Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук Центр естественно-научных исследований

На правах рукописи

Haff-

## Фаррахова Дина Салимовна

# Лазерно-спектроскопические исследования свойств фотосенсибилизатора индоцианина зеленого в молекулярных и коллоидных растворах

Специальность: 1.3.19 – Лазерная физика

Диссертация на соискание учёной степени кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

проф., д.ф.-м.н. Лощенов Виктор Борисович

Москва – 2022

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
Актуальность диссертационной работы	6
Цель и задачи исследований	. 10
Научная новизна	. 12
Практическая значимость	. 13
Положения, выносимые на защиту	. 13
Степень достоверности результатов	. 14
Личный вклад автора	. 14
Апробация работы	. 15
Гранты	. 24
Благодарности	. 25
Структура и объем диссертации	. 26
ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	. 27
1.1. Спектроскопические свойства индоцианина зеленого	. 27
1.2. Оптические свойства биологических тканей. Особенности распространения лазерной излучения в тканях	го 34
1.3. Метод фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики	. 39
Заключение к главе	. 47
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	. 48
2.1. Используемые физические методы исследования	. 49
2.1.1. Исследование спектров поглощения.	. 49
2.1.2. Измерение спектров флуоресценции ФС	. 49
2.1.3. Определение размеров наночастиц методом динамического и статического рассеян света.	ния . 52
2.1.4. Измерение кинетики флуоресценции ФС с пикосекундным разрешением.	. 56
2.1.5. Исследование распределения ФС в опухолевой ткани методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.	. 58
2.1.6. Исследование морфологической структуры наночастицы методом сканирующей электронной микроскопии.	. 60
2.1.7. Получение графических изображений зависимости интенсивности рассеянного лазерного излучения от угла рассеяния.	. 61
2.1.8. Разработка видеофлуоресцентной системы для регистрации мультиспектральных изображений в ДК и БИК диапазонах спектра	. 61
2.2. Материалы	. 65
2.2.1. Фотосенсибилизаторы в молекулярной форме	. 65

## Оглавление

2.3. Биологические модели исследования in vitro и in vivo
2.3.1. Исследования in vivo
2.3.2. Опухолевая модель
2.4. Приготовление трехмерной клеточной модели опухоли (сфероидов)
2.5. Приготовление агрегированного коллоидного раствора индоцианина зеленого
2.6. Теоретическое исследование зависимости поглощения коллоидного раствора НЧ ИЦЗ от размера наночастиц
Заключение к главе
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИХ СВОЙСТВ Ј- АГРЕГАТОВ ИЦЗ
3.1. Исследование степени агрегации и размера частиц коллоидного раствора НЧ ИЦЗ методом динамического рассеяния света
3.2. Исследование морфологии коллоидного раствора НЧ ИЦЗ в зависимости от концентрации методом СЭМ
3.3. Исследование спектральных свойств коллоидного раствора НЧ ИЦЗ в зависимости от размера наночастиц
3.4. Исследование спектроскопических свойств коллоидного раствора НЧ ИЦЗ перестраиваемой длиной волны
3.5. Модель поведения мономеров ИЦЗ, входящих в состав агрегата НЧ ИЦЗ в зависимости от размера наночастиц
Заключение к главе
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИЦЗ В РАЗЛИЧНОМ БИОЛОГИЧЕСКОМ ОКРУЖЕНИИ
4.1. Анализ накопления ИЦЗ в клетках in vitro
4.2. Исследование накопления флуоресцентных красителей БИК-диапазона на моделях трёхмерных сфероидов при помощи видеофлуоресцентной аппаратуры
4.3. Сравнительный анализ связывания НЧ ИЦЗ с гемоглобином и плазмой крови 104
4.4. Проведение экспериментальных работ по исследованию внутритканевого распределения флуоресцентных красителей ДК и БИК диапазонов в молекулярной и нано-форме методами
спектроскопического мониторинга 108
спектроскопического мониторинга
спектроскопического мониторинга. 108 4.5. Проведение экспериментальных работ по исследованию внутритканевого распределения флуоресцентных красителей ДК и БИК диапазонов в молекулярной и нано-форме при помощи видеофлуоресцентной системы. 115 4.6. Время жизни флуоресценции ИЦЗ в молекулярной и нано- формах на монослое клеточной модели опухоли <i>in vitro</i>
спектроскопического мониторинга. 108 4.5. Проведение экспериментальных работ по исследованию внутритканевого распределения флуоресцентных красителей ДК и БИК диапазонов в молекулярной и нано-форме при помощи видеофлуоресцентной системы. 115 4.6. Время жизни флуоресценции ИЦЗ в молекулярной и нано- формах на монослое клеточной модели опухоли <i>in vitro</i> 121 Заключение к главе. 126
<ul> <li>спектроскопического мониторинга. 108</li> <li>4.5. Проведение экспериментальных работ по исследованию внутритканевого распределения флуоресцентных красителей ДК и БИК диапазонов в молекулярной и нано-форме при помощи видеофлуоресцентной системы. 115</li> <li>4.6. Время жизни флуоресценции ИЦЗ в молекулярной и нано- формах на монослое клеточной модели опухоли <i>in vitro</i> 121</li> <li>Заключение к главе. 126</li> <li>ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИЦЗ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ И НАНО- ФОРМАХ НА БИОЛОГИЧЕСКИХ МОДЕЛЯХ</li></ul>

5.2. Измерению оптических характеристик ИЦЗ в молекулярной и нано-формах при пом	лощи
разработанной интраоперационной флуоресцентной видеосистемы.	131
5.3. Корреляционной анализ данных полученных с модельных образцов фантомов со спектроскопической системы и интраоперационной флуоресцентной видеосистемы	133
5.4. Применение разработанной флуоресцентной эндоскопической видеосистемы для диагностики и лечения злокачественных новообразований в клинических условиях	136
Заключение к главе	142
Заключение и выводы	143
Список цитируемой литературы	145

# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БИК ближний инфракрасный
- ДК дальний красный
- ФД флуоресцентная диагностика
- ФДТ фотодинамическая терапия
- ФС фотосенсибилизатор
- Себ хлорин еб
- ИЦЗ индоцианин зеленный
- ДМСО диметилсульфоскид
- НЧ ИЦЗ наночастицы индоцианина зеленого
- СЭМ сканирующая электронная микроскопия

## введение

#### Актуальность диссертационной работы

Одним из ключевых условий безрецидивности лечения опухолей головы и шеи является полнота удаления всех патологических тканей. При этом стоит отметить, что успешность дальнейшего прогноза для данных нозологий 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 опухолей различной локализации, основанные на применении флуоресцирующих В дальней красной (ДК) И ближней инфракрасных (БИК) областях фотосенсибилизаторов (ФС) и красителей для диагностики глубокозалегающих опухолей [1-4].

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, использующимися в онкологии [5, 6]. Одним из важных преимуществ является высокая скорость обработки информации. He широкий физиологических менее важен спектр И морфологических параметров, доступных для анализа методами оптической спектроскопии [6]. Метод флуоресцентной диагностики (ФД) основан на внедрении/накоплении контрастирующих маркеров (ФС и/или флуоресцентные красители) в пораженных участках с последующим воздействием на них излучением с длиной волны выбираемой исходя из ДВУХ критериев: максимального квантового выхода люминесценции и максимальной глубины проникновения излучения в глубь ткани. Некоторые фотосенсибилизаторы обладают способностью к избирательному накоплению В активно

пролиферирующих клетках. Обнаружение участков с повышенной интенсивностью флуоресценции, вызванной повышенной концентрацией фотосенсибилизатора и/или красителя, и есть суть метода ФД.

В процессе интраоперационной навигации 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 связана не только с ее технической частью. Необходимым условием для эффективной флуоресцентной навигации является также правильный выбор фотосенсибилизаторов и/или флуоресцентных красителей, основанный на ИХ спектральных свойствах. Важными характеристиками флуоресцентных красителей наряду со способностью накопления в тканях является спектральный диапазон, а также интенсивность оптического поглощения и эффективность возбуждения флуоресценции. Чем больше глубина проникновения света с длиной волны, соответствующей спектральному максимуму поглощения красителя в биологическую ткань, тем больше может быть глубина зондирования ткани. К сожалению, ФС, которые активно используют в клинике для ФД и фотодинамической терапии (ФДТ), маленькую глубину зондирования. Наибольшую глубину могут имеют обеспечить фотосенсибилизаторы и/или флуоресцентные красители с длиной волны спектрального максимума поглощения в 650-750 нм (ДК) и 750-1050 нм (БИК), где собственное поглощение и светорассеяние биологической ткани минимально.

В последнее время появились исследовательские работы [7-16] по применению для визуализации диапазона длин волн 1,3 - 1,4 мкм. Однако несмотря на улучшение качества изображения за счет уменьшения рассеяния, перспективность этого подхода ограничивается высокой ценой чувствительных

фотоприемных устройств, а также отсутствием фотосенсибилизаторов с высоким квантовым выходом люминесценции, значительным квантовым выходом генерации синглетного кислорода или образования свободных радикалов.

Применение соединений, флуоресценция которых возбуждается в БИК диапазоне, позволяет анализировать более глубокие слои биоткани, что очень важно при диагностике опухолей головы и шеи. В последние годы наряду с направленным поиском новых ФС и/или красителей с интенсивной полосой поглощения в ДК и БИК областях спектра [7-16] ведется разработка многофункциональных наноматериалов для ранней диагностики онкологических заболеваний. Особенно актуальными сейчас являются задачи разработки нанофотосенсибилизаторов и наноконтрастеров, характеризующихся высокой селективностью накопления в опухолевых клетках по сравнению с нормальными тканями. В последнее время появились работы на тему перспективности хирургической навигации фоточувствительных использования ДЛЯ нанокомпозитов БИК области на основе наноносителей красителя - индоцианина зеленого (ИЦЗ) [16, 17], который в молекулярной форме используется в клинической практике для ангиографии [18]. Для молекулярной формы ИЦЗ характерен короткий период полувыведения (3-4 мин). Использование наноразмерных структур позволяет значительно увеличить длительность циркуляции препарата и его селективность накопления в опухоли (тропность), что, соответственно, дает возможность повысить точность в определении границ опухоли [17]. В 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 перспективных клинической практики новых ДЛЯ соединений представляет большие сложности ввиду несоответствия моделей in vitro на монослойных клеточных культурах реальным опухолевым тканям. Существует подход, основанный на создании конгломератов клеток (сфероидов) в 3D-культуре [19], 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 [20, 21]. 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 по опухолевым клеткам и оптимизация клеточных моделей для исследования препарата являются необходимыми исследовательскими задачами для прогнозирования процессов, происходящих *in vivo*. Ввиду разницы во взаимодействии фотосенсибилизатора с различными типами клеток, возникают различные типы поверхностных взаимодействий, в том числе обусловленные зарядами структур. Сложность упаковки непосредственно агрегатов НЧ 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 в совокупности (экспериментальные животные), с целью выявления первопричины и источника трансформации спектральных свойств НЧ ИЦЗ.

Несмотря на существование измерительных комплексов и установок, созданных для решения подобного рода задач, рабочая область большинства из них ограничена спектральной областью до 700 нм. Интерес получения информации о состоянии биологической ткани представляет область спектра 700 - 900 нм (начало БИК диапазона). Поэтому актуальной задачей на сегодняшний день является разработка методик и оборудования скрининга новых субстанций, позволяющих оценивать в цифровом виде динамику изменения концентрации флуоресцентных красителей в ДК и БИК 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 БИК диапазона позволит добиться высокого разрешения определения границ опухоли и на ранних этапах обнаруживать и удалять опухоль хирургическим или фотодинамическим путем.

#### Цель и задачи исследований

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

 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 спектроскопическими головы И шеи методами с использованием фотосенсибилизаторов и флуоресцентных красителей в молекулярной и наноформах. Результаты, изложенные диссертационной работе, В имеют фундаментальное и прикладное значение и могут быть использованы для создания новых подходов и методов для диагностики опухолей головы и шеи:

- Впервые разработан и реализован новый подход к оценке локализации опухолевой ткани по накоплению H-агрегатов индоцианина зеленого в клетках патологической ткани.
- 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.
- 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.
- Впервые реализован метод трех-камерной эндоскопической системы для ФД и лечения опухолей головы и шеи.

## Практическая значимость.

- Разработанное технологическое получение J- и Н-агрегатов позволит создать новую лекарственную форму для ФД и лечения сложных злокачественных новообразований головы и шеи.
- Увеличение времени циркуляции Ј-агрегатов НЧ ИЦЗ в организме и их трансформацию в молекулярную форму позволяет повысить эффективность диагностики локализации опухоли головы и шеи.
- Применение разработанной установки для флуоресцентной интраоперационной диагностики при лечении порядка 30 пациентов показало благоприятное влияние на медиану выживаемости.

#### Положения, выносимые на защиту

- Методика оценки эффективности накопления ИЦЗ в молекулярной и наноформах на модели трехмерных опухолевых сфероидов позволяет проводить лазерно-спектроскопические и видео-флуоресцентные исследования in vitro, приближенной к реальной опухолевой ткани.
- Лазерно-флуоресцентная диагностика опухолевых клеток с использованием коллоидного раствора НЧ ИЦЗ позволяет определить границы опухоли.
- 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.

#### Степень достоверности 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.

## Апробация работы

Материалы диссертации были представлены в виде 16 докладов на международных и всероссийских конференциях, в том числе: VIII Всероссийская конференция "Фотодинамическая терапия и фотодиагностика"; International Conference on Laser Optics ICLO 2018, Saratov Fall Meeting 2018, "Fundamentals of Laser Assisted Micro– and Nanotechnologies" (FLAMN-19), "Современные проблемы физики и технологий", "Open Readings" и др.

Основные результаты диссертации опубликованы в виде 25 печатных работ в изданиях, входящих в перечень ВАК, из них 22 - в индексируемых в базе данных Scopus и 13 в базе данных Web of Science.

- <u>D. Farrakhova</u>, 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.
- <u>Farrakhova, D.</u>, 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.
- Yu.Maklygina, I.Romanishkin, A.Skobeltsin, <u>D.Farrakhova</u>, V.Loschenov. (2021) Phototherapy of brain tumours using a fibre optic neurosystem. Photonics 8(11), 462. DOI: 10.3390/photonics8110462. Q2 WoS, Q2 Scopus.
- Yu. Maklygina, I. Romanishkin, A. Skobeltsin, <u>D. Farrakhova</u>, 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.

- Yakovlev, D., Shiryaev, A., <u>Farrakhova, D.</u>, 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.
- <u>Farrakhova, D. S.</u>, Yakovlev, D. V., Maklygina, Y. S., Ryabova, A. V., Borodkin, A. V., Loschenov, M. V., Bezdetnaya, L., Plyutinskay, 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.
- Yu.Maklygina, I.Romanishkin, D.Yakovlev, A.Plyutinskaya, 7. D.Farrakhova, V.Loschenov. (2021) Fluorescence L.Bezdetnaya, 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.
- A. Sharova, <u>D. Farrakhova</u>, 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.
- Yakovlev, D. V., <u>Farrakhova, D. S.</u>, 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.<u>Farrakhova D.S.</u>, Yakavets I.V., Loschenov V.B., Bolotine 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.
- Makarov, V. I., Akhlyustina, E. V., <u>Farrakhova, D. S.</u>, 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.<u>D.S. Farrakhova</u>, I.D. Romanishkin, D.V. Yakovlev, Yu.S. Maklygina, T.A.Savelieva, L. Bezdetnaya, 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, <u>D.S. Farrakhova</u>, 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., <u>Farrakhova, D. S.</u>, 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., Semenkov A.V., Shiryaev A.A., Nekrasova T.P., Grachev P.V., <u>Farrakhova D.S.</u>, 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.<u>D S Farrakhova</u>, 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, <u>D.S. Farrakhova</u>, 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.Skobeltsin, A., <u>Farrakhova, D.</u>, Maklygina, Y., Romanishkin, I., Ryabova, A., Yakovets, I., Millard, M., Bolotine, L., Plyutinskay, 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.
- 19.<u>Farrakhova, D.S.</u>, Yakavets, I.V., Loschenov, V.B., Bolotine, L.N., Zorin, V.P., Comparitive 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, c. 589. DOI: 10.1109/LO.2018.8435633. Q4 Scopus.
- 20.<u>D.Farrakhova</u>, Y.Maklygina, I.Romanishkin, A.Ryabova, I.Yakavets, M.Millard, L.Bolotine, 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: <u>10.1117/12.2523465</u>
- 21.<u>Farrakhova, D. S.</u>, 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.

- 22. Zolotareva J.O., <u>Farrakhova D.S.</u>, 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
- 23. <u>Farrakhova D.S.</u>, 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.
- 24. 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.
- 25. 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.

## Доклады:

 Farrakhova D.S., Maklygina Yu.S., Yakovlev D.V., Efendiev K.T., Borodkin A.V., Loschenov M.V., Bezdetnaya L., Plyutinskaya A.D., Karmakova T.A., Pankratov A.A., Loschenov V.B. The investigation of the photodynamic efficiency of chlorine e6 on a model of multicellular tumor spheroids using the developed video fluorescent equipment. // 19th International Conference Laser Optics (ICLO 2020), Saint-Petersburg, Russia, 2020.

- <u>Farrakhova D.S.</u>, Makarov V.I., Loschenov V.B. Portable spectrometer for fast assessment of skin engraftment via exogenous and endogenous fluorophores. SPIE Optical System Design. Frankfurt am Main, Germany, 2018.
- <u>Farrakhova D.S.</u>, Maklygina Yu.S., Yakovlev D.V., Grachev P.V., Ryabova A.V., Bolotine L., Plyutinskaya A.D., Karmakova T.A., Pankratov A.A., Loschenov V.B., The distribution research of indocyanine green in molecular and nanoform on the tumor model via video system. 2020 International Conference Laser Optics (ICLO), Saint-Petersburg, 2020.
- <u>Farrakhova D.S.</u>, Yakavets I.V., Loschenov V.B., Bolotine L.N., Zorin V.P., Comparitive accumulation study of chlorin group photosensitizers on monolayer and multicellular tumor spheroids of cell culture // 18th International Conference on Laser Optics ICLO 2018, Saint-Petersburg, Russia, pp. 589-590, 2018. DOI: 10.1109/LO.2018.8435633.
- <u>Dina Farrakhova</u>, Yulia Maklygina, Alexander Borodkin, Lina Bolotine, Anna Plyutinskaya, Tatyana Karmakova, Andrey Pankratov, Victor Loschenov. Video system approbation with zoom on multicellular tumor spheroids model. "Fundamentals of Laser Assisted Micro– and Nanotechnologies" (FLAMN-19), Saint-Petersburg, 2019.
- <u>Farrakhova D.S.</u>, Maklygina Yu.S., Romanishkin I.D., Ryabova A.V., Yakavets I.V., Millard M., Bolotine L., Loschenov V.B., Investigation of Ce6 accumulation and distribution in cell cultures of head and neck cancers. // Saratov Fall Meeting 2018, Saratov, Russia, 2018.
- <u>Farrakhova D.S.</u>, Yakavets I.V., Loschenov V.B., Bolotine L.N., Zorin V.P., Distribution of Chlorin Photosensitizers in Monolayers and Spheroid Cells Cultures. // 60th International Conference for Students of Physics and Natural Science "Open Readings", p.358, Vilnius, Lithuania, 2017.
- 8. <u>Farrakhova D.S.</u>, Yakavets I.V., Loschenov V.B., Bolotine L.N., Zorin V.P. Investigation of chlorin photosensitizers distribution in monolayer and spheroid cell

cultures. // 3rd Winter International School topic-2017: "Photodynamic Therapy in The Endomatology, Dermatology and Cosmetology", Moscow, Russia, 2017.

- <u>Farrakhova, D. S.</u>, Maklygina, Y. S., Romanishkin, I. D., Ryabova, A. V., Bolotine, L., Plyutinskaya, A. D., Loschenov, V. B. The study of ICG distribution in models of head and neck cancer in vitro. Современные проблемы физики и технологий. Москва, Россия, 2019.
- 10.<u>Д.С.Фаррахова</u>, Ю.С.Маклыгина, И.Д.Романишкин, Л.Болотин, В.Б.Лощенов. Динамика межклеточного распределения различных форм красителя индоцианина зеленого на опухолевых моделях *in vivo*. Физиканаукам о жизни, Санкт-Петербург, 2019.
- 11.<u>Farrakhova D.S.</u>, Maklygina Yu.S., Romanishkin I.D., Ryabova A.V., Yakovlev D.V., Bezdetnaya L., Loschenov V.B. Studies of the fluorescence kinetics of indocyanine green in nanoscale structures depending on the bioenvironment in vivo. The XXV Saratov fall meeting conference. Саратов, 2021.
- 12. <u>Farrakhova D.S.</u>, Akhlyustina E.V, Makarov V.I., Pominova D.V., Ryabova A.V. The study of aluminum phthalocyanine nanoparticle fluorescent properties changes in tissue engraftment for the small laboratory animal cross skin transplantation. The International Conference on Coherent and Nonlinear Optics/ International Conference on Lasers, Applications and Technologies 2016. Minsk, Belarus, 2016.
- 13.<u>Farrakhova D.S.</u>, Makarov V.I., Loschenov V.B. The Engraftment Dynamics Evaluation Of Skin Grafts Via Light-Sensitive Nanoparticles And Spectroscopic Methods. The IV International Conference on Laser&Plasma researches and technologies – LaPlas-2018. Moscow, Russia, 2018.
- 14.<u>Farrakhova D.S.</u>, Kuznetsova J.O., Loschenov V.B. Diagnosis of Early Tooth Caries with the Use of Aluminum Phthalocyanine Nanoparticles by Laser-Induced Fluorescence. V International Conference on Photonics and Information Optics. Moscow, Russia, 2016.

- 15.<u>Farrakhova D.S.</u>, Makarov V.I., Loschenov V.B. Evaluation of Healing Skin Grafts with Using Aluminum Phthalocyanine Nanoparticles and Indocyanine Green by Laser Spectroscopic Methods. VI International Conference on Photonics and Information Optics. Moscow, Russia, 2017.
- 16.<u>Farrakhova D.S.</u>, Makarov V.I., Grachev P.V., Ryabova A.V., Loschenov V.B. The Evaluation of Blood Flow Condition and Lymph State with Using Aluminum Phthalocyanine Nanoparticles and Indocyanine Green by Video – Fluorescent Method. The 2st International Symposium on "Physics, Engineering and Technologies for Bio – Medicine". Moscow, Russia, 2017.
- 17. Farrakhova D.S., Maklygina Yu.S., Yakovlev D.V., Grachev P.V., Ryabova A.V., Bolotine L., Plyutinskaya A.D., Karmakova T.A., Pankratov A.A., Loschenov V.B. The distribution research of indocyanine green in molecular and nanoform on the tumor model via video system. // IX Международный конгресс «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика», Москва, Россия, 2020.
- 18.Maklygina Yu. S., <u>Farrakhova D. S.</u>, Grachev P. V., Ryabova A. V., Bezdetnaya L., Plyutinskaya A. D., Karmakova T. A., Pankratov A. A., Loschenov V. B. Investigation of the intratissue accumulation of photosensitizer in the molecular and the nanoform on the hybrid immunodeficiency bg/bgj nude-mice by spectroscopic methods. // IX Международный конгресс «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика», Москва, Россия, 2020.
- 19.<u>Farrakhova D.S.</u>, Loschenov M.V., Maklygina Yu.S., Borodkin A.V., Ryabova A.V., Bolotine L., Plyutinskaya A.D., Karmakova T.A., Pankratov A.A., Loschenov V.B. The video system approbation with the magnification on the multicellular tumor spheroid models with using aluminum phthalocyanine in the molecular and nanoform. VIII Всероссийский конгресс с международным участием ФДТ и ФД. Моска, 2019.
- 20.<u>Farrakhova D.S.</u>, Borodkin A.V., Efendiev K.T., Yakovlev D.V., Maklygina Yu.S., Bolotine L., Loschenov M.V., Shiryaev A.A., Reshetov I.V., Loschenov V.B

Fluorescent diagnostic of ENT organs via the video system in a real-time regime and a chlorine E6 photosensitizer. VIII Всероссийский конгресс с международным участием ФДТ и ФД. Моска, 2019.

- 21.<u>Farrakhova D.S.</u>, Maklygina Yu. S., Yakovlev D.V., Grachev P.V., Ryabova A.V., Bolotine L., Plyutinskaya A. D., Karmakova T. A., Pankratov A. A., Loschenov V. B., The distribution research of indocyanine green in molecular and nanoform on the tumor model via video system. IX МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС «ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ И ФОТОДИАГНОСТИКА», Москва, 2020.
- 22.Maklygina Yu. S., <u>Farrakhova D.S.</u>, Grachev P.V., Ryabova A.V., Bezdetnaya L., Plyutinskaya A. D., Karmakova T. A., Pankratov A. A., Loschenov V. B., Investigation of the intratissue accumulation of photosensitizer in the molecular and the nanoform on the hybrid immunodeficiency bg/bgj nude-mice by spectroscopic methods. IX Международный Конгресс «Фотодинамическая Терапия И Фотодиагностика», Москва, 2020.
- 23. Фаррахова Д.С., Маклыгина Ю.С., Грачев П.В., Романишкин И.Д., Яковлев Д.В., Рябова А.В., Лощенов В.Б., Сравнительный анализ распределения индоцианина зеленого в молекулярной и нано-форме с целью увеличения времени его циркуляции в опухоли и в ее макроокружении для флуоресцентного имаджинга. Молодежная школа-конференция «Наноструктуры. Свойства и применения. Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 2021.
- 24. <u>Фаррахова Д.С.</u>, Маклыгина Ю.С., Грачев П.В., Романишкин И.Д., Рябова А.В., Яковлев Д.В., Плютинская А.Д., Кармакова Т.А., Панкратов А.А., Лощенов В.Б., Исследование внутритканевого распределения индоцианина зеленого в молекулярной и нано-форме спектроскопическими методами. Х Международный Конгресс "Фотодинамическая Терапия И Фотодиагностика", Москва, 2021.

- 25.<u>Д.С. Фаррахова</u>, И.Д. Романишкин, Ю.С. Маклыгина, Д.В. Яковлев, А.В.Рябова, В.Б. Лощено, Исследование времени жизни флуоресценции индоцианина зеленого в молекулярной и нано- формах на модели опухоли головного мозга in vitro. Физика-наукам о жизни, Санкт-Петербург, 2021.
- 26. <u>Фаррахова Д.С.</u>, Ширяев А.А., Яковлев Д.В., Маклыгина Ю.С., Решетов И.В., Лощенов В.Б., Применение Флуоресцентной Эндоскопической Видеосистемы Для Диагностики И Лечения Злокачественных Новообразований Органов Головы И Шеи, Пермь, 2021.
- 27.<u>Фаррахова Д.С.</u>, Макаров В.И., Лощенов В.Б. Применение Фотодинамической Терапии Для Более Эффективного Приживления Кожных Трансплататов При Перекрестной Трансплантации Мелких Лабораторных Животных. Современные проблемы физики и технологий. Россия, Москва, 2018.

## Патенты:

- 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.
- 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.

## Гранты

Работа поддержана:

1. Минобрнауки RFMEFI61618X0096. Свето-индуцированная

нанотераностика опухолей головы и шеи. Совместно с иностранным партнёром, Centre de Recherche en Automatique de Nancy Université de Lorraine - CRAN (Исследовательский центр автоматики Университета Лотарингии), Нанси, Франция. 2018-2020.

2. Российский Фонл Фундаментальных Исследований 21-52-15025 НЦНИ а зеленый нано-форме ИК-Индоцианин В фотосенсибилизатор для исследования иммунного профиля опухолей мозга. Совместно с иностранным партнёром, Centre de Recherche en Automatique de Nancy Université de Lorraine - CRAN (Исследовательский центр автоматики Университета Лотарингии), Нанси, Франция. 2021-2022.

#### Благодарности

Автор благодарит своего научного руководителя проф. Лощенова Виктора Борисовича за неоценимую помощь на всех этапах работы над диссертацией, за чуткое руководство и возможность выполнения работы в лаборатории. Автор благодарит проф. Бездетную Лину за предоставление методики выращивания трехмерных клеточных структур. Автор выражает благодарность всем сотрудникам лаборатории Лазерной Биоспектроскопии за полезные дискуссии и дружескую поддержку. Особая благодарность Анастасии Рябовой, Дарье Поминовой, Юлии Маклыгиной и Екатерине Ахлюстиной за профессиональные советы и помощь в реализации исследований на биологических структурах, Татьяне Савельевой за помощь в моделировании математической модели, Игорю Романишкину, Дмитрию Яковлеву и Павлу Грачеву за помощь в получении результатов, Александру Бородкину за помощь в решении инженерных вопросов.

## Структура и объем диссертации

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

# ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной главе приведен обзор литературы, посвящённый спектроскопическим свойствам индоцианина зеленого при переходе от формы агрегированной. Особое внимание молекулярной к уделено спектроскопическим свойствам биологической ткани при взаимодействии с излучением. Изложены основные принципы флуоресцентной лазерным диагностики и фотодинамической терапии злокачественных новообразований.

#### 1.1. Спектроскопические свойства индоцианина зеленого

Флуоресцентный краситель ИЦЗ является единственным препаратом с максимумом поглощения в БИК диапазоне, разрешенным к клиническому применению в большинстве стран мира [22]. Водный раствор ИЦЗ состоит из мономеров и димеров Н-типа, соответствующей «сэндвич» структуре, с двумя пиками поглощения при 780 нм и 715 нм соответственно, но ИЦЗ с высокой концентрацией (1.5 мМ) способен образовывать J-агрегаты при температуре 65°С в течение 20 ч [23-25]. Кроме того, агрегаты ИЦЗ J-типа имеют пик поглощения в БИК диапазоне, в биологическом окне прозрачности, где коэффициенты поглощения и рассеяния компонент кожи минимальны [26], что перспективно для флуоресцентной диагностики [22, 27]. Впервые J-агрегаты красителей были открыты в 30-е годы, независимо, учеными Jelley E. [28] и Scheibe G. [29]. Благодаря своим спектроскопическим свойствам J-агрегаты активно используют в экспериментальных исследованиях [24].

Обычно, формирование J-агрегатов соответствует нековалентной  $\pi$ - $\pi$  укладке и гидрофобным взаимодействиям молекул. В этом случае переходные дипольные моменты отдельных молекул практически выровнены параллельно линии, соединяющей их центры через расположение "голова к хвосту" (рис.1б) [24].



Рисунок 1. а) Спектры поглощения ИЦЗ, б) схематическая иллюстрация образования структур J-агрегатов.

Спектроскопические особенности, свойственные Ј-агрегатам, проявляются при укладке "голова к хвосту" минимум для 4 молекул ИЦЗ [29]. Обширные исследования J- и H-агрегатов привели к предположению, что эти агрегаты существуют в виде одномерной сборки в решении, которое может быть выполнено в виде лестницы или кирпичной кладки (рис.16). В этой конфигурации, основываясь на модели экситона Френкеля, Ј-агрегаты ИЦЗ демонстрируют свойства молекулярного ансамбля, действующего как единое целое с сильно увеличенным дипольным моментом. Таким образом происходит образование экситонной связи между отдельными молекулами, входящие в состав агрегата [30]. В свою очередь Н-агрегаты принимают геометрию, в которой отдельные хромофоры и их переходные диполи расположены штабелированным (сэндвич-подобным) образом [31-34]. При образовании наноструктуры из нескольких молекул ИЦЗ, вдоль одной оси преобладающая связь агрегата будет отрицательной (J-образной), в то время как связь вдоль другой оси, в проекции осей YZ, может быть положительной (H-образной) [23, 35] (рис.16). Авторами Hans v. Berlepsch и Christoph Bottcher [36] была морфология Ј-агрегатов ИЦЗ, образованная обнаружена нитевидная

мономолекулярными слоями молекул, длинные оси которых лежат параллельно плоскости слоя.



Рисунок 2. Схематическая иллюстрация экситонной модели для вариаций энергии на электронных переходах.

На рисунке 2 изображены энергетические уровни, соответствующие разной форме ИЦЗ. В агрегатах Ј-и Н-типов ИЦЗ возбужденное состояние расщепляется на два невырожденных состояния из-за экситонной связи между молекулами. 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 Jтипа, которое соответствует сонаправленно 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 который соответствует красному спектральному состояния, сдвигу.

Образованные молекулами Н-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 Н-агрегатов допускаются переходы только на верхний энергетический уровень возбужденного состояния, что синему спектральному сдвигу. При наличии приводит К липолей с противоположными ориентациями, электронный переход запрещен и не может быть спектрально наблюдаем [24]. Основываясь на экситонной модели Френкеля, резонансное возбуждение переносит энергию составляющими между 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.



Рисунок 3. Агрегат типа кирпичной кладки, представленный протяженными диполями, осциллирующих в фазе.

Экситон Френкеля является квазичастицей, проявляющейся при квантовомеханическом излучении коллективных молекул. Модель Френкеля хорошо демонстрирует экситоны в цианиновых красителях. Для этого рассмотрим волновую функцию основного (ground) состояния агрегата, состоящего из двух молекул:

$$\Psi_G = \psi_1 \psi_2 \tag{1}$$

где  $\psi_1$  и  $\psi_2$  являются волновыми функциями молекул.

Гамильтониан представляется как:

$$H = H_1 + H_2 + V \tag{2}$$

где *H*<sub>1</sub> и *H*<sub>2</sub> – гамильтонианы молекул, а *V* – оператор межмолекулярного взаимодействия.

Энергия димера в основном состояния выражается как:

$$E_G = \int \Psi_G H \Psi_G d\boldsymbol{r} = \varepsilon_1 + \varepsilon_2 + \iint \psi_1 \psi_2 V \psi_1 \psi_2 d\boldsymbol{r}_1 d\boldsymbol{r}_2$$
(3)

где  $\varepsilon_1 = \varepsilon_2 = \varepsilon$  - энергия молекул основного состояния, с учетом, что молекулы одинаковые.

Волновые функции возбужденного состояния димера выражаются как:

$$\Psi' = \frac{1}{\sqrt{2}}(\varphi_1 + \varphi_2) \tag{4}$$

$$\Psi'' = \frac{1}{\sqrt{2}} (\varphi'_1 + \varphi'_2)$$
(5)

Энергии молекул димера возбужденного состояния выражаются как:

$$E' - E_G = (\varepsilon^+ - \varepsilon) + D + E \tag{6}$$

$$E'' - E_G = (\varepsilon^+ - \varepsilon) + D - E \tag{7}$$

где:

$$D = \iint \psi_1^{+} \psi_2 V \psi_1^{+} \psi_2 dr_1 dr_2 - \iint \psi_1 \psi_2 V \psi_1 \psi_2 dr_1 dr_2$$
(8)

представляет собой изменение энергии между молекулами димера при возбуждении одной из них. Такое изменение энергии демонстрирует сдвиг электронного терма возбужденного состояния относительно терма основного состояния (экситонный сдвиг).

Энергия взаимодействия при передачт энергии возбуждения от одной молекулы к другой выражается как:

$$E = \iint \psi_1^{\dagger} \psi_2 V \psi_1^{\dagger} \psi_2 d\boldsymbol{r}_1 d\boldsymbol{r}_2$$
<sup>(9)</sup>

и определяет расщепление электронного терма возбужденного состояния.

Так как молекулы в димере предполагаются нейтральными, в первом приближении оператор *V* определяется диполь-дипольным взаимодействием между молекулами. Поэтому:

$$E = \frac{M_1 M_2}{R^3} - \frac{3(M_1 R) (M_2 R)}{R^5}$$
(10)

где:

$$\boldsymbol{M}_{1,2} = \int \psi_{1,2}^{+} \, \widehat{M}_{1,2} \psi_{1,2} d\boldsymbol{r}_{1,2} \tag{11}$$

представляет дипольный момент перехода одной из молекул диполя из основного состояния в низшее возбужденное состояние, а радиус-вектор *i*-го электрона в молекуле выражается:

$$\widehat{\boldsymbol{M}}_{1,2} = \sum_{i} e \boldsymbol{r}_{1,2}^{i} , \boldsymbol{r}_{1,2}^{i}$$
(12)

где R – расстояние между центрами масс молекул димера.

Если конфигурация молекул в димере отвечает H-типу или «сэндвич», и волновая функция возбужденного состояния молекулы  $\psi$  отвечает низкому уровню энергии возбуждения, тогда:

$$\boldsymbol{M}_2 = -\boldsymbol{M}_1 \tag{13}$$

$$\boldsymbol{M}' = \int \boldsymbol{\psi}'(\,\boldsymbol{\hat{M}}_1 + \boldsymbol{\hat{M}}_2) \boldsymbol{\psi}_G d\boldsymbol{r} = 0 \tag{14}$$

$$\boldsymbol{M}^{\prime\prime} = \int \boldsymbol{\psi}^{\prime\prime} (\, \boldsymbol{\hat{M}}_1 + \boldsymbol{\hat{M}}_2) \boldsymbol{\psi}_G d\boldsymbol{r} = \sqrt{2} \boldsymbol{M}_1 \tag{15}$$

из чего следует сдвиг спектра в коротковолновый диапазон относительно мономера, так как переход димера из основного состояния запрещен, а переход в верхнее состояние разрешен.

Выразим квадрат матричного элемента дипольного момента перехода через силу осциллятора f соответствующего перехода и циклическую частоту  $\Omega$ :

$$|\boldsymbol{M}_1|^2 = \frac{e^2 \hbar f}{2m_e \Omega} \tag{16}$$

откуда следует, что сила осциллятора для перехода димера в нижнее экситонное состояние равна нулю, а сила осциллятора для перехода в верхнее состояние равна удвоенной силе осциллятора для мономера:

$$f_d' = 0 \tag{17}$$

$$f_d^{\prime\prime} = 2f_m \tag{18}$$

$$E = -\frac{M^2}{R^3} \tag{19}$$

Величина экситонного расщепления:

$$\Delta E = |E'' - E'| \tag{20}$$

$$\Delta E = 2\frac{M^2}{R^3} \tag{21}$$

Величина экситонного расщепления равна удвоенной абсолютной величине *E*.

При расположении дипольных моментов линейно, экситонное расщепление равно:

$$E = 2\frac{M^2}{R^3} \tag{22}$$

Такое расположение молекул отвечает более высокому уровню энергии возбуждения, что приводит к запрету для перехода на верхнее возбужденное состояние и разрешению перехода на нижнее состояние. При этом силы осцилляторов соответствующих переходов равны:

$$f'_d = 2f_m \tag{23}$$

$$f_d^{\prime\prime} = 0 \tag{24}$$

$$\Delta E = 4 \frac{M^2}{R^3} \tag{25}$$

По полученным формулам величина экситонного расщепления в два раза больше, чем в случае параллельного расположения дипольных моментов перехода молекул.

# 1.2. Оптические свойства биологических тканей. Особенности распространения лазерного излучения в тканях

Развитие оптических методов в области диагностики, терапии и хирургии стимулировало изучение оптических свойств различных биологических тканей, так как эффективность лазерного воздействия зависит от распространения фотонов в тканях. Все молекулы могут поглощать падающий свет, исходя из своей электронной структуры. Спектры биомолекул из-за сложной электронной структуры не проанализированы детально. Многие биологические молекулы, содержащие двойные сопряженные связи, поглощают в ближнем УФ- и видимом спектральных диапазонах. Увеличение количества сопряженных двойных связей в молекуле, приводит к увеличению длины волны максимума поглощения данного вещества.

Кожа и слизистые являются наиболее важными тканями для ФДТ опухолей головы и шеи. Разработка новых оптических методов, применяемых в различных

областях медицины для изучения проницаемости клеточных мембран и фотодинамической деструкции клеток и тканей, а также для разработки новых необходимость ФДT, определяет измерения подходов В оптических характеристик клеточных структур и биологических тканей [37, 38], что играет ключевую роль в построении математических моделей, адекватно описывающих световое движение в этих средах. Кроме того, изучение оптических характеристик слизистой оболочки в широком спектральном диапазоне позволяет исследователям расширить возможности разработки новых И оптимизации существующих методов для ФДТ данного заболевания [39]. Знание оптических свойств подкожно-жировой клетчатки также важно, так как оптические свойства этого слоя ткани определяют распределение света в облучаемой коже в процессе фотодинамического лечения.

Кожа представляет собой сложную гетерогенную среду, в которой содержание крови и эндогенных флуорофоров распределено пространственно и изменчиво по глубине [40-43]. Кожа состоит из трех основных слоев: эпидермиса (толщиной 100 мкм, бескровный слой), дермы (толщиной 1-4 MM, васкуляризованный слой) и подкожно-жировой клетчатки (толщиной от 1 до 6 мм, в зависимости от участка тела). Обычно оптические свойства слоев характеризуются коэффициентами поглощения и рассеяния, равным среднему числу событий поглощения и рассеяния на единицу длины пути прохождения фотона в ткани, и коэффициентом анизотропии, представляющим собой средний косинус углов рассеяния. Случайное неоднородное распределение крови и различных хромофоров и пигментов в коже приводит к изменению средних оптических свойств слоев кожи. Тем не менее, можно определить области в коже, где градиент структуры клеток кожи, хромофоров или количества крови изменяется с глубиной, минимальны [40]. Это позволяет разделить эти слои на подслои, в которых учитывается физиологическая природа, физические и оптические свойства их клеток и содержание пигментов.

Слизистая ткань покрыта псевдостратифицированным эпителием, который состоит из реснитчатых, столбчатых, а также коротких и длинных вставленных эпителиальных клеток. Мембрана, называемая основной мембраной, разделяет эпителиальный и собственно слизистый слои. Эта мембрана состоит из ретикулярных волокон, расположенных в интерстициальной однородной среде, и не является образованием постоянной толщины. Следует также отметить, что структурно-морфологические свойства слизистых оболочек различных внутренних органов, представляющих собой стратифицированный эпителий, достаточно схожи между собой [39]. При гиперплазии слизистой оболочки базальная мембрана значительно утолщается [44].

Слой слизистой оболочки органов головы и шеи похож по структуре на соединительную ткань, состоящую из коллагеновых и эластичных волокон. оболочки содержит белки Интерстициальная жидкость слизистой И полисахариды и близка по составу к интерстициальной жидкости большинства соединительных тканей. Более того, слой слизистой оболочки состоит из трех подслоев. Субэпителиальный (или лимфоидный) подслой содержит большое количество лейкоцитов. В промежуточном подслое соответствующего слоя содержатся тубулоальвеолярные железы. В глубоком подслое соответствующего слоя располагаются венозные сплетения, которые состоят из поверхностной сети более мелких сосудов и более глубокой сети более крупных сосудов. В норме общая толщина слизистой оболочки колеблется от 0,1 до 0,5 мм [45, 46]. При наличии патологии (синусит, ринит или другие ринологические заболевания) толщина слизистой оболочки значительно увеличивается и может достигать 2-3 мм [45]. Следует отметить, что собственно слой слизистой оболочки является защищающим основным слоем, ОТ микроорганизмов, вызывающих инфекционные заболевания [46]. Оптические свойства слизистых оболочек носа и придаточных пазух носа в основном определяются оптическими свойствами
соответствующего слоя, так как этот слой значительно толще эпителиального слоя.

Одновременно с оптическими свойствами хромофоров, большую роль играет показатель преломления структурного элемента, который отличается от показателя преломления среды, в которой он находится, что приводит к рассеянию света. В коже и слизистой оболочке содержатся липиды, белки или ДНК с отличающимся показателем преломления от межклеточной и внутриклеточной жидкости. Гладстон и Дейл предложили формулу, описывающую связь показателя преломления и плотности вещества раствора [47]:

$$(n-1)/d = K$$
 (26)

где *п* — показатель преломления, *d* — плотность, а *K* — удельная преломляющая способность. В основном для биологических структур коэффициент пропорциональности в эмпирической формуле равен 0.185 мл/г. Согласно литературным данным показатель преломления протеинов составляет 1.58 [48], для липидов 1.46-1.48 [49], для нуклеиновых кислот 1.497-1.534 [50].

Важными характеристиками контрастеров наряду со способностью накопления в тканях является спектральный диапазон и интенсивность оптического поглощения и флуоресценции. Чем больше глубина проникновения в биологическую ткань света с длиной волны, соответствующей спектральному максимуму поглощения контрастера в ткани, тем больше может быть глубина зондирования ткани (рис.4).



Рисунок 4. Зависимость проникновения света в кожу от длины волны.

Наибольшую глубину могут обеспечить ФС и/или флуоресцентные красители с длиной волны спектрального максимума поглощения в ДК (650-750 нм) и БИК диапазонах (750-1050 нм), где собственное поглощение и светорассеяние биологической ткани минимально (рис.5).



Рисунок 5. Оптическое окно прозрачности биологической ткани.

### 1.3. Метод фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики

В литературе отмечается большая перспективность методов оптической спектроскопии для анализа состояния и функций биологических тканей, которые обладают преимуществами значительными перед другими методами. использующиеся в онкологии [51, 52]. Одним из важных преимуществ является высокая скорость обработки информации. Не менее важен и широкий спектр физиологических и морфологических параметров, доступных для анализа методами оптической спектроскопии [52]. Метод флуоресцентной диагностики основан на сенсибилизации 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 обладают способностью к избирательному накоплению в активно пролиферирующих клетках. Обнаружение участков с повышенной интенсивностью флуоресценции, вызванной повышенной концентрацией ФС и/или красителя, является основой метода флуоресцентной диагностики (ФД).

В свою очередь биомедицинская оптика - междисциплинарная область на стыке оптики, биофизики, медицины, биологии, химии и информатики, позволяет путем анализа взаимодействия света с биологическими тканями с помощью методов и реализующих их устройств с высокой точностью проводить диагностику и терапию в интересующей области. В последние годы в хирургическом сообществе заметно вырос интерес к внедрению в хирургическую практику инструментов и принципов биомедицинской оптики, что в значительной степени обусловлено успехом методов флуоресцентной навигации в хирургии опухолей различной локализации, в частности ЛОР-органов. Многочисленные дополнительные оптические технологии были реализованы клинически, такие как спектроскопия и визуализация диффузного отражения,

когерентная томография, спектроскопия оптическая микроскопия И комбинационного рассеяния, а также усовершенствованные количественные методы, такие как количественная флуоресцентная визуализация. Однако несмотря на значительный прогресс в этой области существует целый спектр нерешенных технических проблем, которые, в процессе интраоперационной навигации опухолей препятствуют эффективной визуализации и получению своевременной полной информации для принятия врачебных решений, а именно: глубина ограниченная зондирования биотканей, кровотечения, низкое пространственное разрешение и неспецифичность конструкции приборов для данной нозологии. Тем не менее проблема визуализации в режиме реального времени не ограничивается технической ее частью, необходимым условием для эффективной флуоресцентной навигации также является правильный выбор ФС и/или флуоресцентных красителей, произведенный на основе их спектральных свойств. Главными преимуществами метода ФД является неинвазивность и вывод результатов в режиме реального времени, что позволяет проводить диагностику раковых заболеваний интраоперационно. Доставка и регистрация света к исследуемой ткани внешних и внутренних органов происходит при помощи оптических волокон и эндоскопических насадок, позволяя обходить сложную анатомическую структуру пациента. Информация получается от эндогенных и экзогенных флуорофоров, флуоресценция которых возбуждена определенной длиной волны, соответствующей пику поглощения [12]. Флуорофоры имеют свои спектральные свойства, что обеспечивает их идентификацию в сложных биологических структурах. Чувствительность метода к изменениям физических свойств тканей человека позволяет на ранних стадиях выявить появление опухолевых клеток [14, 15]. Информация об изменении состава тканей определяется по спектрам флуоресценции обратного диффузного рассеяния: так как эндогенные и экзогенные флуорофоры имеют свои пики поглощения [13].

Распространение света в биологической ткани как в поглощающей среде описывается законом об ослаблении монохроматического пучка Бугера-Ламберта – Бера:

$$I_{\tau}(\lambda) = I_{\rho}(\lambda) \times exp(-\mu_{a}d)$$
<sup>(27)</sup>

где  $I_0$  — интенсивность входящего пучка, проходящего через среду, d — толщина слоя вещества, через которое проходит свет,  $\mu_a$  — коэффициент поглощения, равный вероятности поглощения на единицу длины, являющейся суммой вкладов всех хромофоров биологической среды:

$$\mu_{a}(\lambda) = \sum_{i} \varepsilon_{i} (\lambda) [C_{i}]$$
<sup>(28)</sup>

где  $\varepsilon_i$  и  $C_i$  — коэффициент экстинкции и концентрация *i*-го хромофора биологической среды. Поглощение является следствием частичного перехода световой энергии в тепловое движение или колебательную энергию поглощающих молекул в мутных средах. При поглощении света молекулами световой поток ослабляется и интенсивность света уменьшается по формуле:

$$T = \frac{I}{I_0} \tag{29}$$

$$1 - T = \frac{I_0 - I}{I_0}$$
(30)

где *Т* – коэффициент пропускания.

Флуоресценцией является излучательный переход, молекулы из состояния  $S_1$  в  $S_0$ . (рис.6). Полная энергия молекулы является сумма из электронной, колебательной и вращательной составляющих. Молекулы имеют как заполненные, так и свободные электронные орбитали. При поглощении кванта света происходит переход электрона на незаполненную орбиталь с большей

энергией, что приводит к переходу молекулы на более высокий энергетический уровень (молекула в возбужденном состоянии), при этом увеличивается и электронная и колебательная составляющая общей энергии молекулы (рис.б).



Рисунок 6. Диаграмма Яблонского.

Число фотонов, испущенных за единицу времени в единице объема, является интенсивностью флуоресценции и определяется как интенсивность в момент времени *t* после воздействия непрерывным излучением все еще возбужденных молекул:

$$i_F = \alpha I_0 \frac{k^F}{k^F - k_{nr}^F} = \alpha I_0 \Phi_F \tag{31}$$

(32)

$$\Phi_F = \frac{k^F}{k^F + k_{nr}^F} = k^F \tau_F$$

где  $\alpha I_0$  отражает количество поглощенных фотонов в единице объема за единицу времени,  $I_0$  – интенсивность возбуждающего света,  $k^F$  – константа скорости излучательной дезактивации  $S_1 \rightarrow S_0$ , сопровождающейся флуоресценцией,  $\Phi_F$  -

квантовый выход флуоресценции, определяющийся как отношение числа испущенных фотонов к числу поглощенных фотонов.

Флуоресценция имеет следующие физические характеристики: положение перехода 0-0 (имеющий одну и ту же энергию и в поглощении, и в испускании) одинаково для спектров поглощения и флуоресценции, но спектр флуоресценции сдвинут в длинноволновую область относительно спектра поглощения на величину стоксового сдвига по закону Стокса-Ломмеля. Спектр флуоресценции повторяет спектр поглощения из-за схожести различия между колебательными уровнями основного и возбужденного состояний сходны по правилу зеркальной симметрии Левшина (рис.7).



Рисунок 7. Спектры поглощения и флуоресценции органической молекулы.

Спектр флуоресценции отражает распределение вероятности переходов из нижнего колебательного уровня возбужденного состояния на различные колебательные уровни основного состояния  $S_0$  и представляет собой зависимость интенсивности излучения от длины волны ( $F_{\lambda}$  ( $\lambda_F$ )):

$$\Phi_F = \int_0^\infty F_\lambda(\lambda_F) d\lambda_F$$
(33)

Падающие фотоны мигрируют через исследуемую ткань к детектору по траекториям, имеющую форму "банана", причем два его конца соединяются с источником и детектором [53]. Эта область является наиболее вероятной по которой фотоны будут проходить от источника к приемному волокну (рис.8).



Рисунок 8. Распространение света в коже.

Воздействие на экзогенные флуорофоры с достаточной плотностью мощности около 0,1-10 Вт/см<sup>2</sup> приводит к разрушению раковых клеток, что называется ФДТ. Преимущество ФДТ перед остальными методами лечения злокачественных новообразований, такими как хирургическое вмешательство, заключается в неинвазивности, хорошей селективности, минимальности побочных эффектов и возможности повторного лечения [54]. Для проведения терапии ФС вводится пациенту внутривенно, внутрибрюшинно или перорально, но также может вводиться аппликационно. Через некоторое время после введения препарат селективно накапливается в патологической области, что приводит к возможности избирательного воздействия на опухолевую ткань. Накопление препарата в раковых клетках варьируется от нескольких секунд до

нескольких часов в зависимости от типа ФС и локализации злокачественного новообразования. Далее область с большой концентрацией ФС облучается излучением с длиной волны генерации, соответствующей пику поглощения, введенного ΦС. При фотодинамическом воздействии экзогенная фотосенсибилизирующая молекула лекарственного препарата и эндогенный молекулярный кислород используются в качестве посредников для облегчения превращения молекулярного триплетного кислорода в синглетный кислород. ΦC способна Химическая структура поглощать световую энергию, трансформировать ее в другие формы энергии и далее передавать другим соединениям. При воздействии постоянного излучения на ФС концентрация частиц в возбужденном состоянии будет оставаться постоянной:

$$\frac{d[{}^{1}A^{*}]}{d[{}^{1}A]} = 0 \tag{34}$$

где  $[{}^{l}A]$  - концентрация раствора при воздействии излучения, а  $[{}^{l}A^{*}]$  - концентрация молекул вещества перешедшее в возбужденное синглетное состояние  $S_{l}$ . Синглетный кислород запускает каскад реакций, разрушающих мембранные органеллы клетки и уничтожающих ее. Синглетный кислород может взаимодействовать с клеточными компонентами, такими как белки и нуклеиновые кислоты. Диффузный путь этих молекул ограничен, так как кинетика затухания синглетного кислорода в ткани имеет короткую компоненту времени жизни [55, 56]. При ФДТ биологической ткани с достаточным содержанием кислорода с низкой плотностью мощности облучения скорость потребления кислорода определяется как [57]:

$$\Gamma = \alpha \varphi_{ch}[C]P \tag{35}$$

где *С* – концентрация ФС в биологической ткани, *Р* – плотность мощности лазерного воздействия, *α* – коэффициент эффективности генерации синглетного

кислорода молекулами ФС,  $\varphi_{ch}$  – квантовый выход тушения синглетного кислорода. В свою очередь, коэффициент эффективности генерации синглетного кислорода молекулами ФС [57]:

$$\alpha = \frac{\sigma}{E_{h\nu}} \varphi_{\Delta} \approx 1.925 \times 10^{-5} \lambda \varepsilon \varphi_{\Delta}$$
(36)

где  $\sigma$  – сечение поглощения лазерного излучения молекулой ФС,  $E_{hv}$  – энергия фотона лазерного воздействия,  $\varphi_{\Delta}$  – квантовый выход образования синглетного кислорода,  $\varepsilon$  – коэффициент экстинкции.

Длина свободного пробега фотона определяется функцией плотности вероятности, где  $l_{_{ph}}$  - средняя длина свободного пробега фотона:

$$p(L) = (\frac{1}{l_{ph}})e^{-\frac{L}{l_{ph}}}$$
(37)

$$l_{ph} = \frac{1}{\mu_a + \mu_s} \tag{38}$$

Отмечается, что средняя длина диффузионного пробега синглетного кислорода в биологических тканях составляет 10-100 нм [58]. Данный механизм приводит к повреждению внутриклеточных мишеней, находящихся рядом с молекулами ФС. При этом происходит обесцвечивание ФС, что называется фотобличингом. При фотобличинге образующийся синглетный кислород и другие виды реакционноспособного кислорода реагируют и окисляют молекулы ФС. Поскольку частичная энергия поглощенных фотонов тратится на флуоресценцию ФС, получается возможным определить концентрацию ФС в злокачественном новообразовании биологической ткани и следить за динамикой эффективности ФДТ облучаемой ткани во времени.

Для веществ, имеющих флуоресцентные свойства, можно измерить время жизни флуоресценции, демонстрирующее время нахождения молекулы в возбужденном состоянии. Для большинства экзогенных флуорофоров, используемых для ФД, время жизни флуоресценции составляет порядка наносекунд и описывается экспоненциальной кривой затухания флуоресценции во времени.

## Заключение к главе

Образование коллоидного раствора НЧ ИЦЗ, состоящего преимущественно из J-агрегатов, позволяет открыть новые возможности и подходы к ФД за счет их уникальных спектроскопических свойств в БИК диапазоне. Возможность ранней диагностики опухолей головы и шеи имеет решающее значение для исключения риска ухудшения качества жизни пациентов и снижения высокой смертности онкологических больных. Оценка состояния тканей спектроскопическими методами демонстрирует отличные результаты в визуализации опухолей различной локализации органов головы и шеи. Контроль фотобличинга накопленного ФС в опухолевой ткани сразу после ФДТ обеспечивает оценку результативности терапии в режиме реального времени и дает возможность онкологам своевременно принимать решения для успешного лечения рака головы и шеи. Таким образом, ФД, позволяющая определить точные границы опухолевой ткани, увеличивает эффективность ФДТ, положительно влияет на медиану выживания больных со злокачественными образованиями головы и шеи, не снижая качество жизни.

### ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной главе подробно описаны использующиеся приборы, биологические модели опухолей 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. Спектроскопические методы исследования позволяют выявлять однозначное соответствие между полученными сигналами - поглощения, флуоресценции и рассеяния, обусловленных эндогенными флуорофорами, находящихся в биологической ткани, и экзогенными флуорофорами, вводимыми извне – и малыми и быстрыми функциональными изменениями в исследуемых тканях, а также выявляет 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.

Обоснован выбор моделей исследования и представлен ход экспериментальных исследований. Охарактеризована методика приготовления биологической модели трехмерных опухолевых сфероидов, параметры и свойства которой приближены к опухолевой ткани. Представлен и оптимизирован способ приготовления коллоидного раствора НЧ ИЦЗ. Описана теоретическая модель уменьшения поглощения

в зависимости от размера агрегата.

#### 2.1. Используемые физические методы исследования.

### 2.1.1. Исследование спектров поглощения.

Спектры поглощения исследуемых образцов были получены при помощи компьютеризированного спектрофотометра U-3400 (Hitachi Ltd., Япония). Конструктивно прибор выполнен ПО двулучевой снабжен схеме, микропроцессором, управляющим процессами настройки спектрофотометра и проводимыми измерениями. Принцип действия спектрофотометра основан на свойствах образцов по-разному отражать или пропускать падающий на него свет в разных точках спектра. В прибор встроены несколько источников излучения, рабочий диапазон 190-2500 нм. Источником видимого света служит галогенная лампа, генерирующая постоянный поток света в диапазоне 380-950 нм. В качестве источника УФ используется ксеноновая лампа. Работа двулучевого спектрофотометра заключается в разделении светового потока от источника на два пучка, характеристики которых сравниваются между собой.

#### 2.1.2. Измерение спектров флуоресценции ФС.

Регистрация и анализ спектров флуоресценции ФС были проведены при помощи лазерного электронно-спектрального анализатора LESA-01-Biospec (ООО «Биоспек», Россия). Схема устройства приведена на рисунке 9.



Рисунок 9. Схема экспериментальной установки LESA-01-Biospec.

Для возбуждения флуоресценции ФС использовались полупроводниковые лазеры с длинами волн генерации 633 нм (в комбинации с длинноволновым пропускающим фильтром 635 нм), 785 нм (с пропускающим фильтром в 810-860 нм для исследования растворов и длинноволновый диапазоне пропускающим фильтром 830 нм для солидных исследуемых моделей), 800 нм (с фильтром 830 пропускающим длинноволновым HM для регистрации флуоресценции ФС). Для доставки лазерного излучения и регистрации излучения от образцов было использовано оптическое волокно У-образной формы (оптический зонд) диаметром 1,8 мм. В центре торца оптического зонда располагается осветительное волокно, доставляющее лазерное излучение к исследуемому участку, на периферии торца оптического зонда располагаются шесть приемных волокон, регистрирующих диффузно-отраженное излучение и флуоресценцию от исследуемого участка. Входной конец зонда подключен напрямую к лазерному источнику. Приемные волокна на торце оптического

зонда, ведущем ко входу в спектрометр расположены в одну линию, служащую входной щелью монохроматора, для чего позиционируются перпендикулярно плоскости дифракции диспергирующего элемента. Числовая апертура каждого волокна равна 0,22. При регистрации спектров люминесценции использовались фильтры, возбуждающее оптические частично подавляющие лазерное излучение, однако не полностью - с целью дальнейшей нормировки на интенсивность лазерного сигнала для оценки рассеивающих свойств образца и для повышения точности расчета концентрационной зависимости интенсивности флуоресценции ФС. Для исключения вклада погрешностей от света ламп искусственного освещения и солнечного света исследования были проведены в затемнённом помещении.

Для регистрации резонансной флуоресценции была собрана установка с использованием спектрометра и фемтосекундного лазера с перестраиваемой длиной волны (рис.10).



Рисунок 10. Схематическое изображение установки для регистрации резонансной флуоресценции.

Образец с коллоидным раствором НЧ ИЦЗ с концентрацией 0.6 мг/л облучали разными длинами волн. Диапазон длин волн варьировался от 880 нм до 915 нм. Рассеянное лазерное излучение и флуоресценцию регистрировали с

помощью спектрометра, расположенного под углом 90° относительно направления распространения лазерного излучения. Дополнительно для подавления лазерного сигнала до образца и после образца были установлены скрещенные поляризаторы. В качестве референсного образца для учета вклада рассеяния были использованы полилатексные калибровочные сферы (SPI Supplies, США) с диаметром 110 нм.

Для исследования спектроскопических свойств J-агрегатов ИЦЗ при двухфотонном поглощении использовался титан-сапфировый лазер Chameleon Ultra II (Coherent Inc., США) с частотой 80 МГц и длиной импульса 140 фс. Данный лазер способен перестраивать длину волны генерации в диапазоне 690-1060 нм.

Спектры флуоресценции, а также спектральные карты флуоресценции были получены на системе NanoLog-4 (Horiba Jobin-Yvon, Франция). В качестве детектора использовался InGaAs прибор с зарядовой связью (ПЗС) с рабочим диапазоном 800-1600 нм. В качестве источника возбуждения использовалась ксеноновая лампа (рабочий диапазон 300-900 нм) с двойным монохроматором, спектральное разрешение составляет 2 нм.

# 2.1.3. Определение размеров наночастиц методом динамического и статического рассеяния света.

Работа системы Photocor Complex (ООО «Фотокор», Россия) основывается на методе динамического рассеяния света, позволяющем определить коэффициент диффузии дисперсных частиц в жидкости. Анализ осуществляется путем аппроксимации корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного света. Гидродинамический радиус наночастиц рассчитывается из коэффициента диффузии.

Хаотическое броуновское движение дисперсных частиц порождает микроскопические флуктуации их концентрации, приводящие к локальным

неоднородностям показателя преломления среды. Проходящий через такую среду лазерный луч частично претерпевает рассеяние на неоднородностях. Флуктуации интенсивности рассеянного света будут соответствовать флуктуациям концентрации дисперсных частиц. В качестве источника лазерного излучения используется He-Ne лазер с длиной волны генерации 633 нм. В зависящей от времени корреляционной функции флуктуаций интенсивности содержится информация о коэффициенте диффузии рассеяния частиц. Временная автокорреляционная функция имеет следующий вид:

$$G(\tau) = [I(0)I(t-\tau)] = \lim_{t \to \infty} \frac{1}{tm} \int_0^{tm} I(t)I(t-\tau)dt$$
(39)

где интенсивность *I* имеет различные значения для времен *t* и (*t*- $\tau$ ), *tm* - время накопления корреляционной функции. Очевидно, что при  $\tau=0$ , автокорреляционная функция равна среднеквадратичной интенсивности рассеяния  $\langle I^2 \rangle$ .



Рисунок 11. Схема многоуглового спектрометра динамического и статического

#### рассеяния света.



Рисунок 12. а) Схема процесса рассеяния света, б) автокорреляционная функция рассеянного света.

Для исследования размера агрегатов и степени агрегации при разных концентрациях была проведена регистрация рассеянного сигнала под углами 15° и 145° методом рассеяния Ми.

Теория рассеяния Ми применяется для частиц, размер которых  $d>0.05\lambda_L/n_L$ . С увеличением размера частиц начинает преобладать рассеяние Ми в более концентрированном растворе.

При воздействии на образец лазерным светом, доля энергии  $W_s/W_o$ , рассеянная во внешнем направлении при угле  $\theta$  и внешнем телесном угле,  $\Delta\Omega$ , определяется как [59, 60]:

$$P_m(\theta, \Delta \Omega) = \frac{W_s(\theta, \Delta \Omega)}{W_0} = M(\theta_i) P_R(\theta, \Delta \Omega) = \frac{d\sigma_{M,m}(\theta_i)}{d\Omega} N_m l \frac{\Delta \Omega}{1 + R(\theta)}$$
(40)

где  $N_m$ -плотность мономеров, *l*-длина образца,  $d\sigma_{M,m}(\theta_i)/d\Omega$  дифференциальное поперечное сечение рассеяния Ми. Отражающая способность,  $R(\theta)$ , задается [61]:

$$R(\theta) = \left[\frac{\cos\theta - (\frac{n_L^2}{n_a^2} - \sin^2(\theta))^{\frac{1}{2}}}{\cos\theta + (\frac{n_L^2}{n_a^2} - \sin^2(\theta))^{\frac{1}{2}}}\right]^2$$
(41)

а функция рассеяния Ми определяется как:

$$R(\theta_{i}) = \frac{1}{\beta_{m}^{2}} \sum_{j=1}^{\beta_{m}} \sum_{k=1}^{\beta_{m}} \frac{\sin[s(\theta_{i})|\vec{r}_{j} - \vec{r}_{k}|]}{s(\theta_{i})|\vec{r}_{j} - \vec{r}_{k}|}$$
(42)

где:

$$s(\theta_i) = \frac{4\pi n_L}{\lambda_L} \sin(\frac{1}{2}\theta_i)$$
<sup>(43)</sup>

$$\vec{r}(r,\vartheta,\varphi) = \begin{pmatrix} r\sin\vartheta\cos\varphi\\r\sin\vartheta\sin\varphi\\r\cos\vartheta \end{pmatrix}$$
(44)

Дифференциальное поперечное сечение рассеяния Ми молекулы в частице степени агрегации  $\beta_m$ , определяется как:

$$\frac{d\sigma_{R,m}}{d\Omega}M(\theta_i) = \beta_m \frac{9\pi^2 n_L^4}{\lambda_L^4} V_m^2 |\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2}|^2 M(\theta_i)$$
(45)

Агрегатные частицы [62] описываются слабо упакованными сферами с коэффициентом заполнения объема  $k_f$ . Для совокупности объема мономера  $V_m$  и степени агрегации  $\beta_m$  объем агрегатной частицы равен  $V_g = \beta_m V_m / k_f$ . Аппроксимируя суммирование интегрированием, функция рассеяния Ми для агрегатов становится:

$$M(\theta) \approx \frac{1}{V_g^2} \int_0^{a_g} dr_1 \int_0^{2\pi} d\phi_1 \int_0^{\pi} d\theta_1 2 \times \{ \int_0^{a_g} dr_2 \int_0^{2\pi} d\phi_2 \int_0^{\pi} d\theta_2 \\ \times \frac{\sin[s(\theta_i) |\vec{r}(r_1, \theta_1, \phi_1) - \vec{r}(r_2, \theta_2, \phi_2)|]}{s(\theta_i) |\vec{r}(r_1, \theta_1, \phi_1) - \vec{r}(r_2, \theta_2, \phi_2)|}$$
(46)  
$$\times r_2^2 \sin\theta_2 \} r_1^2 \sin\theta_2$$

Для распределения агрегата по размерам дифференциальное поперечное сечение рассеяния Ми  $d\sigma_{M,m}(\theta_i)/d\Omega$  принимает вид:

$$\frac{d\bar{\sigma}_{M,m}(0)}{d\Omega} = \frac{9\pi^2 n_L^4}{\lambda_L^4} V_m^2 |\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2}|^2 \int_0^\infty \beta_m h(\beta_m) d\beta_m = \frac{9\pi^2 n_L^4}{\lambda_L^4} V_m^2 |\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2}|\bar{\beta}_m$$
(47)

где  $n_L$  - коэффициент преломления линзы, n – коэффициент преломления коллоидного раствора НЧ ИЦЗ.

По формуле (47) было получено дифференциальное поперечное сечение рассеяния Ми под углами 15° и 145°. Исходя из этих данных была высчитана степень агрегации коллоидного НЧ ИЦЗ. Средний размер J-агрегатов был высчитан по формуле:

$$a_{ag} = \left(\frac{3V_{ag}}{4\pi}\right)^{\frac{1}{3}} = \left(\frac{3\beta_m V_m}{4\pi k_f}\right)^{\frac{1}{3}}$$
(48)

# **2.1.4.** Измерение кинетики флуоресценции ФС с пикосекундным разрешением.

Система для исследования кинетики флуоресценции ФС в биологическом окружении состоит из стрик-камеры C10627-13 (Hamamatsu, Photonics Ltd., Япония) с временным разрешением 15 пс, полупроводникового лазера с длительностью импульса 67 пс и длиной волны генерации 637 нм (рис.13).



Рисунок 13. Лазерный спектроскопический комплекс на основе стрик-камеры С10627-13.

Измерение флуоресценции кинетики основывается на методе коррелированного по времени счета единичных фотонов, заключающемся в возбуждении флуоресценции ФС короткими импульсами с одинаковым периодом и последующем анализе распределения зарегистрированных фотонов по времени. При этом время жизни флуоресценции ФС должно быть соизмеримо с временной разверткой стрик камеры и частотой лазерных импульсов. Флуоресцентный сигнал образца ФС, возбужденный лазерным импульсом, собирается оптическим волокном и поступает на полихроматор. Далее излучение формирует на фотокатоде изображение, конвертирование которого создает электронный сигнал. Ускоряющее поле, действующее на электроны параллельно оптической оси, заставляет двигаться их от фотокатода к фосфорному экрану, при этом во время движения на них перпендикулярно действует переменное поле, осуществляющее развертку по времени. Далее электроны попадают на являющуюся фотоэлектронного микроканальную пластинку, аналогом умножителя с разрешением по двум координатам и усиливающую поток электронов за счет вторичной электронной эмиссии (рис.14).



Рисунок 14. Схема электронно-оптического преобразователя (стрик-скопа) С10627.

После прохождения электронно-оптического преобразователя сигнал регистрируется на камере с ПЗС-матрицей и передается на персональный

компьютер для получения кинетики флуоресценции ФС и распределения числа фотонов, зарегистрированных на стрик-камере между компонентами времени жизни флуоресценции ФС.

Аппроксимация кинетики затухания флуоресценции ФС в опухолевых клетках проводилась экспоненциальной функцией:

$$I(t) = A_1 e^{-\frac{x}{\tau_1}} + A_2 e^{-\frac{x}{\tau_2}} + \dots$$
(49)

где A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, ...-амплитуды, относящиеся к различным компонентам времени жизни флуоресценции,  $\tau_1, \tau_2, \ldots$ - время жизни флуоресценции.

Количество экспоненциальных составляющих должно быть таким, чтобы величина редуцированного распределения χ<sup>2</sup> для кривой аппроксимации составляла величину, близкую к 1, и равнялась:

$$\chi^{2} = \frac{1}{M} \sum_{i} \frac{(M_{i} - C_{i})^{2}}{M_{i}}$$
(50)

где  $M_i$  – значение экспериментально исследуемой величины i-ой точки, C<sub>i</sub> – математически аппроксимированное значение исследуемой величины i-ой точки, V – количество степеней свободы.

# 2.1.5. Исследование распределения ФС в опухолевой ткани методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.

Исследование распределения ФС в опухолевой ткани были получены при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM-710 (Carl Zeiss, Германия) (рис.15). Данный метод обладает значительным контрастом и пространственным разрешением, и позволяет визуализировать исследуемые образцы, включая спектроскопические свойства, что достигается при помощи точечной диафрагмы, размещённой в плоскости, сопряженной с фокальной плоскостью и ограничивающей поток рассеянного света, излучаемого не из фокальной плоскости объектива. Во

время сканирования исследуемого образца лазерный пучок перемещается в горизонтальной плоскости с использованием нескольких зеркал с Конфокальный наклона. лазерный управляемым углом микроскоп производит полинейное сканирование образца сфокусированным лазерным лучом, направляемым гальванометрическими сканнерами. Происходит флуоресцентного сигнала от участков исследуемого образца прием посредством фотоумножителя, соответствующим пикселям изображения. Далее происходит оцифровка информации, содержащейся в сигнале фотоумножителя. Для получения флуоресцентного сигнала происходит фокусировка лазера при помощи объектива микроскопа. Собранный этим же объективом флуоресцентный сигнал поступает в приемник посредством дихроического делителя излучения. Точечная диафрагма находится перед приемником в плоскости, соответствующей фокальной плоскости объектива. Свет, исходящий из плоскостей выше и ниже фокальной, при попадании в точечное отверстие оказывается несфокусированным и, соответственно, не влияет на получаемое изображение. Разрешение конфокального микроскопа ограничено дифракционным пределом и определяется как:

$$\sigma = \frac{\lambda}{\pi(NA)} \tag{51}$$

где λ — длина волны лазерного излучения, а числовая апертура определяется как:

$$(NA)=n\sin\alpha$$
 (52)

где n — показатель преломления среды между образцом и объективом,  $\alpha$  — половина угла, который визуализирует объектив. В видимом диапазоне разрешение составляет ~ 250 нм (при *NA*=1,45, *n*=1,51).



Рисунок 15. Комплекс лазерного сканирующего конфокального микроскопа Carl Zeiss серии LSM-710.

# 2.1.6. Исследование морфологической структуры наночастицы методом сканирующей электронной микроскопии.

Исследование проводили методом сканирующей микроскопии (СЭМ). Для изучения морфологической структуры J-агрегатов коллоидный раствор НЧ ИЦЗ замораживали при температуре 77К. Остекловывание образцов при низкой температуре было необходимо для избегания слипания агрегатов и/или перестановки самосборки.

Предварительно замороженная проба размещалась на столике Пельтье и помещалась в камеру электронного микроскопа EVO LS10 (Carl Zeiss, Германия), где подвергалась абляции электронным пучком при ускоряющем напряжении 21 кВ для выведения частиц на поверхность капли при температуре -20°C. Был использован катод LaB6. Наблюдения велись в режиме низкого вакуума (EP, 70 Pa) при ускоряющем напряжении 21 кВ и токе на образце 30 pA, используя детектор обратно рассеянных электронов (BSE) с применением рабочего отрезка 13-13.5 мм. Изображения 1024х768 рх захватывались с аппаратным разрешением 7.7 nm/px.

# 2.1.7. Получение графических изображений зависимости интенсивности рассеянного лазерного излучения от угла рассеяния.

Для получения индикатрисы рассеяния коллоидного раствора НЧ ИЦЗ была собрана установка на лабораторной вращающейся на 360° платформе с фиксацией оптического жгута с лазерным излучением и приемного оптического волокна (рис.16). Длина волны лазерного излучения была выбрана 920 нм, так как на данной длине волны НЧ ИЦЗ не имеет поглощающих свойств.



Рисунок 16. Экспериментальная установка для определения индикатрисы рассеяния коллоидного раствора НЧ ИЦЗ и калибровочных сфер.

Для расчета g-фактора была проведена численная аппроксимация данных с помощью функции Хени-Гринштейна:

$$p(\cos\theta) = \frac{1 - g^2}{2(1 + g^2 - 2g \cdot \cos\theta)^{3/2}}$$
(53)

# 2.1.8. Разработка видеофлуоресцентной системы для регистрации мультиспектральных изображений в ДК и БИК диапазонах спектра.

Для оценки накопления ФС и флуоресцентных красителей была

использована разработанная видеофлуоресцентная система на основе устройства флуоресцентной навигации в нейрохирургии (RU 2 661 029 C1, лля опубл.11.07.2018). Видеофлуоресцентное устройство ДЛЯ анализа внутритканевого распределения фотосенсибилизаторов ДК и БИК диапазонов злокачественных новообразований головы и шеи состоит из светодиодного белого блока излучателя с системой узкополосных источника света, 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 фильтров, обработки регистрации с системой блока 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.

Получение мультиспектральных изображений реализовано с помощью перекрестной системы фильтров (рис.17).



Рисунок 17. Характеристики пропускания фильтров для интраоперационной флуоресцентной видеосистемы.



Рисунок 18. Схема экспериментальной интраоперационной видеосистемы.

Схема интраоперационной флуоресцентной видеосистемы представлена на рисунке 18. В качестве источника белого излучения выступает набор из трех RGB Источник снабжен светофильтром, светодиодов. света пропускающим коротковолновую часть спектра, менее 625 нм. Для доставки излучения от двух лазерных источников с длинами волн генерации 635 нм и 800 нм и источника белого света используются светопроводящие гибкие оптоволоконные жгуты. Для доставки излучения к исследуемому объекту и регистрации диффузноотраженного света используется жесткий эндоскоп. Мощность используемых лазеров на выходе из волокна составила 3-5 мВт. После регистрации диффузноотраженного света от исследуемого образца сигнал поступает в блок регистрации, состоящий из двух светоделителей в виде дихроичных зеркал, цветной камеры для регистрации видимых изображений и двух черно-белых камер для регистрации флуоресцентных изображений. При попадании светового сигнала на первый светоделитель, свет до 652 нм направляется на цветную камеру с оптическим коротковолновым фильтром 650 нм для формирования видимого изображения. Световой поток от 652 нм и выше попадает на второй светоделитель, где разделяется на два луча на 750 нм. Первый луч в диапазоне 652-750 нм попадает на черно-белую камеру с длиноволновым фильтром 675 нм люминесцентных изображений, ДЛЯ формирования соответствующих флуоресценции Н-агрегатов ИЦЗ. Оптический луч от 750 нм попадает на другую черно-белую камеру с длинноволновым фильтром 830 нм для регистрации люминесцентных изображений, соответствующих флуоресценции мономеров и J-агрегатов ИЦЗ. Дополнительно, в данной системе низкоинтенсивный лазер с длиной волны генерации 800 нм заменяли лазером с длиной волны генерации 785 нм для сравнительного анализа регистрации флуоресценции мономеров и Jагрегатов ИЦЗ. Для вывода полученной информации специальное программное

обеспечение обрабатывает и выводит на мониторе изображения в трех режимах, в зависимости от требований пользователя. Во флуоресцентном свете в ДК диапазоне длиной волны 635 нм, получаемой с монохромной камеры, визуализируется флуоресценция Н-агрегатов и мономеров молекулярного раствора ИЦЗ и H-агрегаты коллоидного раствора ИЦЗ. Во флуоресцентном свете в БИК диапазоне длиной волны 785 нм и 800 нм, получаемой с монохромной камеры, визуализируются на мониторе мономеры молекулярного раствора ИЦЗ и мономеры и Ј-агрегаты коллоидного раствора ИЦЗ. Изображение в видимом свете, получаемое с навигационной камеры демонстрирует область исследования в привычном виде. В режиме наложения, который передает флуоресцентный сигнал ФС, на изображение в натуральных цветах накладывается флуоресцентное изображение, окрашенное псевдоцветом. Кроме того, система флуоресцентной видеорегистрации позволяет одновременно наблюдать отраженное и флуоресцентное изображения участка исследуемой области, корректировать яркость И неравномерность флуоресцентного излучения.

### 2.2. Материалы

### 2.2.1. Фотосенсибилизаторы в молекулярной форме.

В качестве исследуемого ФС ИК области был взят препарат ИЦЗ, разрешенный к клиническому применению. Использовали препарат Pulsion<sup>®</sup> (Pulsion Medical Systems, Германия). Структурная формула представлена на рисунке 19.



Рисунок 19. а) Структурная формула ИЦЗ, б) спектр поглощения ИЦЗ.

Спектр поглощения раствора ИЦЗ имеет широкий пик поглощения в ИК области 700-800 нм и выраженный максимум на длине волны 795 нм.

Для ФД и ФДТ пациентов с диагнозом опухоли головы и шеи был использован ФС на основе хлорина еб (Себ), а именно был выбран препарат "Фотодитазин" (ООО "Вета-Гранд", Россия), разрешенный к клиническому применению. Данный препарат является концентрированным раствором для приготовления раствора для инфузий, в состав которого входит исключительно диметилглюкаминовая соль хлорина Еб. Себ имеет выраженный пик поглощения в дальней красной области спектра, что делает его использование целесообразным в рамках решения поставленных задач (рис.20).



Рисунок 20. а) Структурная формула Себ, б) спектр поглощения Себ.

### 2.3. Биологические модели исследования in vitro и in vivo.

### 2.3.1. Исследования in vivo

Иммунодефицитные мыши линии BALB/c nu/nu (nude), самки с массой тела 19-21 г., получены из НПП «Питомник лабораторных животных» – филиала ФГБУН «Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова». Возраст животных на время получения составлял 7–8 недель. Мыши содержались в отдельно отведенной комнате с контролируемыми параметрами окружающей среды, в индивидуально вентилируемых клетках. Всего в экспериментах использовано 30 мышей nude.

### 2.3.2. Опухолевая модель

В работе использовали культуру опухолевых клеток человека (FaDuкарцинома гортаноглотки), полученную из коллекции АТСС. Клетки культивировали в увлажненной атмосфере CO<sub>2</sub>-инкубатора (37°C, 5% атмосфера CO<sub>2</sub>) на среде Игла с добавлением L-глутамина (ПанЭко, Россия), содержание эмбриональной телячьей сыворотки составляло 10% (ПанЭко, Россия). Опухолевые клетки для трансплантации животным культивировали во флаконах с площадью поверхности 75 см<sup>2</sup> до достижения конфлюэнтного монослоя, далее клетки обрабатывали раствором Версена, отмывали питательной средой для культивирования клеток и подсчитывали количество жизнеспособных клеток в камере Горяева. Содержание клеток в удельном объеме клеточной суспензии доводили до количества, определяемого условиями их дальнейшей прививки животным.

Суспензия опухолевых клеток инокулировали животным подкожно, на два бока (рис.21). На правый бок перевивались опухолевые клетки в матригеле (Corning Life Sciences, CША), на левый бок - без матригеля, в количестве 3×10<sup>6</sup> клеток в 50 и 100 мкл, соответственно. Эксперимент начинали через 8 дней после инокуляции опухолевой суспензии. Экспериментальных групп было 3, общее количество животных в опытной (опытных) группе (-ах) составило 25 особей, в контрольной группе - 5.

Исследуемые флуоресцентные красители ИЦЗ в молекулярной и наноформе вводили парентерально в виде однократной струйной внутривенной инъекции в хвостовую вену в дозе 10 мг/кг в объеме 0,2 мл, среднее время введения составило 30 секунд. Рабочая доза была выбрана исходя из доз флуоресцентных красителей при фотодинамической терапии в клинической практике.



Рисунок 21. Внешний вид экспериментального животного (nude мышь) с перевитой опухолью карциномы гортаноглотки человека.

## 2.4. Приготовление трехмерной клеточной модели опухоли (сфероидов).

Была проведена разработка трехмерной клеточной модели опухолей (сфероидов) на основе культуры клеток FaDu [63-66]. 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 двумерный монослой на дне лабораторной посуды, в частности на дне чашки Петри. В связи с этим идея индуцирования процесса формирования трехмерной модели – сфероида - состоит в том, чтобы препятствовать адгезии клеток ко дну чашки, и заставить их расти не горизонтально- по поверхности, а в объеме, не прикрепляясь к поверхности. Достижение этой цели возможно в случае использования покрытия дна чашки Петри, к которому клеточные линии не адгезивны. Таким покрытием может служить получаемый из агара линейного полисахарида – агароза. Клетки не имеют адгезии к данному веществу, в результате чего подобное покрытие препятствует клеточному росту вдоль поверхности чашки Петри, что в условиях нормального клеточного роста провоцирует формирование наиболее выгодной энергетически клеточной структуры - сфероида. Этот процесс можно сравнить с формированием сферической капли воды на гидрофобной поверхности. Однако случае клеток можно контролировать процесс клеточного роста, В a, следовательно, и формирование сфероидов путем изменения клеточной концентрации, поскольку это является единственным вариативным параметром для систем с различным клеточным составом. Связано это с тем, что различные клеточные линии имеют различные размеры самих клеток, различную форму, а также различную скорость роста. В рамках данной диссертационной работы была рассмотрена клеточная линия FaDu – гипофаренгальная карцинома человека. Ввиду того, что выбранные модели имеют одну природу – карциному, которая происходит из эпителиальной ткани, то и свойства выбранных моделей являются близкими. Однако оптимизация формирования трехмерных клеточных структур на основе рассматриваемых клеточных культур является основной и заключается в подборе клеточных концентраций и оптимального времени роста сфероидов. В зависимости от оптимизированной концентрации клеток меняется соотношение питательной среды, поскольку объем лунки для выращивания сфероида конечный и составляет 250 мкл. Таким образом, в работе использовалась питательная среда RPMI-1640, которая является единой и установленной стандартами ведения рассматриваемых клеточных линий.

Для приготовления трехмерных клеточных моделей на основе клеточной линиии FaDu были использованы 96-и луночные планшеты. На дне каждой лунки создавался слой антиадгезивного клеточного покрытия путем раскапывания раствора, приготовленного на основе агарозы: 0,225 г агарозы и 15 мл дистиллированной воды. Однородность и прозрачность раствора агарозы была достигнута путем термического нагрева до полного ее растворения.

Стерилизация раствора осуществлялась путем автоклавирования при температуре 120°С в течение 30 минут. Нанесение 70 мкл раствора в каждую лунку, позволило добиться равномерного покрытия дна каждой лунки после застывания агарозы. Далее лунки однократно промывались раствором натрий-фосфатного буфера в объеме 200 мкл на каждую лунку. Клеточная линия была соответствующим образом подготовлена для инкубации в луночном планшете, а именно произведено трипсинизирование и центрифугирование.

Для расчета концентрации клеток для посева был произведен подсчет трипсинизированных клеток в камере гемоцитометра, после чего необходимое число клеток 10<sup>6</sup> клеток раскапывается в каждую лунку планшета и доводится до полного объема в 250 мкл путем добавления питательной среды RPMI-1640. Далее планшет с засеянными клетками помещали в инкубатор и содержали при температуре 37°C градусов неподвижно (рис. 22).



Рисунок 22. Схема процесса приготовления трехмерных клеточных моделей

Размер выращенных мультиклеточных опухолевых сфероидов составил 370-520 мкм и состоял из трех зон: пролиферирующей, спящей и некротической, что является близким к модели *in vivo* (рис.23).



Рисунок 23. Структура мультиклеточного опухолевого сфероида.

# 2.5. Приготовление агрегированного коллоидного раствора индоцианина зеленого.

В качестве ФС БИК области спектра был взят поликристаллический порошок препарата ИЦЗ Pulsion<sup>®</sup> (Pulsion Medical Systems, Германия) и на его основе приготовлен коллоидный раствор наночастиц, преимущественно состоящий из Ј-агрегатов. С этой целью1,5 мМ водный раствор ИЦЗ нагревали на водяной бане при 65°С в течение 20 часов. После образования Ј-агрегатов агрегатов. фильтровали для удаления больших раствор Этот процесс контролировался при измерении спектров поглощения и размеров наночастиц в коллоиде. Перед использованием полученный коллоидный раствор ресуспендировали в воде. Таким образом, были получены J-агрегаты с узким распределением частиц по размерам, которое составило 120-140 нм. По полученным спектрам поглощения, было установлено, что приготовленный водный коллоидный раствор J-агрегатов ИЦЗ имеет выраженный пик поглощения в ДК области с максимумом на длине волны 893 нм (рис.24), что соответствует поглощению Ј-агрегатов и делает его наиболее перспективным для флуоресцентной диагностики глубокозалегающих опухолей.


Рисунок 24. Спектр поглощения коллоидного раствора ИЦЗ.

Спектры поглощения при образовании J-агрегатов ИЦЗ при нагревании в течение 20 часов были использованы для построения графика в двойной логарифмической шкале для оценки агрегатного числа [25]. Основываясь на законе действующих масс можно получить концентрационные зависимости между ИЦЗ в молекулярной и нано- формах, предполагающих термодинамическое равновесие между двумя состояния.

$$\mathbf{K} = \frac{c_{agg}}{c_m^n} \tag{54}$$

$$C_0 = C_m + nC_{agg} \tag{55}$$

$$C_0 - C_m = nC_{agg} = nKC_m^n \tag{56}$$

$$lg n C_{agg} = lg n K + n lg C_m$$
<sup>(57)</sup>

где *n* - число мономеров, образующих агрегат, *C*<sub>0</sub> – общая концентрация флуоресцентного красителя.

# 2.6. Теоретическое исследование зависимости поглощения коллоидного раствора НЧ ИЦЗ от размера наночастиц.

Для истинного раствора поглощение описывается законом Ламберта-Бугера-Бера. При высоких концентрациях молекулы раствора начинают агрегироваться, которые приводят к отклонению от линейно зависимости. Поэтому, представлена теоретическая модель, на основе которой были получены зависимость поведения коэффициента поглощения НЧ ИЦЗ от агрегации молекул и теоретическое уменьшение нормированного поперечного сечения поглощения за счет агрегации молекул НЧ ИЦЗ.

Для монодисперсного агрегированного раствора со степенью агрегации:

$$\beta_m = \beta_{ag} n_{ag} \tag{58}$$

Коэффициент поглощения выражается как:

$$\alpha_{ag}(\lambda) = \sigma_{ag}(\lambda) N_{ag} = f_{ag}(\lambda) S_{ag} N_{ag} = \frac{f_{ag}(\lambda) S_{ag} N_m}{\beta_m} = \sigma'_{ag}(\lambda) N_m$$
(59)

где  $\sigma_{ag}(\lambda)$  — поперечное сечение поглощения агрегата,  $N_{ag}$  — численная плотность агрегатов,  $N_m$ - численная плотность молекул.

Коэффициент пропорциональности, выражающийся силой осциллятора, определяется как:

$$f_{ag} = \frac{\sigma_{ag}(\lambda)}{S_{ag}} \tag{60}$$

где S<sub>ag</sub> является площадью поперечного сечения агрегата.

$$N_{ag} = \frac{N_m}{\beta_m} \tag{61}$$

При этом численная плотность молекул *N<sub>m</sub>* должна быть намного меньше, чем объем молекул:

$$\frac{1}{V_m} = \frac{3}{4\pi a_m^3}$$
(62)

где *а<sub>m</sub>* – радиус молекулы.

Сила осциллятора агрегата  $f_{ag}$  увеличивается:

$$f_{ag} = \left(\frac{A_{ag}}{A_m}\right) f_m = f_m \frac{1 - T_{ag}}{1 - T_m} \tag{63}$$

где степень поглощения одного агрегата:

$$A_{ag} = 1 - T_{ag} \tag{64}$$

а степень поглощения одной молекулы:

$$A_m = 1 - T_m \tag{65}$$

Пропускание через одну молекулу:

$$T_m \approx e^{-f_m(\lambda)} \tag{66}$$

Нормированное сечение поглощения агрегата выражается через уравнения (59) и (63) и определяется как:

$$\sigma_{ag}'(\lambda) = \frac{1 - T_{ag}(\lambda)}{1 - T_m(\lambda)} \frac{S_{ag}}{S_m \beta_m} \sigma_m'(\lambda)$$
<sup>(67)</sup>

Следовательно, нормированное сечение поглощения агрегата  $\sigma'_{ag}$  практически совпадает с нормированным сечением поглощения молекулы  $\sigma'_m$  до тех пор, пока общая площадь поперечного сечения молекулы поглощения на агрегат:

$$\beta_m \, \sigma_m = \beta_m f_m \, S_m \tag{68}$$

меньше чем площадь агрегата:

$$S_{ag} \approx S_m \beta_m^{2/3} \tag{69}$$

В этом случае свет проникает в агрегаты, и на каждую молекулу внутри агрегата попадает одинаковое количество света.

Для:

$$\beta_m^{1/3} f_m > 1 \tag{70}$$

нормированное сечение поглощения агрегата уменьшается с ростом  $\beta_m$  по направлению к:

$$\sigma'_{ag} = \sigma'_m / \{\beta_m^{1/3} [1 - e^{-f_m(\lambda)}]\}$$
(71)

#### Заключение к главе

Таким образом, в данной главе были представлены подходы и этапы исследований, использующиеся в работе для получения спектроскопических свойств исследуемых ФС и многостороннего анализа результатов процессов. Представлены структурные и спектроскопические свойства ФС на основе ИЦЗ и Себ и обоснованы факторы выбора данных препаратов. Подробно описаны принцип работы и характеристики разработанной интраоперационной флуоресцентной видеосистемы, позволяющей регистрировать флуоресценцию мономеров и агрегатов Н- и Ј-типов ИЦЗ. Более того, разработанная система позволяет проводит флуоресцентную диагностику в клинических условиях с использованием клинически разрешенных препаратов на основе Себ и ИЦЗ в молекулярной форме. Описаны методы и оптимизация приготовления используемых биологических моделей для исследования взаимодействия ИЦЗ в молекулярной и нано- формах в различном микроокружении. Описана теоретическая модель уменьшения поглощения в зависимости от размера агрегата, демонстрирующая уменьшение коэффициента поглощения, вызванное уменьшением удельной поверхности с увеличением размера Jагрегатов НЧ ИЦЗ.

76

#### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИХ СВОЙСТВ J-АГРЕГАТОВ ИЦЗ

В данной главе представлены результаты исследования спектроскопических свойств коллоидного раствора НЧ ИЦЗ. Проведены экспериментальные исследования зависимости спектроскопических свойств НЧ ИЦЗ от размера и обосновано изменение коэффициента поглощения в зависимости от концентрации коллоидного раствора НЧ ИЦЗ. Были вычислены степень агрегации и средний размер частиц коллоидного раствора НЧ ИЦЗ методом динамического рассеяния света. Предложена и обоснована новая структурная модель взаимодействия J-агрегатов НЧ ИЦЗ с электромагнитным излучением.

### 3.1. Исследование степени агрегации и размера частиц коллоидного раствора НЧ ИЦЗ методом динамического рассеяния света.

По описанной теоретической модели, рассмотренной в пункте (2.6), зависимости поглощения от размера J-агрегатов коллоидного раствора были построены зависимости нормированного поперечного сечения от степени агрегации НЧ ИЦЗ.



Рисунок 25. Иллюстрация зависимого от агрегации поведения поглощения J-агрегатов. Для кривых изменяется сила осциллятора агрегатов, *f*<sub>ag</sub>

На рисунке 25 показано уменьшение поглощения из-за увеличения агрегации. Уменьшение  $\sigma'_{ag} \, c \, \beta_{chr}$  вызвано уменьшением общей геометрической площади поперечного сечения с увеличением степени агрегации. Были построены графики нормированного отношения поперечного сечения поглощения  $\sigma'_{ag}/\sigma'_m$  в зависимости от степени агрегации  $\beta_m$  для различных сил осциллятора агрегатов  $f_{ag} = 1$ ; 0,1; 0,01; 0,001.



Рисунок 26. Теоретическое уменьшение нормированного поперечного сечения поглощения за счет агрегации молекул НЧ ИЦЗ.

На рисунке 26 показано изменение нормированного поперечного сечения поглощения из-за агрегации. Красная кривая представляет собой нормированный спектр поперечного сечения поглощения агрегата, иллюстрирующий однородно расширенную форму спектральной линии Лоренца полной ширины на полувысоте 500 см<sup>-1</sup> (fwhm). Кривые построены для силы осциллятора агрегата  $f_{ag} = 0.1$  и рассчитаны для различных степеней агрегации от 10 до 10<sup>7</sup>. Спектральная полуширина на полувысоте полосы поглощения с красным смещением увеличивается с повышением степени агрегации, как и ожидается, исходя из уменьшения поглощения агрегатов, зависящего от способности поглощения. В крыльях спектральных кривых способность поглощения,  $f_{chr}$ меньше, и, следовательно, уменьшение поглощения в зависимости от размера агрегата меньше. 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.

Для исследования размера агрегатов и степени агрегации при разных концентрациях был использован метод динамического рассеяния света. Было измерено количество фотонов, падающих на образец, и количество фотонов, рассеянных на образце при углах 15° и 145°. На основе этих данных рассчитаны дифференциальные Ми,  $d\sigma_{M,m}(\theta_i)/d\Omega$ . поперечные сечения рассеяния дифференциальные поперечные Полученные экспериментально сечения рассеяния Ми при  $\theta = 15^{\circ}$  позволили определить средние степени агрегации (уравнение (47)) (рис.27).



Рисунок 27. Зависимость степени агрегации коллоидного раствора НЧ ИЦЗ от концентрации.

Полученные значения возрастают от 125·10<sup>7</sup> до 238·10<sup>7</sup> при увеличении концентрации коллоидного раствора НЧ ИЦЗ от 2·10<sup>-3</sup> мМ до 0,5 мМ.

Полученные экспериментально дифференциальные поперечные сечения рассеяния Ми при  $\theta = 145^{\circ}$  позволили определить средний размер J-агрегатов коллоидного раствора НЧ ИЦЗ по формулам (47-48).



Рисунок 28. а) зависимости коэффициента поглощения и среднего размера Ј-агрегатов от концентрации коллоидного раствора НЧ ИЦЗ, б) зависимость отношения коэффициента поглощения к среднему размеру Ј-агрегатов от концентрации коллоидного раствора НЧ ИЦЗ.

Были получены спектры поглощения коллоидного раствора НЧ ИЦЗ, по которым был вычислен коэффициент поглощения J-агрегатов. На картинке 28 видно, как с увеличением концентрации уменьшается коэффициент поглощения J-агрегатов, при этом увеличивается средний размер агрегатов и варьируется от 144 нм до 175 нм для концентраций коллоидного раствора НЧ ИЦЗ от  $2 \cdot 10^{-3}$  мМ до 0.05 мМ. Предположительно, при возрастании концентрации до 0.075 мМ J-агрегаты НЧ ИЦЗ достраиваются в высоту, прибавляя к себе молекулы ИЦЗ сверху и снизу посредством нековалентной  $\pi$ – $\pi$  связи, 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.

Собранная установка на вращающейся платформе позволила получить распределение интенсивностей рассеянного света на образцах в зависимости от угловых расположений излучающего и приемного волокон.



Рисунок 29. Индикатрисы рассеяния, а) коллоидный раствор НЧ ИЦЗ, б) калибровочные сферы.

Полученные индикатрисы рассеяния коллоидного раствора и калибровочных сфер представлены на рисунке 29. Рассчитанное значение gфактора для коллоидного раствора составило 0,76, а для калибровочных сфер 0,86.

# **3.2.** Исследование морфологии коллоидного раствора НЧ ИЦЗ в зависимости от концентрации методом СЭМ.

Были получены изображения J-агрегатов коллоидного раствора НЧ ИЦЗ для исследования морфологии при помощи СЭМ метода (рис.30).





Рисунок 30. СЭМ изображения J-агрегатов НЧ ИЦЗ с концентрациями: а) 5·10<sup>-3</sup> мМ, б) 0,1 мМ, в) 0,5 мМ.

На микроскопных снимках видно, что Ј-агрегаты НЧ ИЦЗ представляют собой крупные нитевидные конгломераты И хлопья, состояших ИЗ гранулированного материала и с широким распределением по размерам. На изображениях полученных Ј-агрегаты коллоидного раствора ΗЧ ИЦЗ представляют собой плотно упакованную сеть длинных стержнеобразных конгломератов. По полученным изображениям невозможно точно 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, приблизительно, Ј-агрегаты НЧ ИЦЗ составляют порядка 100-110 нм в ширину нитевидного агрегата и, предположительно, более 1 µм в длину для концентрации коллоидного раствора НЧ ИЦЗ 5.10-3 мМ (Рис.30а). 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.30б). При большой концентрации коллоидного раствора НЧ ИЦЗ 0,5 мМ Јагрегаты представляют собой крупные частицы с шириной до 200 нм и длиной более 1 µм (Рис.30в).

### 3.3. Исследование спектральных свойств коллоидного раствора НЧ ИЦЗ в зависимости от размера наночастиц.

Из уравнений (54-57) было получено агрегатное число, равное 4, молекул ИЦЗ, которые проявляют спектроскопические свойства, соответствующим Jагрегатам (рис.31). Данный результат подтверждается исследованиями концентрационных зависимостей спектроскопического эффекта, предполагающих термодинамическое равновесие между двумя состояниями ИЦЗ, раствором мономеров и J-агрегатами, в работе [67]. Агрегатное число молекул для H-агрегатов ИЦЗ равно 2 (рис.31).



Рисунок 31. а) Спектры поглощения ИЦЗ, полученные при нагревании, б) значения и логарифмический график для оценки агрегатного числа ИЦЗ для Јагрегатов, в) значения и логарифмический график для оценки агрегатного числа ИЦЗ для Н- агрегатов

Перед использованием на опухолевых моделях полученный коллоидный раствор НЧ ИЦЗ ресуспензировали в воде. Определение размера частиц проводилась методом динамического рассеяния света. Радиус наночастиц рассчитывается по коэффициенту диффузии частиц в жидкости с помощью корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного света. Было обнаружено, что полученные НЧ ИЦЗ имели средний размер 460 нм при дисперсии 83,6 нм (таблица 1).

Таблица 1. Значения размеров наночастиц для приготовленного водного коллоида НЧ ИЦЗ, измеренные при помощи многоуглового спектрометра динамического рассеяния света.

Процентное содержание,	Гидрадинамический	Стандартное отклонение, нм
%.	радиус, нм	
70.8	465.9	83.6
29.2	4.3e+4	2.7e+4

Были получены спектры поглощения молекулярного раствора ИЦЗ и полученного коллоидного раствора НЧ ИЦЗ. Приготовленный коллоидный раствор НЧ ИЦЗ имел выраженный пик поглощения в БИК-диапазоне с максимумом на длине волны 897 нм, соответствующий J-агрегатам [25], в то время как молекулярный раствор имел пик поглощения на длине волны 715 нм, соответствующий димерам Н-типа [25], и пик поглощения при 780 нм, соответствующий мономерам ИЦЗ [25] (рис. 32а). При возбуждении НЧ ИЦЗ на длине волны 633 нм, наблюдается отчетливый пик флуоресценции с максимумом на длине волны 700 нм, соответствующий H-агрегатам ИЦЗ. При возбуждении молекулярной формы ИЦЗ на длине волны 633 нм одновременно наблюдаются два пика флуоресценции, соответствующие H-агрегатам и мономерам ИЦЗ на длинах волн 700 нм и 845 нм, соответственно (рис. 326). При возбуждении молекулярной формы ИЦЗ длиной волны генерации 785 нм виден пик флуоресценции, соответствующий мономерной форме ИЦЗ. При возбуждении НЧ ИЦЗ длиной волны генерации 785 нм, наблюдаются два пика флуоресценции, соответствующие мономерам и агрегатам J-типа в диапазонах длин волн 800-850 нм и 860-910 нм, соответственно (рис. 32в).





Коллоидный раствор НЧ ИЦЗ с концентрацией 0.5 мМ последовательно пропускали через фильтры с диаметром пор 400 нм и 220 нм для разделения Јагрегатов по размеру. Для наночастиц НЧ ИЦЗ, прошедших через фильтр с размером пор 220 нм, 20% объема частиц соответствует 326 нм. В то время как для частиц, прошедших через фильтр с размерами от 220 нм до 400 нм, 15% объема частиц соответствует 386 нм. Для частиц, которые не прошли фильтр с порами 400 нм, размер показал 48% от объема частиц 682 нм (таблица 2). Таблица 2. Значения размеров наночастиц для приготовленного водного коллоида НЧ ИЦЗ, прошедшего через фильтры с порами диаметром 400 нм и 220 нм, измеренные при помощи многоуглового спектрометра динамического рассеяния света.

	Процентное		Стандартное отклонение,	
	содержание, %	т идрадинамический радиус, нм	HM	
Частицы размером меньше 220 нм				
	1.3	0.073	0.016	
	20.5	163.6	25.26	
	78.3	5.0e+4	2.6e+4	
Частицы размерами между 220 нм и 400 нм				
	15.1	193.4	28.45	
	84.9	4.4e+4	2.6e+4	
Частицы размером больше 400 нм				
	1.0	28.39	2.009	
	47.9	341.8	63.90	
	52.7	7.5e+4	1.8e+4	

Метод динамического рассеяния света, который характеризует размеры частиц в коллоиде, чувствителен к нежелательным фракциям агрегированного и динамически агрегирующегося образца. Для образцов коллоидного раствора НЧ ИЦЗ различных размеров были получены спектры поглощения и флуоресценции при длинах волн возбуждения 633 нм и 785 нм (рис. 33а).



Рисунок 33. а) Спектры поглощения образцов коллоидного раствора НЧ ИЦЗ, отсортированных по размеру, б) спектры флуоресценции коллоидов НЧ ИЦЗ, отсортированных по размеру при длине волны возбуждения 633 нм, в) спектры флуоресценции коллоидов НЧ ИЦЗ, отсортированных по размеру при длине волны возбуждения 785 нм.

Из полученных спектров флуоресценции при возбуждении лазером 785 нм видно, что основная часть J-агрегатов содержится в образце с размерами от 220 нм до 400 нм (рис. 33в), так как для данного образца наблюдается характерный пик поглощения на 897 нм, соответствующий J-агрегатам ИЦЗ.

# 3.4. Исследование спектроскопических свойств коллоидного раствора НЧ ИЦЗ перестраиваемой длиной волны.

Была произведена попытка регистрации резонансной флуоресценции коллоидного раствора НЧ ИЦЗ при возбуждении лазерным источником с перестраиваемой длиной волны в диапазоне 880-915 нм под углом 90° (рис.34).



Рисунок 34. Спектры лазерного излучения, рассеянного от образца под углом 90°: а) НЧ ИЦЗ, б) калибровочные сферы.



Рисунок 35. а) Максимумы интенсивности рассеянного лазерного излучения НЧ ИЦЗ и калибровочных сфер в зависимости от длины волны, б) отношение максимумов интенсивности НЧ ИЦЗ к калибровочным сферам.

Для оценки спектроскопических свойств коллоидного раствора НЧ ИЦЗ было получено отношение максимумов интенсивности рассеянного лазерного излучения от образца с фотосенсибилизатором к образцу калибровочных сфер (рис.35б). Данная кривая имеет провал в диапазоне 893-896 нм, который

совпадает с поглощением коллоидного раствора НЧ ИЦЗ. Было предположено, что по отношению максимумов интенсивностей рассеянного лазерного излучения на образце НЧ ИЦЗ к калибровочным сферам получится зафиксировать резонансную флуоресценцию, которая, как оказалось, имеет маленькую интенсивность.

Для исследования спектров флуоресценции коллоидного раствора НЧ ИЦЗ с концентрацией 0.025 мМ облучали излучением с длинами волн возбуждения 650 нм, 700 нм, 750 нм и 800 нм (рис.36а).



Рисунок 36. а) Спектры флуоресценции J-агрегатов коллоидного раствора НЧ ИЦЗ при возбуждении длинами волн 650 нм, 700 нм, 750 нм и 800 нм, б)

спектральная карта флуоресценции нормированных интенсивностей испускания

флуоресценции при различных длинах волн возбуждения.

Несимметричность спектра флуоресценции объясняется вкладом коротковолновым пропускающим фильтром, входящую в установку. При облучении образца коллоидного раствора НЧ ИЦЗ длинами волн 750 нм и 800 нм наблюдался интенсивный пик флуоресценции, соответствующего J-агрегатам НЧ ИЦЗ. При этом, при возбуждении образца длинами волн 650 нм и 700 нм кроме

пика флуоресценции, соответствующего J-агрегатам, в диапазоне с большей частотой наблюдается маленький пик флуоресценции, соответствующий мономерам ИЦЗ, пробивающийся через оптический фильтр, на длине волны 820 нм. Было отмечено, что с увеличением длины волны возбуждения наблюдается сдвиг пика флуоресценции в коротковолновую область при этом зависимость изменения длины волны пика флуоресценции от длины волны возбуждения носит линейный характер.

На рисунке 366 представлена зависимость интенсивности флуоресцентного сигнала (отображено цветом) от длины волны флуоресценции и длины волны возбуждения для коллоидного раствора НЧ ИЦЗ. Максимум интенсивности флуоресценции J-агрегатов НЧ ИЦЗ наблюдается при возбуждении длинами волн в диапазоне 775-800 нм. При этом также отмечается смещение флуоресценции Ј-агрегатов НЧ ИЦЗ в коротковолновую область при увеличении длины возбуждения. В данной работе были волны рассмотрены спектроскопические свойства коллоидного раствора НЧ ИЦЗ, состоящего преимущественно из J-агрегатов. Отмечается смещение пика флуоресценции Jагрегатов НЧ ИЦЗ в коротковолновую область при увеличении длины волны возбуждения. Спектральная карта флуоресценции при возбуждении различными длинами волн демонстрирует уширение спектра испускания с увеличением интенсивности при увеличении длины возбуждения.

#### 3.5. Модель поведения мономеров ИЦЗ, входящих в состав агрегата НЧ ИЦЗ в зависимости от размера наночастиц.

При исследовании рассеянного лазерного излучения, проходящего через скрещенные линейные поляризаторы, наблюдался сигнал, демонстрирующий деполяризацию лазерного излучения, рассеянного на J-агрегатах коллоидного раствора НЧ ИЦЗ. Деполяризация лазерного излучения на J-агрегатах обусловлена их структурой, представляющей собой квазиодномерные

91

наночастицы. J-агрегаты имеют сильную связь переходных диполей плотно упакованных мономеров ИЦЗ и ограничения по размеру и форме агрегата. Распространение возбуждения по экситонной связи в J-агрегатах близко коррелирует с длиной экситонной когерентности, а точнее с числом мономерных единиц, на которых делокализуется волновая функция экситона. Авторами Berlepsch H.V. и Böttcher C. [13] была обнаружена нитевидная морфология J-агрегатов ИЦЗ, образованная мономолекулярными слоями молекул, длинные оси которых лежат параллельно плоскости слоя.

Основываясь на законе действующих масс (ур.54-47) было получено минимальное количество молекул, выстроенных в кирпичную кладку J-агрегата НЧ ИЦЗ, равное n=4, для батохромного смещения оптических свойств коллоидного раствора. При воздействии электромагнитного излучения верхняя и нижняя молекулы приподнимаются одной стороной, обрывая связи взаимодействия между молекулами (рис.37). Предложенная конфигурация молекул в J-агрегате НЧ ИЦЗ потенциально согласуется с полученными данными из закона действующих масс (ур.68-71).



Рисунок 37. Схематическое изображение молекул в J-агрегате ИЦЗ при воздействии лазерного излучения.

Для исследования индикатрисы рассеяния было зарегистрировано рассеянное лазерное излучение на образце J-агрегатов коллоидного раствора НЧ ИЦЗ путем сканирования приемным волокном при разных углах рассеяния. Было отмечено, что эффективность рассеянного сигнала возрастает с уменьшением угла рассеяния. Индикатриса рассеяния коллоидного раствора НЧ ИЦЗ имеет вытянутую форму вперед, что подтверждается рассчитанным g-фактором анизотропии по формуле Хеньи-Гринштейна, равным 0,76.

Была исследована степень агрегации и средний размер Ј-агрегатов при увеличении концентрации коллоидного раствора НЧ ИЦЗ. Рассеянный сигнал при угле в 15° предоставил информацию о средней степени агрегации, при этом рассеянный сигнал при угле 145° демонстрировал информацию о среднем размере J-агрегатов. Было отмечено полидисперсное распределение агрегатов по размерам, при этом с увеличением концентрации возрастает размер J-агрегатов НЧ ИЦЗ и их степень агрегации, в то время как коэффициент поглощения падает, теоретическими исследованиями [68]. Уменьшение что согласуется с коэффициента поглощения Ј-агрегатов вызвано уменьшением удельной поверхности с увеличением их размера [69, 70]. Была определена критическая концентрация 0.075 мМ при которой J-агрегаты коллоидного раствора меняют способ достраивания кирпичной кладки конгломерата. До критической концентрации 0.075 мМ добавление ИЦЗ происходит мономеров преимущественно сверху и снизу J-агрегата и медленно в ширину. После критической концентрации 0.075 мМ J-агрегаты начинают медленно достраивать мономеры в высоту и способствуют добавлению молекул ИЦЗ по бокам и/или формируют новые Ј-агрегаты.

На изображениях, полученных методом СЭМ, J-агрегаты НЧ ИЦЗ представляют собой плотно упакованные молекулы с нитевидной морфологией, что согласуется с моделью упаковки кирпичной кладки молекул ИЦЗ, предложенной Куном и коллегами [71]. При этом происходит изменение

93

структурной морфологии J-агрегата при увеличении концентрации, что демонстрируется присоединением мономеров ИЦЗ к поверхности агрегатов.

Исходя из полученных данных, предложена новая модель структурного расположения молекул в J-агрегате ИЦЗ при воздействии лазерного излучения. Угол между диполями электронного перехода и молекулярной осью агрегата определяет, допустим ли переход на более низкие или более высокие уровни возбужденного состояния. В агрегатах Ј-и Н-типов ИЦЗ возбужденное состояние расщепляется на два вырожденных состояния. Состояние с более низкой энергией образуется в ИЦЗ Ј-типа, которое соответствует сонаправленно ориентированным переходным дипольным моментам, в то время как состояние верхнего уровня содержит дипольные моменты перехода с противоположными ориентациями. В J-агрегатах возможны только переходы на нижний уровень расщепленного возбужденного состояния, которые соответствуют красному спектральному сдвигу. Ј-агрегаты коллоидного раствора НЧ ИЦЗ выстроены мономолекулярными слоями молекул, длинные оси которых лежат параллельно плоскости слоя (рис.38). Смещение пика поглощения **Ј**-агрегата В длинноволновую область, 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 Jагрегата, которые приподнимаются, обрывая одну связь взаимодействия с молекулами агрегата с сильно увеличенным дипольным моментом (рис.38).

94



# Рисунок 38. 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.

#### Заключение к главе

В данной главе приведены попытки регистрации резонансной флуоресценции Ј-агрегатов НЧ ИЦЗ с помощью фемтосекундного лазера с перестраиваемой длиной волны в диапазоне 880-915 нм. Наблюдаемое уменьшение поглощения указывает на образование агрегатов, которое может быть аппроксимировано образованием слабо упакованных сферических частиц. В сферической модели Ј-агрегата НЧ ИЦЗ поглощающая способность уменьшается с увеличением степени агрегации молекул. Проведены экспериментальные исследования получения спектроскопических свойств наночастиц ИЦЗ в зависимости от размера, подтверждающие изменение коэффициента поглощения Ј-агрегатов ИЦЗ в зависимости от размера наночастиц. Рассчитаны степень агрегации и средний размер Ј-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 Ј-агрегата коллоидного раствора НЧ ИЦЗ при взаимодействии с лазерным излучением, заключающаяся в переходе поверхностных молекул J-агрегата из пара-положения в орто-положение.

#### ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИЦЗ В РАЗЛИЧНОМ БИОЛОГИЧЕСКОМ ОКРУЖЕНИИ

данной главе представлены результаты исследования динамики B накопления и распределения ИЦЗ в молекулярной и нано- формах в опухолевой ткани на модели монослоя клеток, трехмерных опухолевых сфероидах и лабораторных животных. Были проведены исследования накопления ФС в выводящих органах в максимуме накопления ИЦЗ в молекулярной и наноформах в опухолевой ткани. Проведен сравнительный анализ накопления и распределения ИЦЗ в молекулярной и нано- формах в опухолевой ткани спектроскопическим видеофлуоресцентным Исследована И методами. 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.

#### 4.1. Анализ накопления ИЦЗ в клетках in vitro

Накопление ИЦЗ в клетках оценивали по уровню интенсивности флуоресценции в полосе излучения ФС. Спектры флуоресценции были получены с поверхности клеток при возбуждении с длиной волны лазерного излучения 785 нм. Различное время инкубации опухолевых клеток с молекулярной формой ИЦЗ иллюстрирует практически стабильный уровень флуоресценции и одинаковую форму спектральных линий (рис.39).



Рисунок 39. Спектры флуоресценции молекулярной формы ИЦЗ из опухолевых клеток при различном времени инкубации.

Для оценки скорости накопления ФС была получена динамика накопления НЧ ИЦЗ в опухолевых клетках. Примечательно, что наблюдались два пика флуоресценции, соответствующие мономерам ИЦЗ и J-агрегатам в динамике (рис.40). Спектр состоит из мономерного пика с максимумом на 848 нм и Jагрегатного пика с максимумом на 910 нм. Были получены изменения пропорций интенсивности флуоресценции, соответствующие пикам мономера и J-агрегата, в динамике с длиной волны возбуждения 785 нм.



Рисунок 40. Спектры флуоресценции НЧ ИЦЗ из опухолевых клеток.

Профиль флуоресценции был аппроксимирован функцией псевдо-Фойгта в виде линейной комбинации распределений Гаусса и Лоренца (двух механизмов уширения) [72]. На рисунке 41 показан пример аппроксимации спектров флуоресценции НЧ ИЦЗ, накопленных в опухолевых клетках.



Рисунок 41. Пример аппроксимации псевдо-Фойгта кривой флуоресценции НЧ ИЦЗ.

Аппроксимация позволяет получить данные интегральной интенсивности мономерных и J-агрегатных пиков (рис.42а). Можно отметить изменение интенсивности мономеров и J-агрегатов со временем.



Рисунок 42. а) Интегральная зависимость спектра НЧ ИЦЗ соответствует мономерам и J-агрегатам, б) отношение пика J-агрегата к пику мономера.

Отмечается, что с течением времени пик флуоресценции, соответствующий J-агрегатам ИЦЗ в клетках, увеличивается в течение первых 3 часов, что указывает на различную скорость накопления. В течение следующих 6 часов соотношение остается постоянным (рис.42б).

Конгломераты клеток были исследованы при помощи лазерного конфокального микроскопа.



Рисунок 43. Флуоресцентное изображение конгломерата клеток с содержанием молекулярного раствора ИЦЗ при возбуждении 633 нм справа, слева спектры флуоресценции.

Красный цвет изображения соответствует флуоресценции ИЦЗ при возбуждении Не-Ne лазером с длиной волны 633 нм. В единичных клетках наблюдается равномерное распределение ФС по цитоплазме, что подтверждается спектроскопически, наличием флуоресцентного сигнала ФС внутри клетки (рис. 43). Точечно были выбраны три участка для исследования спектров флуоресценции ИЦЗ внутри клеток. Спектроскопический анализ показывает преимущественно наличие флуоресценции, соответствующей мономерной форме ИЦЗ.

# 4.2. Исследование накопления флуоресцентных красителей БИК-диапазона на моделях трёхмерных сфероидов при помощи видеофлуоресцентной аппаратуры.

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 [63, 73]. Для оценки накопления и распределения ФС по телу сфероида, экспериментальные модели инкубировались с препаратами до максимума накопления. Инкубация сфероидов проводилась при влажности 5% СО<sub>2</sub> и температуре 37°С в темноте. Концентрации для всех исследуемых ФС были одинаковыми: 10, 20, 40, 60, 80 мг/кг и были выбраны исходя из клинически ΦC препаратов. в используемых концентраций различных формах инкубировались с мультиклеточными опухолевыми сфероидами до максимума накопления препарата. Для ИЦЗ в молекулярной форме время инкубации составило 2 часа. Для коллоидного раствора НЧ ИЦЗ максимум накопления ФС составил 24 часа. После инкубации сфероиды дважды отмывали от несвязанного ФС с использованием буфера. Для возбуждения флуоресценции препаратов, использовались лазерные источники, длины волн которых соответствуют пикам поглощения препаратов, и подходящие для них фильтры, позволяющие регистрировать изображение в видимом и флуоресцентном диапазоне.

Для выполнения измерений распределения и накопления ФС по телу сфероидов в одинаковых условиях эндоскоп фиксировался в штативе.

102

Были получены изображения мультиклеточных опухолевых сфероидов с содержанием НЧ ИЦЗ в трех режимах: в видимом свете, флуоресцентном и в режиме наложения.



Рисунок 44. 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 сфероидах, от концентрации.

По флуоресцентным изображениям показано изменение флуоресценции ФС между сфероидами с различными концентрациями. Флуоресцентный сигнал концентрации инкубации. препарата повышается С увеличением при Изображения сфероидов в видимом свете не показывают видимых изменений поверхности сфероидов изменении концентрации препарата. при флуоресценции Диагностический маркер подтверждает повышение с увеличением концентрации.

Эндоскопическая флуоресцентная система позволила получить изображение сфероидов в трех режимах: видимом, флуоресцентном и в режиме наложения. 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 программным обеспичением видеофлуоресцентной системы, позволил оценить локализацию и степень накопления ФС в разных частях сфероида в реальном времени. Количественная оценка флуоресцентного сигнала показала рост средней интенсивности флуоресценции от концентрации. Видеосистема с эндоскопом позволила наблюдать мультиклеточные опухолевые сфероиды размером 500 мкм.

# 4.3. Сравнительный анализ связывания НЧ ИЦЗ с гемоглобином и плазмой крови.

После внутривенного введения препарат ИЦЗ связывается с белками плазмы крови, в частности с белками альбумина и альфа-глобулина в крови в соотношении что 95% и 4% соответственно [74-79]. Поэтому были исследованы оптические свойства ИЦЗ в композитной форме (рис.45) [80].



Рисунок 45. Спектры поглощения ИЦЗ в крови и плазме а) в молекулярной форме, б) в нано-форме.

В молекулярной форме ИЦЗ наблюдаются два пика флуоресценции при 783 нм и 720 нм, связанные с мономерами и Н-агрегатами, соответственно (рис. 45а). Когда ИЦЗ добавляется в кровь, его спектроскопические свойства изменяются, и пик поглощения, соответствующий мономеру, смещается в красную область до 800 нм, в то время как пик, соответствующий Н-агрегатам, смещается до 738 нм. В то же время, когда молекулярная форма ИЦЗ добавляется в плазму, пик поглощения мономеров смещается до 810 нм, а Н-агрегатов — до 741 нм (рис. 45а). Изменения спектральных характеристик молекул ИЦЗ, связанных с белками плазмы, до конца не изучены, предположительно, происходит модификация переходов между энергетическими уровнями, что приводит к сдвигу пиков флуоресценции мономеров и димеров Н-типа. В то же время спектроскопические свойства коллоидного раствора НЧ ИЦЗ не изменяются при добавлении крови и плазмы, что указывает на отсутствие связывания J-агрегатов с белками плазмы (рис. 456).

Динамика сигнала флуоресценции НЧ ИЦЗ была получена после его добавления в кровь и плазму человека (рис. 46).



Рисунок 46. Спектры флуоресценции НЧ ИЦЗ при возбуждении на длине волны 800 нм в разные временные точки, а) с кровью, б) с плазмой. Цветные вертикальные

линии указывают области под спектральной кривой, соответствующие мономерам ИЦЗ и J-агрегатам.

Изменения спектроскопических свойств НЧ ИЦЗ в крови и плазме с течением времени оценивались по спектрам флуоресценции, полученным в нескольких временных метках после приготовления растворов (рис. 46). Как подходящая для возбуждения флуоресценции мономерной формы ИЦЗ и Jвыбрана длина волны возбуждения 800 агрегатов была HM. Кривые флуоресценции имеют плечо спектра мономеров в области 830-875 нм и пик 900 флуоресценции Ј-агрегата Co с максимумом на HM. временем флуоресцентный сигнал НЧ ИЦЗ уменьшался, что указывает на фотодеградацию мономерной формы ИЦЗ и разложение Ј-агрегата.



Рисунок 47. Пример аппроксимации функцией Гаусса кривой флуоресценции композитной формы НЧ ИЦЗ.

Спектр флуоресценции аппроксимировался с помощью комбинаций функции Гаусса (рис. 47). Подгонка пиков флуоресценции иллюстрирует перекрывающиеся пики мономерной формы ИЦЗ и J-агрегата. Аппроксимация была проведена путем вручную выбранных максимумов функцией Гаусса.



Рисунок 48. Отношение площади пика флуоресценции J-агрегатов ИЦЗ к площади пика флуоресценции мономеров IGG в крови и плазме при возбуждении на длине волны 800 нм.

Для определения стабильности J-агрегатов ИЦЗ в крови и плазме оценивали динамику отношения площади пика флуоресценции, соответствующей флуоресценции **Ј**-агрегатов ИЦЗ, К площади пика флуоресценции мономеров ИЦЗ в крови и плазме человека при возбуждении на длине волны 800 нм (рис. 48). Отмечается, что со временем интегральная интенсивность флуоресценции для пика, соответствующего Ј-агрегатам ИЦЗ в крови, увеличилась по сравнению с мономерами ИЦЗ, что указывает на фотодеградацию молекулярной формы ИЦЗ и стабильность формы агрегации НЧ ИЦЗ. В то же время интенсивность флуоресцентной кривой коллоидного раствора НЧ ИЦЗ в целом уменьшается с течением времени.

107

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 Ј-агрегата не наблюдается. 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 низкую фотостабильность формы мономеров ИШЗ. Соотношение на интегральной флуоресценции мономеров к Ј-агрегатам демонстрирует различное поведение в крови и плазме. Пик флуоресценции Ј-агрегата в крови увеличился, что можно объяснить стабильностью агрегата. Интегральное соотношение мономеров к Ј-агрегатам в плазме иллюстрирует одинаковое снижение фотостабильности мономерной формы ИЦЗ с одинаковой скоростью и переход агрегатов Ј-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.

#### 4.4. Проведение экспериментальных работ по исследованию

внутритканевого распределения флуоресцентных красителей ДК и БИК диапазонов в молекулярной и нано-форме методами спектроскопического мониторинга.

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

108
фотосенсибилизаторов в молекулярной и нано-формах было выбрано парентеральное введение в виде однократной струйной внутривенной инъекции в системный кровоток. Все исследуемые ФС ИЦЗ и НЧ ИЦЗ медленно вводили внутривенно в хвостовую вену в дозе 10 мг/кг в объеме 0.2 мл, среднее время введения составило 30 секунд. Доза введения была выбрана из аналогии с используемыми в клинической практике дозами ФС при фотодинамической терапии, а также путем предварительных экспериментальных изысканий. Все животные хорошо перенесли введение ФС, не было отмечено никаких побочных эффектов [81].

Спектры флуоресценции ФС в тканях мыши через разные промежутки времени после введения ФС регистрировали с использованием волоконнооптического устройства при возбуждении лазерами с длинами волн генерации 633 нм, 785 нм и 800 нм. Для каждой временной точки измерений, для каждого животного от каждого органа регистрировали по 5 спектров, которые потом усредняли и использовали для статистического анализа. Для исследований распределения ФС по органам в соответствующие временные точки после умерщвлялись внутривенного введения препарата животные были И препарированы. Так были получены спектральные данные от печени, почек, селезенки, легких, кожи, сердца. Стоит также отметить, что оптические свойства различных органов сильно отличаются по своим поглощающим и рассеивающим характеристикам. В этой связи для наглядного и правомерного сравнения содержания ФС в них было учтено рассеяние от каждого типа исследуемой ткани, путем нормировки на рассеянную лазерную линию, что приводится в графиках. Для регистрации спектров от опухолевой ткани измерения проводили на живых мышах. Вычисляя интегральную площадь пика люминесценции ФС, строили зависимость интенсивности люминесценции наночастиц в тканях и органах животного во времени.

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.49-51). Все животные хорошо перенесли введение как молекулярного раствора, так и коллоида НЧ ИЦЗ, побочных эффектов отмечено не было. Также были получены спектры флуоресценции кожи, которая служила образцом нормальной ткани.



Рисунок 49. Спектры флуоресценции молекулярного раствора ИЦЗ в ткани ксенографта FaDu y nude мышей, а) при возбуждении длиной волны 633 нм, б) при возбуждении длиной волны 800 нм.



a)

b)

c)

Рисунок 50. Спектры флуоресценции НЧ ИЦЗ в ткани ксенографта FaDu у nude мышей, а) при возбуждении длиной волны 633 нм, б) при возбуждении длиной волны 800 нм.



Рисунок 51. Интегральная зависимость спектральной кривой красителей в ткани ксенографта FaDu y nude мышей при возбуждении длинами волн 633 нм, 785 нм и 800 нм а) молекулярного раствора ИЦЗ, б) наночастиц НЧ ИЦЗ.

Такой анализ показал, что максимальное накопление ИЦЗ в молекулярной форме в ткани ксенографта FaDu y nude мышей происходит в течение первых 5 минут после введения. После чего происходит быстрое выведение препарата, по сравнению с другими флуоресцентными красителями, которые разрешены к клиническому применению, такие как хлорин е6, фталоцианин алюминия и 5аминолиулиновая кислота. Данные, полученные при исследовании образцов нормальной кожи во всех временных точках, колеблются в диапазоне, выделенном между двумя спектральными кривыми розовым цветом.

Таким образом, спектральный анализ показал, что накопление в ткани ксенографта FaDu y nude мышей НЧ ИЦЗ является максимальным через 24 часа после системного введения препарата. В результате анализа спектрального состава сигнала флуоресценции, соответствующего молекулярной форме НЧ ИЦЗ, был зарегистрирован его максимум через 72 часа после введения флуоресцентного красителя. Полученная динамика позволяет сделать вывод о том, что нано-форма позволяет флуоресцентному красителю накапливаться и надолго задерживаться в опухоли – до 24 часов, после чего, вероятно, происходит постепенный переход нано-формы в молекулярную форму флуоресцентного красителя на третьи сутки после введения. Изначальная задача повысить время накопления в опухоли была решена путем перехода к нано-форме препарата. Его последующее растворение В опухоли также положительной является особенностью, поскольку молекулярная форма ИЦЗ является фотодинамически активной [82], что позволит в дальнейшем, наряду с диагностикой, эффективно осуществлять фототерапию опухолей. Кроме того, молекулярная форма ИЦЗ имеет спектральные характеристики (возбуждение 785 и 800 нм и флуоресценция 845 нм против возбуждения на 633 нм и флуоресценции 710 нм для нано-формы), глубоко которые позволят максимально осуществлять флуоресцентную диагностику.

Для оценки накопления ИЦЗ в молекулярной и нано-форме в органах выведения в максимуме аккумуляции препарата были получены спектры флуоресценции и распределение интенсивности флуоресценции НЧ ИЦЗ по органам и в коже. При возбуждении 633 нм, 785 нм и 800 нм в момент максимального флуоресцентного сигнала в опухоли для молекулярной формы ИЦЗ 5 минут, для коллоидного раствора НЧ ИЦЗ - 24 часа (рис. 52-54). За нормальную ткань (норма) была взята кожа лабораторной мыши, так как ИЦЗ

является флуоресцентным красителем сосудистого типа. Таким образом, демонстрируется отсутствие значительной контрастности препарата, поскольку уровень накопления в опухоли незначительно превосходит уровень общего накопления в коже по сравнению с другими флуоресцентными красителями, при этом уровень накопления ИЦЗ в печени и в почках является наибольшим, что подтверждает наличие процессов быстрого выведения. Полученные результаты хорошо коррелируют с экспериментальными данными других исследований [83], поскольку ИЦЗ используют в клинике как контрастный агент для визуализации сосудистой сети, что правомерно ввиду его быстрого выведения.



Рисунок 52. Спектры флуоресценции и зависимость интенсивности флуоресценции красителей в органах выведения в момент максимального накопления в опухоли, а) молекулярного раствора ИЦЗ при возбуждении длиной волны 633 нм, б) НЧ ИЦЗ при возбуждении длиной волны 633 нм.



Рисунок 53. Спектры флуоресценции и зависимость интенсивности флуоресценции красителей в органах выведения в момент максимального





Рисунок 54. Спектры флуоресценции и зависимость интенсивности флуоресценции красителей в органах выведения в момент максимального накопления в опухоли, а) молекулярного раствора ИЦЗ при возбуждении длиной волны 800 нм, б) НЧ ИЦЗ при возбуждении длиной волны 800 нм.

Таким образом, демонстрируется высокая контрастность накопления НЧ ИЦЗ в опухоли в период 24 часов после системного введения флуоресцентного красителя при сравнении с молекулярной формой. Однако, как было показано выше, вероятный переход препарата в молекулярную форму сопровождается разгоранием флуоресценции молекулярной формы ИЦЗ в опухоли. Однако, анализ тканей органов выведения позволил заключить, что подобные процессы идут не только в опухоли, но и во всех органах выведения, а наиболее активно в печени и почках. Кроме того, наблюдается интенсивный пик флуоресценции на 905 нм, что демонстрирует большое количество агрегатов J-типа в печени и селезенке.

## 4.5. Проведение экспериментальных работ по исследованию внутритканевого распределения флуоресцентных красителей ДК и БИК диапазонов в молекулярной и нано-форме при помощи

#### видеофлуоресцентной системы.

Параллельно со спектроскопическими исследованиями распределения флуоресцентных красителей по тканям и органам выведения лабораторных животных после внутривенного введения флуоресцентного красителя была проведена флуоресцентная диагностика при помощи интраоперационной диагностической видеосистемы (рис.55-60).



Рисунок 55. Флуоресцентные изображения мыши с подкожным ксенографтом карциномы человека FaDu после внутривенного введения флуоресцентного красителя и органах выведения в максимуме накопления молекулярного раствора ИЦЗ в опухоли при возбуждении длиной волны 635 нм.



Рисунок 56. Флуоресцентные изображения мыши с подкожным ксенографтом карциномы человека FaDu после внутривенного введения флуоресцентного красителя и органах выведения в максимуме накопления молекулярного раствора ИЦЗ в опухоли при возбуждении длиной волны 785 нм.



Рисунок 57. Флуоресцентные изображения мыши с подкожным ксенографтом карциномы человека FaDu после внутривенного введения флуоресцентного красителя и органах выведения в максимуме накопления молекулярного раствора ИЦЗ в опухоли при возбуждении длиной волны 800 нм.



Рисунок 58. Флуоресцентные изображения мыши с подкожным ксенографтом карциномы человека FaDu после внутривенного введения флуоресцентного красителя и органах выведения в максимуме накопления НЧ ИЦЗ в опухоли при возбуждении длиной волны 635 нм.



Рисунок 59. Флуоресцентные изображения мыши с подкожным ксенографтом карциномы человека FaDu после внутривенного введения флуоресцентного красителя и органах выведения в максимуме накопления НЧ ИЦЗ в опухоли при возбуждении длиной волны 785 нм.



Рисунок 60. Флуоресцентные изображения мыши с подкожным ксенографтом карциномы человека FaDu после внутривенного введения флуоресцентного красителя и органах выведения в максимуме накопления НЧ ИЦЗ в опухоли при возбуждении длиной волны 800 нм.

Разгорание сигнала флуоресценции молекулярной формы ИЦЗ в опухоли при локальном накоплении происходит сразу после введения флуоресцентного красителя. В ходе анализа средней интенсивности флуоресценции в отдельных точках изображений было отмечено, что максимальное накопление исследуемого препарата в опухоли происходит через 5 мин после внутривенного введения препарата. Одновременно с этим, наблюдается незначительное содержание флуоресцентного красителя в органах выведения, что хорошо коррелирует с данными, полученными спектральными методами.

Результаты видеофлуоресцентной диагностики продемонстрировали механизм перехода флуоресцентного красителя в нано-форму на основе ИЦЗ в молекулярной форме с течением времени путем растворения. Полученные флуоресцентные изображения демонстрируют отчетливый рост сигнала соответствующего нано-форме ИЦЗ при флуоресценции, длине волны возбуждения 635 нм в первые 24 часа после введения, и его же спад впоследствии (рис.58), наряду co значительным ростом сигнала, соответствующего флуоресценции молекулярной формы ИЦЗ в период 21ч-72ч (рис.59-60). Таким образом, нано-форма флуоресцентного красителя демонстрирует оптимальные свойства как с точки зрения использования спектрального окна максимальной прозрачности для его возбуждения и, как следствие, возможности анализа глубоких слоев биоткани, так и значительную тропность к опухоли в сочетании с оптимальными характеристиками накопления агрегатной формы ИЦЗ (до 24 часов) и выведения препарата в мономерной форме ИЦЗ (до 3 дней).

В качестве результата исследования данного типа наночастиц стоит подчеркнуть, что нано-форма НЧ ИЦЗ является перспективной с точки зрения своих спектрально-флуоресцентных свойств, а также с точки зрения локального контрастного накопления нано-формы в опухоли. Обнаруженные процессы наибольшей интенсивности флуоресценции молекулярного ИЦЗ, образовавшегося из НЧ ИЦЗ на 2 и 3 день после введения, играют также положительную роль в качестве подтверждения нормального протекания процессов выведения, что обеспечивает безопасность новой нано-формы в качестве использования ИЦЗ в агрегатной форме для флуоресцентной диагностики.

Молекулярная форма ИЦЗ демонстрирует оптимальные спектральные характеристики, а именно, эффективное возбуждение лазерным излучением с длиной волны генерации 633 нм, 785 нм и 800 нм, то есть в дальней видимой красной и БИК областях спектра, а также интенсивный спектр флуоресценции с максимумом на длине волны 845 нм, необходимой для глубокого зондирования биологических тканей. Однако, быстрое выведение препарата не позволяет перспективным считать его применение В конкретной форме ЛЛЯ интраоперационной флуоресцентной навигации. В клинике, в основном, ИЦЗ используют как контрастный агент для визуализации сосудистой сети, что правомерно ввиду его быстрого выведения. Как уже было подмечено, контрастирование и флуоресцентная интраоперационная диагностика опухолей ИЦЗ в молекулярной форме не представляется возможной. Именно, в связи с этим была рассмотрена нано-форма НЧ ИЦЗ с сохранением его спектральных свойств, которые дают данному препарату особые преимущества. Связь дипольных моментов перехода хромофоров при агрегации приводит к делокализации электронно - возбужденных состояний и, как правило, связана с существенными изменениями оптических свойств с проявлением батохромной (J-полоса) полосы поглощения агрегатов по отношению к мономерной полосе.

Результаты динамики сигнала флуоресценции при лазерном возбуждении с длинами волн 785 нм и 800 нм в опухоли после внутривенного введения молекулярной формы ИЦЗ продемонстрировали максимальный сигнал флуоресценции флуоресцентного красителя сразу после введения, после чего происходит его равномерное выведение в течении часа. Однако, стоит отметить, что возбуждение флуоресценции на длинах волн 785 нм и 800 нм позволяет сканировать глубокие слои биоткани.

Исследуемый флуоресцентный краситель ИЦЗ в молекулярной форме многообещающие спектрально-флуоресцентные имеет характеристики, необходимые для возбуждения глубоких слоев биотканей. Однако, полученные результаты, которые представлены выше демонстрируют, что ИЦЗ обладает незначительной контрастностью накопления в опухоли, по сравнению с другими флуоресцентными красителями, и характерным быстрым выведением [79]. Поэтому, была использована исследована И технология нано-формы флуоресцентного красителя на основе ИЦЗ, описанная в работе [84]. Спектры флуоресценции НЧ ИЦЗ в опухоли мыши через разные промежутки времени после системного введения препарата регистрировали с использованием трех источников возбуждения, что связано с тем, что *in vivo* контролировалось присутствие обеих форм флуоресцентного красителя как молекулярной, которая эффективно возбуждается на 633 нм, 785 нм и 800 нм, так и нано-формы, которая эффективно возбуждается на 633 нм для визуализации Н-агрегатов и на 785 нм и 800 нм для визуализации J-агрегатов [81].

Таким образом, флуоресцентный краситель на основе ИЦЗ имеет оптимальные спектральные свойства, но высокую скорость выведения из организма, что не является приемлемым для интраоперационной получена флуоресцентной Была диагностики. динамика накопления флуоресцентного красителя НЧ ИЦЗ в нано-форме, и при этом одновременно контролировались процессы его взаимодействия с биологической тканью. В

частности, процессы перехода нано-формы в молекулярную, что возможно при растворении препарата различными клеточными органеллами, и зависимости флуоресцентного интенсивности люминесценции красителя В опухоли животного от времени при разных длинах волн возбуждения. Разработка и апробация новой нано-формы НЧ ИЦЗ является перспективными для увеличения его тропности к опухоли. Присутствие нано-формы флуоресцентного красителя обнаруживается не сразу, а в среднем через 24 часа после внутривенного введения препарата. Однако, в течение 72 часов происходит медленный переход от нано-формы ИЦЗ в молекулярную форму, что позволяет наблюдать свечение опухоли в течение какого-то времени. НЧ ИЦЗ имеют тенденцию к выведению из организма ретикуло-эндотелиальной системой. Самая высокая концентрация наночастиц флуоресцентного красителя наблюдается в печени, почках и селезенке, также его высокая концентрация отмечается в легких. Такое разработанная ΗЧ ИЦЗ распределение демонстрирует, что форма метаболизируются через печень. Таким образом, в новой нано-форме НЧ ИЦЗ контрастирование и флуоресцентная интраоперационная диагностика опухолей представляются возможными и эффективными для анализа глубоких слоев биотканей.

Известно, что при внутривенном введении молекулярной формы ИЦЗ связывается с белками альбумина и альфа-глобулина, что влияет на изменение спектроскопических свойств ИЦЗ, что, в свою очередь сказывается на смещении мономерного пика поглощения в красную область спектра. При этом, данное явление не наблюдается в агрегатной форме ИЦЗ, что показывает их стабильность при взаимодействии с белками плазмы крови. Исследование динамики флуоресцентного сигнала разных форм ИЦЗ в крови и плазме показало стабильность J-агрегатов в плазме, но при этом выявило их переход в мономеры при взаимодействии с кровью.

# 4.6. Время жизни флуоресценции ИЦЗ в молекулярной и нано- формах на монослое клеточной модели опухоли *in vitro*

Кинетика затухания флуоресценции была получена с помощью лазерного спектроскопического комплекса на основе стрик-камеры C10627-13 Hamamatsu Photonics. На рисунке 61 представлена кинетика затухания флуоресценции молекулярного раствора ИЦЗ. Каждой точке соответствует определенное количество фотонов, которое кодируется цветом. Переходу цветов от синего к зеленому, желтому, оранжевому и к черному соответствует увеличение числа фотонов. По вертикальной оси отмечено время изменения числа фотонов для каждой длины волны, отмеченной на горизонтальной оси. Ниже приведен профиль флуоресцентного сигнала, исследуемых ФС.



Рисунок 61. а) Спектр кинетики затухания флуоресценции молекулярного раствора ИЦЗ, б) спектр кинетики затухания флуоресценции коллоидного раствора НЧ ИЦЗ.

На рисунке 61а отмечается интенсивный пик флуоресценции, соответствующий мономерам ИЦЗ, и пик, соответствующий димерам Н-типа.

При этом у коллоидного раствора наблюдается только пик флуоресценции, соответствующий Н-агрегатам (рис.61б) [85]. Опухолевые образцы с содержанием ИЦЗ в молекулярной и нано- формах были исследованы при помощи конфокального микроскопа.

В максимуме накопления коллоидного раствора НЧ ИЦЗ лабораторных мышей с перевитыми ксенографтами FaDu были выведены из эксперимента. Для исследования накопления НЧ ИЦЗ в раковых клетках были получены криосрезы опухолевой ткани (рис.62).



Рисунок 62. Флуоресцентное изображение криосрезов опухолевой ткани с содержанием молекулярного раствора ИЦЗ при возбуждении 633 нм со спектрами флуоресценции.

На рисунке 62 в выбранных точках наблюдается спектр флуоресценции, соответствующий димерам Н-типа ИЦЗ.

На рисунке 63 приведена аппроксимация кинетики затухания флуоресценции ФС в опухолевых клетках с помощью двухкомпонетной экспоненциальной функции.



Рисунок 63. Спектр кинетики распада флуоресценции, полученный с поверхности клетки С6 с помощью, а) ИЦЗ в молекулярной форме, б) ИЦЗ в нано-форме.

По характеру спектральной кривой можно сделать вывод о наличии двух компонент времени жизни флуоресценции.

В разных оптических диапазонах было получено время жизни ИЦЗ формах. ИЦЗ флуоресценции В различных Для молекулярного спектральный диапазон составлял от 790 нм до 860 нм, что соответствует мономерам ИЦЗ. Для коллоидного раствора ИЦЗ были зарегистрированы данные о времени жизни флуоресценции от 700 нм до 730 нм, что соответствует Нагрегатам ИЦЗ.



Рисунок 64. а) Зависимость времени жизни флуоресценции от концентрации ИЦЗ, б) зависимость отношения амплитуды времени жизни флуоресценции к концентрации ИЦЗ.

Математическая обработка полученного спектра кинетики затухания флуоресценции демонстрирует наличие двух периодов жизни флуоресценции для молекулярной формы ИЦЗ 0.22±0.04 нс и 0.63±0.01 нс, а также двух периодов жизни флуоресценции для нано-форм ИЦЗ 0.28±0.03 нс и 1.21±0.08 нс (рис.64а). Время жизни флуоресценции ИЦЗ в молекулярной и нано- формах не изменяется с ростом концентрации. Результаты показывают разницу между значениями времени жизни флуоресценции различных форм ИЦЗ. Первая составляющая времени жизни флуоресценции молекулярной формы ИЦЗ в 0,2 раза ниже, чем первая составляющая НЧ ИЦЗ. Однако вторая составляющая времени жизни флуоресценции молекулярной формы ИЦЗ почти в 2 раза ниже, чем НЧ ИЦЗ. Отношение амплитуд времени жизни флуоресценции ИЦЗ уменьшается с ростом концентрации, в то время как значения отношения амплитуд времени жизни флуоресценции НЧ ИЦЗ остаются на том же уровне [86].

Исследование демонстрирует контраст спектральных характеристик ИЦЗ в мономерах и агрегатном типе. Кроме того, во время накопления в опухолевых клетках наблюдалась трансформация из мономеров в J-агрегаты. Анализ

флуоресценции показывает разницу кинетики между временем жизни флуоресценции, что позволяет отделять формы ИЦЗ в биологической ткани. ИЦЗ стабильность Однако демонстрирует продолжительности жизни флуоресценции с ростом концентрации. НЧ ИЦЗ имеют огромные перспективы флуоресцентной диагностики опухолей головного мозга благодаря ДЛЯ спектроскопическим свойствам и способствуют сохранению здоровой ткани головного мозга.

Была исследована кинетика затухания флуоресценции ИЦЗ в молекулярной и нано-форме в опухолевом микроокружении на модели лабораторных животных.



Рисунок 65. Зависимость значения времени жизни флуоресценции ФС ксенографтом карциномы человека FaDu после внутривенного введения флуоресцентного красителя от времени накопления ФС, а) молекулярного раствора ИЦЗ, б) коллоидного раствора НЧ ИЦЗ.

В опухолевой модели nude мышей наблюдались две компоненты времени жизни флуоресценции ИЦЗ в молекулярной и нано- формах. 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 (рис.65а), а также двух периодов жизни флуоресценции для нано-формы ИЦЗ 1.25±0.09 нс и 0.28±0.02 нс, соответствующей агрегатам Н-типа (рис.65б). Было отмечено соответствие между временными характеристиками флуоресценции Н-агрегатов молекулярного раствора ИЦЗ и коллоидного раствора НЧ ИЦЗ, накопленных в опухолевой модели nude мышей.

#### Заключение к главе

Исследование демонстрирует контраст спектральных характеристик ИЦЗ в мономерах И агрегатном типе. Максимумы накопления изученных флуоресцентных красителей в молекулярной и нано- формах 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 Ј-агрегатов является альтернативным подходом к повышению общей стабильности ИЦЗ в организме. Установлено, что НЧ ИЦЗ перспективны для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии 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 Jагрегатах НЧ ИЦЗ при возбуждении 785 нм и 800 нм, в то время как Ј-агрегаты представляют интерес для дальнейших исследований. ИЦЗ является более подходящим красителем для флуоресцентной диагностики кровотока и лимфотока вблизи злокачественного новообразования из-за его быстрого выведения из организма. Анализ кинетики флуоресценции показывает разницу между временем жизни флуоресценции, которая позволяет разделять формы ИЦЗ в биологической ткани. 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.

### ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИЦЗ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ И НАНО- ФОРМАХ НА БИОЛОГИЧЕСКИХ МОДЕЛЯХ

В данной главе описываются результаты исследования изменения спектров флуоресценции биологических фантомов, воспроизводящих оптические свойства биологической ткани, с различной концентрацией ИЦЗ в молекулярной и нано- формах. Параллельно были получены флуоресцентные изображения фантомов с использованием разработанной флуоресцентной интраоперационной видеосистемы, позволяющей определить относительное содержание ФС в модельных образцах. Показано соответствие результатов корреляционного анализа, демонстрирующие коэффициент корреляции Пирсона и коэффициент детерминации для оценки соответствия результатов, полученных при помощи спектроскопической системы и видеофлуоресцентной интраоперационной Продемонстрированные применение разработанной системы. видеофлуоресцентной системы в клинической практике для флуоресцентной диагностики злокачественных новообразований головы и шеи, с использованием ФС на основе Себ, и печени с применением молекулярной формы ИЦЗ.

### 5.1. Измерение спектров флуоресценции ИЦЗ в молекулярной и наноформах, в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах на модельных образцах.

Были изучены спектральные свойства флуоресценции ИЦЗ в молекулярной и нано- формах на модельных образцах, называемых фантомами, которые с достаточной точностью воспроизводят оптические и структурные свойства реальных тканей [87]. Фантом биологической ткани (кожи) представляет собой раствор 1,6% жировой эмульсии (Интралипид®). Концентрации для всех исследуемых ФС были одинаковыми: 1, 2, 3, 5, 8, 10 мг/кг и были выбраны исходя из клинически используемых концентраций препаратов. Возбуждение

флуоресценции ИЦЗ в молекулярной и нано-форме производилось лазерами с длинами волн генерации 633 нм и длинноволновым фильтром 635 нм; 785 нм с пропускающим фильтром в диапазоне 810-860 нм для исследования растворов и длинноволновым фильтром на 830 нм для исследования солидных исследуемых моделей; и лазером с длиной волны генерации 800 нм с длинноволновым 830 красителя. Для фильтром HM для регистрации флуоресценции воспроизведения флуоресцентных изображений тканей экспериментальных использовалась видеосистема фильтром, животных С регистрирующая флуоресцентный сигнал в диапазоне 814-850 нм. Флуоресцентные изображения ИЦЗ в молекулярной и нано-форме были получены при возбуждении лазерами с длинами волн генерации 635 нм, 785 нм и 800 нм. Для сохранения рабочего расстояния между эндоскопом и экспериментальным образцом, эндоскоп фиксировался на штативе для сохранения одинаковых условий при получении информации о модельных средах.

Спектры флуоресценции, нормированные на линию лазерного излучения ( $\lambda_{ex}$ =633 нм) полученные для образцов ИЦЗ в молекулярной форме с различными концентрациями и интегральные зависимости модельных образцов, приведены на рисунке 66.



Рисунок 66. Спектры флуоресценции и интегральные зависимости спектральных кривых модельных образцов (фантомов) биологической ткани

при возбуждении на 633 нм с содержанием молекулярного раствора ИЦЗ в



#### различных концентрациях.

Рисунок 67. Зависимость интенсивности флуоресценции модельных образцов (фантомов) биологической ткани от концентраций ИЦЗ в молекулярной и в нано-формах при возбуждении различными длинами волн.

С повышением концентрации повышается интенсивность флуоресценции ИЦЗ в молекулярной и нано- формах при возбуждении на длинах волн 633 нм, 785 нм и 800 нм (рис.67). При этом, при возбуждении на длине волны 633 нм в молекулярном растворе ИЦЗ наблюдается два пика флуоресценции, соответствующих Н-агрегатам и мономерам на 700 нм и 850 нм, соответственно. В то же время в коллоидном растворе НЧ ИЦЗ 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.

5.2. Измерению оптических характеристик ИЦЗ в молекулярной и наноформах при помощи разработанной интраоперационной флуоресцентной видеосистемы.

Также, были получены изображения фантомов с различным содержанием ИЦЗ в молекулярной форме при помощи видеофлуоресцентной системы в трех режимах: в видимом свете, во флуоресцентном и в режиме наложения (рис.68-69) [87].



Рисунок 68. а) Цветное изображение модельных образцов: фантомы биологической ткани с различным содержанием молекулярного раствора ИЦЗ, б) черно-белое изображение модельных образцов: фантомы биологической ткани с различным содержанием молекулярного раствора ИЦЗ при возбуждении на длине волны 635 нм.

Изображения образцов фантомов с различными концентрациями ИЦЗ были получены с помощью цветной камеры, и визуальных отличий в цвете образцов не наблюдалась (рис.68а). Флуоресцентное изображение продемонстрировало изменение флуоресценции ФС между образцами с различными концентрациями под воздействием лазерного источника с длиной волны генерации 635 нм

(рис.68б). С увеличением концентрации ФС усиливается флуоресцентный сигнал в модельных образцах.

Также, изображения фантомов были получены в режиме наложения с длинами волн генерации лазерного излучения 635 нм, 785 нм и 800 нм (рис.69). Полученные в режиме наложения изображения содержат флуоресцентный сигнал, представленный в виде зеленого псевдо-цвета.



Рисунок 69. Изображение модельных образцов: фантомы биологической ткани с различным содержанием молекулярного раствора ИЦЗ в режиме наложения с длиной волны возбуждения 635 нм.



Рисунок 70. Зависимость интенсивности флуоресценции ИЦЗ и НЧ ИЦЗ в фантомах биологической ткани от концентрации ФС.

Интенсивность флуоресцентного сигнала была измерена в центре экспериментального образца при помощи флуоресцентного маркера. Значение флуоресцентного сигнала выбранной области отображается в верхнем левом углу на рисунках 69. Количественный сигнал показал рост флуоресценции с увеличением концентраций в экспериментальных образцах для ИЦЗ в молекулярном и нано- формах (рис.70).

# 5.3. Корреляционной анализ данных полученных с модельных образцов фантомов со спектроскопической системы и интраоперационной флуоресцентной видеосистемы.

Для оценки корреляции между данными, полученными с помощью спектроскопической системы и интраоперационной флуоресцентной видеосистемы, был использован регрессионный анализ, базирующийся на линейном уравнении регрессии:

$$Y = a + b^* X \tag{75}$$

где Y – зависимая переменная, в данном случае выступающая в качестве значений индекса флуоресценции, полученных при помощи видеосистемы, X – независимая переменная, в данном случае представленная интегральными значениями, полученными при помощи спектроскопической системы, a – свободный член линии оценки и b – угловой коэффициент, показывающий на сколько увеличивается Y при увеличении X.

Используя данный метод, были построены линии регрессии для фантомов, содержащих разные концентрации ИЦЗ в молекулярной и нано- формах (рис.71).



Рисунок 71. Линейная регрессия оптических фантомов при возбуждении длин волн 633 нм, 785 нм, 800 нм содержащих разные концентрации молекулярного

раствора ИЦЗ и коллоидного раствора НЧ ИЦЗ.

Для оценки силы линейной связи между парными значениями, в данном случае полученными разными системами, был определен коэффициент корреляции Пирсона, который описывается формулой:

$$r = \frac{\sum (X - \bar{X})(Y - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X - \bar{X})^2 \sum (Y - \bar{Y})^2}}$$
(76)

где  $\overline{X}$  и  $\overline{Y}$  являются средними значениями переменных X и Y. При линейной регрессии положительное значение г Пирсона указывает на наличие положительной линейной корреляции между значениями.

Квадрат коэффициента корреляции называется коэффициентом детерминации, показывающий качество регрессионной модели, и определяется как:

$$R^2 = 1 - \frac{RSS}{TSS} \tag{77}$$

где *RSS* – остаточная сумма квадратов: 134

$$RSS = \sum_{i=1}^{n} (y_i - \hat{y}_i)^2$$
(78)

Хорошая аппроксимация характеризуется значением *R*<sup>2</sup>, близким к единице.

Таблица 3. Корреляционные значения, полученные со спектроскопической системы и видеосистемы на фантомах с содержанием различных концентрации ИЦЗ в молекулярной и нано- формах.

	Коэффициент	Коэффициент детерминации	
	корреляции Пирсона		
ИЦЗ λ <sub>ех</sub> =633	0.99	0.97	
НЧ ИЦЗ λ <sub>ех</sub> =633	0.99	0.98	
ИЦЗ λ <sub>ех</sub> =785	0.99	0.98	
НЧ ИЦЗ λ <sub>ех</sub> =633	0.98	0.96	
ИЦЗ λ <sub>ех</sub> =800	0.99	0.98	
НЧ ИЦЗ λ <sub>ех</sub> =633	0.99	0.97	

Исходя из данных, представленных в таблице 3, коэффициент корреляции Пирсона имеет положительное значение, близкое к 1, что показывает наличие положительной линейной корреляции между значениями, полученными со спектроскопической системы и с видеосистемы. Коэффициент детерминации, стремящийся к 1, демонстрирует объяснение линии регрессии изменения данных, полученных с видеосистемы, относительно среднего значения, что подтверждает соответствие линии регрессии значениям, полученным разными приборами.

# 5.4. Применение разработанной флуоресцентной эндоскопической видеосистемы для диагностики и лечения злокачественных новообразований в клинических условиях.

Главной проблемой лечения рака различных онкологических заболеваний является неточное определение границ опухоли, что является причиной неполной резекции опухолевых тканей, что приводит к рецидиву заболевания. Следовательно, определение границ опухоли с высокой степенью точности имеет решающее значение для максимизации эффективности лечения и последующего качества жизни пациента. Для проведения ФД была использована разработанная эндоскопическая видеосистема, состоящая из источника белого света, красного лазера с длиной волны генерации 635 нм, цветной и черно-белой камер для визуализации опухолевой ткани. В качестве системы доставки излучения был использован гибкий эндоскоп с жесткой насадкой.

ФДТ проводили в максимуме накопления Себ с помощью терапевтического лазера с длиной волны возбуждения 660 нм. Доза облучения ФДТ варьировалось от 20 до 100 Дж/см<sup>2</sup> в зависимости от локализации рака и болевых ощущений пациента. Плотность мощности на выходе из волокна составляла 40-100 мВт/см<sup>2</sup>. Для пациентов со злокачественными новообразованиями в области голосовых связках, трахеи и корня языка ротоглотку орошали раствором лидокаина для уменьшения болевых ощущений и щадящего проведения терапии.



Рисунок 72. Изображения световых оптических волокон, использующихся для ФДТ а) цилиндрический диффузор, б) волокно с прямым выходом излучения и с рассеивающей линзой.

В качестве системы доставки света к опухоли в области ротоглотки использовался цилиндрический диффузор, обеспечивающий доставку лазерного излучения в поперечном направлении в эндоскопических операциях (рис. 72а), а также оптическое волокно с прямым выводом излучения для операций на поверхности ткани пациента. На конце светового волокна была закреплена рассеивающая линза для однородного распределения светового пятна (рис. 72б).

Перед внутривенным введением был приготовлен стерильный водный раствор Се6 с концентрацией 1,0-1,1 мг/кг. Максимум накопления ФС наблюдался через 2 часа после внутривенного введения. ФД патологического участка проводилась до и сразу после ФДТ.

С целью оценки эффективности контроля ΦДТ с применением видеофлуоресцентной эндоскопической системы были выбраны различные нозологии, отличающиеся по локализации и глубины инвазии, и стадии процесса. В исследовании приняли участие 30 больных с диагнозами злокачественное новообразование правой голосовой связки, трахеи, боковой поверхности языка, левой околоушной слюнной железы и левой голосовой связки (по международной классификации МКБ-10-см). Возраст пациентов варьировался от 58 до 94 лет. Диагнозы были подтверждены биопсией, которая была получена до ФДТ [88, 89].

Через два часа после введения ФС у всех пациентов наблюдалось повышение интенсивности флуоресценции в области злокачественного новообразования по сравнению со здоровой кожей. Флуоресцентная контрастность экзогенных флуорофоров говорит об избирательности накопления препарата в патологических очагах по отношению к здоровым тканям. Во время

терапии пациенты наблюдали некоторые дискомфортные ощущения, такие как жжение в области облучения или болевые реакции.

Три операции ФДТ были проведены пациенту с диагнозом рак левой околоушной слюнной железы IV стадии, состояния после радикального хирургического лечения, лучевой и химиотерапии. Метастатическое поражение мягких тканей левой половины лица, шеи, надключичной области. Проводилось два сеанса ФДТ с перерывом в 1 неделю между ними. ФД проводили до и после ФДТ для оценки изменения флуоресцентного индекса в опухолевой ткани.

Градиент интенсивности флуоресценции регистрировали до и после терапии. Дозы облучения на первом сеансе ФДТ составила 70 Дж/см<sup>2</sup>. Во время облучения у пациента были болезненное ощущение в виде жжения. Изменение индекса флуоресценции оценивали с использованием комбинированного изображения, сформированного программным обеспечением видеосистемы. Метастазы локализуются внутрикожно, как это наблюдалось при проведении ФД. Область с метастазами облучалась с передней лицевой стороны пациента. Для оценки фотобличинга ФС были выбраны некоторые участки на поверхности кожи (рис.73).

	Fluorescent images Флуоресцентные изображения	Visible images Видимое изображения	Combined images Комбинированные изображения
Before PDT До ФДТ			163
After PDT После ФДТ			58

Рисунок 73. Комбинированные изображения области опухоли при первом сеансе ФДТ.

При сравнении участка опухоли до ФДТ и после ФДТ во флуоресцентном свете, отмечается визуальное уменьшение флуоресценции ФС Себ. На комбинированном изображении зарегистрировано уменьшение флуоресценции ФС по флуоресцентному маркеру почти в три раза, что свидетельствует о фотобличинге препарата.

Биопсия была взята в патологической зоне с высокой интенсивностью флуоресценции. Внутриклеточное распределение ФС в раковых клетках был исследован методом конфокальной микроскопии (рис.74).



Рисунок 74. Флуоресцентное изображение биопсии, полученное при помощи микроскопа (зеленый цвет соответствует автофлуоресценции в диапазоне 490-630 нм при возбуждении 488 нм, красный цвет соответствует флуоресценции Себ с максимумом на 661 нм при возбуждении 633 нм).

Для анализа биоптата была выбрана большая площадь клеточного кластера. На рис.74 представлены две разные области биопсионного материала с максимальным накоплением препарата. Себ распределяется в опухолевой ткани не равномерно из-за гетерогенности новообразования, но в единичных клетках наблюдается равномерное распределение ФС по цитоплазме. Вторая операция ФДТ было проведена через неделю после первого сеанса. Доза облучения тех же патологических участков составила 80 Дж/см<sup>2</sup> (рис.75).



Рисунок 75. Комбинированные изображения области опухоли при втором сеансе ФДТ.

На рисунке 76 представлены комбинированные изображения опухоли, полученные цветной и флуоресцентной камерами. Визуализация показала четкую разницу между опухолью и нормальной тканью, с двойной разницей во флуоресцентном сигнале.



Рисунок 76. Фото пациента с диагнозом метастазы околоушной железы до ФДТ и спустя 2,5 месяца после ФДТ.

Спустя 2,5 месяца наблюдается визуальное уменьшение отека левой лицевой стороны (рис.76). Пациент отмечает значительное улучшение своего

состояния и качества жизни. Была проведена ФД с Себ, которая показала слабое накопление препарата в патологической ткани, что говорит об уменьшении опухоли.

Для проведения флуоресцентной диагностики очаговых образований печени перед внутривенным введением был приготовлен стерильный водный раствор молекулярного раствора ИЦЗ с концентрацией 5 мг/кг. В исследовании приняли участие 8 пациентов: 4 мужчины от 48 до 70 лет, 4 женщины от 41 до 71 года. Диагнозы были подтверждены с помощью УЗИ, КТ и/или МРТ брюшной полости с контрастным усилением. Флуоресцентная диагностика проводилась сразу после внутривенного введения [90].



Рисунок 77. Флуоресцентное изображение печени сразу после внутривенного введения молекулярного раствора ИЦЗ.

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 (рис.77). На основании полученного изображения с

распределением ИЦЗ по печени проводилась хирургическая резекция и затем делалась повторная запись и оценка флуоресценции краев резекции.

Возможность ранней диагностики имеет решающее значение для снижения высокой смертности онкологических больных. Видеосистема показала хорошие образований результаты визуализации злокачественных различных В локализаций. Полученные данные свидетельствуют о применение ФС в такой дозе является достаточной для селективного накопления препарата в патологических очагах по отношению к здоровым тканям, что может быть для интраоперационного воздействия на ФДТ. Контроль использовано фотобличинга Себ сразу после ФДТ позволяет оценивать эффективность терапии интраоперационно и дает возможность хирургам незамедлительно принимать решения для успешного лечения опухолей головы и шеи. ФД с внутривенным ИЦЗ позволяет введении молекулярного раствора проводить полную хирургическую резекцию очаговых образованием печени с сохранением здоровой ткани. Следовательно, интраоперационная флуоресцентная диагностика, позволяющая определить точную локализацию и границы опухоли, повышает эффективность ФДТ, благоприятно влияет на медиану выживания больных раком различных локализаций, не снижая качество жизни.

#### Заключение к главе

В данной главе были получены спектры флуоресценции биологических фантомов с различной концентрацией ИЦЗ в молекулярной и нано- формах. Параллельно были получены флуоресцентные изображения фантомов при помощи флуоресцентной видеосистемы. Полученные результаты двумя разными методами иллюстрируют повышение интенсивности флуоресценции с увеличением концентрации исследуемых ФС. Был проведен корреляционный анализ, демонстрирующий коэффициент корреляции Пирсона и коэффициент детерминации в диапазонах 0.98-0.99 и 0.97-0.98, соответственно, что

соответствии результатов, полученных свидетельствует при помощи 0 спектроскопической системы и видеофлуоресцентной системы. Представлены результаты интраоперационной флуоресцентной диагностики с использованием эндоскопической системы для оценки качества проведения ФДТ рака головы и шеи, с использованием Себ. Контроль эффективности ФДТ был проведен по фотобличинга Себ. Метод интраоперационной оценки флуоресцентной визуализации позволяет определить точную локализацию новообразования и ее границы. Оценка выгорания Себа в режиме реального времени позволяет онкологам быстро принимать решения во время проведения процедуры ФДТ, что способствует улучшению качества лечения пациентов. Флуоресцентная диагностика гемангиомы печени, при внутривенном введении молекулярного раствора ИЦЗ, продемонстрировала область для полной хирургической резекции образований. Полученные результаты показали удобство очаговых использования эндоскопической флуоресцентной видеосистемы при различных нозологиях рака головы и шеи. Следовательно, данный подход диагностики позволит повысить эффективность лечения онкологических больных.

#### Заключение и выводы

В данной диссертационной работе был разработан новый подход к флуоресцентной интраоперационной навигации опухолей головы и шеи с использованием флуоресцентных красителей ДК и БИК спектральных областей в молекулярной форме и в составе наноразмерных структур:

 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 информаций 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 возбуждение длины волны 633 нм для визуализации опухоли и флуоресцентной камеры в БИК диапазоне при возбуждении 785 нм и 800 нм для определения путей метастазирования.

## Список цитируемой литературы

- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians, 61(2), 69-90.
- 2. Haddad, R. I., & Shin, D. M. (2008). Recent advances in head and neck cancer. New England Journal of Medicine, 359(11), 1143-1154.
- Vokes, E. E., Weichselbaum, R. R., Lippman, S. M., & Hong, W. K. (1993). Head and neck cancer. New England Journal of Medicine, 328(3), 184-194.
- Siegel, R., Ward, E., Brawley, O., & Jemal, A. (2011). Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. CA Cancer Journal for Clinicians, 61(4), 212-236.
- Argiris, A., Karamouzis, M. V., Raben, D., & Ferris, R. L. (2008). Head and neck cancer. The Lancet, 371(9625), 1695-1709.
- 6. Blot, W. J., McLaughlin, J. K., Winn, D. M., Austin, D. F., Greenberg, R. S., 145

Preston-Martin, S., ... & Fraumeni, J. F. (1988). Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. Cancer research, 48(11), 3282-3287.

- 7. Boffetta, P., Hecht, S., Gray, N., Gupta, P., & Straif, K. (2008). Smokeless tobacco and cancer. The lancet oncology, 9(7), 667-675.
- Gandini, S., Botteri, E., Iodice, S., Boniol, M., Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P., & Boyle, P. (2008). Tobacco smoking and cancer: a metaanalysis. International journal of cancer, 122(1), 155-164.
- Hashibe, M., Boffetta, P., Zaridze, D., Shangina, O., Szeszenia-Dabrowska, N., Mates, D., ... & Chabrier, A. (2006). Evidence for an important role of alcoholand aldehyde-metabolizing genes in cancers of the upper aerodigestive tract. Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, 15(4), 696-703.
- 10.Miller, C. S., & Johnstone, B. M. (2001). Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontology, 91(6), 622-635.
- 11.Shiu, M. N., Chen, T. H. H., Chang, S. H., & Hahn, L. J. (2000). Risk factors for leukoplakia and malignant transformation to oral carcinoma: a leukoplakia cohort in Taiwan. British journal of cancer, 82(11), 1871-1874.
- 12.Laubenbacher, C., Saumweber, D., Wagner-Manslau, C., Kau, R. J., Herz, M., Avril, N., ... & Schwaiger, M. (1995). Comparison of fluorine-18fluorodeoxyglucose PET, MRI and endoscopy for staging head and neck squamous-cell carcinomas. Journal of Nuclear Medicine, 36(10), 1747-1757.
- 13.Marur, S., & Forastiere, A. A. (2016, March). Head and neck squamous cell carcinoma: update on epidemiology, diagnosis, and treatment. In Mayo Clinic Proceedings (Vol. 91, No. 3, pp. 386-396). Elsevier.
- 14.Marur, S., & Forastiere, A. A. (2008, April). Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. In Mayo Clinic Proceedings (Vol. 83, No. 4, pp. 489-501). Elsevier.
- 15.Pfister, D. G., Ang, K. K., Brizel, D. M., Burtness, B. A., Busse, P. M., Caudell,

J. J., ... & Gilbert, J. (2013). Head and neck cancers, version 2.2013. Journal of the National Comprehensive Cancer Network, 11(8), 917-923.

- 16.Langendijk, J. A., Doornaert, P., Verdonck-de Leeuw, I. M., Leemans, C. R., Aaronson, N. K., & Slotman, B. J. (2008). Impact of late treatment-related toxicity on quality of life among patients with head and neck cancer treated with radiotherapy. Journal of clinical oncology, 26(22), 3770-3776.
- 17.Vlacich, G., Spratt, D. E., Diaz, R., Phillips, J. G., Crass, J., Li, C. I., ... & Cmelak, A. J. (2014). Dose to the inferior pharyngeal constrictor predicts prolonged gastrostomy tube dependence with concurrent intensity-modulated radiation therapy and chemotherapy for locally-advanced head and neck cancer. Radiotherapy and Oncology, 110(3), 435-440.
- 18.Burtness, B., Bauman, J. E., & Galloway, T. (2013). Novel targets in HPVnegative head and neck cancer: overcoming resistance to EGFR inhibition. The lancet oncology, 14(8), e302-e309.
- 19.Vermorken, J. B., Trigo, J., Hitt, R., Koralewski, P., Diaz-Rubio, E., Rolland, F., ... & Baselga, J. (2007). Open-Label, Uncontrolled, Multicenter Phase II Study to Evaluate the Efficacy and Toxicity of Cetuximab As a Single Agent in Patients With Recurrent and/or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the. Journal of clinical oncology, 25(16), 2171-2177.
- 20.Cohen, E. E., Kane, M. A., List, M. A., Brockstein, B. E., Mehrotra, B., Huo, D., ... & Vokes, E. E. (2005). Phase II trial of gefitinib 250 mg daily in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. Clinical Cancer Research, 11(23), 8418-8424.
- 21.Soulieres, D., Senzer, N. N., Vokes, E. E., Hidalgo, M., Agarwala, S. S., & Siu, L. L. (2004). Multicenter phase II study of erlotinib, an oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamous cell cancer of the head and neck. Journal of clinical oncology, 22(1), 77-85.

- 22.Shakiba, M., Ng, K.K., Huynh, E., Chan, H., Charron, D.M., Chen, J., Muhanna, N., Foster, F.S., Wilson, B.C., Zheng, G. (2016). Stable J-aggregation enabled dual photoacoustic and fluorescence nanoparticles for intraoperative cancer imaging. Nanoscale, 8, 12618-12625.
- 23.Zweck, J., Penzkofer, A. (2001). Microstructure of indocyanine green Jaggregates in aqueous solution. Chemical Physics, 269, 399-409.
- 24.Bricks, J.L., Slominskii, Y.L., Panas, I.D., Demchenko, A.P. (2017). Fluorescent J-aggregates of cyanine dyes: basic research and applications review. Methods and applications in fluorescence, 6, 012001.
- 25.Liu R., Tang J., Xu Y., Zhou Y., Dai Z. (2017). Nano-sized Indocyanine Green J-aggregate as a One-component Theranostic Agent. Nanotheranostics, 1, 430-439.
- 26.Hill, T. K., Abdulahad, A., Kelkar, S. S., Marini, F. C., Long, T. E., Provenzale, J. M., & Mohs, A. M. (2015). Indocyanine green-loaded nanoparticles for imageguided tumor surgery. Bioconjugate chemistry, 26(2), 294-303.
- 27.Wittmann, M., Rotermund, F., Weigand, R., Penzkofer, A. (1998). Saturable absorption and absorption recovery of indocyanine green J-aggregates in water. Applied Physics B: Lasers &Optics, 66.
- 28.Jelley, E. E. (1936). Spectral absorption and fluorescence of dyes in the molecular state. Nature, 138, 1009-1010.
- 29.Sheibe, G. (1936). Variability of the absorption spectra of some sensitizing dyes and its cause. Angew. Chem, 49, 563-564.
- 30.Würthner, F., Kaiser, T.E., Saha-Möller, C.R. (2011). J-aggregates: from serendipitous discovery to supramolecular engineering of functional dye materials. Angewandte Chemie International Edition, 50, 3376–3410.
- 31.Herz, H. (1977). Aggregation of sensitizing dyes in solution and their adsorption onto silver-halides. Advances in Colloid and Interface Science, 8, 237–298.

- 32.Valdesaguilera, O., Neckers, D.C. (1989). Aggregation phenomena in xanthene dyes. Accounts of Chemical Research, 22, 171–177.
- 33.Ogawa, M., Kosaka, N., Choyke, P.L., Kobayashi, H. (2009). H-type dimer formation of fluorophores: A mechanism for activatable, in vivo optical molecular imaging. ACS chemical biology, 4, 535–546.
- 34.Patonay G., Kim J.S., Kodagahally R., Strekowski L. (2005). Spectroscopic study of a novel bis(heptamethine cyanine) dye and its interaction with human serum albumin. Applied spectroscopy, 59, 682–690.
- 35.Deshmukh, A.P., Koppel, D., Chuang, C., Cadena, D.M., Cao, J., Caram, J.R. (2019). Design principles for two-dimensional molecular aggregates using Kasha's model: tunable photophysics in near and short-wave infrared. The Journal of Physical Chemistry C, 123, 18702-18710.
- 36.Berlepsch, H.V., Böttcher, C. (2010). Cryo-transmission electron microscopy reveals mesoscopic H-and J-aggregates of near infrared cyanine dyes. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 214, 16-21.
- 37.Zimnyakov, D. A., & Tuchin, V. V. (2002). Optical tomography of tissues. Quantum Electronics, 32(10), 849.
- 38.Tuchin, V.V. Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis. SPIE Tutorial Text in Optical Engineering (SPIE Press, Washington, 2000).
- 39.Bashkatov, A. N., Genina, E. A., Kochubey, V. I., Tuchin, V. V., Chikina, E. E., Knyazev, A. B., & Mareev, O. V. (2004). Optical properties of mucous membrane in the spectral range 350–2000 nm. Optics and spectroscopy, 97(6), 978-983.
- 40.Stenn K S 1988 The skin Cell and Tissue Biology ed L Weiss (Baltimore: Urban & Shwarzenberg), 541–72
- 41.Odland, G. F., & Goldsmith, I. (1991). Physiology, biochemistry and molecular biology of the skin. Oxford: Oxford University Press, 1991, Vol. I, p. 3-62.

- 42.Ryan T J 1991 Cutaneous Circulation Physiology, Biochemestry, and Molecular Biology of the Skin vol 2, ed L A Goldsmith (Oxford: Oxford University Press), 1019–84
- 43.Young, A. R. (1997). Chromophores in human skin. Physics in Medicine & Biology, 42(5), 789-820.
- 44.Zavaliy, M. A., Balabantsev, A. G., Zagorul'ko, A. K., & Filonenko, T. G. (2002). State of ciliary epithelium of patients with the chronic purulent sinusitis. Russian Rhinology, 2, 19-22.
- 45.Piskunov, G. Z., & Piskunov, S. Z. (2002). Clinical rhinology. Moscow: Miklon.
- 46.Bashkatov, A. N., Genina, E. A., Kochubey, V. I., Tuchin, V. V., Chikina, E. E., Knyazev, A. B., & Mareev, O. V. (2004). Optical properties of mucous membrane in the spectral range 350–2000 nm. Optics and spectroscopy, 97(6), 978-983.
- 47.Gladstone, J. H., & Dale, T. P. (1863). XIV. Researches on the refraction, dispersion, and sensitiveness of liquids. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, (153), 317-343.
- 48.Barer, R., & Joseph, S. (1954). Refractometry of living cells: Part I. Basic principles. Journal of Cell Science, 3(32), 399-423.
- 49.Beuthan, J., Minet, O., Helfmann, J., Herrig, M., & Müller, G. (1996). The spatial variation of the refractive index in biological cells. Physics in Medicine & Biology, 41(3), 369.
- 50.Wang, L., Yoshida, J., Ogata, N., Sasaki, S., & Kajiyama, T. (2001). Selfassembled supramolecular films derived from marine deoxyribonucleic acid (DNA)- cationic surfactant complexes: large-scale preparation and optical and thermal properties. Chemistry of Materials, 13(4), 1273-1281.
- 51.Kolste, K. K., Kanick, S. C., Valdés, P. A., Jermyn, M., Wilson, B. C., Roberts, D. W., ... & Leblond, F. (2015). Macroscopic optical imaging technique for wide-

field estimation of fluorescence depth in optically turbid media for application in brain tumor surgical guidance. Journal of biomedical optics, 20(2), 026002.

- 52.Elliott, J. T., Dsouza, A. V., Marra, K., Pogue, B. W., Roberts, D. W., & Paulsen, K. D. (2016). Microdose fluorescence imaging of ABY-029 on an operating microscope adapted by custom illumination and imaging modules. Biomedical optics express, 7(9), 3280-3288.
- 53.Cui, W., Kumar, C., & Chance, B. (1991, May). Experimental study of migration depth for the photons measured at sample surface. In Time-Resolved Spectroscopy and Imaging of Tissues (Vol. 1431, pp. 180-191). International Society for Optics and Photonics.
- 54.Chudy, M., Tokarska, K., Jastrzębska, E., Bułka, M., Drozdek, S., Lamch, Ł., ...
  & Brzozka, Z. (2018). Lab-on-a-chip systems for photodynamic therapy investigations. Biosensors and Bioelectronics, 101, 37-51.
- 55.Moan, J., & Berg, K. (1991). The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. Photochemistry and photobiology, 53(4), 549-553.
- 56.Baker, A., & Kanofsky, J. R. (1992). Quenching of singlet oxygen by biomolecules from L1210 leukemia cells. Photochemistry and photobiology, 55(4), 523-528.
- 57.Fernandez, J. M., Bilgin, M. D., & Grossweiner, L. I. (1997). Singlet oxygen generation by photodynamic agents. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 37(1-2), 131-140.
- 58.Moan, J. (1990). On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. J.Photochem. Photobiol., 6, 343-344.
- 59.Hulst, H. C., & van de Hulst, H. C. (1981). Light scattering by small particles. Courier Corporation.
- 60.Kerker, M. (1969). The Scattering of Light, and Other Electromagnetic Radiation, 27–96 Academic Press. New York.

- 61.Ditchburn, R. W. (1976). Light 3rd edition. Light 3rd edition by RW Ditchburn FRS London.
- 62.Doi, M. (1996). Introduction to polymer physics. Oxford university press.
- 63.Farrakhova, D. S., Yakovlev, D. V., Maklygina, Y. S., Ryabova, A. V., Borodkin, A. V., Loschenov, M. V., Bezdetnaya, L., Plyutinskay, 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.
- 64.Farrakhova, D.S., Yakavets, I.V., Loschenov, V.B., Bolotine, L.N., Zorin, V.P. (2017) Investigation of chlorin photosensitizers distribution in monolayer and spheroid cell cultures. Biomedical Photonics. 6(2), 4-11.
- 65.Skobeltsin, A., Farrakhova, D., Maklygina, Y., Romanishkin, I., Ryabova, A., Yakovets, I., Millard, M., Bolotine, L., Plyutinskay, A., Karmakova, T., Pankratov, A., Loschenov, V. (2020). 3D spheroid cultures for evaluation of nanophotosensitizers accumulation. In Journal of Physics: Conference Series. 1439(1), 012032.
- 66.Farrakhova, D.S., Yakavets, I.V., Loschenov, V.B., Bolotine, L.N., Zorin, V.P. (2018) Comparitive accumulation study of chlorin group photosensitizers on monolayer and multicellular tumor spheroids of cell culture. Proceedings International Conference Laser Optics 2018, ICLO 2018. 8435633, 589.
- 67.Wang, J., Pang, X., Tan, X., Song, Y., Liu, L., You, Q., Sun, Q., Tan, F., Li, N. (2017). A triple-synergistic strategy for combinational photo/radiotherapy and multi-modality imaging based on hyaluronic acid-hybridized polyaniline-coated WS2 nanodots. Nanoscale, 9, 5551-5564.
- 68.Weigand, R., Rotermund, F., Penzkofer, A. (1997) Aggregation dependent absorption reduction of indocyanine green. The Journal of Physical Chemistry A 101(42), 7729-7734. https://doi.org/10.1021/jp9700894

- 69.Gregg, S. D., Sing, K. S. W. (1967) Adsorption, Surface Area and Porosity. Journal of The electrochemical society 114(11), 279Ca.
- 70.Lowell, S., Shields, J. E. (1991) Powder surface area and porosity. Springer Science & Business Media, 2.
- 71.Czikkely, V., Försterling, H.D., Kuhn, H., (1970) Light absorption and structure of aggregates of dye molecules. Chem. Phys. Lett. 6, 11–14. https://doi.org/10.1016/0009-2614(70)80062-8.
- 72.Dzhemilova, Z. N., Sitkin, I. I., Sergeeva, S. V., Grachev, P. V., Linkov, K. G., Loshenov, V. B., & Galstyan, G. R. (2018). Near-infrared fluorescence imaging with indocyanine green in diabetic patient with critical limb ischemia: a case report. Diabetes mellitus. 21(4), 319-324.
- 73.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.
- 74.Baker, K. J. (1966) Binding of sulfobromophthalein (BSP) sodium and indocyanine green (ИЦЗ) by plasma alpha1 lipoproteins, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 122, 957–963.
- 75.Muckle, T. J. (1976). Plasma-proteins binding of indocyanine green," Biochem. Med., 15, 17–21.
- 76.Mordon, S., Devoisselle, J. M., Soulie-Begu, S. and Desmettre, T. (1998). Indocyanine green: Physicochemical factors affecting its fluorescence in vivo, Microvasc. Res., 55, 146–152.
- 77.Yoneya, S., Saito, T., Komatsu, Y., Koyama, I., Takahashi, T. and DuvollYoung, J. (1998). Binding properties of indocyanine green in human blood, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 39, 1286–1290.

- 78.Desmettre, T., Devoisselle, J. M. and Mordon, S. (2000). Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ИЦЗ) as related to angiography," Survey Ophthalmol., 45, 15–27.
- 79.Cherrick, G. R., Stein, S. W., Leevy, C. M. and Davidson, C. S. (1960) Indocyanine green: Observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. J. Clin. Invest., 39, 592–600.
- 80.Farrakhova, D.S., Romanishkin, I.D., Yakovlev, D.V., Maklygina, Yu.S., Savelieva, T.A., Bezdetnaya, L., Loschenov, V.B. (2021) The spectroscopic study of indocyanine green J-aggregate stability in human blood and plasma. Physics of Wave Phenomena. (Принята к печати).
- 81.Farrakhova, D., Maklygina, Yu., Romanishkin, I., Yakovlev, D., Plyutinskaya, A., Bezdetnaya, L., Loschenov, V. (2021) Fluorescence Imaging Analysis Of Distribution Of Indocyanine Green In Molecular And Nanoform In Tumor Model. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 37, 102636.
- 82.Desmettre, T., Devoisselle J.M., Mordon S. (2000). Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ИЦЗ) as related to angiography. Survey Ophthalmology, 45, 15–27.
- 83.Tovar, J.S.D., Kassab, G., Inada, N.M., Bagnato, V.S., Kurachi, C. (2019). Photodegradation in the infrared region of indocyanine green in aqueous solution. 2019 SBFoton International Optics and Photonics Conference (SBFoton IOPC), IEEE, 1-5.
- 84.Dasgupta P. On use of pseudo-Voigt profiles in diffractions line broadening analyses. FIZIKA A-ZAGREB-., 200, 9(2), 61–66.
- 85.Farrakhova, D.S., Romanishkin, I.D., Maklygina, Yu.S., Yakovlev, D.V., Ryabova, A.V., Loschenov, V.B. (2021) Fluorescence lifetime of indocyanine green in molecular and nano-forms in the cellular model of a brain tumor in vitro. IOP: Journal of Physics: Conference Series 2058, 012031.

- 86.Farrakhova, D., Romanishkin, I., Maklygina, Yu., Bezdetnaya, L., Loschenov,
  V. (2021) Analysis of fluorescence decay kinetics of indocyanine green monomers and aggregates in brain tumor model in vivo. Nanomaterials 11(12), 3185.
- 87.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.
- 88.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.
- 89.Kulichenko, A.M., Farrakhova, D.S., Yakovlev, D.V., Maklygina, Yu.S., Shiryaev, A.A., Loschenov, V.B. (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.
- 90.Subbot, V.S., Semenkov, A.V., Shiryaev, A.A., Nekrasova, T.P., Grachev, P.V., Farrakhova, D.S., Loschenov, V.B., Bodyrev, M.A., Yudayev, N.D. (2021) Clinical application of the video fluorescent mapping method in the preoperative planning of liver resections in its focal diseases. Clinical an Experimental Surgery. 9(4), 81-87.