

На правах рукописи



Фаррахова Дина Салимовна

**Лазерно-спектроскопические исследования свойств
фотосенсибилизаторов индоцианина зеленого в молекулярном и
коллоидном растворах**

Специальность: 1.3.19 – Лазерная физика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва - 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Федеральном исследовательском центре «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук»

Научный руководитель:

Лощенов Виктор Борисович, д.ф.-м.н., проф., заведующий лабораторией лазерной биоспектроскопии ЦЕНИ ИОФ РАН

Официальные оппоненты:

Салмин Владимир Валерьевич, д.ф.-м.н., доцент, заведующий кафедрой медицинской и биологической физики Красноярского государственного медицинского университета имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого

Олейников Владимир Александрович, д.ф.-м.н., заведующий отделом биоматериалов и бионанотехнологий, заведующий лабораторией молекулярной биофизики Института биоорганической химии им.академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физический институт им.П.Н. Лебедева Российской академии наук

Защита диссертации состоится 15 июня 2022г. на заседании диссертационного совета 24.1.223.01 (Д 002.063.01) при ИОФ РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д.38, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ИОФ РАН <http://diss.gpi.ru/all/>

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор физико-математических наук
тел. +7(499) 503-81-47 доб.1-47

Кузькин В.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Онкологические заболевания в настоящее время являются одной из главных проблем здравоохранения, во всех развитых и многих развивающихся странах мира и одной из основных причин смертности и инвалидности населения. В современной практической онкологии принят комплексный метод лечения, состоящий из сочетания хирургического, лучевого и химиотерапевтического вмешательства. Однако первостепенным и ведущим остается хирургический способ лечения. Одним из ключевых условий безрецидивности хирургической операции по удалению опухолей различных локализаций является полнота удаления всех патологических тканей. При этом стоит отметить, что успешность дальнейшего лечения для злокачественных новообразований имеет значимую положительную корреляцию с ранней диагностикой. Поэтому дифференциальная и ранняя диагностика микроучастков опухолевой ткани с последующим их удалением является актуальной задачей, определяющей успех лечения в целом. В последнее время активно разрабатываются новые подходы к интраоперационной навигации при удалении опухолей различной локализации, основанные на применении флуоресцирующих фотосенсибилизаторов (ФС) и красителей, селективно накапливающихся в патологических тканях.

В литературе отмечается большая перспективность методов оптической спектроскопии для качественного и количественного анализа состояния и функций биологических тканей, которые обладают значительными преимуществами перед другими методами, используемыми в онкологии. Метод флуоресцентной диагностики основан на сенсibilизации пораженных участков ФС и/или флуоресцентным красителем с последующим воздействием на них излучением с длиной волны выбираемой исходя из двух критериев: максимальный квантовый выход люминесценции и максимальная глубина проникновения излучения в глубь ткани. Некоторые ФС и флуоресцентные красители обладают способностью к избирательному накоплению в активно пролиферирующих клетках. Обнаружение участков с повышенной интенсивностью флуоресценции, вызванной повышенной концентрацией ФС и/или флуоресцентного красителя, и есть суть метода флуоресцентной диагностики.

В процессе интраоперационной навигации при удалении опухолей эффективной визуализации и получению своевременной полной информации для принятия врачебных решений препятствуют кровотечения, ограниченная глубина зондирования биотканей, низкое пространственное разрешение и неспецифичность конструкции приборов для данной нозологии. Проблема визуализации в режиме реального времени не ограничивается технической ее частью, необходимым условием для эффективной флуоресцентной навигации является правильный выбор ФС и/или флуоресцентных красителей, основываясь на их спектральных свойствах. Важными характеристиками флуоресцентных красителей наряду со способностью накопления в тканях является спектральный диапазон, а также коэффициент оптического поглощения и эффективность возбуждения флуоресценции. Чем больше глубина проникновения в биологическую ткань света с длиной волны, соответствующей спектральному

максимуму поглощения красителя в ткани, тем больше может быть глубина зондирования ткани. Наибольшую глубину могут обеспечить ФС и/или флуоресцентные красители с длиной волны спектрального максимума поглощения в дальнем красном (ДК) (650-750 нм) и ближнем инфракрасном (БИК) диапазонах (750-1050 нм), где собственное поглощение и светорассеяние биологической ткани минимально.

Применение соединений, флуоресценция которых возбуждается в ближнем инфракрасном диапазоне, позволяет анализировать более глубокие слои биоткани, что очень важно при диагностике опухолей различных локализаций. В последние годы наряду с направленным поиском новых ФС и/или красителей с интенсивной полосой поглощения в ДК и БИК областях спектра ведется разработка многофункциональных наноматериалов для ранней диагностики онкологических заболеваний. Особенно актуальными сейчас являются задачи разработки нанофотосенсибилизаторов и наноконтрастеров с высокой селективностью накопления к опухолевым клеткам (тропностью) по сравнению с нормальными тканями. В последнее время появились работы на тему перспективности использования для хирургической навигации фоточувствительных наноконструкций ближней инфракрасной области на основе наночастиц красителя - индоцианина зеленого (ИЦЗ), который в молекулярной форме используется в клинической практике для ангиографии. Для молекулярной формы ИЦЗ характерны короткий период полувыведения (3-4 мин). Использование наноразмерных структур позволяет значительно увеличить длительность циркуляции препарата и его тропность к опухоли, что, соответственно, дает возможность повысить точность в определении границ опухоли. В данной работе использован водный коллоидный раствор стабильных наночастиц ИЦЗ (НЧ ИЦЗ), в которых молекулы ИЦЗ имеют не ковалентную упаковку, а находятся в состоянии J- и H-агрегатов. Таким образом, такие важные параметры для эффективной флуоресцентной визуализации патологических очагов как высокая тропность к опухоли и селективность накопления могут быть достигнуты при использовании препаратов, в частности красителей БИК спектрального диапазона, в новой нано-форме.

Исследование новых перспективных для клинической практики соединений представляет большие сложности ввиду неадекватности моделей *in vitro* на монослойных клеточных культурах реальным опухолевым тканям. Существует подход, основанный на создании конгломератов клеток (сфероиды) в 3D-культуре, которые представляют собой подобие бессосудистых опухолевых узлов, что характеризует данную модель как *in vivo* - подобную и более адекватную, чем клеточные культуры для испытаний новых форм препаратов. Также стоит отметить, что в последнее время особое внимание уделяется многофакторности процесса роста и метастазирования опухоли. Весьма важная роль в механизме защиты опухоли от внешних факторов отводится иммунокомпетентным клеткам, в частности макрофагам. Для приближения опухолевой модели к естественным условиям в организме могут быть использованы 3D модели конгломератов клеток и ко-культур с использованием клеточных линий моноцитов/макрофагов. Таким образом, предлагаемая 3D модель *in vitro* сфероидов может считаться максимально приближенной моделью к естественным условиям организма, что особенно актуально для испытания новых препаратов для целей нанотераностики.

В связи с этим исследование процессов распределения флуоресцентных красителей и оптимизация клеточных моделей для исследования препарата являются необходимыми исследовательскими задачами для прогнозирования процессов происходящих *in vivo*. Ввиду разницы во взаимодействии ФС с различными типами клеток, возникают различные типы поверхностных взаимодействий, в том числе обусловленных зарядами структур. Сложность упаковки непосредственно агрегатов ИЦЗ обуславливает необходимость исследования их взаимодействия и поведения в окружении различных биологических структур. Пути взаимодействия ИЦЗ с клетками различного фенотипа могут различаться. Ввиду многокомпонентности реальных биологических моделей, в данном исследовании были рассмотрены, как возможные их составные части (такие как плазма крови, кровь), так и экспериментальные животные с целью выявить первопричину и источник трансформации спектральных свойств ИЦЗ.

Несмотря на существование измерительных комплексов и установок, созданных для решения подобного рода задач, рабочая область большинства из них ограничена спектральным диапазоном до 700 нм. Интерес же представляет БИК область спектра (700 - 900 нм). Поэтому актуальной задачей на сегодняшний день является разработка методик и оборудования скрининга новых субстанций, позволяющей оценивать в цифровом виде динамику изменения концентрации флуоресцентных красителей в дальней красной и ближней инфракрасной диапазонах на микроуровне (конгломераты клеток). Кроме того, интраоперационная диагностика имеет конструктивные элементы, адаптированные под конкретные локализации, которые упростят диагностику “неудобных” опухолей головы и шеи. Важность такого решения подтверждает тот факт, что по статистике 80% опухолей первичного выявления злокачественных новообразований в области головы и шеи происходят уже на III, IV стадии. Интраоперационная флуоресцентная диагностика за счет своей специфичности для данной нозологии и использования ближнего инфракрасного диапазона позволит добиться высокого разрешения при определении границ опухоли и на ранних этапах обнаружения и удаления опухоли хирургическим или фотодинамическим путем на ранних этапах.

Целью данной работы является исследование свойств флуоресценции и светорассеяния ФС ИЦЗ в нано-форме для разработки нового подхода диагностики и интраоперационной навигации опухолей головы и шеи. Разработка метода и аппаратуры для диагностики опухолей головы и шеи с применением флуоресцентных красителей ДК и БИК спектральных областей в молекулярной форме и в составе наноразмерных структур.

Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие задачи:

1. Разработка технологии приготовления коллоидного раствора индоцианина зеленого, преимущественно состоящего из J-агрегатов.
2. Проведение исследований лазерно-индуцированной флуоресценции, поглощения и светорассеяния J-агрегатов индоцианина зеленого в зависимости от концентрации и размера наночастиц.
3. Оптимизация флуоресцентных методов анализа для исследования процессов распределения флуоресцентных красителей в молекулярной форме и в составе

наноразмерных структур на разработанной экспериментальной модели опухоли *in vitro* на основе 3D клеточных культур.

4. Разработка методики получения видео- и спектроскопической информации о процессах распределения флуоресцентных красителей в опухолевых тканях *in vitro* (биологические фантомы, клеточные монослои, сфероиды) и *in vivo* (лабораторные животные), включая:
 - локализацию очагов флуоресценции в БИК-области спектра в режиме реального времени;
 - визуализацию границы опухолей по флуоресценции;
 - определение накопления и распределения молекулярной и нано- форм ИЦЗ по времени жизни флуоресценции в биологическом окружении.
5. Оптимизация оптических характеристик системы для флуоресцентной интраоперационной диагностики головы и шеи и печени в клинических условиях.

Научная новизна

В диссертационной работе представлены методы диагностики опухолей головы и шеи спектроскопическими методами с использованием ФС и флуоресцентных красителей в молекулярной и нано-формах. Результаты, изложенные в диссертационной работе, имеют фундаментальное и прикладное значение и могут быть использованы для создания новых подходов и методов для диагностики опухолей головы и шеи:

1. Впервые разработан и реализован новый подход к оценке локализации опухолевой ткани по накоплению Н-агрегатов индоцианина зеленого в клетках патологической ткани.
2. Впервые метод спектрально-флуоресцентного анализа продемонстрировал увеличение циркуляции ИЦЗ в организме за счет перехода J-агрегатов в мономеры в течение 3 дней.
3. Обнаружены различные времена жизни флуоресценции димеров Н-типа и мономеров молекулярной формы ИЦЗ и Н-агрегатов коллоидного раствора НЧ ИЦЗ в различных клеточных структурах, которые могут быть важным критерием для идентификации типа клеток.
4. Предложена новая структурная модель расположения молекул в J-агрегате НЧ ИЦЗ и динамика изменения структуры J-агрегатов при увеличении концентрации коллоидного раствора НЧ ИЦЗ.
5. Разработана и оптимизирована новая экспериментальная модель конгломерата клеток (сфероидов) для исследования накопления и распределения индоцианина зеленого в молекулярной и нано- формах.
6. Впервые реализован метод трех-камерной эндоскопической системы для ФД и лечения опухолей головы и шеи.

Практическая значимость

1. Разработанное технологическое получение J- и Н-агрегатов позволит создать новую лекарственную форму для ФД и лечения сложных злокачественных новообразований головы и шеи.

2. Увеличение времени циркуляции J-агрегатов НЧ ИЦЗ в организме и их трансформацию в молекулярную форму позволяет повысить эффективность диагностики локализации опухоли головы и шеи.
3. Применение разработанной установки для флуоресцентной интраоперационной диагностики при лечении порядка 30 пациентов показало благоприятное влияние на медиану выживаемости.

Положения, выносимые на защиту

1. Методика оценки эффективности накопления ИЦЗ в молекулярной и нано-формах на модели трехмерных опухолевых сфероидов позволяет проводить лазерно-спектроскопические и видео-флуоресцентные исследования *in vitro*, приближенной к реальной опухолевой ткани.
2. Лазерно-флуоресцентная диагностика опухолевых клеток с использованием коллоидного раствора НЧ ИЦЗ позволяет определить границы опухоли.
3. Поведение мономеров НЧ ИЦЗ зависит от концентрации коллоидного раствора и от воздействия лазерного излучения.
4. Лазерно-флуоресцентная визуализация при помощи разработанной видеосистемы позволяет проводить флуоресцентную навигацию опухоли в режиме реального времени с лучшим разрешением, по сравнению с современным оборудованием, применяемым в рутинной клинической практике.

Обоснованность и достоверность полученных результатов

Достоверность и обоснованность результатов обусловлена обзором литературы и экспериментальными данными других групп исследователей, научными современными методами экспериментальными исследованиями и оборудованием, которое верифицируется в соответствии с международными стандартами обеспечения единства измерений и единообразием средств измерений.

Личный вклад автора

Автором был проведен обзор научной литературы; разработана оптимальная методика приготовления коллоидного раствора НЧ ИЦЗ; разработаны и проведены экспериментальные исследования оптических свойств J-агрегатов НЧ ИЦЗ; проведен сравнительный анализ экспериментально полученных данных с теоретической моделью J-агрегатов; проведена оптимизация методов исследования накопления и распределения ИЦЗ в молекулярной и нано-формах на разработанной экспериментальной модели опухоли *in vitro* на основе 3D клеточных культур; разработана методика проведения флуоресцентной диагностики злокачественных новообразований видео- и спектроскопическими методами для локализации очагов флуоресценции в БИК-области спектра в режиме реального времени, визуализации границы опухолей по флуоресценции, определения накопления и распределения молекулярной и нано- форм ИЦЗ по времени жизни флуоресценции в биологическом окружении; проведена оптимизация оптических характеристик системы для флуоресцентной интраоперационной диагностики головы и шеи в клинических условиях; проведен анализ и интерпретация полученных результатов, сформулированы выводы. Автор

принимал непосредственное участие в обсуждении полученных результатов, презентации результатов на конференциях и оформлении их в виде научных публикаций.

Публикации и апробация работы

Материалы диссертации были представлены в виде 25 печатных работ в изданиях, удовлетворяющих требованиям ВАК из них в журналах с квартилем 1 опубликовано 2 статьи, с квартилем 2 - 4 статьи, с квартилем 3 - 6 статей, 23 тезиса на научных конференциях, 3 патента. Каждая из четырех оригинальных глав диссертации написана на основе результатов, опубликованных в 16 статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК. Публикации автора отражены в следующих библиографических базах данных: Web of Science 13, Scopus 22, РИНЦ 34.

Структура и объем диссертации

Работа состоит из введения, пяти глав, заключения и списка литературы. Общий объем диссертации - 155 страницы, включая 77 рисунков, 3 таблицы и список литературы из 90 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и основные задачи исследования, изложены основные положения, выносимые на защиту, отмечена научная новизна, достоверность и научно-практическая значимость полученных результатов, перечислены публикации и основные доклады по теме диссертации.

В **первой главе** приведен обзор литературы спектроскопических свойств индоцианина зеленого при переходе от молекулярной формы к агрегированной. Особое внимание уделено спектроскопическим свойствам биологической ткани и ее взаимодействие с лазерным излучением. Изложены основные принципы флуоресцентной диагностики и ФДТ.

Спектроскопические особенности, свойственные J-агрегатам, проявляются при укладке “голова к хвосту” минимум для 4 молекул ИЦЗ, в этом случае дипольные моменты электронных переходов отдельных молекул практически выровнены параллельно линии, соединяющей их центры через расположение кирпичной кладки.

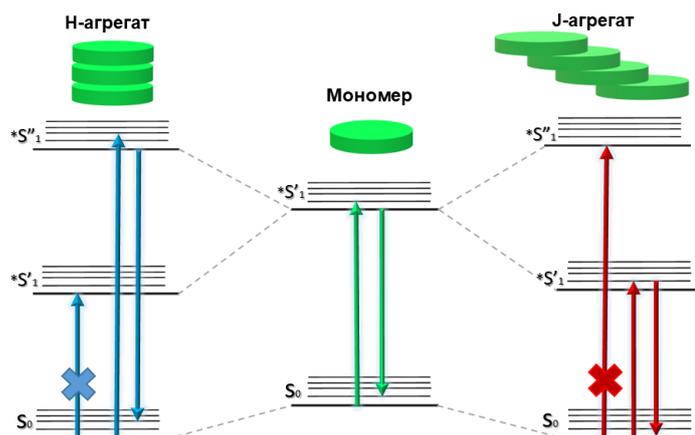


Рисунок 1. Схематическая иллюстрация экситонной модели для вариаций энергии на электронных переходах.

В агрегатах J- и H-типов ИЦЗ возбужденное состояние расщепляется на два вырожденных состояния из-за экситонной связи между молекулами (рис.1). Угол между диполями перехода и молекулярной осью агрегата определяет, допустим ли переход на более низкие или более высокие уровни возбужденного состояния. Состояние с более низкой энергией экситонно образуется в ИЦЗ J-типа, которое соответствует сонаправленным ориентированным переходным дипольным моментам, в то время как экситонное состояние верхнего уровня содержит переходные диполи с противоположными ориентациями. В J-агрегатах возможны только переходы на нижний уровень расщепленного возбужденного состояния, который соответствует красному спектральному сдвигу. Образованные молекулами H-типа, направленные переходные диполи повышают энергию возбужденного состояния, что переводит систему в экситонное состояние верхнего уровня. В то время как противоположно ориентированные переходные диполи понижают энергию возбужденного состояния, что переводит систему в состояние нижнего уровня. Для H-агрегатов допускаются переходы только на верхний энергетический уровень возбужденного состояния, что приводит к синему спектральному сдвигу. При наличии диполей с противоположными ориентациями, электронный переход запрещен и не может быть спектрально наблюдаем. Основываясь на экситонной модели, резонансное возбуждение переносит энергию между составляющими молекулами гораздо сильнее, чем взаимодействие с окружающей средой. Возбуждение больше не локализуется на одном мономере, демонстрируется когерентное движение экситона вдоль молекулярной цепи как волновой пакет. Возбуждение достигается в одной молекуле, затем передается посредством связанных колебаний от молекулы к молекуле, эти электронно-дырочные пары распространяются через агрегат. При этом электроны локализованы на молекулах, а возбуждение делокализовано по многим мономерам в виде волн возбуждения.

Вторая глава посвящена подробному описанию используемых приборов, биологическим опухолевым моделям *in vitro* и *in vivo*. Представлен метод исследования спектроскопических свойств биологических моделей в ДК и БИК диапазонах. Описаны принципы работы и характеристики приборов для исследования спектроскопических

свойств ИЦЗ в молекулярной и нано-формах, накопления и распределения препарата в исследуемых биологических моделях. Описана теоретическая модель уменьшения поглощения в зависимости от размера агрегата, демонстрирующая уменьшение коэффициента поглощения, вызванное уменьшением удельной поверхности с увеличением размера J-агрегатов НЧ ИЦЗ. Спектроскопические методы исследования позволяют выявлять однозначное соответствие между полученными сигналами (поглощения, флуоресценции или различных видов рассеяния, обусловленных эндогенными флуорофорами, находящимися в биологической ткани, и экзогенными флуорофорами, вводимыми извне) и малыми и быстрыми функциональными изменениями в исследуемых тканях, а также выявляют сильную корреляцию с глубокими метаболическими и структурными перестройками, имеющими место при развитии патологий в ткани. Особое внимание уделено методам оптической спектроскопии с разрешением по времени, для анализа накопления ФС в опухолевой ткани и выводящих органах, конфокальной флуоресцентной микроскопии и сканирующей электронной микроскопии. Описан основной принцип и составные части разработанной видеосистемы с трехкамерным блоком обработки данных для оценки накопления ФС на основе индоцианина зеленого и хлорина еб.

Для оценки накопления ФС и флуоресцентных красителей была разработана видеофлуоресцентная система на основе устройства для флуоресцентной навигации в нейрохирургии (RU 2 661 029 С1, опубл.11.07.2018). Видеофлуоресцентное устройство для анализа внутритканевого распределения ФС ДК и БИК диапазонов злокачественных новообразований головы и шеи состоит из светодиодного источника белого света, блока излучателя с системой узкополосных светофильтров, содержащих два полупроводниковых лазера с длинами волн возбуждения 635 нм и 800 нм, работающие в непрерывном режиме, систему доставки света с вводом излучения в один жгут, доставляющую свет одновременно от источника белого света и от блока излучателя, блока регистрации с системой фильтров, блока обработки видеоданных с возможностью аффинного преобразования изображения, поступающего с одной из монохромных видеокамер, для последующего наложения на изображение с цветной видеокамеры в режиме реального времени, и с возможностью цифровой обработки изображения с цветной видеокамеры путем усиления красной составляющей спектра RGB канала, и блока вывода получаемых видеоданных и численного значения интенсивности флуоресцентного сигнала исследуемого участка ткани.

Была проведена разработка трехмерных клеточных моделей опухолей (сфероидов) на основе культуральных клеток FaDu, воспроизводящую модель близкую к реальной опухоли. Технология *in vitro* ведения и экспериментального исследования клеточных структур основывается на общем свойстве различных клеточных линий прикрепляться к поверхности лабораторного пластика (имеющего специальный состав и покрытие) и, таким образом, формировать двумерные структуры на дне лабораторной посуды, в частности на дне чашки Петри.

В **третьей главе** проведены экспериментальные и теоретические исследования получения спектроскопических свойств НЧ ИЦЗ в зависимости от размера, подтверждающие изменение коэффициента J-агрегатов ИЦЗ в зависимости от размера наночастиц. Изучено уменьшение поглощения с увеличением размера частиц и

коэффициента заполнения объема J-агрегатов ИЦЗ. Уменьшение поглощения вызвано уменьшением удельной поверхности с увеличением размера частиц. Наблюдаемое уменьшение поглощения указывает на образование агрегатов, которое может быть аппроксимировано образованием слабо упакованных сферических частиц. Рассчитаны степень агрегации и средний размер J-агрегатов коллоидного раствора в зависимости от концентрации раствора. Отмечено, что с увеличением концентрации происходит уменьшение коэффициента поглощения, при этом увеличивается размер агрегатов. Представлена новая структурная модель J-агрегата коллоидного раствора НЧ ИЦЗ при взаимодействии с лазерным излучением, заключающаяся в переходе поверхностных молекул J-агрегата из пара-положения в орто-положение.

Исследование спектроскопических свойств J-агрегатов ИЦЗ, таких как флуоресценция, поглощение и рассеяние, продемонстрировало уменьшение поглощения с увеличением размера частиц и коэффициента заполнения объема J-агрегатов НЧ ИЦЗ. Теоретическая модель зависимости коллоидного раствора НЧ ИЦЗ от размера частиц продемонстрировала уменьшение коэффициента поглощения из-за уменьшения удельной поверхности с увеличением размера частиц. Наблюдаемое уменьшение поглощения указывает на образование агрегации мономеров ИЦЗ. Приведены попытки регистрации резонансной флуоресценции J-агрегатов НЧ ИЦЗ с помощью фемтосекундного лазера с перестраиваемой длиной волны в диапазоне 880-915 нм, что показало деполяризацию рассеянного лазерного излучения на образце из-за квазиодномерной структуры наночастиц.

Для исследования размера агрегатов и степени агрегации при разных концентрациях был использован многоугловой спектрометр динамического рассеяния света.

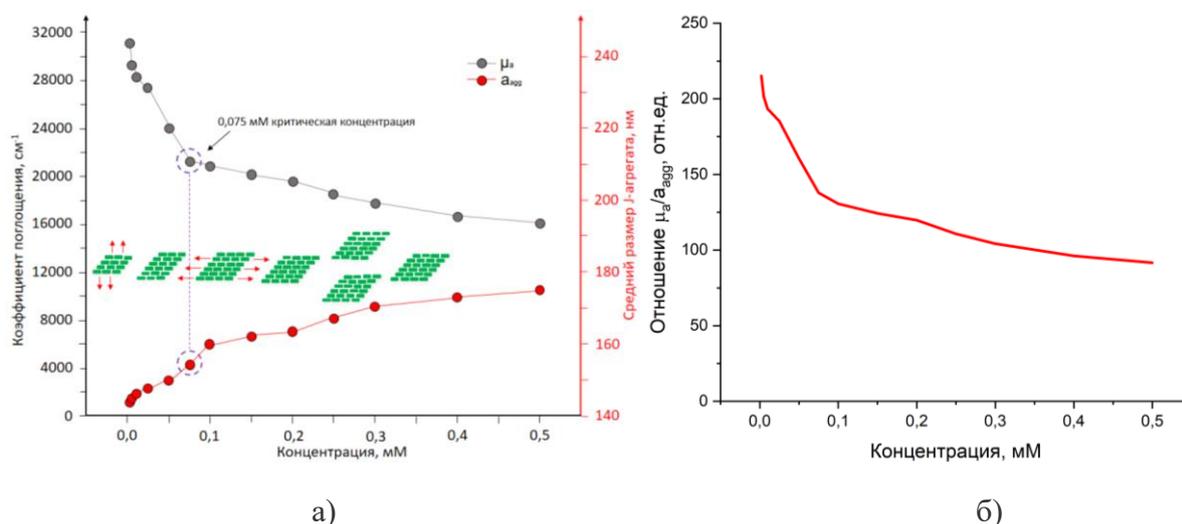


Рисунок 2. а) зависимости коэффициента поглощения и среднего размера J-агрегатов от концентрации коллоидного раствора НЧ ИЦЗ, б) зависимость отношения коэффициента поглощения к среднему размеру J-агрегатов от концентрации коллоидного раствора НЧ ИЦЗ.

Полученные значения возрастают от $125 \cdot 10^7$ до $238 \cdot 10^7$ для концентраций коллоидного раствора НЧ ИЦЗ от $2 \cdot 10^{-3}$ мМ до 0.5 мМ (рис.2). Были получены спектры

поглощения коллоидного раствора НЧ ИЦЗ, по которым был вычислен коэффициент поглощения J-агрегатов. На картинке 2б видно, как с увеличением концентрации уменьшается коэффициент поглощения J-агрегатов, при этом увеличивается средний размер агрегатов и варьирует от 144 нм до 175 нм для концентраций коллоидного раствора НЧ ИЦЗ от $2 \cdot 10^{-3}$ мМ до 0.5 мМ. Предположительно, при возрастании концентрации до 0.075 мМ J-агрегаты НЧ ИЦЗ достраиваются в высоту, прибавляя к себе молекулы ИЦЗ сверху и снизу нековалентной π - π укладки, при возрастании концентрации после 0.075 мМ J-агрегаты НЧ ИЦЗ достраиваются в ширину, добавляя к себе молекулы сбоку и/или образуя другие J-агрегаты НЧ ИЦЗ.

Были получены изображения J-агрегатов коллоидного раствора НЧ ИЦЗ для исследования морфологической структуры методом сканирующей электронной микроскопии (рис.3).

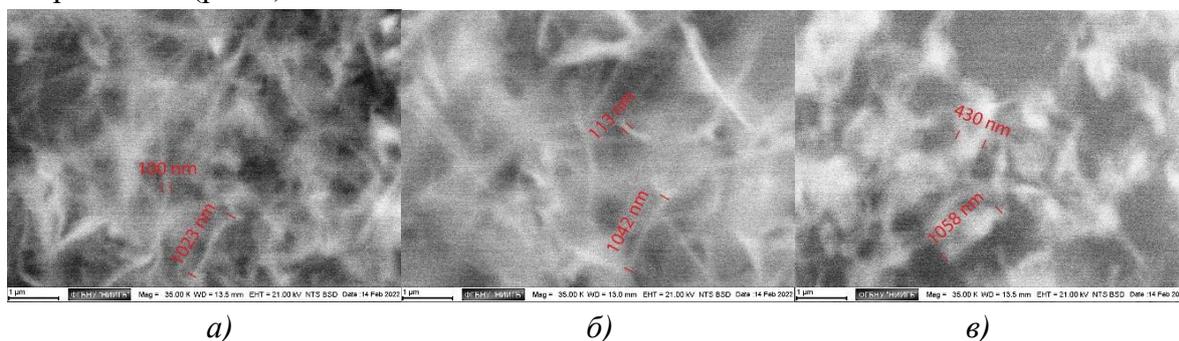


Рисунок 3. SEM изображения J-агрегатов НЧ ИЦЗ с концентрациями: а) $5 \cdot 10^{-3}$ мМ, б) 0.1 мМ, в) 0.5 мМ.

На микроскопных снимках видно представление J-агрегатов НЧ ИЦЗ в виде крупных нитевидных агрегатов и в виде хлопьев, состоящих из гранулированного материала и с широким распределением по размерам. На полученных изображениях J-агрегаты коллоидного раствора НЧ ИЦЗ представляют собой плотно упакованную сеть длинных стержнеобразных конгломератов. По полученным изображениям невозможно определить отдельные агрегаты от начала до конца и точки пересечения между отдельными агрегатами, при этом агрегаты слегка изогнуты. Образование сети является причиной сильной вязкоупругости, наблюдаемой в растворах. По полученным изображениям J-агрегаты НЧ ИЦЗ составляют порядка 100-110 нм в ширину нитевидного агрегата и, предположительно, более 1 мкм в длину для концентрации коллоидного раствора НЧ ИЦЗ 5 мкм (Рис.3а). При увеличении концентрации коллоидного раствора НЧ ИЦЗ до 0.1 мМ, увеличиваются размеры агрегатов до 120 ± 5 нм в ширину и 1050 ± 15 нм в длину (Рис.3б). При большой концентрации коллоидного раствора НЧ ИЦЗ 0.5 мМ J-агрегаты представляют собой крупные частицы с шириной до 200 нм и длиной более 1 μ м (Рис.3в).

Исходя из полученных данных, предложена новая модель структурного расположения молекул в J-агрегате ИЦЗ при воздействии лазерного излучения. Угол между диполями перехода и молекулярной осью агрегата определяет, допустим ли переход на более низкие или более высокие уровни возбужденного состояния. В агрегатах J- и H-типов ИЦЗ возбужденное состояние расщепляется на два невырожденных состояния. Состояние с более низкой энергией образуется в ИЦЗ J-типа,

которое соответствует сонаправленно ориентированным переходным дипольным моментам, в то время как состояние верхнего уровня содержит переходные диполи с противоположными ориентациями. В J-агрегатах возможны только переходы на нижний уровень расщепленного возбужденного состояния, который соответствует красному спектральному сдвигу. J-агрегаты коллоидного раствора НЧ ИЦЗ выстроены мономолекулярными слоями молекул, длинные оси которых лежат параллельно плоскости слоя (рис.4). Смещение пика поглощения в длинноволновую область J-агрегата, происходит из-за большого бокового смещения вдоль длинной молекулярной оси между соседними мономерами ИЦЗ. Дипольные моменты перехода отдельных молекул в агрегате выровнены параллельно линии, соединяющей их центры, посредством расположения мономеров «голова к хвосту». При воздействии электромагнитного излучения в этой конфигурации происходит взаимодействие с молекулами, находящимися на поверхности J-агрегата, которые приподнимаются, обрывая одну связь взаимодействия с молекулами агрегата с сильно увеличенным дипольным моментом (рис.4).

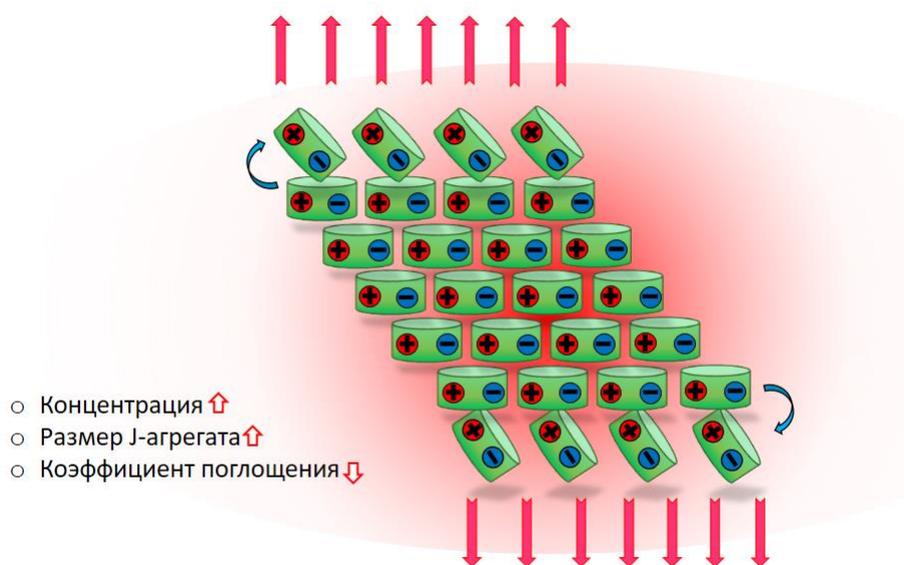


Рисунок 4. Структурное расположение молекул в J-агрегате ИЦЗ при воздействии лазерного излучения.

Резонансное возбуждение переносит взаимодействие на поверхностные молекулы J-агрегата. Узкий спектр флуоресценции обосновывается одновременным приподниманием молекул на поверхности агрегата. При увеличении концентрации происходит квазидвумерная надстройка мономеров ИЦЗ на поверхности J-агрегата. Уменьшение коэффициента поглощения при увеличении концентрации характеризуется увеличением вероятности перехода молекул в возбужденное состояние из-за увеличения количества молекул, составляющих J-агрегат НЧ ИЦЗ. При этом J-агрегаты характеризуются широким распределением по размерам, которое варьируется от мелких частиц олигомера до нитевидных агрегатов длиной в сотни нанометров.

В четвертой главе представлена динамика накопления и распределения ИЦЗ в молекулярной и наноформе в опухолевой ткани на модели монослоя клеток, трехмерных опухолевых сфероидов и лабораторных животных. Были проведены исследования накопления ФС в выводящих органах в максимуме накопления ИЦЗ в молекулярной и наноформе в опухолевой ткани. Проведен сравнительный анализ накопления и распределения ИЦЗ в молекулярной и наноформе в опухолевой ткани спектроскопическим и видеофлуоресцентным методами. Исследована стабильность наночастиц ИЦЗ после внутривенного введения в окружении белков плазмы крови. Проведено исследования времени жизни флуоресценции молекулярной формы ИЦЗ и коллоидного раствора НЧ ИЦЗ после внутривенного введения лабораторным животным.

Было исследовано накопление исследуемых ФС на трехмерных моделях мультиклеточных опухолевых сфероидов при помощи видеофлуоресцентной видеосистемы. Визуализация объектов размером 500 мкм проводилась при помощи эндоскопа, что позволяет анализировать распределение ФС в опухолевой ткани.

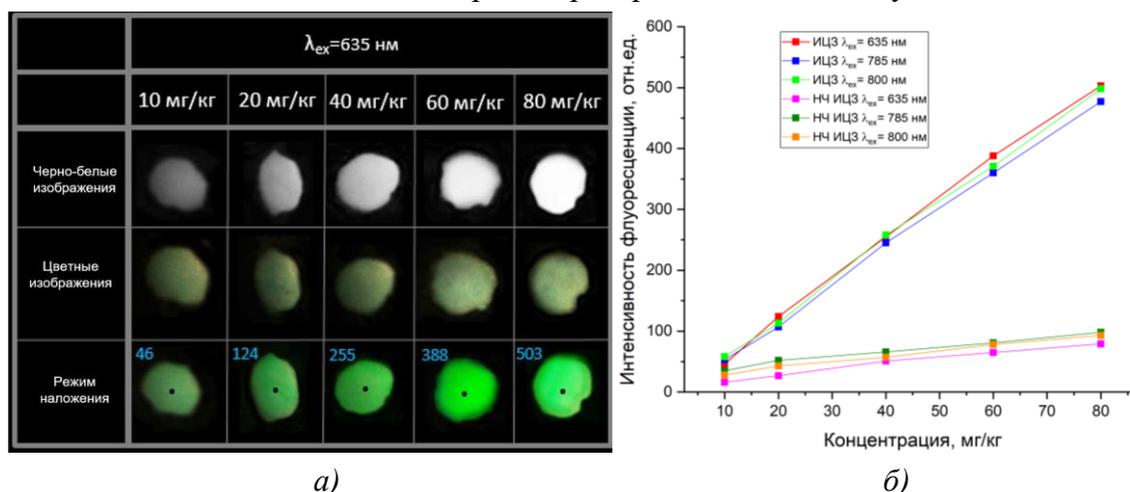


Рисунок 5. а) Изображения многоклеточных опухолей сфероидов с различной концентрацией молекулярного раствора ИЦЗ в флуоресцентном, видимом свете и в режиме наложения, б) зависимость индекса флуоресценции ИЦЗ в молекулярной и в нано-формах, накопленных в опухолевых сфероидов, от концентрации.

Эндоскопическая флуоресцентная система позволила получить изображение сфероидов в трех режимах: видимом, флуоресцентном и в режиме наложения (рис.5). Для всех исследуемых ФС видимое изображение сфероидов визуально не изменялось при изменении концентрации препарата. Во флуоресцентном свете яркость тела сфероида увеличивалась с ростом концентрации. Режим наложения, генерируемый ПО видеофлуоресцентной системы, позволил оценить локализацию и степень накопления ФС в разных частях сфероида в режиме реального времени. Количественная оценка флуоресцентного сигнала показала рост средней интенсивности флуоресценции с концентрацией. Видеосистема с увеличением позволила наблюдать мультиклеточные опухолевые сфероиды размером 500 мкм.

ИЦЗ в композитной форме (мономеры ИЦЗ, связанные с белками плазмы) имеет пик поглощения мономера, смещенный в красную область спектра. В то же время сдвиг пика поглощения формы J-агрегата НЧ ИЦЗ не наблюдается (рис.6).

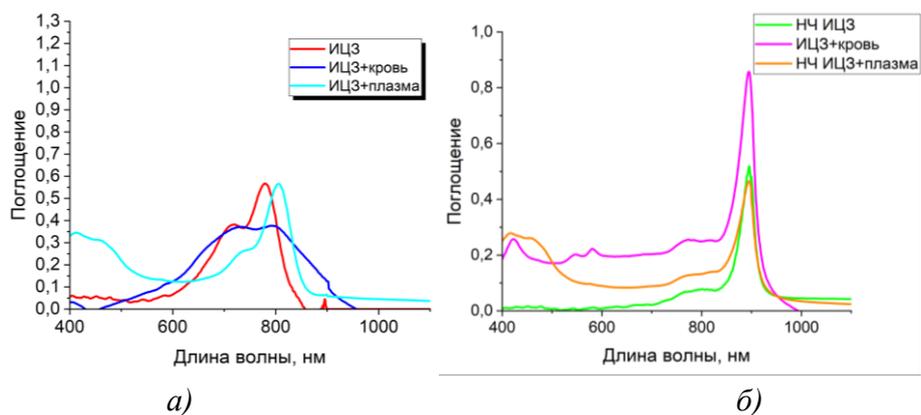


Рисунок 6. Спектры поглощения ИЦЗ в крови и плазме а) в молекулярной форме, б) в нано-форме.

Изучение динамики флуоресцентного сигнала различных форм ИЦЗ в крови и плазме человека показало незначительное снижение флуоресцентного сигнала в течение 5 часов и изменение амплитуды флуоресцентных пиков. Это явление указывает на низкую фотостабильность формы мономеров ИЦЗ (рис.7).

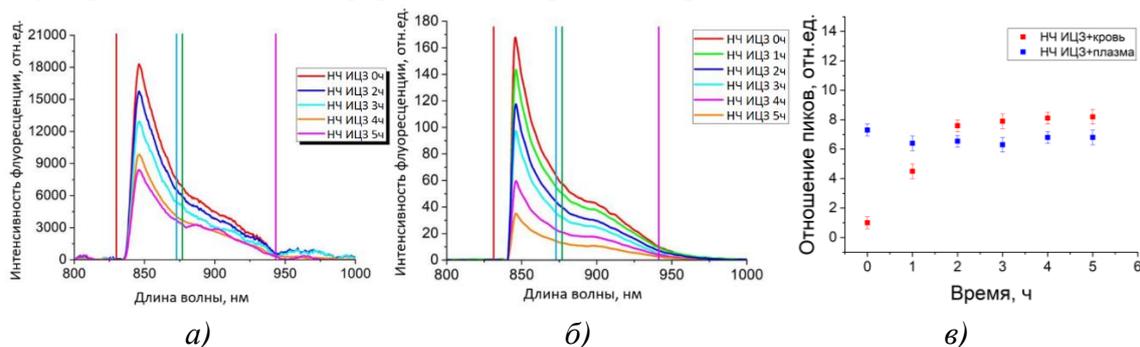


Рисунок 6. Спектры флуоресценции НЧ ИЦЗ при возбуждении на длине волны 800 нм, а) с кровью, б) с плазмой. Цветные вертикальные линии указывают области под спектральной кривой, соответствующие мономерам ИЦЗ и J-агрегатам, в) отношение площади пика флуоресценции J-агрегатов ИЦЗ к мономерам ИЦЗ в крови и плазме при возбуждении на длине волны 800 нм.

Соотношение интегральной флуоресценции мономеров к J-агрегатам демонстрирует различное поведение в крови и плазме (рис.7в). Пик флуоресценции J-агрегата в крови увеличился, что можно объяснить стабильностью агрегата. Интегральное соотношение мономеров к J-агрегатам в плазме иллюстрирует одинаковое снижение фотостабильности мономерной формы ИЦЗ с одинаковой скоростью и переход агрегатов J-типа в мономерную форму. Коллоидный раствор НЧ ИЦЗ может улучшить флуоресцентную диагностику за счет усиления циркуляции мономерной формы в системе крови, что позволяет прогнозировать пути метастазирования. Совокупная форма ИЦЗ имеет значительные перспективы для флуоресцентной диагностики различных злокачественных новообразований благодаря своим спектроскопическим свойствам.

Для моделирования опухолей головы и шеи была использована клеточная линия карциномы гортаноглотки человека FaDu, которая перевивалась экспериментальным животным nude-мышей с отсутствием тимуса и наличием дефицита Т-клеток. Все

исследуемые флуоресцентные красители ИЦЗ и НЧ ИЦЗ медленно вводили внутривенно в хвостовую вену в дозе 10 мг/кг. Для оценки скорости аккумуляции ИЦЗ в молекулярной и нано-форме была исследована динамика накопления исследуемых флуоресцентных красителей в ткани ксенографта FaDu у мышей *nude* в режиме реального времени *in vivo* (рис.8).

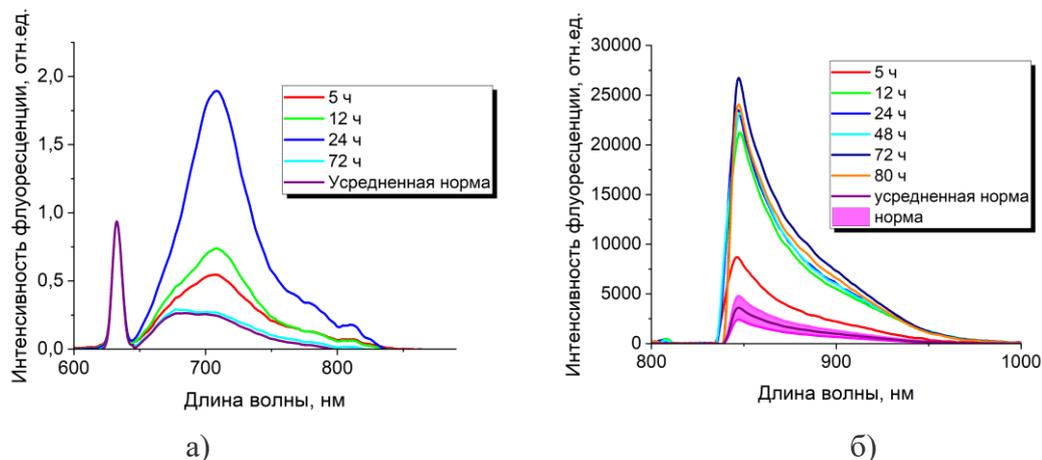


Рисунок 8. Спектры флуоресценции НЧ ИЦЗ в ткани ксенографта FaDu у *nude* мышей, а) при возбуждении длиной волны 633 нм, б) при возбуждении длиной волны 785 нм, в) при возбуждении длиной волны 800 нм.

Максимумы накопления изученных флуоресцентных красителей в молекулярной и наноформе были установлены в опухолевой ткани, в нормальной ткани и в органах выделения. Полученные результаты показали различное время накопления изученных флуоресцентных красителей в патологической ткани: молекулярная форма ИЦЗ-5 мин, НЧ ИЦЗ – 24 часа, при этом в течение 72 часов происходит медленный переход от наноформы ИЦЗ к молекулярной форме. Формирование J-агрегатов является альтернативным подходом к повышению общей стабильности ИЦЗ. Установлено, что НЧ ИЦЗ перспективны для флуоресцентной диагностики и ФДТ благодаря их уникальным оптическим свойствам и селективности накопления. В нашем исследовании возбуждение в основном происходило в H-агрегатах НЧ ИЦЗ при длине волны возбуждения 633 нм и в J-агрегатах НЧ ИЦЗ при возбуждении 785 нм и 800 нм, в то время как J-агрегаты представляют интерес для дальнейших исследований. Было также отмечено, что основная масса наночастиц, которые проявляют спектроскопические свойства, связанные с J-агрегатами, находятся в диапазоне размеров от 220 нм до 400 нм. ИЦЗ является более подходящим красителем для флуоресцентной диагностики кровотока и лимфотока вблизи злокачественного новообразования из-за его быстрого выведения из организма. Исследование демонстрирует контраст спектральных характеристик ИЦЗ в мономерах и агрегатном типе. Кроме того, во время накопления в опухолевых клетках наблюдалась трансформация мономеров в J-агрегаты.

Анализ кинетики флуоресценции показывает разницу между временем жизни флуоресценции, которая позволяет разделять формы ИЦЗ в биологической ткани. В опухолевой модели *nude* мышей наблюдались две компоненты времени жизни флуоресценции ИЦЗ в молекулярной и наноформах. Периоды жизни флуоресценции для молекулярной формы ИЦЗ составили 0.90 ± 0.02 нс и 0.48 ± 0.02 нс для мономерной

составляющей молекулярного раствора и 1.09 ± 0.10 нс и 0.26 ± 0.05 нс для димеров Н-типа молекулярного раствора, а также двух периодов жизни флуоресценции для наноформы ИЦЗ 1.25 ± 0.09 нс и 0.28 ± 0.02 нс, соответствующей агрегатам Н-типа. Было отмечено соответствие между временными характеристиками флуоресценции Н-агрегатов молекулярного раствора ИЦЗ и коллоидного раствора НЧ ИЦЗ, накопленных в опухолевой модели *nude* мышей.

Однако ИЦЗ демонстрирует стабильность времени жизни флуоресценции с ростом концентрации. Наночастицы ИЦЗ имеют огромные перспективы для флуоресцентной диагностики опухолей благодаря своим спектроскопическим свойствам и способствуют сохранению здоровой ткани.

В пятой главе были получены спектры флуоресценции биологических фантомов с различной концентрацией ИЦЗ в молекулярной и наноформах. Параллельно были получены флуоресцентные изображения фантомов при помощи флуоресцентной видеосистемы. С повышением концентрации повышается интенсивность флуоресценции ИЦЗ в молекулярной и наноформе при возбуждении длинами 633 нм, 785 нм и 800 нм. При этом, при возбуждении длиной волны 633 нм в молекулярном растворе ИЦЗ наблюдается два пика флуоресценции, соответствующие Н-агрегатам и мономерам на 700 нм и 850 нм, соответственно. В то время как в коллоидном растворе наблюдается только пик, соответствующий Н-агрегатам. При возбуждении длинами волн 785 нм и 800 нм коллоидного раствора ИЦЗ наблюдается интенсивный пик мономеров и небольшой пик J-агрегатов ИЦЗ на 850 нм и 900 нм, соответственно.

Был проведен корреляционный анализ, демонстрирующий коэффициент корреляции Пирсона и коэффициент детерминации в диапазонах 0.98-0.99 и 0.97-0.98, соответственно, что свидетельствует о соответствии результатов, полученных при помощи спектроскопической системы и видеофлуоресцентной системы.

Была приведена флуоресцентная диагностика злокачественных новообразований головы и шеи и печени с помощью разработанной интраоперационной видеофлуоресцентной системы в клинических условиях.

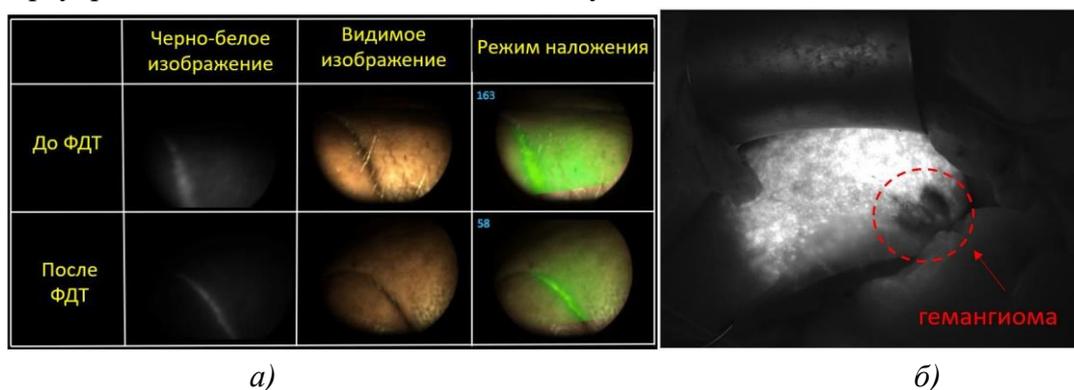


Рисунок 9. а) Комбинированные изображения области опухоли при первом сеансе ФДТ, б) флуоресцентное изображение печени сразу после внутривенного введения молекулярного раствора ИЦЗ.

Флуоресцентная диагностика опухолей головы и шеи проводилась с помощью ФС хлорин еб до и после ФДТ (рис.9а). Контроль эффективности ФДТ был проведен по оценке фотобличинга ФС. Флуоресцентная диагностика гемангиомы печени

проводилась во время хирургической резекции опухоли с использованием молекулярной формы ИЦЗ (рис.9б). Метод интраоперационной флуоресцентной визуализации позволяет определить точную локализацию новообразования и ее границы. Оценка выгорания ФС в режиме реального времени позволяет онкологам быстро принимать решения во время проведения процедуры ФДТ, что способствует улучшению качества лечения пациентов. Флуоресцентная визуализация исследуемой области печени с очаговым образованием демонстрирует почти полное отсутствие распределения ИЦЗ, что указывает на отсутствие прохождения молекул ИЦЗ через сосуды и капилляры к патологической ткани. На основании полученного изображения с распределением ИЦЗ по печени проводилась хирургическая резекция и затем делалась повторная запись и оценка флуоресценции краев резекции. Полученные результаты показали удобство использования эндоскопической флуоресцентной видеосистемы при различных нозологиях рака головы и шеи. Следовательно, данный подход диагностики позволит повысить эффективность лечения онкологических больных.

В Заключении сформулированы основные результаты работы.

1. Найдены технологические условия синтеза коллоидного раствора индоцианина зеленого с концентрацией 1.5 мМ, состоящего из J-агрегатов, высокой стабильности приготовления концентрационных серий коллоидного раствора при температуре 65°C в течение 20 часов.
2. В результате исследований показано, что синтезированный коллоидный раствор индоцианина зеленого состоит из J-агрегатов на 97% с узкими пиками поглощения и флуоресценции, при этом пик поглощения J-агрегатов смещен примерно на 100 нм в длинноволновую область, относительно мономерного пика, полученные спектры рассеяния демонстрируют наличие индивидуальных наночастиц, составляющих коллоидный раствор.
3. Определена структура J-агрегатов индоцианина зеленого в зависимости от концентрации исходного молекулярного раствора, объяснено изменение среднего размера НЧ и коэффициента поглощения в зависимости от концентрации. Предложена новая модель взаимодействия излучения с наночастицами, заключающаяся в активности поверхностных молекул, переходящие из пара-положения в орто-положение.
4. Оптимизированы флуоресцентные методы анализа и проведены исследования процессов распределения флуоресцентных красителей в молекулярной форме и в составе наноразмерных структур на разработанной экспериментальной модели опухоли *in vitro* на основе 3D клеточных культур. Это позволило улучшить точность определения границы опухолевого роста по флуоресценции красителей с точностью не хуже 0,1 мм.
5. Разработана методика совместной оценки видео-флуоресцентной и спектрально-флуоресцентной информации о процессах распределения флуоресцентных красителей в опухолевых тканях *in vitro* (биологические фантомы, клеточные монослои, сфероиды) и *in vivo* (лабораторные животные), включая:
 - локализацию очагов флуоресценции в БИК-области спектра в режиме реального времени;

- визуализацию границы опухолей по флуоресценции с пространственным разрешением не ниже 0,5 мм для *in vivo* исследований и не ниже 0,1 мм для *in vitro* исследований;
 - определение накопления и распределения мономеров и Н-агрегатов индоцианина зеленого по времени жизни флуоресценции в биологическом окружении.
6. По результатам проведенных клинических исследований на 30 пациентах были оптимизированы оптические характеристики видео-флуоресцентной системы в части согласования интерференционных фильтров и зеркал. Видео-флуоресцентная система состоит из трех камер, а именно видимой камеры для навигации, флуоресцентной камеры в ДК диапазоне при возбуждении длины волны 633 нм для визуализации опухоли и флуоресцентной камеры в БИК диапазоне при возбуждении 785 нм и 800 нм для определения путей метастазирования.
- 7.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. D. Farrakhova, I. Romanishkin, Yu. Maklygina, L. Bezdetnaya, V. Loschenov. (2021) Analysis of fluorescence decay kinetics of indocyanine green monomers and aggregates in brain tumor model *in vivo*. *Nanomaterials* 11(12), 3185. DOI: 10.3390/nano11123185. **Q1** WoS, **Q1** Scopus.
2. Farrakhova, D., Shiryaev, A., Yakovlev, D., Efendiev, K., Maklygina, Y., Borodkin, A., Loshchenov, M., Bezdetnaya, L., Ryabova, A., Amirkhanova, L., Samoylova, S., Rusakov, M., Zavodnov, V., Levkin, V., Reshetov, I., Loschenov, V. (2019). Trials of a fluorescent endoscopic video system for diagnosis and treatment of the head and neck cancer. *Journal of clinical medicine*, 8(12), 2229. DOI: 10.3390/jcm8122229. **Q1** WoS, **Q1** Scopus.
3. Yu. Maklygina, I. Romanishkin, A. Skobeltsin, D. Farrakhova, V. Loschenov. (2021) Phototherapy of brain tumours using a fibre optic neurosystem. *Photonics* 8(11), 462. DOI: 10.3390/photonics8110462. **Q2** WoS, **Q2** Scopus.
4. Yu. Maklygina, I. Romanishkin, A. Skobeltsin, D. Farrakhova, S. Kharnas, L. Bezdetnaya, V. Loschenov. (2021) Changes in spectral fluorescence properties of a near-infrared photosensitizer in a nanoform as a coating of an optical fiber neuroport. *Photonics* 8(12), 556. DOI: 10.3390/photonics8120556. **Q2** WoS, **Q2** Scopus.
5. Yakovlev, D., Shiryaev, A., Farrakhova, D., Savelieva, T., Efendiev, K., Loschenov, M., Zhemerikin, G., Amouroux, M., Daul, C., Blondel, W., Reshetov, I., Loschenov, V. (2022) Comparison of the Capabilities of Spectroscopic and Quantitative Video Analysis of Fluorescence for the Diagnosis and Photodynamic Therapy Control of Cholangiocellular Cancer. *Photonics* 9(2), 65. DOI: 10.3390/photonics9020065. **Q2** WoS, **Q2** Scopus.
6. Farrakhova, D. S., Yakovlev, D. V., Maklygina, Y. S., Ryabova, A. V., Borodkin, A. V., Loschenov, M. V., Bezdetnaya, L., Plyutinskaya, A., Karmakova, T., Pankratov, A., Loschenov, V. B. (2020). The research of chlorine e6 distribution and accumulation in multicellular tumor spheroid model. *Optical and Quantum Electronics*, 52(2), 116. DOI: 10.1088/1742-6596/1439/1/012032. **Q3** WoS, **Q2** Scopus.
7. D. Farrakhova, Yu. Maklygina, I. Romanishkin, D. Yakovlev, A. Plyutinskaya, L. Bezdetnaya, V. Loschenov. (2021) Fluorescence Imaging Analysis Of Distribution Of Indocyanine Green In Molecular And Nanoform In Tumor Model. *Photodiagnosis*

- and Photodynamic Therapy, 37, 102636. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2021.102636. **Q3** WoS, **Q2** Scopus.
8. A. Sharova, D. Farrakhova, E. Slovokhodov, S. Arakelov, A. Zykov, A. Sarantsev, K. Linkov, V. Loschenov Evaluation of vulvar leukoplakia photodynamic therapy efficiency by fluorescent diagnostics method with local "Alasens (R)" photosensitizer application. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 27, 105, 2019. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2019.05.018. **Q3** WoS, **Q2** Scopus.
 9. Yakovlev, D. V., Farrakhova, D. S., Shiryaev, A. A., Efendiev, K. T., Loschenov, M. V., Amirkhanova, L. M., Kornev, D.O., Levkin, V.V., Reshetov, I.V., Loschenov, V. B. (2020). New approaches to diagnostics and treatment of cholangiocellular cancer based on photonics methods. Frontiers of Optoelectronics, 13(4), 352-359. DOI: 10.1007/s12200-020-1093-0. **Q2** Scopus.
 10. Farrakhova D.S., Yakavets I.V., Loschenov V.B., Bolotina L.N., Zorin V.P. Investigation of chlorin photosensitizers distribution in monolayer and spheroid cell cultures. // Biomedical Photonics. 2017;6(2), pp. 4-11. DOI:10.24931/2413-9432-2017-6-2-4-11. **Q3** Scopus.
 11. Makarov, V. I., Akhlyustina, E. V., Farrakhova, D. S., Pominova, D. V., Ryabova, A. V., Loschenov, V. B. (2016). Photonic methods for quality evaluation of skin engraftment. Biomedical Photonics, 5(3), 30-40. DOI: 10.24931/2413-9432-2016-5-3-30-40. **Q3** Scopus.
 12. D.S. Farrakhova, I.D. Romanishkin, D.V. Yakovlev, Yu.S. Maklygina, T.A. Savelieva, L. Bezdetsnaya, V.B. Loschenov. (2021) The spectroscopic study of indocyanine green J-aggregate stability in human blood and plasma. Physics of Wave Phenomena. (Принята к печати). **Q4** WoS, **Q3** Scopus.
 13. J.O. Kuznetsova, D.S. Farrakhova, M.G. Yassin. (2018) Aluminum phthalocyanine nanoparticles as a contrast agent for the detection of tooth enamel microcracks. Photonics & Lasers in Medicine, 7(3), 4-20. **Q3** Scopus.
 14. Zolotareva, J. O., Farrakhova, D. S., Kupriyanova, E. N., & Loschenov, V. B. (2018). Aluminum phthalocyanine nanoparticles activation for local fluorescence spectroscopy in dentistry. Biomedical Photonics, 7(3), 4-20. **Q3** Scopus.
 15. Subbot V.S., Semenov A.V., Shiryaev A.A., Nekrasova T.P., Grachev P.V., Farrakhova D.S., Loschenov V.B., Bodyrev M.A., Yudayev N.D. Clinical application of the video fluorescent mapping method in the preoperative planning of liver resections in its focal diseases. Clinical an Experimental Surgery. 2021. vol. 9, № 4. pp. 81-87. DOI: 10.33029/2308-1198-2021-9-4-81-87. **Q4** Scopus.
 16. D S Farrakhova, I D Romanishkin, Yu S Maklygina, D V Yakovlev, A V Ryabova and V B Loschenov, Fluorescence lifetime of indocyanine green in molecular and nano-forms in the cellular model of a brain tumor *in vitro*. (2021) IOP: Journal of Physics: Conference Series 2058, 012031. DOI: 10.1088/1742-6596/2058/1/012031. **Q4** Scopus.
 17. A.M. Kulichenko, D.S. Farrakhova, D.V. Yakovlev, Yu.S. Maklygina, A.A. Shiryaev and V.B. Loschenov. (2021) Fluorescence diagnostics and photodynamic therapy of squamous cell carcinoma of the lateral surface of the tongue using the photosensitizer chlorin e6 by spectroscopic video fluorescence methods. IOP: Journal of Physics: Conference Series 2058, 12021. DOI: 10.1088/1742-6596/2058/1/012021. **Q4** Scopus.
 18. Farrakhova, D. S., Kuznetsova, J. O., & Loschenov, V. B. (2016). The study of laser induced fluorescence of tooth hard tissues with aluminum phthalocyanine nanoparticles. In Journal of Physics: Conference Series (Vol. 737, No. 1, p. 012048). IOP Publishing. **Q4** Scopus.

19. Skobeltsin, A., Farrakhova, D., Maklygina, Y., Romanishkin, I., Ryabova, A., Yakovets, I., Millard, M., Bolotina, L., Plyutinskaya, A., Karmakova, T., Pankratov, A., Loschenov, V. (2020). 3D spheroid cultures for evaluation of nanophotosensitizers accumulation. In Journal of Physics: Conference Series (Vol. 1439, No. 1, p. 012032). IOP Publishing. DOI: 10.1088/1742-6596/1439/1/012032. **Q4** Scopus.
20. Farrakhova D.S., Makarov V.I., Loschenov V.B. (2019). The engraftment dynamics evaluation of skin grafts via aluminum phthalocyanine nanoparticles using spectroscopic methods. In Journal of Physics: Conference Series (Vol. 1238, No. 1, p. 012026). IOP Publishing. **Q4** Scopus.
21. Zolotareva J.O., Farrakhova D.S., Loschenov V.B. Aluminium Phthalocyanine Nanoparticles Application for Fluorescent Diagnostics and Photodynamic Therapy in Dentistry. KnE Energy & Physics, 3 (2) 568, 2018. DOI: 10.18502/ken.v3i2.1867

Просидинги:

1. D.Farrakhova, Y.Maklygina, I.Romanishkin, A.Ryabova, I.Yakovets, M.Millard, L.Bolotina, A.Plyutinskaya, T.Karmakova, A.Pankratov, V.Loschenov, Investigation of Ce6 accumulation and distribution in cell cultures of head and neck cancers. // In Saratov Fall Meeting 2018: Optical and Nano-Technologies for Biology and Medicine (Vol. 11065, p. 110651V). DOI: 10.1117/12.2523465
2. Farrakhova, D. S., Maklygina, Y. S., Yakovlev, D. V., Efendiev, K. T., Borodkin, A. V., Loschenov, M. V., ... & Loschenov, V. B. (2020). The investigation of the photodynamic efficiency of chlorine e6 on a model of multicellular tumor spheroids using the developed video fluorescent equipment. In 2020 International Conference Laser Optics (ICLO) (pp. 1-1). IEEE. DOI: 0.1109/ICLO48556.2020.9285432.
3. Farrakhova, D.S., Yakavets, I.V., Loschenov, V.B., Bolotina, L.N., Zorin, V.P., Comparative accumulation study of chlorin group photosensitizers on monolayer and multicellular tumor spheroids of cell culture. // Proceedings - International Conference Laser Optics 2018, ICLO 2018. 2018, 8435633, с. 589. DOI: 10.1109/LO.2018.8435633. **Q4** Scopus.
4. Farrakhova, D., Borodkin, A., & Makarov, V. (2018). The concept of the portable spectrometer for fast assessment of skin engraftment via exogenous and endogenous fluorophores. In Optical Instrument Science, Technology, and Applications (Vol. 10695, p. 106950P). International Society for Optics and Photonics.

Патенты:

1. RU 203175 U1 Видеофлуоресцентное устройство для анализа внутритканевого распределения фотосенсибилизаторов дальнего красного и ближнего инфракрасного диапазонов злокачественных новообразований головы и шеи от 24.03.2021.
2. RU 121742 S Устройство для интраоперационной флуоресцентной диагностики опухолей головы и шеи с контролем за терапевтическим воздействием от 24.09.2020.
3. RU 2767264 C1 Способ внутрипротоковой фототераностики холангиоцеллюлярного рака от 17.03.2022.