol. Rep.* – 2013. – № 30. – P. 1143–1148.
245. McCaughan J.S., Mertens B.F., Cho C., et al. Photodynamic therapy to treat tumors of the extrahepatic biliary ducts. A case report // *Arch. Surg.* – 1991. – Vol. 126. – P. 111–113
246. Meining A., Chen Y.K., Pleskow D., et al. Direct visualization of indeterminate pancreaticobiliary strictures with probe-based confocal laser endomicroscopy: a multicenter experience // *Gastrointest Endosc.* – 2011. – № 74. – P. 961–968.
247. Mendoza-Garcia J. Ex vivo evaluation of the effect of photodynamic therapy on skin scars and striae distensae / J. Mendoza-Garcia et al. // *Photodermatol photoimmunol photomed.* – 2015. – № 31. – P. 239–251.
248. Miserocchi G., Mercatali L., Liverani C., De Vita A., Spadazzi C., Pieri F., Bongiovanni A., Recine F., Amadori D., Ibrahim T. Management and potentialities of primary cancer cultures in preclinical and translational studies // *J Transl Med.* – 2017. – № 15(1). – P. 229.
249. Moghissi K., Dixon K., Thorpe J.A.C., Stringer M.R. Photodynamic therapy in early central lung cancer: a treatment option for patients ineligible for surgical resection // *Thorax.* – 2007. – Vol. 65. – P. 391–395
250. Mohkam K., Malik Y., Derosas C., Isaac J., Marudanayagam R., Mehrzad H., Mirza D.F., Muiesan P., Roberts K.J., Sutcliffe R.P. Percutaneous transhepatic cholangiographic endobiliary forceps biopsy versus endoscopic ultrasound fine needle aspiration for proximal biliary strictures: a single-centre experience // *HPB.* – 2017. – Vol. 19. – Iss. 6. – P. 530–537.
251. Molnar W., Stockum A.E. Relief of obstructive jaundice through percutaneous transhepatic catheter: a new therapeutic method // *Am. J. Roentgenol. Radium. Ther. Nucl. Med.* – 1974. – Vol. 122. – P. 356–367.
252. Moole H., Dharmapuri S., Duvvuri A., et al. Endoscopic versus Percutaneous Biliary Drainage in Palliation of Advanced Malignant Hilar Obstruction: A Meta-Analysis and Systematic Review // *Canad J Gastroenterol and Hepatol.* – 2016. – № 8. – P. 1–8.
253. Moole H., Tathireddy H.T., Dharmapuri S., Moole V., Boddireddy R., Yedama P., Dharmapuri S., Uppu A., Bondalapati N., Duvvuri A.. Success of photodynamic therapy in palliating patients with nonresectable cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis // *World J Gastroenterol.* – 2017. – № 23(7). – P. 1278–1288.

254. Morizane C., Okusaka T., Mizusawa J., Katayama H., Ueno M., Ikeda M. et al. Combination gemcitabine plus S-1 versus gemcitabine plus cisplatin for advanced/recurrent biliary tract cancer: the FUGA-BT (JCOG1113) randomized phase III clinical trial // *Ann Oncol.* – 2019. – № 30. – P. 1950–1958.
255. Mroz P., Vatansever F., Muchowicz A., Hamblin M.R. Photodynamic therapy of murine mastocytoma induces specific immune responses against the cancer/testis antigen P1A // *Cancer Res.* – 2013. – № 73. – P. 6462–6470.
256. Mroz P., Yaroslavsky A., Kharkwal G.B., Hamblin M.R. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer // *Cancers.* – 2011. – Vol. 3. – P. 2516–2539.
257. Mukewar S., Gupta A., Baron T.H., Gores G., Furutani K., Haddock M.G., et al. Endoscopically inserted nasobiliary catheters for high dose-rate brachytherapy as part of neoadjuvant therapy for perihilar cholangiocarcinoma // *Endoscopy.* – 2015. – № 47(10). – P. 878–883.
258. Murakami Y, Uemura K, Sudo T, Hashimoto Y, Nakashima A, Kondo N, Sakabe R, Ohge H, Sueda T. Prognostic factors after surgical resection for intrahepatic, hilar, and distal cholangiocarcinoma // *Ann Surg Oncol.* – 2011. – № 18(3). – P. 651–658.
259. Nachabé R. Effect of bile absorption coefficients on the estimation of liver tissue optical properties and related implications in discriminating healthy and tumorous samples // *Biomedical optics express.* – 2011. – № 2(3). – P. 600–614.
260. Nagino M. Surgical Treatment of Perihilar Cholangiocarcinoma: Resection or Transplant? // *Ann Surg.* – 2018. – № 267. – P. 806–807.
261. Nagino M., Ebata T., Yokoyama Y., Igami T., Sugawara G., Takahashi Y., Nimura Y. Evolution of surgical treatment for perihilar cholangiocarcinoma: a single-center 34-year review of 574 consecutive resections // *Ann Surg.* – 2013. – № 258. – P. 129–140.
262. Nagino M., Takada T., Miyazaki M., Miyakawa S., Tsukada K., Kondo S., Furuse J., Saito H., Tsuyuguchi T., Yoshikawa T., Ohta T., Kimura F., Ohta T., Yoshitomi H., Nozawa S., Yoshida M., Wada K., Amano H., Miura F. Preoperative biliary drainage for biliary tract and ampullary carcinoma // *J. HPB Surg.* – 2008. – № 15 (1). – P. 25–30.
263. Naitoh I., Nakazawa T., Kato A., Hayashi K., Miyabe K., Shimizu S., Kondo H., Nishi Y., Yoshida M., Umemura S., Hori Y., Kuno T., Takahashi S., Ohara H., Joh T. Predictive factors for positive diagnosis of malignant biliary strictures by transpapillary brush cytology and forceps biopsy // *J Dig Dis.* – 2016. – № 17(1). – P. 44–51.
264. Nakahara K., Michikawa Y., Morita R., et al. Diagnostic ability of endoscopic bile cytology using a newly designed biliary scraper for biliary strictures // *Dig Dis Sci.* – 2019. – № 64. – P. 241–248.

265. Nakai Y., Isayama H., Wang H.P., Rerknimitr R., Khor C., Yasuda I., Kogure H., Moon J.H., Lau J., Lakhtakia S., Ratanachu-Ek T., Seo D.W., Lee D.K., Makmun D., Dy F., Liao W.C., Draganov P.V., Almadi M., Irisawa A., Katanuma A., Kitano M., Ryozaawa S., Fujisawa T., Wallace M.B., Itoi T., Devereaux B. International consensus statements for endoscopic management of distal biliary stricture // *J Gastroenterol Hepatol.* – 2020. – № 35(6). – P. 967–979.
266. Nakanuma Y., Sato Y., Harada K., Sasaki M., Xu J., Ikeda H. Pathological classification of intrahepatic cholangiocarcinoma based on a new concept // *World J Hepatol.* – 2010. – № 2(12). – P. 419–427.
267. Nakeeb A., Pitt H.A. Radiation therapy, chemotherapy and chemoradiation in hilar cholangiocarcinoma // *HPB (Oxford).* – 2005. – № 7(4). – P. 278–282.
268. Nanashima A., Hiyoshi M., Imamura N., Yano K., Hamada T., Kai K. Recent Advances in Photodynamic Imaging and Therapy in Hepatobiliary Malignancies: Clinical and Experimental Aspects // *Curr. Oncol.* – 2021. – № 28.
269. Navaneethan U., Njei B., Lourdusamy V., Konjeti R., Vargo JJ, Parsi MA. Comparative effectiveness of biliary brush cytology and intraductal biopsy for detection of malignant biliary strictures: a systematic review and meta-analysis // *Gastrointest Endosc.* – 2015. – № 81(1). – P. 168–176.
270. Nennstiel S., Weber A., Frick G., Haller B, Meining A., Schmid R.M., Neu B. Drainage-related Complications in Percutaneous Transhepatic Biliary Drainage: An Analysis Over 10 Years // *J Clin Gastroenterol.* – 2015. – № 49(9). – P. 764–770.
271. Nimura Y. Staging cholangiocarcinoma by cholangioscopy // *HPB.* – 2008. – № 10. – P. 113–115.
272. Okumoto T., Sato A., Yamada T., Takase K., Matsushashi T., Tsuda M., Seiji K., Ishibashi T., Higano S., Katayose Y., Unno M., Takahashi S. Correct diagnosis of vascular encasement and longitudinal extension of hilar cholangiocarcinoma by four-channel multidetector-row computed tomography // *Tohoku J Exp Med.* – 2009. – № 217(1). – P. 1–8.
273. Oleinick N.L., Evans H.H. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms // *Radiat. Res.* – 1998. – Vol. 150 (5 Suppl.). – P. 146–156.
274. Oleinick N.L., Morris R.L., Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2002. – № 1. – P. 1–21.
275. Ordonez N.G. Application of mesothelin immunostaining in tumor diagnosis // *Am J Surg Pathol.* – 2003. – № 27. – P. 1418–1428.
276. Ortner M.A., Caca K., Berr F., et al. Successful photodynamic therapy for nonresectable cholangiocarcinoma: a randomized prospective study // *Gastroenterology.* – 2003. – Vol. 125. – P. 1355–1366.

277. Ortner M.E., Caca K., Berr F., Liebetruh J., Mansmann U., Huster D., Voderholzer W., Schachschal G., Mössner J., Lochs H. Successful photodynamic therapy for nonresectable cholangiocarcinoma: a randomized prospective study // *Gastroenterology*. – 2003. – № 125 (5). – P. 1355–1363.
278. Ortner M.A., Liebetruh J., Schrejber S., et al. Photodynamic therapy of nonresectable cholangiocarcinoma // *Gastroenterology*. – 1998. – Vol. 114(3). – P. 536–542.
279. Osnes M., Serck-Hanssen A., Myren J. Endoscopic retrograde brush cytology (ERBC) of the biliary and pancreatic ducts // *Scand J Gastroenterol*. – 1975. – P. 10. – P. 829–831.
280. Pandey R.K., Dougherty T.J., Kessel D. (ed.). Handbook of photodynamic therapy: updates on recent applications of porphyrin-based compounds. – World Scientific, 2016.
281. Papayan G., Goncharov S., Kazakov N., Strui A., Akopov A. Clinical potential of photodynamic diagnosis and therapy of tracheobronchial malignancies in the visible and infrared spectral ranges // *Translational Biophotonics*. – 2020. – Vol. 2, Iss. 2.
282. Park D.H., Lee S.S., Park S.E., Lee J.L., Choi J.H., Choi H.J. et al. Randomised phase II trial of photodynamic therapy plus oral fluoropyrimidine, S-1, versus photodynamic therapy alone for unresectable hilar cholangiocarcinoma // *Eur J Cancer*. – 2014. – № 50. – P. 1259–1268.
283. Park H.J., Kim Y.K., Park M.J., Lee W.J. Small intrahepatic mass-forming cholangiocarcinoma: target sign on diffusion-weighted imaging for differentiation from hepatocellular carcinoma // *Abdom Imaging*. – 2013. – № 38(4). – P. 793–801.
284. Park J., Kim M.H., Kim K.P., Park do H., Moon S.H., Song T.J., et al. Natural history and prognostic factors of advanced cholangiocarcinoma without surgery, chemotherapy, or radiotherapy: a large-scale observational study // *Gut Liver*. – 2009. – P. 298–305.
285. Perdue D.G., Freeman M.L., DiSario J.A., et al. Plastic versus self-expanding metallic stents for malignant hilar biliary obstruction: a prospective multicenter observational cohort study // *J Clin Gastroenterol*. – 2008. – № 42. – P. 1040–1046.
286. Pereira P., Santos S., Morais R., Gaspar R., Rodrigues-Pinto E., Vilas-Boas F., Macedo G. Role of Peroral Cholangioscopy for Diagnosis and Staging of Biliary Tumors // *Dig Dis*. – 2020. – № 38. – P. 431–439.
287. Pereira P., Vilas-Boas F., Peixoto A., Andrade P., Lopes J., Macedo G. How SpyGlass May Impact Endoscopic Retrograde holangiopancreatography Practice and Patient Management // *GE Port J Gastroenterol*. – 2018. – № 25. – P. 132–137.

288. Pereira S.P., Aithal G.P., Ragnath K., Devlin J., Owen F., Meadows H. Safety and long term result of porfimer sodium photodynamic therapy in locally advanced bile duct carcinoma // *Photodiagnosis Photodyn Ther.* – 2012. – № 9. – P. 287–292.
289. Petrowsky H., Wildbrett P., Husarik D.B., Hany T.F., Tam S., Jochum W., Clavien P.A. Impact of integrated positron emission tomography and computed tomography on staging and management of gallbladder cancer and cholangiocarcinoma // *J Hepatol.* – 2006. – № 45(1). – P. 43–50.
290. Pizova K., Tomankova K., Daskova A., Binder S., Bajgar R., Kolarova H.. Photodynamic therapy for enhancing antitumour immunity // *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* – 2012. – № 156. – P. 93–102.
291. Pogue B.W. et al. Revisiting photodynamic therapy dosimetry: reductionist & surrogate approaches to facilitate clinical success // *Physics in Medicine & Biology.* – 2016. – T. 61. – №.7. – P. 57.
292. Pogue B.W. Review of Neurosurgical Fluorescence Imaging Methodologies / B.W. Pogue, S. Gibbs-Strauss, P.A. Valdés, K. Samkoe, D.W. Roberts, K.D. Paulsen // *IEEE J Sel Top Quantum Electron.* – 2010. - № 16. – P. 493–505.
293. Ponchon T., Gagnon P., Berger F., Labadie M., Liaras A., Chavaillon A., Bory R. Value of endobiliary brush cytology and biopsies for the diagnosis of malignant bile duct stenosis: results of a prospective study // *Gastrointest Endosc.* – 1995. – № 42. – P. 565–572.
294. Primrose J.N., Fox R.P., Palmer D.H., Malik H.Z., Prasad R., Mirza D. et al. Capecitabine compared with observation in resected biliary tract cancer (BILCAP): a randomised, controlled, multicentre, phase 3 study // *Lancet Oncol.* – 2019. – № 20. – P. 663–673.
295. Pugliese V., Conio M., Nicolo G., Saccomanno S., Gatteschi B. Endoscopic retrograde forceps biopsy and brush cytology of biliary strictures: a prospective study // *Gastrointest Endosc.* – 1995. – № 42. – P. 520–526.
296. Putra J., de Abreu F.B., Peterson J.D., et al. Molecular profiling of intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma using next-generation sequencing // *Exp Mol Pathol.* – 2015. – № 99. – P. 240–244.
297. Rahnemai-Azar A.A., Abbasi A., Acher A.W, et al. Emerging pathways for precision medicine in management of cholangiocarcinoma // *Surg Oncol.* – 2020. – № 35. – P. 47–55.
298. Raju R.P., Jaganmohan S.R., Ross W.A., et al. Optimum palliation of inoperable hilar cholangiocarcinoma: comparative assessment of the efficacy of plastic and self-expanding metal stents // *Dig Dis Sci.* – 2011. – № 56. – P. 1557–1564.
299. Razumilava N., Gores G.J. Cholangiocarcinoma // *Lancet.* – 2014. – № 383. – P. 2168–2179.

300. Rerknimitr R., Angsuwatcharakon P., Ratanachu-ek T., Khor C.J., Ponnudurai R., Moon J.H., Seo D.W., Pantongrag-Brown L., Sangchan A., Pisespongsa P., Akaraviputh T., Reddy N.D., Maydeo A., Itoi T., Pausawasdi N., Punamiya S., Attasaranya S., Devereaux B., Ramchandani M., Goh K.L. Asia-Pacific Working Group on Hepatobiliary Cancers. Asia-Pacific consensus recommendations for endoscopic and interventional management of hilar cholangiocarcinoma // *J Gastroenterol Hepatol.* – 2013. – № 28(4). – P. 593–607.
301. Reshetov I.V., Fatyanova A.C., Babaeva Y.V., Denisenko M.V., Romanko Y.S. Modern aspects of photodynamic therapy of actinic keratosis // *Biomedical Photonicsthis link is disabled.* – 2019. – № 8(2). – P. 25–30.
302. Riener M.O., Fritzsche F.R., Clavien P.A., et al. IMP3 expression in lesions of the biliary tract: a marker for high-grade dysplasia and an independent prognostic factor in bile duct carcinomas // *Hum Pathol.* – 2009. – № 40. – P. 1377–1383.
303. Rimola J., Forner A., Reig M., Vilana R., de Lope C.R., Ayuso C., Bruix J. Cholangiocarcinoma in cirrhosis: absence of contrast washout in delayed phases by magnetic resonance imaging avoids misdiagnosis of hepatocellular carcinoma // *Hepatology.* – 2009. – № 50. – P. 791–798.
304. Rizvi S., Khan S.A., Hallemeier C.L., Kelley R.K., Gores G.J. Cholangiocarcinoma – evolving concepts and therapeutic strategies // *Nat Rev Clin Oncol.* – 2018. – № 15(2). – P. 95–111.
305. Rompianesi G., Di Martino M., Gordon-Weeks A., Montalti R., Troisi R.. Liquid biopsy in cholangiocarcinoma: Current status and future perspectives // *World J Gastrointest Oncol.* – 2021. – № 13(5). – P. 332–350.
306. Roos E., Strijker M., Franken L.C., Busch O.R., van Hooft J.E., Klumpen H.J. et al. Comparison of short- and long-term outcomes between anatomical subtypes of resected biliary tract cancer in a Western high-volume center // *HPB (Oxford).* –2020. – № 22. – P. 405–414.
307. Rosen C.B., Heimbach J.K., Gores G.J. Liver transplantation for cholangiocarcinoma // *Transpl Int.* – 2010. – № 23. – P. 692–697.
308. Ruys A.T., van Beem B.E., Engelbrecht M.R., et al. Radiological staging in patients with hilar cholangiocarcinoma: a systematic review and meta-analysis // *Br J Radiol.* – 2012. – № 85. – P. 1255–1262.
309. Sahai P, Kumar S. External radiotherapy and brachytherapy in the management of extrahepatic and intrahepatic cholangiocarcinoma: available evidence // *Br J Radiol.* – 2017. – № 90.
310. Sahai V., Catalano P.J., Zalupski M.M., Lubner S.J., Menge M.R., Nimeiri H.S. et al. Nab-Paclitaxel and Gemcitabine as First-line Treatment of Advanced or Metastatic

- Cholangiocarcinoma: A Phase 2 Clinical Trial. – JAMA Oncol. – 2018. – № 4. – P. 1707–1712.
311. Sakamoto Y., Kokudo N., Matsuyama Y., Sakamoto M., Izumi N., Kadoya M. et al. Proposal of a new staging system for intrahepatic cholangiocarcinoma: Analysis of surgical patients from a nationwide survey of the Liver Cancer Study Group of Japan // *Cancer*. – 2016. – № 122. – P. 61–70.
312. Sallinen V., Siren J., Makisalo H., Lehtimäki T.E., Lantto E., Kokkola A. et al. Differences in Prognostic Factors and Recurrence Patterns After Curative-Intent Resection of Perihilar and Distal Cholangiocarcinomas // *Scand J Surg*. – 2020. – № 109. – P. 219–227.
313. Sapisochin G., Facciuto M., Rubbia-Brandt L., Marti J., Mehta N., Yao F.Y. et al. Liver transplantation for «very early» intrahepatic cholangiocarcinoma: International retrospective study supporting a prospective assessment // *Hepatology*. – 2016. – № 64. – P. 1178–1188.
314. Sasahira N., Hamada T., Togawa O., Yamamoto R., Iwai T., Tamada K., Kawaguchi Y., Shimura K., Koike T., Yoshida Y., Sugimori K., Ryozaawa S., Kakimoto T., Nishikawa K., Kitamura K., Imamura T., Mizuide M., Toda N., Maetani I., Sakai Y., Itoi T., Nagahama M., Nakai Y., Isayama H. Multicenter study of endoscopic preoperative biliary drainage for malignant distal biliary obstruction // *World J. Gastroenterol.* – 2016. – № 22 (14). – P. 3793–3802.
315. Schwartz J.J. Using the modern Silverhawk atherectomy catheter to characterize biliary structures that appear malignant: review of initial experience / J.J. Schwartz, H. Thiesset, F. Clayton, et al. // *HPB (Oxford)*. – 2011. – Vol. 13. – № 11. – P. 823–829.
316. Selvaggi S.M. Biliary brushing cytology // *Cytopathology*. – 2004. – № 15. – P. 74–79.
317. Seo H., Lee J.M., Kim I.H., Han J.K., Kim S.H., Jang J.Y., Kim S.W., Choi B.I. Evaluation of the gross type and longitudinal extent of extrahepatic cholangiocarcinomas on contrast-enhanced multidetector row computed tomography // *J Comput Assist Tomogr.* – 2009. – № 33(3). – P. 376–382.
318. Shah B.B., Goenka M.K. Approach to management of indeterminate biliary stricture // *Adv Res Gastroentero Hepatol.* – 2018. – № 10. – P. 86–90.
319. Shao J., Fang H., Li G., He J., Wang B., Sun, J. Percutaneous transhepatic biliary drainage and stenting for malignant obstructive jaundice: A report of two cases // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2015. – Vol. 10. – № 4. – P. 1503–1506.
320. Shieh F.K., Drumm H., Nathanson M.H., et al. High-definition confocal endomicroscopy of the common bile duct // *J Clin Gastroenterol.* – 2012. – № 46. – P. 401–406.



321. Shinohara K., Ebata T., Shimoyama Y., Mizuno T., Yokoyama Y., Yamaguchi J., Onoe S., Watanabe N., Nagino M. A Study on Radial Margin Status in Resected Perihilar Cholangiocarcinoma // *Ann Surg.* – 2021. – № 273(3). – P. 572–578.
322. Shinohara E.T., Mitra N., Guo M., Metz J.M. Radiation therapy is associated with improved survival in the adjuvant and definitive treatment of intrahepatic cholangiocarcinoma // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* – 2008. – № 72. – P. 1495–501.
323. Shiryayev A. et al. Investigated spectral-fluorescent properties of endogenous porphyrins of the wild boar hepatobiliary system optimize the diagnostics and treatment of cholangiocarcinoma with FD and PDT // *Optical Engineering.* – 2020. – T. 59. – № 6.
324. Shiryayev A.A., Efendiev K.T., Kornev D.O., Samoylova S.I., et al. Photodynamic therapy of classic Kaposi's sarcoma with video-fluorescence control // *Photodiagnosis Photodyn Ther.* – 2021. – № 35. – P. 102378.
325. Shroff R.T., Kennedy E.B., Bachini M., Bekaii-Saab T., Crane C., Edeline J., El-Khoueiry A., Feng M., Katz MHG., Primrose J., Soares H.P., Valle J., Maithel S.K.. Adjuvant Therapy for Resected Biliary Tract Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline // *J Clin Oncol.* – 2019. – № 37(12). – P. 1015–1027.
326. Sioulas A.D., El-Masry M.A., Groth S. et al. Prospective evaluation of the short access cholangioscopy for stone clearance and evaluation of indeterminate strictures // *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* – 2017. – № 16. – P. 96–103.
327. Sirica A.E., Gores G.J., Groopman J.D., Selaru F.M., Strazzabosco M., Wei Wang X., Zhu A.X. Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Continuing Challenges and Translational Advances // *Hepatology.* – 2019. – № 69(4). – P. 1803–1815.
328. Skowronek J., Zwierzchowski G. Brachytherapy in the treatment of bile duct cancer – a tough challenge // *J Contemp Brachyther.* – 2017. – № 9(2). – P. 187–195.
329. Slivka A., Gan I., Jamidar P., et al. Validation of the diagnostic accuracy of probe-based confocal laser endomicroscopy for the characterization of indeterminate biliary strictures: results of a prospective multicenter international study // *Gastrointest Endosc.* – 2015. – № 81. – P. 282–290.
330. Smits M., Huibregtse K., Tytgat G. Results of the new nitinol self-expandable stents for distal biliary structures // *Endoscopy.* – 1995. – № 27. – P. 505–508.
331. Soehendra N., Reynders-Frederix V. Palliative bile duct drainage – a new endoscopic method of introducing a transpapillary drain // *Endoscopy.* – 1980. – № 12(1). – P. 8–11.
332. Sofi A.A., Khan M.A., Das A., Sachdev M., Khuder S., Nawras A. Radiofrequency ablation combined with biliary stent placement versus stent placement alone for malignant biliary strictures: a systematic review and meta-analysis // *Gastrointest Endosc.* – 2018. – № 87.

333. Staub J., Siddiqui A., Murphy M., et al. Unilateral versus bilateral hilar stents for the treatment of cholangiocarcinoma: a multicenter international study // *Ann Gastroenterol.* – 2020. – № 33. – P. 202–209.
334. Steimers A., Gramer M., Ebert B., Füchtemeier M., Royl G., Leithner C., Dreier J.P., Lindauer U., Kohl-Bareis M. Imaging of cortical haemoglobin concentration with RGB reflectometry // *Proc. SPIE.* – 2009.
335. Stern N., Sturgess R. Endoscopic therapy in the management of malignant biliary obstruction // *Eur J Surg Oncol.* – 2008. – № 34. – P. 313–317.
336. Stewart C.J., Burke G.M. Value of p53 immunostaining in pancreatobiliary brush cytology specimens // *Diagn Cytopathol.* – 2000. – № 23. – P. 308–313.
337. Strijker M, Belkouz A., van der Geest L.G, van Gulik T.M., van Hooft J.E., de Meijer V.E., Haj Mohammad N., de Reuver P.R., Verheij J., de Vos-Geelen J., Wilmink J.W., Groot Koerkamp B., Klümper H.J., Besselink M.G. Dutch Pancreatic Cancer Group. Treatment and survival of resected and unresected distal cholangiocarcinoma: a nationwide study // *Acta Oncol.* – 2019. – № 58(7). – P. 1048–1055.
338. Sun B., Hu B. The role of intraductal ultrasonography in pancreatobiliary diseases // *Endosc Ultrasound.* – 2016. – № 5(5). – P. 291–299.
339. Susak Y.M., Palytsya R.Y., Markulan L.M., Dyrda O.O. Palliative surgical treatment of patients, suffering proximal tumoral affection of biliary ducts and the jaundice syndrome // *Klinicheskaia khirurgiia.* – 2020. – № 87. – P. 40–47.
340. Talreja J.P., Degaetani M., Ellen K., Schmitt T., Gaidhane M., Kahaleh M. Photodynamic therapy in unresectable cholangiocarcinoma: not for the uncommitted // *Clin Endosc.* – 2013. – № 46(4). – P. 390–394.
341. Talreja J.P., Sethi A., Jamidar P.A., et al. Interpretation of probe-based confocal laser endomicroscopy of indeterminate biliary strictures: is there any interobserver agreement? // *Dig Dis Sci.* – 2012. – № 57. – P. 3299–3302.
342. Tamada K., Ushio J., Sugano K. Endoscopic diagnosis of extrahepatic bile duct carcinoma: Advances and current limitations // *World J Clin Oncol.* – 2011. – № 2. – P. 203–216.
343. Tang Z., Yang Y., Meng W., Li X. Best option for preoperative biliary drainage in Klatskin tumor: a systematic review and metaanalysis // *Medicine (Baltimore).* – 2017. – № 96 (43). – P. 8372.
344. Tantau A.I., Mandrutiu A., Pop A., Zaharie R.D., Crisan D., Preda C.M., Tantau M. Voicu Mercea Extrahepatic cholangiocarcinoma: Current status of endoscopic approach and additional therapies // *World J Hepatol.* – 2021. – № 13(2). – P. 166–186.
345. Tascilar M., Sturm P.D., Caspers E, et al. Diagnostic p53 immunostaining of endobiliary brush cytology: preoperative cytology compared with the surgical specimen // *Cancer.* – 1999. – № 87. – P. 306–311.

346. Tol J.A.M., van Hooft J.E., Timmer R., Kubben F.J., van der Harst E., de Hingh I.H., Vleggaar F.P., Molenaar I.Q., Keulemans Y.C., Boerma D., Bruno M.J., Schoon E.J., van der Gaag N.A., Besselink M.G., Fockens P., van Gulik T.M., Rauws E.A., Busch O.R., Gouma D.J. Metal or plastic stents for preoperative biliary drainage in resectable pancreatic cancer // *Gut*. – 2016. – № 65 (12). – P. 1981–1987.
347. Trikudanathan G., Navaneethan U., Njei B., Vargo J.J., Parsi M.A. Diagnostic yield of bile duct brushings for cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis: a systematic review and meta-analysis // *Gastrointest Endosc*. – 2014. – № 79(5). – P. 783–789.
348. Tse F., Barkun J.S., Romagnuolo J., Friedman G., Bornstein J.D., Barkun A.N. Nonoperative imaging techniques in suspected biliary tract obstruction // *HPB (Oxford)*. – 2006. – № 8(6). – P. 409–425.
349. Tsen A., Barbara M., Rosenkranz L. Dilemma of elevated CA 19-9 in biliary pathology // *Pancreatology*. – 2018. – № 18. – P. 862–867.
350. Tsuchiya T., Yokoyama Y., Ebata T., et al. Randomized controlled trial on timing and number of sampling for bile aspiration cytology // *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. – 2014. – № 21. – P. 433–438.
351. Tyrrell J. S., Campbell S. M., Curnow A. The relationship between protoporphyrin IX photobleaching during real-time dermatological methyl- aminolevulinate photodynamic therapy (MAL- PDT) and subsequent clinical outcome // *Lasers in Surgery and Medicine*. – 2010. – Vol. 42. – № 7. – P. 613–619.
352. Tyrrell J., Paterson C., Curnow A. Regression analysis of protoporphyrin IX measurements obtained during dermatological photodynamic therapy // *Cancers*. – 2019. – Vol. 11. – № 1. – P. 72.
353. Tzerkovsky D.A. Multiple-field interstitial photodynamic therapy of subcutaneously transplanted cholangiocellular carcinoma RS-1 in rats / D.A. Tzerkovsky // *Exp Oncol*. – 2017. – № 39 (2). – P. 117–120.
354. Urban O., Vanek P., Zoundjiekpon V., Falt P. Endoscopic Perspective in Cholangiocarcinoma Diagnostic Process // *Gastroenterology Research and Practice Volume*. – 2019.
355. Valdés P.A. et al. Quantitative, spectrally-resolved intraoperative fluorescence imaging. // *Scientific Reports*. – 2012. – № 2 (798).
356. Valero V. 3rd, Cosgrove D., Herman J.M. et al. Management of perihilar cholangiocarcinoma in the era of multimodal therapy // *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. – 2012. – № 6 (4). – P. 481–495
357. Valle J.W., Lamarca A., Goyal L., Barriuso J., Zhu A.X. New Horizons for Precision Medicine in Biliary Tract Cancers // *Cancer Discov*. – 2017. – № 7. – P. 943–962.

358. Van Duijnhoven F.H., Jansen M.C., Junggeburst J.M.C., van Hillegersberg R., Rijken A.M., van Coevorden F. et al. Factors influencing the local failure rate of radiofrequency ablation of colorectal liver metastases // *Ann Surg Oncol.* – 2006. – № 13. – P. 651–658.
359. Van Vugt J.L.A., Gaspersz M.P., Coelen R.J.S., Vugts J., Labeur T.A., de Jonge J., Polak W.G., Busch O.R.C., Besselink M.G., IJzermans J.N.M., Nio CY, van Gulik TM, Willemsen FEJA, Groot Koerkamp B. The prognostic value of portal vein and hepatic artery involvement in patients with perihilar cholangiocarcinoma // *HPB (Oxford).* – 2018. – № 20(1). – P. 83–92.
360. Vicent S., Lieshout R., Saborowski A., et al. (2019). Experimental models to unravel the molecular pathogenesis, cell of origin and stem cell properties of cholangiocarcinoma // *Liver International.* – 2019. – № 39, 79–97.
361. Wakai T., Shirai Y., Sakata J., et al. Clinicopathological features of benign biliary strictures masquerading as biliary malignancy // *Am Surg.* – 2012. – № 78. P. 1388–1391.
362. Wamsteker E.J., Anderson M.A. Fluorescence in situ hybridization for the detection of malignant bile duct strictures: has FISH found a new pond? // *Am J Gastroenterol.* – 2004. – № 99. – P. 1682–1683.
363. Wang J.B. Therapeutic effect of photodynamic therapy using hematoporphyrin monomethyl ether (HMME) on human cholangiocarcinoma cell line QBC939 // *Neoplasma.* – 2010. – № 57(1). – P. 79–85.
364. Wang Q., Xu J., Geng R., Cai J., Li J., Xie C., Tang W., Shen Q., Huang W., Fan Q. High performance one-for-all phototheranostics: NIR-II fluorescence imaging guided mitochondria-targeting phototherapy with a single-dose injection and 808 nm laser irradiation // *Biomaterials.* – 2020. – Vol. 231.
365. Wang X. Photodynamic Therapy-Induced Apoptosis of Keloid Fibroblasts is Mediated by Radical Oxygen Species In Vitro / X. Wang et al. // *Clin Lab.* – 2015. – 61(9). – P. 1257-1266.
366. Wardell C.P., Fujita M, Yamada T., et al. Genomic characterization of biliary tract cancers identifies driver genes and predisposing mutations // *J Hepatol.* – 2018. – № 68. – P. 959–969.
367. Weber A., Schmid R.M., Prinz C. Diagnostic approaches for cholangiocarcinoma // *World J Gastroenterol.* – 2008. – № 14(26). – P. 4131–4136.
368. Weber A., von Weyhern C., Fend F., Schneider J., Neu B., Meining A., Weidenbach H., Schmid R.M., Prinz C. Endoscopic transpapillary brush cytology and forceps biopsy in patients with hilar cholangiocarcinoma // *World J Gastroenterol.* – 2008. – № 14. – P. 1097–1101.

369. Weinberg B.A., Xiu J., Lindberg M.R., et al. Molecular profiling of biliary cancers reveals distinct molecular alterations and potential therapeutic targets // *J Gastrointest Oncol.* – № 2019. – Vol. 10. – P. 652–662.
370. Weismüller T.J. Role of Intraductal RFA: A Novel Tool in the Palliative Care of Perihilar Cholangiocarcinoma // *Visc Med.* – 2021. – № 37. – P. 39–47.
371. Wentrup R., Winkelmann N., Mitroshkin A., Prager M., Voderholzer W., Schachschal G. et al. Photodynamic Therapy Plus Chemotherapy Compared with Photodynamic Therapy Alone in Hilar Nonresectable Cholangiocarcinoma // *Gut Liver.* – 2016. – № 10. – P. 470–475.
372. Wiedmann M., Caca K., Berr F., Schiefke I., Tannapfel A., Wittekind C., et al. Neoadjuvant photodynamic therapy as a new approach to treating hilar cholangiocarcinoma: a phase II pilot study // *Cancer.* – 2003. – № 97. – P. 2783–2790.
373. Wiggers J.K., Coelen R.J.S., Rauws E.A.J., et al. Preoperative endoscopic versus percutaneous transhepatic biliary drainage in potentially resectable perihilar cholangiocarcinoma (DRAINAGE trial): design and rationale of a randomized controlled trial // *BMC Gastroenterology.* – 2015. – № 15. – Vol. 20.
374. Wiggers J.K., Groot Koerkamp B., Coelen R.J., Doussot A., van Dieren S., Rauws E.A., Schattner M.A., van Lienden K.P., Brown K.T., Besselink M.G., van Tienhoven G., Allen P.J., Busch O.R., D'Angelica M.I., DeMatteo R.P., Gouma D.J., Kingham T.P., Verheij J., Jarnagin W.R., van Gulik T.M. Percutaneous preoperative biliary drainage for resectable perihilar cholangiocarcinoma: no association with survival and no increase in seeding metastases // *Ann. Surg. Oncol.* – 2015. – № 22 (3). – P. 1156–1163.
375. Wilson B.C., Patterson M.S., Lilge L. Implicit and explicit dosimetry in photodynamic therapy: a new paradigm // *Lasers in medical science.* – 1997. – Vol. 12. – № 3. – P. 182–199.
376. Xie C., Aloreidi K., Patel B., Ridgway T., Thambi-Pillai T., Timmerman G. et al. Indeterminate biliary strictures: a simplified approach // *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2018. – Vol. 12. – P. 189–199.
377. Xing G.S., Geng J.C., Han X.W., Dai J.H., Wu C.Y. Endobiliary brush cytology during percutaneous transhepatic cholangiodrainage in patients with obstructive jaundice // *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* – 2005. – № 4. – P. 98–103.
378. Yamashita H., Ebata T., Yokoyama Y., Igami T., Mizuno T., Yamaguchi J., Onoe S., Watanabe N., Ando M., Nagino M. Pleural dissemination of cholangiocarcinoma caused by percutaneous transhepatic biliary drainage during the management of resectable cholangiocarcinoma // *Surgery.* – 2018.
379. Yamashita Y., Ueda K., Kawaji Y., Tamura T., Itonaga M., Yoshida T., Maeda H., Magari H., Maekita T., Iguchi M., Tamai H., Ichinose M., Kato J. The Wire-

- Grasping Method as a New Technique for Forceps Biopsy of Biliary Strictures: A Prospective Randomized Controlled Study of Effectiveness // *Gut Liver*. – 2016. – № 10(4). – P. 642–648.
380. Yanagimoto H., Toyokawa H., Sakai D., Wada H., Satoi S., Yamamoto T. et al. A phase I study for adjuvant chemotherapy of gemcitabine plus S-1 in patients with biliary tract cancer undergoing curative resection without major hepatectomy (KHBO1202) // *Cancer Chemother Pharmacol*. – 2018. – № 81. – P. 461–468.
381. Yang L.-C., Shi H.-Y., Huang J.-W., Lee K.-T. Biliary stenting for unresectable cholangiocarcinoma: A population-based study of long-term outcomes and hospital costs in Taiwan // *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. – 2015. – Vol. 31. – Iss. 7. – P. 370–376.
382. Yang P.-C., Chen Y.-J., Li X.-Y., Hsiao C.-Y., Cheng B.-B., Gao Y., Zhou B.-Z., Chen S.-Y., Hu S.-Q., Zeng Q., Huang K.-W. Irreversible Electroporation Treatment With Intraoperative Biliary Stenting for Unresectable Perihilar Cholangiocarcinoma: A Pilot Study. – 2021.
383. Yeo M.K., Kim K.H., Lee Y.M., et al. The usefulness of adding p53 immunocytochemistry to bile drainage cytology for the diagnosis of malignant biliary strictures // *Diagn Cytopathol*. – 2017. – № 45. – P. 592–597.
384. Yin X., Li D.M., Yang F., Liu T.G., Xia F.F., Fu Y.F. Self-expanded metallic stent insertion for hilar cholangiocarcinoma: comparison of unilateral and bilateral stenting // *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. – 2019. – № 29. – P. 1501–1506.
385. Yoon K.A., Woo S.M., Kim Y.H., et al. Somatic mutations from whole exome sequencing analysis of the patients with biliary tract cancer // *Genomics Inform*. – 2018. – № 16. – P. 35.
386. Yoshida T., Hara K., Imaoka H. et al. Benefits of side-by-side deployment of 6-mm covered self-expandable metal stents for hilar malignant biliary obstructions // *J Hepatobiliary Pancreat. Sci*. – 2016. – № 23. – P. 548–555.
387. Yu L., Feng M., Kim H., et al. Mesothelin as a potential therapeutic target in human cholangiocarcinoma // *J Cancer*. – 2010. – № 1. – P. 141–149.
388. Zeller T. Long-term results after directional atherectomy of femoro-popliteal lesions / T. Zeller, A. Rastan, S. Sixt, et al. // *J Am Coll Cardiol*. – 2006. – Vol. 48. – Iss. 8. – P. 1573–1578.
389. Zhang C. Photodynamic therapy induces antifibrotic alterations in primary human vocal fold fibroblasts // *Laryngoscope*. – 2018. – № 128(9).
390. Zhang H., Yang T., Wu M., Shen F. Intrahepatic cholangiocarcinoma: Epidemiology, risk factors, diagnosis and surgical management // *Cancer Lett*. – 2016. – № 379. – P. 198–205.

391. Zhang X.-F., Beal E.W., Merath K., Ethun C.G., Salem A., Weber S.M., Tran T., Poultsides G., Son A.Y., Hatzaras I., Jin L., Fields R.C., Weiss M., Scoggins C., Martin R.C.G., Isom C.A., Idrees K., Mogal H.D., Shen P., Maithel S.K., Schmidt C.R., Pawlik T.M. Oncologic effects of preoperative biliary drainage in resectable hilar cholangiocarcinoma: Percutaneous biliary drainage has no adverse effects on survival. – 2018. – Vol.117. – Iss. 6. – P. 1267–1277.
392. Zhang Z.J., Huang Y.P., Li X.X., Liu Z.T., Liu K., Deng X.F., Xiong L., Zou H., Wen Y. A. Novel Ferroptosis-Related 4-Gene Prognostic Signature for Cholangiocarcinoma and Photodynamic Therapy // *Front Oncol.* – 2021. – № 11.
393. Zheng Q., et al. The contribution of reactive oxygen species to the photobleaching of organic fluorophores // *Photochemistry and photobiology.* – 2014. – Vol. 90. – № 2. – P. 448–454.
394. Zhimin G., Noor H., Jian-Bo Z., Lin W., Jha R.K. Advances in diagnosis and treatment of hilar cholangiocarcinoma – a review // *Med Sci Monit.* – 2013. – № 19. – P. 648–656.
395. Zhou W., Qian L., Rong Y., Zhou Q., Shan J., Li P. et al. Prognostic factors and patterns of recurrence after curative resection for patients with distal cholangiocarcinoma // *Radiother Oncol.* – 2020. – № 147. – P. 111–117.
396. Zhu A.X., Hezel A.F. Development of molecularly targeted therapies in biliary tract cancers: reassessing the challenges and opportunities // *Hepatology.* – 2011. – № 53. – P. 695–704.
397. Zoepf T., Jakobs R., Arnold J.C., Apel D., Riemann J.F. Palliation of nonresectable bile duct cancer: improved survival after photodynamic therapy // *Am J Gastroenterol.* – 2005. – № 100 (11). – P. 2426–2430.