

На правах рукописи



Эфендиев Канагат Темботович

**СПЕКТРОСКОПИЧЕСКАЯ ИНТРАОПЕРАЦИОННАЯ ДИАГНОСТИКА
В ПРОЦЕССЕ ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ**

Специальность: 1.3.19. Лазерная физика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Москва - 2023

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

Научный руководитель:

Лощенов Виктор Борисович, д.ф.-м.н., проф., заведующий лабораторией лазерной биоспектроскопии Центра естественно-научных исследований ИОФ РАН.

Официальные оппоненты:

Олейников Владимир Александрович, д.ф.-м.н., заведующий лабораторией молекулярной биофизики Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Васютинский Олег Святославович, д.ф.-м.н., проф., член-корр. РАЕН, главный научный сотрудник Физико-технического института имени А. Ф. Иоффе РАН.

Ведущая организация:

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

Защита диссертации состоится 26 сентября 2023 г. на заседании диссертационного совета 24.1.223.02 при ИОФ РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д.38, корп. 1.

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

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.1.223.02
канд. физ.-мат. наук
тел.: +7 (499) 503-8777 доб. 1-47



Т.Б. Воляк

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Разработанные в последние годы новые подходы к диагностике и лечению опухолей методами флуоресцентной диагностики (ФД) и фотодинамической терапии (ФДТ) демонстрируют высокую эффективность. ФДТ не имеет тяжелых побочных эффектов, а малоинвазивный характер с избирательным противоопухолевым эффектом минимизирует необратимые повреждения окружающих нормальных тканей и сохраняет функции органов. Эффективность ФДТ зависит от концентрации фотосенсибилизатора (ФС) и молекулярного кислорода, которые неоднородно распределены в биологических тканях, а также от интенсивности лазерного воздействия. Вследствие большой гетерогенности опухолей внутритканевое распределение ФС и молекулярного кислорода может меняться в процессе лазерного облучения [1], что создает трудности для широкого клинического применения ФДТ, связанные с техническими сложностями интраоперационной диагностики распределения ФС и оценкой достаточности лазерного воздействия. Таким образом, имеется необходимость в разработке методов, которые позволили бы интраоперационно контролировать изменения в распределениях ФС и кислорода непосредственно в процессе лазерного облучения.

Спектроскопическая диагностика, частью которой является флуоресцентная навигация, обеспечивает оценку распределения ФС в биологических тканях и контроль изменения интенсивности его флуоресценции [A1]. Флуоресцентная навигация может проводиться спектрально- или видео-флуоресцентными методами. Чаще всего интраоперационный процесс ФДТ контролируется методами ФД только до и после фотодинамического воздействия. Основным недостатком данного подхода является необходимость использования отдельных источников света для диагностики и терапии, а также отсутствие информации о процессах, запускаемых в начале лазерного облучения. В процессе спектроскопической диагностики нами было предложено контролировать четыре важных параметра, характеризующих состояние облучаемой биологической ткани, содержащей ФС: динамику изменения интенсивности флуоресценции ФС, которая напрямую связана с его концентрацией; спектр диффузно отраженного широкополосного света, позволяющий оценить поглощение и, соответственно, изменение уровня оксигенации гемоглобина, а также уровень кровенаполненности микроциркуляторного русла; динамику изменения интенсивности диффузно рассеянного лазерного излучения, характеризующего рассеивающие и поглощающие свойства облучаемых биологических тканей. Непрерывный спектроскопический контроль позволяет оценить скорости протекания данных процессов, запускаемых при ФДТ.

Достаточно часто при регистрации флуоресценции ФС в реальных биологических тканях наблюдается значительный вклад эндогенных порфиринов,

которые имеют характерные полосы поглощения и флуоресценции в диапазоне длин волн 280–700 нм [2]. Решением данной проблемы может быть регистрация флуоресценции ФС в ближнем инфракрасном (БИК) диапазоне, что позволяет минимизировать вклад эндогенной флуоресценции тканей, а также выявлять более глубокозалегающие сенсibilизированные очаги [3]. В данной работе предложен метод интраоперационной спектроскопической диагностики с применением протопорфирина IX (Protoporphyrin IX, PpIX) и хлорина е6 (Chlorin e6, Ce6) с регистрацией длинноволнового плеча флуоресценции в БИК-диапазоне и возбуждением флуоресценции ФС в красном диапазоне длин волн [A2]. В отличие от существующих, данный метод включает применение только одного источника лазерного излучения как для ФД, так и для ФДТ (фототераностики) [П1, П2]. Предложенный метод обеспечивает контроль в процессе лазерного облучения изменений интенсивностей флуоресценции ФС в диапазоне длин волн 725–800 нм и диффузно рассеянного лазерного излучения [П3].

Разработка дозиметрического метода оценки эффективности ФДТ осложняется из-за динамических изменений микроциркуляции крови, насыщенности гемоглобина кислородом и распределения ФС по объему опухоли. Ранее [4] был предложен метод спектроскопического анализа биологических тканей, включающий одновременную оценку оксигенации гемоглобина, накопления PpIX и изменения рассеивающих свойств тканей. Однако данный метод не позволяет проводить контроль ФДТ непосредственно в процессе лазерного облучения и подразумевает использование отдельного источника лазерного излучения для ФД. На основе ранее предложенных методов [4,5] нами был разработан спектроскопический метод комбинированного контроля эффективности ФДТ, обеспечивающий одновременную оценку уровня оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном русле, уровня кровенаполненности, изменения интенсивности флуоресценции ФС в БИК-диапазоне и изменения интенсивности диффузно рассеянного лазерного излучения за счет регистрации спектроскопических сигналов с экспозицией 20–50 мс и временным интервалом регистрации спектров 3–5 с непосредственно в процессе лазерного облучения с применением одного источника лазерного излучения, который одновременно используется для ФД и ФДТ. Предложенный метод позволяет оптимизировать энергетические параметры лазерного воздействия на разные зоны биологических тканей с учетом их гетерогенности за счет возможности контроля изменения внутритканевого распределения ФС и состояния сосудистой системы опухоли в процессе лазерно-индуцированной ФДТ.

Целью данной работы являлась разработка спектроскопических методов и устройств контроля процесса воздействия лазерного излучения на биологические ткани, содержащие ФС, позволяющих оценить изменения в распределении ФС и уровня насыщенности гемоглобина крови кислородом, а также состояние сосудистой системы тканей для оценки эффективности фотодинамического воздействия в режиме реального времени.

Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие **задачи**:

1. Разработать метод флуоресцентной навигации в БИК-диапазоне и оценки распределения ФС в гетерогенных биологических тканях при помощи регистрации длинноволнового плеча флуоресценции Себ и РrIX непосредственно в процессе лазерно-индуцированного фотодинамического воздействия.
2. Разработать метод спектроскопического комбинированного контроля ФДТ в процессе лазерного облучения, включающий оценку уровня оксигенации гемоглобина, интенсивности флуоресценции ФС и диффузно рассеянного лазерного излучения.
3. Разработать устройство с волоконно-оптическим способом доставки лазерного излучения для инфракрасной (ИК) визуализации кровеносных сосудов и оценки кровенаполненности биологических тканей методом регистрации и анализа обратно рассеянного лазерного излучения. Уточнить оптимальные длины волн в БИК-диапазоне для визуализации кровеносных сосудов в коже человека методом регистрации обратно рассеянного лазерного излучения.
4. Методами флуоресцентной навигации исследовать изменения внутритканевого распределения Себ в центральной зоне и периферии/границе опухоли в процессе лазерного облучения.

Научная новизна

1. Разработан метод спектроскопической диагностики с возбуждением флуоресценции Себ и РrIX в красном диапазоне и регистрацией длинноволнового плеча флуоресценции в диапазоне длин волн 725–800 нм, который позволяет в режиме реального времени регистрировать спектроскопические сигналы с экспозицией 20–50 мс и временным интервалом регистрации спектров 3–5 с, что обеспечивает контроль изменения интенсивностей флуоресценции ФС и диффузно рассеянного лазерного излучения в процессе лазерно-индуцированной ФДТ.
2. Разработан метод спектроскопического контроля лазерно-индуцированного фотодинамического воздействия в режиме реального времени непосредственно в процессе лазерного облучения с комбинированной оценкой изменения уровня оксигенации гемоглобина, флуоресценции ФС и диффузно рассеянного лазерного излучения, характеризующего оптические свойства биологических тканей.
3. Разработано устройство с волоконно-оптическим способом доставки лазерного излучения, обеспечивающее визуализацию подкожных вен и оценку кровенаполненности биологических тканей методом регистрации и анализа обратно рассеянного лазерного излучения. Установлено, что наибольшая контрастность вен при визуализации методом регистрации диффузно рассеянного лазерного излучения в диапазоне 700–860 нм наблюдается на длине волны 760 нм.
4. Разработан и реализован в клинической практике метод предварительного низкоинтенсивного лазерного облучения опухоли с плотностью энергии 10–20 Дж/см² и плотностью мощности на поверхности 130–310 мВт/см² до основного облучения, который увеличивает медианную концентрацию Себ в опухолях кожи в 1,3 раза, что повышает эффективность фотодинамического воздействия.

Научно-практическая значимость работы

1. На базе разработанных методов и устройств созданы объекты интеллектуальной собственности, защищенные патентами РФ в количестве 4 шт [П1–П4].
2. Регистрация флуоресценции Себ и РrIX в БИК-диапазоне позволяет проводить спектроскопическую диагностику глубокозалегающих злокачественных новообразований, а также улучшает специфичность обнаружения экзогенной флуоресценции ФС, минимизируя вклад эндогенных флуорофоров в регистрируемый сигнал. Применение одного источника лазерного излучения, который одновременно используется для ФД и ФДТ (фототераностики), позволило сократить время проведения процедуры лечения опухолей с применением Себ и РrIX. Данные подходы успешно реализованы в клинической практике при интраоперационной фототераностике опухолей.
3. Спектроскопический комбинированный метод определения оптимальных энергетических параметров ФДТ непосредственно в процессе лазерного облучения по изменению интенсивности флуоресценции ФС, оксигенации гемоглобина и интенсивности диффузно рассеянного лазерного излучения, которые характеризуют состояние сосудистой системы в зоне облучения, внедрен в клиническую практику при лечении опухолей. Метод позволяет персонализировать время лазерного воздействия на биологические ткани при ФДТ.
4. Разработанное устройство с волоконно-оптическим способом доставки лазерного излучения позволяет проводить ИК-визуализацию подкожных вен человека. Устройство обеспечивает интраоперационный контроль состояния сосудистой системы при лазерном облучении биологических тканей, накопивших ФС.
5. Метод предварительного низкоинтенсивного лазерного облучения позволяет локально увеличить концентрацию Себ в опухоли, что позволяет повысить эффективность фотодинамического воздействия и сократить количество проводимых процедур ФДТ.

Разработанные методы и устройства реализованы в клинической практике и были применены в стандартных процедурах ФД и ФДТ для более чем 350 пациентов с опухолями кожи, головы и шеи, холангиоцеллюлярным раком и раком шейки матки, выполненных совместно с Институтом кластерной онкологии им. Л.Л. Левшина Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

Положения, выносимые на защиту

1. Спектроскопическая диагностика с возбуждением флуоресценции Себ и РrX в красном диапазоне длин волн и регистрацией длинноволнового плеча флуоресценции ФС в БИК-диапазоне позволяет оценить распределение ФС в биологических тканях в процессе лазерно-индуцированного фотодинамического воздействия.
2. Метод спектроскопического комбинированного контроля обеспечивает одновременную регистрацию изменений насыщенности гемоглобина кислородом и уровня кровенаполненности биологических тканей в диапазоне 500–600 нм, процесса

тромбирования сосудистой системы облучаемых тканей за счет регистрации диффузно рассеянного лазерного излучения в диапазоне 650–670 нм и флуоресценции ФС в диапазоне 725–800 нм непосредственно в процессе лазерного облучения.

3. ИК-визуализация кровеносных сосудов методом регистрации и анализа обратно рассеянного лазерного излучения с волоконно-оптическим способом доставки позволяет неинвазивно визуализировать подкожные вены и оценить изменения уровня кровенаполненности биологических тканей при лазерном облучении.

4. Предварительное низкоинтенсивное лазерное облучение опухолей кожи с внутривенным введением ФС на основе Себ лазерным излучением ($\lambda=660\pm 5$ нм) с плотностью мощности на поверхности 130–310 мВт/см² и плотностью энергии 10–20 Дж/см² увеличивает концентрацию Себ в зоне облучения.

Публикации и апробация работы

По результатам исследований опубликовано 24 статьи в рецензируемых журналах, удовлетворяющих требованиям ВАК, из них в журналах с первым квартилем опубликовано 6 статей, со вторым квартилем 13 статей, с третьим квартилем 3 статьи, с четвертым квартилем 1 статья, а также 15 тезисов на научных конференциях. На основе разработанных методов созданы объекты интеллектуальной собственности, защищенные 4-мя патентами РФ.

Структура и объем диссертации

Работа состоит из введения, пяти глав, заключения и списка литературы. Общий объем диссертации 158 страниц, включая 81 рисунок, 4 таблицы и список литературы из 195 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

Первая глава посвящена рассмотрению особенностей распространения света в биологических тканях, которые обладают высоким уровнем гетерогенности. В § 1 для описания оптических свойств биологических тканей вводятся понятия коэффициента поглощения, коэффициента рассеяния и фактора анизотропии рассеяния биологической среды. Коэффициент поглощения μ_a вводится в законе Бугера–Ламберта–Бэра и определяется как сумма вкладов всех хромофоров сложной гетерогенной среды $\mu_a(\lambda) = \sum_i(\epsilon_i(\lambda)) C_i$, где $\epsilon_i(\lambda)$ – коэффициент экстинкции, C_i – концентрация i -го флуорофора. В § 2 рассмотрены механизмы ФД и ФДТ, описаны три основных этапа процесса ФДТ опухоли. Особое внимание уделяется факторам, влияющим на эффективность ФДТ: концентрации ФС и кислорода, а также изменениям в сосудистой системе опухоли. В § 3 рассмотрены процессы

фотобличинга (фотообесцвечивания) ФС. В процессе ФДТ с молекулой ФС могут происходить фотохимические изменения, которые способствуют либо временной потере флуоресценции, либо деструкции и необратимой потере флуоресцентных свойств. В § 4 рассмотрены основные механизмы действия ФДТ на опухоль: прямая гибель клеток опухоли по пути апоптоза или некроза; разрушение сосудистой системы опухоли; запуск противоопухолевых иммунологических механизмов организма. В § 5 особое внимание уделено влиянию ФДТ на сосудистую систему опухоли. При ФДТ в зоне лазерного облучения может наблюдаться локальная гипоксия как из-за прямого фотохимического потребления кислорода за счет образования синглетного кислорода $^1\text{O}_2$, так и непрямого снижения концентрации кислорода вследствие тромбирования или временного сосудистого сужения.

Вторая глава посвящена рассмотрению материалов и методов исследования. Описаны устройства и принципы работы оборудования, а также экспериментальные модели биологических тканей (оптических фантомов), которые использовались при проведении исследований. В § 1 приведены спектрально-флуоресцентные свойства Себ и РрIX. Флуоресценция Себ и РрIX наиболее часто возбуждается в полосе Core (в области 400–405 нм) и регистрируется в диапазоне длин волн 620–720 нм. Себ и РрIX также имеют максимумы поглощения на длинах волн 635 и 660 нм соответственно. Однако интенсивности поглощения Себ и РрIX в красноволновой Q-полосе в несколько раз меньше, чем в полосе Core, что уменьшает интенсивность возбуждаемой флуоресценции ФС.

В § 2 и 3 описаны установки для спектрально- и видео-флуоресцентной навигации распределения ФС в биологических тканях. Спектроскопические измерения проводились с использованием установки ЛЭСА-01-БИОСПЕК, которая может регистрировать сигнал в спектральном диапазоне от 350 до 1000 нм. Флуоресцентные изображения регистрировались с использованием двухканальной видеосистемы УФФ-630/675-01-БИОСПЕК, которая обеспечивает визуализацию сенсibilизированных биологических тканей с отображением флуоресцирующих очагов на длинах волн более 650 нм. В § 4 описана схема подготовки оптических фантомов на основе жировой эмульсии (Intralipid 10% МСТ/LCT), содержащих ФС, для концентрационной оценки распределения ФС в биологических тканях и исследования процессов фотобличинга ФС. В § 5 и 6 описаны методы оценки накопления ФС и уровня оксигенации гемоглобина при помощи спектроскопии обратного диффузного отражения света. В § 7 описывается общая схема численного моделирования распространения фотонов в трехслойной модели кожи человека методом Монте-Карло. В § 8 описывается метод микроскопической оценки распределения Себ в опухоли с помощью сканирующей конфокальной микроскопии.

Третья глава посвящена разработке метода спектроскопической оценки критериев эффективности фототераностики в БИК-диапазоне с применением Себ и РрIX [A2]. В первом параграфе представлен метод флуоресцентной навигации

распределения ФС в диапазоне длин волн 725–800 нм, включающий проведение спектроскопической диагностики, не прерывая фотодинамического воздействия, источниками лазерного излучения с длинами волн 635 ± 5 и 660 ± 5 нм [ПЗ]. На Рис. 1 представлены характерные результаты спектроскопической диагностики оптических фантомов, содержащих РрIX и Се6, с регистрацией флуоресценции ФС в красном (665–710 нм) в БИК (725–800 нм) диапазонах.

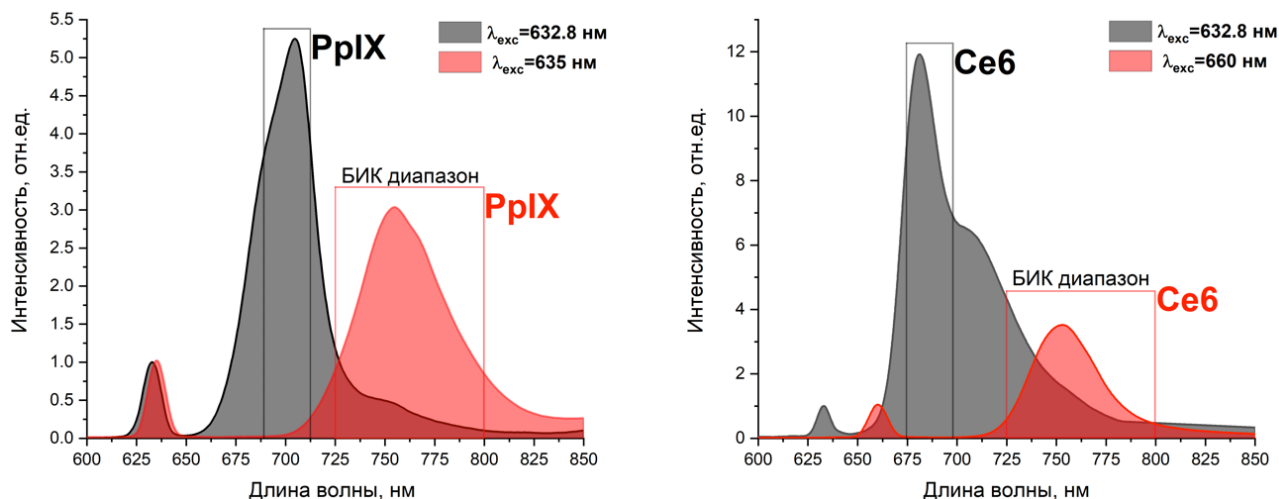


Рис. 1. Спектроскопическая диагностика оптических фантомов с регистрацией флуоресценции ФС в красном и БИК-диапазонах: (а) фантом с РрIX; (б) фантом с Се6. Концентрация ФС 2 мг/кг.

Спектроскопическая диагностика оптических фантомов, содержащих РрIX и Се6 в концентрациях 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 5 мг/кг, позволила зарегистрировать интенсивную флуоресценцию ФС в диапазоне длин волн 725–800 нм. Наибольшее значение «сигнал/шум» в случае фантомов с РрIX наблюдалось при $\lambda_{exc}=635$ нм, а в случае фантомов с Се6 при $\lambda_{exc}=660$ нм и составляло 25 ± 3 и 308 ± 31 соответственно.

В § 2 анализируются преимущества флуоресцентной навигации в БИК-диапазоне. Диапазон длин волн 700–900 нм является наиболее оптимальным за счет большей глубины проникновения света и минимального вклада эндогенной флуоресценции в сравнении с диапазоном 400–700 нм.

В § 3 показано, что регистрация флуоресценции РрIX и Се6 в БИК-диапазоне обеспечивает контроль фотобликинга ФС непосредственно в процессе лазерного облучения (Рис. 2).

Индексы флуоресценции IF рассчитывались как отношение интегральной интенсивности под спектральной кривой флуоресценции $I_f(\lambda)$ к интегральной интенсивности под спектральной кривой диффузно рассеянного лазерного излучения:

$$\begin{aligned} IF_{\lambda_{exc}=635\text{нм}} &= \int_{725}^{800} I_f(\lambda) d\lambda / \int_{625}^{645} I_{bs}(\lambda) d\lambda, \\ IF_{\lambda_{exc}=660\text{нм}} &= \int_{725}^{800} I_f(\lambda) d\lambda / \int_{650}^{670} I_{bs}(\lambda) d\lambda. \end{aligned} \quad (1)$$

Фотобликинг ФС был аппроксимирован экспоненциальной функцией:

$$IF(t) = A \cdot e^{\frac{t}{\tau}} + \text{const} = A \cdot e^{-kt} + \text{const}, \quad (2)$$

где $IF(t)$ – индексы флуоресценции в процессе облучения; A – коэффициент аппроксимации; t – время облучения; $k = 1/\tau$ – скорость фотобликинга ФС.

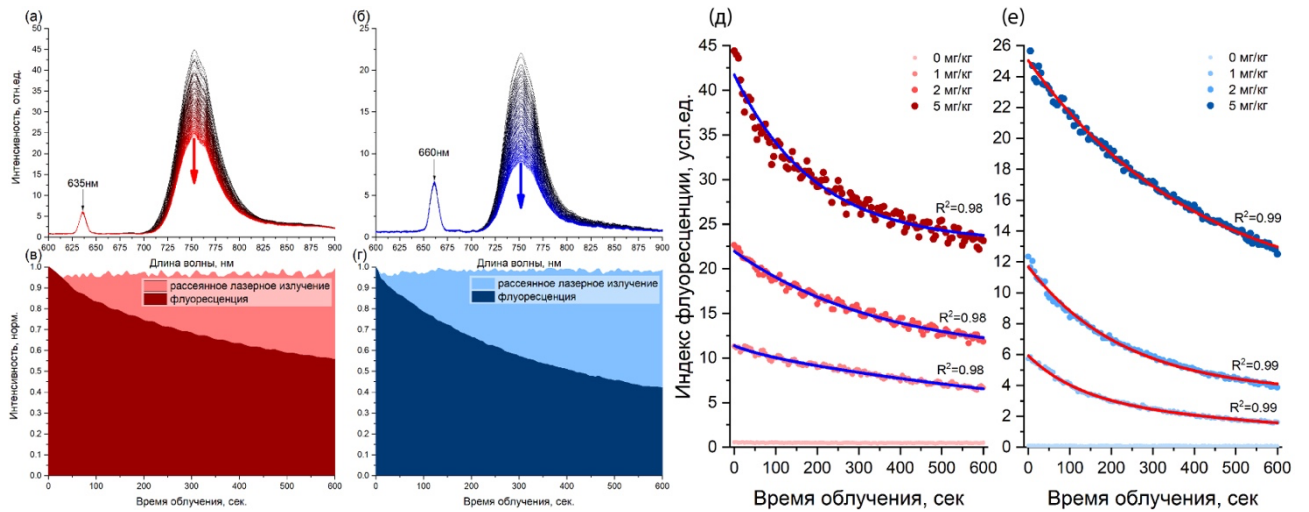


Рис. 2. Спектроскопическая диагностика в процессе лазерного облучения: (а) спектры фантома с PrIX, $C_{PrIX} = 2$ мг/кг; (б) спектры фантома с Себ, $C_{Себ} = 2$ мг/кг; (в) распределение интенсивностей диффузно рассеянного лазерного излучения и флуоресценции PrIX, $\lambda_{exc} = 635$ нм; (г) распределение интенсивностей диффузно рассеянного лазерного излучения и флуоресценции Себ, $\lambda_{exc} = 660$ нм; (д) распределение индексов флуоресценции в процессе лазерного облучения оптических фантомов с PrIX, $\lambda_{exc} = 635$ нм; (е) распределение индексов флуоресценции в процессе лазерного облучения оптических фантомов с Себ, $\lambda_{exc} = 660$ нм. Время экспозиции 50 мс. Временной интервал регистрации спектров 5 с.

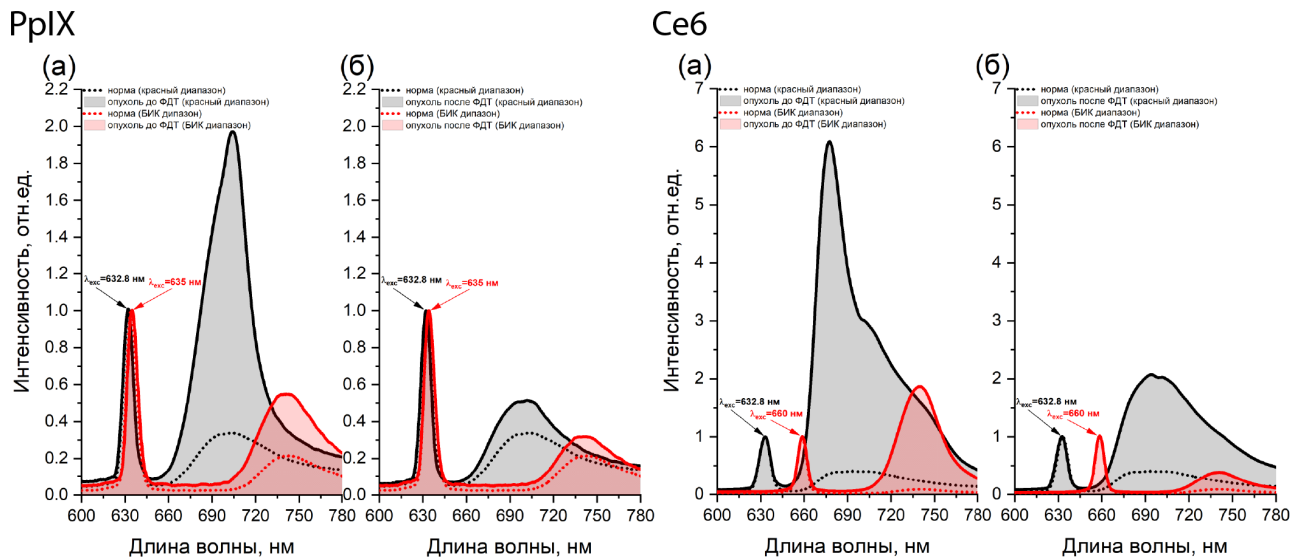


Рис. 3. Спектроскопическая диагностика опухолей с регистрацией флуоресценции PrIX и Себ в диапазонах 665–710 нм и 725–800 нм: (а) до ФДТ; (б) после ФДТ.

В § 4 представлены результаты флуоресцентной навигации опухоли с регистрацией флуоресценции PrIX и Себ в красном (665–710 нм) и БИК (725–800 нм) диапазонах, что позволило достоверно выявить зоны опухоли с накоплением ФС (Рис. 3). Фотобликинг ФС в процессе фотодинамического воздействия

контролировался за счет регистрации в одном динамическом диапазоне диффузно рассеянного лазерного излучения и флуоресценции в БИК-диапазоне (Рис. 4).

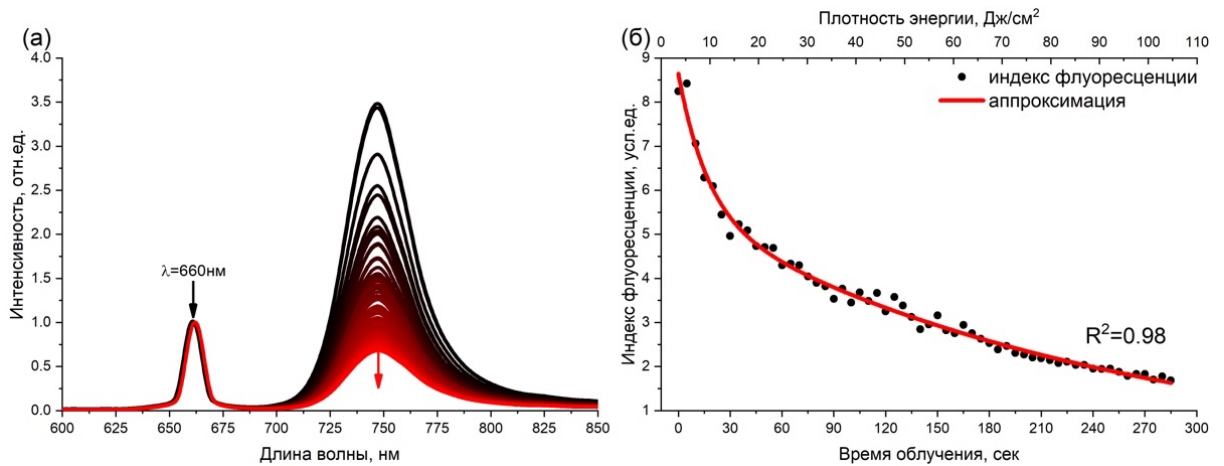


Рис. 4. Спектроскопический контроль фототерапии опухоли в процессе лазерного облучения: (а) регистрируемая спектральная информация; (б) распределение индексов флуоресценции опухоли. Плотность мощности лазерного излучения 365 мВт/см^2 .

Полученные в процессе лазерно-индуцированной ФДТ распределения индексов флуоресценции были аппроксимированы двухэкспоненциальной функцией:

$$IF(t) = A_1 \cdot e^{-k_1 t} + A_2 \cdot e^{-k_2 t} + \text{const}, \quad (3)$$

где $IF(t)$ – индексы флуоресценции в процессе облучения; A_1, A_2 – коэффициенты аппроксимации; t – время облучения; k_1, k_2 – скорости фотобликинга ФС. В длинноволновом диапазоне преобладание рассеяния над поглощением позволяет анализировать структурные особенности биологических тканей. Было выявлено, что контроль интенсивностей диффузно рассеянного лазерного излучения и флуоресценции ФС позволяет определять момент тромбирования сосудистой системы тканей в зоне облучения (Рис. 5).

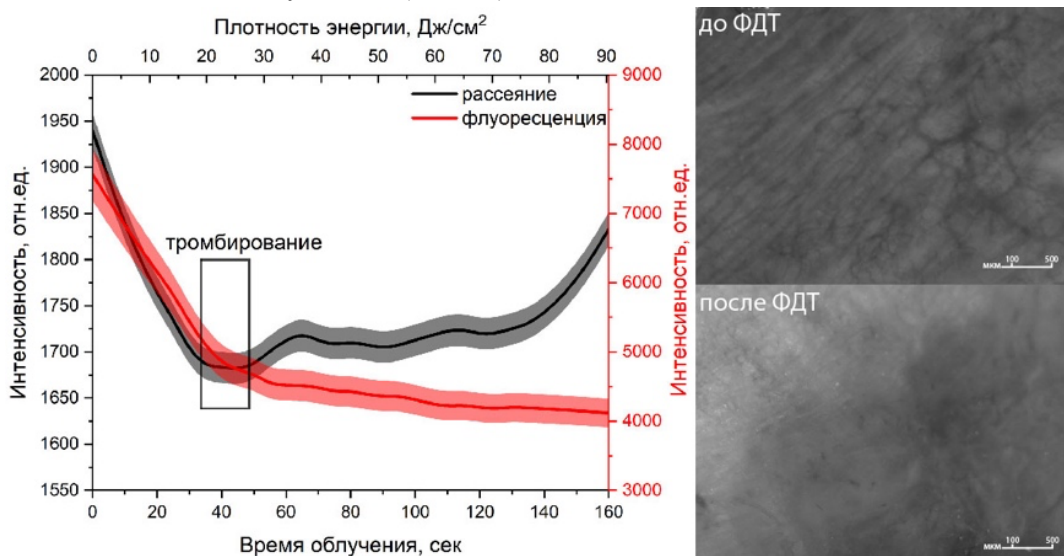


Рис. 5. Распределение интенсивностей диффузно рассеянного лазерного излучения (650–670 нм) и флуоресценции Се6 (725–800 нм) и результаты видео-капилляроскопии опухоли до и после ФДТ.

Так как Себ преимущественно локализован в сосудистой системе опухоли, при ФДТ повреждаются эндотелий кровеносных сосудов, что приводит к запуску процесса их тромбирования, особенно артериальной части капилляров. В тромбогенезе ведущую роль играют тромбоциты, которые прилипают к месту повреждения и вместе с лейкоцитами образуют так называемый «белый тромб», где позднее откладывается фибрин, в нитях которого застревают эритроциты и образуется «красный тромб» [6]. В процессе тромбирования за счет ограничения доступа оксигемоглобина и увеличения плотности тканей увеличивается интенсивность диффузно рассеянного лазерного излучения. Тромбирование сосудистой системы тканей при ФДТ с Себ также было подтверждено результатами видеокапилляроскопии (Рис. 5).

В § 5 представлен спектроскопический метод комбинированного контроля эффективности лазерно-индуцированного фотодинамического воздействия, который позволяет одновременно оценить оксигенацию гемоглобина, изменение интенсивности диффузно рассеянного лазерного излучения и флуоресценции ФС в процессе лазерного облучения (Рис. 6).

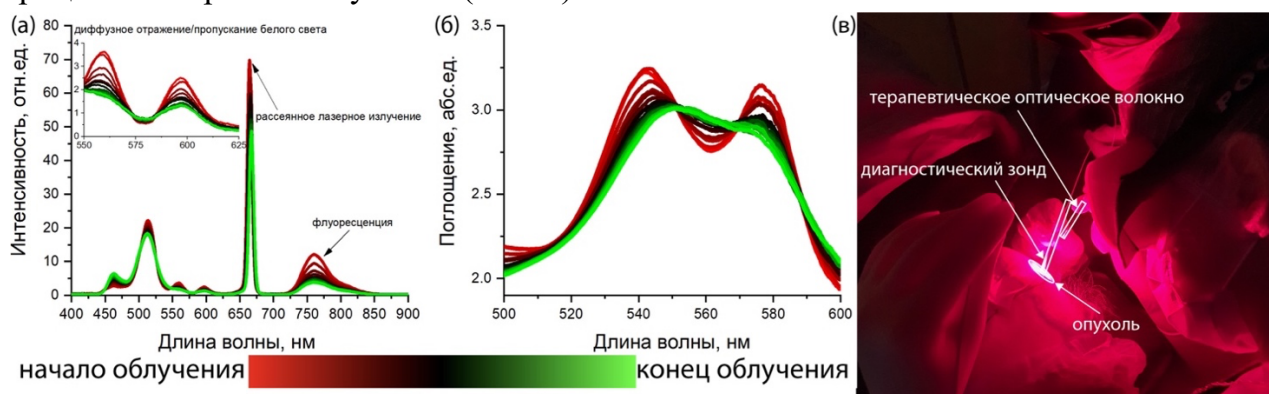


Рис. 6. Спектроскопический комбинированный контроль эффективности лазерно-индуцированного фотодинамического воздействия: (а) диффузно отраженный белый свет и лазерное излучение, а также флуоресценция Себ в БИК-диапазоне; (б) поглощение гемоглобина; (в) интраоперационный процесс фототерапии опухоли с комбинированным спектроскопическим контролем.

Данный метод подразумевает применение одного источника лазерного излучения ($\lambda = 660 \pm 5$ нм) для спектроскопической диагностики и лазерно-индуцированной ФДТ. В § 6 представлены результаты сравнительного исследования спектроскопического комбинированного контроля ФДТ с применением оптических фантомов, содержащих эритроциты и Себ. После начала лазерного облучения на 20–25 с наблюдалось временное гиперосмотическое разбухание эритроцитов. С увеличением концентрации Себ наблюдалось увеличение интенсивности диффузно прошедшего лазерного излучения вследствие разрушения эритроцитов и, соответственно, уменьшения концентрации рассеивающих центров в среде. При лазерном облучении наблюдался двухэкспоненциальный процесс уменьшения интенсивности флуоресценции Себ (Рис. 7). В процессе ФДТ наблюдалось

разрушение мембран эритроцитов и дальнейшее уменьшение интенсивности флуоресценции Себ, однако в данном случае скорость фотоблинка Себ в среднем уменьшалась в 14 раз. Разрушающее действие $^1\text{O}_2$ преимущественно было направлено на мембраны эритроцитов.

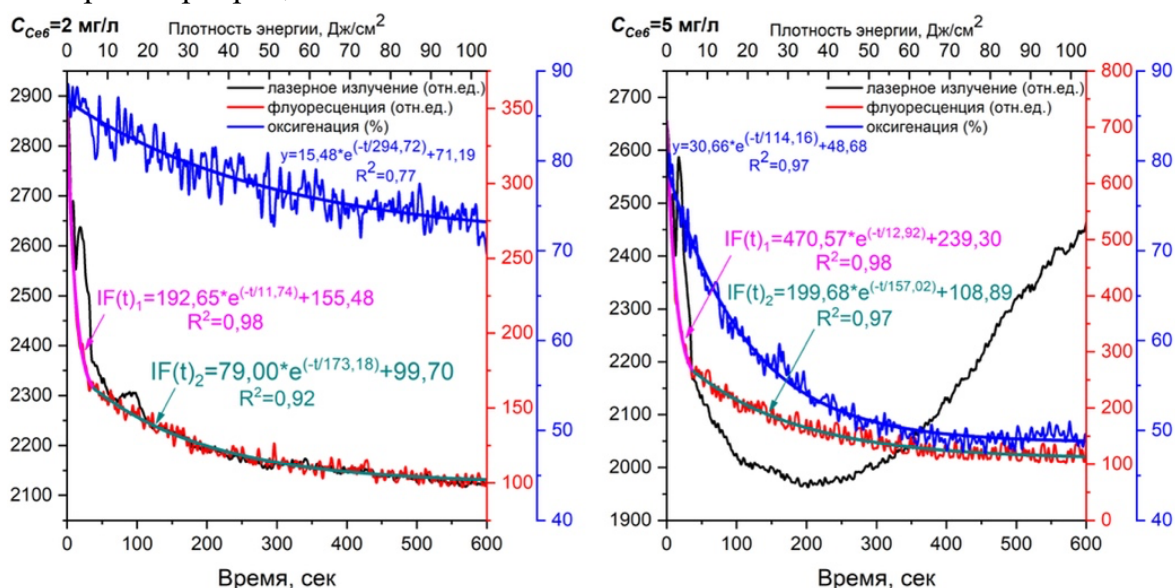


Рис. 7. Распределения интенсивностей диффузного пропускания лазерного излучения ($\lambda_{\text{exc}} = 660 \text{ нм}$), флуоресценции Себ (725–800 нм) и оксигенации гемоглобина в процессе лазерного облучения. Время экспозиции 30 мс. Временной интервал регистрации спектров 5 с. Плотность мощности лазерного излучения 173 мВт/см^2 . Плотность мощности широкополосного белого света $11 \pm 3 \text{ мВт/см}^2$.

В § 7 представлены результаты интраоперационного спектроскопического комбинированного контроля лазерно-индуцированной ФДТ опухолей кожи. По результатам спектроскопической диагностики отмечалась селективность накопления Себ в опухоли по сравнению с нормальными тканями. При этом выделялись случаи с высоким уровнем накопления Себ (Рис. 8а,в) и низким уровнем накопления Себ (Рис. 8б,г) в опухоли. Низкий уровень накопления Себ преимущественно наблюдался у пациентов, которым проводилась повторная процедура ФДТ. На Рис. 8 представлены результаты спектроскопического комбинированного контроля фотодинамического воздействия в процессе лазерного облучения опухоли.

В случае с высоким уровнем накопления Себ в процессе ФДТ интенсивность диффузно рассеянного лазерного излучения в определенный момент времени начинала увеличиваться, а скорость фотоблинка ФС уменьшаться в связи с полным тромбированием сосудистой системы в облучаемой зоне. Пока к опухоли поступала кровь, наблюдался быстрый фотоблинка Себ за счет притока оксигемоглобина, что подтверждалось результатами оценки кровенаполненности. В случае с низким накоплением Себ уровень оксигенации гемоглобина в начале облучения оставался на одном уровне. При этом интенсивности диффузно рассеянного лазерного излучения и кровенаполненности уменьшались, что может быть связано с временным сосудистым сужением и, вследствие этого, с «просветлением» облучаемых биологических тканей.

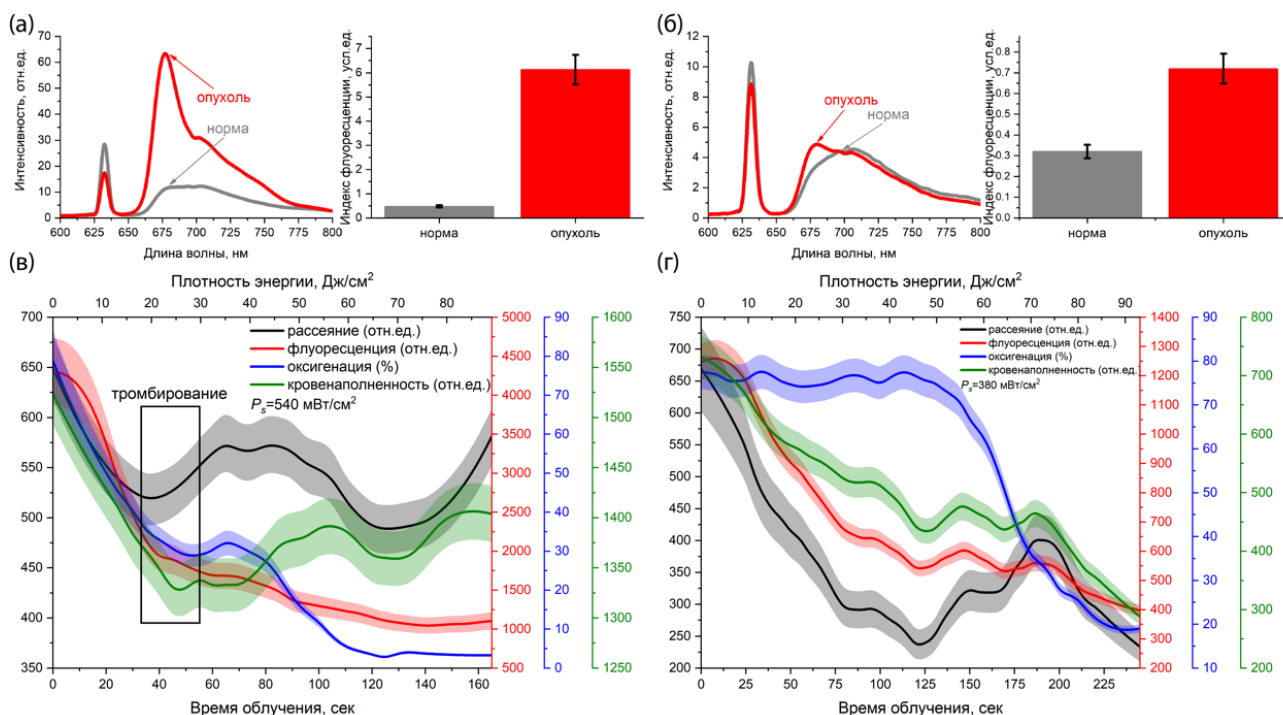


Рис. 8. Спектроскопический комбинированный контроль фототерапии опухоли: (а,б) спектроскопическая диагностика до ФДТ, $\lambda_{exc}=632,8$ нм; (в,г) распределения интенсивностей диффузно рассеянного лазерного излучения (650–670 нм), флуоресценции Себ (725–800 нм), уровня оксигенации гемоглобина и кровенаполненности опухоли (520–590 нм) в процессе лазерного облучения. Время экспозиции 20 мс. Временной интервал регистрации спектров 5 с.

Четвертая глава посвящена разработке устройства для ИК-визуализации кровеносных сосудов методом регистрации обратно рассеянного лазерного излучения и оценки состояния сосудистой системы биологических тканей [А3]. В § 1 описаны существующие методы ИК-визуализации кровеносных сосудов и предпосылки создания разрабатываемого устройства. Разница в поглощении и рассеянии в БИК-диапазоне между эритроцитами, преимущественно локализованными в крупных кровеносных сосудах, и окружающими тканями дает возможность регистрировать изображения поглощения подкожных кровеносных сосудов в диффузно рассеянном назад свете [7]. В § 2 представлены схема работы и внешний вид системы визуализации кровеносных сосудов методом регистрации и анализа обратно рассеянного лазерного излучения (Рис. 9).

Лазерное излучение доставляется через 20 полимерных оптических волокон диаметром 500 мкм с апертурой $NA=0,22$ в режиме контакта «оптическое волокно–кожа». ИК-камера регистрирует обратно рассеянное лазерное излучение, и на экране монитора отображаются «теневые» изображения кровеносных сосудов [П4].

В § 3 описывается метод определения оптимальных длин волн для ИК-визуализации кровеносных сосудов в диапазоне 700–860 нм методом регистрации обратно рассеянного лазерного излучения. На границе кровеносного сосуда с окружающей тканью наблюдается скачок яркости, а скорость данного скачка

характеризует степень размытия/резкости границы. Для оценки резкости границ кровеносных сосудов профиль яркости аппроксимировался сигмоидальной функцией с дальнейшим дифференцированием:

$$\sigma(x) = \frac{L}{1+e^{-k(x-x_0)}} - A \Rightarrow \frac{d\sigma}{dx} = Lk \frac{e^{-k(x-x_0)}}{(1+e^{-k(x-x_0)})^2}, \quad (4)$$

где L , x_0 , k , A – параметры, которые задают размах по оси ординат, абсциссу точки перегиба, крутизну кривой и сдвиг по оси ординат соответственно. В § 4 анализируется оптимальный диапазон длин волн для ИК-визуализации подкожных кровеносных сосудов методом регистрации и анализа обратно рассеянного лазерного излучения. Наибольшая контрастность кровеносных сосудов наблюдалась в диапазоне длин волн 700–800 нм, а наибольшее значение коэффициента резкости на длине волны 760 нм.

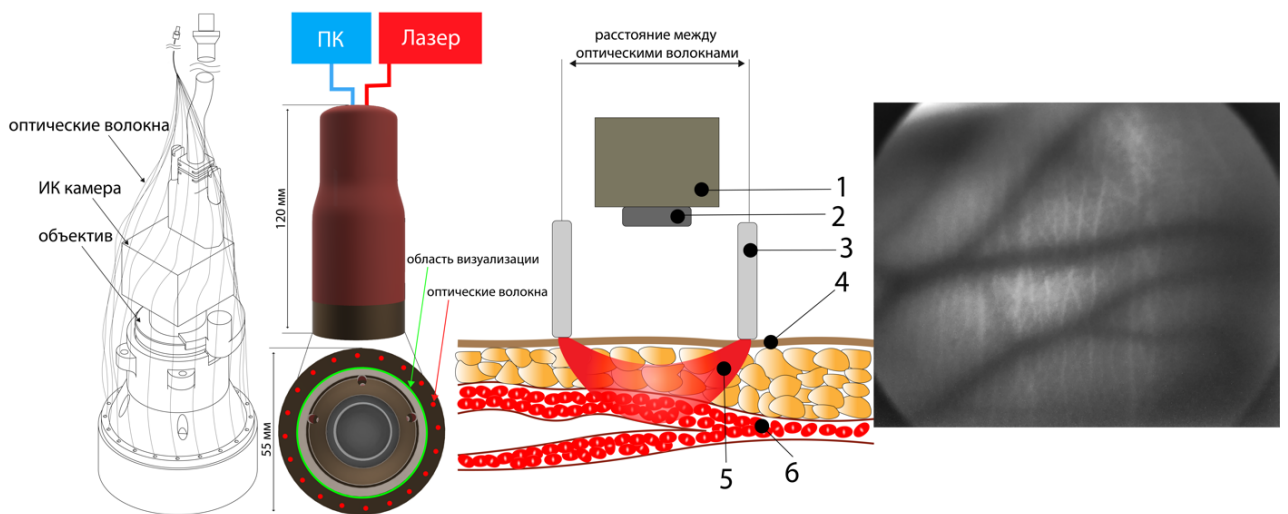


Рис. 9. Внешний вид и схема работы устройства для визуализации кровеносных сосудов с примером регистрируемых изображений: 1 – ИК камера; 2 – объектив; 3 – оптические волокна; 4 – кожа; 5 – зондирующее лазерное излучение; 6 – кровеносные сосуды.

В § 5 представлены результаты моделирования методом Монте-Карло распространения лазерного излучения ($\lambda = 800$ нм) в трехслойной модели кожи человека. При расположении оптических волокон на расстоянии друг от друга более 28,5 мм глубина зондирования составляла более 6 мм. Зависимость глубины зондирования излучением была аппроксимирована функцией

$$y(r) = a - b \cdot \ln(r + c), \quad (5)$$

где r – расстояние между оптическими волокнами; a , b и c – коэффициенты пропорциональности. В § 6 проводится сравнительное применение ИК-визуализации подкожных вен человека методом диффузно рассеянного лазерного излучения и методом прямого освещения поверхности с регистрацией отраженного сигнала. Предложенный метод визуализации с волоконно-оптическим способом доставки обеспечивает получение более высококонтрастных изображений кровеносных сосудов (Рис. 10).

В § 7 приведены результаты ИК-визуализации опухоли до и после ФДТ с применением Себ. После ФДТ границы опухоли становятся менее контрастными в сравнении с изображениями до ФДТ, что обусловлено тромбированием кровеносных сосудов в зоне лазерного облучения, преимущественно в артериальной части капилляров (Рис. 11). В данном случае по результатам спектроскопической диагностики в процессе ФДТ также наблюдалось ограничение циркуляции крови в тканях, что было подтверждено результатами оценки уровня оксигенации гемоглобина и кровенаполненности, которые уменьшались после ФДТ.

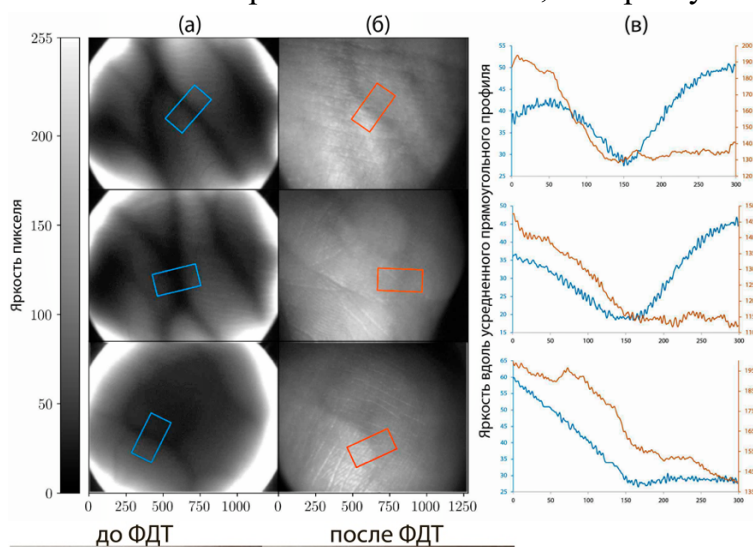


Рис. 10. ИК-визуализация одних и тех же зон при различных способах доставки лазерного излучения ($\lambda=800$ нм): (а) в контакте оптических волокон с кожей по периметру исследуемой зоны; (б) методом прямого освещения поверхности; (в) усредненные профили яркости выделенных зон.

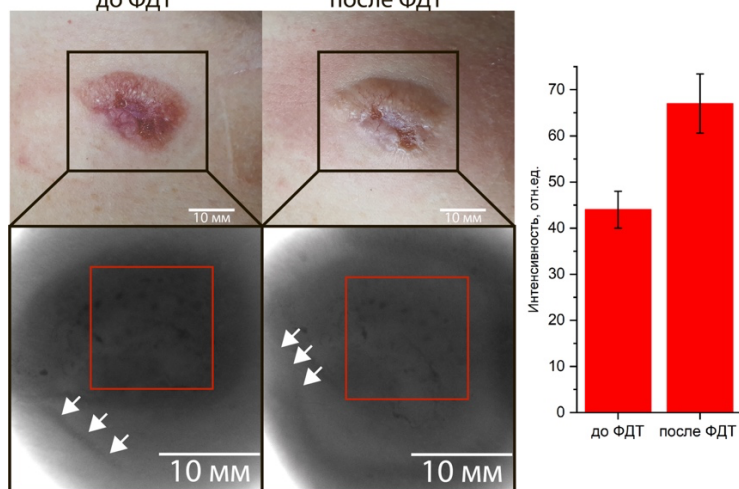


Рис. 11. Изображения опухоли кожи, полученные в цветном режиме и методом регистрации обратно рассеянного лазерного излучения ($\lambda=785$ нм) до и после ФДТ.

Пятая глава посвящена разработке метода предварительного лазерного облучения опухоли с применением Себ, позволяющего неинвазивно локально увеличить концентрацию ФС в тканях опухоли [А4]. Предварительное воздействие подразумевало облучение ткани лазерным излучением с $\lambda = 660 \pm 5$ нм и плотностью энергии 10–20 Дж/см². В § 1 представлены результаты флуоресцентной оценки накопления и степени фотобликинга Себ в тканях опухоли и границы опухоли (~5 мм). Исследование проводилось на 19 пациентах с опухолями кожи. В большинстве случаев (65%) значения индексов флуоресценции в опухоли после предварительного лазерного облучения превышали значения до облучения, тогда как в тканях границы опухоли в большинстве случаев (58%) наблюдалось уменьшение индексов флуоресценции ($p < 0.01$, ранговый *W*-критерий Вилкоксона). В § 2

представлены результаты оценки концентрационного распределения Себ в опухоли и на границе опухоли до и после предварительного лазерного облучения. Медиана выборки концентраций Себ до ФДТ в норме составляла 0,07 мг/кг с интерквартильным размахом (interquartile range, IQR) 0,03–0,39 мг/кг, в опухоли 0,71 мг/кг (IQR=0,18–1,38 мг/кг), а в тканях границы опухоли 0,26 мг/кг (IQR=0,07–0,89 мг/кг). После предварительного облучения с плотностью энергии излучения 10–20 Дж/см² медианное значение концентрации Себ в опухоли составило 0,92 мг/кг (IQR=0,23–2,35 мг/кг), т.е. наблюдалось увеличение концентрации Себ в 1,3 раза.

В § 3 представлены результаты конфокальной микроскопической оценки распределения Себ в опухоли до и после предварительного лазерного облучения. Наибольшая интенсивность флуоресценции Себ до ФДТ наблюдалась в области кровеносных сосудов, однако после низкоинтенсивного лазерного облучения отмечалось тромбирование кровеносных сосудов, а интенсивная флуоресценция Себ обнаруживалась и в тканях паренхимы опухоли (Рис. 12).

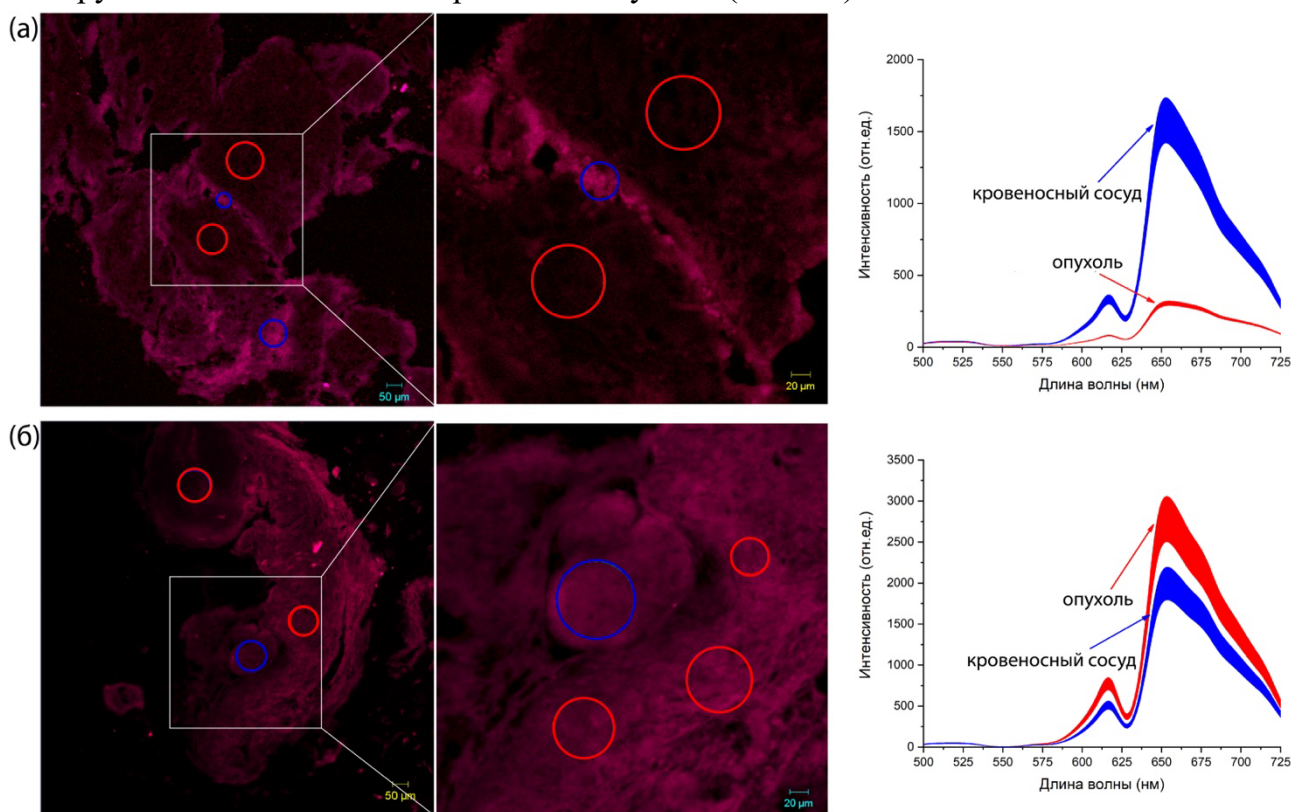


Рис. 12. Микроскопические флуоресцентные изображения тканей опухоли и спектры флуоресценции спустя 3 часа после внутривенного введения Себ (область кровеносного сосуда выделена синим; область паренхимы опухоли выделена красным): (а) до ФДТ; (б) после ФДТ с плотностью мощности 310 мВт/см² и плотностью энергии 10 Дж/см².

В § 4 приведены результаты спектроскопического исследования уровня оксигенации гемоглобина в опухоли с Себ в процессе предварительного лазерного облучения. При лазерном облучении с плотностью энергии излучения 10 Дж/см² уровень оксигенации гемоглобина снижался в опухоли на 27 % и на 25 % в тканях

границы опухоли (Рис. 13). При дальнейшем предварительном лазерном облучении наблюдалось увеличение уровня оксигенации гемоглобина и достижение значений, которые наблюдались до ФДТ. После основного лазерного облучения, т.е. после непрерывной ФДТ с поверхностной плотностью мощности 700 мВт/см^2 и плотностью энергии 100 Дж/см^2 , наблюдалось тромбирование кровеносных сосудов. Таким образом, предварительное лазерное облучение позволяет избежать полного тромбирования кровеносных сосудов, что обеспечивает поступление ФС и кислорода, содержащихся в крови, в облучаемые ткани в процессе светового воздействия и, тем самым, увеличивает эффективность ФДТ.

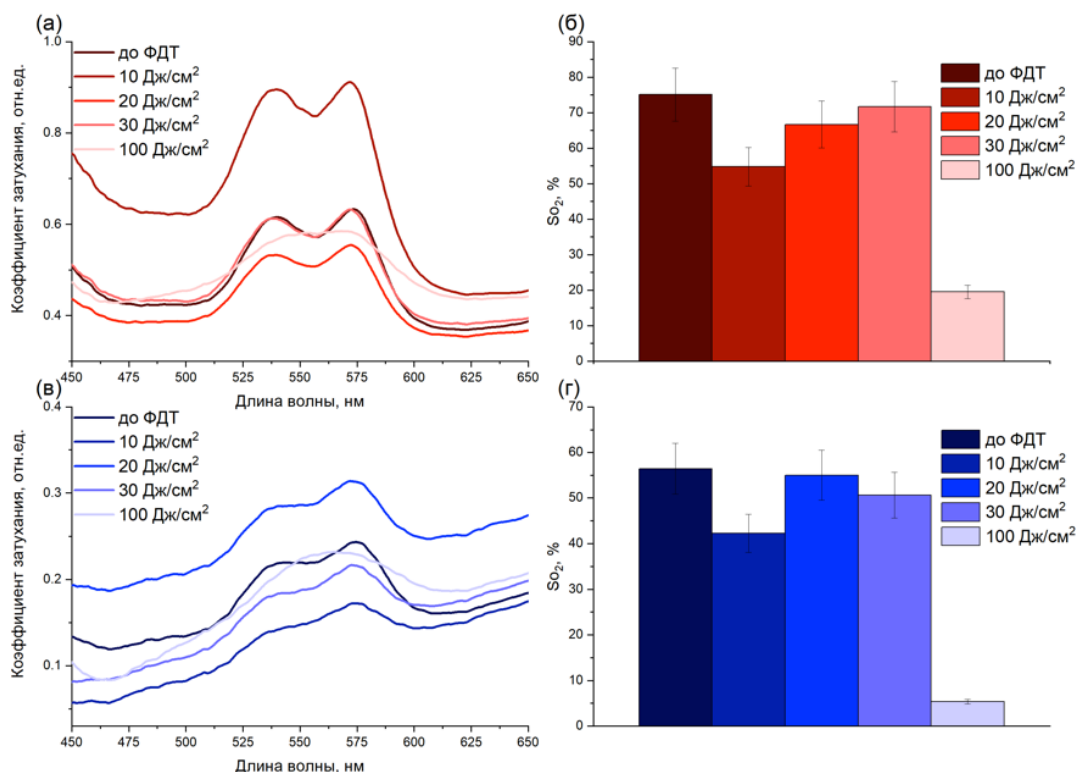


Рис. 13. Спектроскопический контроль оксигенации гемоглобина в опухоли и границе опухоли: (а,в) спектры коэффициента ослабления света в диапазоне длин волн, в пределах которого рассчитывалась оксигенация гемоглобина; (б,г) уровень оксигенации гемоглобина.

В § 5 приведены результаты оценки клинической эффективности применения предварительного лазерного облучения опухоли с внутривенным капельным введением Себ. После 1–2 процедур ФДТ в 90 % случаев отмечалась полная регрессия опухоли с формированием небольшого рубца, что улучшило качество жизни пациентов. По результатам гистологического исследования фрагментов кожи спустя 1 месяц после ФДТ наблюдалась гиперплазия эпидермиса с выраженным фиброзом дермы и периваскулярными лимфоидными инфильтратами (Рис. 14).

С применением разработанных методов и устройств, обеспечивающих флуоресцентную навигацию распределения ФС, контроль изменения интенсивности флуоресценции ФС или оксигенации гемоглобина в процессе лазерного облучения,

было проведено более 350 процедур ФДТ. Применение данных разработок обеспечивает контроль на всех этапах процедуры ФДТ.



Рис. 14. Изображения новообразований пациентов с раком кожи: (а) до ФДТ; (б) спустя 1 месяц после ФДТ.

В **Заключении и выводах** сформулированы основные результаты работы.

1. Разработанный метод спектроскопического контроля процесса лазерного облучения опухолей с применением РрIX и Себ с регистрацией длинноволнового плеча флуоресценции в диапазоне длин волн 725–800 нм позволил провести интраоперационную флуоресцентную навигацию распределения ФС. Метод включает применение одного источника лазерного излучения, который одновременно используется для ФД и ФДТ, что обеспечивает проведение спектроскопического контроля изменения интенсивности флуоресценции ФС в процессе фотодинамического воздействия. Метод в режиме реального времени позволяет контролировать скорости процессов фотоблинка ФС и тромбирования кровеносных сосудов.
2. Разработан метод спектроскопического определения оптимального времени продолжительности светового облучения непосредственно в процессе лазерно-индуцированного фотодинамического воздействия за счет комбинированного контроля изменений интенсивности флуоресценции Себ, уровня оксигенации

гемоглобина и диффузно рассеянного лазерного излучения ($\lambda=660\pm 5$ нм), характеризующего оптические свойства биологических тканей. Метод обеспечивает в режиме реального времени регистрацию спектроскопических сигналов (с экспозицией 20–50 мс и временным интервалом регистрации спектров 3–5 с) с оценкой основных параметров биологических тканей, отвечающих за эффективность фотодинамического воздействия.

3. Разработано устройство для ИК-визуализации приповерхностных вен человека методом регистрации и анализа обратно рассеянного лазерного излучения с волоконно-оптическим способом доставки света к области исследования. Устройство позволяет визуализировать подкожные вены и оценить изменения кровенаполненности биологических тканей, содержащих ФС, при фотодинамическом воздействии. Установлено, что наибольшая контрастность вен при визуализации методом регистрации диффузно рассеянного лазерного излучения в диапазоне 700–860 нм наблюдается на длине волны 760 нм.

4. Выявлены изменения внутритканевого распределения Себ в опухолях кожи с внутривенным способом введения ФС в процессе предварительного лазерного облучения с плотностью мощности 130–310 мВт/см² и шагом плотности энергии 10 Дж/см². Установлено, что предварительное низкоинтенсивное лазерное облучение опухоли увеличивает медианную концентрацию Себ в тканях, что повышает эффективность ФДТ.

Разработанные методы и устройства апробированы и применяются в Институте кластерной онкологии им. Л. Л. Левшина Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

Список основных публикаций по теме диссертации

A1 **Efendiev K.T.**, Alekseeva P.M., Shiryayev A.A. et al. Comparative investigation of 5-aminolevulinic acid and hexyl aminolevulinate-mediated photodynamic diagnostics and therapy of cervical dysplasia and vulvar leukoplakia // *Laser Physics Letters*. – 2021. – Т. 18. – №. 6. – С. 065601.

A2 **Efendiev K.**, Alekseeva P., Shiryayev A. et al. Near-infrared phototheranostics of tumors with protoporphyrin IX and chlorin e6 photosensitizers // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2023. – Т. 42. – С. 103566.

A3 **Efendiev K.**, Grachev P., Moskalev A. et al. Non-invasive high-contrast infrared imaging of blood vessels in biological tissues by the backscattered laser radiation method // *Infrared Physics and Technology*. – 2020. – Т. 111. – С. 103562.

A4 **Efendiev K.T.**, Alekseeva P.M., Shiryayev A.A. et al. Preliminary low-dose photodynamic exposure to skin cancer with chlorin e6 photosensitizer // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2022. – Т. 38. – С. 102894.

A5 Alekseeva P.M., **Efendiev K.T.**, Savelieva T.A. et al. Optimization of energy parameters for laser-induced PDT of cervical tissues using numerical simulation and fluorescent monitoring // *Laser Physics*. – 2023. – Т. 33. – №. 6. – С. 065602.

- A6 Shiryaev A.A., **Efendiev K.T.**, Kornev D.O. et al. Photodynamic therapy of classic Kaposi's sarcoma with video-fluorescence control // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2021. – Т. 35. – С. 102378.
- A7 Kozlikina E.I., **Efendiev K.T.**, Grigoriev A.Y. et al. A Pilot Study of Fluorescence-Guided Resection of Pituitary Adenomas with Chlorin e6 Photosensitizer // *Bioengineering*. – 2022. – Т. 9. – №. 2. – С. 52.
- A8 Alekseeva P.M., **Efendiev K.T.** et al. Sublingual administration of 5-aminolevulinic acid for laser-induced photodiagnostics and photodynamic therapy of oral cavity and larynx cancers // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2021. – Т. 34. – С. 102289.
- A9 Alekseeva P.M., **Efendiev K.T.**, Loshchenov M.V. et al. Combined spectral- and video-fluorescent diagnostics of cervical neoplasms for photodynamic therapy // *Laser Physics Letters*. – 2020. – Т. 17. – №. 10. – С. 105602.
- A10 Kustov D.M., Kozlikina E.I., **Efendiev K.T.** et al. Laser-induced fluorescent visualization and photodynamic therapy in surgical treatment of glial brain tumors // *Biomedical Optics Express*. – 2021. – Т. 12. – №. 3. – С. 1761-1773.
- A11 Shiryaev A.A., Minaev V.V., Stolyarov V.I., **Efendiev K.T.** et al. A method for intra-pericardial PDT for malignant mesothelioma // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2022. – Т. 38. – С. 102799.
- A12 Gilyadova A., Ishchenko A., Ishenko A., Samoiloa S., Shiryaev A., Kiseleva A., Petukhova N., **Efendiev K.** et al. Analysis of the Results of Severe Intraepithelial Squamous Cell Lesions and Preinvasive Cervical Cancer Phototheranostics in Women of Reproductive Age // *Biomedicines*. – 2022. – Т. 10. – №. 10. – С. 2521.
- A13 Гилядова А.В., Романко Ю.С., Ищенко А.А., **Эфендиев К.Т.** и др. Фотодинамическая терапия предраковых заболеваний и рака шейки матки (обзор литературы) // *Biomedical Photonics*. – 2022. – Т. 10. – №. 4. – С. 59-67.
- A14 Yakovlev D., Shiryaev A., Farrakhova D., Savelieva T., **Efendiev K.** et al. Comparison of the Capabilities of Spectroscopic and Quantitative Video Analysis of Fluorescence for the Diagnosis and Photodynamic Therapy Control of Cholangiocellular Cancer // *Photonics*. – MDPI, 2022. – Т. 9. – №. 2. – С. 65.
- A15 Gilyadova A., Ishchenko A., Shiryaev A., Alekseeva P., **Efendiev K.** et al. Phototheranostics of cervical neoplasms with chlorin e6 photosensitizer // *Cancers*. – 2022. – Т. 14. – №. 1. – С. 211.
- A16 Гилядова А.В., Ищенко А.А., Аполихина И.А., **Эфендиев К.Т.** и др. Возможности применения фотодинамической терапии в лечении предраковых заболеваний и рака шейки матки // *Акушерство и гинекология*. 2022. – № 5. – С. 35-42.
- A17 Козликина Е.И., **Эфендиев К.Т.**, Трифонов В.В. и др. Разработка и клиническая апробация баллонного устройства для флуоресцентной диагностики и контролируемой фотодинамической терапии глиальных опухолей головного мозга // *Лазерная медицина*. – 2021. – Т. 25. – №. 3S. – С. 32.

- A18 Morozova N.B., Pavlova M.A., Plyutinskaya A.D., Pankratov A.A., **Efendiev K.T.** et al. Photodiagnosis and photodynamic effects of bacteriochlorin-naphthalimide conjugates on tumor cells and mouse model // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2021. – Т. 223. – С. 112294.
- A19 Kozlikina E.I., Pominova D.V., Ryabova A.V., **Efendiev K.T.** et al. Spectroscopic measurement of methylene blue distribution in organs and tissues of hamadryas baboons during oral administration // Photonics. – MDPI, 2021. – Т. 8. – №. 8. – С. 294.
- A20 Баранов А.В., Корнев А.И., Борискин А.А., Мустафаев Р.Д., Дербенев В.А., Горин Д.С., **Эфендиев К.Т.** Накопление фотосенсибилизатора в слизистой оболочке мочевого пузыря при хроническом цистите // Лазерная медицина. – 2021. – Т. 24. – №. 2-3. – С. 9-14.
- A21 Yakovlev D.V., Farrakhova D.S., Shiryaev A.A., **Efendiev K.T.** et al. New approaches to diagnostics and treatment of cholangiocellular cancer based on photonics methods // Frontiers of Optoelectronics. – 2020. – Т. 13. – С. 352-359.
- A22 Loshchenov M., Levkin V., Kalyagina N., Linkov K., Kharnas S., **Efendiev K.** et al. Laser-induced fluorescence diagnosis of stomach tumor // Lasers in Medical Science. – 2020. – Т. 35. – С. 1721-1728.
- A23 Shiryaev A., Alekseeva P., **Efendiev K.** et al. Investigated spectral-fluorescent properties of endogenous porphyrins of the wild boar hepatobiliary system optimize the diagnostics and treatment of cholangiocarcinoma with FD and PDT // Optical Engineering. – 2020. – Т. 59. – №. 6. – С. 061615-061615.
- A24 Farrakhova D., Shiryaev A., Yakovlev D., **Efendiev K.** et al. Trials of a fluorescent endoscopic video system for diagnosis and treatment of the head and neck cancer // Journal of Clinical Medicine. – 2019. – Т. 8. – №. 12. – С. 2229.

Патенты

- П1 Патент № 2767264 С1 Российская Федерация. Способ внутривидеотерапии холангиоцеллюлярного рака. Д.В. Яковлев, Д.С. Фаррахова, П.В. Грачев, **К.Т. Эфендиев** [и др.].
- П2 Патент № 2782643 С1 Российская Федерация. Способ фотодинамической терапии новообразований шейки матки и вульвы под контролем совместной видео- и спектрально-флуоресцентной диагностики с применением фотосенсибилизаторов хлоринового ряда. П.М. Алексеева, **К.Т. Эфендиев**, М.В. Лощенов [и др.].
- П3 Патент № 2777486 С1 Российская Федерация. Устройство для проведения фотодинамической терапии с возможностью одновременного спектрально-флуоресцентного контроля фотобличинга фотосенсибилизатора. **К.Т. Эфендиев**, П.М. Алексеева, А.А. Ширяев, В.Б. Лощенов.
- П4 Патент на полезную модель № 204680 U1 Российская Федерация. Устройство для контактной инфракрасной визуализации кровеносных сосудов методом обратно рассеянного лазерного излучения. **К.Т. Эфендиев**, П.В. Грачев, В.Б. Лощенов.

Список цитируемой литературы

1. Pogue B. W., Patterson M. S. Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry // *Journal of Biomedical Optics*. – 2006. – Т. 11. – № 4. – С. 041102-041102-16.
2. Croce A. C., Bottiroli G. Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis // *European Journal of Histochemistry: EJH*. – 2014. – Т. 58. – №. 4.
3. Ruiz A. J. et al. Effective fluence and dose at skin depth of daylight and lamp sources for PpIX-based photodynamic therapy // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2023. – С. 103260.
4. Савельева, Т. А. Комбинированный спектроскопический метод исследования сильнорассеивающих биологических сред: специальность 01.04.21–Лазерная физика: диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук. – Москва, ИОФ РАН, 2013. – 118 с.
5. Рябова А. В., Стратонников А. А., Лощенов В. Б. Лазерно-спектроскопический метод оценки эффективности фотосенсибилизаторов в биологических средах // *Квантовая электроника*. – 2006. – Т. 36. – №. 6. – С. 562-568.
6. Порядин Г.В. Патофизиология гемореологии и микроциркуляции РГМУ.–2007.
7. Jacques S. L. Optical properties of biological tissues: a review // *Physics in Medicine & Biology*. – 2013. – Т. 58. – №. 11. – С. R37.