

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики  
Российской академии наук»  
(ИПФ РАН)

На правах рукописи

ХИЛОВ Александр Владимирович

ДВУХВОЛНОВАЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ  
ДЛЯ ЗАДАЧ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Специальность: 1.3.4 Радиофизика

диссертация на соискание учёной степени  
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:  
к.ф.-м.н. М.Ю. Кириллин

Нижний Новгород

2022

# Оглавление

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>Глава 1. Аналитический обзор современного состояния в области флуоресцентной визуализации</b> .....	15
<b>1.1 Флуоресцентные методы визуализации</b> .....	15
<b>1.2 Многоволновая флуоресцентная визуализация</b> .....	19
<b>1.3 Оптические методы мониторинга фотодинамической терапии</b> .....	22
<b>1.4 Подходы к созданию фантомов биоткани</b> .....	24
<b>1.5 Выводы</b> .....	26
<b>Глава 2. Оценка локализации флуорофора в биоткани на основе двухволновой флуоресцентной визуализации</b> .....	27
<b>2.1 Расчёт оптических полей в биоткани в рамках уравнения переноса излучения</b> .....	27
<b>2.2 Аналитическая модель формирования флуоресцентных сигналов в системах флуоресцентной визуализации</b> .....	29
<b>2.3. Отношение флуоресцентных сигналов при двухволновой флуоресцентной визуализации и его связь с толщиной приповерхностного флуоресцентного слоя</b> .....	35
<b>2.4. Монте-Карло моделирование флуоресценции распределённого в биоткани флуорофора</b> .....	38
<b>2.5. Сравнение аналитической модели и результатов Монте-Карло моделирования</b> .....	40
<b>2.6. Исследование влияния оптических свойств биоткани на точность оценки локализации флуорофора</b> .....	43
<b>2.7. Монте-Карло моделирование флуоресценции фотосенсибилизатора, распределённого внутри биоткани, при внутривенном введении и поверхностном нанесении</b> .....	48
<b>2.8. Выводы</b> .....	58
<b>Глава 3. Апробация метода оценки локализации флуорофора в биоткани на основе двухволновой флуоресцентной визуализации в модельном эксперименте</b> .....	61
<b>3.1 Изготовление агаровых фантомов биоткани</b> .....	61
<b>3.2 Оптические свойства агаровых фантомов биоткани</b> .....	64
<b>3.3. Двухволновая флуоресцентная визуализация агаровых фантомов, имитирующих биоткани с введённым фотосенсибилизатором хлоринового ряда</b> .....	69
<b>3.4. Выводы</b> .....	77
<b>Глава 4. Двухволновой флуоресцентный мониторинг фотодинамической терапии с использованием фотосенсибилизаторов хлоринового ряда</b> .....	79
<b>4.1 Мониторинг фотодинамической терапии in vivo на интактной ткани лабораторных животных</b> .....	79
<b>4.2 Мониторинг фотодинамической терапии in vivo на опухолевой ткани лабораторных животных</b> .....	83
<b>4.3 Мониторинг фотодинамической терапии актинического кератоза в клинических условиях</b> .....	90

<b>4.4 Мониторинг фотодинамической терапии базальноклеточного рака кожи в клинических условиях .....</b>	<b>92</b>
<b>4.5 Обобщение результатов двухволнового флуоресцентного мониторинга фотодинамической терапии .....</b>	<b>96</b>
<b>4.6 Выводы.....</b>	<b>100</b>
<b>Заключение. Основные результаты .....</b>	<b>103</b>
<b>Список публикаций автора по теме диссертации.....</b>	<b>106</b>
<b>Список литературы .....</b>	<b>111</b>

## **ВВЕДЕНИЕ**

Традиционно применяемые для биомедицинской диагностики методы визуализации, а именно: ультразвуковое исследование (УЗИ) [1], компьютерная томография (КТ) [2, 3], магнитно-резонансная томография (МРТ) [4], позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) [5], характеризуются, как правило, относительно высокой стоимостью оборудования и длительностью исследовательской процедуры (КТ, МРТ, ПЭТ), небезопасностью методов, использующих ионизирующее излучение (КТ), низким контрастом при исследовании мягких тканей (УЗИ, КТ), что существенно ограничивает возможности их использования для мониторинга.

Мощным инструментом в диагностике биотканей является использование неионизирующего излучения видимого и ближнего инфракрасного (ИК) диапазонов длин волн (от 380 нм до 1400 нм) [6-8]. Несмотря на ограниченную глубину проникновения излучения данных диапазонов в биоткани, оптические методы хорошо зарекомендовали себя как в исследованиях на лабораторных животных, так и в клинической практике, поскольку обладают высокой чувствительностью к молекулярному составу и морфологическим особенностям биотканей. Так, метод оптической когерентной томографии (ОКТ), основанный на низкокогерентной рефлектометрии, позволяет визуализировать слоистую структуру биоткани толщиной порядка 1 мм, благодаря чему активно применяется, например, в офтальмологии [9], в диагностике опухолевых [10] и неопухолевых патологий [11]. Оптическая диффузионная спектроскопия (ОДС), основанная на регистрации многократно рассеянной компоненты света и последующей реконструкции коэффициентов поглощения и рассеяния биоткани, позволяет оценивать концентрации различных хромофоров (например, воды, жира, коллагена, окси- и дезоксигемоглобина) [12] и степень насыщения крови кислородом [13]. Гибридные оптические методы сочетают в себе оптический и дополнительный принцип визуализации, что позволяет повысить пространственное разрешение, ограниченное эффектами рассеяния, для

глубин более 1 мм. В частности, оптоакустическая (ОА) визуализация основана на регистрации ультразвуковых волн, генерируемых биотканью при поглощении её хромофорами коротких лазерных импульсов. Как и метод ОДС, спектроскопический ОА метод позволяет оценивать компонентный состав биоткани [14].

В настоящее время одним из наиболее активно развивающихся и широко применяющихся в биомедицинских приложениях [15-18] оптических методов неинвазивной диагностики биологических тканей является флуоресцентная визуализация (ФВ), основанная на способности ряда молекул (флуорофоров) переизлучать фотоны с длиной волны, большей длины волны поглощённого фотона (так называемый «стоксов сдвиг»). Одним из перспективных направлений применения ФВ в биомедицине является мониторинг процедуры фотодинамической терапии (ФДТ). ФДТ является современным, активно развивающимся терапевтическим методом лечения широкого спектра опухолевых и неопухолевых патологий [19, 20]. Суть процедуры ФДТ заключается во введении фотосенсибилизатора (ФС), селективно накапливающегося в тканях с повышенной микроциркуляторной активностью, и в последующем облучении целевых тканей излучением видимого диапазона, что приводит к активации ФС и запуску фотохимических реакций с образованием синглетного кислорода и цитотоксических продуктов, приводящих к гибели опухолевых клеток (апоптозу). Большинство ФС обладают флуоресцентными свойствами, что и делает целесообразным применение ФВ при планировании и проведении ФДТ. Таким образом, ФДТ воплощает в себе принципы так называемой тераностики, т.е. проведения терапии с одновременным диагностическим контролем.

Согласно современным протоколам ФДТ дозы ФС и светового облучения определяются эмпирическим путем, исходя лишь из типа опухоли, ее размеров и массы пациента при внутривенном введении препарата. Однако эффективность процедуры ФДТ зависит от множества других факторов, в том числе от поглощенной ФС световой дозы терапевтического излучения,

обусловленной распределением ФС в биоткани и характером распространения излучения оптического диапазона в биотканях различной локализации. Возможность контроля ряда параметров потенциально позволяет повысить эффективность процедуры и индивидуализировать лечение посредством корректировки режима воздействия, дозы ФС и дозы светового облучения.

При высоком контрасте накопления ФС в опухоли в сравнении с окружающими тканями ФВ позволяет осуществлять локализацию опухоли, что может являться важным этапом для оптимизации процедуры ФДТ [21]. При этом традиционно флуоресцентные исследования распределения флуорофоров в биоткани в основном связаны не с распределением препаратов по глубине, а с оценкой их распределения по поперечным координатам и усреднённой концентрации.

При использовании ФС с широкими спектрами поглощения и/или эмиссии целесообразным является использование различных длин волн возбуждения и/или детектирования флуоресценции и последующего анализа различий в регистрируемых флуоресцентных сигналах. Подобные исследования зачастую носят рациометрический характер: количественным критерием служит отношение флуоресцентных сигналов, соответствующих двум длинам волн возбуждения или эмиссии флуоресценции.

Дальнейшее совершенствование современных методов ФВ и переход от качественной к количественной визуализации требуют разработки недорогих и легко воспроизводимых стандартов для калибровки и валидации разрабатываемых методик. В связи с этим необходимым этапом является создание фантомов, которые имитируют оптические свойства исследуемой биоткани в широком спектральном диапазоне и её свойства при введении флуоресцентного маркера, а также сохраняют заданные оптические и структурные свойства на протяжении определенного времени. Традиционно фантомы биоткани изготавливаются на основе жировых эмульсий [22], однако такие фантомы являются жидкими, что накладывает ряд существенных

ограничений на возможность создания фантомов заданной формы, а также фантомов, содержащих флуоресцентные включения.

Таким образом, актуальной задачей флуоресцентных методов визуализации применительно к мониторингу ФДТ остаётся оценка локализации ФС в биоткани, а также разработка подходов к созданию флуоресцирующих фантомов биоткани для апробации разрабатываемых методов подобной оценки.

В связи с этим **целью** диссертационной работы явилась разработка и экспериментальная апробация метода оценки глубины локализации флуорофора в биоткани на основе данных двухволновой ФВ.

Для достижения поставленной цели были решены следующие **задачи**:

1. Разработка подходов к моделированию формирования флуоресцентных откликов от распределённых в биоткани флуорофоров. Задача включает в себя разработку аналитической и численной моделей для флуоресцентного отклика приповерхностного слоя биоткани с равномерным распределением флуорофора, а также верификацию результатов аналитического исследования путем численного моделирования методом Монте-Карло.

2. Разработка метода оценки локализации флуорофора внутри биоткани по глубине при двухволновой ФВ на основе анализа отношения флуоресцентных сигналов, соответствующих различным длинам волн возбуждения флуоресценции. Исследование влияния оптических свойств биоткани на возможность такой оценки. Адаптация метода на случай ФС хлоринового ряда при их поверхностном нанесении и внутривенном введении в биоткань перед проведением процедуры фотодинамической терапии.

3. Разработка подхода к изготовлению многослойных агаровых фантомов, имитирующих оптические свойства биоткани до и после введения ФС хлоринового ряда различными способами.

4. Апробация метода оценки локализации флуорофора в биоткани в модельном эксперименте на разработанных агаровых фантомах биоткани, имитирующих поверхностное нанесение и внутривенное введение ФС.

5. Апробация метода на экспериментальных данных двухволновой ФВ *in vivo* при проведении ФДТ с ФС хлоринового ряда на лабораторных животных и в клинических условиях. Исследование динамики отношения флуоресцентных сигналов, соответствующих различным длинам волн возбуждения в спектре поглощения ФС хлоринового ряда, при фотодинамическом воздействии в моно-режиме на терапевтических длинах волн 405 нм и 660 нм, а также в комбинированном режиме.

**Научная новизна** диссертации определяется полученными в ней оригинальными результатами:

1. В рамках полуэмпирической модели с использованием диффузионного приближения уравнения переноса излучения впервые получено аналитическое выражение для флуоресцентного отклика от равномерно распределённого в приповерхностном слое биоткани флуорофора, а также для отношения флуоресцентных сигналов, соответствующих различным длинам волн возбуждения флуоресценции в спектре поглощения флуорофора, равномерно распределенного в приповерхностном слое биоткани.

2. Предложен новый метод оценки глубины локализации флуорофора внутри биоткани, исключая необходимость калибровочных измерений и использующий отношение флуоресцентных сигналов для различных длин волн возбуждения флуоресценции.

3. Предложен новый подход к изготовлению многослойных флуоресцирующих агаровых фантомов, имитирующих оптические свойства кожи в диапазоне длин волн 400-1000 нм до и после поверхностного нанесения и внутривенного введения ФС хлоринового ряда, для задач планирования и мониторинга ФДТ.



4. В рамках серии *in vivo* экспериментов по мониторингу различных режимов ФДТ тканей лабораторных животных, а также актинического кератоза и базальноклеточного рака кожи человека в клинических условиях с использованием ФС хлоринового ряда впервые продемонстрированы различия в динамике отношения флуоресцентных сигналов, соответствующих длинам волн возбуждения 660 нм и 405 нм при ФДТ.

5. Предложенный метод оценки локализации флуорофора на основе данных двухволновой ФВ впервые позволил получить оценки средней глубины проникновения ФС хлоринового ряда в здоровую и патологическую кожу лабораторных животных и человека.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Полуэмпирическая аналитическая модель с использованием диффузионного приближения уравнения переноса излучения для формирования флуоресцентного сигнала в системах двухволновой ФВ позволяет рассчитать с погрешностью менее 10% относительно моделирования методом Монте-Карло флуоресцентный отклик от равномерно распределённого в приповерхностном слое кожи толщиной более 0,1 мм ФС хлоринового ряда при его возбуждении плоской волной на длинах волн 660 нм и 405 нм, а также отношение флуоресцентных сигналов, соответствующих этим длинам волн возбуждения.

2. Применение аналитической модели на основе диффузионного приближения при обработке данных двухволновой ФВ позволяет оценить толщину содержащего ФС хлоринового ряда приповерхностного слоя кожи в диапазоне от 0,1 до 2 мм, с точностью 0,1 мм; погрешность априорной оценки оптических свойств кожи в диапазоне 30% влечет дополнительную погрешность определения толщины слоя в пределах 30%.

3. Многослойные флуоресцирующие агаровые фантомы, изготовленные с использованием липофундина и красной туши, позволяют имитировать оптические свойства кожи *in vivo* до и после введения ФС хлоринового ряда с погрешностью коэффициента поглощения менее 5% в

диапазонах 520-560 нм и 760-800 нм и с погрешностью транспортного коэффициента рассеяния и менее 10% в диапазоне 450-700 нм и могут использоваться в модельных экспериментах по двухволновой ФВ за счёт существенной разницы коэффициента поглощения в синем и красном диапазонах длин волн.

4. Изменение отношения флуоресцентных сигналов, регистрируемых с помощью двухволновой ФВ при проведении ФДТ здоровой кожи и новообразований человека и лабораторных животных с терапевтической длиной волны 660 нм не превосходит 10%, а при использовании терапевтической длины волны 405 нм отношение возрастает на величину до 40% при поверхностном нанесении ФС и до 300% при внутривенном введении ФС, что обусловлено различиями в глубине проникновения терапевтического излучения в биоткань и в характере фотовыгорания ФС.

**Практическая значимость** диссертации состоит в следующем:

1. Предложенный метод оценки локализации флуорофора в биоткани на основе анализа отношения флуоресцентных сигналов, соответствующих различным длинам волн возбуждения, позволяет оценивать глубину локализации флуоресцирующего слоя биоткани. Разработанный метод позволит оценивать распределение ФС хлоринового ряда в биоткани, корректировать режим воздействия при назначении процедуры ФДТ с использованием ФС хлоринового ряда, а также оценивать эффективность процедуры при двухволновой ФВ. Включение метода в протоколы проведения ФДТ позволит существенно повысить их эффективность и персонализировать лечение.

2. Предложенный подход к созданию многослойных агаровых фантомов биоткани позволяет имитировать биоткани с различным способом введения в них ФС хлоринового ряда. Разработанные фантомы могут быть использованы в модельных экспериментах по планированию и мониторингу ФДТ с ФС хлоринового ряда.

**Личный вклад автора.** Все приведенные в диссертации результаты получены лично автором, либо при его непосредственном участии. Автор участвовал в разработке аналитических и численных моделей формирования сигналов в системах двухволновой ФВ, разработке подхода к созданию агаровых фантомов биоткани с флуоресцентными включениями, имитирующих биоткани при различном способе введения ФС, проведении экспериментов по двухволновой ФВ процедур ФДТ биотканей различных локализаций, численной и экспериментальной апробации разработанного метода оценки локализации флуорофора в биоткани.

**Достоверность** полученных результатов обеспечивается физически обоснованной постановкой задач ФВ, использованием общепринятых моделей при разработке алгоритмов и подтверждается численными, модельными и *in vivo* экспериментами.

**Краткое содержание работы.** Во введении обоснована актуальность работы, сформулированы цели и задачи диссертации, указаны научная новизна и практическая значимость диссертации, приведены основные положения, выносимые на защиту, а также краткое содержание работы.

В Главе 1 Диссертации представлен аналитический обзор современного состояния в области флуоресцентных методов визуализации, подходов к созданию фантомов биоткани и мониторинга процедуры ФДТ.

В Главе 2 Диссертации разработан метод оценки локализации флуорофора в биоткани на основе двухволновой рациометрической ФВ. В рамках диффузионного приближения уравнения переноса излучения (УПИ) получены аналитические выражения для флуоресцентного отклика от распределённого в приповерхностном слое биоткани флуорофора и отношения флуоресцентных сигналов, соответствующим двум длинам волн возбуждения флуоресценции [23]. На основе аналитического исследования, численного моделирования методом Монте-Карло и модельных экспериментов показано, что отношение сигналов флуоресценции, соответствующих различным длинам волн возбуждения ФС хлороинового

ряда, монотонно зависит от толщины приповерхностного флуоресцентного слоя, что может быть использовано для оценки локализации ФС внутри биоткани [24, 25]. Исследовано влияние оптических свойств биоткани на возможность подобной оценки. Результаты получены для распределения ФС внутри биоткани, соответствующих поверхностному и внутривенному введению ФС [26].

В Главе 3 Диссертации предложен подход к изготовлению агаровых фантомов, имитирующих реальные биоткани, а также биоткани с введением в них ФС хлоринового ряда [27], широко используемых при проведении ФДТ [28-31]. В качестве опорных параметров при изготовлении фантома по данным литературы выбраны измеренные *in vivo* спектральные характеристики кожи человека различных локализаций [32]. Соответствие спектров рассеяния и поглощения обеспечивалось добавлением суспензии липофундина в качестве рассеивателя и красной туши в качестве хромофора с выраженной дисперсией показателя поглощения. Изготовление содержащих ФС элементов основано на добавлении ФС во время жидкой фазы смеси компонентов. Продемонстрировано, что спектры поглощения и рассеяния фантомов хорошо согласуются с литературными данными для биотканей, в частности, для кожи человека в диапазоне 500-800 нм [32]. Продемонстрирована стабильность оптических характеристик фантомов в указанном диапазоне длин волн при длительном хранении в условиях, препятствующих высыханию (1 месяц), в пределах 10%-ного отклонения. Предложенный подход позволяет, в частности, осуществлять модельные эксперименты для решения задач планирования и мониторинга ФДТ.

В Главе 4 Диссертации представлены результаты апробации метода, предложенного в Главе 2 Диссертации, в *in vivo* экспериментах по ФДТ на лабораторных животных [30, 31, 33-39], а также в клинических условиях [40]. Получены типичные значения для отношения флуоресцентных сигналов при поверхностном и внутривенном введении ФС в организм, согласующиеся с результатами численного и аналитического исследования, представленного в

Главе 2. По полученным значениям осуществлены оценки глубины проникновения ФС хлоринового ряда в биоткань при поверхностном нанесении на здоровую и патологическую кожу различных локализаций. Результаты оценок согласуются с литературными данными о толщине эпидермиса соответствующих локализаций. Показано различие в динамике отношения флуоресцентных сигналов при осуществлении ФДТ на различных длинах волн воздействия, что позволяет оценивать глубину терапевтического воздействия при ФДТ эффективность проводимой процедуры.

**Публикации и апробация результатов.** По теме диссертации опубликовано 26 работ, из которых 10 статей в журналах, рекомендованных ВАК, 7 публикаций в сборниках трудов конференций, 9 публикаций в сборниках тезисов конференций.

Изложенные в диссертации результаты обсуждались на всероссийских и международных конференциях:

1. 9th International Graduate summer school Biophotonics '19 (10–17 June 2017, Island of Ven, Sweden);
2. European Conferences on Biomedical Optics (ECBO) (Munich, 25–29 June, 2017);
3. VI International Symposium TOPICAL PROBLEMS OF BIOPHOTONICS (28 July–03 August, 2017 St.-Petersburg – Nizhny Novgorod, Russia);
4. «Saratov Fall Meeting 2017» (September 26–29, 2017, Saratov, Russia);
5. Clinical and Translational Biophotonics (2018, Florida, United States, 3–6 April 2018);
6. 18th International Conference on Laser Optics (4–8 June, 2018, St.-Petersburg, Russia);
7. 4th International Conference CTCT–2018 - Current Trends in Cancer

Theranostics and 3rd General Meeting of COST Action CM1403 (1–5 July 2018, Trakai, Lithuania).

8. International Conference on Advanced Laser Technologies «ALT'18» (9–14 September 2018, Tarragona, Spain);

9. «Saratov Fall Meeting 2018» (September 24–29 2018, Saratov, Russia);

10. International Conference on Advanced Laser Technologies «ALT'19» (15-20 September 2019, Prague, Czech Republic);

11. European Conferences on Biomedical Optics 2019 (23 - 27 June 2019, Munich, Germany);

12. «Saratov Fall Meeting 2020» (28 September-2 October 2020, Saratov Russia);

13. 19th International Conference on Laser Optics (2–6 November, 2020, St.-Petersburg, Russia);

14. 4th Sechenov International Biomedical Summit 2020 (November 17-18 2020, Moscow, Russia);

15. European Conferences on Biomedical Optics 2021 (20 - 24 June 2021, Munich, Germany);

16. International Conference on Advanced Laser Technologies «ALT'21» (06-10 September 2021, Moscow, Russia);

17. «Saratov Fall Meeting 2021» (28 September – 1 October 2021, Saratov, Russia);

18. 20th International Conference on Laser Optics (20–24 June, 2022, St.-Petersburg, Russia)

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, четырёх глав, заключения и списка цитируемой литературы. Общий объем работы — 133 страницы, включая 42 рисунка, 2 таблицы и список цитируемой литературы из 181 наименования.

# Глава 1. Аналитический обзор современного состояния в области флуоресцентной визуализации

## 1.1 Флуоресцентные методы визуализации

Схематично суть явления флуоресценции представляется диаграммой Яблонского (рис. 1.1). Молекулы флуорофоров способны поглощать кванты света с длиной волны  $\lambda_{ex}$  в своем спектре поглощения, переходя из основного состояния  $S_0$  в возбуждённое состояние  $S_1^*$ . После перехода флуорофор безызлучательным образом теряет часть энергии, релаксируя к нижнему колебательному подуровню возбуждённого состояния  $S_1$ , а затем происходит переход к основному состоянию  $S_0$  с излучением кванта света на длине волны флуоресценции  $\lambda_{em}$ .

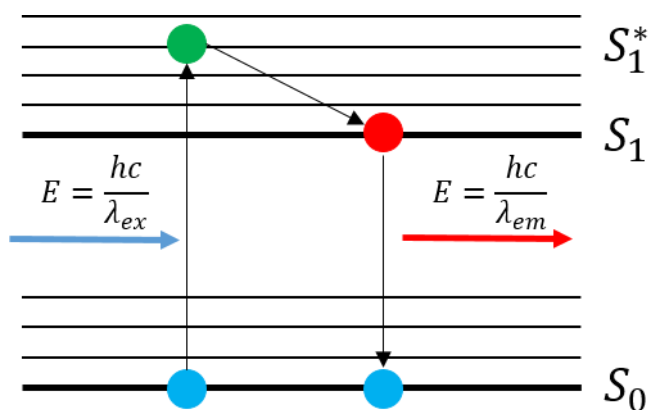


Рисунок 1.1. Схематичное изображение процессов поглощения света и флуоресценции (диаграмма Яблонского).

Из-за энергетических потерь при переходе на нижний колебательный подуровень, длина волны поглощённого фотона отличается от длины волны излучаемого фотона, что позволяет при проведении ФВ осуществлять регистрацию в диапазоне длин волн, отличном от длины волны возбуждения. Схема поверхностной ФВ представлена на рис. 1.2.

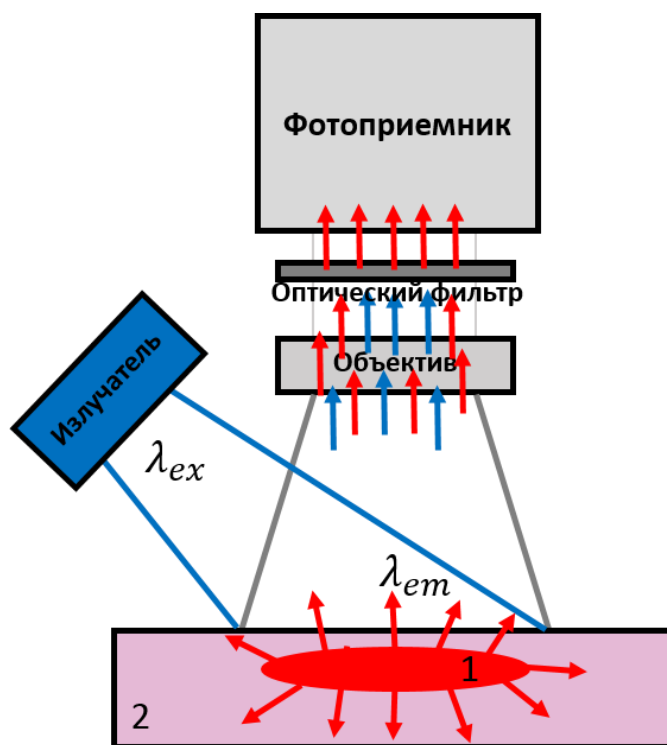


Рисунок 1.2. Схематичное изображение поверхностной флуоресцентной визуализации. 1 — флуоресцирующий объект, 2 — окружающая биоткань.

Для экспериментального получения флуоресцентного сигнала с целью последующего его анализа поверхность биоткани или модельной среды, меченой флуоресцентным маркером, облучается широким [41] или узконаправленным [42] пучком на длине волны  $\lambda_{ex}$  в спектре поглощения этого маркера, а затем флуоресцентный отклик на длине волны  $\lambda_{em}$  регистрируется фотоприемником (обычно матричным). Таким образом, основное преимущество флуоресцентного метода диагностики состоит в возможности получения высококонтрастных изображений структуры биологических тканей путем использования флуоресцентных маркеров, как эндогенных, так и экзогенных.

Множество молекул, присутствующих в биотканях, в частности, коллаген, эластин, NADH, являются биохимическими эндогенными флуоресцентными маркерами, используемыми при ФВ [43, 44]. Ограничениями в использовании эндогенных флуорофоров являются



относительно невысокий уровень их квантового выхода флуоресценции, а также перекрытие спектров флуоресценции различных молекул, которые могут вносить нежелательный вклад в регистрируемый флуоресцентный сигнал [45, 46]. Например, даже слабая нежелательная флуоресценция кожи может превысить полезный флуоресцентный отклик от искомого эндогенного флуорофора, расположенного в подкожных слоях [47]. Для выделения полезного сигнала могут быть использованы время-разрешенные флуоресцентные измерения, а также методы спектрального разделения сигналов [47, 48].

Используемые в качестве экзогенных источников флуоресценции органические красители, флуоресцентные белки, квантовые точки и др., обладают большим по сравнению с эндогенными флуорофорами квантовым выходом флуоресценции, что позволяет детектировать флуоресцентно-меченные структуры биотканей даже на больших глубинах. Использование флуоресцентных маркеров с активной основой в виде антител и других специфичных молекул позволяет осуществлять таргетную доставку маркера в исследуемую область биоткани [49, 50] для повышения её контраста на флуоресцентных изображениях.

Среди неинвазивных *in vivo* методов исследования накопления флуорофоров при поверхностном нанесении можно выделить методы прямой и косвенной визуализации. К первой группе относятся конфокальная и многофотонная флуоресцентная микроскопия [51, 52] — методы с клеточным уровнем детализации и существенно ограниченной из-за рассеяния глубиной детектирования, составляющей в биоткани менее 500 мкм. Возбуждение флуоресценции источниками импульсного и модулированного излучения позволяет осуществлять ФВ с определением времени релаксации флуорофора (в иностранной литературе FLIM – fluorescence lifetime imaging/microscopy) [53-55]. Флуоресцентный отклик статистического ансамбля на облучение коротким лазерным импульсом будет затухать со временем по закону [56-58]

$$F(t) \propto e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (1.1)$$

где  $t$  – время,  $\tau$  – время релаксации флуорофора. Время релаксации флуорофора не зависит от его концентрации, что делает FLIM важным для проведения ряда биологических исследований, преимущественно для идентификации флуоресцентных агентов с близкими спектральными характеристиками (спектрами поглощения и излучения), в том числе, для повышения контраста ФВ путем разделения флуоресценции экзогенных и эндогенных флуорофоров по времени жизни [59]. Использование сенсоров на основе флуоресцентных белков, молекулярных роторов и др. позволяет осуществлять мониторинг физиологических параметров среды, например, оксигенации [60], вязкости [61], уровня pH [62]. Использование флуоресцентно-резонансного переноса энергии (в иностранной литературе FRET — Förster Resonance Energy Transfer) [63, 64] позволяет изучать механизмы действия новых лекарственных препаратов, изменяющих активность ферментов. Такие исследования проводятся в основном на клеточных культурах [65-67] с использованием флуоресцентной микроскопии в реальном времени.

В условиях сильного рассеяния света при ФВ заглублённых в биоткань объектов целесообразно применение косвенных (реконструкционных) методов визуализации, в частности, диффузионной флуоресцентной томографии (ДФТ) [68, 69]. Для решения обратной задачи ДФТ используются итерационные алгоритмы, позволяющие реконструировать [70-73] пространственное распределение концентрации флуорофора по входным данным, являющимися флуоресцентными изображениями, полученными при разных положениях источника излучения относительно объекта и детектора. Существенным недостатком ДФТ является плохая обусловленность обратной задачи ДФТ [74] и, как следствие, высокая техническая сложность ее реализации, связанная с необходимостью учета поверхности биоткани,

использования достаточно точных аналитических моделей распространения света в биотканях и пр.

Возможность применения спектроскопического подхода для повышения устойчивости решения задачи ДФТ была продемонстрирована при использовании дальнекрасных флуоресцентных белков, имеющих довольно узкий спектр эмиссии (например, флуоресцентного белка mKate [75], ширина спектра эмиссии которого, рассчитанная по полувысоте от максимума, составляет 90 нм), но лежащий в области от 600 нм, т.е. там, где дисперсия показателя поглощения биоткани велика [73]. Тем не менее, предельный размер объекта визуализации при ДФТ составляет порядка нескольких см и недостаточен для широкого применения данного метода в клинической практике, вследствие чего объектами исследования являются в основном мелкие лабораторные животные. Таким образом, задача количественной оценки распределения флуорофоров в биоткани различных локализаций продолжает оставаться актуальной.

## **1.2 Многоволновая флуоресцентная визуализация**

Дополнительную диагностическую информацию об исследуемом объекте позволяет получать многоволновая ФВ, заключающаяся в использовании нескольких длин волн возбуждения и/или регистрации флуоресценции. Как правило, применение многоволновых измерений связано с одновременным использованием различных флуоресцентных маркеров. Подобные исследования проводятся в микроскопии при реализации ФВ на уровне единичных молекул [76] или для мониторинга внутриклеточного взаимодействия [77], на тканевом уровне, например, для мониторинга состояния кожи [78, 79], а также на уровне целого организма лабораторных животных [80, 81] для раннего детектирования опухоли и мониторинга её развития.

Другим возможным направлением применения многоволновой ФВ является использование различных длин волн возбуждения и/или детектирования флуоресценции одного флуоресцентного маркера и последующего анализа различий в регистрируемых флуоресцентных сигналах. Подобные исследования зачастую носят ратиометрический характер: количественным критерием служит отношение флуоресцентных сигналов, соответствующих двум длинам волн возбуждения или эмиссии флуоресценции. В работах [82-84] двухволновая ратиометрическая ФВ с использованием потенциал-чувствительного флуоресцентного красителя применялась для определения потенциала клеточной мембраны. Использование ратиометрических сенсоров позволяет проводить количественные оценки изменений уровня содержания определённых элементов внутри клеток [85, 86] или физиологических параметров, например, уровня pH [87].

Применение двухволновой ФВ *in vivo* позволяет использовать не только спектральные характеристики флуоресцентных маркеров, но и различие в оптических свойствах биотканей на разных длинах волн. Например, в работах [88, 89] предложена регистрация флуоресцентных сигналов при возбуждении на длинах волн, соответствующих максимуму и минимуму поглощения флуорофора. В случае минимума поглощения флуорофора осуществляется, фактически, регистрация автофлуоресценции окружающих тканей, что в предположении о слабом изменении автофлуоресценции в диапазоне используемых длин волн позволяет уменьшить её влияние и улучшить контраст получаемых флуоресцентных изображений.

Ратиометрический подход также применяется в рамках модельных и *in vivo* исследований по двухволновой ФВ. В работах [90-93] в рамках Монте-Карло моделирования и модельных экспериментов регистрируемой флуоресценции заглублённого в фантом биоткани флуоресцентного слоя было показано, что отношение флуоресцентных сигналов, соответствующих

различным длинам волн флуоресценции, может быть использовано для оценки глубины залегания флуорофора в биоткани. Обсуждается вопрос о выборе оптимальных длин волн регистрации флуоресценции для подобной оценки с учётом искажений спектра эмиссии флуорофора, заглублённого в биоткань [91]. Теоретическое описание двухволнового детектирования флуоресценции в рамках диффузионного приближения УПИ приведено в работе [94]. Для радиометрических исследований по двухволновой ФВ целесообразно также использовать флуорофоры с широким спектром поглощения (или имеющего несколько пиков поглощения, далеко отстоящих друг от друга по спектру) и проводить анализ флуоресцентных сигналов, соответствующих различным длинам волн возбуждения флуоресценции, характеризующимся различной глубиной проникновения в биоткань (рис. 1.3). Примерами таких флуорофоров могут служить, например, ФС хлоринового ряда [28, 29] (рис. 1.3), обладающие двумя ярко выраженными пиками в спектре поглощения, соответствующим длинам волн 402 и 662 нм; протопорфирин IX (PPIX) [95, 96], характеризующийся ярко выраженным пиком в спектре поглощения на длине волны 405 нм и несколькими менее выраженными пиками на длинах волн от 450 нм до 650 нм; сложные синтезированные наночастицы с широким спектром поглощения [97].

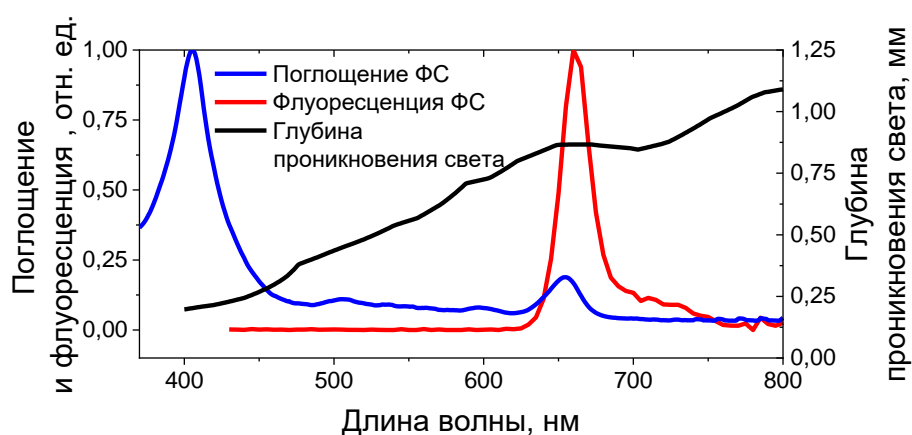


Рисунок 1.3. Нормированные спектры поглощения и флуоресценции ФС хлоринового ряда [98], а также характерная глубина проникновения света в биоткань кожи человека по данным работы [99].

В работе [100] приведены клинические исследования по радиометрическим эндоскопическим измерениям флуоресценции РРІХ в нормальной ткани мочевого пузыря, а также в доброкачественных и злокачественных опухолях той же локализации. Сравнение отношения флуоресцентных сигналов, соответствующих возбуждению в красном и синем диапазоне длин волн, для нормальной и опухолевой ткани показало различие соответствующих величин при воспалении, дисплазии, неинвазивной папиллярной карциноме и карциноме *in situ*. Результаты флуоресцентных измерений подтверждались результатами гистологических исследований. Возможность оценки глубины залегания флуорофора в биоткани на основе радиометрических флуоресцентных измерений при двухволновом возбуждении и регистрации флуоресценции показана для синтезированного с использованием изотиоцианата флуоресцеина маркера LS903 в работе [101]. Следует отметить, что наряду с глубиной залегания в биоткани важным параметром является и толщина флуоресцентного слоя, которая в приведённых выше работах не оценивается.

### **1.3 Оптические методы мониторинга фотодинамической терапии**

Мониторинг процедуры ФДТ может осуществляться с использованием различных подходов [102-105]. Наиболее перспективными среди них являются оптические методы неинвазивного мониторинга и контроля процедуры в реальном времени. Оперативную оценку морфологического ответа биоткани на процедуру ФДТ позволяют осуществлять, в частности, оптическая когерентная томография (ОКТ) [106-108] и отражательная спектроскопия [109]. ОДС [13] и мультиспектральная ОА томография [110] позволяют измерять степень насыщения крови кислородом для последующей оценки реакции биоткани на процедуру. Мониторинг микроциркуляции сосудов опухоли в ходе и после ФДТ, осуществляемый в рамках ОКТ

ангиографии [107, 111], ОА визуализации [112], корреляционной спектроскопии [113], лазерной доплеровской флоуметрии [114-116] также позволяет оценивать эффективность процедуры.

Поскольку большинство ФС являются флуоресцентными маркерами, традиционно для мониторинга ФДТ среди оптических методов выделяют ФВ [117-121]. Высокая селективность накопления ФС в опухолевых тканях позволяет применять ФВ для *in vivo* визуализации опухоли с целью демаркации злокачественных и здоровых тканей [122]. Мониторинг фотовыгорания ФС — уменьшения уровня сигнала флуоресценции в ходе ФДТ — позволяет судить об эффективности процедуры [123, 124]. Таким образом, ФДТ воплощает в себе принципы так называемой тераностики, т.е. проведения терапии с одновременным диагностическим контролем. Комплементарное использование ФВ и спектроскопических методов позволяет проводить измерение уровня синглетного кислорода по люминесценции на длине волны 1270 нм при проведении ФДТ [125-128], который является основным цитотоксическим агентом, генерируемым в ходе ФДТ [129]. Однако такие спектроскопические исследования являются требовательными к чувствительности измерительных приборов, что увеличивает как техническую, так и экономическую сложность создания подобных устройств, а также позволяют осуществлять лишь локальные измерения, в отличие от ФВ, позволяющей регистрировать пространственное распределение флуоресценции.

Использование ФС хлоринового ряда при проведении ФДТ открывает дополнительные возможности в силу наличия двух пиков в спектре поглощения. Различие в глубине проникновения света синего и красного диапазонов в биоткани (рис. 1.3) позволяет не только варьировать глубину терапевтического воздействия при ФДТ, а также получать дополнительную диагностическую информацию о распределении ФС, анализируя сигналы его флуоресценции, соответствующие различным длинам волн возбуждения [98].

Возможность контроля параметров при планировании или мониторинге ФДТ потенциально позволяет повысить эффективность процедуры и индивидуализировать лечение посредством корректировки режима воздействия, дозы ФС и дозы светового облучения и проводить оперативную оценку перераспределения ФС после ФДТ для оценки глубины терапевтического воздействия. Однако по современным протоколам ФДТ дозы ФС и светового облучения определяются эмпирическим путем и не учитывают индивидуальных особенностей организма.

#### **1.4 Подходы к созданию фантомов биоткани**

Дальнейшее совершенствование современных методов ФВ и переход от качественной к количественной визуализации требуют разработки недорогих и легко воспроизводимых стандартов для калибровки и валидации разрабатываемых методик. В связи с этим необходимым этапом является создание фантомов, которые имитируют оптические свойства исследуемой биоткани в широком спектральном диапазоне и её свойства при введении флуоресцентного маркера, а также сохраняют заданные оптические и структурные свойства на протяжении определенного времени.

В качестве стандарта для создания фантомов биоткани в видимом и ближнем ИК диапазонах традиционно используются жировые эмульсии, такие как интралипид [22, 130, 131] или его близкий аналог липофундин [132]. Интралипид и липофундин характеризуются различным размером капель соевого масла, входящего в их состав, однако разница в коэффициенте рассеяния не превышает 9% [133]. Оптические свойства жировых эмульсий остаются стабильными в течение долгого времени, в отличие, например, от молока, которое ранее широко использовалось в качестве калибровочной среды [134].

Коэффициент поглощения жировых эмульсий мал [135], поскольку обусловлен в основном поглощением воды, которое является несущественным



в большей части видимого диапазона. В связи с этим для создания фантомов, моделирующих поглощающие свойства реальных биотканей, необходимо использовать дополнительные хромофоры. Наиболее доступными и спектрально стабильными поглотителями являются тушь [136, 137] и чернила различных цветов. Например, красные чернила хорошо имитируют спектральные характеристики гемоглобина [138]. В работе [139] определены значения удельных (отнесенных к объемной концентрации) коэффициентов рассеяния и поглощения интралипида и туши на длинах волн 633 нм, 750 нм и 830 нм. Эти значения могут быть выбраны в качестве опорных при разработке фантомов на основе интралипида и туши. Следует отметить, что традиционно фантомы на основе жировых эмульсий являются жидкими, что накладывает ряд ограничений на изготовление фантомов заданной формы, содержащих включения.

Для создания полутвёрдых фантомов заданной формы используется вода с добавлением агара [140, 141], что позволяет формировать стабильные матрицы с возможностью добавления рассеивающих и поглощающих компонентов. Использование агарового порошка позволяет также контролировать оптические свойства изготавливаемых фантомов биоткани [142]. В работе [143] предложен подход к изготовлению эластичных флуоресцирующих фантомов биоткани кожи человека на основе полиакриламида, и делается акцент на строгих условиях следования протоколу изготовления для сохранения флуоресцентных свойств внедряемого флуорофора. Следует отметить, что характерные значения коэффициента поглощения разработанных в работе [143] фантомов существенно ниже, чем типичные значения для биотканей в видимом спектральном диапазоне.

## 1.5 Выводы

Существенным недостатком современных протоколов ФДТ является эмпирический выбор световой дозы без учёта индивидуальных особенностей организма и характера накопления ФС в биоткани перед процедурой. Для персонализации лечения существует необходимость в разработке технически легко реализуемых методов оценки глубины локализации ФС в биоткани. Включение применения такого метода в протоколы ФДТ позволит существенно повысить эффективность процедуры, а также оценивать глубину терапевтического воздействия при проведении ФДТ. Для решения задач, связанных с разработкой и валидацией методов ФВ, существует потребность в разработке простых подходов к созданию полутвёрдых фантомов, имитирующих биоткани до и после введения в них флуоресцентного маркера.

## Глава 2. Оценка локализации флуорофора в биоткани на основе двухволновой флуоресцентной визуализации

### 2.1 Расчёт оптических полей в биоткани в рамках уравнения переноса излучения

Распространение оптического излучения в большинстве биологических тканей, являющихся сильно рассеивающими и поглощающими средами, описывается уравнением переноса излучения (УПИ). УПИ оперирует непосредственно с лучевой интенсивностью (яркостью) светового поля — средней плотностью потока энергии в единичном интервале частот и в единичном телесном угле. Уравнение переноса излучения для лучевой интенсивности  $L(\vec{r}, \vec{s}, t)$  в данной точке  $\vec{r}$  и направлении  $\vec{s}$  в момент времени  $t$  имеет вид [144]:

$$\begin{aligned} \frac{dL(\vec{r}, \vec{s}, t)}{ds} + \frac{1}{v} \frac{\partial L(\vec{r}, \vec{s}, t)}{\partial t} + (\mu_a + \mu_s)L(\vec{r}, \vec{s}, t) \\ = \mu_s \int_{4\pi} \varphi(\vec{s}, \vec{s}') L(\vec{r}, \vec{s}', t) ds' + \varepsilon(\vec{r}, \vec{s}, t) \end{aligned} \quad (2.1)$$

где  $\mu_a$  — коэффициент поглощения среды,  $\mu_s$  — коэффициент рассеяния среды,  $v$  — скорость света в среде,  $\varphi(\vec{s}, \vec{s}')$  — фазовая функция рассеяния — безразмерная величина, описывающая вероятность смены направления распространения фотона из направления  $\vec{s}$  в направление  $\vec{s}'$  в результате акта единичного рассеяния,  $\varepsilon(\vec{r}, \vec{s}, t)$  — пространственно-временное и угловое распределение яркости источников. Решение данного уравнения описывает пространственное распределение лучевой интенсивности на определенной длине волны внутри биологической ткани.

Прямая задача вычисления флуоресцентного отклика от находящегося в среде флуорофора представляет собой суперпозицию двух задач, а именно задач о распространении возбуждающего излучения до флуорофора и распространении флуоресценции до поверхности среды, где происходит

регистрация флуоресценции. При нахождении в среде флуоресцентного маркера, источником лучевой интенсивности  $L_{em}$  на длине волны флуоресценции  $\lambda_{em}$  будет служить поглощенная этим маркером световая энергия  $L_{ex}$  на длине волны возбуждения флуорофора  $\lambda_{ex}$ . Для нахождения лучевой интенсивности флуоресценции  $L_{em}$  необходимо решить, таким образом, систему двух уравнений:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dL_{ex}(\vec{r}, \vec{s}, t)}{ds} + \frac{1}{v} \frac{\partial L_{ex}(\vec{r}, \vec{s}, t)}{\partial t} + (\mu_a^{ex} + \mu_s^{ex})L_{ex}(\vec{r}, \vec{s}, t) = \\ = \mu_s^{ex} \int_{4\pi} \varphi^{ex}(\vec{s}, \vec{s}') L_{ex}(\vec{r}, \vec{s}', t) ds' + \varepsilon_{ex}(\vec{r}, \vec{s}, t) \\ \frac{dL_{em}(\vec{r}, \vec{s}, t)}{ds} + \frac{1}{v} \frac{\partial L_{em}(\vec{r}, \vec{s}, t)}{\partial t} + (\mu_a^{em} + \mu_s^{em})L_{em}(\vec{r}, \vec{s}, t) = \\ = \mu_s^{em} \int_{4\pi} \varphi^{em}(\vec{s}, \vec{s}') L_{em}(\vec{r}, \vec{s}', t) ds' + \sigma_a N_f \eta L_{ex}(\vec{r}, \vec{s}, t) \end{array} \right. \quad (2.2)$$

где  $\sigma_a$  — сечение поглощения флуорофора,  $N_f$  — концентрация флуорофора,  $\eta$  — квантовый выход, параметр, характеризующий переизлучательную способность флуорофора. При записи системы (2.2) верхние индексы  $ex$  и  $em$  относятся к длинам волны возбуждения и эмиссии соответственно.

Уравнение переноса излучения (2.1) в общем виде, как и система (2.2), не имеют аналитического решения, и для построения приближенных аналитических решений используются различные приближения. В частности, диффузионное приближение УПИ [145] широко используется для глубин, больших 1-2 длин транспортного пробега  $l_{tr} = \frac{1}{\mu_a + \mu_s'}$ , где  $\mu_s' = \mu_s(1 - g)$  — транспортный коэффициент рассеяния биоткани,  $g$  — средний косинус угла рассеяния. На этих глубинах фотоны в результате многократного рассеяния "забывают" о своем первоначальном направлении распространения. При этом лучевая интенсивность на таких глубинах не зависит от угла, что позволяет перейти от уравнения (2.1) к диффузионному приближению УПИ, в котором вместо лучевой интенсивности используется плотность диффузного потока

$$\phi(\vec{r}) = \frac{1}{4\pi} \int_{4\pi} L(\vec{r}, \vec{s}) ds \quad (2.3)$$

В рамках диффузионного приближения УПИ для диффузного потока принимает вид [146]:

$$\frac{1}{v} \frac{\partial}{\partial t} \phi(\vec{r}, t) - D \Delta \phi(\vec{r}, t) + \mu_a \phi(\vec{r}, t) = \varepsilon(\vec{r}, t) \quad (2.4)$$

где  $D = \frac{1}{3(\mu_a + \mu'_s)}$  — коэффициент диффузии,  $\Delta$  — оператор Лапласа. С учётом

(2.4) система (2.2) запишется в виде

$$\begin{cases} \frac{1}{v} \frac{\partial}{\partial t} \phi_{ex}(\vec{r}, t) - D_{ex} \Delta \phi_{ex}(\vec{r}, t) + \mu_a^{ex} \phi_{ex}(\vec{r}, t) = \varepsilon(\vec{r}, t) \\ \frac{1}{v} \frac{\partial}{\partial t} \phi_{em}(\vec{r}, t) - D_{em} \Delta \phi_{em}(\vec{r}, t) + \mu_a^{em} \phi_{em}(\vec{r}, t) = \sigma_a N_f \eta \phi_{ex}(\vec{r}, t) \end{cases} \quad (2.5)$$

## 2.2 Аналитическая модель формирования флуоресцентных сигналов в системах флуоресцентной визуализации

Рассмотрим стационарную задачу расчёта флуоресцентного сигнала от распределённого в приповерхностном слое биоткани флуорофора. Она может быть представлена в виде суперпозиции двух задач: вычисления пространственного распределения интенсивности возбуждающего излучения, поглощаемого флуорофором, и последующего расчёта флуоресценции этого флуорофора, регистрируемой с поверхности биоткани. Биоткань рассматривается как полубесконечная двухслойная среда, в которой в приповерхностном тонком слое толщины  $d$  содержится флуорофор с однородно распределённой концентрацией  $C$  и квантовым выходом флуоресценции  $\eta$ . Биоткань облучается широким пучком подсветки с равномерным поверхностным распределением падающей интенсивности  $I_0$  на границе среды  $z = 0$  (рис. 2.1). Биоткань характеризуется коэффициентом поглощения  $\mu_{a,tiss}(\lambda)$ , коэффициентом рассеяния  $\mu_s(\lambda)$  и фактором анизотропии  $g$ . В верхнем слое, содержащем флуорофор, коэффициент

поглощения определяется как сумма собственного поглощения биоткани и поглощения флуорофора  $\mu_{a,f}(\lambda)$ :  $\mu_a(\lambda) = \mu_{a,tiss}(\lambda) + \mu_{a,f}(\lambda)$ , причем поглощение флуорофора пропорционально его концентрации. При анализе распространения излучения предполагается, что на длинах волн возбуждения флуорофора дополнительное поглощение слоя биоткани, вносимое флуорофором, мало по сравнению с собственным поглощением биоткани:

$$\mu_{a,f}(\lambda) \ll \mu_{a,tiss}(\lambda) \quad (2.6)$$

Поскольку возбуждение флуорофора осуществляется на длинах волн, соответствующих пикам его поглощения, а регистрация флуоресценции в спектре эмиссии, где поглощение флуорофора существенно меньше, то при выполнении вышеуказанного условия (2.6) вкладом флуорофора в поглощение биоткани на длине волны эмиссии флуоресценции можно также пренебречь.

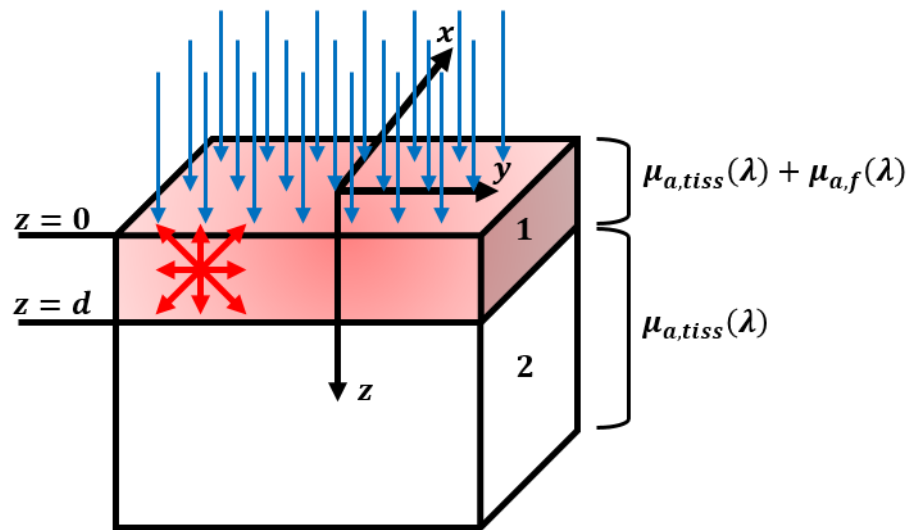


Рисунок 2.1. Схема двухслойной среды с приповерхностным флуоресцентным слоем (1) в окружающей биоткани (2).

Интенсивность выходящей из среды флуоресценции на длине волны  $\lambda_{em}$ , регистрируемая в точке  $\mathbf{r}_0$  границы среды (в плоскости  $z = 0$ ) при облучении приповерхностного слоя, содержащего флуорофор, записывается в виде интеграла по объёму верхнего слоя V

$$I_{em}(\mathbf{r}_0, \lambda_{ex}, \lambda_{em}) = \gamma \int_V \eta \phi_{em}(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}, \lambda_{em}) \mu_{a,f}(\mathbf{r}, \lambda_{ex}) \phi_{ex}(\mathbf{r}, \lambda_{ex}) dV \quad (2.7)$$

где  $\mu_{a,f}(\mathbf{r}, \lambda_{ex}) \phi_{ex}(\mathbf{r}, \lambda_{ex}) dV$  — мощность возбуждающего излучения на длине волны  $\lambda_{ex}$ , поглощённая флуорофором в элементарном объеме  $dV$  в точке  $\mathbf{r}$  среды,  $\gamma$  — фактор, связанный со скачком показателя преломления на границе биоткани, а  $\phi_{em}(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}, \lambda_{em})$  — пространственная облученность (fluence rate), которая создается в точке  $\mathbf{r}_0$  находящимся в точке  $\mathbf{r}$  излучателем с единичной мощностью.

Решение задачи о распространении возбуждающего излучения (нахождение функции  $\phi_{ex}(\mathbf{r}, \lambda_{ex})$ ) может быть получено в рамках аналитической полуэмпирической модели, приведённой в работе [147]. В ней продемонстрировано, что при облучении полубесконечного слоя биоткани плоской волной с интенсивностью  $I_0$ , излучаемой на длине волны  $\lambda_{ex}$ , пространственная облученность на глубине  $z$ , рассчитанная с помощью численного моделирования методом Монте-Карло для широкого диапазона оптических параметров облучаемой среды, может быть аппроксимирована экспоненциальной функцией

$$\phi(z) = I_0 k(\lambda_{ex}) e^{-\mu(\lambda_{ex})z} \quad (2.8)$$

где  $k(\lambda_{ex})$  — фактор обратного рассеяния,  $\mu(\lambda_{ex})$  — коэффициент диффузного ослабления излучения на длине волны  $\lambda_{ex}$  в среде. Для данных величин приводятся следующие эмпирические выражения, полученные путем согласования результатов Монте-Карло моделирования с асимптотическими решениями УПИ:

$$k_{ex} = k(\lambda_{ex}) = 3 + 5,4R_d - 2e^{-17R_d} \quad (2.9)$$

$$\mu_{ex} = \mu(\lambda_{ex}) = \tilde{\mu} \left( 1 - \frac{e^{-20R_d}}{\sqrt{3}} \right) \quad (2.10)$$

$$R_d \approx \exp\left(-8 \frac{\mu_a}{\tilde{\mu}}\right) \quad (2.11)$$

где  $R_d$  — характеристика полного диффузного отражения,  $\tilde{\mu} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)}$  — эффективный коэффициент ослабления диффузного света. Величины  $R_d$  и  $k_{ex}$  рассчитаны в [147] в предположении, что на поверхности биоткани присутствует относительный скачок показателя преломления  $n = n_{\text{medium}}/n_{\text{out}}=1,37$ , где  $n_{\text{medium}}$  — показатель преломления биоткани,  $n_{\text{out}}$  — показатель преломления окружающей среды. Характерный спектр эффективного коэффициента ослабления  $\mu$  для дермы человека, рассчитанный по формуле (9) на основе спектров поглощения и рассеяния [99], приведен на рис. 2.2.

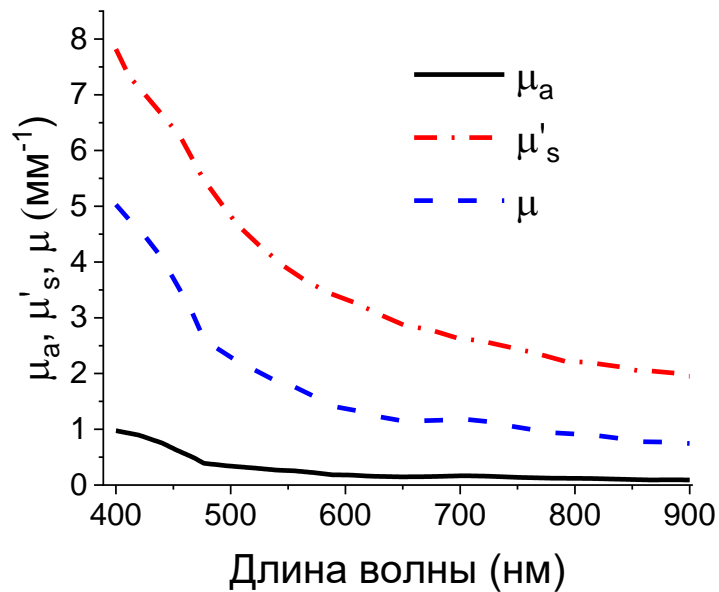


Рисунок 2.2. Типичные спектры коэффициента поглощения  $\mu_a$ , коэффициента транспортного рассеяния  $\mu'_s$  и коэффициента диффузного ослабления  $\mu$ , вычисленного по формуле (9), для обескровленной дермы человека в видимом спектральном диапазоне на основе данных работы [99].

В предположении, что элементарный объём  $dV$  среды с флуорофором, расположенный в точке  $\mathbf{r}$  ( $x, y, z$ ), является точечным изотропным источником с мощностью  $\eta dP_{abs}(\mathbf{r}, \lambda_{ex}) = \eta \mu_{a,f}(\mathbf{r}, \lambda_{ex}) \phi_{ex}(\mathbf{r}, \lambda_{ex}) dV$ , интенсивность его флуоресценции, регистрируемая на внешней границе среды в точке  $\mathbf{r}_0$  ( $x_0, y_0, 0$ ), с использованием выражения (2.7) представляется в виде



$$dI_{em}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, \mathbf{r}, \mathbf{r}_0) = \gamma \eta dP_{abs}(\mathbf{r}, \lambda_{ex}) \phi_{em}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0, \lambda_{em}) \quad (2.12)$$

через облучённость от точечного изотропного источника в полубесконечной среде, рассчитанную в диффузионном приближении УПИ (4) [148]:

$$\begin{aligned} \phi_{em}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0, \lambda_{em}) &= \frac{1}{4\pi D_{em}} \left( \frac{e^{-\tilde{\mu}_{em}\sqrt{(x-x_0)^2+(y-y_0)^2+z^2}}}{\sqrt{(x-x_0)^2+(y-y_0)^2+z^2}} \right. \\ &\quad \left. - \frac{e^{-\tilde{\mu}_{em}\sqrt{(x-x_0)^2+(y-y_0)^2+(z+2z_{em}^*)^2}}}{\sqrt{(x-x_0)^2+(y-y_0)^2+(z+2z_{em}^*)^2}} \right) \quad (2.13) \end{aligned}$$

где  $\tilde{\mu}_{em} = \tilde{\mu}(\lambda_{em})$  — эффективный коэффициент ослабления, а  $D_{em} = \frac{1}{3(\mu_a(\lambda_{em}) + \mu'_s(\lambda_{em}))} = \frac{\mu_a(\lambda_{em})}{\tilde{\mu}_{em}^2}$  — коэффициент диффузии на длине волны эмиссии флуорофора  $\lambda_{em}$ . Величина  $z_{em}^* = \frac{1}{3\gamma} l_{tr}$  учитывает относительный скачок показателя преломления  $n$  [148].

Для равномерного по поперечным координатам  $(x, y)$  и произвольного по глубине  $z$  распределения флуорофора в предположении малости вносимого им возмущения полей излучения возбуждения и флуоресценции, интенсивность флуоресценции на внешней границе среды имеет вид интеграла

$$\begin{aligned} I_{em}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) &= \gamma \frac{\eta I_0 k(\lambda_{ex})}{4\pi \tilde{\mu}_{em} D_{em}} \int_{z=0}^{\infty} \mu_{a,f}(z, \lambda_{ex}) e^{-\mu_{ex} z} dz \int_{r_{\perp}=0}^{\infty} \left( \frac{e^{-\tilde{\mu}_{em}\sqrt{r_{\perp}^2+z^2}}}{\sqrt{r_{\perp}^2+z^2}} \right. \\ &\quad \left. - \frac{e^{-\tilde{\mu}_{em}\sqrt{r_{\perp}^2+(z+2z_{em}^*)^2}}}{\sqrt{r_{\perp}^2+(z+2z_{em}^*)^2}} \right) 2\pi r_{\perp} dr_{\perp} \quad (2.14) \end{aligned}$$

Путём замены переменных  $\sqrt{r_{\perp}^2 + z^2} = \xi$  и с учетом соотношения  $r_{\perp} dr_{\perp} = \xi d\xi$  получаем выражение для интенсивности флуоресценции на поверхности биоткани в случае произвольного распределения флуорофора по глубине в виде одномерного интеграла

$$\begin{aligned}
I_{em}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) &= \gamma \frac{\eta I_0 k(\lambda_{ex})}{2\tilde{\mu}_{em} D_{em}} \int_{z=0}^{\infty} \mu_{a,f}(z, \lambda_{ex}) e^{-\mu_{ex}z} (e^{-\tilde{\mu}_{em}z} - e^{-\tilde{\mu}_{em}(z+2z_{em}^*)}) dz \quad (2.15)
\end{aligned}$$

Для равномерного распределения флуорофора в приповерхностном слое биоткани толщины  $d$  из (2.15) получаем окончательное выражение для флуоресцентного отклика, возбуждённого излучением на длине волны  $\lambda_{ex}$  и зарегистрированного на длине волны  $\lambda_{em}$  на поверхности ткани:

$$I_{em}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, d) = I_0 \eta \mu_{a,f}(\lambda_{ex}) K(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) (1 - e^{-(\mu_{ex} + \tilde{\mu}_{em})d}) \quad (2.16)$$

$$\text{где введено обозначение } K(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = \gamma \frac{k(\lambda_{ex}) \sinh(\tilde{\mu}_{em} z_{em}^*) e^{-\tilde{\mu}_{em} z_{em}^*}}{\tilde{\mu}_{em} D_{em} (\mu_{ex} + \tilde{\mu}_{em})}.$$

Из формулы (2.16) следует, что величина интенсивности флуоресценции  $I_{em}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, d)$  монотонно возрастает с увеличением толщины флуоресцентного слоя  $d$ , асимптотически стремясь к константе  $I_{em}^{(\infty)} = I_0 \eta \mu_{a,f}(\lambda_{ex}) K(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$ . Такая зависимость флуоресцентного сигнала связана с ограниченной глубиной проникновения возбуждающего излучения внутрь биоткани. Для тонких флуоресцентных слоев, толщина которых удовлетворяет соотношению  $(\mu_{ex} + \tilde{\mu}_{em})d \ll 1$ , регистрируемый флуоресцентный сигнал линейно зависит от толщины слоя  $d$ , а именно  $I_{em}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, d) \cong I_0 \eta \mu_{a,f} K(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) (\mu_{ex} + \tilde{\mu}_{em})d$ . Область чувствительности флуоресцентного сигнала к наличию флуорофора, определяемая по уровню 95% от максимального значения  $I_{em}^{(\infty)}$ , ограничена диапазоном глубин  $z \lesssim 3/(\mu_{ex} + \tilde{\mu}_{em})$ , и наличие флуорофора за её пределами практически не приводит к изменению сигнала флуоресценции.

### 2.3. Отношение флуоресцентных сигналов при двухволновой флуоресцентной визуализации и его связь с толщиной приповерхностного флуоресцентного слоя

Различия в оптических свойствах биотканей в синем и красном диапазонах длин волн (рис. 1.3) позволяют оценивать глубину проникновения ФС хлоринового ряда в биоткань на основе двухволнового ФИ. Для подавляющего большинства биотканей оптическое рассеяние и поглощение выше в синем диапазоне длин волн, нежели в красном (рис. 1.3) из-за особенностей спектров поглощения крови и меланина, вследствие чего глубина проникновения в биоткань существенно больше для красного диапазона длин волн. Так, дерма характеризуется более высокими значениями эффективного коэффициента ослабления  $\mu_{ex}$  в окрестности  $\lambda_{ex1} = 405$  нм («синего» пика поглощения ФС хлоринового ряда) по сравнению с окрестностью  $\lambda_{ex2} = 660$  нм («красного» пика поглощения ФС хлоринового ряда):  $\mu_{ex}(\lambda_{ex1})/\mu_{ex}(\lambda_{ex2}) \cong 3,8$  (рис. 1.3). Отсюда следует, что выход сигнала флуоресценции на постоянную величину происходит на значительно меньших глубинах при возбуждении в синем диапазоне длин волн, поскольку приповерхностная область сильно поглощающей и рассеивающей биоткани экранирует проникновение зондирующего излучения в более глубокие слои, содержащие ФС. Таким образом, естественно предположить, что соотношение флуоресцентных сигналов, соответствующих различным длинам волн возбуждения ФС хлоринового ряда позволяет оценить толщину поверхностного флуоресцентного слоя.

Для флуорофоров с широким спектром поглощения или с несколькими пиками в спектре поглощения, в частности, для ФС хлоринового ряда, можно ввести отношение сигналов эмиссии для двух длин волн возбуждения флуоресценции, нормированных на интенсивность падающего излучения:

$$R_{\lambda} = \frac{I_{em}(\lambda_{ex2}, \lambda_{em}, d)/I_0(\lambda_{ex2})}{I_{em}(\lambda_{ex1}, \lambda_{em}, d)/I_0(\lambda_{ex1})} \quad (2.17)$$

где  $\lambda_{ex2}$  соответствует области пика поглощения ФС в красном диапазоне длин волн, а  $\lambda_{ex1}$  – области пика поглощения ФС в синем диапазоне длин волн. Соотношение (2.17) построено таким образом, чтобы увеличение толщины слоя  $d$  соответствовало росту величины  $R_\lambda$ , для чего в знаменателе должен находиться сигнал, соответствующий бóльшим значениям коэффициента ослабления на длине волны зондирования и поэтому достигающий насыщения при меньших  $d$ .

Учитывая соотношение (2.16), выражение (2.17) для отношения флуоресцентных сигналов  $R_\lambda$  можно представить в виде:

$$R_\lambda = \frac{\eta_2 \mu_{a,f}(\lambda_{ex2}) k(\lambda_{ex2})}{\eta_1 \mu_{a,f}(\lambda_{ex1}) k(\lambda_{ex1})} \frac{\mu_{ex1} + \tilde{\mu}_{em}}{\mu_{ex2} + \tilde{\mu}_{em}} \frac{1 - e^{-(\mu_{ex2} + \tilde{\mu}_{em})d}}{1 - e^{-(\mu_{ex1} + \tilde{\mu}_{em})d}} \quad (2.18)$$

где  $\eta_1$  и  $\eta_2$  – квантовые выходы флуоресценции при возбуждении на длинах волн  $\lambda_{ex1}$  и  $\lambda_{ex2}$  соответственно. Соотношение  $R_\lambda$ , зависящее только от параметров среды и флуорофора, может быть получено из экспериментальных измерений сигналов флуоресценции, возбуждаемых на двух длинах волн, при условии, что характеристики регистрирующей аппаратуры на этих длинах волн не различаются, либо после нормировки на соответствующие параметры детектирования.

Анализ формулы (2.18) позволяет определить асимптотическое поведение величины  $R_\lambda$  при малых и больших значениях толщины флуоресцирующего слоя  $d$ . При  $d \rightarrow 0$  сигналы флуоресценции, возбуждаемые на обеих длинах волн, линейно зависят от толщины, вследствие чего  $R_\lambda$  стремится к постоянному значению

$$R_\lambda(d \rightarrow 0) \cong R_\lambda^{(0)} = \frac{\eta_2 \mu_{a,f}(\lambda_{ex2}) k(\lambda_{ex2})}{\eta_1 \mu_{a,f}(\lambda_{ex1}) k(\lambda_{ex1})} \quad (2.19)$$

Следует заметить, что  $R_\lambda^{(0)}$  выражается через произведение двух величин: отношение приведенных коэффициентов поглощения ФС  $\eta \mu_{a,f}$  на двух длинах волн возбуждения и отношение интенсивностей зондирующего

излучения на поверхности среды  $\frac{I_0(\lambda_{ex2})k(\lambda_{ex2})}{I_0(\lambda_{ex1})k(\lambda_{ex1})}$ , которое может быть напрямую получено из измерений диффузно отраженных биотканью сигналов.

При малых значениях  $d$  зависимость  $R_\lambda(d)$  близка к линейной, угол наклона которой определяется разностью коэффициентов ослабления зондирующего излучения на двух длинах волн:

$$R_\lambda(d < 2/(\mu_{ex1} - \mu_{ex2})) \cong R_\lambda^{(lin)}(d) = R_\lambda^{(0)} \left( 1 + \frac{d(\mu_{ex1} - \mu_{ex2})}{2} \right) \quad (2.20)$$

Данная асимптотика хорошо описывает поведение  $R_\lambda(d)$  в интервале значений  $d < 2/(\mu_{ex1} - \mu_{ex2})$ ; при дальнейшем увеличении толщины слоя ФС рост  $R_\lambda(d)$  замедляется и для больших толщин стремится к постоянной величине

$$R_\lambda \left( d \gg \frac{2}{(\mu_{ex1} - \mu_{ex2})} \right) \cong R_\lambda^{(inf)} = R_\lambda^{(0)} \frac{\mu_{ex1} + \tilde{\mu}_{em}}{\mu_{ex2} + \tilde{\mu}_{em}} \quad (2.21)$$

Предел  $R_\lambda^{(\infty)}$  зависит в том числе и от коэффициента ослабления излучения на длине волны флуоресценции, в отличие от выражений для  $R_\lambda^{(0)}$  (2.19) и  $R_\lambda^{(lin)}(d)$  (2.20), полученных для малых  $d$  и определяемых параметрами ослабления только зондирующего излучения и приведенными коэффициентами поглощения ФС. При  $R_\lambda < 0.95R_\lambda^{(inf)}$ , отношение  $R_\lambda$  чувствительно к величине толщины слоя биоткани, содержащего ФС, в интервале значений  $0 < d < 3/(\mu_{ex2} + \tilde{\mu}_{em})$ . В этом случае отношение флуоресцентных сигналов  $R_\lambda$  может служить для оценки толщины флуоресцентного слоя, если известны спектры приведенного коэффициента поглощения ФС  $\eta\mu_{a,f}(\lambda_{ex})$  и эффективного коэффициента диффузного ослабления  $\mu$  (как общего случая  $\tilde{\mu}$ ).

## 2.4. Монте-Карло моделирование флуоресценции распределённого в биоткани флуорофора

Для отыскания решения УПИ (2.1) с любой заданной точностью в широком диапазоне глубин, оптических параметров, произвольных граничных и начальных условий применяются численные методы, среди которых наиболее часто используется метод Монте-Карло моделирования. Метод основан на многократном повторении расчета случайной траектории движения фотона в среде с заданной геометрией и оптическими свойствами и последующем статистическом анализе полученных данных [149]. Метод Монте-Карло моделирования является наиболее широко применяемым в численном моделировании распространения оптического излучения в биологических тканях [150, 151]. Различные модификации метода Монте-Карло используются для моделирования изображений, получаемых методами оптической визуализации, и последующей оптимизации соответствующих систем [152-154].

Единственным недостатком метода Монте-Карло, с вычислительной точки зрения, является его потребность в больших вычислительных мощностях. Однако в последние годы время вычисления на персональном компьютере удалось существенно снизить благодаря многопоточным вычислителям, и, в частности, графическим процессорам [155, 156]. Случайные траектории фотонов независимы друг от друга, следовательно, расчёт траекторий может осуществляться параллельно без обмена данными между потоками.

Для численного подтверждения разработанной теоретической модели формирования флуоресцентного сигнала, описанной в подразделе 2.2, проводилось моделирование методом Монте-Карло. Алгоритм был адаптирован для среды MATLAB. Поскольку среда MATLAB оптимизирована для работы с массивами большого размера, одновременные операции над массивами характеристик фотонов обеспечивают выигрыш во времени

расчетов по сравнению с традиционным последовательным вычислением случайных траекторий.

Численное моделирование флуоресцентного сигнала от слоя биоткани, содержащего ФС, проводится в два этапа по аналогии с построением аналитической модели. На первом этапе производится расчет трехмерных карт плотности поглощенной флуорофором световой дозы зондирующего излучения  $P_{abs}(\lambda_{ex}, x_i, y_i, z_i)$  на длине волны возбуждения флуоресценции  $\lambda_{ex}$  с учетом заданной геометрии среды, распределения флуорофора в ней, а также оптических свойств среды и флуорофора на длине волны накачки. Фотонам задаются начальные характеристики: вес, направление и позиции в декартовых координатах. Затем массивы характеристик обрабатываются в соответствии с Монте-Карло алгоритмом, в котором учитывается изменение траектории фотонов за счет рассеяния и уменьшение веса фотонов из-за поглощения среды. При численном моделировании также учитывается добавочное поглощение в слое среды, содержащем флуорофор. Под общей поглощенной дозой действующего излучения в элементарном объеме среды  $dV = \Delta x \Delta y \Delta z$ , где  $\Delta x$ ,  $\Delta y$ ,  $\Delta z$  соответствуют шагам сетки по декартовым координатам, понимается суммарный вес, потерянный фотонами вследствие поглощения, находясь в данном элементарном объеме.

На втором этапе рассчитанные карты поглощённой флуорофором световой дозы для выбранных длин волн возбуждения используются в качестве распределённого источника эмиссии флуоресценции. Общий вес фотонов, испущенных из центра каждого вокселя карты при моделировании эмиссии флуоресценции, соответствует  $\eta P_{abs}(\lambda_{ex}, x_i, y_i, z_i) \Delta x \Delta y \Delta z$ . Интенсивность флуоресценции вычисляется путем усреднения суммарного веса фотонов, покинувших биоткань, по аналогии с получением сигнала флуоресценции фотоприемником в экспериментальной установке [157], который пропорционален падающей на него интенсивности флуоресценции. Отношение флуоресцентных сигналов  $R_\lambda(d)$ , возбуждаемых на двух длинах

волн, вычисляется из результатов моделирования в соответствии с выражением (2.17).

## 2.5. Сравнение аналитической модели и результатов Монте-Карло моделирования

Для сравнения результатов расчёта характеристик флуоресценции слоя биоткани, содержащего ФС, в рамках аналитической модели и Монте-Карло моделирования биоткань в соответствии с рис. 2.1 была задана как двухслойная среда, верхний слой которой содержал ФС хлоринового ряда с объёмной концентрацией  $C_0 = 0,5\%$ , что соответствует типичным значениям при введении ФС в организм перед процедурой ФДТ [158]. Базовые оптические параметры среды, представленные в таблице 1, соответствовали значениям для дермы человека [99]. Толщина верхнего слоя, содержащего ФС, варьировалась от 0,01 до 3 мм, при этом полная толщина биоткани составляла 6 мм. Поперечные размеры среды составляли 20 мм \* 20 мм. Показатель преломления биоткани был равен 1,37.

Таблица 1.

Базовые оптические свойства биоткани дермы и слоя дермы, содержащей ФС, для Монте-Карло моделирования и аналитического исследования на основе данных работы [99].

Длина волны	$\mu_a, \text{мм}^{-1}$		$\mu_s, \text{мм}^{-1}$	g	Коэффициент диффузного ослабления $\mu, \text{мм}^{-1}$	
	Биоткань	Слой, содержащий ФС			Биоткань	Слой, содержащий ФС
$\lambda_{ex1}=405$ нм	0,89	1,01	37	0,8	4,67	4,99
$\lambda_{ex2}=660$ нм	0,15	0,19	14	0,8	1,15	1,31
$\lambda_{em}=760$ нм	0,13	0,13	12	0,8	0,96	0,96



Результаты сравнения аналитической модели и Монте-Карло моделирования представлены на рис. 2.3. Поскольку в рамках Монте-Карло моделирования рассматривается двухслойная среда, в верхнем слое которой содержится флуорофор, а аналитические решения (2.16) получены в рамках распространения излучения в однородной среде, аналитические кривые приведены для двух случаев: при расчете карты поглощения возбуждающего излучения коэффициент поглощения среды считается равным  $\mu_{a,tiss}(\lambda)$  (AM) или  $\mu_{a,tiss}(\lambda) + \mu_{a,f}(\lambda)$  (AM+), что соответствует учету вклада ФС в поглощение среды.

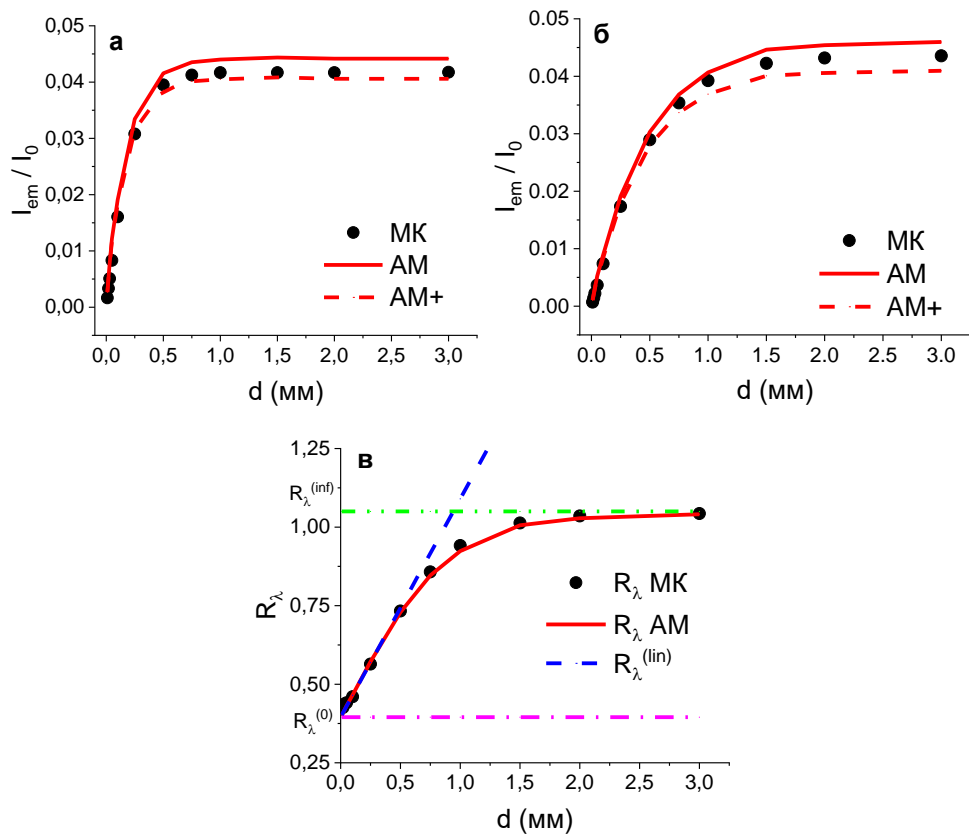


Рисунок 2.3. Интенсивности флуоресценции  $I_{em}/I_0$ , нормированные на интенсивность падающего излучения, в зависимости от толщины приповерхностного флуоресцентного слоя  $d$  при возбуждении флуоресценции на длине волны 405 нм (а) и 660 нм (б), а также их отношение  $R_\lambda$  для всего рассмотренного диапазона значений  $d$  и его асимптоты (в), вычисленные в рамках Монте-Карло моделирования (МК) и аналитической модели для

базовых оптических параметров дермы (АМ) и для случая учета вклада ФС в коэффициент поглощения  $\mu_a(\lambda) = \mu_{a,tiss}(\lambda) + \mu_{a,f}(\lambda)$  (АМ+).

Как следует из вида формулы (2.16), интенсивность флуоресценции монотонно растёт с увеличением толщины флуоресцентного слоя, что и демонстрируют рис. 2.3а,б. При этом, как видно из рис. 2.3а,б, с увеличением величина флуоресцентного сигнала быстрее достигает предельного значения  $I_{em}^{(\infty)}$  для длины волны возбуждения 405 нм, что связано с более сильным ослаблением зондирующего излучения на длине волны 405 нм по сравнению с длиной волны 660 нм. В то же время интенсивность флуоресценции, рассчитанная с помощью Монте-Карло моделирования, выходит на более низкий асимптотический уровень при больших толщинах слоя, содержащего ФС. Это расхождение связано с упрощением, сделанным при построении аналитической модели, в рамках которой при распространении возбуждающего и флуоресцентного излучения влияние добавочного поглощения в слое, содержащем ФС, не учитывается, а среда считается однородной. Для подтверждения этого предположения на графиках рис. 2.3 и ниже приведены аналитические кривые, рассчитанные по формуле (16) для однородной среды, у которой коэффициент поглощения равен  $\mu_a(\lambda) = \mu_{a,tiss}(\lambda) + \mu_{a,f}(\lambda)$ , что соответствует равномерному распределению ФС с заданной концентрацией по всему объёму биоткани. Из рис. 2.3а,б видно, что асимптотика зависимости сигнала флуоресценции от толщины флуоресцентного слоя  $d$ , рассчитанная с помощью Монте-Карло моделирования, располагается между асимптотиками, рассчитанными с помощью аналитической модели для сред с базовым поглощением и с учетом дополнительного поглощения ФС. Отношение  $R_\lambda(d)$ , рассчитанное с помощью соотношения (2.17) на основе данных аналитической модели и Монте-Карло моделирования, а также асимптотики (2.19)-(2.21), представлены на рис. 2.3в. Аналитическая модель хорошо согласуется с

результатами численного моделирования. Тем не менее, необходимо отметить, что при малых значениях  $d$  ( $d < 0,1$  мм) результаты Монте-Карло моделирования отличаются от линейной асимптотики, полученной в рамках аналитической модели, поскольку для малых значений  $d$  не выполняются условия применимости диффузионного приближения, лежащего в основе аналитической модели (2.16). Представленная на рис. 2.3в зависимость характеризуется наличием линейного участка на интервале толщин флуоресцентного слоя  $d = 0,1 - 0,5$  мм, за которым следует выход на постоянную асимптоту. Величина  $R_\lambda(d)$  в меньшей степени чувствительна к неоднородному распределению поглощения (как к эффекту более высокого порядка). Зависимость отношения  $R_\lambda$  от толщины флуоресцентного слоя является монотонной, что позволяет использовать зависимость  $R_\lambda(d)$  в качестве критерия оценки толщины приповерхностного флуоресцентного слоя. Рациометрический параметр  $R_\lambda$ , рассчитываемый с использованием аналитического соотношения (2.17), позволит получить адекватную оценку толщины  $d$  слоя ФС хлоринового ряда даже при описанных упрощениях модели флуоресцентного сигнала. Так, применение разработанной аналитической модели позволяет оценить толщину содержащего ФС хлоринового ряда приповерхностного слоя кожи в диапазоне от 0,1 до 2 мм с точностью 0,1 мм (рис. 2.3).

## **2.6. Исследование влияния оптических свойств биоткани на точность оценки локализации флуорофора**

Оптические характеристики биотканей для конкретного организма могут варьироваться внутри выборки значений для набора одинаковых объектов (организмов) в пределах  $\pm 30\%$  [159]. В связи с этим для оценки устойчивости разработанной аналитической модели к вариациям оптических свойств биоткани было проведено сравнение результатов Монте-Карло моделирования и аналитического исследования при изменении оптических

свойств дермы в пределах  $\pm 30\%$ . Результаты для вариации отдельно коэффициента поглощения и коэффициента рассеяния в пределах  $\pm 30\%$  от базовых представлены на рис. 2.4 и рис. 2.5 соответственно.

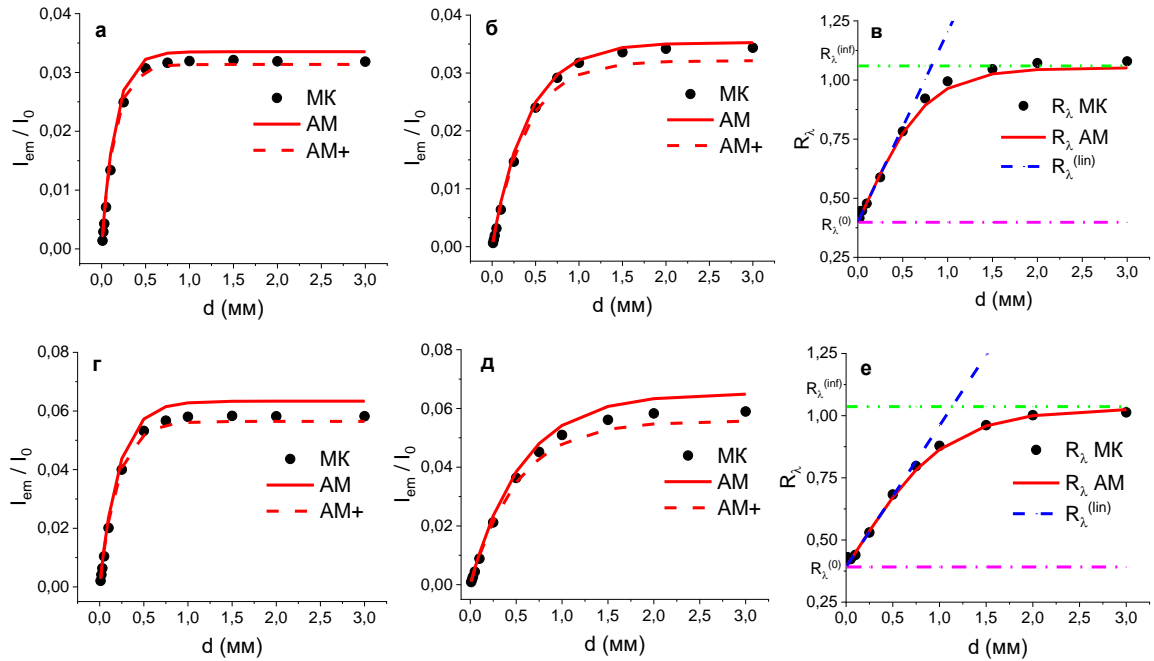


Рисунок. 2.4. Интенсивности флуоресценции  $I_{em}/I_0$ , нормированные на интенсивность падающего излучения, в зависимости от толщины приповерхностного слоя ФС  $d$  при возбуждении флуоресценции на длине волны 405 нм (а) и 660 нм (б), а также их отношение  $R_\lambda$  (в), вычисленные в рамках Монте-Карло моделирования (МК) и аналитической модели без учета (AM) и с учетом (AM+) вклада ФС в коэффициент поглощения среды для вариаций коэффициента поглощения на +30% (а-в) и на -30% (г-е) среды относительно базовых (Табл. 1).

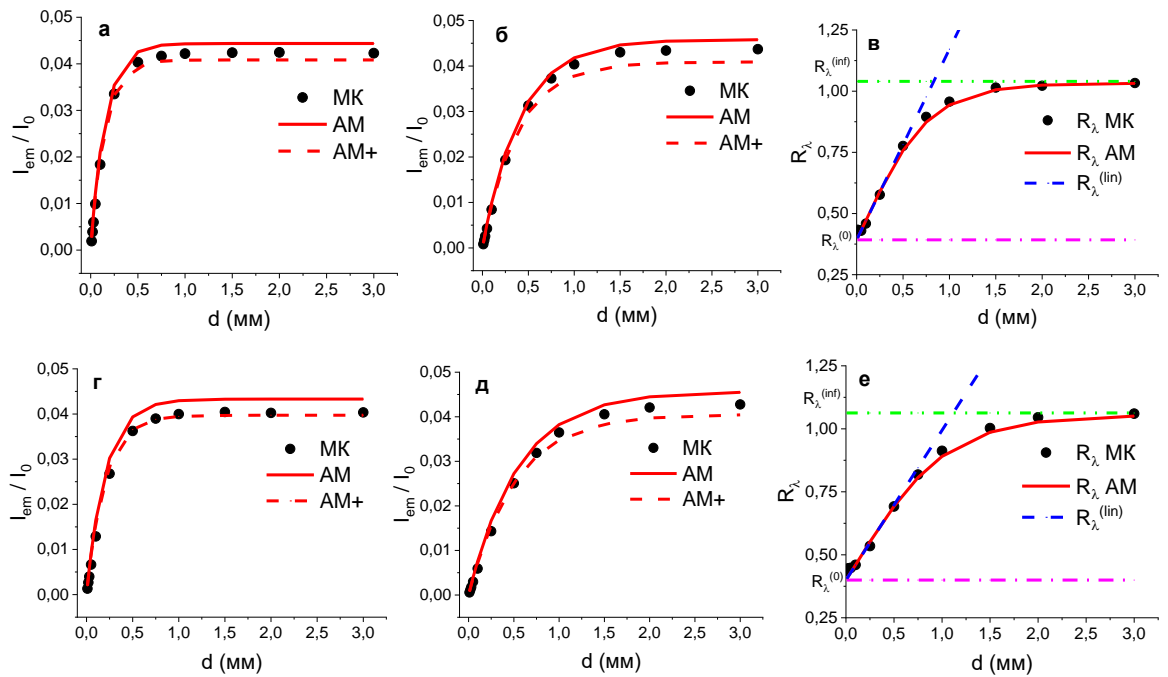


Рисунок 2.5. Интенсивности флуоресценции  $I_{em}/I_0$ , нормированные на интенсивность падающего излучения, в зависимости от толщины приповерхностного слоя ФС  $d$  при возбуждении флуоресценции на длине волны 405 нм (а) и 660 нм (б), а также их отношение  $R_\lambda$  (в), вычисленные в рамках Монте-Карло моделирования (МК) и аналитической модели без учета (AM) и с учетом (AM+) вклада ФС в коэффициент поглощения среды для вариаций коэффициента рассеяния на +30% (а-в) и на -30% (г-е) среды относительно базовых (Табл. 1).

Следует отметить, что флуоресцентный сигнал от среды формируется не только фотонами эмиссии, вышедшими из верхнего слоя среды, содержащего ФС, но и фотонами эмиссии, обратно диффузно рассеянными нижним слоем биоткани, не содержащим ФС. Из результатов, представленных на рис. 2.3-2.5, можно видеть, что для длины волны возбуждения  $\lambda_{ex} = 405$  нм зависимость сигнала флуоресценции от толщины флуоресцентного слоя  $d$ , рассчитанная в рамках Монте-Карло моделирования, располагается ближе к аналитической кривой для среды с учётом вклада ФС в коэффициент поглощения ( $\mu_a = \mu_{a,tiss} + \mu_{a,f}$ ). Это объясняется тем фактом, что сигнал флуоресценции при возбуждении в «синем» диапазоне длин волн

формируется преимущественно приповерхностными слоями среды и для больших толщин слоя, содержащего ФС, слабо чувствителен к параметрам нижнего слоя, не содержащего ФС. При возбуждении флуоресценции в «красном» диапазоне длин волн фотоны, обратно рассеянные из объема среды, не содержащего ФС, дают значительный вклад в мощность возбуждающего излучения, поглощаемую флуорофором, поэтому кривая интенсивности флуоресценции, рассчитанная методом Монте-Карло, располагается между двумя аналитическими кривыми, рассчитанными для среды с базовым поглощением и с учетом дополнительного поглощения ФС.

При одновременной вариации коэффициентов поглощения и рассеяния на  $\pm 30\%$  происходит изменение коэффициента диффузного ослабления  $\mu$  на аналогичную величину. Это изменение является более значительным, чем в случае вариации только коэффициента рассеяния или поглощения, что ведет к более существенному изменению характера зависимости  $R_\lambda(d)$ . Соответствующие зависимости показаны на рис. 2.6.

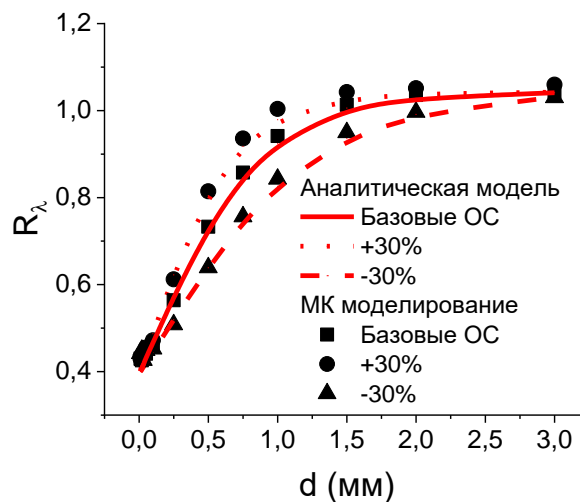


Рисунок 2.6. Отношения  $R_\lambda$  флуоресцентных откликов на длинах волн 660 и 405 нм, вычисленные в рамках Монте-Карло моделирования (МК) и аналитической модели (АМ) для базовых параметров среды и одновременной вариации коэффициентов поглощения и рассеяния среды в пределах  $+30\%$  и  $-30\%$  относительно базовых.

Анализ зависимостей  $R_\lambda(d)$  на рис. 2.3-2.6 демонстрирует, что при пропорциональном изменении параметров базовой среды на обеих длинах волн зондирования с одновременным сохранением спектра поглощения ФС интервал изменения значений  $R_\lambda$   $\left[ R_\lambda^{(0)}, R_\lambda^{(\infty)} \right]$  остается практически неизменным, поскольку определяется отношением характеристик среды на длинах волн  $\lambda_{ex1}, \lambda_{ex2}$  и  $\lambda_{em}$  (2.18). Скорость изменения  $R_\lambda(d)$  на линейном участке, наоборот, чувствительна к изменению абсолютных значений коэффициентов ослабления  $\mu$ , поскольку пропорциональна разности  $\mu_{ex1} - \mu_{ex2}$  (2.20), но одинаковые по величине и знаку относительные изменения либо поглощения, либо рассеяния, вызывают практически одинаковый эффект в темпе нарастания  $R_\lambda(d)$ .

Очевидно, что для оценки толщины флуоресцирующего слоя  $d$  на основании данных двухволновой ФВ необходимо использовать функцию  $d(R_\lambda)$ , обратную рассмотренной выше зависимости  $R_\lambda(d)$ , причем, поскольку величина  $R_\lambda$  зависит от оптических свойств биоткани, их априорная неизвестность может служить источником погрешности в определении  $d$ . Для оценки величины этой погрешности были построены зависимости  $d(R_\lambda)$  как для базовых оптических свойств, так и для случая их вариаций на величины в пределах  $\pm 30\%$ , включая одновременные. Результаты представлены на рис. 2.7.

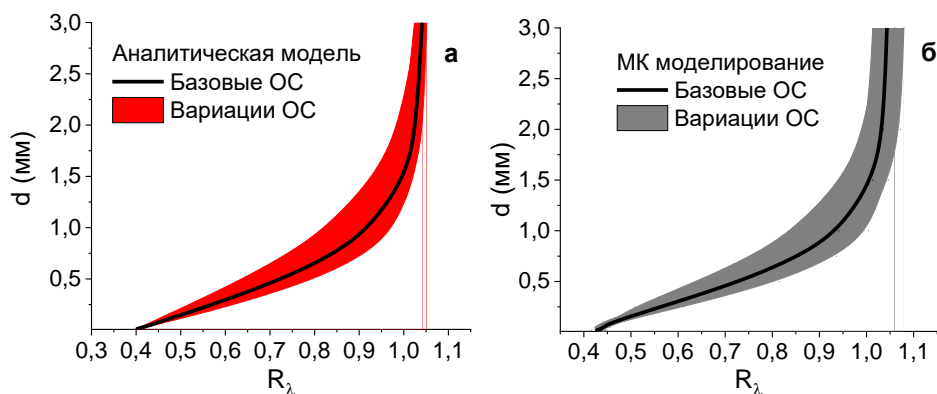


Рисунок 2.7. Оценки толщины флуоресцирующего слоя  $d$  по величине отношения сигналов флуоресценции  $R_\lambda$ , полученные в рамках аналитической

модели (а) и метода Монте-Карло (б), для базовых значений оптических свойств (ОС) дермы (сплошная линия) и для их различных вариаций (включая одновременные) в пределах  $\pm 30\%$  (интервал указан серым цветом).

Оценка ширины области значений (выделена на рис. 2.7 серым цветом) для фиксированных значений  $R_\lambda$  позволяет оценить погрешность определения толщины флуоресцирующего слоя в 25-30% при погрешности определения оптических свойств биоткани в 30% в диапазоне значений  $R_\lambda [0,4; 1]$ , что соответствует интервалу толщин флуоресцирующего слоя  $d \sim 0,1 - 2$  мм. Для малых значений  $d$  ( $d \ll l_{tr} = 3D$ ) предложенная аналитическая модель не может быть использована, поскольку в этом случае нарушаются условия применимости диффузионного приближения. При больших значениях  $d$  ( $d > 3/(\mu_{ex2} + \tilde{\mu}_{em})$ ) изменение флуоресцентных сигналов перестает быть чувствительным к наличию флуорофора, что ограничивает возможности применения предложенного метода оценки толщины флуоресцентного слоя.

Применимость предложенного радиометрического подхода к оценке локализации флуорофора также ограничена выполнением условия  $\mu_a \ll \mu'_s$  между коэффициентом поглощения и транспортным коэффициентом рассеяния в биоткани (условие применимости диффузионного приближения). При нарушении указанного условия формула (2.18) становится некорректной, и для оценки локализации флуорофора целесообразно реализовать решение обратной задачи на основании результатов Монте-Карло моделирования.

## **2.7. Монте-Карло моделирование флуоресценции фотосенсибилизатора, распределённого внутри биоткани, при внутривенном введении и поверхностном нанесении**

Представленные в разделах 2.5-2.6 результаты аналитического исследования и численного моделирования получены в предположении об однородном распределении флуорофора в приповерхностном слое биоткани



(рис. 2.1). Следует заметить, что традиционно при проведении процедуры ФДТ используются два типа введения ФС в организм: при лечении неопухолевых патологий используется, как правило, поверхностное нанесение ФС, в то время как при ФДТ новообразований ФС вводится внутривенно и доставляется в опухолевые ткани кровотоком. При поверхностном нанесении на кожу или слизистые ФС диффундирует в биоткань, неравномерно распределяясь в ней по глубине [160, 161]. При внутривенном (системном) введении ФС в организм и последующей доставке препарата в опухолевые ткани посредством кровотока распределение ФС традиционно считается однородным [162], однако в этом случае кровеносные сосуды располагаются в биоткани на некоторой глубине, что приводит к необходимости учёта в модели приповерхностного слоя, практически не содержащего флуорофора. Таким образом, предложенный радиометрический подход к оценке локализации флуорофора в биоткани на основе двухволновой ФВ требует обобщения на случай неоднородного распределения флуорофора в приповерхностном слое биоткани при поверхностном нанесении и на случай однородного распределения в заглублённом слое биоткани. Исследование формирования флуоресцентных сигналов в описанных случаях осуществлялось на основе численного моделирования методом Монте-Карло. Схемы численных экспериментов для обоих случаев введения ФС показаны на рис. 2.8.

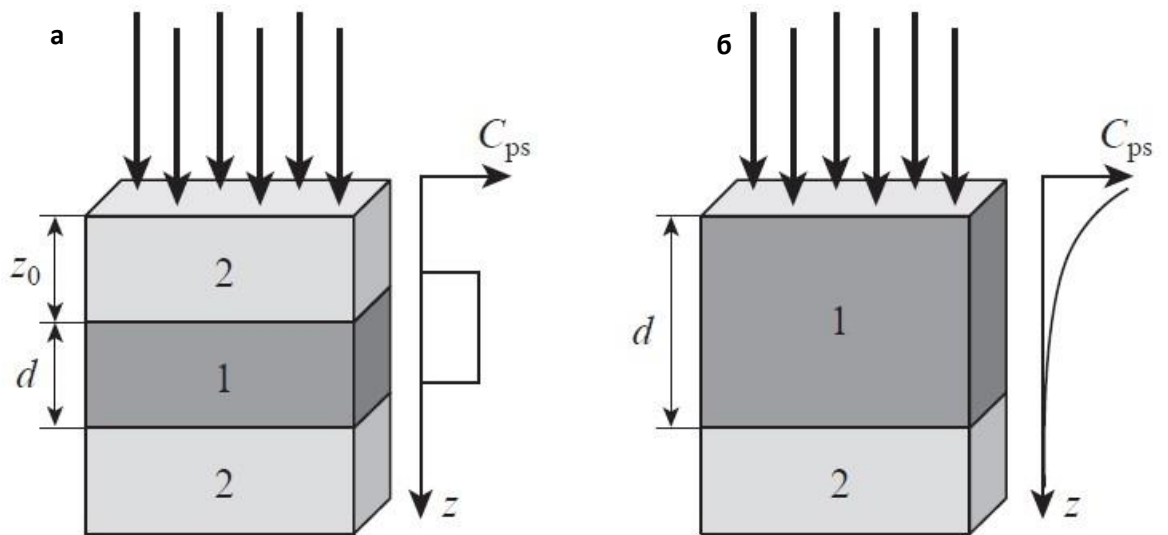


Рисунок 2.8. Геометрия численного моделирования и профиль концентрации ФС для случая системного введения ФС (а) и поверхностного нанесения ФС (б). 1 — флуоресцентный слой, 2 — окружающая биоткань.

При моделировании системного введения ФС (рис. 2.8а) вычислялась карта поглощённой ФС световой дозы при однородном распределении в слое толщиной  $d$ , находящемся на глубине  $z_0$ . Величины  $d$  и  $z_0$  варьировались от 0,25 до 3 мм независимо друг от друга. Объёмная концентрация ФС внутри слоя считалась постоянной  $C_{PS}(z) = const = C_0$ . Как и в случае приповерхностного флуоресцентного слоя с однородным распределением ФС, величина  $C_0$  выбрана равной 0,5% [158].

При моделировании случая поверхностного нанесения ФС (рис. 2.8б) вычислялась карта поглощённой ФС световой дозы в приповерхностном слое, дополнительно разбитом на слои с постоянной объёмной концентрацией с шагом  $\Delta z = 250$  мкм. При этом объёмная концентрация ФС уменьшалась с глубиной по закону

$$C_{PS}(z) = C_0 e^{-\alpha z_i} \quad (2.22)$$

где  $z_i$  — координата верхней границы  $i$ -го слоя;  $z \in [z_i; z_i + \Delta z]$ . Величина  $C_0$  выбрана равной 0,5% [158],  $\alpha = 0,6 \text{ мм}^{-1}$  [161]. Выбор величины шага дискретизации обусловлен тем, что он, с одной стороны, обеспечивает достаточное изменение концентрации ФС во всём флуоресцентном слое, а с

другой стороны, превышает длину свободного пробега фотонов в среде, поскольку метод Монте-Карло моделирования подразумевает локальную однородность оптических свойств среды на длине свободного пробега. Толщина флуоресцентного слоя варьировалась от 0,5 мм до 3 мм. Во всех случаях полные размеры среды составляли 10 мм \* 10 мм \* 6 мм. В качестве оптических параметров биоткани использовались значения, представленные в таблице 2 [26].

Таблица 2.  
Оптические свойства базовой биоткани и биоткани, содержащей ФС.

Длина волны, нм	$\mu_a, \text{мм}^{-1}$		$\mu_s, \text{мм}^{-1}$		g	
	Биоткань	Слой с ФС	Биоткань	Слой с ФС	Биоткань	Слой с ФС
$\lambda_{ex1}=405$ нм	0,47	0,59	5,0	5,6	0,84	0,79
$\lambda_{ex2}=660$ нм	0,04	0,08	4,8	5,0	0,87	0,83
$\lambda_{em}=760$ нм	0,03	0,03	4,6	4,7	0,88	0,85

Число фотонов зондирующего излучения составляло  $10^7$ , геометрия засветки была реализована в виде плоской волны. Отношение флуоресцентных сигналов  $R_\lambda$  вычислялось по формуле (2.17).

Карты распределения поглощённой ФС световой дозы  $dP_{abs}(\lambda_{ex}, x, y, z)$ , нормированной на число запускаемых в среду фотонов на единицу площади, для случая системного введения ФС (рис. 2.8а) при различных длинах волн возбуждения, глубинах залегания и толщинах флуоресцентного слоя представлены на рис. 2.9 и рис. 2.10.

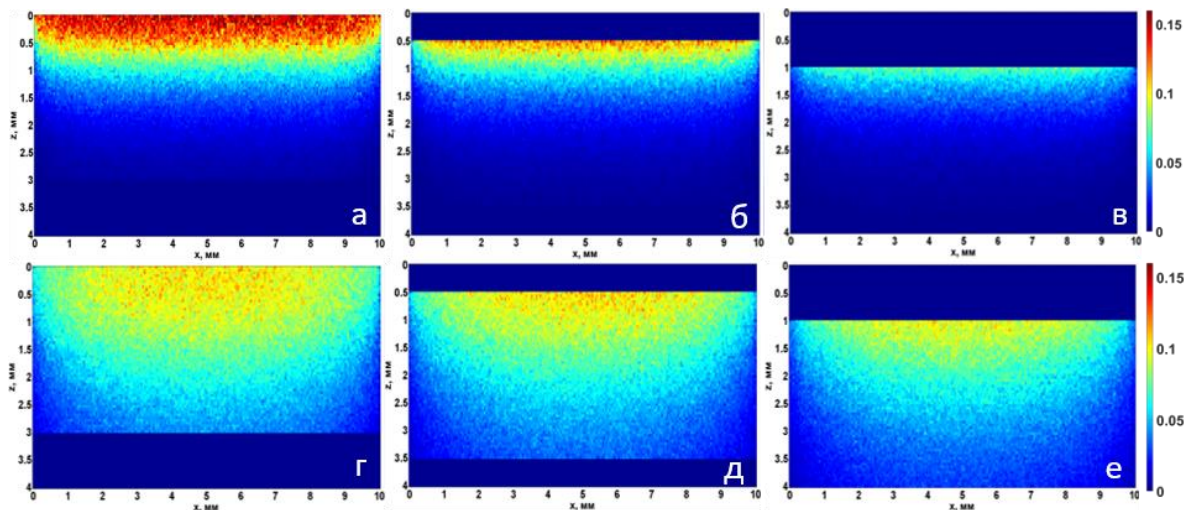


Рисунок 2.9. Карты распределений поглощённой ФС световой дозы при системном введении ФС для случая флуоресцентных слоёв толщиной 3 мм на поверхности биоткани (а, г) и на глубинах 0,5 мм (б, д) и 1 мм (в, е) при возбуждении флуоресценции на длинах волн 405 нм (а–в) и 660 нм (г–е). Величина световой дозы нормирована на число запускаемых в среду фотонов на единицу площади.

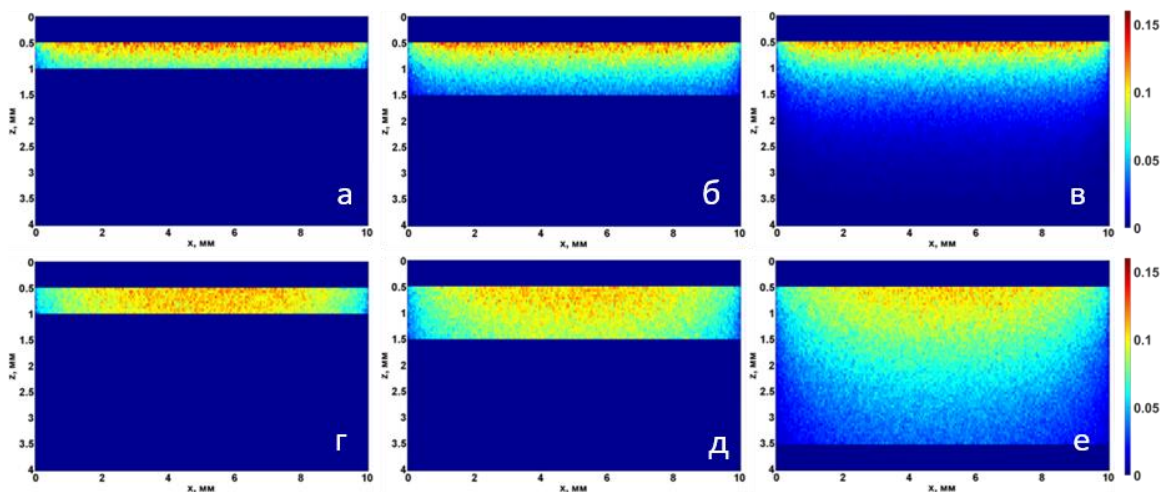


Рисунок 2.10. Карты распределений поглощённой ФС световой дозы при системном введении ФС для случая флуоресцентных слоёв толщиной 0,5 мм (а, г), 1 мм (б, д) и 3 мм (в, е) на глубине 0,5 мм внутри биоткани при возбуждении флуоресценции на длинах волн 405 нм (а–в) и 660 нм (г–е). Величина световой дозы нормирована на число запускаемых в среду фотонов на единицу площади.

Поглощаемая ФС световая доза уменьшается с увеличением глубины залегания слоя, причём уменьшение для длины волны возбуждения 405 нм происходит значительно быстрее, что связано со значительно большим ослаблением возбуждающего излучения при распространении в биоткани. При этом поглощаемая ФС световая доза в верхних слоях флуоресцентной области для длины волны 405 нм значительно превышает аналогичную величину для длины волны 660 нм. Этот факт связан с гораздо большим собственным поглощением ФС на длине волны 405 нм.

Карты распределения поглощённой ФС световой дозы  $dP_{abs}(\lambda_{ex}, x, y, z)$ , нормированной на число запускаемых в среду фотонов на единицу площади, для случая поверхностного нанесения ФС (рис. 2.8б) при различных длинах волн возбуждения представлены на рис. 2.11. Для сравнения на этом же рисунке представлены соответствующие результаты для приповерхностного слоя той же толщины с постоянной концентрацией  $C_0=0,5\%$ .

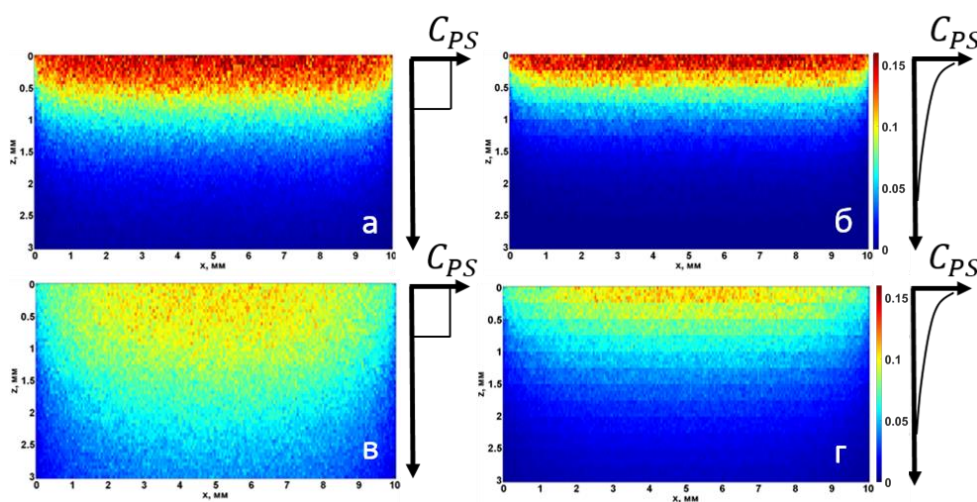


Рисунок 2.11. Карты распределений поглощённой ФС световой дозы в случае его поверхностного нанесения для однородного (а, в) и экспоненциального (б, г) распределения при возбуждении флуоресценции ФС на длинах волн 405 нм (а, б) и 660 нм (в, г). Величина световой дозы нормирована на число запускаемых в среду фотонов на единицу площади.

Как следует из рис. 2.11, экспоненциальное уменьшение концентрации ФС в биоткани приводит к перераспределению поглощенной световой дозы в пользу поверхностных слоев биоткани, и этот эффект более ярко выражен для длины волны 660 нм, что связано с ограниченным проникновением синего света в биоткань. Для количественного сравнения наблюдаемых эффектов на рис. 2.12 представлены центральные сечения карт поглощённой ФС световой дозы  $dP_{abs}(\lambda_{ex}, x, y, z)$  при однородном распределении ФС в слое толщиной 3 мм внутри среды (рис. 2.12а), а также однородном и экспоненциальном распределении ФС в приповерхностном слое толщиной 3 мм (рис. 2.12б).

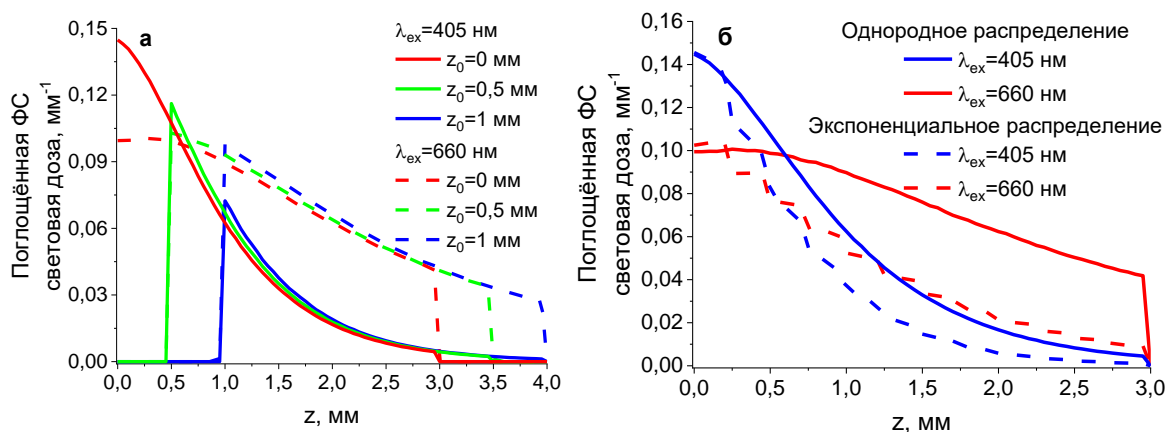


Рисунок 2.12. Центральные сечения карт распределений парциального поглощения ФС (а) при возбуждении флуоресценции на длинах волн 405 нм (сплошные кривые) и 660 нм (пунктирные кривые) во флуоресцентном слое толщиной 3 мм на различной глубине залегания с однородным распределением ФС; (б) при возбуждении флуоресценции на длинах волн 405 нм (синие кривые) и 660 нм (красные кривые) в приповерхностном флуоресцентном слое толщиной 3 мм с однородным (сплошные кривые) и экспоненциальным (пунктирные линии) распределениями ФС.

При возбуждении на длине волны 405 нм наибольшая световая доза поглощается в верхнем слое биоткани, при этом для глубин залегания слоя, превышающих величину 2 мм, поглощаемая доза светового излучения, следовательно, и флуоресцентный отклик для длины волны возбуждения 405

нм относительно невелики. Для каждой из длин волн возбуждения флуоресценции 405 нм и 660 нм спад кривых, соответствующих различным глубинам локализации флуоресцентного слоя, в зависимости от глубины  $z$  происходит примерно одинаково, тем не менее, поглощённая ФС световая доза немного возрастает с увеличением глубины локализации флуоресцентного слоя, что связано с отсутствием дополнительного ослабления света в верхнем слое в силу отсутствия в нём ФС. Дискретность изменения концентрации во флуоресцентном слое (2.22) при поверхностном нанесении ФС приводит к волнообразности линий на рис. 2.11 и рис. 2.12б наглядно демонстрируют необходимость учёта неоднородности распределения ФС в приповерхностном слое биоткани после поверхностного нанесения ФС.

В рамках Монте-Карло моделирования были рассчитаны зависимости отношения флуоресцентных сигналов  $R_\lambda$  от глубины залегания содержащего ФС слоя при системном введении ФС и от толщины приповерхностного содержащего ФС слоя при поверхностном нанесении ФС. На рис. 2.13 представлены зависимости отношения  $R_\lambda$  от глубины залегания флуоресцентного слоя  $z_0$  и его толщины  $d$  при системном введении ФС.

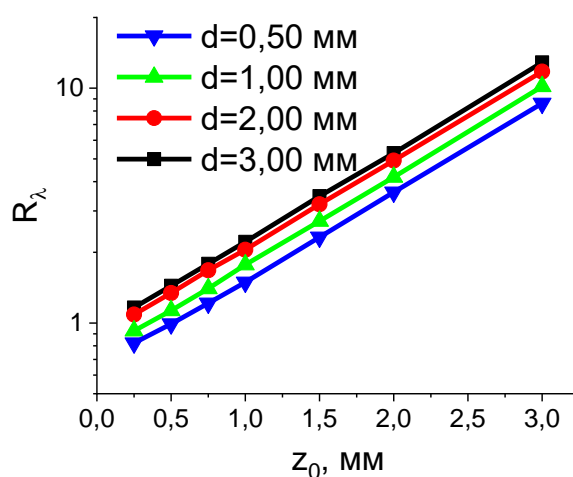


Рисунок 2.13. Зависимости отношения флуоресцентных сигналов  $R_\lambda$  от глубины залегания флуоресцентного слоя для случая системного введения ФС (рис. 2.8а).

Для слоя постоянной толщины  $d$  отношение растёт при увеличении глубины локализации  $z_0$ . Это объясняется совокупностью таких факторов, как быстрое уменьшение поглощённой ФС световой дозы возбуждающего излучения и значительно большее ослабление возбуждающего излучения на длине волны 405 нм по сравнению с длиной волны 660 нм. Как видно из рис. 2.13, отношение  $R_\lambda$  демонстрирует экспоненциальную зависимость от глубины залегания с независящим от толщины слоя показателем.

Таким образом, отношение  $R_\lambda$  позволяет оценить глубину залегания  $z_0$  флуоресцентного слоя известной толщины  $d$  внутри биоткани. Монотонное возрастание  $R_\lambda$  с увеличением толщины слоя  $d$  показывает, что отношение  $R_\lambda$  является также критерием оценки толщины  $d$  флуоресцентного слоя с известной глубиной залегания  $z_0$  внутри биоткани, в том числе и для приповерхностных локализаций, т.е. при  $z_0 = 0$ , что согласуется с результатами, представленными в разделе 2.5. При толщине флуоресцентного слоя более 1 мм, что зачастую реализуется на практике, глубину его залегания можно оценить с точностью до 1 мм.

Зависимости отношения  $R_\lambda$  от толщины приповерхностного содержащего ФС слоя с экспоненциальным распределением концентрации ФС при поверхностном нанесении, вычисленные в рамках Монте-Карло моделирования, представлены на рис. 2.14. Для сравнения на этом же рисунке представлены результаты Монте-Карло моделирования для однородного распределения ФС.



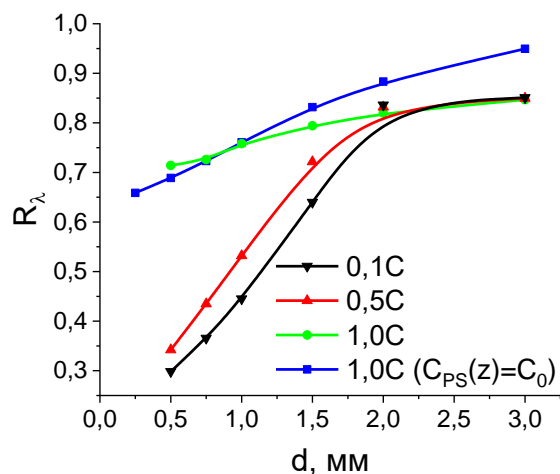


Рисунок 2.14. Зависимости отношения флуоресцентных сигналов  $R_\lambda$  от толщины флуоресцентного слоя  $d$  для случая поверхностного нанесения ФС (22) при различных концентрациях ФС, а также результаты численного моделирования ( $C_{PS}(z) = C_0$ ) для случая однородного распределения ФС в приповерхностном слое биоткани.

Наклон представленных на рис. 2.14 кривых уменьшается при увеличении толщины слоя, что связано с уменьшением вклада больших глубин во флуоресцентные сигналы и их отношение. Показатели поглощения биоткани и ФС в концентрации  $C_0$  сравнимы для длины волны 660 нм, в то время как для длины волны 405 нм поглощение среды значительно превышает поглощение ФС. Таким образом, увеличение концентрации ФС приводит к значительному увеличению поглощенной ФС световой дозы и, как следствие, флуоресцентного сигнала для длины волны возбуждения 660 нм, а для длины волны возбуждения 405 нм существенного увеличения поглощённой световой дозы не наблюдается. Это приводит к увеличению отношению флуоресцентных сигналов с ростом концентрации ФС. Увеличение концентрации ФС приводит также к уменьшению глубины проникновения зондирующего излучения на длине волны 660 нм в биоткань, из-за чего формирование флуоресцентного сигнала происходит в основном в приповерхностных слоях биоткани, приводя к уменьшению наклона зависимостей отношения флуоресцентных сигналов при небольших значениях

толщины флуоресцентного слоя. При уменьшении концентрации  $C_0$  уменьшается влияние ФС на отношение  $R_\lambda$ , причём в пределе малых концентраций величина  $R_\lambda$  перестаёт зависеть от концентрации флуорофора, что позволяет применять радиометрический подход при мониторинге проникновения ФС в биоткань.

## 2.8. Выводы

Предложена аналитическая модель формирования флуоресцентного сигнала от распределённого в приповерхностном слое биоткани флуорофора. Получено аналитическое выражение для регистрируемой флуоресценции в рамках модели, в которой предполагается облучение биоткани плоской волной, а каждый элементарный объём флуоресцирующего слоя предполагается изотропным точечным излучателем в полубесконечной среде. Результаты применения аналитической модели для расчёта флуоресцентных откликов от равномерно распределённого в приповерхностном слое кожи толщиной более 0,1 мм ФС хлоринового ряда, соответствующих различным (405 нм и 660 нм) длинам волн возбуждения флуоресценции в спектре поглощения ФС хлоринового ряда, хорошо согласуются (в пределах погрешности 10%) с результатами Монте-Карло моделирования. На основе предложенной модели предложен радиометрический подход к оценке локализации флуорофора в биоткани в рамках двухволновой ФВ в случае однородного распределения флуорофора в приповерхностном слое биоткани. Показано, что отношение флуоресцентных сигналов  $R_\lambda$ , соответствующих различным длинам волн возбуждения флуоресценции, может быть использовано для оценки толщины приповерхностного слоя  $d$  биоткани, содержащей флуорофор, поскольку зависимость  $R_\lambda(d)$  является монотонно возрастающей. Исследована асимптотика полученных зависимостей  $R_\lambda(d)$  и получены оценки для применимости предложенного подхода. Отношение  $R_\lambda$  чувствительно к величине толщины слоя биоткани, содержащего ФС, в

интервале значений  $0 < d < 3/(\mu_{ex2} + \tilde{\mu}_{em})$ , что связано с ограниченной глубиной проникновения света в биоткань.

Показано, что применение разработанной аналитической модели позволяет оценить толщину содержащего ФС хлоринового ряда приповерхностного слоя кожи в диапазоне от 0,1 до 2 мм с точностью 0,1 мм, а погрешность априорной оценки оптических свойств биоткани до 30% влечёт дополнительную погрешность определения толщины слоя предложенным методом в пределах 30%.

В реальных условиях характерная глубина проникновения ФС зависит как от пространственных характеристик диффузии, так и от времени проникновения. Задача нахождения пространственно-временного распределения концентрации ФС в биоткани в результате его диффузии решалась, например, в работе [160]. Для применения разработанной упрощенной модели к реалистичной ситуации неравномерного распределения ФС можно аппроксимировать сложную зависимость концентрации ФС от глубины в каждый момент времени ступенчатой функцией, параметры которой – толщина слоя, содержащего ФС, и уровень поглощения ФС – выражены через характерный масштаб спада концентрации ФС с глубиной и значение концентрации на поверхности. Тогда оценка толщины слоя ФС по радиометрическим измерениям флуоресценции позволит отслеживать динамику проникновения ФС вглубь биоткани и определять ее характерные временные параметры, что имеет практическую ценность в задачах изучения накопления ФС различными типами биотканей.

Рассмотренная в рамках аналитического исследования упрощенная модель биоткани и распределения в ней ФС обобщена на случай локализации флуоресцентного слоя с однородным распределением в ней ФС на определённой глубине внутри биоткани, а также на случай неоднородного распределения ФС в приповерхностном слое биоткани. Описанные модели соответствуют системному введению ФС в организм и его доставке в опухолевую ткань путём кровотока, а также поверхностному нанесению ФС

на кожу или слизистые и его диффузии вглубь биоткани. Показано, что в случае системного введения ФС параметр  $R_\lambda$  может использоваться для определения глубины локализации содержащего ФС слоя или его толщины. В случае поверхностного нанесения ФС величина  $R_\lambda$  может использоваться для оценки толщины приповерхностного флуоресцентного слоя.

Результаты численного моделирования демонстрируют существенные количественные различия в значениях параметра  $R_\lambda$  для случая системного введения и поверхностного нанесения ФС. Различие связано с ограниченностью проникновения оптического излучения в биоткань, особенно для синего диапазона длин волн. Таким образом, наличие дополнительного слоя биоткани, не содержащего ФС, приводит к гораздо более сильному ослаблению зондирующего излучения и флуоресценции с увеличением глубины локализации флуоресцентного слоя, особенно для длины волны 405 нм, и, следовательно, к значительному росту параметра  $R_\lambda$ .

Для количественной оценки глубины проникновения ФС на основе описанной модели необходима информация об оптических свойствах конкретного участка биоткани, содержащей флуорофор, на всех рабочих длинах волн. Одновременные опорные измерения оптических свойств биоткани при осуществлении двухволновой ФВ являются перспективным направлением для повышения информативности предложенного диагностического метода, предшествующего процедуре ФДТ, что будет способствовать повышению эффективности процедуры посредством индивидуализации режимов воздействия, корректировки дозы ФС и дозы светового облучения.

### **Глава 3. Апробация метода оценки локализации флуорофора в биоткани на основе двухволновой флуоресцентной визуализации в модельном эксперименте**

Для проведения модельных экспериментов по двухволновой ФВ необходимы фантомы заданной формы с флуоресцентными включениями. В связи с этим целесообразным представляется создание полутвёрдых фантомов биоткани с водным раствором агарового порошка в качестве основной матрицы.

В данной Главе разработан подход к созданию фантомов биоткани для проведения модельных экспериментов по двухволновой ФВ для задач ФДТ. Разработанные фантомы были апробированы в рамках модельного эксперимента по двухволновой ФВ фантомов, имитирующих различные способы введения ФС в организм. Апробирован метод оценки толщины приповерхностного флуоресцентного слоя, разработанный в Главе 2.

#### **3.1 Изготовление агаровых фантомов биоткани**

Использование воды с добавлением агарового порошка [140, 141] позволяет формировать стабильные матрицы с возможностью добавления рассеивающих и поглощающих компонентов, что является важным для изготовления полутвёрдых фантомов биоткани. В рамках предлагаемого подхода к созданию фантомов биоткани в качестве основной матрицы использовался водный раствор агарового порошка с массовой долей 1,25%. После нагрева в СВЧ печи до визуально наблюдаемого процесса кипения (до температуры  $\sim 85^{\circ}\text{C}$ ) раствор охлаждался в комнатных условиях с периодическим перемешиванием для растворения всех гранул агарового порошка. Липофундин 20% МСТ/ЛСТ (Braun, Германия) смешивался с красными чернилами (Koh-i-Noor, Чехия), предварительно подвергнутыми ультразвуковому перемешиванию. Использование красных чернил в качестве основного хромофора фантома позволяет имитировать особенности спектра

поглощения биотканей, обусловленные в рассматриваемом диапазоне преимущественно гемоглобином [138]. Полученная смесь добавлялась в охлаждённый до температуры ниже 42°C (температуры денатурации белков) раствор агара. Предварительные эксперименты показали, что следование выбранному температурному режиму критично для получения однородного фантома. Поскольку в рамках экспериментов было определено, что из-за происходящих в процессе изготовления фантома процессов оптические свойства фантома не могут быть рассчитаны как суперпозиция оптических свойств его компонентов, соотношение компонентов в фантоме определялось эмпирически. Объёмные концентрации липофундина и красных чернил в полученном растворе составили 23% и 0,19% соответственно. Затем полученный раствор до застывания разливался на 2 равных объёма, в один из которых добавлялся гель-ФС на основе хлорина еб Revixan-Derma (Revixan, Россия), объёмная концентрация которого в полученном флуоресцирующем фантоме составляла 0,1%. Указанным способом создавались растворы для фантомов базовой биоткани и биоткани с введённым флуоресцентным агентом, причём различия в оптических свойствах фантомов были обусловлены только наличием или отсутствием ФС, являющегося дополнительным хромофором. До застывания растворов они разливались в ячейки диаметром 45 мм с контролируемой глубиной, а также в кварцевые кюветы толщиной 2 мм для проведения спектрофотометрических измерений. Изготовленные фантомы имели цилиндрическую форму. Толщины изготавливаемых фантомов соответствовали набору глубин ячеек и составляли 0,51, 0,68, 1,00 и 2,00 мм. Выбор толщины обусловлен характерными толщинами слоев кожи и оценками глубины локализации ФС хлоринового ряда при различном введении его в организм перед процедурой ФДТ [98]. Также изготавливались фантомы толщиной 30 мм, имитирующие толстые образцы биоткани и также имеющие цилиндрическую форму. Все полученные фантомы упаковывались в воздухонепроницаемую пленку,

помещались в холодильную камеру и охлаждались до температуры 4°C, чтобы обеспечить их бóльшую стабильность при проведении измерений.

Изготовленный набор фантомов позволил имитировать не только однослойные, но также и многослойные биоткани, отдельные слои которых могут содержать флуорофор, аналогично использованным в рамках численного моделирования (рис. 2.8) геометриям биоткани. Расположение флуоресцирующего слоя над слоем базового фантома имитирует ситуацию поверхностного нанесения флуорофора на кожу (рис 3.1а), в то время как расположение слоя с флуорофором под базовым слоем моделирует подповерхностное накопление ФС (за счет микроциркуляции крови) при внутривенном введении (рис. 3.1б).

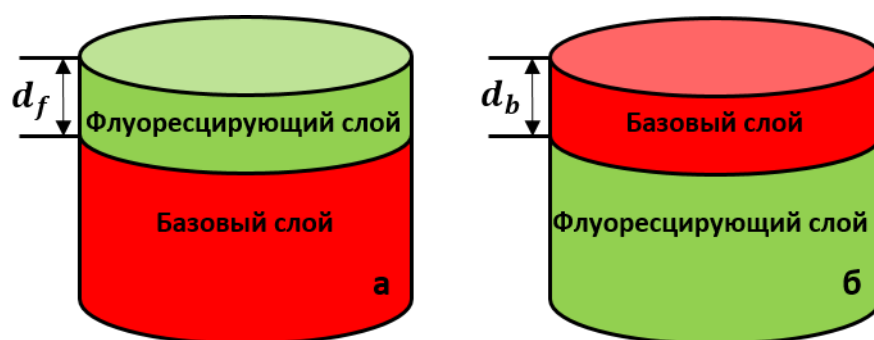


Рисунок 3.1. Схема двухслойных агаровых фантомов биоткани, имитирующих поверхностное (а) и внутривенное (б) введение ФС в организм.

Внешний вид изготовленных агаровых фантомов биоткани представлен на рис. 3.2. Флуоресцирующие фантомы биоткани обладают слегка зеленоватым оттенком, обусловленным наличием в их составе ФС, эффективно поглощающего в синем и красном диапазонах длин волн. Следует отметить, что визуально фантомы имеют более насыщенный цвет по сравнению с кожей человека, что связано с тем, что визуально цвет кожи обусловлен оптическими свойствами поверхностного рогового слоя, который не содержит кровеносных сосудов, в то время как макроскопические

оптические свойства кожи определяются нижележащими слоями, в которых присутствуют кровеносные сосуды.

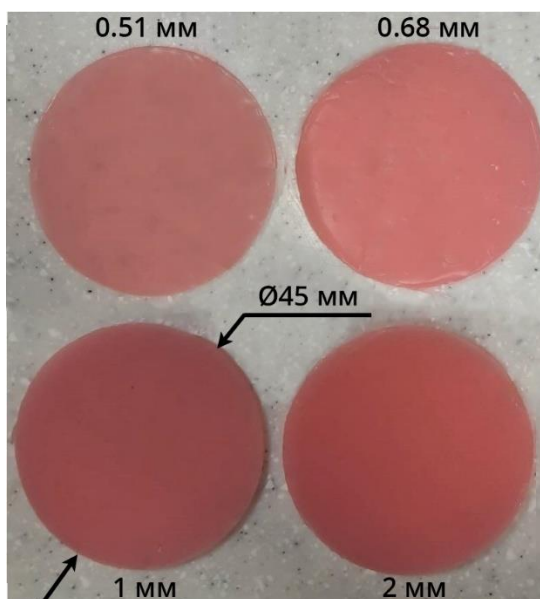


Рисунок 3.2. Агаровые фантомы базовой биоткани различной толщины (вид сверху).

### 3.2 Оптические свойства агаровых фантомов биоткани

Для определения оптических свойств изготовленных агаровых фантомов с помощью спектрофотометра Specord 250 Plus (Analytik Jena, Германия), оснащённого интегрирующей сферой, проводились измерения спектров коллимированного и диффузного пропускания, а также диффузного отражения в диапазоне длин волн 370-1000 нм. Для измерений использовались образцы фантомов и их компонентов в кварцевых кюветах толщиной 2 мм. По результатам спектрофотометрических измерений спектров диффузного пропускания и отражения восстанавливались спектры коэффициента поглощения  $\mu_a$  и транспортного коэффициента рассеяния  $\mu'_s$  методом инверсного Монте-Карло [163]. По спектрам коллимированного пропускания определялись спектры поглощения туши и воды.



Спектры коэффициентов поглощения и рассеяния всех компонентов фантома (агарового геля, красной туши, липофундина и воды), восстановленные из спектрофотометрических измерений, представлены на рис. 3.3а. Концентрации веществ в субстанциях, использованных для измерения отдельных спектров компонентов, соответствуют таковым в итоговом фантоме. Раствор туши и вода не обладают значимым рассеянием, в то время как коэффициент поглощения липофундина определяется только водой. Восстановленный транспортный коэффициент рассеяния агара оказался незначительным и не представлен на графике.

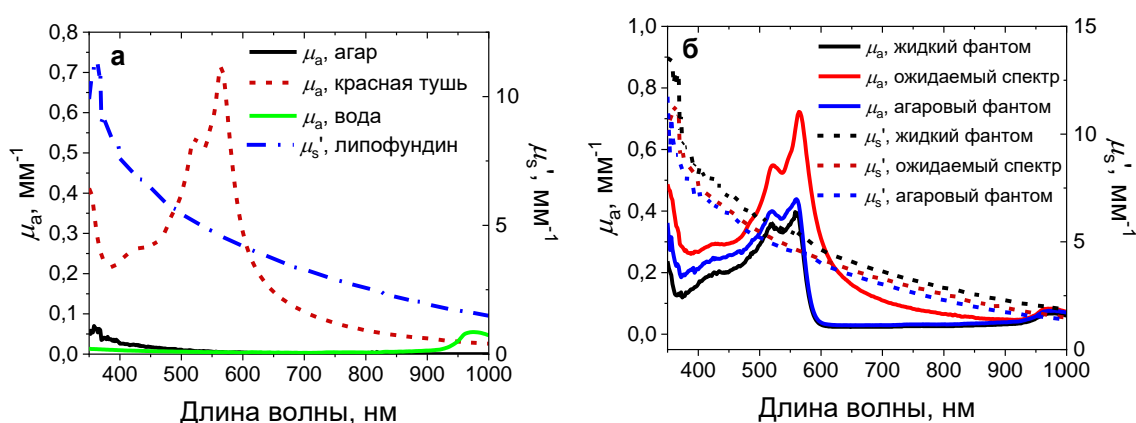


Рисунок 3.3. Спектральные зависимости коэффициента поглощения и транспортного коэффициента рассеяния для компонентов фантома (а); для агарового фантома, жидкого фантома, состоящего из липофундина, красной туши и воды, и ожидаемые значения, рассчитанные как сумма свойств индивидуальных компонентов («ожидаемый спектр») (б).

Следует отметить, что в соответствии с полученными зависимостями можно ожидать, что рассеяние в изготавливаемом фантоме будет обусловлено присутствием липофундина, в то время как поглощение в диапазоне длин волн 400-900 нм будет обусловлено преимущественно красной тушью, а агар обеспечит небольшой вклад в поглощение в синей области спектра. Предварительно перед изготовлением производился прогноз ожидаемого спектра путем суммирования спектров рассеяния липофундина и агара и

отдельно индивидуальных спектров поглощения раствора красной туши и агара, взятых в относительных концентрациях, соответствующих их содержанию в фантоме. На рис. 3.3б представлены спектральные зависимости оптических свойств трех композиций: (1) ожидаемого спектра, (2) жидкого фантома, состоящего из липофундина, красной туши и воды – основных компонентов, ответственных за имитацию оптических характеристик биотканей в фантоме, и (3) самого агарового фантома. Спектры жидкого фантома и ожидаемый спектр различаются как по амплитуде, так и по характерной форме (это касается более резкого спада коэффициента поглощения в районе 600 нм для жидкого фантома по сравнению с ожидаемым), что обусловлено взаимодействием туши и липофундина. Предположительно, наночастицы туши облепляют капли соевого масла с характерным микронным размером при добавлении туши в липофундин, что приводит к пониженному содержанию частиц туши в воде и, соответственно, пониженному поглощению относительно ожидаемого. Одновременно капли соевого масла в оболочке из наночастиц туши также изменяют свои свойства, что ведет к изменению их сечения рассеяния. Поглощение в агаровом фантоме также ниже ожидаемого, однако превосходит таковое для жидкого фантома, в то время как рассеяние близко к ожидаемым значениям, что позволяет предположить, что в агаровом фантоме влияние взаимодействия липофундина и туши ниже, чем в жидком.

На рис. 3.4 представлены восстановленные по результатам спектрофотометрических измерений оптические свойства фантомов базовой биоткани и биоткани с добавленным ФС в сравнении с усредненными по различным локализациям *in vivo* спектрами кожи человека [32]. Поскольку в работе [32] представлены спектры коэффициента рассеяния, для расчета транспортного коэффициента рассеяния использовалось значение фактора анизотропии  $g = 0,67$ , соответствующее фазовой функции, использованной в этой работе.

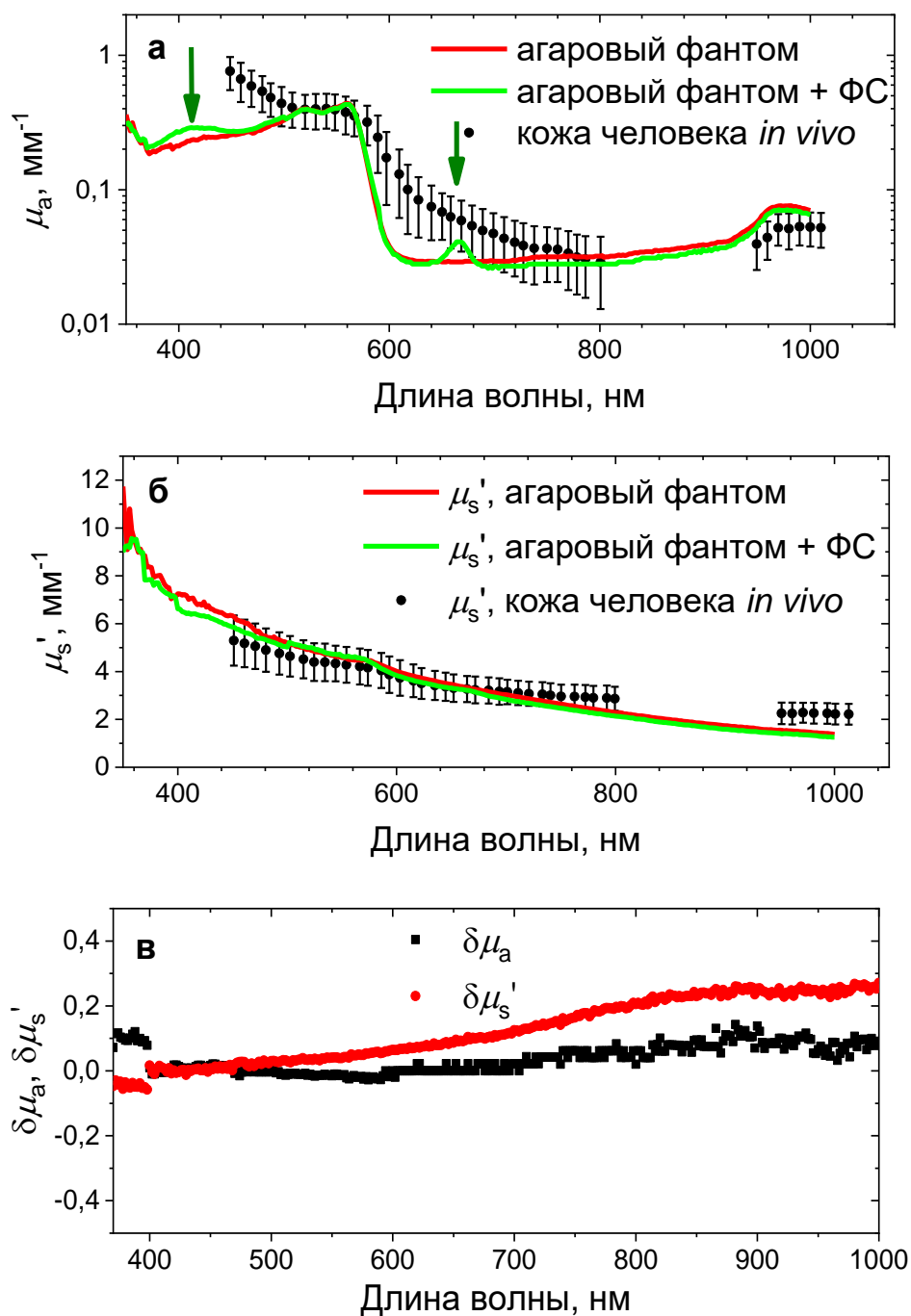


Рисунок 3.4. Восстановленные спектры коэффициента поглощения (а) и транспортного коэффициента рассеяния (б) агаровых фантомов базовой биоткани (агаровый фантом) и биоткани с введением ФС хлоринового ряда (агаровый фантом + ФС) в сравнении со спектрами кожи человека из работы [32]. Зелеными стрелкам показаны пики поглощения ФС. Относительные изменения транспортного коэффициента рассеяния и коэффициента поглощения после хранения фантома в течение 1 месяца (в).

Представленные данные демонстрируют, что изготовленные фантомы хорошо имитируют оптические свойства кожи человека в спектральном диапазоне от 500 до 800 нм, причем погрешность коэффициента поглощения составляет менее 5% в диапазонах 520-560 нм и 760-800 нм; погрешность транспортного коэффициента рассеяния составляет менее 10% в диапазоне 450-700 нм. Тем не менее, в диапазоне 350-500 нм поглощение полученного фантома существенно ниже значений, характерных для реальных биотканей, обусловленных поглощением меланина и бета-каротина [164, 165]. Несмотря на это, следует отметить, что поглощение в этом диапазоне существенно превышает поглощение в красном и ближнем ИК диапазоне, что качественно повторяет наблюдаемые тренды в биотканях, и такие фантомы могут быть использованы для апробации методик двухволновой ФВ с использованием ФС хлоринового ряда, в основе которых лежит существенная разница в оптических свойствах биотканей на длинах волн 405 нм и 660 нм. Разброс значений оптических свойств при повторном изготовлении фантома не превышает 15%.

Как видно из рис. 3.4а,б, добавление ФС практически не изменяет спектр транспортного коэффициента рассеяния, в то время как в спектре коэффициентов поглощения для фантома, содержащего ФС, отчетливо видны пики в районе длин волн 405 и 660 нм, соответствующие пикам в спектре поглощения ФС хлоринового ряда (рис. 1.3). В остальной части спектра коэффициенты поглощения базового и флуоресцирующего фантома совпадают.

Одним из важных параметров фантома является его стабильность, то есть постоянство оптических свойств с течением времени. Для проверки стабильности изготовленного фантома он хранился в течение месяца в сухом темном месте при температуре 4°C обернутым в воздухо непроницаемую пленку. Результаты вычисления относительного изменения оптических свойств фантома через месяц после изготовления:

$$\delta\mu_a = \frac{\mu_{a,2} - \mu_{a,1}}{(\mu_{a,2} + \mu_{a,1})/2} \quad (3.1)$$

$$\delta\mu_s' = \frac{\mu'_{s,2} - \mu'_{s,1}}{(\mu'_{s,2} + \mu'_{s,1})/2} \quad (3.2)$$

где «1» соответствует фантому сразу после изготовления, а «2» - через 1 месяц, представлены на рис. 3.4в. Они демонстрируют незначительное (в пределах 25%) увеличение транспортного коэффициента рассеяния и коэффициента поглощения (а в диапазоне длин волн 500-700 нм отклонение составляет не более 10%), что связано с небольшим испарением воды из фантома во время хранения.

### **3.3. Двухволновая флуоресцентная визуализация агаровых фантомов, имитирующих биоткани с введённым фотосенсибилизатором хлоринового ряда**

Предложенный в Главе 2 радиометрический метод оценки толщины флуоресцентного слоя был апробирован в модельном эксперименте на фантомах биоткани, изготовленных по «рецепту», описанному в подразделе 1.3. Регистрация флуоресцентных сигналов осуществлялась с помощью разработанного в ИПФ РАН устройства для мониторинга накопления ФС и контроля ФДТ [157], схема которого представлена на рис. 3.5.

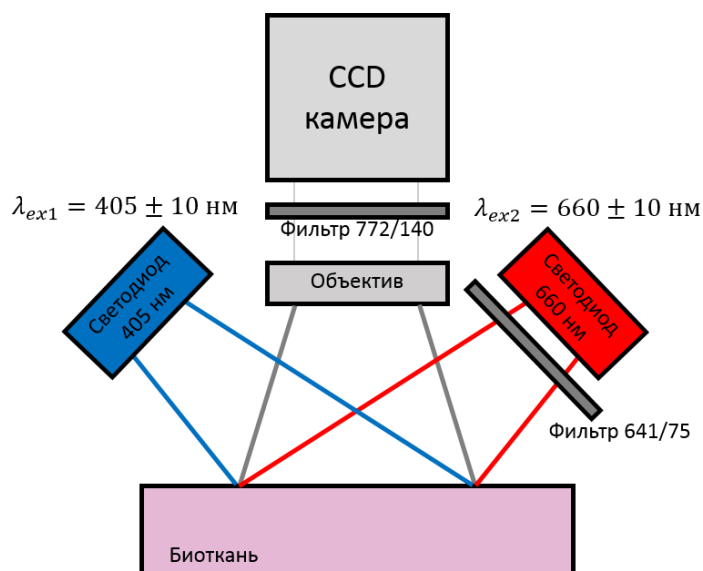


Рисунок 3.5. Упрощенная схема устройства для мониторинга накопления ФС и контроля ФДТ [157].

Устройство оснащено двумя светодиодными источниками на длинах волн  $405 \pm 10$  нм и  $660 \pm 10$  нм, синхронизованных с CCD-камерой. Спектр синего светодиода достаточно далеко отстоит от спектра флуоресценции ФС хлоринового ряда (рис. 3.6), поэтому при возбуждении флуоресценции синим светодиодом не используются оптические фильтры. Зондирующее излучение красного светодиода пропускается через фильтр 641/75 (Semrock, США). При регистрации флуоресценции для исключения влияния красного зондирующего излучения используется фильтр 772/140 (Semrock, США). Спектры источников представлены на рис. 3.6; для наглядности приведены также спектры ФС хлоринового ряда.

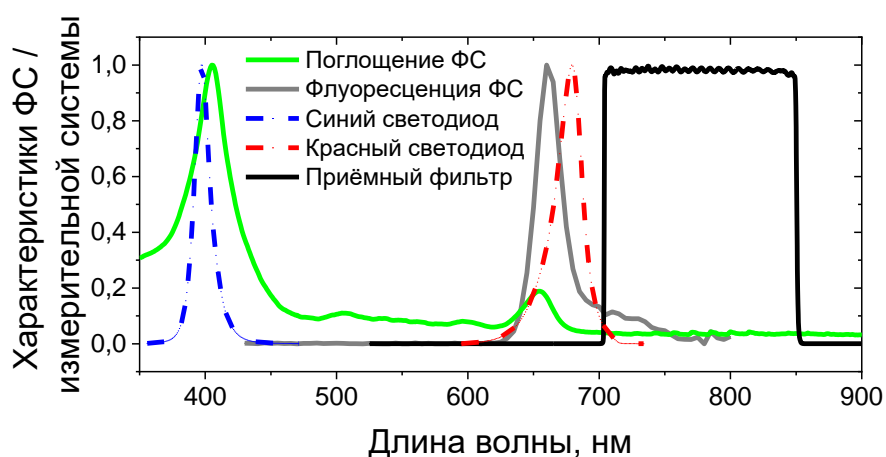


Рисунок 3.6. Спектры источников устройства для мониторинга накопления ФС и контроля ФДТ.

Для возбуждения флуоресценции используется широкополосная равномерная засветка исследуемого объекта, формируемая при помощи специально подобранной светодиодной оптике. Интенсивности источников на поверхности облучаемого объекта составляют  $1,44 \text{ мВт/см}^2$  и  $2,21 \text{ мВт/см}^2$  для синего и красного светодиодов соответственно. Время свечения светодиодов для обеих длин волн возбуждения флуоресценции составляет 0,3 с. Размеры области изображения составляют  $13 \text{ см} * 17 \text{ см}$  и соответствует облучаемой области при расстоянии до объекта исследования порядка 40 см. Из флуоресцентных изображений, полученных с включенным синим или красным светодиодом, автоматически вычитается фоновое изображение, полученное с выключенными светодиодами, что позволяет учесть фоновое освещение. После регистрации флуоресцентных изображений, соответствующих длинам волн возбуждения 405 нм и 660 нм, вычисляется отношение  $R_\lambda$  (2.17), где величинам  $I_{em}(\lambda_{ex} = 405 \text{ нм})$  и  $I_{em}(\lambda_{ex} = 660 \text{ нм})$  соответствуют усреднённые по поверхности исследуемого объекта флуоресцентные сигналы.

На рис. 3.7 представлены флуоресцентные изображения изготовленных однослойных фантомов биоткани толщиной 30 мм при возбуждении флуоресценции на длинах волн 405 нм и 660 нм, соответствующих пикам

поглощения ФС хлоринового ряда, и регистрации флуоресценции в окрестности длины волны 760 нм. Изображения представлены в виде карт интенсивностей флуоресценции  $I_{405}$  и  $I_{660}$ , регистрируемых камерой в разрядных единицах (нижний индекс соответствует длине волны возбуждения), отнесенных к соответствующим значениям зондирующей интенсивности  $I_{405}^{(0)}$  и  $I_{660}^{(0)}$ .

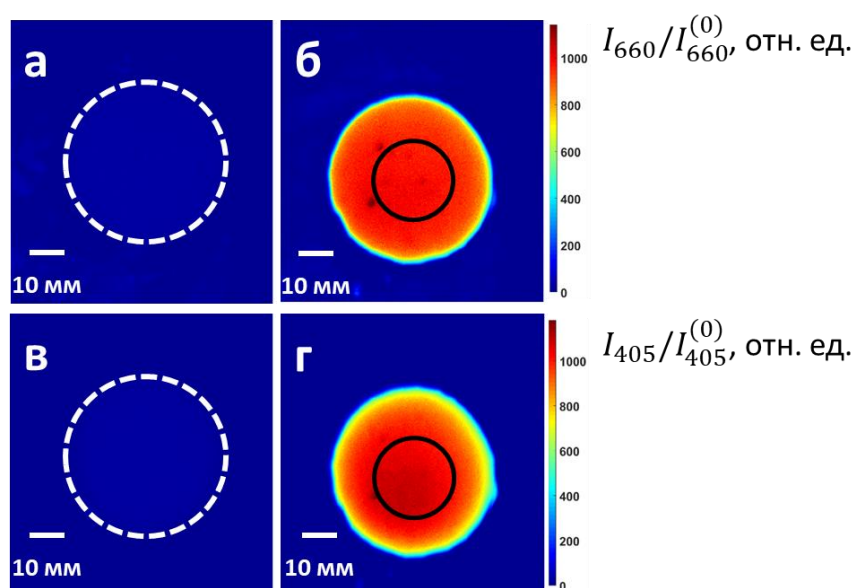


Рисунок 3.7. Флуоресцентные изображения фантомов базовой биоткани (а, в) (границы фантома обозначены пунктирной линией) и биоткани с введением ФС хлоринового ряда (б, г), полученные при возбуждении флуоресценции на длинах волн 405 нм (а, б) и 660 нм (в, г). Сплошной линией показана область усреднения при расчете сигналов флуоресценции от фантомов.

Флуоресцентные изображения фантомов базовой биоткани и биоткани с введением ФС приведены в одной цветовой шкале для каждой длины возбуждения флуоресценции. Таким образом, рис. 3.7 наглядно демонстрирует, что флуоресценция фантомов обусловлена добавлением ФС, а не автофлуоресценцией компонентов, входящих в состав как базового, так и флуоресцирующего фантома.



На рис. 3.8 представлены зависимости усредненных флуоресцентных сигналов двухслойных фантомов, имитирующих случаи поверхностного нанесения и внутривенного введения ФС (рис. 3.1), от толщины верхнего флуоресцирующего слоя  $d_f$  или верхнего базового слоя  $d_b$ . Область усреднения флуоресцентного сигнала, показанная на рис. 3.7 сплошной линией, проведена с отступом от границы фантома, чтобы избежать влияния краевых эффектов. Монотонный рост сигнала от  $d_f$  в случае, имитирующим поверхностное нанесение (рис. 3.8а), обусловлен увеличением толщины слоя, содержащего ФС и, следовательно, общего количества ФС в фантоме. Асимптотическое стремление зависимости к постоянному уровню обусловлено тем фактом, что при увеличении толщины флуоресцирующего слоя до глубины проникновения зондирующего излучения, дальнейшее увеличение его толщины не будет оказывать влияние на величину регистрируемого флуоресцентного сигнала. Монотонное уменьшение сигнала флуоресценции в случае, имитирующем внутривенное введение (рис. 3.8б), обусловлено усилением затухания возбуждающего излучения в верхнем слое, не содержащем ФС, при увеличении его толщины.

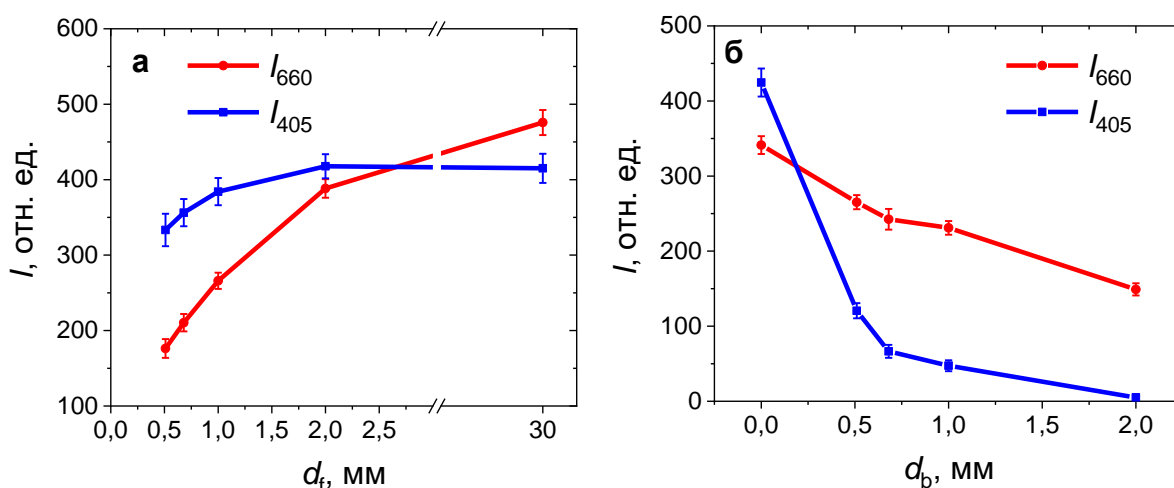


Рисунок 3.8. Экспериментальные зависимости флуоресцентных сигналов  $I_{660}$  и  $I_{405}$ , соответствующих длинам волн возбуждения 660 нм и 405 нм и нормированных на соответствующие интенсивности зондирующего излучения, полученные для двухслойных агаровых фантомов биоткани,

имитирующих поверхностное (а) и внутривенное (б) введение ФС в организм, от толщины верхнего слоя.

Количественные различия в динамике нормированных флуоресцентных сигналов  $I_{405}$  и  $I_{660}$ , соответствующих длинам волн возбуждения 405 нм и 660 нм, определяются различием в оптических свойствах базового фантома биоткани: более сильное поглощение и рассеяние света в синем диапазоне длин волн приводит к большему ослаблению возбуждающего излучения на длине волны 405 нм по сравнению с длиной волны 660 нм, вследствие чего флуоресцентный сигнал, соответствующий возбуждению в красном диапазоне длин волн, превосходит таковой для длины волны возбуждения 405 нм. При этом для малых толщин приповерхностного флуоресцирующего слоя ослабление на длине волны 405 нм компенсируется большим собственным поглощением ФС по сравнению с поглощением на длине волны 660 нм, что приводит к тому, что флуоресцентный сигнал при возбуждении на длине волны 405 нм больше, чем на длине волны 660 нм.

Прямое количественное сравнение флуоресцентных сигналов, регистрируемых в эксперименте и рассчитанных в рамках теоретической модели или Монте-Карло моделирования, осложняется неопределённостью в квантовых выходах флуоресценции  $\eta_{1,2}$  для различных длин волн возбуждения, интенсивностях возбуждающего излучения  $I_0(\lambda_{ex1,2})$ , а также коэффициентах поглощения ФС  $\mu_{a,f}(\lambda_{ex1,2})$ , которые могут зависеть от растворителя [166, 167]. В связи с этим для калибровки отношения флуоресцентных сигналов  $R_\lambda$ , полученного в рамках эксперимента, был подготовлен объект для опорного измерения. Калибровочный объект представлял собой поглощающую поверхность с нанесённым на неё тонким слоем ФС. Величина отношения  $R_{\lambda,ref}$  для калибровочного объекта не зависит от толщины флуоресцентного слоя и содержит информацию о квантовых выходах флуоресценции  $\eta_{1,2}$ , интенсивностях возбуждающего излучения

$I_0(\lambda_{ex1,2})$  и коэффициентах поглощения ФС  $\mu_{a,f}(\lambda_{ex1,2})$  для двух длин волн возбуждения флуоресценции:

$$R_{\lambda,ref} \approx \frac{\eta_2 I_0(\lambda_{ex2}) \mu_{a,f}(\lambda_{ex2})}{\eta_1 I_0(\lambda_{ex1}) \mu_{a,f}(\lambda_{ex1})} \quad (3.3)$$

Все экспериментально полученные значения  $R_\lambda$  были нормированы на калибровочный коэффициент  $R_{\lambda,ref}$ , что позволило получить параметр  $R_\lambda^c$ , независимый от неизвестных параметров эксперимента:

$$R_\lambda^c = \frac{R_\lambda}{R_{\lambda,ref}} \quad (3.4)$$

На рис. 3.9а представлены зависимости величины  $R_\lambda^c$  от толщины приповерхностного флуоресцентного слоя  $d_f$ , полученные в рамках аналитического исследования (2.17) и модельного эксперимента. На рис. 3.8б представлены зависимости величины  $R_\lambda^c$  от толщины приповерхностного слоя базовой биоткани  $d_b$  (рис. 3.9б), полученные в модельном эксперименте и с использованием аналитической модели, предложенной в работе [98].

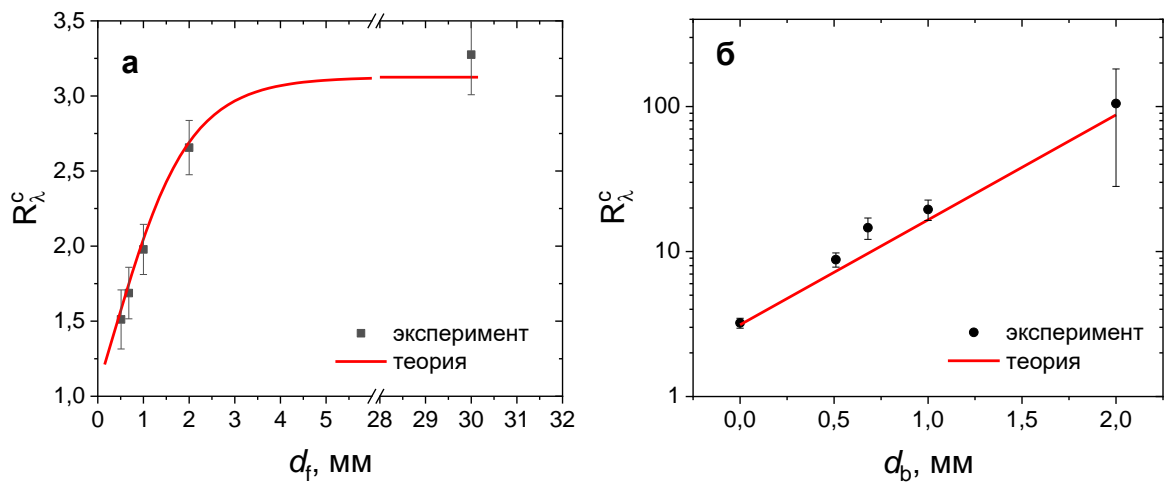


Рисунок 3.9. Экспериментальные зависимости нормированного отношения флуоресцентных сигналов  $R_\lambda^c$ , соответствующих длинам волн возбуждения 660 нм и 405 нм, полученные для двуслойных агаровых фантомов биоткани, имитирующих накопление ФС в организме при поверхностном нанесении (а) и внутривенном введении, от толщины верхнего слоя и соответствующие аналитические зависимости.

Как видно из рис. 3.9а, результаты, полученные в рамках предложенной аналитической модели, хорошо согласуются с результатами модельного эксперимента. Расхождение экспериментальных и теоретических результатов для малых толщин флуоресцентного слоя может быть объяснено неточностями в восстановлении оптических свойств фантомов или измерении толщин флуоресцентных фантомов и неоднородностью оптических свойств в фантомах после их изготовления.

Экспериментальные значения параметра  $R_\lambda^c$  могут быть использованы для оценки глубины проникновения ФС в биоткань. С учётом (3.3) и (3.4) соотношение (2.17) может быть переписано для  $R_\lambda^c$ :

$$R_\lambda^c = \frac{k(\lambda_{ex2})}{k(\lambda_{ex1})} \frac{\mu_{ex1} + \tilde{\mu}_{em}}{\mu_{ex2} + \tilde{\mu}_{em}} \frac{1 - e^{-(\mu_{ex2} + \tilde{\mu}_{em})d}}{1 - e^{-(\mu_{ex1} + \tilde{\mu}_{em})d}} \quad (3.5)$$

Уравнение (3.5) для толщины приповерхностного флуоресцентного слоя  $d$  является трансцендентным, что не позволяет построить обратную функцию  $d(R_\lambda^c)$  аналитически. Тем не менее, уравнение (3.5) может быть решено численно для заданного набора оптических параметров биоткани и экспериментальных значений параметра  $R_\lambda^c$ . На рис. 3.10 представлены результаты оценки толщины приповерхностного флуоресцентного слоя  $d_{f,estim}$ , полученные путём численного решения уравнения (3.5) для экспериментальных значений  $R_\lambda^c$  в среде Matlab, в сравнении с истинным значением толщины приповерхностного флуоресцентного слоя  $d_{f,real}$ .

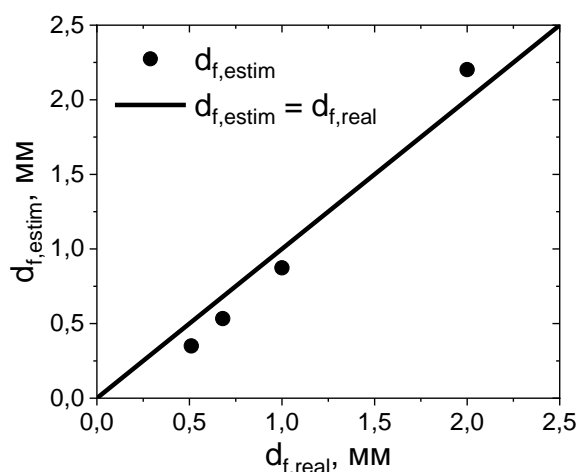


Рисунок 3.10. Результаты оценки толщины приповерхностного флуоресцентного слоя  $d_{f,estim}$  по экспериментальным значениям  $R_{\lambda}^c$  в зависимости от истинного значения толщины приповерхностного флуоресцентного слоя  $d_{f,real}$ .

Как видно из рис. 3.10, использование предложенной аналитической модели позволяет получить адекватную оценку толщины приповерхностного флуоресцентного слоя в рамках двухволновой ФВ. Погрешность определения толщины приповерхностного слоя уменьшается с увеличением толщины и для значений 0,5-2 мм находится в пределах 10-30%, что согласуется с результатами аналитического и численного исследования, представленными в Главе 2.

### 3.4. Выводы

Разработан простой и экономически эффективный подход к изготовлению агаровых фантомов, имитирующих оптические свойства биоткани до и после введения ФС хлоринового ряда. В рамках предложенного подхода были изготовлены фантомы, характеризующиеся значениями коэффициента поглощения  $0,02-0,5 \text{ мм}^{-1}$  и транспортного коэффициента рассеяния  $1-7 \text{ мм}^{-1}$  в диапазоне 400-1000 нм и имитирующие оптические свойства кожи человека *in vivo* в диапазоне 500-800 нм. В частности,

погрешность коэффициента поглощения составляет менее 5% в диапазонах 520-560 нм и 760-800 нм; погрешность транспортного коэффициента рассеяния составляет менее 10% в диапазоне 450-700 нм. Показано, что флуоресцентные свойства фантомов и различия в спектре поглощения определяются исключительно наличием ФС, а не автофлуоресценцией отдельных компонентов фантома. Влияние ФС на спектр транспортного коэффициента рассеяния является несущественным. При хранении фантомов в условиях, препятствующих высыханию (например, в холодильной камере и в пищевой плёнке), поддерживается стабильность их оптических свойств.

Предложенный подход позволяет создавать многослойные фантомы биоткани, имитирующие различные способы введения ФС в организм, что является важным для проведения модельных экспериментов по ФВ для задач планирования и контроля ФДТ с использованием ФС хлоринового ряда.

Предложенный в Главе 2 метод оценки локализации флуорофора в биоткани апробирован в модельном эксперименте на разработанных агаровых фантомах биоткани, имитирующих поверхностное нанесение ФС (с однородным распределением флуорофора в приповерхностном слое) и внутривенное введение ФС (с однородным распределением флуорофора под слоем базовой биоткани). Показано хорошее согласование результатов модельного эксперимента с теоретическими результатами, полученными в Главе 2. Предложенный в Главе 2 метод оценки локализации флуорофора в биоткани позволил оценить толщину приповерхностного флуоресцентного слоя от 0,5 мм до 2 мм с погрешностью 10-30%.

## **Глава 4. Двухволновой флуоресцентный мониторинг фотодинамической терапии с использованием фотосенсибилизаторов хлоринового ряда**

Данная Глава посвящена исследованию различных режимов воздействия при ФДТ с использованием ФС хлоринового ряда в рамках двухволновой ФВ, а также апробации разработанного в Главе 2 подхода к оценке локализации флуорофора на основе двухволновой ФВ в *in vivo* экспериментах. Исследования включают в себя проведение экспериментов на интактных (здоровых) и патологических (опухолевых) тканях лабораторных животных, а также мониторинг ФДТ в клинических условиях при лечении актинического кератоза и базальноклеточного рака. Процедуры ФДТ проводились на длинах волн 405 нм и 660 нм, а также в комбинированном режиме, поскольку различия в оптических свойствах биотканей и ФС в синем и красном диапазоне длин волн позволяют варьировать глубину воздействия путем выбора длины волны терапевтического воздействия при ФДТ с использованием ФС хлоринового ряда.

Традиционно при назначении процедуры ФДТ определяются доза светового излучения, доставляемая к поверхности облучаемой биоткани, а также количество ФС, вводимого внутривенно или наносимого поверхностно. Применение двухволновой ФВ при планировании, мониторинге и для оценки эффективности процедуры ФДТ позволит усовершенствовать существующие протоколы ФДТ в соответствии с принципами персонализированной медицины.

### **4.1 Мониторинг фотодинамической терапии *in vivo* на интактной ткани лабораторных животных**

Модельные эксперименты по ФВ процедуры ФДТ интактной ткани проводились в рамках исследования влияния различных режимов воздействия с поверхностным нанесением ФС хлоринового ряда [31]. В качестве объекта

исследования выбрана интактная ткань внутренней поверхности ушей кроликов породы русская шиншилла. Доза светового воздействия составляла 50 Дж/см<sup>2</sup> при облучении на терапевтических длинах волн  $\lambda_{th}=405$  и  $\lambda_{th}=660$  нм, а также при комбинированном воздействии: 25 Дж/см<sup>2</sup> на длине волны  $\lambda_{th}=405$  нм + 25 Дж/см<sup>2</sup> на длине волны  $\lambda_{th}=660$  нм. Здесь и далее символом  $\lambda_{th}$  обозначается терапевтическая длина волны. При комбинированном воздействии облучение проводилось последовательно на длинах волн  $\lambda_{th}=405$  нм и  $\lambda_{th}=660$  нм. Световые дозы меньше традиционно используемых при ФДТ онкологических заболеваний и соответствуют типичным световым дозам, используемым при проведении ФДТ в косметологии. ФС хлоринового ряда «Ревиксан» (ООО «Ревиксан-Дерма», Россия) использовался в качестве терапевтического агента. ФС наносился поверхностно на участок внутренней поверхности уха кролика площадью 1 см \* 1 см и затем накапливался в течение 30 минут. Остаточный поверхностный слой ФС после его накопления удалялся с поверхности перед процедурой ФДТ и её мониторингом для исключения вклада поверхностного ФС во флуоресцентные сигналы. Облучение осуществлялось при помощи аппарата для ФДТ «Гармония» (ООО «Лазер медцентр», Россия); плотность мощности излучения составляла 0,4 Вт/см<sup>2</sup>. Исследования одобрены Этическим Комитетом Приволжского Исследовательского Медицинского Университета (протокол №7 от 03.07.2017). Накопление ФС и мониторинг его фотовыгорания в ходе процедуры ФДТ осуществлялись при помощи устройства для мониторинга накопления ФС и контроля ФДТ [157], описанного в Главе 3. При этом аналогично численному моделированию и модельному эксперименту оценивались не только величины флуоресцентных сигналов, соответствующих длинам волн возбуждения 405 нм и 660 нм, но и вычислялось их отношение  $R_{\lambda}^c$  (3.4).

На рис. 4.1а,б представлены типичные кривые фотовыгорания ФС при осуществлении процедуры ФДТ на длинах волн  $\lambda_{th}=405$  нм и  $\lambda_{th}=660$  нм соответственно.



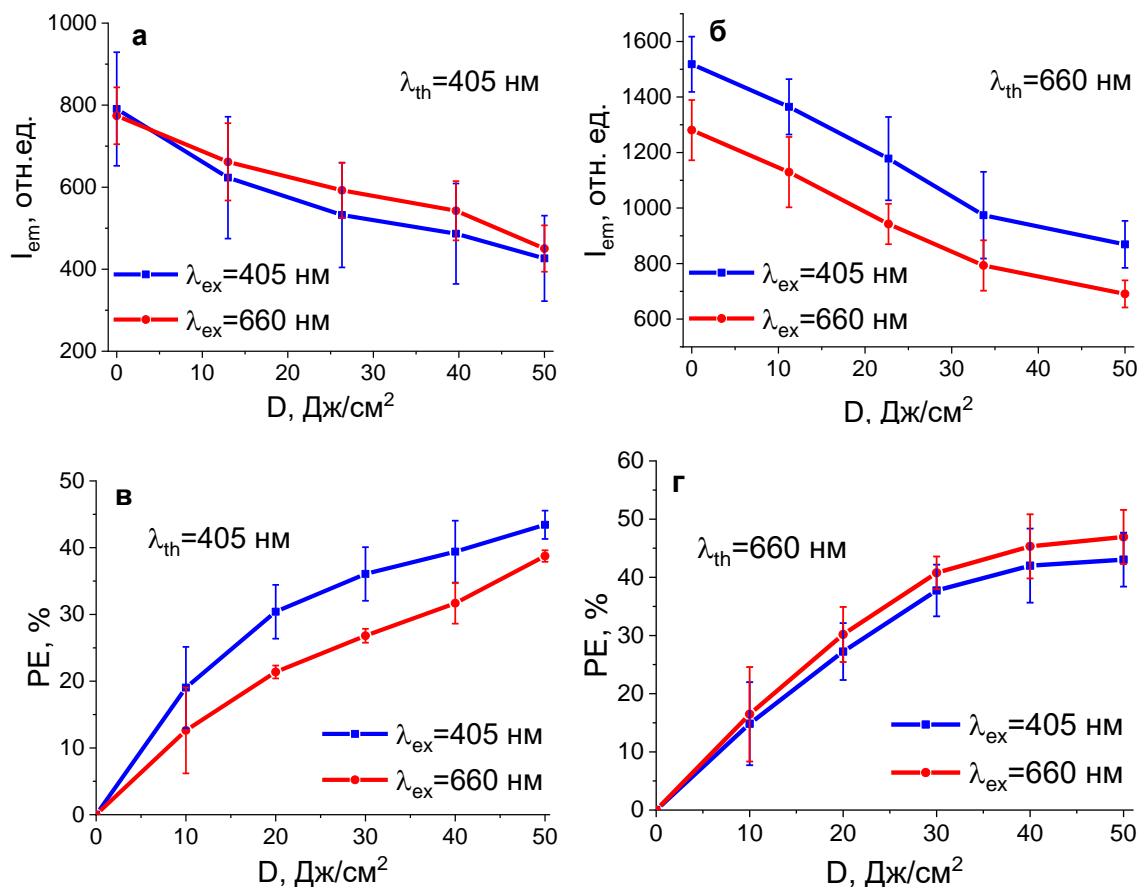


Рисунок 4.1. Зависимости флуоресцентного сигнала  $I_{em}$  (а, б) и эффективности фотовыгорания  $PE$  (в, г) ФС от световой дозы  $D$  при осуществлении процедуры ФДТ с полной световой дозой 50 Дж/см<sup>2</sup> на длине волны  $\lambda_{th}=405$  нм (а, в) и  $\lambda_{th}=660$  нм (б, г) на внутренней поверхности уха кролика. Усреднение в каждом случае проведено по 3 областям воздействия.

Как видно из рис. 4.1, величина флуоресцентного сигнала монотонно уменьшается в ходе процедуры ФДТ, демонстрируя фотовыгорание ФС. Величина (эффективность) фотовыгорания  $PE$  (рис. 4.1в, г) традиционно оценивается как выраженное в процентах отношение разности флуоресцентных сигналов до ( $I_1$ ) после процедуры ( $I_2$ ) к величине флуоресцентного сигнала до процедуры:

$$PE = \frac{I_1 - I_2}{I_1} * 100\% \quad (4.1)$$

и может быть использована в качестве предиктивного фактора успешности проводимой процедуры [168-170].

Во всех рассмотренных случаях световая доза 50 Дж/см<sup>2</sup> приводила к фотовыгоранию ФС на уровне 41,9%±6,1% и 43,2%±7,2% для длины волны терапевтического воздействия  $\lambda_{th}=405$  нм и  $\lambda_{th}=660$  нм соответственно. Достигнутые величины свидетельствуют об эффективности проведённой процедуры, поскольку традиционно в качестве порогового значения фотовыгорания для оценки эффективности ФДТ выбирается уровень 40% [119]. Таким образом, результаты мониторинга демонстрируют эффективность проведённой процедуры вкупе с минимальным повреждением окружающей нормальной ткани.

На рис. 4.2 представлены значения величины  $R_{\lambda}^c$  до и после проведения процедуры ФДТ на длинах волн  $\lambda_{th}=405$  нм и  $\lambda_{th}=660$  нм.

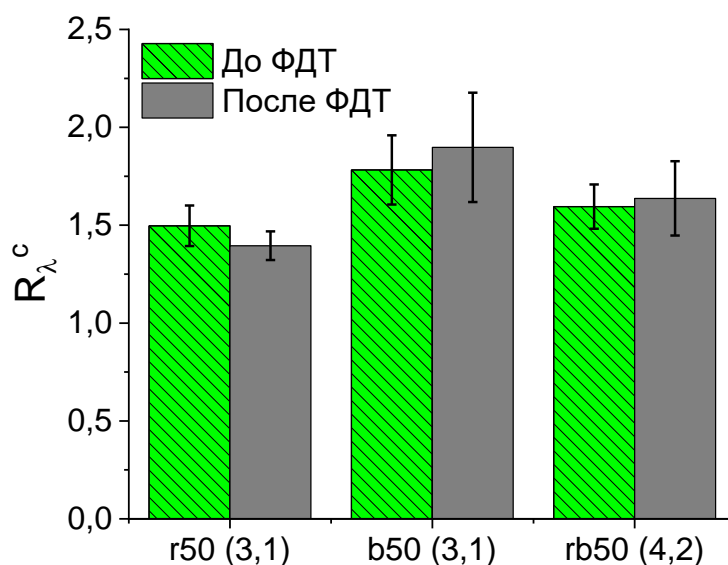


Рисунок 4.2. Нормированное отношение флуоресцентных сигналов  $R_{\lambda}^c$  до и после процедуры ФДТ со световой дозой 50 Дж/см<sup>2</sup> на длинах волн  $\lambda_{th}=405$  нм (b50) и  $\lambda_{th}=660$  нм (r50) и при комбинированном воздействии (rb50). В скобках указано общее число очагов воздействия и независимых организмов внутри группы.

Несмотря на одинаковое качественное поведение флуоресцентных сигналов, соответствующих длинам волн возбуждения 405 нм и 660 нм, динамика величины  $R_{\lambda}^c$  различна при проведении ФДТ на длине волны  $\lambda_{th}=660$  нм и при использовании длины волны  $\lambda_{th}=405$  нм. Величина  $R_{\lambda}^c$  убывает в ходе процедуры на длине волны  $\lambda_{th}=660$  нм, что связано с засветкой достаточно широкого слоя биоткани и равномерным выгоранием ФС в нём; в свою очередь, при проведении процедуры на длине волны  $\lambda_{th}=405$  нм величина  $R_{\lambda}^c$  растёт, что связано с достаточно быстрым фотовыгоранием приповерхностных слоёв в силу меньшей глубины проникновения синего света в биоткань по сравнению с красным.

#### **4.2 Мониторинг фотодинамической терапии in vivo на опухолевой ткани лабораторных животных**

Модельные эксперименты по двухволновой ФВ процедуры ФДТ осуществлялись в рамках сравнительного анализа различных режимов воздействия на опухолевые ткани с различными способами введения ФС хлоринового ряда [30]. Эксперименты осуществлялись на мышах линии Balb/c с привитыми на бедро опухолями линии СТ-26. Доза светового воздействия составляла 200 Дж/см<sup>2</sup> при облучении на длинах волн  $\lambda_{th}=405$  нм и 250 Дж/см<sup>2</sup> при облучении на длине волны  $\lambda_{th}=660$  нм. При комбинированном воздействии на указанных длинах волны суммарная световая доза составляла 250 (100+150) Дж/см<sup>2</sup>; при комбинированном воздействии облучение проводилось последовательно на длинах волн  $\lambda_{th}=405$  нм (100 Дж/см<sup>2</sup>) и  $\lambda_{th}=660$  нм (150 Дж/см<sup>2</sup>). Используемые световые дозы соответствуют значениям, рекомендованным при лечении онкологических заболеваний. При проведении процедуры использовался ФС хлоринового ряда «Фотолон», вводимый в организм внутривенно или наносимый поверхностно. Время накопления ФС составляло 30 минут и 2 часа для поверхностного и внутривенного введения соответственно. Типичный диаметр опухоли при

проведении ФДТ составлял 5 мм. Облучение проводилось при помощи аппарата для ФДТ «Гармония», дополнительно оснащённого световодной насадкой для доставки оптического излучения непосредственно к поверхности опухоли, практически без облучения окружающих здоровых тканей. Плотности мощности для длин волн 405 нм и 660 нм составляли 0,1 Вт/см<sup>2</sup> и 0,2 Вт/см<sup>2</sup> соответственно. Исследования одобрены Этическим Комитетом Приволжского Исследовательского Медицинского Университета (протокол №7 от 03.07.2017). Для регистрации флуоресцентных сигналов использовалось устройство для мониторинга накопления ФС и контроля ФДТ [157], описанное в Главе 2.

На рис. 4.3 представлены динамики флуоресцентных сигналов, соответствующих длинам волн возбуждения 405 нм и 660 нм, в области опухоли в ходе накопления ФС после внутривенного введения. Флуоресцентные сигналы выходят на насыщение после 1 часа накопления. Как показано в работе [171], максимум накопления «Фотолона» в опухолевой ткани мышей происходит через 2-4 часа после введения, что согласуется с полученными результатами и подтверждает, что выбранный интервал между внутривенным введением ФС и проведением процедуры ФДТ является оптимальным.

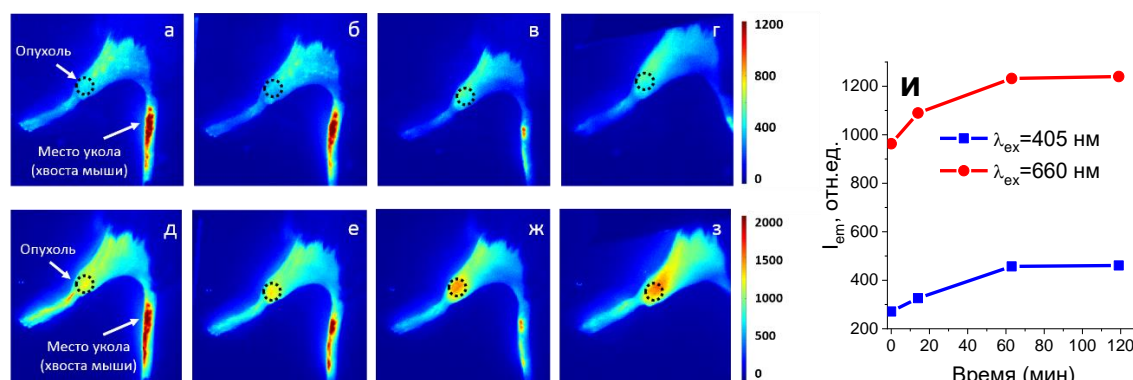


Рисунок 4.3. Флуоресцентные изображения бедра мыши Valb/c с привитой опухолью линии СТ-26 через 3 (а, д), 15 (б, е), 60 (в, ж) и 120 (г, з) минут после внутривенного введения ФС, полученные при возбуждении на

длинах волн 405 нм (а-г) и 660 нм (д-з), а также динамики флуоресцентных сигналов в области опухоли (выделена пунктиром) после внутривенного введения ФС (и).

На рис. 4.4 представлены типичные кривые фотовыгорания ФС при осуществлении процедуры ФДТ в различных режимах после поверхностного и внутривенного введения ФС вместе с их аппроксимацией двухэкспоненциальной функцией световой дозы  $D$  [172, 173], доставляемой к поверхности облучаемой биоткани

$$I_{em}(D) = A_1 e^{-d_1 D} + A_2 e^{-d_2 D} \quad (4.2)$$

где  $A_{1,2}$  и  $d_{1,2}$  — амплитуды и константы фотовыгорания. «Быстрая» константа  $d_1$  характеризует фотовыгорание в начале процедуры, а уменьшение локальной концентрации кислорода в ходе процедуры приводит к изменению константы фотовыгорания на «медленную»  $d_2$ .

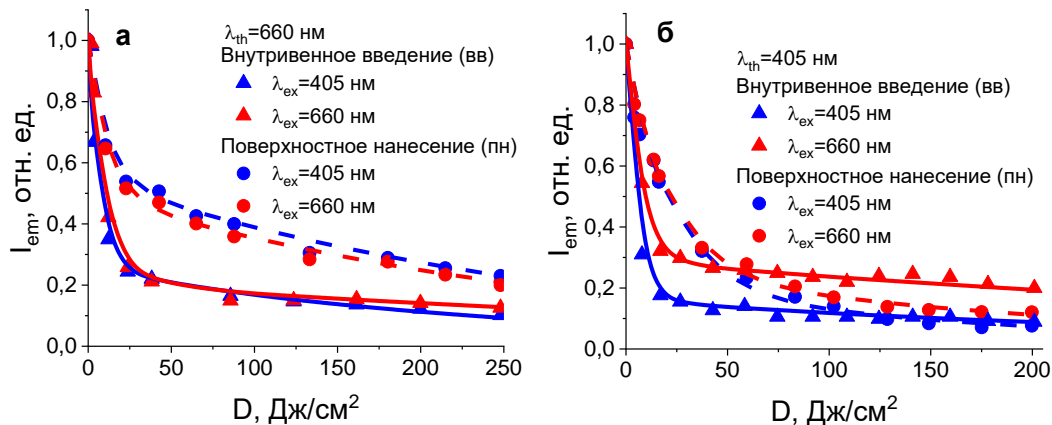


Рисунок 4.4. Типичные кривые фотовыгорания ФС при проведении ФДТ на модельных опухолях на длине волны  $\lambda_{th}=660$  нм и полной световой дозой  $250 \text{ Дж/см}^2$  (а) и на длине волны  $\lambda_{th}=405$  нм и полной световой дозой  $200 \text{ Дж/см}^2$  (б). Точки соответствуют экспериментальным данным, двухэкспоненциальная аппроксимация по формуле (4.2) представлена сплошными и пунктирными линиями для внутривенного и поверхностного введения соответственно.

В случае внутривенного введения накопление ФС связано с микроциркуляцией. ФС накапливается в основном в опухоли и в меньшей степени в коже поверх опухоли; таким образом, приповерхностные слои содержат меньше ФС при внутривенном введении по сравнению со случаем поверхностного нанесения. При ФДТ на длине волны  $\lambda_{th}=405$  нм фотовыгорание происходит в основном в коже и в верхней части опухоли. Облучаемый объем биоткани больше при проведении ФДТ на длине волны  $\lambda_{th}=660$  нм в силу большей глубины проникновения, что и демонстрирует более высокий уровень флуоресцентного сигнала после проведения процедуры. Режим с длиной волны  $\lambda_{th}=660$  нм обеспечивает большую глубину терапевтического воздействия, что демонстрируют практически одинаковые кинетики фотовыгорания при мониторинге на длинах волн 405 нм и 660 нм.

В случае поверхностного нанесения ФС его накопление происходит в основном в приповерхностных слоях, в которые хорошо проникает излучение как на длине волны 660 нм, так и на длине волны 405 нм, таким образом, динамика фотовыгорания практически одинакова при мониторинге на обеих длинах волн. Поскольку поглощение биоткани выше для длины волны 405, при проведении процедуры на этой длине волны ( $\lambda_{th}=405$  нм) происходит более значительное фотовыгорание ФС по сравнению с процедурой на длине волны  $\lambda_{th}=660$  нм. Кинетики фотовыгорания для комбинированного воздействия не представлены, поскольку практически повторяют кинетики для режимов воздействия на длине волны 660 нм, поскольку в комбинированном режиме первым осуществляется воздействие на длине волны 660 нм, что в основном и определяет поведение кинетики фотовыгорания.

Обобщённые данные по константам фотовыгорания  $d_{1,2}$ , вычисленным по флуоресцентным кинетикам, представлены на рис. 4.5.

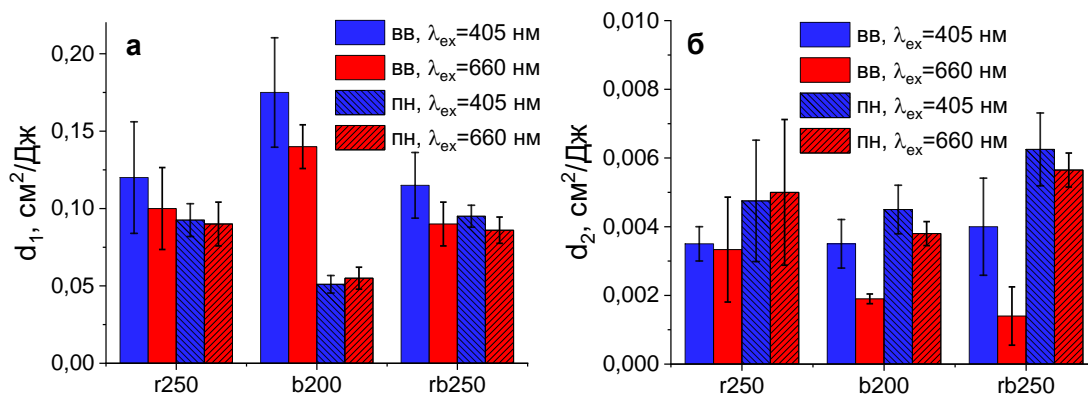


Рисунок 4.5. Константы фотовыгорания  $d_1$  (а) и  $d_2$  (б) при проведении процедуры ФДТ опухолям линии СТ-26 после поверхностного (пн) и внутривенного (вв) введения ФС со световой дозой 200 Дж/см<sup>2</sup> на длине волны  $\lambda_{th}=405$  нм (b200) и световой дозой 250 Дж/см<sup>2</sup> на длине волны  $\lambda_{th}=660$  нм (r250) и при комбинированном воздействии (rb250).

Константа  $d_1$  превосходит константу  $d_2$  на порядок внутри групп, относящихся к одному способу введения ФС (поверхностному или внутривенному), поскольку низкодозная часть каждой кинетики характеризуется более быстрым спадом по сравнению с остальной кривой. Значения «быстрой» константы  $d_1$  близки для воздействия на длине волны  $\lambda_{th}=660$  нм и комбинированного воздействия (около 0,1 см<sup>2</sup>/Дж), в то время как для воздействия на длине волны  $\lambda_{th}=405$  нм  $d_1$  при внутривенном введении значительно больше, а при поверхностном нанесении меньше, чем типичные значения для режимов воздействия с красным светом. Следует отметить, что при детектировании фотовыгорания *in vivo* оценка «истинной» константы фотовыгорания усложняется влиянием поглощения и рассеяния на плотность мощности терапевтического излучения и, как следствие, неравномерного фотовыгорания на различных глубинах [174]. Как видно из рис. 4.5, величины констант  $d_2$  больше для режимов ФДТ с поверхностным нанесением ФС. Это объясняется различием в распределении и концентрации ФС в облучаемой ткани при различных способах введения ФС в организм, а также, вероятно, различием в концентрации кислорода в приповерхностных и

более глубоких слоях биоткани, что может влиять на константы фотовыгорания при фотохимических реакциях [175, 176].

На рис. 4.6а представлены типичные величины эффективности фотовыгорания (4.1) для всех рассмотренных режимов ФДТ. Значения величин  $R_{\lambda}^c$  в области опухоли до и после процедуры ФДТ представлены на рис. 4.6б.

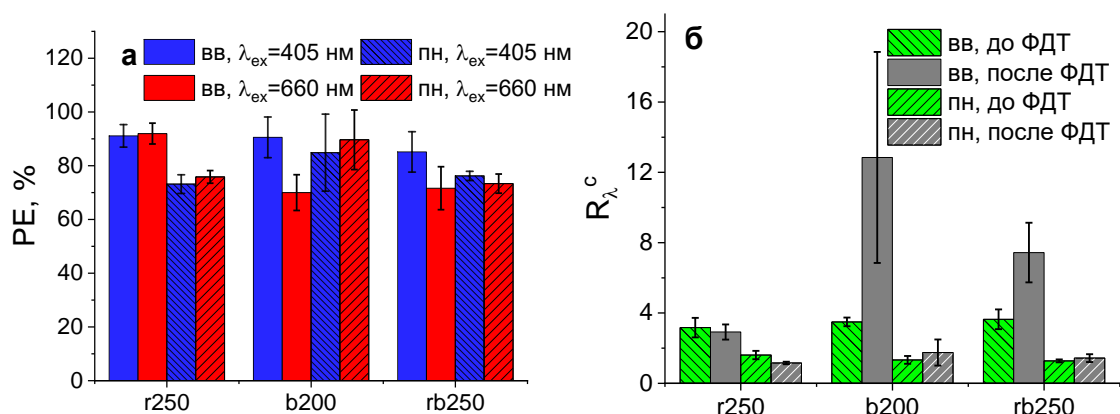


Рисунок 4.6. Эффективность фотовыгорания (а) и нормированное отношение флуоресцентных сигналов  $R_{\lambda}^c$  до и после процедуры ФДТ (б) на опухолях линии СТ-26 при поверхностном (пн) и внутривенном (вв) введении ФС со световой дозой 200 Дж/см<sup>2</sup> на длине волны  $\lambda_{th}=405$  нм (b200) и световой дозой 250 Дж/см<sup>2</sup> на длине волны  $\lambda_{th}=660$  нм (r250) и при комбинированном воздействии (rb250).

Как видно из рис. 4.6а, для всех случаев величина фотовыгорания превышает 70%. Мониторинг процедуры при внутривенном введении и  $\lambda_{th}=660$  нм показывает высокий уровень фотовыгорания на обеих длинах волн зондирования в силу эффективного проникновения красного света терапевтического излучения в опухолевую ткань, где в основном накапливается ФС. В случае поверхностного нанесения ФС и  $\lambda_{th}=660$  нм эффективность фотовыгорания меньше, вероятно, за счет более короткого интервала «быстрой» кинетики по сравнению с внутривенным введением. Режим с  $\lambda_{th}=405$  нм и поверхностным нанесением ФС демонстрирует



высокую эффективность фотовыгорания без существенной разницы между двумя длинами волн возбуждения благодаря эффективному поглощению синего света накопленным в поверхностных слоях ФС. Комбинированный режим воздействия с внутривенным введением демонстрирует меньшую эффективность фотовыгорания по сравнению с  $\lambda_{th}=660$  нм и меньшую разницу между длинами волн возбуждения по сравнению с  $\lambda_{th}=405$  нм. Комбинированный режим с поверхностным нанесением характеризуется значениями фотовыгорания, близкими к режиму с поверхностным нанесением и  $\lambda_{th}=660$  нм. Следует отметить, что высокие значения эффективности фотовыгорания в случае режимов поверхностного нанесения указывают только на эффективное воздействие на поверхностные слои опухоли, тогда как ответ опухоли может быть слабым из-за отсутствия ФС в более глубоких слоях опухоли.

Как было показано ранее, увеличение величины  $R_{\lambda}^c$  означает относительное увеличение количества ФС в более глубоких слоях биоткани. При поверхностном нанесении значения величины  $R_{\lambda}^c$  ( $R_{\lambda}^c \sim 2$ ) меньше чем при внутривенном введении ( $R_{\lambda}^c \sim 4$ ), поскольку во втором случае ФС локализован глубже. Таким образом, наблюдаемые результаты согласуются с результатами Монте-Карло моделирования, представленными в Главе 2 (рис. 2.13, 2.14), а также с результатами модельного эксперимента, представленными в Главе 3 (рис. 3.9).

Анализ величины  $R_{\lambda}^c$  позволяет охарактеризовать процедуру ФДТ: при сохранении значения  $R_{\lambda}^c$  до и после ФДТ можно говорить о достаточно равномерном фотовыгорании ФС внутри объема облучаемой биоткани, в то время как значительные изменения величины  $R_{\lambda}^c$  являются индикатором неравномерного по глубине фотовыгорания. Существенное увеличение величины  $R_{\lambda}^c$  (до 300%,  $R_{\lambda}^c \sim 12$ ) в режиме с  $\lambda_{th}=405$  нм и внутривенным введением (рис. 4.6б) объясняется фотовыгоранием ФС преимущественно в приповерхностных слоях, в то время как при внутривенном введении и

$\lambda_{th}=660$  нм величина  $R_{\lambda}^c$  изменяется мало (в пределах 10%). В режиме комбинированного воздействия с внутривенным введением увеличение  $R_{\lambda}^c$  меньше по сравнению со случаем  $\lambda_{th}=405$  нм, тем не менее, неоднородность фотовыгорания, связанная с частичным проведением процедуры на длине волны  $\lambda_{th}=405$ , присутствует. Режимы ФДТ с поверхностным нанесением не демонстрируют существенных изменений в величине  $R_{\lambda}^c$ , что позволяет говорить о том, что глубина проникновения ФС в биоткань при таком нанесении меньше или сравнима с глубиной проникновения света на длинах волн возбуждения ФС.

#### **4.3 Мониторинг фотодинамической терапии актинического кератоза в клинических условиях**

Двухволновой флуоресцентный мониторинг ФДТ *in vivo* проводился при лечении актинического кератоза трёх пациентов в возрасте от 63 до 78 лет. Новообразования были локализованы на лице и спине в виде ярко выраженных очагов. Перед процедурой на поражённые участки кожи наносился ФС хлоринового ряда «Ревиксан». Накопление ФС осуществлялось в течение 30 минут, после чего остатки ФС удалялись с использованием специального средства (ООО «Ревиксан-Дерма», Россия). ФДТ проводилась на длинах волн  $\lambda_{th}=405$  нм (b50, 3 очага),  $\lambda_{th}=660$  нм (r50, 8 очагов), а также в комбинированном режиме (rb50, 2 очага). Световая доза, доставляемая к каждому очагу заболевания, составляла 50 Дж/см<sup>2</sup>, что соответствует типичным дозам при ФДТ в косметологии. При проведении ФДТ в комбинированном режиме световая доза на обеих длинах волн составляла 25 Дж/см<sup>2</sup>. Облучение проводилось при помощи аппарата для ФДТ «Гармония». Плотности мощности для длин волн 405 нм и 660 нм составляли 0,1 Вт/см<sup>2</sup> и 0,2 Вт/см<sup>2</sup> соответственно. Для регистрации флуоресцентных сигналов использовалось устройство для мониторинга накопления ФС и контроля ФДТ [157], описанное в Главе 3.

На рис. 4.7 представлены зависимости величины  $R_{\lambda}^c$  от световой дозы  $D$  при осуществлении процедуры ФДТ актинического кератоза. Значения величины  $R_{\lambda}^c$  до и после процедуры ФДТ представлены на рис. 4.8. Кривые фотовыгорания ФС не представлены, поскольку качественно повторяют полученные ранее кривые фотовыгорания ФС в экспериментах на лабораторных животных.

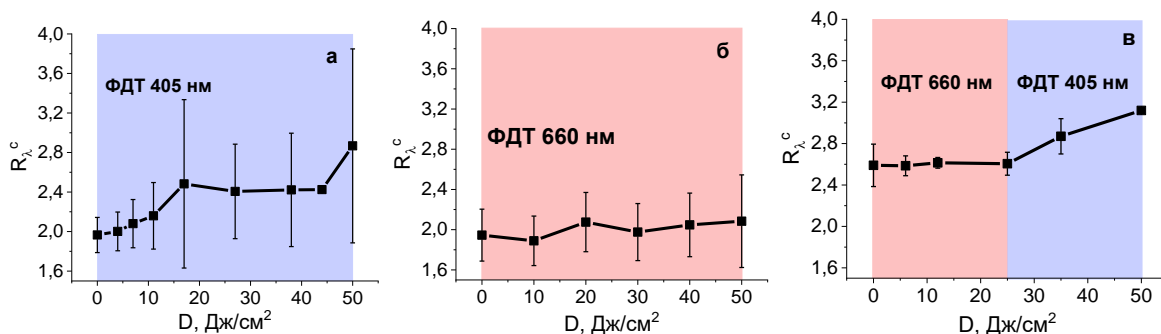


Рисунок 4.7. Динамика параметра  $R_{\lambda}^c$  при проведении ФДТ актинического кератоза на длинах волн  $\lambda_{th}=405$  нм (а),  $\lambda_{th}=660$  нм (б) и в комбинированном режиме (в).

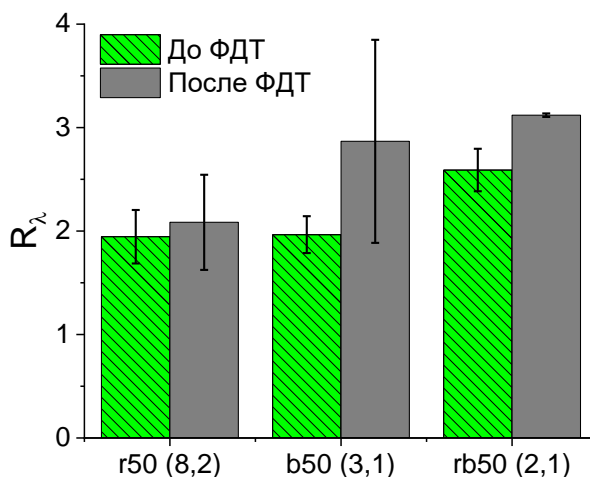


Рисунок 4.8. Нормированное отношение флуоресцентных сигналов  $R_{\lambda}^c$  до и после процедуры ФДТ актинического кератоза со световой дозой 50 Дж/см<sup>2</sup> на длинах волны  $\lambda_{th}=405$  нм (b50) и  $\lambda_{th}=660$  нм (r50) и при комбинированном воздействии (rb50). В скобках указано общее число очагов воздействия и пациентов внутри группы.

Как видно из рис. 4.7 и 4.8, динамика величины  $R_{\lambda}^c$  качественно повторяет результаты *in vivo* флуоресцентного мониторинга ФДТ на интактной и опухолевой ткани лабораторных животных. Проведение процедуры ФДТ с синим светом приводит к значительному увеличению величины  $R_{\lambda}^c$ , свидетельствуя о более неравномерном выгорании ФС.

#### **4.4 Мониторинг фотодинамической терапии базальноклеточного рака кожи в клинических условиях**

Двухволновой флуоресцентный мониторинг ФДТ *in vivo* проводился при лечении базальноклеточного рака кожи (БКРК) различных локализаций (спина, волосистая часть головы, нос и т.д.) у 7 пациентов (29 опухолевых узлов БКРК) в возрасте от 50 до 74 лет. Перед процедурой пациентам внутривенно вводился ФС хлоринового ряда «Фотодитазин» в концентрации 1 мг/кг массы тела. Накопление ФС перед процедурой ФДТ осуществлялось в течение 2,5 часов. ФДТ проводилась на длине волны  $\lambda_{th}=660$  нм. Световая доза, доставляемая к каждому опухолевому узлу, составляла 150 Дж/см<sup>2</sup> (r150), интенсивность терапевтического излучения составляла 0,3 Вт/см<sup>2</sup>. Устройство для мониторинга накопления ФС и контроля ФДТ [157], описанное в Главе 3, использовалось для регистрации флуоресцентных сигналов. По регистрируемым флуоресцентным сигналам, соответствующих длинам волн возбуждения 405 нм и 660 нм, вычислялось их отношение  $R_{\lambda}^c$ . Флуоресцентный мониторинг осуществлялся как в ходе ФДТ, так и в характерные реперные точки (через 1-7 часов после процедуры ФДТ, а также через 1 день после процедуры). На рис. 4.9 представлены типичные ряды флуоресцентных изображений, регистрируемых при мониторинге.

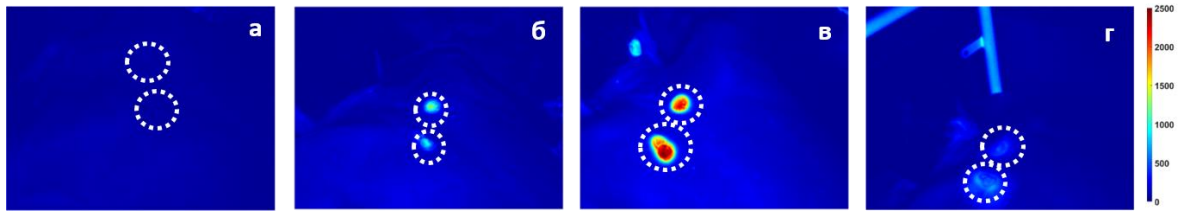


Рисунок 4.9. Типичные флуоресцентные изображения опухолевых узлов БКРК (обозначены прерывистой линией), полученные при возбуждении ФС на длине волны 660 нм непосредственно после ФДТ (а), через 1 час после ФДТ (б), через 3 часа после ФДТ (в) и через 20 часов после ФДТ (г).

Мониторинг накопления ФС осуществлялся только на одном пациенте для одного из очагов БКРК, что связано с длительностью данной процедуры и возникающими вследствие этого ограничениями функционирования кабинета ФДТ в клинике. На рис. 4.10 представлена полная динамика флуоресцентных сигналов для этого очага, полученная в течение суток. На рис. 4.11 представлены усреднённые по всем опухолевым узлам динамики флуоресцентных сигналов во время и после процедуры ФДТ, а также усреднённая динамика величины  $R_{\lambda}^c$ .

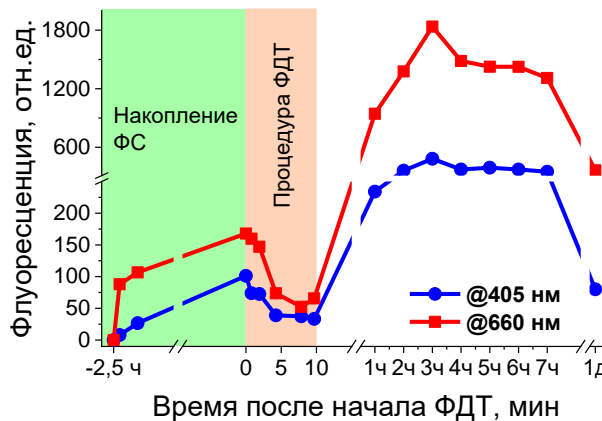


Рисунок 4.10. Полная динамика флуоресцентных сигналов при мониторинге всех этапов процедуры ФДТ на одном из опухолевых узлов.

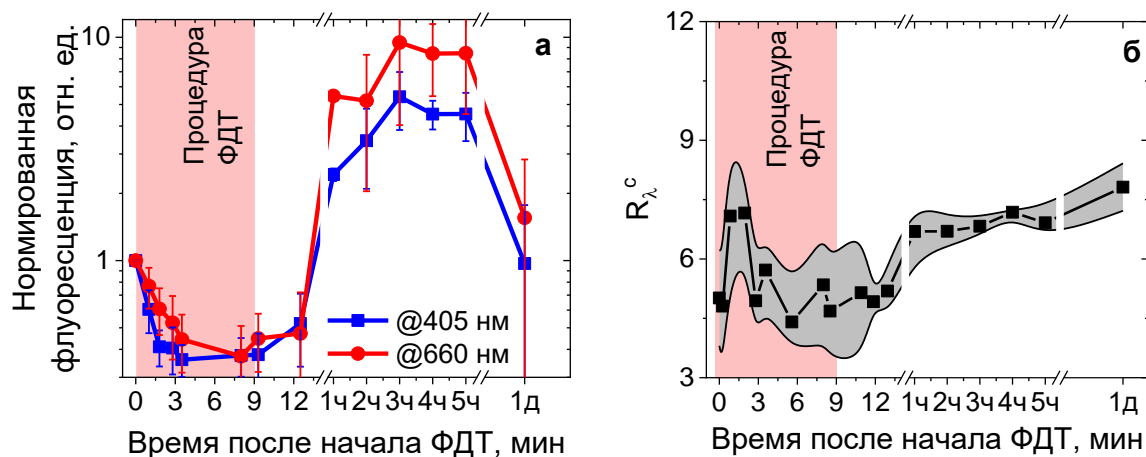


Рисунок 4.11. Динамики флуоресцентных сигналов при возбуждении на длинах волн 405 нм и 660 нм, нормированных на соответствующие величины после накопления ФС (перед началом процедуры ФДТ) (а) и динамика нормированного отношения флуоресцентных сигналов  $R_{\lambda}^c$  (б). Результаты усреднены по всем случаям двухволнового флуоресцентного мониторинга ФДТ при лечении БКРК (7 пациентов, 29 опухолевых узлов).

Как видно из рис. 4.10, двухволновой ФИ демонстрирует накопление ФС в очаге БКРК после введения в организм перед процедурой. В ходе процедуры ФДТ наблюдается фотовыгорание ФС (рис. 4.10, рис. 4.11а). Величина  $R_{\lambda}^c$  при этом изменяется несильно, что свидетельствует о равномерном выгорании ФС (рис. 4.11б). После ФДТ наблюдается постепенное восстановление уровня флуоресцентного сигнала, связанное с притоком ФС в опухолевые ткани через кровеносные сосуды, питающие опухоль. В дальнейшем происходит значительное увеличение интенсивности флуоресценции (рис. 4.19а-в,д-ж, рис. 4.11а) до уровня, значительно превышающего исходный (непосредственно перед процедурой ФДТ), что объясняется повышением микроциркуляторной активности в опухолевом узле непосредственно после лазерного воздействия. В наблюдаемых случаях максимальный уровень флуоресцентного сигнала зарегистрирован через 3-4 часа после процедуры. Спустя примерно сутки после ФДТ уровень флуоресцентного сигнала значительно снижается (рис. 4.10, рис. 4.11а),

причём флуоресценция периферии опухоли и окружающих здоровых тканей остаётся достаточно высокой (рис. 4.9г,з), что не позволяет говорить о полной биодеградации ФС; при этом она существенно выше, чем флуоресценция опухоли, что свидетельствует о прекращении кровоснабжения опухолевых тканей. Прекращение кровотока, питающего опухоль, в течение суток после ФДТ приводит к перераспределению ФС в более глубокие слои биоткани (вкуче с биодеградацией), что приводит к росту отношения флуоресцентных сигналов (рис. 4.11б).

Значения величины нормированного отношения флуоресцентных сигналов  $R_{\lambda}^c$ , зарегистрированные до и после процедуры ФДТ, представлены на рис. 4.12.

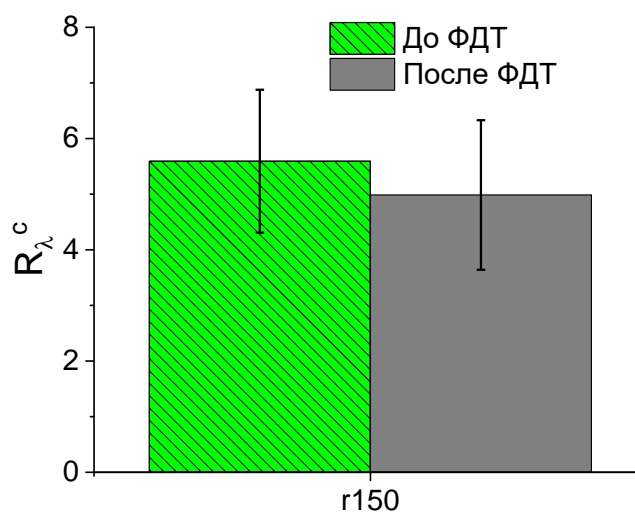


Рисунок 4.12. Нормированное отношение флуоресцентных сигналов  $R_{\lambda}^c$  до и после (непосредственно после лазерного воздействия) процедуры ФДТ БКРК со световой дозой 150 Дж/см<sup>2</sup> на длине волны  $\lambda_{th}=660$  нм (r150).

Изменения величины  $R_{\lambda}^c$  в результате процедуры ФДТ качественно согласуются с результатами *in vivo* флуоресцентного мониторинга ФДТ на интактной и опухолевой ткани лабораторных животных на длине волны 660 нм. Незначительные изменения величины  $R_{\lambda}^c$  говорят о том, что глубина

терапевтического воздействия сравнима или превышает глубину локализации ФС после внутривенного введения в организм.

Следует отметить, что по результатам долгосрочных наблюдений за пациентами после проведения ФДТ (7 пациентов, 29 опухолевых узлов БКРК), в течение года после ФДТ не было выявлено рецидивов; среди тех пациентов после ФДТ, у кого со времени проведения ФДТ прошло более 1,5 лет, был выявлен один случай рецидива. Единичный случай отдаленного рецидива не дает оснований говорить о неэффективности ФДТ при лечении БКРК, и наблюдаемое снижение уровня флуоресценции, говорящее о локальном воздействии на микроциркуляторное русло, может служить индикатором отклика на проводимую процедуру.

#### **4.5 Обобщение результатов двухволнового флуоресцентного мониторинга фотодинамической терапии**

Результаты двухволнового флуоресцентного мониторинга фотодинамической терапии с использованием ФС хлоринового ряда на лабораторных животных и в клинической практике, описанные в подразделах 4.1-4.4, обобщены на рис. 4.13. Для сравнения приведены также результаты при нанесении ФС поверхностно на участки кожи предплечья здоровых волонтеров. При отображении диапазона наблюдаемых величин  $R_{\lambda}^c$  учтены все значения, зарегистрированные в той или иной серии экспериментов.



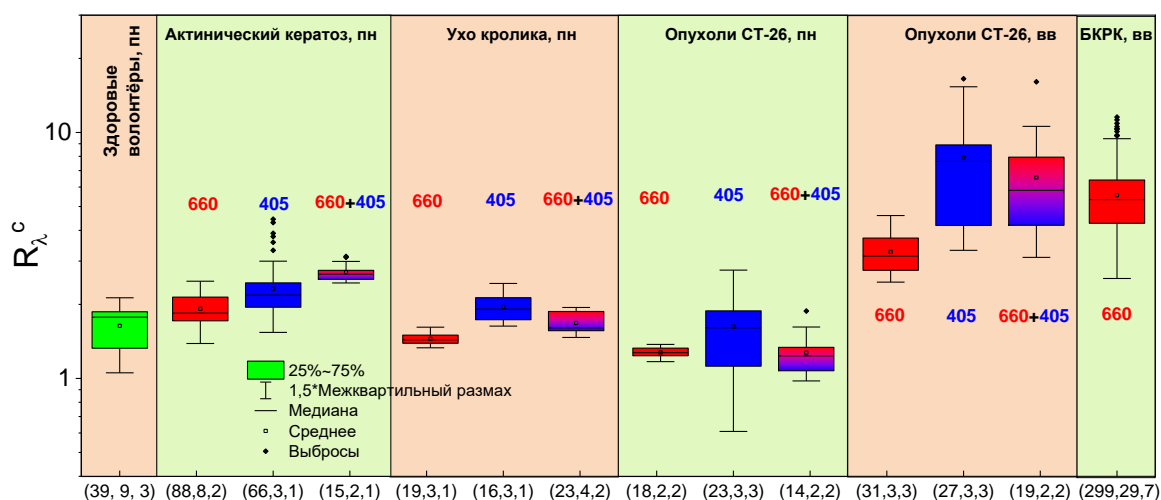


Рисунок 4.13. Нормированное отношение флуоресцентных сигналов  $R_{\lambda}^c$ , измеренное на лабораторных животных, здоровых волонтерах и пациентах до и в ходе процедуры ФДТ (пн — поверхностное нанесение, вв — внутривенное введение; 405/660 – терапевтическая длина волны). В скобках указано общее число измерений, очагов воздействия и независимых организмов внутри группы.

Для групп с поверхностным нанесением ФС (здоровые волонтеры, внутренняя поверхность ушей кроликов, бедра мышей, очаги актинического кератоза) значения величин  $R_{\lambda}^c$  находятся в интервале 0,5-4, что согласуется с результатами аналитических и численных исследований для поверхностного нанесения ФС. Следует отметить, что в ходе проведения процедуры ФДТ возможно перераспределение ФС, особенно в случае неравномерного фотовыгорания ФС (преимущественно в приповерхностных слоях), что потенциально может приводить к распределению ФС, близкому для внутривенного введения, когда приповерхностные слои не содержат ФС. Для групп с внутривенным введением ФС (бедра мышей и базальноклеточный рак кожи) типичные значения параметра  $R_{\lambda}^c$  лежат в диапазоне 3-20, что также согласуется с результатами численного моделирования для внутривенного введения ФС.

Экспериментальные значения параметра  $R_{\lambda}^c$ , полученные после поверхностного нанесения и накопления ФС (перед проведением ФДТ), представлены на рис. 4.14 для всех групп (здоровые волонтеры, внутренняя поверхность ушей кроликов, бедра мышей, очаги актинического кератоза).

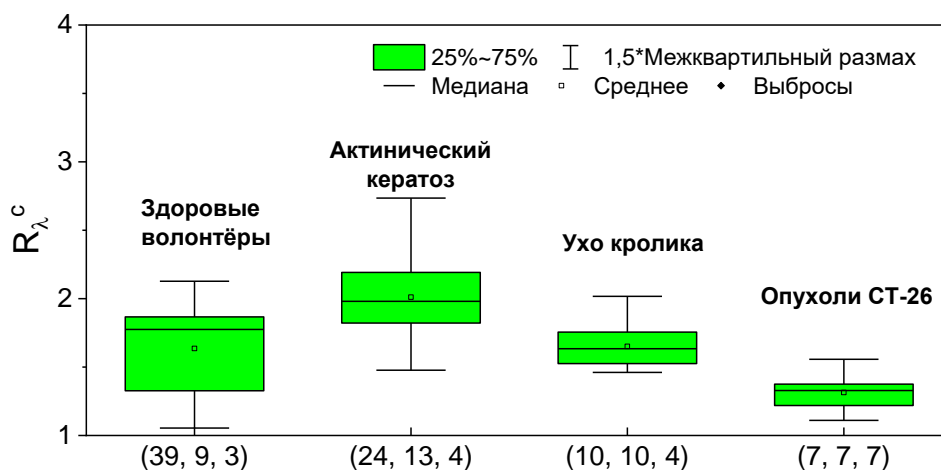


Рисунок 4.14. Нормированное отношение флуоресцентных сигналов  $R_{\lambda}^c$ , измеренное на лабораторных животных, здоровых волонтерах и пациентах после поверхностного нанесения и накопления ФС (перед процедурой ФДТ). В скобках указано общее число измерений, очагов воздействия и независимых организмов внутри группы.

Для оценки глубины проникновения ФС в биоткань при поверхностном нанесении для всех наборов экспериментальных значений  $R_{\lambda}^c$  численно в среде Matlab решалось уравнение (3.5). Результаты оценки представлены на рис. 4.15.

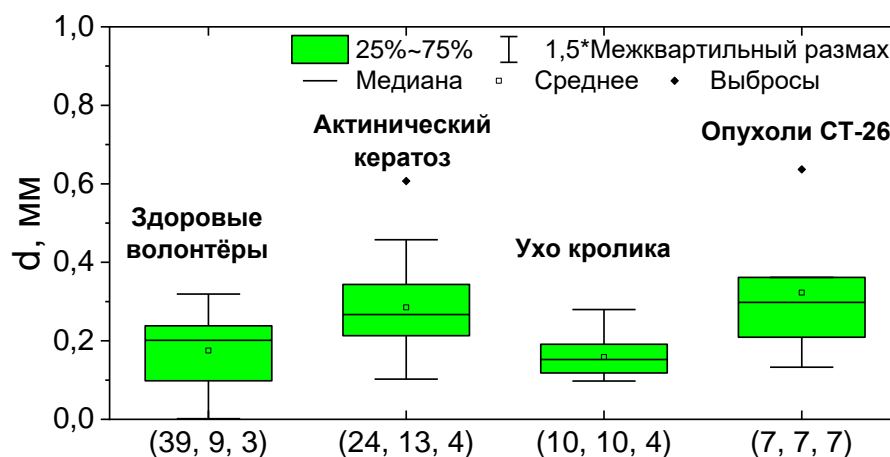


Рисунок 4.15. Оценка глубины проникновения ФС в биоткань по величинам  $R_{\lambda}^c$ , измеренным на лабораторных животных, здоровых волонтерах и пациентах после поверхностного нанесения и накопления ФС (перед процедурой ФДТ). В скобках указано общее число измерений, очагов воздействия и независимых организмов внутри группы.

При оценке глубины проникновения ФС при нанесении на внутреннюю поверхность предплечья здоровых волонтеров с использованием оптических свойств кожи [99] получено среднее значение 0,18 мм при максимальной глубине 0,32 мм, что согласуется с типичными значениями толщины ткани эпидермиса здорового человека 0,05 — 0,64 мм в зависимости от локализации [177].

Для пациентов с актиническим кератозом, характеризующимся морфологическими изменениями в эпидермисе [178, 179], глубина проникновения ФС в биоткань больше, чем для здоровых волонтеров: среднее значение 0,28 мм при максимальной глубине 0,61 мм, что согласуется с результатами морфологических исследований. Фолликулярное расширение, характерное для актинического кератоза [180], стимулирует более глубокое проникновение ФС в биоткань.

В силу отсутствия в литературе оптических свойств внутренней поверхности уха кролика при оценке глубины проникновения ФС для данной группы были использованы оптические свойства дермы человека [99].

Полученные результаты находятся в диапазоне 0,13 — 0,36 мм, что говорит о частичном проникновении ФС в кожу уха кролика, типичная толщина которого находится в диапазоне 0,5 — 1,5 мм [31].

Для мышей с привитыми опухолями клеточной линии СТ-26 оценка глубины проникновения ФС с использованием оптических свойств мышинных биотканей [181] дает среднее значение 0,32 мм, что согласуется с результатами исследования [30], показавшего частичный ответ опухолевой ткани на процедуру ФДТ при поверхностном нанесении ФС, что говорит о проникновении ФС в опухолевые ткани через кожу.

#### 4.6 Выводы

Предложенный в Главе 2 метод двухволновой ФВ был апробирован в *in vivo* исследованиях на лабораторных животных и в клинических условиях.

Эксперименты на лабораторных животных включали в себя двухволновой флуоресцентный мониторинг ФДТ интактной ткани (внутренней поверхности уха кролика) и опухолевой ткани (опухоли линии СТ-26, привитые на бедро мыши) с использованием ФС хлоринового ряда, вводимого в организм поверхностно или внутривенно. Эксперименты *in vivo* в клинических условиях включали в себя двухволновой флуоресцентный мониторинг ФДТ при лечении актинического кератоза на длинах волн 405 нм, 660 нм и в комбинированном режиме после поверхностного нанесения ФС и двухволновой флуоресцентный мониторинг ФДТ при лечении базальноклеточного рака на длине волны 660 нм после внутривенного введения ФС.

Результаты двухволнового флуоресцентного мониторинга демонстрируют фотовыгорание ФС в ходе процедуры для каждой из длин волн возбуждения флуоресценции 405 нм и 660 нм. При этом проведенные эксперименты показывают, что несмотря на качественно одинаковое поведение флуоресцентных сигналов при проведении ФДТ на длинах волн 405

нм и 660 нм и при различных дозах терапевтического излучения, величина  $R_\lambda$  (или нормированное отношение флуоресцентных сигналов  $R_\lambda^c$ ) по-разному изменяется в ходе процедуры для различных длин волн терапевтического воздействия. Для терапевтической длины волны 660 нм изменение отношения флуоресцентных сигналов до и после процедуры не превосходит 10%, что свидетельствует о фотовыгорании ФС во всём зондируемом объеме, в то время как для терапевтической длины волны 405 нм отношение увеличивается на 10-40% при поверхностном нанесении ФС и на 200-300% при внутривенном введении ФС в силу его фотовыгорания преимущественно в приповерхностных слоях биоткани. При внутривенном введении ФС в организм изменения величины  $R_\lambda$  в результате ФДТ более существенны, нежели при поверхностном нанесении ФС, что объясняется большей чувствительностью отношения  $R_\lambda$  к изменению глубины локализации ФС. Данный результат согласуется с результатами численного моделирования, представленными в Главе 2.

В экспериментах по двухволновому флуоресцентному мониторингу ФДТ с поверхностным нанесением ФС значения величин нормированного отношения флуоресцентных сигналов  $R_\lambda^c$  находятся в интервале 0,5-4, в то время как при внутривенном введении ФС типичные измеряемые значения параметра  $R_\lambda^c$  лежат в диапазоне 3-20, что согласуется с результатами аналитических и численных исследований для поверхностного и внутривенного введения ФС в организм, представленными в Главе 2.

Наборы экспериментальных значений  $R_\lambda^c$ , зарегистрированные после накопления ФС при поверхностном нанесении на кожу лабораторных животных, здоровых волонтеров и пациентов с актиническим кератозом, были использованы для численной оценки глубины проникновения ФС в биоткань в рамках радиометрического подхода, предложенного в Главе 2. Для полученных экспериментальных значений  $R_\lambda^c$  средняя глубина проникновения ФС при нанесении на кожу здоровых волонтеров составила 0,18 мм; на очаги актинического кератоза — 0,28 мм; на ухо кролика — 0,16

мм; на бедро мыши с привитой опухолью клеточной линии СТ-26 — 0,32 мм.  
Полученные значения согласуются с результатами морфологических исследований и с литературными данными.

## Заключение. Основные результаты

В ходе проведённых теоретических и численных исследований, а также модельных и *in vivo* экспериментах на лабораторных животных и в клинических условиях всесторонне исследован процесс формирования флуоресцентных сигналов в системах двухволновой ФВ и получены следующие оригинальные результаты:

1. В рамках полуэмпирической модели с использованием диффузионного приближения уравнения переноса излучения впервые получено аналитическое выражение для флуоресцентного отклика от равномерно распределённого в приповерхностном слое биоткани флуорофора, а также для отношения флуоресцентных сигналов, соответствующих различным (405 нм и 660 нм) длинам волн возбуждения флуоресценции в спектре поглощения ФС хлоринового ряда, равномерно распределённого в приповерхностном слое кожи толщиной более 0,1 мм. Результаты применения полученных аналитических выражений хорошо согласуются с результатами численного моделирования методом Монте-Карло.

2. Предложен новый метод оценки глубины локализации флуорофора внутри биоткани, исключающий необходимость калибровочных измерений и использующий отношение флуоресцентных сигналов для различных длин волн возбуждения флуоресценции. Показано, что применение разработанной аналитической модели позволяет оценить толщину содержащего ФС хлоринового ряда приповерхностного слоя кожи в диапазоне от 0,1 до 2 мм с точностью 0,1 мм, а погрешность априорной оценки оптических свойств биоткани до 30% влечёт дополнительную погрешность определения толщины слоя предложенным методом в пределах 30%.

3. Предложен новый подход к изготовлению многослойных флуоресцирующих агаровых фантомов, имитирующих оптические свойства биоткани в диапазоне длин волн 400-1000 нм до и после поверхностного

нанесения и внутривенного введения ФС хлоринового ряда, для задач планирования и мониторинга ФДТ. Изготовленные агаровые фантомы характеризуются коэффициентом поглощения  $0,02-0,5 \text{ мм}^{-1}$  и транспортным коэффициентом рассеяния  $1-7 \text{ мм}^{-1}$  в диапазоне длин волн  $400-1000 \text{ нм}$  и имитируют оптические свойства кожи *in vivo* до и после введения ФС хлоринового ряда с погрешностью коэффициента поглощения менее 5% в диапазонах  $520-560 \text{ нм}$  и  $760-800 \text{ нм}$  и с погрешностью транспортного коэффициента рассеяния менее 10% в диапазоне  $450-700 \text{ нм}$ . Изготовленные фантомы позволили в хорошо контролируемых условиях апробировать предложенный метод оценки глубины локализации флуорофора и подтвердить, что погрешность оценки толщины приповерхностного флуоресцирующего слоя составляет 10-30% для значений толщины от  $0,5 \text{ мм}$  до  $2 \text{ мм}$ .

4. В рамках серии *in vivo* экспериментов по мониторингу различных режимов ФДТ тканей лабораторных животных, а также актинического кератоза и базальноклеточного рака кожи человека в клинических условиях с использованием ФС хлоринового ряда впервые продемонстрированы различия в динамике отношения флуоресцентных сигналов, соответствующих длинам волн возбуждения  $660 \text{ нм}$  и  $405 \text{ нм}$  при ФДТ. Для терапевтической длины волны  $660 \text{ нм}$  изменение отношения флуоресцентных сигналов до и после процедуры не превосходит 10%, что свидетельствует о фотовыгорании ФС во всём зондируемом объеме, в то время как для терапевтической длины волны  $405 \text{ нм}$  отношение увеличивается на 10-40% при поверхностном нанесении ФС и на 200-300% при внутривенном введении ФС в силу его фотовыгорания преимущественно в приповерхностных слоях биоткани.

5. Предложенный метод оценки локализации флуорофора на основе данных двухволновой ФВ впервые позволил получить оценки средней глубины проникновения ФС хлоринового ряда: в коже здорового человека она составила  $0,18 \text{ мм}$ , в очагах актинического кератоза –  $0,28 \text{ мм}$ , в здоровой ткани



уха кролика – 0,16 мм, в опухоли СТ-26 на бедре мыши – 0,32 мм. Эти оценки согласуются с результатами морфологических исследований и с литературными данными о толщине эпидермиса соответствующих локализаций.

## Список публикаций автора по теме диссертации

### Статьи в реферируемых журналах

1. Хилов А., Логинова Д., Сергеева Е., Шахова М., Меллер А., Турчин И., Кириллин М. Мониторинг и планирование фотодинамической терапии с использованием двухволнового флуоресцентного имиджинга // Современные технологии в медицине. – 2017. – Т. 9, № 4.

2. Shakhova M., Loginova D., Meller A., Sapunov D., Orlinskaya N., Shakhov A., Khilov A., Kirillin M. Photodynamic therapy with chlorin-based photosensitizer at 405 nm: numerical, morphological, and clinical study // Journal of Biomedical Optics. – 2018. – Т. 23, № 9. – С. 091412.

3. Khilov A., Kirillin M. Y., Loginova D., Turchin I. Estimation of chlorin-based photosensitizer penetration depth prior to photodynamic therapy procedure with dual-wavelength fluorescence imaging // Laser Physics Letters. – 2018. – Т. 15, № 12. – С. 126202.

4. Хилов А.В., Куракина Д.А., Турчин И.В., Кириллин М.Ю. Мониторинг локализации фотосенсибилизаторов хлоринового ряда с помощью двухволнового флуоресцентного имиджинга: численное моделирование // Квантовая Электроника. – 2019. – Т. 49, № 1. – С. 63.

5. Kurakina D., Khilov A., Shakhova M., Orlinskaya N., Sergeeva E., Meller A., Turchin I., Kirillin M. Comparative analysis of single- and dual-wavelength photodynamic therapy regimes with chlorin-based photosensitizers: animal study // Journal of biomedical optics. – 2019. – Т. 25, № 6. – С. 063804.

6. Миронычева А., Кириллин М., Хилов А., Малыгина А., Куракина Д., Гутаковская В., Турчин И., Орлинская Н., Шливно И., Клеменова И. Комбинированное применение двухволнового флуоресцентного мониторинга и бесконтактной термометрии при фотодинамической терапии базально-

клеточного рака кожи // Современные технологии в медицине. – 2020. – Т. 12, № 3.

7. *Kirillin M., Kurakina D., Khilov A., Orlova A., Shakhova M., Orlinskaya N., Sergeeva E.* Red and blue light in antitumor photodynamic therapy with chlorin-based photosensitizers: a comparative animal study assisted by optical imaging modalities // *Biomedical Optics Express*. – 2021. – Т. 12, № 2. – С. 872-892.

8. *Хилов А.В., Сергеева Е.А., Куракина Д.А., Турчин И.В., Кириллин М.Ю.* Аналитическая модель формирования флуоресцентного отклика для оценки локализации флуорофора в биоткани с помощью двухволнового флуоресцентного имиджинга // *Квантовая Электроника*. – 2021. – Т. 51, № 2. – С. 95.

9. *Kirillin M., Khilov A., Kurakina D., Orlova A., Perekatova V., Shishkova V., Malygina A., Mironycheva A., Shlivko I., Gamayunov S., Turchin I., Sergeeva E.* Dual-Wavelength Fluorescence Monitoring of Photodynamic Therapy: From Analytical Models to Clinical Studies // *Cancers*. – 2021. – Т. 13, № 22. – С. 5807.

10. *Хилов А.В., Шишкова В.А., Сергеева Е.А., Куракина Д.А., Кириллин М.Ю.* Агаровые фантомы биоткани для задач флуоресцентного мониторинга фотодинамической терапии // *Квантовая Электроника*. – 2022. – Т. 52, № 1. – С. 63.

### **Публикации в сборниках трудов конференций**

1. *Kirillin M., Shakhova M., Meller A., Sapunov D., Agrba P., Khilov A., Pasukhin M., Kondratieva O., Chikalova K., Motovilova T., Sergeeva E., Turchin I., Shakhova N.* Quantitative Optical Diagnostics in Pathology Recognition and

Monitoring of Tissue Reaction to PDT // Proceedings SPIE. – 2017. – T. 10417. – C. 104170C.

2. *Khilov A., Kirillin M., Loginova D., Turchin I.* Estimation of chlorine-based photosensitizer penetration depth prior to PDT procedure from two-wavelength excitation fluorescence measurements // OSA Technical Digest. – 2018. – JW3A.9.

3. *Khilov A. V., Kurakina D. A., Turchin I. V., Kirillin M. Y.* Dual-wavelength fluorescence localization of chlorin-based photosensitizer // Proceedings SPIE. – 2019. – T. EB101. – 11079\_54.

4. *Kirillin M., Shakhova M., Kurakina D., Khilov A., Orlova A., Sergeeva E., Meller A., Orlinskaya N., Turchin I.* Red and blue light photodynamic therapy regimes: optical monitoring and histology studies // Proceedings SPIE. – 2019. – T. EB101. – 11079\_26.

5. *Kurakina D., Khilov A., Shakhova M., Orlinskaya N., Kirillin M.* Comparative analysis of single- and dual-wavelength low dose photodynamic therapy regimens // Proceedings SPIE. – 2019. – T. EB101. – 11079\_57.

6. *Khilov A. V., Kurakina D. A., Sergeeva E. A., Shakhova M. A., Malygina A. S., Mironycheva A. M., Pavlova K. G., Getmanskaya A. A., Turchin I. V., Shlivko I. L., Gamayunov S. V., Kirillin, M. Y.* Dual-Wavelength Fluorescence Imaging of Chlorin-Based Photosensitizers // OSA Technical Digest. – 2021. – EW1A.5.

7. *Kirillin M., Kurakina D., Khilov A., Orlova A., Shakhova M., Pavlova K., Perekatova V., Orlinskaya N., Sergeeva E.* Red and Blue Light in Photodynamic Therapy with Chlorin-Based Photosensitizers // OSA Technical Digest. – 2021. – EW1A.2.

## Публикации в сборниках тезисов конференций

1. *Khilov A., Kirillin M., Loginova D., Gamayunov S., Turchin I.* Two-color fluorescence monitoring in PDT treatment // 18th International Conference on Laser Optics, 4-8 June, 2018, St.-Petersburg, Russia.
2. *Kirillin M., Shakhova M., Khilov A., Kurakina D., Sergeeva E., Meller A., Sapunov D., Perekatova V., Turchin I., Orlinskaya N., Shakhov A.* Optical techniques for advancement of photodynamic therapy: from model experiments to clinical studies // 18th International Conference on Laser Optics, 4-8 June, 2018, St.-Petersburg, Russia.
3. *Khilov A., Kirillin M., Loginova D., Turchin I.* Estimation of photosensitizer penetration depth with dual-wavelength fluorescence imaging prior to PDT procedure with chlorin-based photosensitizers // B-O-10, Book of abstracts of The 26th International Conference on Advanced Laser Technologies, ALT'18, 9-14 September, 2018, Tarragona, Spain.
4. *Kirillin M., Kurakina D., Khilov A., Orlova A., Sergeeva E., Shakhova M., Mironycheva A., Malygina A., Shlivko I., Orlinskaya N.* Optical imaging for development and advancement of photodynamic therapy protocols // International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT) 19, 157 (2019).
5. *Sergeeva E., Kurakina D., Khilov A., Kirillin M.* Modeling of a photosensitizer fluorescence response during accumulation and photobleaching in biotissue // International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT) 19, 180 (2019).
6. *Kirillin M., Khilov A., Kurakina D., Shakhova M., Sergeeva E., Orlova A., Meller A., Mironycheva A., Malygina A., Shlivko I., Orlinskaya N., Turchin I., Gamayunov S.* Development of photodynamic therapy protocols with assistance of optical monitoring techniques // 2020 International Conference Laser Optics (ICLO), 2020, pp. 1-1

7. *Khilov A., Kurakina D., Sergeeva E., Shakhova M., Orlova A., Mironycheva A., Malygina A., Turchin I., Shlivko I., Kirillin M.* Dual-wavelength fluorescence imaging for photodynamic therapy planning and monitoring // 2020 International Conference Laser Optics (ICLO), 2020, pp. 1-1.

8. *Kirillin M., Kurakina D., Khilov A., Orlova A., Shakhova M., Perekatova V., Shishkova V., Mironycheva A., Malygina A., Shlivko I., Gamayunov S., Turchin I., Orlinskaya N., Sergeeva E.* PDT-Duo: Dual-wavelength approaches in performance and monitoring of photodynamic therapy // International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT) 21, 101 (2021).

9. *Kirillin M., Kurakina D., Khilov A., Perekatova V., Getmanskaya A., Shishkova V., Shakhova M., Orlova A., Malygina A., Mironycheva A., Shlivko I., Gamayunov S., Orlinskaya N., Turchin I., Sergeeva E.* Spectral approaches for depth analysis in diffuse optical diagnostics modalities // 2022 International Conference Laser Optics (ICLO).

## Список литературы

1. *Tang M.-X., Mulvana H., Gauthier T., Lim A., Cosgrove D., Eckersley R., Stride E.* Quantitative contrast-enhanced ultrasound imaging: a review of sources of variability // *Interface focus*. – 2011. – Т. 1, № 4. – С. 520-539.
2. *Holly T. A., Abbott B. G., Al-Mallah M., Calnon D. A., Cohen M. C., DiFilippo F. P., Ficaro E. P., Freeman M. R., Hendel R. C., Jain D.* Single photon-emission computed tomography // *Journal of nuclear cardiology*. – 2010. – Т. 17, № 5. – С. 941-973.
3. *Paulus M. J., Gleason S. S., Kennel S. J., Hunsicker P. R., Johnson D. K.* High resolution X-ray computed tomography: an emerging tool for small animal cancer research // *Neoplasia*. – 2000. – Т. 2, № 1-2. – С. 62.
4. *Giedd J. N.* Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain // *Annals of the new york academy of sciences*. – 2004. – Т. 1021, № 1. – С. 77-85.
5. *Gerhard A., Pavese N., Hotton G., Turkheimer F., Es M., Hammers A., Eggert K., Oertel W., Banati R. B., Brooks D. J.* In vivo imaging of microglial activation with [<sup>11</sup>C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease // *Neurobiology of disease*. – 2006. – Т. 21, № 2. – С. 404-412.
6. *Luker G. D., Luker K. E.* Optical imaging: current applications and future directions // *Journal of Nuclear Medicine*. – 2008. – Т. 49, № 1. – С. 1-4.
7. *Zhu H., Isikman S. O., Mudanyali O., Greenbaum A., Ozcan A.* Optical imaging techniques for point-of-care diagnostics // *Lab on a Chip*. – 2013. – Т. 13, № 1. – С. 51-67.
8. *Турчин И. В.* Методы оптической биомедицинской визуализации: от субклеточных структур до тканей и органов // *Успехи физических наук*. – 2016. – Т. 186, № 5. – С. 550-567.
9. *Rebolleda G., Diez-Alvarez L., Casado A., Sánchez-Sánchez C., De Dompablo E., González-López J. J., Muñoz-Negrete F. J.* OCT: new perspectives in neuro-ophthalmology // *Saudi Journal of Ophthalmology*. – 2015. – Т. 29, № 1. – С. 9-25.

10. Wang J., Xu Y., Boppart S. A. Review of optical coherence tomography in oncology // Journal of biomedical optics. – 2017. – T. 22, № 12. – C. 121711.
11. Gambichler T., Regeniter P., Bechara F. G., Orlikov A., Vasa R., Moussa G., Stücker M., Altmeyer P., Hoffmann K. Characterization of benign and malignant melanocytic skin lesions using optical coherence tomography in vivo // Journal of the American Academy of Dermatology. – 2007. – T. 57, № 4. – C. 629-637.
12. Chung S., Cerussi A., Klifa C., Baek H., Birgul O., Gulsen G., Merritt S., Hsiang D., Tromberg B. In vivo water state measurements in breast cancer using broadband diffuse optical spectroscopy // Physics in Medicine & Biology. – 2008. – T. 53, № 23. – C. 6713.
13. Orlova A., Perevalova Y., Pavlova K., Orlinskaya N., Khilov A., Kurakina D., Shakhova M., Kleshnin M., Sergeeva E., Turchin I. Diffuse Optical Spectroscopy Monitoring of Experimental Tumor Oxygenation after Red and Blue Light Photodynamic Therapy // Photonics. – T. 9 –MDPI, 2021. – C. 19.
14. Perekatova V., Subochev P., Kirillin M. Y., Sergeeva E., Kurakina D., Orlova A., Postnikova A., Turchin I. Quantitative techniques for extraction of blood oxygenation from multispectral optoacoustic measurements // Laser Physics Letters. – 2019. – T. 16, № 11. – C. 116201.
15. Frangioni J. V. In vivo near-infrared fluorescence imaging // Current opinion in chemical biology. – 2003. – T. 7, № 5. – C. 626-634.
16. Rao J., Dragulescu-Andrasi A., Yao H. Fluorescence imaging in vivo: recent advances // Current opinion in biotechnology. – 2007. – T. 18, № 1. – C. 17-25.
17. Gustafsson M. G. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2005. – T. 102, № 37. – C. 13081-13086.
18. Leblond F., Davis S. C., Valdés P. A., Pogue B. W. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications // Journal of photochemistry and photobiology B: Biology. – 2010. – T. 98, № 1. – C. 77-94.



19. *Celli J. P., Spring B. Q., Rizvi I., Evans C. L., Samkoe K. S., Verma S., Pogue B. W., Hasan T.* Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization // *Chemical reviews*. – 2010. – Т. 110, № 5. – С. 2795-2838.
20. *Allison R., Moghissi K.* Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. // *Clinical Endoscopy*. – 2013. – Т. 46, № 1. – С. 24–29.
21. *Johansson T., Thompson M. S., Stenberg M., af Klinteberg C., Andersson-Engels S., Svanberg S., Svanberg K.* Feasibility study of a system for combined light dosimetry and interstitial photodynamic treatment of massive tumors // *Applied optics*. – 2002. – Т. 41, № 7. – С. 1462-1468.
22. *Di Ninni P., Martelli F., Zaccanti G.* Intralipid: towards a diffusive reference standard for optical tissue phantoms // *Physics in Medicine & Biology*. – 2010. – Т. 56, № 2. – С. N21.
23. *Хилов А.В., Сергеева Е.А., Куракина Д.А., Турчин И.В., Кириллин М.Ю.* Аналитическая модель формирования флуоресцентного отклика для оценки локализации флуорофора в биоткани с помощью двухволнового флуоресцентного имиджинга // *Квантовая Электроника*. – 2021. – Т. 51, № 2. – С. 95.
24. *Khilov A., Kirillin M. Y., Loginova D., Turchin I.* Estimation of chlorin-based photosensitizer penetration depth prior to photodynamic therapy procedure with dual-wavelength fluorescence imaging // *Laser Physics Letters*. – 2018. – Т. 15, № 12. – С. 126202.
25. *Khilov A., Kirillin M., Loginova D., Turchin I.* Estimation of chlorine-based photosensitizer penetration depth prior to PDT procedure from two-wavelength excitation fluorescence measurements // *Optical Tomography and Spectroscopy – Optical Society of America*. – 2018. – С. JW3A. 9.
26. *Хилов А.В., Куракина Д.А., Турчин И.В., Кириллин М.Ю.* Мониторинг локализации фотосенсибилизаторов хлоринового ряда с помощью двухволнового флуоресцентного имиджинга: численное моделирование // *Квантовая Электроника*. – 2019. – Т. 49, № 1. – С. 63.

27. Хилов А.В., Шишкова В.А., Сергеева Е.А., Куракина Д.А., Кириллин М.Ю. Агаровые фантомы биоткани для задач флуоресцентного мониторинга фотодинамической терапии // Квантовая Электроника. – 2022. – Т. 52, № 1. – С. 63.

28. Spikes J. D. New trends in photobiology: Chlorins as photosensitizers in biology and medicine // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 1990. – Т. 6, № 3. – С. 259-274.

29. Ol'shevskaya V. A., Nikitina R. G., Savchenko A. N., Malshakova M. V., Vinogradov A. M., Golovina G. V., Belykh D. V., Kutchin A. V., Kaplan M. A., Kalinin V. N. Novel boronated chlorin e6-based photosensitizers: Synthesis, binding to albumin and antitumour efficacy // Bioorganic & medicinal chemistry. – 2009. – Т. 17, № 3. – С. 1297-1306.

30. Kirillin M., Kurakina D., Khilov A., Orlova A., Shakhova M., Orlinskaya N., Sergeeva E. Red and blue light in antitumor photodynamic therapy with chlorin-based photosensitizers: a comparative animal study assisted by optical imaging modalities // Biomedical Optics Express. – 2021. – Т. 12, № 2. – С. 872-892.

31. Kurakina D., Khilov A., Shakhova M., Orlinskaya N., Sergeeva E., Meller A., Turchin I., Kirillin M. Comparative analysis of single- and dual-wavelength photodynamic therapy regimes with chlorin-based photosensitizers: animal study // Journal of biomedical optics. – 2019. – Т. 25, № 6. – С. 063804.

32. Kono T., Yamada J. In vivo measurement of optical properties of human skin for 450–800 nm and 950–1600 nm wavelengths // International Journal of Thermophysics. – 2019. – Т. 40, № 5. – С. 1-14.

33. Shakhova M., Loginova D., Meller A., Sapunov D., Orlinskaya N., Shakhov A., Khilov A., Kirillin M. Photodynamic therapy with chlorin-based photosensitizer at 405 nm: numerical, morphological, and clinical study // Journal of Biomedical Optics. – 2018. – Т. 23, № 9. – С. 091412.

34. Khilov A., Kirillin M., Loginova D., Gamayunov S., Turchin I. Two-color fluorescence monitoring in PDT treatment // 2018 International Conference Laser Optics (ICLO) – IEEE. – 2018. – С. 494-494.

35. Kirillin M. Y., Shakhova M., Khilov A., Loginova D., Sergeeva E., Meller A., Sapunov D., Perekatova V., Turchin I., Orlinskaya N. Y. Optical techniques for advancement of photodynamic therapy: from model experiments to clinical studies // 2018 International Conference Laser Optics (ICLO) – IEEE. – 2018. – С. 463-463.
36. Kirillin M., Shakhova M., Meller A., Sapunov D., Agrba P., Khilov A., Pasukhin M., Kondratieva O., Chikalova K., Motovilova T. Quantitative optical diagnostics in pathology recognition and monitoring of tissue reaction to PDT // European Conference on Biomedical Optics – Optical Society of America. – 2017. – С. 104170C.
37. Kurakina D. A., Khilov A. V., Shakhova M. A., Orlinskaya N. Y., Kirillin M. Y. Comparative analysis of single-and dual-wavelength low dose photodynamic therapy regimens // European Conference on Biomedical Optics – Optical Society of America. – 2019. – С. 11079\_57.
38. Kirillin M., Shakhova M., Kurakina D., Khilov A., Orlova A., Sergeeva E., Meller A., Orlinskaya N., Turchin I. Red and blue light photodynamic therapy regimes: optical monitoring and histology studies // European Conference on Biomedical Optics – Optical Society of America. – 2019. – С. 11079\_26.
39. Кириллин М.Ю., Куракина Д.А., Перекатова В.В., Орлова А.Г., Сергеева Е.А., Хиллов А.В., Субочев П.В., Турчин И.В., Маллиди Ш., Хасан Т. Комплементарный бимодальный подход к мониторингу фотодинамической терапии глиом с применением таргетных наноконструктов: численное моделирование // Квантовая электроника. – 2019. – Т. 49, № 1. – С. 43-51.
40. Миронычева А., Кириллин М., Хиллов А., Малыгина А., Куракина Д., Гутаковская В., Турчин И., Орлинская Н., Шлишко И., Клеменова И. Комбинированное применение двухволнового флуоресцентного мониторинга и бесконтактной термометрии при фотодинамической терапии базальноклеточного рака кожи // Современные технологии в медицине. – 2020. – Т. 12, № 3.

41. *Rusanov A. L., Ivashina T. V., Vinokurov L. M., Fiks I. I., Orlova A. G., Turchin I. V., Meerovich I. G., Zherdeva V. V., Savitsky A. P.* Lifetime imaging of FRET between red fluorescent proteins // *Journal of biophotonics*. – 2010. – T. 3, № 12. – C. 774-783.
42. *Roy R., Godavarty A., Sevick-Muraca E. M.* Fluorescence-enhanced three-dimensional lifetime imaging: a phantom study // *Physics in Medicine & Biology*. – 2007. – T. 52, № 14. – C. 4155.
43. *Yaseen M. A., Sutin J., Wu W., Fu B., Uhlirova H., Devor A., Boas D. A., Sakadžić S.* Fluorescence lifetime microscopy of NADH distinguishes alterations in cerebral metabolism in vivo // *Biomedical optics express*. – 2017. – T. 8, № 5. – C. 2368-2385.
44. *Lane P., Lam S., Follen M., MacAulay C.* Oral fluorescence imaging using 405-nm excitation, aiding the discrimination of cancers and precancers by identifying changes in collagen and elastic breakdown and neovascularization in the underlying stroma // *Gender medicine*. – 2012. – T. 9, № 1. – C. S78-S82. e8.
45. *Wagnieres G. A., Star W. M., Wilson B. C.* In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications // *Photochemistry and photobiology*. – 1998. – T. 68, № 5. – C. 603-632.
46. *Billinton N., Knight A. W.* Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence // *Analytical biochemistry*. – 2001. – T. 291, № 2. – C. 175-197.
47. *Mansfield J. R., Gossage K. W., Hoyt C. C., Levenson R. M.* Autofluorescence removal, multiplexing, and automated analysis methods for in-vivo fluorescence imaging // *Journal of biomedical optics*. – 2005. – T. 10, № 4. – C. 041207.
48. *Davis S. C., Dehghani H., Wang J., Jiang S., Pogue B. W., Paulsen K. D.* Image-guided diffuse optical fluorescence tomography implemented with Laplacian-type regularization // *Optics express*. – 2007. – T. 15, № 7. – C. 4066-4082.

49. *Van Dam G. M., Themelis G., Crane L. M., Harlaar N. J., Pleijhuis R. G., Kelder W., Sarantopoulos A., De Jong J. S., Arts H. J., Van Der Zee A. G.* Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- $\alpha$  targeting: first in-human results // *Nature medicine*. – 2011. – T. 17, № 10. – C. 1315.

50. *Paganin-Gioanni A., Bellard E., Paquereau L., Ecochard V., Golzio M., Teissié J.* Fluorescence imaging agents in cancerology // *Radiology and oncology*. – 2010. – T. 44, № 3. – C. 142-148.

51. *Huang A. Y., Myers J. T., Barkauskas D., Howell S. J., Oleinick N. L., McCormick T. S., Cooper K. D., Baron E. D., Lam M.* Cutaneous penetration of the topically applied photosensitizer Pc 4 as detected by intravital 2-photon laser scanning microscopy // *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. – 2012. – T. 9, № 3. – C. 225-231.

52. *Lademann J., Meinke M., Schanzer S., Richter H., Darvin M., Haag S., Fluhr J., Weigmann H. J., Sterry W., Patzelt A.* In vivo methods for the analysis of the penetration of topically applied substances in and through the skin barrier // *International journal of cosmetic science*. – 2012. – T. 34, № 6. – C. 551-559.

53. *Gadella Jr T. W., Jovin T. M., Clegg R. M.* Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM): spatial resolution of microstructures on the nanosecond time scale // *Biophysical chemistry*. – 1993. – T. 48, № 2. – C. 221-239.

54. *Provenzano P. P., Eliceiri K. W., Keely P. J.* Multiphoton microscopy and fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to monitor metastasis and the tumor microenvironment // *Clinical & experimental metastasis*. – 2009. – T. 26, № 4. – C. 357-370.

55. *Becker W.* Fluorescence lifetime imaging—techniques and applications // *Journal of microscopy*. – 2012. – T. 247, № 2. – C. 119-136.

56. *Sun T., Zhang Z., Grattan K., Palmer A.* Analysis of double exponential fluorescence decay behavior for optical temperature sensing // *Review of scientific instruments*. – 1997. – T. 68, № 1. – C. 58-63.

57. Cong A., Pimenta R. M., Lee H. B., Mereddy V., Holy J., Heikal A. A. Two-photon fluorescence lifetime imaging of intrinsic NADH in three-dimensional tumor models // *Cytometry Part A*. – 2019. – T. 95, № 1. – C. 80-92.

58. Suhling K., Hirvonen L. M., Levitt J. A., Chung P.-H., Tregidgo C., Le Marois A., Rusakov D. A., Zheng K., Ameer-Beg S., Poland S. Fluorescence lifetime imaging (FLIM): Basic concepts and some recent developments // *Medical Photonics*. – 2015. – T. 27. – C. 3-40.

59. Rich R. M., Stankowska D. L., Maliwal B. P., Sørensen T. J., Laursen B. W., Krishnamoorthy R. R., Gryczynski Z., Borejdo J., Gryczynski I., Fudala R. Elimination of autofluorescence background from fluorescence tissue images by use of time-gated detection and the AzaDiOxaTriAngulenium (ADOTA) fluorophore // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2013. – T. 405, № 6. – C. 2065-2075.

60. Shives E., Xu Y., Jiang H. Fluorescence lifetime tomography of turbid media based on an oxygen-sensitive dye // *Optics Express*. – 2002. – T. 10, № 26. – C. 1557-1562.

61. Kuimova M. K. Mapping viscosity in cells using molecular rotors // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2012. – T. 14, № 37. – C. 12671-12686.

62. Burdikova Z., Svindrych Z., Pala J., Hickey C. D., Wilkinson M. G., Panek J., Auty M. A., Periasamy A., Sheehan J. J. Measurement of pH micro-heterogeneity in natural cheese matrices by fluorescence lifetime imaging // *Frontiers in microbiology*. – 2015. – T. 6. – C. 183.

63. Padilla-Parra S., Tramier M. FRET microscopy in the living cell: different approaches, strengths and weaknesses // *Bioessays*. – 2012. – T. 34, № 5. – C. 369-376.

64. McGhee E. J., Morton J. P., Von Kriegsheim A., Schwarz J. P., Karim S. A., Carragher N. O., Sansom O., Anderson K. I., Timpson P. FLIM-FRET imaging in vivo reveals 3D-environment spatially regulates RhoGTPase activity during cancer cell invasion // *Small GTPases*. – 2011. – T. 2, № 4. – C. 747-757.

65. *Sekar R. B., Periasamy A.* Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations // *The Journal of cell biology.* – 2003. – T. 160, № 5. – C. 629-633.
66. *Wallrabe H., Periasamy A.* Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy // *Current opinion in biotechnology.* – 2005. – T. 16, № 1. – C. 19-27.
67. *Day R. N., Davidson M. W.* Fluorescent proteins for FRET microscopy: monitoring protein interactions in living cells // *Bioessays.* – 2012. – T. 34, № 5. – C. 341-350.
68. *Yang X., Gong H., Quan G., Deng Y., Luo Q.* Combined system of fluorescence diffuse optical tomography and microcomputed tomography for small animal imaging // *Review of Scientific Instruments.* – 2010. – T. 81, № 5. – C. 054304.
69. *Dang X., Bardhan N. M., Qi J., Gu L., Eze N. A., Lin C.-W., Kataria S., Hammond P. T., Belcher A. M.* Deep-tissue optical imaging of near cellular-sized features // *Scientific reports.* – 2019. – T. 9, № 1. – C. 1-12.
70. *Eppstein M. J., Hawrysz D. J., Godavarty A., Sevick-Muraca E. M.* Three-dimensional, Bayesian image reconstruction from sparse and noisy data sets: near-infrared fluorescence tomography // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2002. – T. 99, № 15. – C. 9619-9624.
71. *Milstein A. B., Oh S., Webb K. J., Bouman C. A., Zhang Q., Boas D. A., Millane R.* Fluorescence optical diffusion tomography // *Applied Optics.* – 2003. – T. 42, № 16. – C. 3081-3094.
72. *Klose A. D., Hielscher A. H.* Fluorescence tomography with simulated data based on the equation of radiative transfer // *Optics letters.* – 2003. – T. 28, № 12. – C. 1019-1021.
73. *Kleshnin M., Turchin I.* Fluorescence diffuse tomography technique with autofluorescence removal based on dispersion of biotissue optical properties // *Laser Physics Letters.* – 2013. – T. 10, № 7. – C. 075601.

74. Фикс И.И., Кириллин М.Ю., Сергеева Е.А., Турчин И.В. Реконструкция положения объектов для диффузионной флуоресцентной томографии на основе гибридных моделей рассеяния света в биотканях // Известия вузов. Радиофизика. – 2011. – Т. 54, № 3. – С. 197.
75. Shcherbo D., Merzlyak E. M., Chepurnykh T. V., Fradkov A. F., Ermakova G. V., Solovieva E. A., Lukyanov K. A., Bogdanova E. A., Zharitsky A. G., Lukyanov S. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging // Nature methods. – 2007. – Т. 4, № 9. – С. 741-746.
76. Friedman L. J., Chung J., Gelles J. Viewing dynamic assembly of molecular complexes by multi-wavelength single-molecule fluorescence // Biophysical journal. – 2006. – Т. 91, № 3. – С. 1023-1031.
77. Salmon W. C., Adams M. C., Waterman-Storer C. M. Dual-wavelength fluorescent speckle microscopy reveals coupling of microtubule and actin movements in migrating cells // The Journal of cell biology. – 2002. – Т. 158, № 1. – С. 31-37.
78. Koenig K., Riemann I. High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution // Journal of biomedical optics. – 2003. – Т. 8, № 3. – С. 432-439.
79. Koenig K. Hybrid multiphoton multimodal tomography of in vivo human skin // IntraVital. – 2012. – Т. 1, № 1. – С. 11-26.
80. Xie B.-W., Mol I. M., Keereweer S., Van Beek E. R., Que I., Snoeks T. J., Chan A., Kaijzel E. L., Löwik C. W. Dual-wavelength imaging of tumor progression by activatable and targeting near-infrared fluorescent probes in a bioluminescent breast cancer model // PloS one. – 2012. – Т. 7, № 2.
81. Kijanka M. M., van Brussel A. S., van der Wall E., Mali W. P., van Diest P. J., en Henegouwen P. M. v. B., Oliveira S. Optical imaging of pre-invasive breast cancer with a combination of VHHs targeting CAIX and HER2 increases contrast and facilitates tumour characterization // EJNMMI research. – 2016. – Т. 6, № 1. – С. 14.



82. *Montana V., Farkas D. L., Loew L. M.* Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurements of membrane potential // *Biochemistry*. – 1989. – T. 28, № 11. – C. 4536-4539.

83. *Gross E., Bedlack Jr R. S., Loew L. M.* Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurement of the membrane dipole potential // *Biophysical journal*. – 1994. – T. 67, № 1. – C. 208.

84. *Hortigon-Vinagre M., Zamora V., Burton F., Green J., Gintant G., Smith G.* The use of ratiometric fluorescence measurements of the voltage sensitive dye Di-4-ANEPPS to examine action potential characteristics and drug effects on human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes // *Toxicological Sciences*. – 2016. – T. 154, № 2. – C. 320-331.

85. *Bozym R. A., Thompson R. B., Stoddard A. K., Fierke C. A.* Measuring picomolar intracellular exchangeable zinc in PC-12 cells using a ratiometric fluorescence biosensor // *ACS chemical biology*. – 2006. – T. 1, № 2. – C. 103-111.

86. *Xu J., Pan J., Jiang X., Qin C., Zeng L., Zhang H., Zhang J. F.* A mitochondria-targeted ratiometric fluorescent probe for rapid, sensitive and specific detection of biological SO<sub>2</sub> derivatives in living cells // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – T. 77. – C. 725-732.

87. *Shangguan J., He D., He X., Wang K., Xu F., Liu J., Tang J., Yang X., Huang J.* Label-free carbon-dots-based ratiometric fluorescence pH nanoprobe for intracellular pH sensing // *Analytical chemistry*. – 2016. – T. 88, № 15. – C. 7837-7843.

88. *Fischer F., Dickson E., Pottier R., Wieland H.* An affordable, portable fluorescence imaging device for skin lesion detection using a dual wavelength approach for image contrast enhancement and aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX. Part I. Design, spectral and spatial characteristics // *Lasers in medical science*. – 2001. – T. 16, № 3. – C. 199-206.

89. *Fischer F., Dickson E., Kennedy J., Pottier R.* An Affordable, Portable Fluorescence Imaging Device for Skin Lesion Detection Using a Dual Wavelength Approach for Image Contrast Enhancement and Aminolaevulinic Acid-induced

Protoporphyrin IX. Part II. In Vivo Testing // Lasers in Medical Science. – 2001. – T. 16, № 3. – C. 207-212.

90. *Svensson J., Andersson-Engels S.* Modeling of spectral changes for depth localization of fluorescent inclusion // Optics Express. – 2005. – T. 13, № 11. – C. 4263-4274.

91. *Swartling J., Svensson J., Bengtsson D., Terike K., Andersson-Engels S.* Fluorescence spectra provide information on the depth of fluorescent lesions in tissue // Applied optics. – 2005. – T. 44, № 10. – C. 1934-1941.

92. *Jermyn M., Kolste K. K., Pichette J., Sheehy G., Angulo-Rodríguez L. M., Paulsen K. D., Roberts D. W., Wilson B. C., Petrecca K., Leblond F.* Macroscopic-imaging technique for subsurface quantification of near-infrared markers during surgery // Journal of biomedical optics. – 2015. – T. 20, № 3. – C. 036014.

93. *Wirth D., Kolste K., Kanick S., Roberts D. W., Leblond F., Paulsen K. D.* Fluorescence depth estimation from wide-field optical imaging data for guiding brain tumor resection: a multi-inclusion phantom study // Biomedical optics express. – 2017. – T. 8, № 8. – C. 3656-3670.

94. *Leblond F., Ovanesyan Z., Davis S., Valdés P., Kim A., Hartov A., Wilson B., Pogue B., Paulsen K., Roberts D.* Analytic expression of fluorescence ratio detection correlates with depth in multi-spectral sub-surface imaging // Physics in Medicine & Biology. – 2011. – T. 56, № 21. – C. 6823.

95. *Sternberg E. D., Dolphin D., Brückner C.* Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy // Tetrahedron. – 1998. – T. 54, № 17. – C. 4151-4202.

96. *Kelty C. J., Brown N. J., Reed M. W., Ackroyd R.* The use of 5-aminolaevulinic acid as a photosensitiser in photodynamic therapy and photodiagnosis // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2002. – T. 1, № 3. – C. 158-168.

97. *Wang K., Zhuang J., Liu Y., Xu M., Zhuang J., Chen Z., Wei Y., Zhang Y.* PEGylated chitosan nanoparticles with embedded bismuth sulfide for dual-

wavelength fluorescent imaging and photothermal therapy // Carbohydrate polymers. – 2018. – T. 184. – C. 445-452.

98. *Kirillin M., Khilov A., Kurakina D., Orlova A., Perekatova V., Shishkova V., Malygina A., Mironycheva A., Shlivko I., Gamayunov S., Turchin I., Sergeeva E.* Dual-Wavelength Fluorescence Monitoring of Photodynamic Therapy: From Analytical Models to Clinical Studies // *Cancers*. – 2021. – T. 13, № 22. – C. 5807.

99. *Salomatina E. V., Jiang B., Novak J., Yaroslavsky A. N.* Optical properties of normal and cancerous human skin in the visible and near-infrared spectral range // *Journal of biomedical optics*. – 2006. – T. 11, № 6. – C. 064026.

100. *Zaak D., Frimberger D., Stepp H., Wagner S., Baumgartner R., Schneede P., Siebels M., Knüchel R., Kriegmair M., Hofstetter A.* Quantification of 5-aminolevulinic acid induced fluorescence improves the specificity of bladder cancer detection // *The Journal of urology*. – 2001. – T. 166, № 5. – C. 1665-1669.

101. *Miller J. P., Maji D., Lam J., Tromberg B. J., Achilefu S.* Noninvasive depth estimation using tissue optical properties and a dual-wavelength fluorescent molecular probe in vivo // *Biomedical optics express*. – 2017. – T. 8, № 6. – C. 3095-3109.

102. *Fei B., Wang H., Wu C., Chiu S.-m.* Choline PET for monitoring early tumor response to photodynamic therapy // *Journal of Nuclear Medicine*. – 2010. – T. 51, № 1. – C. 130-138.

103. *Becker T. L., Paquette A. D., Keymel K. R., Henderson B. W., Sunar U.* Monitoring blood flow responses during topical ALA-PDT // *Biomedical optics express*. – 2011. – T. 2, № 1. – C. 123-130.

104. *Wang H., Fei B.* Diffusion-weighted MRI for monitoring tumor response to photodynamic therapy // *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. – 2010. – T. 32, № 2. – C. 409-417.

105. *Jo J., Lee C. H., Kopelman R., Wang X.* Lifetime-resolved photoacoustic (LPA) spectroscopy for monitoring oxygen change and photodynamic therapy (PDT) // *Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing 2016*. – T. 9708 – International Society for Optics and Photonics, 2016. – C. 97081L.

106. *Hamdoon Z., Jerjes W., Upile T., Hopper C.* Optical coherence tomography-guided photodynamic therapy for skin cancer: case study // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* – 2011. – T. 8, № 1. – C. 49-52.

107. *Standish B. A., Yang V. X., Munce N. R., Song L.-M. W. K., Gardiner G., Lin A., Mao Y. I., Vitkin A., Marcon N. E., Wilson B. C.* Doppler optical coherence tomography monitoring of microvascular tissue response during photodynamic therapy in an animal model of Barrett's esophagus // *Gastrointestinal Endoscopy.* – 2007. – T. 66, № 2. – C. 326-333.

108. *Salinas-Alamán A., García-Layana A., Maldonado M. J., Sainz-Gómez C., Álvarez-Vidal A.* Using optical coherence tomography to monitor photodynamic therapy in age related macular degeneration // *American journal of ophthalmology.* – 2005. – T. 140, № 1. – C. 23. e1-23. e7.

109. *Amelink A., de Wolf W., Robinson D., Sterenborg H.* Monitoring PDT by means of superficial reflectance spectroscopy // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* – 2005. – T. 79, № 3. – C. 243-251.

110. *Neuschmelting V., Kim K., Malekzadeh-Najafabadi J., Jebiwott S., Prakash J., Scherz A., Coleman J. A., Kircher M. F., Ntziachristos V.* WST11 vascular targeted photodynamic therapy effect monitoring by multispectral optoacoustic tomography (MSOT) in mice // *Theranostics.* – 2018. – T. 8, № 3. – C. 723.

111. *Sirotkina M., Matveev L., Shirmanova M., Zaitsev V., Buyanova N., Elagin V., Gelikonov G., Kuznetsov S., Kiseleva E., Moiseev A.* Photodynamic therapy monitoring with optical coherence angiography // *Scientific reports.* – 2017. – T. 7. – C. 41506.

112. *Turchin I., Bano S., Kirillin M., Orlova A., Perekatova V., Plekhanov V., Sergeeva E., Kurakina D., Khilov A., Kurnikov A., Subochev P., Shirmanova M., Komarova A., Yuzhakova D., Gavrina A., Mallidi S., Hasan T.* Combined Fluorescence and Optoacoustic Imaging for Monitoring Treatments against CT26 Tumors with Photoactivatable Liposomes // *Cancers.* – 2021. – T. 14, № 1. – C. 197.

113. Yu G., Durduran T., Zhou C., Wang H.-W., Putt M. E., Saunders H. M., Sehgal C. M., Glatstein E., Yodh A. G., Busch T. M. Noninvasive monitoring of murine tumor blood flow during and after photodynamic therapy provides early assessment of therapeutic efficacy // *Clinical cancer research*. – 2005. – T. 11, № 9. – C. 3543-3552.
114. Chen B., Pogue B. W., Goodwin I. A., O'Hara J. A., Wilmot C. M., Hutchins J. E., Jack Hoopes P., Hasan T. Blood flow dynamics after photodynamic therapy with verteporfin in the RIF-1 tumor // *Radiation research*. – 2003. – T. 160, № 4. – C. 452-459.
115. Liu D. L., Svanberg K., Wang I., Andersson-Engels S., Svanberg S. Laser Doppler perfusion imaging: New technique for determination of perfusion and reperfusion of splanchnic organs and tumor tissue // *Lasers in Surgery and Medicine*. – 1997. – T. 20, № 4. – C. 473-479.
116. Perentes J. Y., Wang Y., Wang X., Abdelnour E., Gonzalez M., Decosterd L., Wagnieres G., van den Bergh H., Peters S., Ris H.-B. Low-dose vascular photodynamic therapy decreases tumor interstitial fluid pressure, which promotes liposomal doxorubicin distribution in a murine sarcoma metastasis model // *Translational oncology*. – 2014. – T. 7, № 3. – C. 393-399.
117. Zeng H., Korbelik M., McLean D. I., MacAulay C., Lui H. Monitoring Photoproduct Formation and Photobleaching by Fluorescence Spectroscopy Has the Potential to Improve PDT Dosimetry with a Verteporfin-like Photosensitizer // *Photochemistry and photobiology*. – 2002. – T. 75, № 4. – C. 398-405.
118. Tyrrell J., Campbell S., Curnow A. Validation of a non-invasive fluorescence imaging system to monitor dermatological PDT // *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. – 2010. – T. 7, № 2. – C. 86-97.
119. Gamayunov S., Turchin I., Fiks I., Korchagina K., Kleshnin M., Shakhova N. Fluorescence imaging for photodynamic therapy of non-melanoma skin malignancies—A retrospective clinical study // *Photonics & Lasers in Medicine*. – 2016. – T. 5, № 2. – C. 101-111.

120. *Valentine R. M., Ibbotson S. H., Wood K., Brown C. T. A., Moseley H.* Modelling fluorescence in clinical photodynamic therapy // *Photochemical & Photobiological Sciences.* – 2013. – T. 12, № 1. – C. 203-213.

121. *Rollakanti K. R., Kanick S. C., Davis S. C., Pogue B. W., Maytin E. V.* Techniques for fluorescence detection of protoporphyrin IX in skin cancers associated with photodynamic therapy // *Photonics & lasers in medicine.* – 2013. – T. 2, № 4. – C. 287-303.

122. *He J., Yang L., Yi W., Fan W., Wen Y., Miao X., Xiong L.* Combination of fluorescence-guided surgery with photodynamic therapy for the treatment of cancer // *Molecular imaging.* – 2017. – T. 16. – C. 1536012117722911.

123. *Baran T. M., Foster T. H.* Fluence Rate-Dependent Photobleaching of Intratumorally Administered Pc 4 Does not Predict Tumor Growth Delay // *Photochemistry and photobiology.* – 2012. – T. 88, № 5. – C. 1273-1279.

124. *Kuznetsova D. S., Shirmanova M. V., Dudenkova V. V., Subochev P. V., Turchin I. V., Zagaynova E. V., Lukyanov S. A., Shakhov B. E., Kamensky V. A.* Photobleaching and phototoxicity of KillerRed in tumor spheroids induced by continuous wave and pulsed laser illumination // *Journal of biophotonics.* – 2015. – T. 8, № 11-12. – C. 952-960.

125. *Gemmell N. R., McCarthy A., Kim M. M., Veilleux I., Zhu T. C., Buller G. S., Wilson B. C., Hadfield R. H.* A compact fiber-optic probe-based singlet oxygen luminescence detection system // *Journal of biophotonics.* – 2017. – T. 10, № 2. – C. 320-326.

126. *Li B., Lin L., Lin H., Wilson B. C.* Photosensitized singlet oxygen generation and detection: Recent advances and future perspectives in cancer photodynamic therapy // *Journal of biophotonics.* – 2016. – T. 9, № 11-12. – C. 1314-1325.

127. *Niedre M. J., Secord A. J., Patterson M. S., Wilson B. C.* In vitro tests of the validity of singlet oxygen luminescence measurements as a dose metric in photodynamic therapy // *Cancer research.* – 2003. – T. 63, № 22. – C. 7986-7994.

128. *Krasnovsky A., Kozlov A.* New approach to measurement of IR absorption spectra of dissolved oxygen molecules based on photochemical activity of oxygen upon direct laser excitation // *Biophysics*. – 2014. – Т. 59, № 2. – С. 199-205.

129. *Weishaupt K. R., Gomer C. J., Dougherty T. J.* Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor // *Cancer research*. – 1976. – Т. 36, № 7 Part 1. – С. 2326-2329.

130. *Kim C., Garcia-Uribe A., Kothapalli S.-R., Wang L. V.* Optical phantoms for ultrasound-modulated optical tomography // *Design and Performance Validation of Phantoms Used in Conjunction with Optical Measurements of Tissue*. – Т. 6870 –International Society for Optics and Photonics, 2008. – С. 68700M.

131. *Lepore M., Delfino I.* Intralipid-based phantoms for the development of new optical diagnostic techniques // *The Open Biotechnology Journal*. – 2019. – Т. 13, № 1.

132. *Крайнов А., Мокеева А., Сергеева К., Азрба П., Кириллин М.* Оптические свойства биотканей мышей и моделирующих их оптических фантомов // *Оптика и спектроскопия*. – 2013. – Т. 115, № 2. – С. 193-200.

133. *Di Ninni P., Bérubé-Lauzière Y., Mercatelli L., Sani E., Martelli F.* Fat emulsions as diffusive reference standards for tissue simulating phantoms? // *Applied optics*. – 2012. – Т. 51, № 30. – С. 7176-7182.

134. *Waterworth M., Tarte B., Joblin A., Van Doorn T., Niesler H.* Optical transmission properties of homogenised milk used as a phantom material in visible wavelength imaging // *Australasian physical & engineering sciences in medicine*. – 1995. – Т. 18, № 1. – С. 39-44.

135. *Royston D. D., Poston R. S., Prahl S. A.* Optical properties of scattering and absorbing materials used in the development of optical phantoms at 1064 nm // *Journal of biomedical optics*. – 1996. – Т. 1, № 1. – С. 110-116.

136. *Madsen S. J., Patterson M. S., Wilson B. C.* The use of India ink as an optical absorber in tissue-simulating phantoms // *Physics in Medicine & Biology*. – 1992. – Т. 37, № 4. – С. 985.

137. *Di Ninni P., Martelli F., Zaccanti G.* The use of India ink in tissue-simulating phantoms // *Optics express.* – 2010. – Т. 18, № 26. – С. 26854-26865.

138. *Логинава Д.А., Сергеева Е.А., Крайнов А.Д., Азрба П.Д., Кириллин М.Ю.* Жидкие оптические фантомы, моделирующие спектральные характеристики биотканей лабораторной мыши // *Квантовая Электроника.* – 2016. – Т. 46, № 6. – С. 528.

139. *Spinelli L., Botwicz M., Zolek N., Kasprzak M., Milej D., Sawosz P., Liebert A., Weigel U., Durduran T., Foschum F.* Determination of reference values for optical properties of liquid phantoms based on Intralipid and India ink // *Biomedical optics express.* – 2014. – Т. 5, № 7. – С. 2037-2053.

140. *Mustari A., Nishidate I., Wares M. A., Maeda T., Kawauchi S., Sato S., Sato M., Aizu Y.* Agarose-based tissue mimicking optical phantoms for diffuse reflectance spectroscopy // *JoVE (Journal of Visualized Experiments).* – 2018. № 138. – С. e57578.

141. *Ntombela L., Adeleye B., Chetty N.* Low-cost fabrication of optical tissue phantoms for use in biomedical imaging // *Heliyon.* – 2020. – Т. 6, № 3. – С. e03602.

142. *Lamouche G., Kennedy B. F., Kennedy K. M., Bisaillon C.-E., Curatolo A., Campbell G., Pazos V., Sampson D. D.* Review of tissue simulating phantoms with controllable optical, mechanical and structural properties for use in optical coherence tomography // *Biomedical optics express.* – 2012. – Т. 3, № 6. – С. 1381-1398.

143. Шуплецов В.В., Жеребцов Е.А., Дремин В.В., Попов А.П., Быков А.В., Потапова Е.В., Дунаев А.В., Меглинский И.В. Использование модельных образцов кожи человека на основе полиакриламида в задачах гиперспектральной флуоресцентной визуализации и спектроскопии // *Квантовая электроника.* – 2021. – Т. 51, № 2. – С. 118.

144. *Ishimaru A.* Wave propagation and scattering in random media / New York: Academic press, 1978. – 272 С.



145. *Tarvainen T., Vauhkonen M., Kolehmainen V., Kaipio J.* Finite element model for the coupled radiative transfer equation and diffusion approximation // *International journal for numerical methods in engineering.* – 2006. – Т. 65, № 3. – С. 383-405.

146. *Patterson M. S., Chance B., Wilson B. C.* Time resolved reflectance and transmittance for the noninvasive measurement of tissue optical properties // *Applied optics.* – 1989. – Т. 28, № 12. – С. 2331-2336.

147. *Jacques S. L.* How tissue optics affect dosimetry of photodynamic therapy // *Journal of biomedical optics.* – 2010. – Т. 15, № 5. – С. 051608.

148. *Haskell R. C., Svaasand L. O., Tsay T.-T., Feng T.-C., McAdams M. S., Tromberg B. J.* Boundary conditions for the diffusion equation in radiative transfer // *JOSA A.* – 1994. – Т. 11, № 10. – С. 2727-2741.

149. *Wang L., Jacques S. L., Zheng L.* MCML—Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues // *Computer methods and programs in biomedicine.* – 1995. – Т. 47, № 2. – С. 131-146.

150. *Zhu C., Liu Q.* Review of Monte Carlo modeling of light transport in tissues // *Journal of biomedical optics.* – 2013. – Т. 18, № 5. – С. 050902.

151. *Periyasamy V., Pramanik M.* Advances in Monte Carlo simulation for light propagation in tissue // *IEEE reviews in biomedical engineering.* – 2017. – Т. 10. – С. 122-135.

152. *Welch A., Gardner C., Richards-Kortum R., Chan E., Criswell G., Pfefer J., Warren S.* Propagation of fluorescent light // *Lasers in Surgery and Medicine.* – 1997. – Т. 21, № 2. – С. 166-178.

153. *Сергеева Е.А., Катичев А.Р., Кириллин М.Ю.* Формирование сигнала двухфотонной флуоресцентной микроскопии в условиях сильного рассеяния: теоретическое и численное моделирование // *Квантовая Электроника.* – 2010. – Т. 40, № 12. – С. 1053.

154. *Ong Y. H., Finlay J. C., Zhu T. C.* Monte Carlo modeling of fluorescence in semi-infinite turbid media // *Optical Interactions with Tissue and Cells XXIX.* – International Society for Optics and Photonics, 2018. – Т. 10492. – С. 104920Т.

155. Фикс И. И. Использование графических процессоров для решения задачи распространения света в диффузионной флуоресцентной томографии методом Монте-Карло // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2011. – Т. 4, № 1. – С. 190-195.

156. Townson R. W., Jia X., Tian Z., Graves Y. J., Zavgorodni S., Jiang S. B. GPU-based Monte Carlo radiotherapy dose calculation using phase-space sources // Physics in Medicine & Biology. – 2013. – Т. 58, № 12. – С. 4341.

157. Kleshnin M., Fiks I., Plekhanov V., Gamayunov S., Turchin I. Compact and fully automated system for monitoring photodynamic therapy, based on two LEDs and a single CCD // Laser Physics Letters. – 2015. – Т. 12, № 11. – С. 115602.

158. Хиллов А., Логинова Д., Сергеева Е., Шахова М., Меллер А., Турчин И., Кириллин М. Мониторинг и планирование фотодинамической терапии с использованием двухволнового флуоресцентного имиджинга // Современные технологии в медицине. – 2017. – Т. 9, № 4.

159. Mesradi M., Genoux A., Cuplov V., Abi-Haidar D., Jan S., Buvat I., Pain F. Experimental and analytical comparative study of optical coefficient of fresh and frozen rat tissues // Journal of biomedical optics. – 2013. – Т. 18, № 11. – С. 117010.

160. Svaasand L. O., Wyss P., Wyss M. T., Tadir Y., Tromberg B. J., Berns M. W. Dosimetry model for photodynamic therapy with topically administered photosensitizers // Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery. – 1996. – Т. 18, № 2. – С. 139-149.

161. Lopez N., Mulet R., Rodríguez R. Tumor reactive ringlet oxygen approach for Monte Carlo modeling of photodynamic therapy dosimetry // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2016. – Т. 160. – С. 383-391.

162. Salas-García I., Fanjul-Vélez F., Arce-Diego J. L. Influence of the human skin tumor type in Photodynamic Therapy analysed by a predictive model // International Journal of Photoenergy. – 2012. – Т. 2012.

163. Zobotnov S. V., Skobelkina A. V., Sergeeva E. A., Kurakina D. A., Khilov A. V., Kashaev F. V., Kaminskaya T. P., Presnov D. E., Agrba P. D., Shuleiko D. V. Nanoparticles produced via laser ablation of porous silicon and silicon nanowires for optical bioimaging // *Sensors*. – 2020. – T. 20, № 17. – C. 4874.

164. Zonios G., Dimou A., Bassukas I., Galaris D., Tsolakidis A., Kaxiras E. Melanin absorption spectroscopy: new method for noninvasive skin investigation and melanoma detection // *Journal of biomedical optics*. – 2008. – T. 13, № 1. – C. 014017.

165. Meredith P., Sarna T. The physical and chemical properties of eumelanin // *Pigment cell research*. – 2006. – T. 19, № 6. – C. 572-594.

166. Paul S., Heng P. W. S., Chan L. W. Optimization in solvent selection for chlorin e6 in photodynamic therapy // *Journal of fluorescence*. – 2013. – T. 23, № 2. – C. 283-291.

167. Isakau H., Parkhats M., Knyukshto V., Dzhagarov B., Petrov E., Petrov P. Toward understanding the high PDT efficacy of chlorin e6–polyvinylpyrrolidone formulations: Photophysical and molecular aspects of photosensitizer–polymer interaction in vitro // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2008. – T. 92, № 3. – C. 165-174.

168. Sheng C., Jack Hoopes P., Hasan T., Pogue B. W. Photobleaching-based dosimetry predicts deposited dose in ALA-PpIX PDT of rodent esophagus // *Photochemistry and photobiology*. – 2007. – T. 83, № 3. – C. 738-748.

169. Tyrrell J. S., Campbell S. M., Curnow A. The relationship between protoporphyrin IX photobleaching during real-time dermatological methylaminolevulinate photodynamic therapy (MAL-PDT) and subsequent clinical outcome // *Lasers in Surgery and Medicine*. – 2010. – T. 42, № 7. – C. 613-619.

170. Anbil S., Rizvi I., Celli J., Alagic N., Hasan T. A photobleaching-based PDT dose metric predicts PDT efficacy over certain BPD concentration ranges in a three-dimensional model of ovarian cancer // *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXII*. – T. 8568 –SPIE, 2013. – C. 143-147.

171. *Shliakhtsin S., Trukhachova T., Isakau H., Istomin Y.* Pharmacokinetics and biodistribution of Photolon®(Fotolon®) in intact and tumor-bearing rats // Photodiagnosis and photodynamic therapy. – 2009. – T. 6, № 2. – C. 97-104.

172. *Dysart J. S., Patterson M. S.* Photobleaching kinetics, photoproduct formation, and dose estimation during ALA induced PpIX PDT of MLL cells under well oxygenated and hypoxic conditions // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2006. – T. 5, № 1. – C. 73-81.

173. *Tekrony A. D., Kelly N. M., Fage B. A., Cramb D. T.* Photobleaching Kinetics of Verteporfin and Lemuteporfin in Cells and Optically Trapped Multilamellar Vesicles Using Two-photon Excitation // Photochemistry and photobiology. – 2011. – T. 87, № 4. – C. 853-861.

174. *Ong Y. H., Kim M. M., Zhu T. C.* Photodynamic therapy explicit dosimetry // Recent Advancements and Applications in Dosimetry. – 2018. – T. 1. – C. 45-72.

175. *Finlay J. C., Mitra S., Patterson M. S., Foster T. H.* Photobleaching kinetics of Photofrin in vivo and in multicell tumour spheroids indicate two simultaneous bleaching mechanisms // Physics in Medicine & Biology. – 2004. – T. 49, № 21. – C. 4837.

176. *Weston M. A., Patterson M. S.* Monitoring oxygen concentration during photodynamic therapy using prompt photosensitizer fluorescence // Physics in Medicine & Biology. – 2013. – T. 58, № 20. – C. 7039.

177. *Wei J. C., Edwards G. A., Martin D. J., Huang H., Crichton M. L., Kendall M. A.* Allometric scaling of skin thickness, elasticity, viscoelasticity to mass for micro-medical device translation: from mice, rats, rabbits, pigs to humans // Scientific reports. – 2017. – T. 7, № 1. – C. 1-16.

178. *Tan J., Lambie D., Sinnya S., Sahebian A., Soyer H., Prow T., Ardigò M.* Histopathology and reflectance confocal microscopy features of photodamaged skin and actinic keratosis // Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. – 2016. – T. 30, № 11. – C. 1901-1911.

179. *Heerfordt I. M., Nissen C. V., Poulsen T., Philipsen P. A., Wulf H. C.* Thickness of actinic keratosis does not predict dysplasia severity or P53 expression // *Scientific reports.* – 2016. – T. 6, № 1. – C. 1-6.

180. *Fernández-Figueras M., Saenz-Sardà X., Vargas P., Thompson C., Carrato C., Puig L., Ferrándiz C., Ariza A.* The depth of follicular extension in actinic keratosis correlates with the depth of invasion in squamous cell carcinoma: implication for clinical treatment // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* – 2018. – T. 32, № 10. – C. 1657-1661.

181. *Sabino C. P., Deana A. M., Yoshimura T. M., da Silva D. F., França C. M., Hamblin M. R., Ribeiro M. S.* The optical properties of mouse skin in the visible and near infrared spectral regions // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* – 2016. – T. 160. – C. 72-78.