

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук»
Центр естественно-научных исследований

На правах рукописи



Эфендиев Канагат Темботович

СПЕКТРОСКОПИЧЕСКАЯ ИНТРАОПЕРАЦИОННАЯ ДИАГНОСТИКА
В ПРОЦЕССЕ ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ

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—2023

Оглавление

Список сокращений	5
Введение	6
Глава 1. Аналитический обзор литературы	14
1.1 Распространение света в биологических тканях	14
1.2 Фотодинамическая терапия и флуоресцентная диагностика	20
1.3 Фотобличинг фотосенсибилизатора в процессе фотодинамической терапии	21
1.4 Механизмы действия фотодинамической терапии на опухоль . . .	27
1.4.1 Апоптоз и некроз	29
1.4.2 Сосудистый механизм	30
1.4.3 Иммунологический механизм	30
1.5 Влияние фотодинамической терапии на сосудистую систему опу- холи	32
Заключение по главе 1	34
Глава 2. Материалы и методы исследования	35
2.1 Фотосенсибилизаторы Ce6 и PrIX	35
2.2 Установка для спектрально-флуоресцентной навигации	38
2.3 Установка для видео-флуоресцентной визуализации	40
2.4 Оптические фантомы биологических тканей	41
2.5 Методы интраоперационной оценки накопления фотосенсибили- затора	44
2.6 Спектроскопический метод оценки оксигенации гемоглобина . . .	46
2.7 Моделирование распространения лазерного излучения методом Монте-Карло	48
2.8 Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия	51
Заключение по главе 2	52

Глава 3. Разработка метода спектроскопической диагностики в БИК-диапазоне с фотосенсибилизаторами Себ и РrIX	53
3.1 Метод спектроскопической диагностики в БИК-диапазоне	53
3.2 Преимущества флуоресцентной навигации в БИК-диапазоне	62
3.3 Спектроскопическая диагностика оптических фантомов в БИК-диапазоне	65
3.4 Интраоперационная флуоресцентная диагностика в БИК-диапазоне	68
3.5 Метод спектроскопического комбинированного контроля фотодинамического воздействия в процессе лазерного облучения	74
3.6 Спектроскопический комбинированный контроль лазерного облучения оптических фантомов	79
3.7 Интраоперационный спектроскопический комбинированный контроль лазерного облучения	81
Заключение к главе 3	85
Глава 4. Разработка устройства для ИК-визуализации кровеносных сосудов	87
4.1 Предпосылки создания устройства для визуализации кровеносных сосудов	87
4.2 Устройство для ИК-визуализации кровеносных сосудов	89
4.3 Метод определения оптимальных длин волн для ИК-визуализации кровеносных сосудов	92
4.4 Оптимальный диапазон длин волны для ИК-визуализации кровеносных сосудов	94
4.5 Глубина зондирования лазерного излучения в модели кожи человека	97
4.6 Преимущества ИК-визуализации методом регистрации диффузно рассеянного лазерного излучения	100
4.7 ИК-визуализация опухоли методом регистрации обратно рассеянного лазерного излучения	101
Заключение по главе 4	106
Глава 5. Разработка метода предварительного низкоинтенсивного лазерного облучения опухоли	108
5.1 Флуоресцентная навигация и фотодинамическая терапия с предварительным лазерным облучением	108

5.1.1	Видео-флуоресцентная визуализация опухоли	109
5.1.2	Спектрально-флуоресцентная навигация Себ	110
5.2	Концентрационное распределение Себ в процессе предварительного лазерного облучения	118
5.3	Микроскопическая оценка распределения Себ в опухоли после предварительного лазерного облучения	120
5.4	Спектроскопическая оценка оксигенации гемоглобина в процессе предварительного лазерного облучения	123
5.5	Клиническая эффективность предварительного лазерного облучения опухоли	124
	Заключение по главе 5	126
	Список иллюстраций	130
	Список таблиц	139
	Литература	140

Список сокращений

ФД - флуоресцентная диагностика
ФДТ - фотодинамическая терапия
ФС - фотосенсибилизатор
БИК – ближний инфракрасный
PpIX - протопорфирин IX
Се6 - хлорин е6
5-АЛК - 5-аминолевулиновая кислота
ИК - инфракрасный
АФК - активные формы кислорода
НАДН - никотинамидадениндинуклеотид
ДМСО - диметилсульфоксид
ОДО - обратное диффузное отражени
БКР - базально-клеточный рак
AlPc - фталоцианин алюминия
ММК - метод Монте-Карло
 pO_2 - давление кислорода

Введение

Актуальность диссертационной работы

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 [2]. 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 парамет-

ра, 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 [3]. 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 [4]. 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 [5]. В отличие от существующих, данный метод включает применение только одного источника лазерного излучения как для ФД, так и для ФДТ (фототераностики). Предложенный метод обеспечивает контроль в процессе лазерного облучения изменений интенсивностей флуоресценции ФС в диапазоне длин волн 725–800 нм и диффузно рассеянного лазерного излучения.

Разработка дозиметрического метода оценки эффективности ФДТ осложняется из-за динамических изменений микроциркуляции крови, насыщенности гемоглобина кислородом и распределения ФС по объему опухоли. Ранее [6] 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 [6, 7] 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.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы является 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 были поставлены 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

1. На базе разработанных методов и устройств созданы объекты интеллектуальной собственности, защищенные патентами РФ в количестве 4 шт :
 - Патент RU 2777486 C1: “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.
 - Патент RU 204680 U1: “Устройство для контактной инфракрасной визуализации кровеносных сосудов методом обратно рассеянного лазерного излучения”. **К. Т. Эфендиев**, П. В. Грачев, В. Б. Лощенов.
 - Патент RU 2782643 C1: “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.].
 - Патент RU 2767264 C1: “Способ внутрипротоковой фототераностики, включающий в себя проведение флуоресцентной диагностики во время фотодинамической терапии холангиоцеллюлярного рака в режиме реального времени”. Д. В. Яковлев, Д. С. Фаррахова, П. В. Грачев, **К. Т. Эфендиев** [и др.].
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 флуорофо-

ров 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.

Основные научные положения, выносимые на защиту

1. Спектроскопическая диагностика с возбуждением флуоресценции Себ и РrX в красном диапазоне длин волн и регистрацией длинноволнового пле-

ча 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.

Апробация работы

По результатам исследований опубликовано 24 статьи в рецензируемых журналах, удовлетворяющих требованиям ВАК (Q1 - 6 статей, Q2 - 13 статей, Q3 - 2 статьи, Q4 - 1 статья) и 15 тезисов в трудах научных конференций. На основе разработанных методов получены 4 патента. Публикации автора отражены в библиографических базах данных Web of Science - 21, Scopus - 23, РИНЦ - 20.

Личный вклад автора

Проведен критический анализ современной научной литературы по теме диссертационного исследования, разработаны методики измерения, разработаны методики экспериментального исследования распространения лазерного

и флуоресцентного излучения в гетерогенных биологических тканях, проведен анализ и визуализация полученных результатов, сформулированы выводы по полученным результатам. Автор непосредственно участвовал в проведении исследований, получении, интерпретации полученных результатов, а также в их оформлении в виде научных публикаций.

Гранты

Исследования частично были поддержаны грантом конкурсной программы для молодых ученых «УМНИК». Договор №13971ГУ/2019: «Разработка видео-флуоресцентной системы для оценки состояния поверхностных кровеносных и лимфатических сосудов человека в ближнем инфракрасном диапазоне с целью диагностирования сердечно-сосудистых заболеваний».

Благодарности

Автор благодарит своего научного руководителя Лощенова Виктора Борисовича за колоссальную помощь на всех этапах проведения исследований, ценные советы и замечания, которые позволили достичь поставленных целей. Автор также благодарит всех сотрудников лаборатории лазерной биоспектроскопии ИОФ РАН за научные дискуссии и дружескую поддержку. Особая благодарность Алексеевой Полине Михайловне за помощь в реализации исследований, а также за мотивационные беседы. Автор благодарит сотрудников Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Ширяева Артема Анатольевича и Гилядову Аиду Владимировну за помощь и возможность проведения клинических исследований.

Структура и объем диссертации

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

Глава 1

Аналитический обзор литературы

В данной главе рассматриваются особенности распространения света в биологических тканях с высоким уровнем гетерогенности, а также особенности флуоресцентной навигации биологических тканей. Особое внимание уделено рассмотрению разных механизмов действия ФДТ на ткани опухоли и ее сосудистую систему с применением ФС преимущественно клеточного и сосудистого типов. Также рассмотрены различные механизмы фотобличинга ФС в процессе лазерного воздействия.

1.1 Распространение света в биологических тканях

Вследствие высокой неоднородности (гетерогенности) биологических тканей, взаимодействие лазерного излучения с ними имеет сложный характер. Лазерное излучение при попадании в биологические ткани может отразиться, поглотиться, рассеяться или переизлучиться. Данные процессы позволяют получить информацию о макро- и микроструктуре исследуемой среды, движении и форме отдельных ее составляющих компонентов. В случае лазерного воздействия на биологические ткани важными факторами, влияющими на ткани являются: продолжительность облучения, режим светового облучения (непрерывный или импульсный) и длительность процессов, происходящих в облучаемой зоне. Интенсивности поглощенного, отраженного и рассеянного света зависят от оптических свойств тканей и длины волны падающего лазерного излучения. Практически оптически прозрачными биологическими тканями в диапазоне длин волн 380 – 780 нм являются хрусталик и роговица глаза. Биологические ткани, в которых лазерное излучение полностью рассеивается и поглощается, называются оптически непрозрачными [8]. Поглощающие свойства

тканей зависят от электронной структуры атомов или молекул (поглощающих центров), толщины поглощающего слоя, температуры среды, а также от длины волны падающего излучения. Энергия поглощенного кванта света соответствует разности энергий электронных состояний молекулы. Интенсивность лазерного излучения $I(\lambda)$, проходящего через биологическую среду толщиной d , в случае незначительного рассеяния, убывает по экспоненциальному закону в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера:

$$I(\lambda) = I_0(\lambda)e^{-\mu_a d} \quad (1.1)$$

где $I_0(\lambda)$ - интенсивность падающего лазерного излучения, μ_a - коэффициент поглощения, который характеризуется суммой вкладов всех хромофоров сложной гетерогенной биологической среды:

$$\mu_a(\lambda) = \sum_i (\epsilon_i(\lambda))C_i \quad (1.2)$$

где ϵ_i - коэффициент экстинкции, C_i - концентрация i -го хромофора. Спектроскопические методы исследования позволяют количественно определить вклад каждого отдельного поглотителя с учетом их коэффициентов поглощения в определенных диапазонах длин волн. Основными эндогенными поглотителями в биологической ткани в видимом диапазоне являются оксигемоглобин (HbO_2) и дезоксигемоглобин (Hb). В БИК-диапазоне липиды и вода обеспечивают дополнительное поглощение. Следует учитывать, что рост опухоли сопровождается неоваскуляризацией, что приводит к большей концентрации крови в этих тканях. Кроме того, более высокая скорость метаболизма опухолевых тканей приводит к снижению насыщения крови кислородом (оксигенации). В биологических тканях в видимом диапазоне вклад рассеяния гораздо больше, чем поглощение [9]. Величина, обратная коэффициенту поглощения μ_a называется длиной поглощения:

$$l_a = \frac{1}{\mu_a} \quad (1.3)$$

Клетки тканей содержат в себе сотни хромофоров (витамины, гемоглобин, флавины, каротиноиды, флавиновые ферменты и др.), поглощающих свет в видимом и УФ областях спектра.

Имеется строгая взаимосвязь присутствия многих эндогенных флуорофоров

с морфофункциональными свойствами тканей, которые влияют на их флуоресцентные свойства. Эндогенные флуорофоры, такие как никотинамидадениндинуклеотид (НАДН), флавины и порфирины (пероксидаза, каталаза, гемоглобин, миоглобин) участвуют во многих важных внутриклеточных процессах, таких как гликолиз, тканевое дыхание и цикл Кребса, а также играют важную роль в процессах, происходящих в клетках опухоли [10]. Эндогенные флуорофоры могут служить биомаркерами для изучения внутренних различий между нормальными и опухолевыми клетками [11]. Одной из главных особенностей при навигации опухолевой ткани методами спектроскопии аутофлуоресценции является определение различий уровня интенсивности эндогенной флуоресценции НАДН [12], т.к. редуцированная форма НАДН не является флуоресцентной, но присутствует в опухолевых клетках, что приводит к общему снижению интенсивности флуоресценции опухолевых клеток в спектральной области 420 – 460 нм [13]. Также интенсивность эндогенной флуоресценции опухоли, относительно здоровой ткани, может меняться при изменении внутриклеточного матрикса, т.е. при уменьшении содержания или частичного разрушения коллагена и эластина.

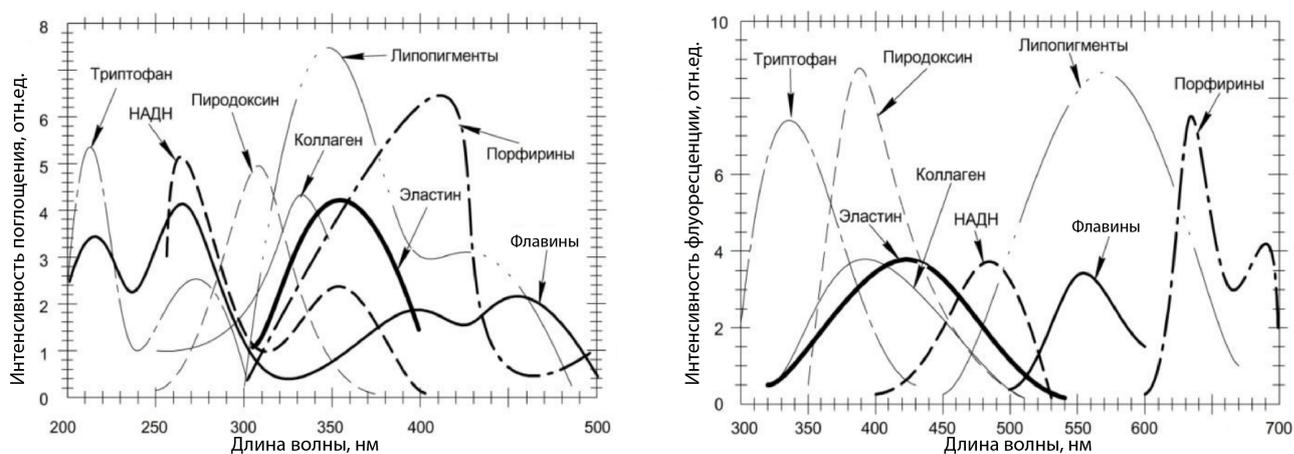


Рисунок 1.1 – Спектры поглощения и флуоресценции эндогенных флуорофоров [14].

Навигация эндогенной флуоресценции может обнаруживать нарушения клеточного метаболизма и дифференцировать доброкачественные и злокачественные опухоли различного типа. Следует отметить, что использование спектроскопии аутофлуоресценции имеет сложности из-за перекрывающихся спектров поглощения эндогенных флуорофоров. На Рисунке 1.1 представлены спектры поглощения и флуоресценции основных эндогенных флуорофоров [14].

«Терапевтическое окно» биологических тканей заключено в красном и БИК-

диапазонах от 600 до 1100 нм, где в диапазоне от 900 до 1100 нм расположено «окно прозрачности» воды [15]. В ИК-диапазоне, на длинах волн более 1500 нм, поглощение биологических тканей преимущественно определяется вкладом молекул воды. Излучение в БИК-диапазоне проникает в биологические ткани с наименьшими потерями (Рисунок 1.2) [4].

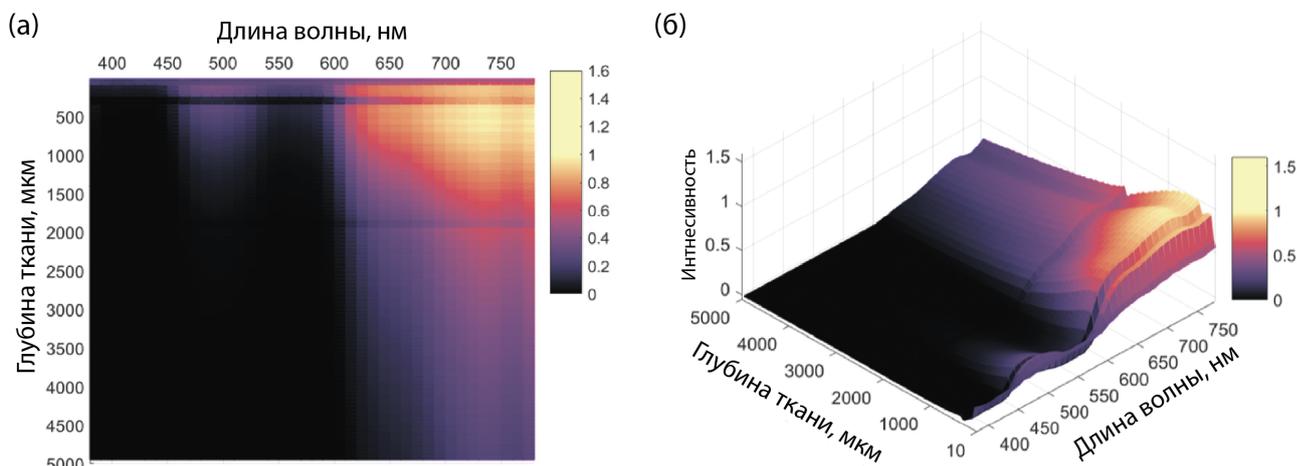


Рисунок 1.2 – Глубина проникновения лазерного излучения в модели кожи: (а) глубина проникновения сверху вниз; (б) распределение плотности потока [4].

Применения источников лазерного излучения в красном диапазоне с регистрацией флуоресценции ФС в красном или БИК-диапазоне дает возможность проводить флуоресцентную диагностику и ФДТ достаточно глубоких тканевых структур. С учетом того, что опухоли пациентов имеют структурные различия или даже различия между первичной (исходной) и вторичной опухолью, гетерогенность тканей играет важную роль в ФД и ФДТ. Рассеивающие свойства тканей зависят от размеров частиц, составляющих ткани (от нм - белки до мкм - клетки), что позволяет дифференцировать по рассеивающим свойствам морфологические изменения [16]. Уменьшение интенсивности вследствие рассеяния описывается выражением:

$$I(z) = I_0 e^{-\mu_s z} \quad (1.4)$$

где z - оптическая ось, μ_s - коэффициент рассеяния.

В большинстве биологических сред одновременно наблюдаются рассеяние и поглощение, которые называются оптически непрозрачными (мутными) средами с полным коэффициентом ослабления:

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s \quad (1.5)$$

Также удобно ввести дополнительный параметр, как оптическое альbedo a :

$$a = \frac{\mu_s}{\mu_t} = \frac{\mu_s}{\mu_a + \mu_s} \quad (1.6)$$

В случае, когда $a=0$ ослабление интенсивности лазерного излучения происходит только вследствие поглощения, тогда как при $a=1$ наблюдается только рассеяние. При $a=1/2$ выражение 1.6 принимает вид $\mu_a = \mu_s$, т.е. коэффициенты поглощения и рассеяния будут равными. При рассмотрении биологических тканей другим важным параметром является оптическая глубина d :

$$d_{opt} = \int_0^l \mu_t dl \quad (1.7)$$

где l - полная длина оптического пути фотона, dl - отрезок оптического пути. Когда коэффициент ослабления μ_t постоянный т.е. в случае однородного затухания, выражение d_{opt} принимает вид:

$$d_{opt} = \mu_t l \quad (1.8)$$

В сильнорассеивающих биологических средах также используется эффективный коэффициент ослабления:

$$\mu_{eff} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu_s(1 - g))} \quad (1.9)$$

где g - фактор анизотропии, учитывающий индикатрису рассеяния в каждом конкретном случае. Фактор анизотропии g определяется как [17]:

$$g = \int_{4\pi} p(\theta) \cos \theta d\omega / \int_{4\pi} p(\theta) d\omega \quad (1.10)$$

где $p(\theta)$ - функция вероятности. Фактор анизотропии g представляет собой средний косинус угла рассеяния $\langle \cos(\theta) \rangle$, а его значение находится в диапазоне от -1 до 1, где значение близкое к 1 указывает на рассеяние вперед, а при значении $g = 0$ наблюдается изотропное рассеяние. Рассеяние большинства биологических тканей направлено преимущественно вперед, а фактор анизотропии находится в диапазоне 0,7 – 0,99. Фактор анизотропии также используется для определения редуцированного (приведенного) коэффициента рассеяния μ'_s ,

который учитывает влияние коэффициента рассеяния и среднего косинуса угла рассеяния:

$$\mu'_s = \mu_s(1 - g) \quad (1.11)$$

Редуцированный коэффициент рассеяния μ'_s учитывает то, насколько больше столкновений в анизотропной среде должно произойти по сравнению с изотропной средой для того, чтобы излучение рассеялось на тот же угол, что и в изотропной среде. μ'_s обычно всегда $\leq \mu_s$, а соответствующая ему длина пути, соответствует одному свободному пробегу в изотропной среде. Важным параметром в выражении 1.10 является функция вероятности $p(\theta)$, которая нормируется следующим образом:

$$\frac{1}{4\pi} \int_{4\pi} p(\theta) d\omega = 1 \quad (1.12)$$

где $d\omega = \sin \theta d\theta$ - элементарный телесный угол. Некоторые теоретические фазовые функции известны как функции Дельта-Эддингтона, Рэля-Ганса и Рейнольда [18] и Хени-Гринштейна [19]. В соответствии с экспериментальными данными, наилучшей является функция Хени-Гринштейна:

$$p(\theta) = \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2\cos\theta)^{3/2}} \quad (1.13)$$

Фазовая функция Хени-Гринштейна эквивалентна выражению [8]:

$$p(\theta) = \sum_{i=0}^{\infty} (2i + 1) g^i P_i(\cos \theta) \quad (1.14)$$

где P_i - полином Лежандра. Математическое описание процессов распространения лазерного излучения в биологических тканях обычно проводится с применением аналитической теории и теории переноса [12]. Одним из главных недостатков теории переноса является сложность определения диффузной составляющей т.к. рассеяние фотонов имеет вероятностный характер [17]. Для преодоления данных сложностей применяются различные приближения (теория Кубелки-Мунка, диффузионное приближение, ММК и др.), в соответствии с которыми, доминирующим процессом ослабления света является либо поглощение, либо рассеяние падающих фотонов [20].

1.2 Фотодинамическая терапия и флуоресцентная диагностика

Процедура ФДТ включает два основных этапа: введение в организм пациента ФС, который обладает свойствами селективного накопления в тканях/клетках опухоли и воздействие на sensibilized ткани светом определенной длины волны, соответствующей одному из пиков поглощения ФС, для запуска процесса генерации активных форм кислорода (АФК) (преимущественно синглетного кислорода 1O_2) [21]. АФК обладают высокой реакционной способностью и коротким периодом полураспада. Время жизни синглетного кислорода 1O_2 составляет порядка 10-320 нс, что ограничивает его диффузию в клетках примерно до 10-55 нм [22].

Образующиеся в процессе фотодинамического воздействия АФК могут быть направлены на прямое повреждение клеток, либо на разрушение или частичное тромбирование кровеносных сосудов опухоли [23]. Процесс тромбирования характеризуется образованием стабилизированного сгустка, состоящего из фибрина и/или форменных элементов крови, на внутренней поверхности кровеносных сосудов с полной или частичной окклюзией (нарушением проходимости) их просвета. Наличие кислорода в тканях опухоли имеет решающее значение для проведения эффективной ФДТ. Выделяют три основных этапа процесса ФДТ опухоли (Рисунок 1.3):

1. $S_0 + h\nu \rightarrow S_1$ - переход молекулы ФС в короткоживущее возбужденное синглетное состояние.
2. $S_1 \rightarrow T_1$ - переход ФС в триплетное состояние.
3. $T_1 + {}^3O_2 \rightarrow S_0 + {}^1O_2$ - передача энергии ФС молекулярному кислороду.

Процесс обратного перехода молекулы ФС из состояния S_1 в S_0 может происходить с испусканием кванта света, характеризующийся короткими временами жизни (~ 10 нс). ФС в состоянии S_1 может перейти на долгоживущий триплетный уровень T_1 , переход с которого в основное состояние (фосфоресценция) запрещен правилами отбора и характеризуется длительным временем жизни. В присутствии молекулярного кислорода энергия с триплетного состояния ФС может быть передана на 3O_2 и запустить процесс генерации АФК, которые также могут разрушать молекулы ФС.

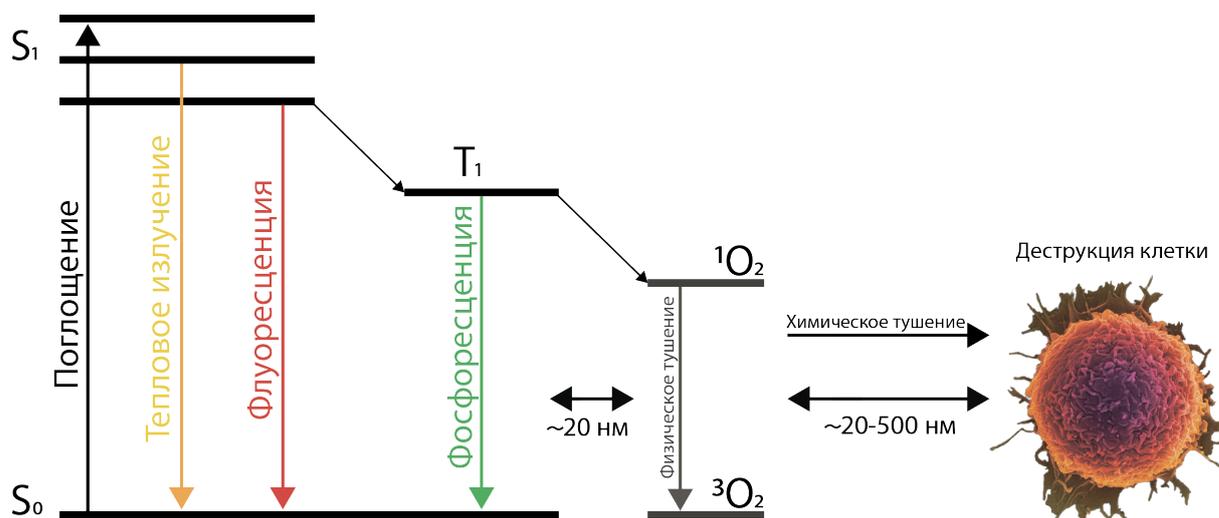


Рисунок 1.3 – Механизмы фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики.

ФД основана на выявлении патологических зон с высокой интенсивностью флуоресценции эндогенных флуорофоров или молекул, селективно накопленных в тканях ФС в высокой концентрации. Интенсивность флуоресценции увеличивается с увеличением числа флуоресцирующих молекул, в соответствии с изменениями локальной концентрации флуорофоров в исследуемой области. Однако, при высоких концентрациях ФС, может наблюдаться эффект «концентрационного тушения» т.е. уменьшение интенсивности флуоресценции в результате поглощения молекулами ФС флуоресцентного излучения [24].

На данный момент разработка идеального дозиметрического метода оценки эффективности ФДТ осложняется из-за динамических изменений ключевых компонентов ФДТ (концентрации ФС и уровня кислорода в тканях) в процессе светового воздействия, что в некоторой степени препятствует широкому клиническому применению ФДТ. Для неинвазивной оценки концентрации ФС при ФДТ выделяют два способа проведения ФД [25]: первый способ, когда терапевтическое лазерное излучение прерывается для проведения ФД; второй способ, когда изменение флуоресценции регистрируется непосредственно в процессе светового воздействия.

1.3 Фотобличинг фотосенсибилизатора в процессе фотодинамической терапии

Вероятность взаимодействия молекулы ФС в возбужденном синглетном состоянии S_1 с биологическим субстратом очень мала, вследствие короткого вре-

мени жизни ($10^{-9} - 10^{-8}$ сек). Из состояния S_1 молекула ФС может перейти в более стабильное возбужденное состояние T_1 (время жизни микросекунды или миллисекунды) за счет интеркомбинационной конверсии, когда спины электронов параллельны. Молекула ФС, как отмечалось ранее, также может вернуться в основное состояние S_0 , испустив энергию в виде кванта света (флуоресценции) или путем внутренней конверсии с выделением тепла (Рисунок 1.4).

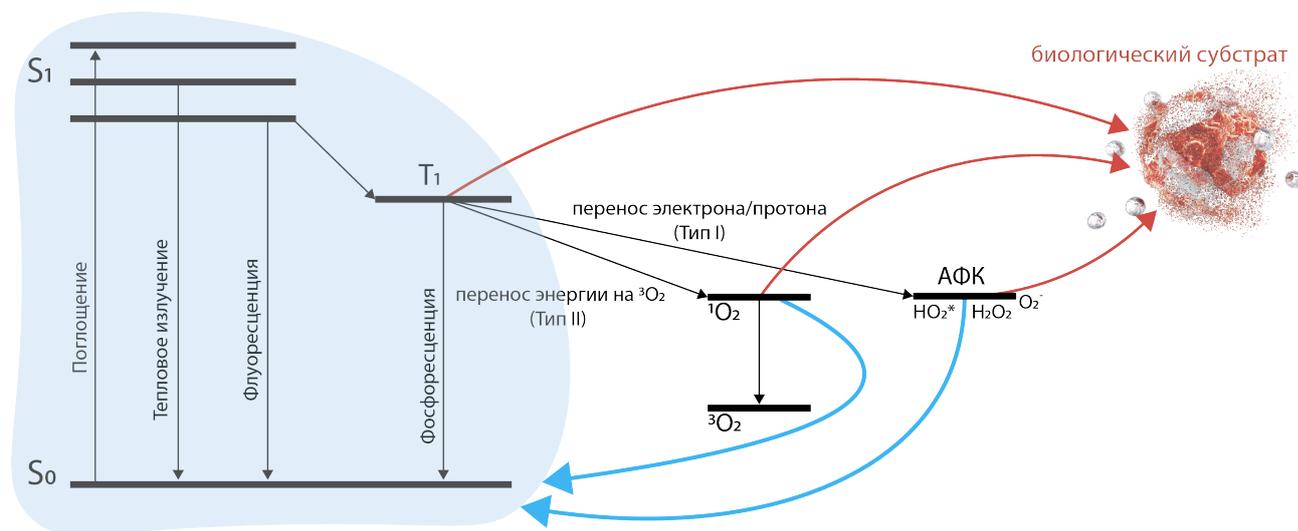


Рисунок 1.4 – Схема фотовозбуждения и фотобликинга ФС в присутствии кислорода и биомолекул. S_0 , S_1 и T_1 - основное, возбужденные синглетное и триплетные состояния ФС. 3O_2 и 1O_2 - основное триплетное и возбужденное синглетное состояние кислорода. O_2^- - супероксид, HO_2^* - гидропероксильный радикал, H_2O_2 - пероксид водорода.

Из состояния T_1 молекула ФС также может вернуться в состояние S_0 испустив фосфоресцентный квант света. Этот переход является медленным, так как данный процесс запрещен по спину правилами отбора. Запрет на синглет-триплетные переходы снимается благодаря спин-орбитальному взаимодействию [26]. ФС в возбужденном триплетном состоянии T_1 может подвергаться двум типам фотохимических реакций в зависимости от того, как возбуждаемая энергия передается от ФС к окружающему биологическому субстрату. При этом сам перенос энергии включает два основных механизма: резонансный перенос энергии между синглетными состояниями донора и акцептора, а именно резонансный перенос по механизму Ферстера и обменно-резонансный перенос энергии между триплетным состоянием донора и синглетным состоянием акцептора, т.е. перенос энергии по механизму Декстера [27]. Ферстеровский механизм переноса энергии достигается, когда имеется спектральное перекрытие между донором и акцептором, когда расстояние между ними менее 10 нм и когда имеется от-

носителем высокого квантового выхода донора [28].

В процессе ФДТ различают реакции Типа I и Типа II, которые протекают с участием кислорода и запускают процесс генерации цитотоксических АФК, что в конечном счете приводит к фотодинамическому повреждению клеток и тканей опухоли. В реакциях Типа I взаимодействие молекулы ФС с близлежащими молекулами биологической ткани приводит к переносу на них электрона или протона с образованием анионного или катионного радикала [29], соответственно, которые, в свою очередь, могут взаимодействовать с молекулярным кислородом с образованием АФК (например, супероксида O_2^- , гидропероксильного радикала HO_2^* или пероксида водорода H_2O_2) с последующим запуском реакции Габера — Вейса [30]. АФК при взаимодействии с ненасыщенными жирными кислотами биологических мембран могут инициировать цепную реакцию окисления липидов и повреждение биомембран с нарушением их функций [31]. Следует отметить, что супероксид O_2^- не обладает высокой реакционной способностью в биологических тканях и, соответственно, не вызывает сильного окислительного повреждения, но может реагировать сам с собой с образованием пероксида водорода H_2O_2 и кислорода [32]. Реакции Типа I с наибольшей эффективностью протекают при высокой концентрации биологического субстрата и низкой концентрации молекулярного кислорода, так как молекулы кислорода являются сильными конкурентами молекул биологических тканей за взаимодействие с молекулами ФС в возбужденном триплетном состоянии T_1 [29].

В реакциях Типа II происходит перенос энергии от триплетного состояния ФС на основное триплетное состояние кислорода 3O_2 с образованием синглетного кислорода 1O_2 и переходом ФС в основное состояние S_0 .



Синглетный кислород примерно в 100 раз эффективнее окисляет биомолекулы в сравнении с другими АФК [33]. Следует отметить, что синглетный кислород 1O_2 , образующийся в процессе ФДТ, напрямую воздействует только на то микроокружение, которое находится близко к области, где происходит его генерация, обычно в радиусе от 10 до 500 нм [34, 35], и может существовать в двух возбужденных состояниях с высокой и низкой энергией (Рисунок 1.5) [36].

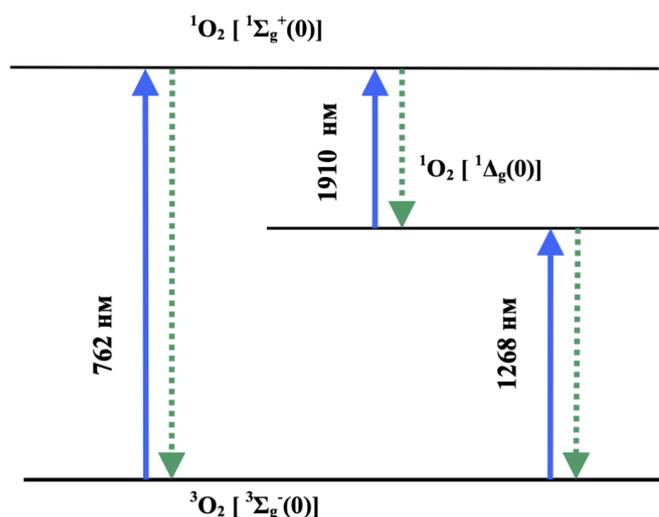


Рисунок 1.5 – Схема электронных переходов между основным и синглетными уровнями молекулы кислорода [36].

Свойства 1O_2 в состояниях с высокой энергией и более низкой энергией несколько отличаются друг от друга [37]. Время жизни 1O_2 с более низкой энергией в биологических средах составляет 0,01 – 0,04 мкс [34], тогда как синглетный кислород с высокой энергией обладает намного более длительным временем жизни [37], который составляет порядка 2 – 4 мкс в H_2O и несколько десятков мкс в липидах. Таким образом, данное состояние является основной формой 1O_2 , участвующей в процессе ФДТ.

Эффективный перенос энергии от молекулы ФС в триплетном состоянии T_1 на 3O_2 возможен лишь в том случае, когда энергия ФС больше энергии синглетного уровня молекулы кислорода. Важным параметром, характеризующим эффективность ФС является квантовый выход генерации 1O_2 , который характеризует количество молекул синглетного кислорода, образующихся при поглощении одной молекулой ФС одного кванта света. Ранее отмечалось, что порфирины, хлорины и фталоцианины могут эффективно генерировать синглетный кислород [38]. Квантовый выход синглетного кислорода $\Phi_{\text{СФ}}$ при возбуждении на длине волны 660 нм составляет 0,75, а РрIX при возбуждении на длине волны 630 нм - 0,54 [39].

Обратный переход кислорода из синглетного состояния в основное триплетное состояние $^1O_2 \rightarrow ^3O_2$ запрещен правилами отбора, но данный процесс может происходить за счет физического тушения, приводящего к дезактивации 1O_2 (без расходования кислорода), либо химического тушения.

Главное различие между реакциями ФДТ Типа I и Типа II заключается

во вкладе синглетного кислорода. Так, в реакциях Типа I вклад синглетного кислорода является несущественным, тогда как в реакциях Типа II фотодинамическая реакция определяется преимущественно активностью 1O_2 . Данные реакции, как правило, протекают одновременно, а их относительный вклад сильно варьируется в зависимости от концентраций кислорода, биологического субстрата и ФС [29]. При этом относительный вклад каждой реакции может меняться в процессе светового воздействия [36].

Таким образом, в процессе ФДТ молекула ФС может подвергаться фотобличингу т.е. с молекулой могут произойти фотохимические изменения, которые способствуют временной потере свойств флуоресценции, либо деструкции и необратимой потере флуоресцентных свойств молекулой. На данный момент выделяют два основных механизма фотобличинга ФС с необратимой потерей флуоресцентных свойств [40]:

1. деструкция и необратимая потеря флуоресцентных свойств молекулой ФС, вследствие атаки АФК (преимущественно синглетным кислородом 1O_2) - АФК-опосредованный механизм;
2. деструкция молекулы ФС, вследствие взаимодействия молекулы ФС в возбужденном триплетном состоянии T_1 непосредственно с окружающими биологическим субстратом (клеточной мембраной или молекулой), либо взаимодействия непосредственно с молекулярным кислородом 3O_2 - не АФК-опосредованный механизм.

Таким образом, во многих случаях молекулы ФС могут одновременно являться эффективными тушителями 1O_2 . Кинетика затухания флуоресценции ФС с не АФК-опосредованным механизмом фотобличинга может быть описана одноэкспоненциальной функцией [40], однако кинетика фотобличинга практически всех клинически разрешенных ФС, включая ФС хлоринового ряда, не может быть описана этой моделью [41, 42]. Считается, что в случае применения ФС хлоринового ряда оба механизма фотобличинга дают сопоставимые вклады. Однако в процессе ФДТ относительные вклады каждого механизма могут изменяться, вследствие химических реакций в многокомпонентной биологической среде с пространственной неоднородностью распределения молекул кислорода и/или ФС [43].

Суммарный коэффициент поглощения сенсibilизированных тканей μ_a , представляет собой сумму коэффициента поглощения эндогенных флуорофоров μ_{a0} и коэффициента поглощения ФС $\mu_{a\text{ФС}}$. Локальный уровень плотности потока энергии ϕ в точке r в ткани можно найти, решив стационарное уравнение диффузии:

$$D\phi^2 - \mu_a\phi(r) = S(r) \quad (1.17)$$

где $S(r)$ источник излучения, а D - диффузионная константа, которая определяется как:

$$D = \frac{1}{3(\mu_a + \mu'_s)} \quad (1.18)$$

Распределение плотности потока изменяется в процессе ФДТ из-за изменения пространственного распределения коэффициента поглощения ФС, возникающего в результате фотобликинга. Полубесконечная среда изначально однородна и облучается широким пучком, концентрация ФС изменяется с глубиной z . Таким образом, общий суммарный коэффициент поглощения и диффузионная константа зависят только от глубины, а выражение 1.17 принимает следующий вид:

$$D(z)\frac{\partial^2}{\partial z^2}\phi(z) - \mu_a(z)\phi(z) = -S(z) \quad (1.19)$$

При этом $S(z)$ определяется выражением:

$$S(z) = S_0\mu'_s \exp\left[-\int_0^z \mu'_s(\omega)d\omega\right] \quad (1.20)$$

где S_0 - плотность потока фотонов, падающих на поверхность, количество которых уменьшается с глубиной z в соответствии с полным коэффициентом ослабления $\mu'_t = \mu_a + \mu'_s$, который определяется, как сумма редуцированного коэффициента рассеяния μ'_s и коэффициента поглощения μ_a . Таким образом, выражение 1.19 принимает следующий вид:

$$D(z)\frac{\partial^2}{\partial z^2}\phi(z) - \mu_{eff}^2(z)\phi(z) = -3S_0\mu'_s\mu'_t(z) * \exp\left[-\int_0^z \mu'_t(\omega)d\omega\right] \quad (1.21)$$

где $\mu_{eff} = \sqrt{3\mu_a(z)\mu'_t(z)}$ - эффективный коэффициент ослабления. Если изменение μ_{eff} по глубине незначительное, то решение выражения 1.21 можно найти

с помощью метода Вентцеля-Крамерса-Бриллюэна:

$$\phi(z) = S_0 \left\{ \frac{b}{\mu_{eff}(z)^{1/2}} \exp \left[- \int_0^z \mu_{eff}(\omega) d\omega \right] + C(z) \exp \left[- \int_0^z \mu'_t(\omega) d\omega \right] \right\} \quad (1.22)$$

Выражение 1.22 состоит из двух экспоненциальных членов, соответствующих изменению по глубине полного и эффективного коэффициентов ослабления, а параметры b и $C(z)$ зависят от оптических свойств биологической ткани и граничных условий на ее поверхности.

Часто, предполагается, что интенсивность фотобличинга ФС явно зависит только от концентрации ФС и плотности потока энергии. В таком случае изменения коэффициента поглощения ФС $\mu_{aФС}$ может быть записана в виде:

$$\frac{\mu_{aФС}(z, t)}{dt} = -\beta\phi(z, t)\mu_{aФС}(z, t) \quad (1.23)$$

где β - скорость фотобличинга ФС. Локальная скорость фотобличинга ФС на глубине зависит от локальной плотности потока фотонов, а изменение $\mu_{aФС}$ за время Δt определяется из выражения:

$$\mu_{aФС}(z, t + \Delta t) = \mu_{aФС}(z, t) - \beta\phi(z, t)\mu_{aФС}(z, t)\Delta t \quad (1.24)$$

Дозиметрия на основе оценки фотобличинга ФС, которая заключается в регистрации изменений интенсивности флуоресценции биологических тканей в процессе ФДТ является удобным и относительно простым способом контроля параметров лазерного воздействия и оценки эффективности проводимой терапии.

1.4 Механизмы действия фотодинамической терапии на опухоль

Опухоль и ее микроокружение из-за чрезмерной пролиферации и недостаточного кровоснабжения могут находиться в состоянии с низким содержанием кислорода (значения pO_2 на уровне 2,5 мм.рт.ст. при норме 37-42 мм.рт.ст) [44], что может ограничивать эффективность генерации АФК и влиять на механизмы действия ФДТ на ткани опухоли [45]. Как отмечалось ранее, в процессе ФДТ

потребляется много кислорода, что может усугублять гипоксию опухолевых тканей и снижать противоопухолевую эффективность ФДТ [46], так как клетки опухоли демонстрируют прогрессивно меньшую чувствительность к ФДТ по мере снижения уровня кислорода в среде [47]. Для преодоления данного ограничения проводятся широкие исследования по разработке способов увеличения концентрации 3O_2 в тканях опухоли. В работе [48] было показано, что наночастицы на основе каталазы и хитозана инкапсулированные Себ при попадании в кислую среду опухоли разлагались и высвобождали молекулы ФС, тогда как каталаза ускоряла разложение перекиси водорода (H_2O_2) на воду и кислород ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$). Исследования показывают, что опухолевая ткань содержит большие уровни H_2O_2 в сравнении с нормальными тканями [49]. Последующее ФДТ опухоли лазерным излучением с длиной волны 650 нм и плотностью энергии 12 Дж/см², по результатам проточной цитометрии, вызывала апоптотическую гибель клеток на уровне 94,31%, а в случае свободного введения Себ на уровне 78,57%. Аномальная сосудистая сеть и склонность кровеносных сосудов к быстрому тромбированию в опухолевой ткани, также являются важными факторами, способствующими уменьшению содержания кислорода, поэтому увеличение проходимости кровеносных сосудов может стать эффективным методом улучшения оксигенации тканей опухоли. Авторы [50] продемонстрировали, что локальное повышение температуры опухоли до значений 37-43 °С увеличивало уровень оксигенации тканей на 52%, что значительно усиливало генерацию АФК при ФДТ с применением наноконцентра «альбумин-Себ». Также был предложен метод увеличения концентрации 3O_2 за счет снижения потребления кислорода клетками опухоли [51]. За счет применения комплекса «ингибитор окислительного фосфорилирования-Себ» в клетках опухоли подавлялось митохондриальное дыхание и после ФДТ с наблюдалось более быстрое уменьшение роста опухоли в сравнении с контролем Себ.

Помимо разработки методов, повышающих эффективность терапии преимущественно за счет реакций Типа II, на данный момент проводятся исследования направленные на ФДТ за счет реакций Типа I. Применение наночастиц ZnO , TiO_2 , Cu_2O для ФДТ продемонстрировало значительную эффективность образования супероксидных радикалов [52, 53]. Однако данные наночастицы нуждаются в улучшении с точки зрения биосовместимости и фотостабильности.

Таким образом, уровень внутритканевой концентрации 3O_2 является важ-

ным фактором, влияющим на три основных противоопухолевых механизма действия ФДТ [54] (Рисунок 1.6).

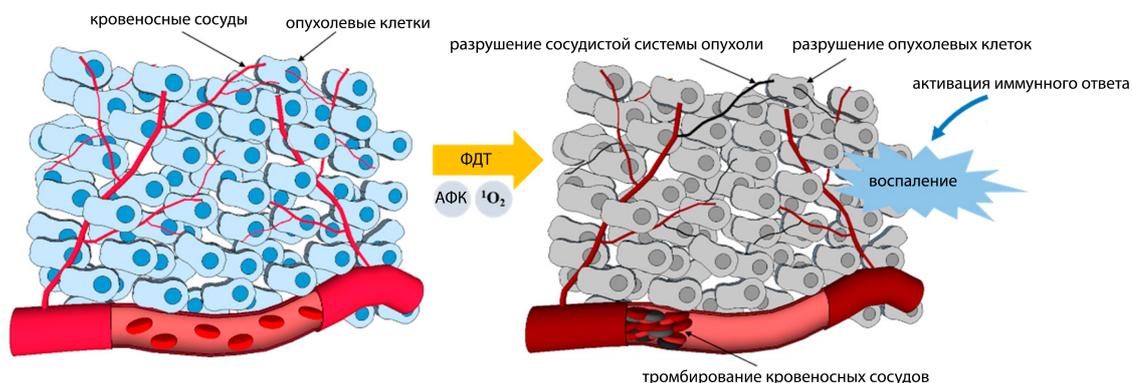


Рисунок 1.6 – Механизмы разрушения опухоли при ФДТ [55].

АФК, образующиеся в процессе ФДТ, могут разрушить непосредственно опухолевые клетки, вызывая апоптоз и/или некроз, либо вызвать разрушение сосудистой системы опухоли, приводя к нарушению процессов снабжения кислородом. Также ФДТ может вызывать воспалительную реакцию, которая может активизировать иммунный ответ против опухолевых клеток [56]. Эффективность ФДТ зависит от всех этих механизмов.

1.4.1 Апоптоз и некроз

При ФДТ разрушение опухоли может происходить как по пути некроза, так и по пути апоптоза [35]. Как правило, при плотностях мощности от 700 до 2000 мВт/см² в тканях опухоли преобладает некроз [57]. Клеточная гибель вследствие некроза приводит к потере целостности клеточной мембраны и неконтролируемому высвобождению продуктов клеточной гибели во внеклеточное пространство [58]. При этом в окружающих тканях запускается воспалительная реакция, которая привлекает лейкоциты и близлежащие фагоциты, которые утилизируют мертвые клетки путем фагоцитоза. Апоптотическая гибель клеток при ФДТ, как правило, может быть запущена при использовании низких плотностей мощности и доз света [59]. Данный процесс является регулируемым, в результате которой клетка распадается на отдельные апоптотические тельца, которые довольно быстро (~ 90 мин), утилизируются макрофагами, либо соседними клетками, что позволяет минимизировать запуск воспалительной реакции в области лазерного облучения [60].

1.4.2 Сосудистый механизм

Помимо непосредственной гибели опухолевых клеток, ФДТ часто приводит к разрушению сосудистой системы, питающей ткани опухоли. Подобно опухолевым клеткам, эндотелиальные клетки кровеносных сосудов могут накапливать ФС. К примеру, Себ является ФС преимущественно сосудистого типа. Разрушение сосудистой системы опухоли приводит к прекращению ее питания (кислородом и питательными веществами) и, как следствие, приводит к гибели опухолевых клеток. Данный механизм действия ФДТ является очень важным для долгосрочной эффективности проведенной терапии [61]. Следует отметить, что сосудистого механизма действия ФДТ можно целенаправленно достичь за счет короткого интервала между введением в организм ФС и световым воздействием, когда ФС преимущественно локализован в кровеносных сосудах [62]. В данном случае селективность воздействия ФДТ достигается за счет точного определения границ новообразования для избежания повреждения окружающих нормальных тканей. Так называемая сосудистая ФДТ имеет важные преимущества по сравнению с протоколами ФДТ с применением ФС клеточного типа (к примеру с PrIX), так как в данном случае ФС быстро выводится из организма [63].

1.4.3 Иммунологический механизм

В течение долгих лет ФДТ считалась локальным методом лечения, воздействующим только на клетки и сосудистую систему опухоли. Однако многочисленные исследования показали, что ФДТ может значительно влиять на иммунный ответ различными способами, либо посредством стимуляции или подавления иммунного ответа, что влияет на успешность запуска противоопухолевого иммунитета [64]. Таким образом долгосрочный положительный результат ФДТ зависит от его воздействия на клетки опухоли, сосудистую сеть и активации иммунной системы [65]. Противоопухолевое воздействие Себ помимо повреждения сосудистой системы опухоли, включает повреждение как патологических клеток по механизму некроза и/или апоптоза, так и опухоль-ассоциированных макрофагов [66]. Данный тройной эффект может значительно подавлять рост опухоли. Применение Себ может регулировать инфильтрацию и активацию макрофагов в опухоли, что обеспечивает обоснование применения

ФДТ в регуляции иммунного микроокружения для лечения злокачественных опухолей [67]. В процессе ФДТ с применением Себ также существует вероятность изменения поляризации противовоспалительных макрофагов фенотипа М2 в провоспалительный фенотип М1 [68]. Однако условия запуска данного процесса зависят от оптимальных энергетических параметров ФДТ, которые на данный момент не определены. Провоспалительные макрофаги фенотипа М1 утилизируют поврежденные в процессе ФДТ раковые клетки и презентуют белки из этих клеток Т-хелперам (Т-лимфоцитам), которые затем активируют Т-цитотоксические лимфоциты с фенотипом CD3+ CD8+ [69]. Эти цитотоксические Т-лимфоциты способны длительно циркулировать по организму, распознавать и специфически разрушать опухолевые клетки [70], обеспечивая системный противоопухолевый иммунный ответ.

Изменение целостности клеток и тканей опухоли при ФДТ запускает острую воспалительную реакцию, индуцированную высвобождением провоспалительных медиаторов, к которым относятся различные цитокины, факторы роста и белки [65]. Эти медиаторы привлекают врожденные иммунные клетки организма - хозяина, такие как нейтрофилы, тучные клетки, макрофаги и дендритные клетки, которые проникают в поврежденную ткань для восстановления гомеостаза в пораженной области.

Эффективность клинического лечения методом ФДТ зависит от большого количества параметров, включая тип используемого ФС, его микроскопического и макроскопического распределения в организме, длины волны, плотности мощности, плотности энергии лазерного излучения, оптических свойств и уровня оксигенации ткани [71]. На итоговый результат терапии влияет выбор вводимого в организм пациента ФС. При Себ-опосредованной ФДТ эффективность терапии больше зависит от накопления препарата в микрососудистой сети, а не опухолевых клеток, как в случае с РrIX, т.е. его эффективность объясняется главным образом разрушением кровеносных сосудов новообразований [72].

Длительность лазерного воздействия при ФДТ рассчитывается исходя из подобранной эффективной дозы (плотности энергии) E_s [Дж/см²]. Плотность мощности лазерного излучения P_s [Вт/см²] определяется как отношение выходной мощности лазерного излучения P [Вт] на площадь облучаемой поверхности S [см²]: $P_s = P/S$. Длительность светового воздействия t [с] определяется как $t = E_s/P_s$. Плотность энергии при ФДТ может заметно варьироваться

из-за большой вариабельности фармакокинетики ФС и оптических свойств новообразований у пациентов с разными типами опухоли. Для обеспечения эффективной ФДТ приходится использовать высокую дозу вводимого ФС, либо увеличивать плотность энергии лазерного излучения путем увеличения времени облучения и/или повышения плотности мощности лазерного излучения. На сегодняшний день нет точных методов оценки достаточности фотодинамического воздействия в зависимости от индивидуальных особенностей опухоли у каждого пациента. Неадекватные энергетические параметры ФДТ могут привести к недостаточной обработке зоны облучения, в то время как чрезмерные дозы энергии могут вызвать необратимые повреждение окружающих здоровых тканей. В настоящее время для большинства клинических процедур ФДТ используются заданные протокольные значения энергетических параметров с учетом дозы введенного ФС [73, 74].

1.5 Влияние фотодинамической терапии на сосудистую систему опухоли

Кровеносная система является основным средством доставки питательных веществ и кислорода, включая ткани опухоли [75]. При размере опухоли менее 0,1 см в диаметре она может расти только за счет диффузии необходимых питательных веществ и кислорода [76]. Если размер новообразования превышает критическое значение, опухолевые клетки будут пытаться создать свою собственную сосудистую систему, чтобы обеспечить достаточное снабжение питательными веществами для дальнейшего роста [77]. Этот процесс представляет собой так называемый опухолевый ангиогенез, который сопровождается ростом от небольших локальных новообразований к более крупным, которые в дальнейшем могут метастазировать. Быстрая неоваскуляризация является признаком опухолевой прогрессии, поэтому эффект фотодинамического воздействия можно оценить по изменениям в сосудистой системе тканей до и после ФДТ.

Воздействие на сосудистую систему опухоли при ФДТ может оказать как положительный, так и отрицательный эффект. С одной стороны, нарушение кровеносных сосудов опухоли может привести к тканевой гипоксии, лишению питательных веществ и, в конечном итоге, к голоданию и гибели опухолевых клеток [78]. С другой стороны, клетки в условиях гипоксии могут стимули-

ровать факторы роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor, VEGF) и запускать ангиогенез [79]. Таким образом, высокая терапевтическая эффективность ФДТ может быть достигнута за счет избирательного воздействия на существующие кровеносные сосуды и/или подавления (ингибирования) процесса образования новых сосудов [80].

В последние годы ФДТ, направленная на разрушение сосудистой системы опухоли, привлекает значительное внимание в связи с высокой эффективностью [23]. Локальная гипоксия тканей при ФДТ является результатом как прямого потребления кислорода (фотохимическое потребление кислорода за счет образования синглетного кислорода), так и непрямого снижения концентрации кислорода за счет разрушения сосудистой системы опухоли. Авторы [81] показали, что скорость потребления пропорциональна произведению концентрации ФС и плотности потока лазерного излучения. Если в процессе ФДТ к тканям не будет непрерывно подаваться кислород эффективность дальнейшей терапии может быть ограничена, поэтому важно последовательно измерять изменения оксигенации тканей в процессе лазерного воздействия. Ранее было продемонстрировано, что эффективность ФДТ новообразований зависит от повреждения кровеносных сосудов как в тканях самой опухоли, так и в пределах нормальной окружающей ткани [82]. В работе [83] отмечалось, что при ФДТ с 3 ч экспозицией Себ через 24 ч после светового воздействия отмечалась заметное разрушение сосудистой системы (частичное или полное повреждение) и опухолевых клеток в непосредственной близости от разрушенных кровеносных сосудов, которые некротизировались [84]. Однако большинство опухолевых клеток, относительно удаленных от кровеносных сосудов, все же оказались жизнеспособными.

При ФДТ с применением ФС сосудистого типа и облучении источниками света с длинами волн 600, 630 и 660 нм отмечалось, что в случае облучения излучением 600 нм наблюдался очень поверхностный некроз, а при 630 нм наблюдался более глубокий некроз, в то время как лазер 660 нм не вызвал некроза [85], что было связано с глубиной проникновения света.

В процессе ФДТ с применением Себ повреждение направлено преимущественно на кровеносные сосуды, в которых имеется наибольшее содержание кислорода. В процессе ФДТ вблизи зоны облучения фиксируется быстрое снижение уровня кислорода, что объясняется запуском процесса тромбирования и/или временным сосудистым сужением, а в случае прекращения облучения

запуском обратного процесса [86, 87]. При фотодинамическом повреждении стенок эндолеммы кровеносных сосудов активируются тромбоциты, которые прилипают к месту повреждения и вместе с лейкоцитами образуют так называемый «белый тромб». В процессе чего увеличивается плотность тканей в зоне лазерного облучения. Позднее в данной области образуется «красный тромб» за счет откладывания фибрина, в нитях которого застревают эритроциты. В венозной части кровеносных сосудов с медленным кровотоком одновременно с активацией тромбоцитов происходит и активация коагуляционных факторов с образованием фибрина, поэтому в зоне облучения может сразу образоваться «красный тромб» [88]. В случае разрушения сосудистой системы опухоли после ФДТ может развиваться отек мягких тканей в умеренно-выраженной степени и уже через 1-3 суток образоваться область некроза [89]

Заключение к главе 1

Исследованиями, разработками и совершенствованием существующих эффективных методов диагностики и терапии рака методами ФД и ФДТ занимается большое количество научных лабораторий. С учетом того, что опухоли одного типа у разных пациентов имеют структурные различия и различия между первичной (исходной) и вторичной опухолью, гетерогенность опухоли играет важную роль в диагностике и терапии рака, так как это влияет на картину распространения света в данных тканях. Противоопухолевая эффективность ФДТ зависит от множества параметров, таких как тип ФС, спектральные характеристики источников света, плотность мощности, время светового воздействия, уровень оксигенации и тип опухоли. Селективность накопления ФС и его концентрация в тканях опухоли являются одними из основных факторов, влияющих на эффективность ФДТ, поэтому флуоресцентная навигация ФС и контролирование его фотобликинга являются предметом исследований из-за сложности механизмов деструкции молекул ФС и высокой гетерогенности опухоли. Разработка новых методов и устройств, обеспечивающих контролирование процесса ФДТ, в рамках каждого пациента, является важнейшей задачей и может минимизировать необратимое повреждение окружающих нормальных тканей, избежать прогрессивного роста и метастазирования опухоли, что позволит увеличить выживаемость и качество жизни пациентов.

Глава 2

Материалы и методы исследования

Вторая глава посвящена рассмотрению материалов и методов исследования. Описаны устройства и принципы работы оборудования, а также экспериментальные биологические модели, которые использовались в исследованиях. Особое внимание уделено методам ФД, одним из важных преимуществ которых является высокая скорость обработки информации. Методы спектрально-флуоресцентной и видео-флуоресцентной диагностики могут обеспечить значительную корреляцию регистрируемого сигнала - поглощения, флуоресценции и рассеяния.

2.1 Фотосенсибилизаторы Се6 и РrIX

ФС является ключевым элементом ФДТ. Молекулы ФС в идеале должны с высокой селективностью накапливаться в опухоли, обладать низкой темновой фототоксичностью, быстро выводиться из организма пациента и иметь пик поглощения в «терапевтическом окне» в диапазоне длин волн 600 – 900 нм [90].

На данный момент наиболее широко в клинической практике многих стран мира для ФД и ФДТ опухолей применяются препараты на основе РrIX, который является метаболитом 5-АЛК или ее производных и препараты на основе Се6 [91]. В присутствии 5-АЛК опухолевые клетки способны к повышенному накоплению РrIX, что обусловлено повышенной активностью в опухолевых клетках ферментов начального этапа синтеза гема, а также дефицитом в них феррохелатазы - фермента, утилизирующего РrIX путем его превращения в гем, в то время как в нормальных клетках РrIX превращается в фотонеактивный гем [92]. Се6 имеет два интенсивных пика поглощения на длинах волн 400 и 660 нм (Рисунок 2.1а) и интенсивную флуоресценцию в диапазоне 650 – 750 нм

с максимумом на длине волны около 665 нм (Рисунок 2.1б). Поглощение РрIX наблюдается в диапазоне длин волн от 300 до 650 нм с максимумом в области 400 – 420 нм, известной как полоса Соре, и более слабыми Q-полосами поглощения в видимом диапазоне [93]. РрIX имеет интенсивную флуоресценцию в диапазоне 620 – 720 нм с максимумами на длинах волн приблизительно 635 и 705 нм (Рисунок 2.1б).

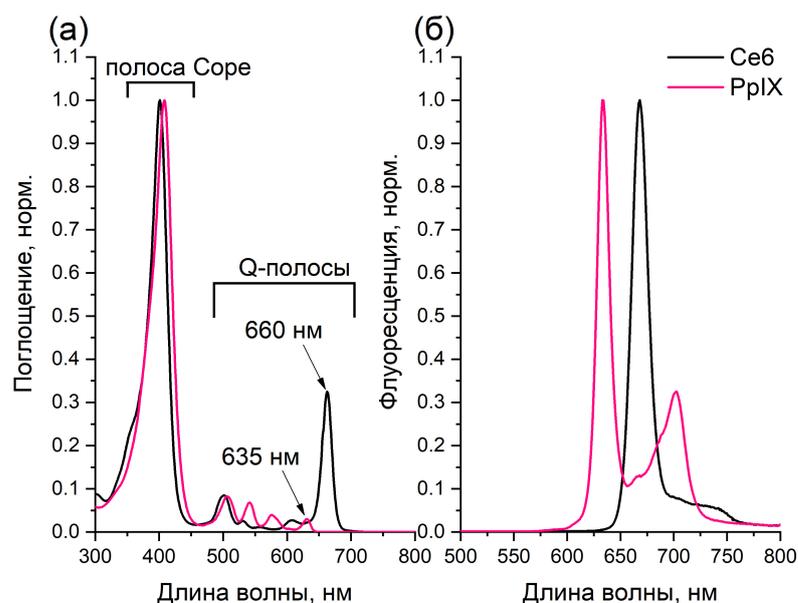


Рисунок 2.1 – Спектры: (а) поглощения Се6 и РрIX; (б) флуоресценции Се6 и РрIX. Се6 растворен в дистиллированной воде. РрIX растворен в диметилсульфоксиде (ДМСО).

Чаще всего флуоресценция РрIX/Се6 возбуждается в полосе Соре (около 405 нм) и регистрируется в диапазоне 620 – 720 нм [55]. В синем диапазоне спектра высокие коэффициенты поглощения гемоглобина, меланина и билирубина способствуют ослаблению проникновения света в биологические ткани [94], но, как отмечалось ранее, РрIX и Се6 также имеют пики поглощения в красном диапазоне Q-полос поглощения на длинах волн приблизительно 635 и 660 нм, соответственно. Следует отметить, что поглощение РрIX в области 635 нм примерно в 30 раз меньше, чем в полосе Соре. В случае Се6 поглощение в области 660 нм примерно в 3 раза меньше, чем в области 405 нм, что уменьшает интенсивность возбуждаемой флуоресценции. Тем не менее, в некоторых исследованиях ФД биологических тканей с накоплением РрIX или Се6 проводится с использованием источников лазерного излучения в красном диапазоне [95]. ФДТ с использованием лазеров в красном диапазоне обеспечивает большую глубину фотодинамического воздействия, поскольку в диапазоне 600 – 900 нм

поглощение основных эндогенных абсорбирующих компонентов биологических тканей минимально.

Результаты наших предыдущих исследований демонстрируют, что ФДТ с применением ФС хлоринового ряда на основе Себ обладает хорошим потенциалом для лечения рака [96, 97]. ФС хлоринового ряда являются гидрофильными восстановленными порфиринами, поэтому их основная химическая структура аналогична порфиринам [98]. Себ является ФС второго поколения, который обладает хорошей стабильностью в воде и практически не вызывает светочувствительности кожи [99]. Максимальный контраст накопления Себ в опухолевой ткани наблюдается спустя 2-4 ч после введения в организм [100, 101]. При этом полная регрессия опухоли после Себ-опосредованной ФДТ может наблюдаться в течение недели [102]. Себ является эффективным ФС с низкой фототоксичностью и имеет меньше побочных эффектов по сравнению с ФС первого поколения [103]. Основные особенности Себ характеризуются его фотофизическими свойствами. Время жизни первого возбужденного синглетного состояния Себ составляет 4,3 нс [104], а время жизни первого возбужденного триплетного состояния составляет 0,9 – 2,1 мкс [104, 105]. Квантовый выход флуоресценции Себ составляет 0,18, а квантовый выход синглетного кислорода - 0,74 [106].

Основными преимуществами применения Себ являются:

1. Большая глубина фотодинамического воздействия, поскольку длина волны их поглощения находится в «терапевтическом окне», где поглощение основных эндогенных абсорбирующих компонент кожи минимально [107].
2. Селективное накопление преимущественно в тканях опухоли. Накопление Себ в опухоли может достигать соотношения 28:1 в опухоли по сравнению с нормальной тканью [108].
3. Быстрое время выведения из кожи и низкая фототоксичность. Себ демонстрирует большой коэффициент экстинкции в красной области спектра, который на порядок выше, чем соответствующий коэффициент экстинкции для порфиринов [109].

Для флуоресцентной визуализации, спектрально-флуоресцентной навигации опухоли и ФДТ использовались коммерчески доступные и клинически разрешенные ФС (Таблице 2.1).

Таблица 2.1 – Основные параметры ФС, использованных в исследованиях

Препарат	Действующее вещество	Вводимые дозы	Время накопления
Фоторан®	тринатриевая соль хлорина е6	2,0-2,5 мг/кг	3-4 часа
Фотолон®	хлорин е6	1,0-3,0 мг/кг	3 часа
Фотодитазин®	хлорин е6 димеглюмин	0,7-1,4 мг/кг	1,5-2,5 часа
Аласенс®	5-аминолевулиновая кислота	10-30 мг/кг	2-6 часов

Для ФД и ФДТ (фототераностики) пациентов с базально-клеточным раком (БКР) кожи использовались коммерчески доступные ФС хлоринового ряда. Рассчитанная доза препарата в концентрации 1 мг/кг массы тела пациента растворялась в 150 мл 0,9% раствора натрия хлорида и за 3 – 3,5 часа до начала ФДТ. Подготовленный раствор в течение 30 мин внутривенно капельно вводился в затемненном помещении.

Пациентам с лейкоплакией полости рта за 2,5 часа до проведения фототераностики сублингвально вводился заранее подготовленный раствор препарата Аласенс® (ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Москва, Россия) в концентрации 20 мг/кг. Действующим веществом данного препарата является 5-АЛК. Лекарственный раствор представляет собой сахарный сироп в жидкой форме. Сублингвальное введение подразумевает размещение и удержание сахарного сиропа с 5-АЛК под языком пациента в течение 10 – 15 минут [110].

В течение 24 часов после введения ФС пациенты строго соблюдали световой режим. Начиная с первого дня применения ФС в течении 3 дней открытые поверхности тела обрабатывались фотозащитным кремом.

2.2 Установка для спектрально-флуоресцентной навигации

Для локальной спектрально-флуоресцентной навигации распределения ФС в биологических тканях использовалась лазерная электронно-спектральная установка ЛЭСА-01-БИОСПЕК [111]. Данная установка включает: источник света (источник лазерного излучения/широкополосный галогеновый источник белого света); портативный спектрометр; диагностическое волокно; специальное программное обеспечение UnoMomento, позволяющее обрабатывать регистрируемые спектральные данные с нормировкой на аппаратную функцию. Регистра-

ция диффузно рассеянного лазерного излучения и флуоресценции осуществлялась с помощью шести приемных оптических волокон, расположенных вокруг одного оптического волокна, предназначенного для доставки света к исследуемой зоне (Рисунок 2.2).

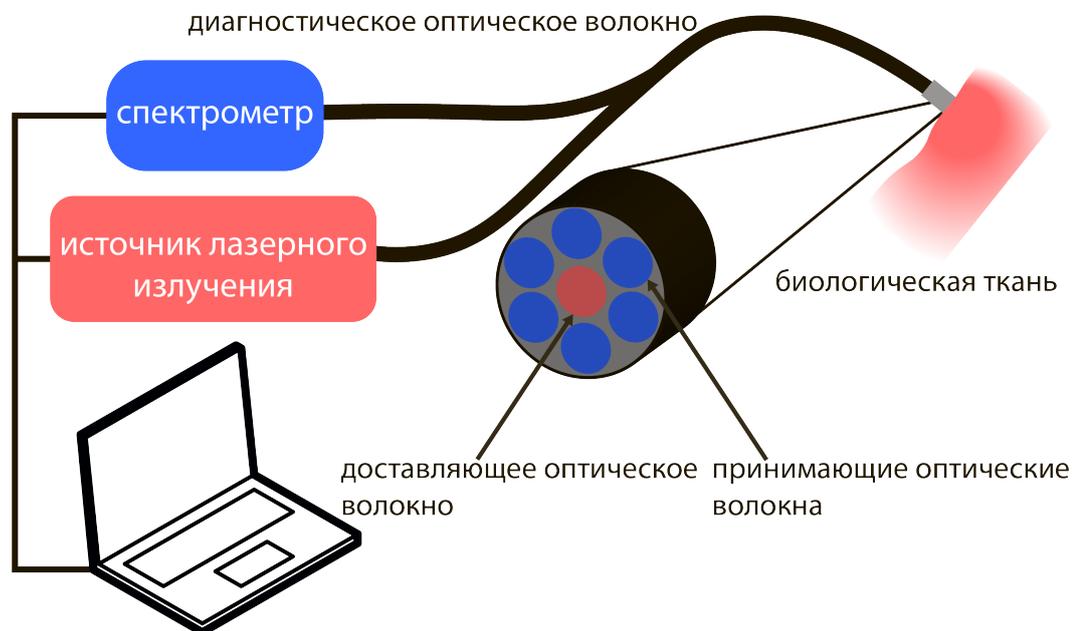


Рисунок 2.2 – Схематическое устройство установки ЛЭСА-01-БИОСПЕК [111].

Диаметры доставляющих и регистрирующих оптических волокон могут варьироваться. В стандартной установке диаметр каждого оптического волокна составляет 200 мкм, а числовая апертура $NA=0,22$. Данная конструкция позволяет варьировать расстояние между рабочей частью оптического зонда от 0 до 2 см и угол наклона от 0 до 30^0 с ошибкой измерений не превышающей 10%. Регистрирующие 6 оптических волокон, которые соединяются со спектрометром, расположены в ряд, чтобы увеличить световой поток без потери разрешения регистрируемого сигнала. Перед спектрометром может быть установлен специальный узкополосный светофильтр, подавляющий интенсивность диффузно рассеянного лазерного излучения, что позволяет одновременно регистрировать флуоресценцию тканей в одном динамическом масштабе. Флуоресцентный сигнал может регистрироваться в спектральном диапазоне от 350 до 1000 нм. Стандартная комбинация установки включает *He-Ne* источник лазерного излучения ($\lambda_{exc} = 632,8$ нм). Применение лазерного излучения в красном диапазоне позволяет проводить флуоресцентную навигацию более глубокозалегающих тканей, чем в случае применения источников в синем диапазоне [112].

2.3 Установка для видео-флуоресцентной визуализации

Для видео-флуоресцентной визуализации границ сенсibilизированных тканей и количественной оценки распределения ФС использовалась двухканальная видео-флуоресцентная система УФФ-630/675-01-БИОСПЕК [113]. Данная система состоит из широкополосного источника белого света, полупроводникового лазера с длиной волны 630 ± 5 нм, Y-образного волоконного жгута, эндоскопического адаптера, соединенного с эндоскопом для регистрации обратно рассеянного и флуоресцентного излучений, оборудованного высокочувствительной Ч/Б и цветной ПЗС-камерами (Рисунок 2.3).

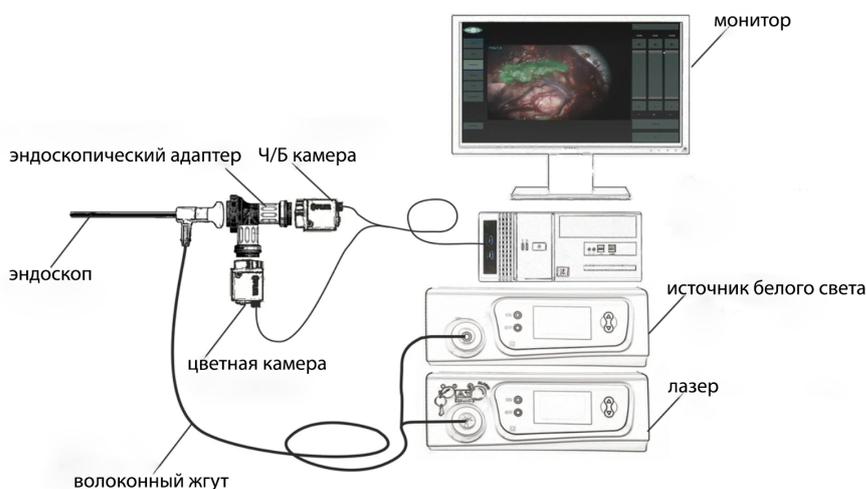


Рисунок 2.3 – Схематическое устройство двухканальной видео-флуоресцентной системы УФФ-630/675-01-БИОСПЕК [113].

Оптические характеристики данной системы оптимальны для видео - флуоресцентной визуализации с применением препаратов 5-АЛК, Себ и фталоцианина алюминия (Aluminum phthalocyanine, AlPc). Область визуализации с равномерным распределением света может достигать 10 – 15 см. Мощность оптического излучения системы составляет не менее 1000 мВт, а плотность мощности не менее 40 мВт/см^2 .

При проведении видео-флуоресцентной визуализации регистрируются изображения в трёх режимах: цветном (навигационном), черно-белом (монохромном) и совмещенном (флуоресцентном). В совмещенном режиме работы специальное программное обеспечение синхронизирует работу двух камер и отображает в режиме реального времени цветное изображение, поверх которого на-

кладывается Ч/Б с отображением флуоресцирующих очагов на длинах волн более 650 нм, которые автоматически выделяются зеленым цветом (Рисунок 2.4).

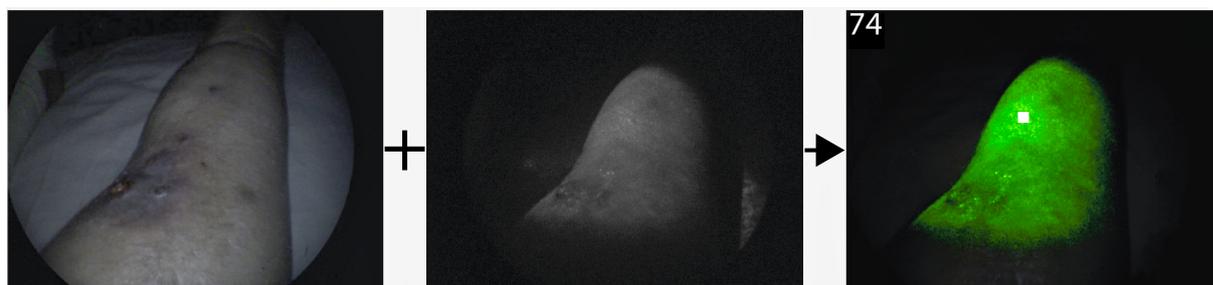


Рисунок 2.4 – Схема получения изображений видео-флуоресцентной системой УФФ-630/675-01-БИОСПЕК в совмещенном режиме работы.

Это позволяет визуально определить границы опухоли и рассчитать в выделенной зоне коэффициент флюоресцентной контрастности, который рассчитывается по следующему принципу: вычисляется среднее значение интенсивности выделенных диагностическим курсором пикселей изображения, регистрируемого Ч/Б камерой, которое нормируется на параметры данной камеры. Далее, вычисляется среднее значение интенсивности пикселей изображения, регистрируемого красным каналом цветной камерой в диапазоне 600 – 750 нм, которое также нормируется на параметры цветной камеры. Затем значение Ч/Б камеры нормируется на значение цветной камеры [114]. Для пространственной количественной оценки интенсивности флуоресценции исследуемых тканей, в случае каждого пациента, проводится нормирование коэффициента флуоресцентной контрастности на значение интенсивности нормальной ткани, которой присваивается значение 10 отн.ед. Это позволяет интраоперационно выявлять области с наибольшей интенсивностью флуоресценции ФС (коэффициент контрастности флуоресценции > 10 отн.ед.), что характерно для патологически измененных тканей. Данная система обеспечивает визуализацию патологических тканей, накопивших ФС в концентрации не менее 0,1 мг/кг.

2.4 Оптические фантомы биологических тканей

Проведение интраоперационной ФД с измерением спектров поглощения и флуоресценции тканей после введения ФС позволяет оценить его концентрационное распределение в опухолевых и нормальных тканях. Для этого был

специально разработан метод концентрационной оценки распределения ФС в исследуемых тканях с применением стандартных образцов (оптических фантомов), имитирующих рассеивающие свойства мягких тканей человека и содержащих ФС в различных концентрациях. Для моделирования рассеивающих свойств биологических тканей использовался 10%-ый раствор жировой эмульсии (Intralipid 10% МСТ/LCT). На Рисунке 2.5 представлена схема приготовления оптических фантомов.

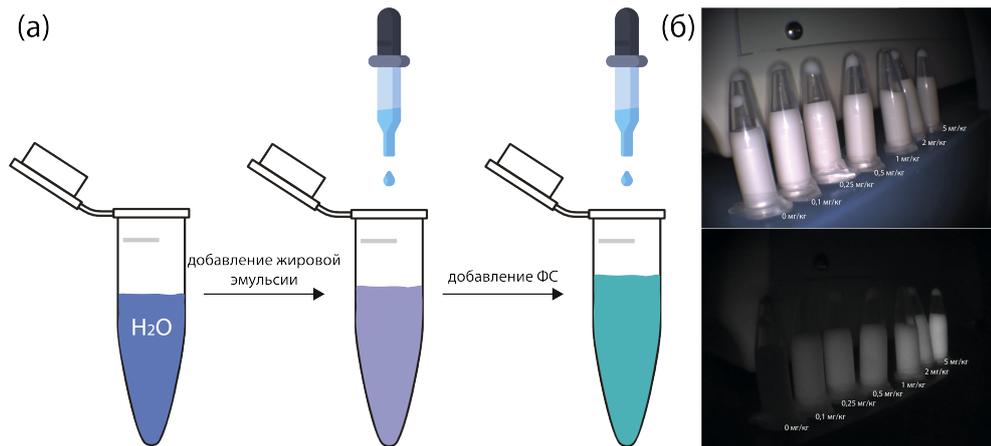


Рисунок 2.5 – Схема приготовления оптических фантомов на основе жировой эмульсии: (а) процесс добавления основных компонент; (б) результаты визуализации оптических фантомов, содержащих ФС в различных концентрациях.

Жировая эмульсия является удобной моделью, часто используемой в качестве компонента оптических фантомов, имитирующей светорассеивающие свойства биологических тканей [1]. Жировые эмульсии обладают высокой временной стабильностью и незначительными колебаниями оптических свойств от партии к партии [115]. На Рисунке 2.6 представлены распределения Intralipid 10% в диапазоне длин волн 400 – 800 нм фактора анизотропии g , коэффициента рассеяния μ_s и редуцированного коэффициента рассеяния μ'_s [116]. Для расчета оптических свойств жировых эмульсий могут быть использованы следующие уравнения:

$$\mu_s = a\lambda^a \quad (2.1)$$

$$g = y_0 + y\lambda \quad (2.2)$$

$$\mu'_s = y_0 + a\lambda + b\lambda^2 \quad (2.3)$$

где y_0 , a и b параметры, значения которых для Intralipid 10% представлены в Таблице 2.2.

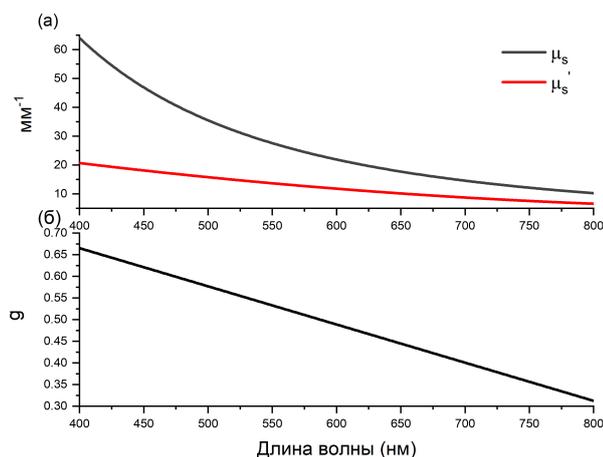


Рисунок 2.6 – Распределения коэффициента рассеяния, редуцированного коэффициента рассеяния и фактора анизотропии Intralipid 10%.

Таблица 2.2 – Параметры для расчета фактора анизотропии, коэффициента рассеяния, редуцированного коэффициента рассеяния и соответствующих коэффициентов детерминации сглаживания

Параметры	g	μ_s	μ'_s
y_0	1,018E+0	-	4,957E+1
a	8,82E-4	4,857E+8	-9,063E-2
b	-	-2,644E+0	4,616E-5
R^2	9,926E-1	9,996E-1	9,984E-1

Для расчета соответствующих значений μ_s и μ'_s с помощью уравнений 2.1 - 2.3 длина волны подставляется в [мкм], а значения коэффициентов получаются в [mm^{-1}]. В красном диапазоне спектра 630–760 нм редуцированный коэффициент рассеяния Intralipid 10% составляет 7,4 – 10,8 mm^{-1} . Для расчета процентного содержания жировой эмульсии в фантоме использовался редуцированный коэффициент рассеяния кожи μ'_s , который в красном диапазоне спектра от 630 до 665 нм составляет 1,8 – 2,5 mm^{-1} [117]. Для моделирования рассеивающих свойств кожи человека жировая эмульсия разбавлялась дистиллированной водой до концентрации 1,6%. Концентрации ФС в оптических фантомах составляли 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 5 мг/кг. Выбор данных концентраций был обусловлен их соответствием наиболее часто наблюдаемым концентрациям ФС в тканях опухоли пациентов [118].

Проведение ФД оптических фантомов с заранее известными концентрациями ФС позволяет оценить его концентрационное распределение в исследуемых

тканях животных или людей. Для приблизительной оценки концентрации ФС в биологических тканях строился калибровочный график, где по оси абсцисс откладывались концентрации ФС в фантомах, а по оси ординат соответствующие усредненные значения индексов флуоресценции. Распределение индексов флуоресценции от концентрации аппроксимировалось линейной функцией $y = kx + b$ методом наименьших квадратов. Данный метод заключается в нахождении коэффициентов линейной зависимости $\{k, b\}$, чтобы «совокупное» отклонение результатов от линейной зависимости было минимально, при которых функция $y(k, b) = \sum_{i=1}^n (y_i - (kx_i + b))^2$ принимает наименьшее значение [119]. При данных значениях k и b сумма квадратов отклонений экспериментальных данных от найденной прямой будет наименьшей.

2.5 Методы интраоперационной оценки накопления фотосенсибилизатора

Флуоресцентные свойства ФС лежат в основе ФД опухолей и обеспечивают контроль накопления и выведения из тканей, а запуск процесса генерации АФК в процессе фотодинамического воздействия обеспечивает противоопухолевую эффективность. Селективность накопления в тканях опухоли, быстрое время выведения из нормальных тканей, интенсивное поглощение и флуоресценция в красном или БИК-диапазоне являются одними из основных свойств ФС, определяющих эффективность ФД и ФДТ. Высокая селективность накопления ФС в опухоли минимизирует вероятность повреждения здоровых тканей в процессе светового воздействия, а применение источников в красном или БИК-диапазонах позволяет выявлять и подвергать терапии наиболее глубоко локализованные сенсibilизированные очаги.

Для интраоперационной флуоресцентной навигации распределения ФС в биологических тканях наиболее часто используются спектроскопические и видеофлуоресцентные методы. А для исследования внутриклеточного распределения флуоресцирующих соединений в единичных клетках или в тканевых срезах применяется конфокальная микроскопия. Для *in vivo* исследования флуоресцентных свойств изолированных образцов и органов широко используется метод локальной флуоресцентной спектроскопии. Исследование распределения ФС можно эффективно осуществлять с помощью разработанных ранее в лаборатории

Лазерной биоспектроскопии ЦЕНИ ИОФ им. А.М. Прохорова РАН методик и оборудования для флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии обратного диффузного отражения (ОДО) [111, 120]. Для этого используется портативный спектрометр ЛЭСА-01-БИОСПЕК. Схематическое устройство данной установки представлено в **пункте 2.2**. При проведении ФД расстояние между доставляющим и приемными волокнами может варьироваться. С увеличением расстояния между доставляющим и приемными волокнами увеличивается длина траектории наиболее вероятного распространения фотонов в биологической ткани и, тем самым, увеличивается глубина зондирования лазерного излучения (Рисунок 2.7).

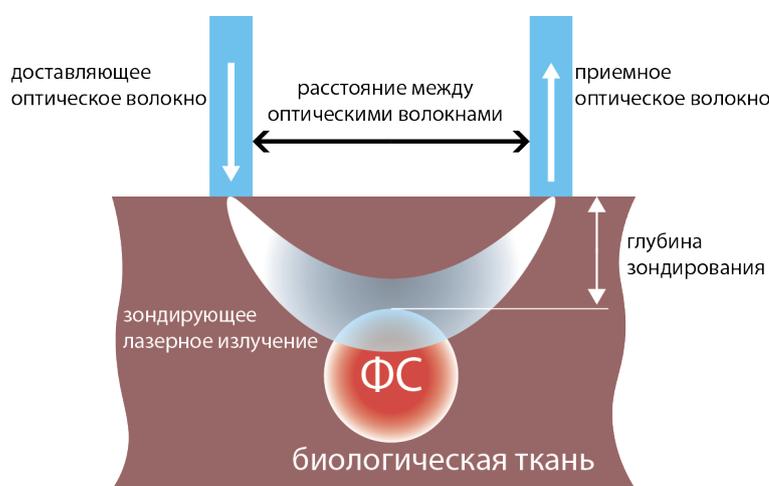


Рисунок 2.7 – Схема системы, реализующей методы спектрально-флуоресцентной диагностики или спектроскопии ОДО.

Для оценки глубины зондирования лазерного излучения Z могут быть использованы следующие аналитические выражения [121]:

$$Z = \frac{\sqrt{2d}}{4} \quad \text{при } d \ll \delta \quad (\text{слабое поглощение}) \quad (2.4)$$

$$Z = \left(\frac{d\delta}{2}\right)^{1/2} \quad \text{при } d \gg \delta \quad (\text{сильное поглощение}) \quad (2.5)$$

где d - расстояние между доставляющим и приемным оптическим волокном, δ - глубина проникновения света в биологическую ткань (диффузионная длина).

Средняя длина пути прохождения фотонов через ткань l между доставляющим и регистрирующими оптическими волокнами (дифференциальная длина пути фотонов) значительно превышает расстояние между ними (из-за рассе-

яния) и определяется через безразмерный коэффициент дифференциального пути β :

$$l = \beta d \quad (2.6)$$

Когда расстояние между оптическими волокнами больше длины рассеяния $1/\mu'_s$ коэффициент дифференциального пути определяется как:

$$\beta = \frac{\sqrt{3}}{2} \frac{d}{d + \delta} \left(\frac{\mu'_s}{\mu_a} \right)^{1/2} \quad (2.7)$$

Глубина проникновения света в биологическую ткань определяется по следующей формуле:

$$\delta = \frac{1}{\sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)}} \approx \frac{1}{\sqrt{3\mu_a\mu'_s}} \quad (2.8)$$

В случае стандартной комбинации оптических волокон (6 приемных и 1 доставляющее волокно диаметрами по 200 мкм) глубина зондирования составляет менее 0,5 мм. При проведении спектроскопии ОДО расстояние между доставляющим и приемным оптическим волокном обычно составляет 5 – 10 мм, что позволяет увеличить траекторию распространения фотона в ткани и, тем самым, увеличить глубину зондирования до 2 – 6 мм. Регистрируемая спектральная информация усредняется по исследуемому объему (пути миграции фотонов), который значительно превышает неоднородность ткани из-за строения микрососудов. Проведение спектрально-флуоресцентной диагностики или спектроскопии ОДО до и после введения ФС позволяет оценить его концентрационное распределение и селективность накопления, а также контролировать фотобличинг ФС в процессе светового воздействия.

2.6 Спектроскопический метод оценки оксигенации гемоглобина

Экспериментальная установка для спектроскопической оценки уровня оксигенации гемоглобина состояла из источника белого света и спектрометра ЛЭСА-01-БИОСПЕК с оптоволоконным входом. В качестве источника широкополосного света использовалась светодиодная лампа с оптоволоконным выходом. Спектр источника белого света в диапазоне 500–600 нм имел достаточную для исследований однородность. Ранее был разработан метод оценки уровня

оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном русле биологических тканей [122]. Количественное определение уровня оксигенации производится с использованием логарифма обратного отражения [123]:

$$A_{exp}(\lambda) = \ln \left(\frac{I_{ref} - I_{dark}}{I - I_{dark}} \right) \quad (2.9)$$

где I_{ref} - отраженный сигнал от стандартного рассеивающего образца ($BaSO_4$); I_{dark} - темновой шум в отсутствии света; I - интенсивность диффузно отраженного света от ткани. Коэффициент отражения $BaSO_4$ приблизительно составляет 1. Данный подход учитывает спектральную неоднородность широкополосного источника белого света и пропускания оптических волокон, а также чувствительность детектора спектрометра. Экспериментальная зависимость $A_{exp}(\lambda)$ описывается модельной функцией [124]:

$$A_{model}(\lambda) = c_0 + c_1(\lambda) + \langle L \rangle [c_{Hb} \epsilon_{Hb}(\lambda) + c_{HbO_2} \epsilon_{HbO_2}(\lambda)] \ln 10 \quad (2.10)$$

где c_0 и c_1 – коэффициенты, учитывающие вклад рассеяния и поглощения ткани, не связанные с гемоглобином; c_{Hb, HbO_2} , ϵ_{Hb, HbO_2} – коэффициенты экстинкции и концентрации оксигенированного и дезоксигенированного гемоглобина. Значения данных коэффициентов, а также величин $\langle L \rangle c_{Hb}$ и $\langle L \rangle c_{HbO_2}$ определяются путем минимизации разности между экспериментальными и модельными спектрами методом наименьших квадратов в диапазоне длин волн 500 – 600 нм [125]. В данном спектральном диапазоне спектры поглощения Hb и HbO_2 имеют характерные различные пики поглощения (Рисунок 2.8).

Уровень оксигенации гемоглобина S_{O_2} и произведение полной концентрации гемоглобина c_{Hb+HbO_2} на среднюю длину пути фотонов $\langle L \rangle$ определяются из вычисленных коэффициентов по следующим формулам [123]:

$$S_{O_2} = \frac{\langle L \rangle c_{HbO_2}}{\langle L \rangle c_{HbO_2} + \langle L \rangle c_{Hb}} = \frac{c_{HbO_2}}{c_{HbO_2} + c_{Hb}} \quad (2.11)$$

$$\langle L \rangle c_{Hb+HbO_2} = \langle L \rangle c_{Hb} + \langle L \rangle c_{HbO_2} \quad (2.12)$$

Произведение $\langle L \rangle c_{Hb+HbO_2}$ зависит от геометрии зондируемой зоны через величину $\langle L \rangle$, поэтому имеют смысл только динамические изменения относительной концентрации гемоглобина $C = c_{Hb+HbO_2}(t)/c_{Hb+HbO_2}(0)$ [7].

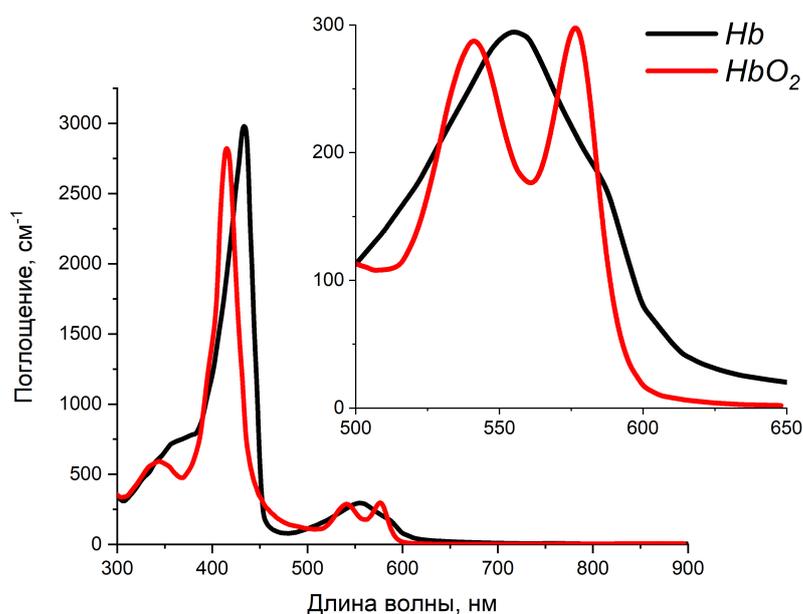


Рисунок 2.8 – Спектры поглощения оксигенированного (HbO_2) и дезоксигенированного (Hb) гемоглобина.

В процессе проведения измерений непроизвольное движение рук может приводить к небольшим изменениям расстояния между торцом волоконно-оптического зонда и тканью, что вызывает случайные колебания $\langle L \rangle$. Степень оксигенации гемоглобина менее чувствительна к ошибкам, так как связана с изменением геометрии во время измерений, поскольку данная величина не зависит от средней длины пути фотонов через ткань. Относительная ошибка при вычислении степени оксигенации составляла не более 3%, а абсолютная – не более 10% [7].

2.7 Моделирование распространения лазерного излучения методом Монте-Карло

Для исследования глубины зондирования лазерного излучения в модели кожи человека при ИК-визуализации кровеносных сосудов методом регистрации обратно рассеянного лазерного излучения было проведено моделирование ММК. Данный метод представляет собой расчет случайного распространения групп фотонов в рассеивающей среде [126] и основан на численном моделировании распространения фотонов в мутных средах. При миграции фотонов внутри биологической ткани претерпевают процессы многократного рассеяния и поглощения. На Рисунке 2.9 представлена последовательность шагов для реализации моделирования ММК.

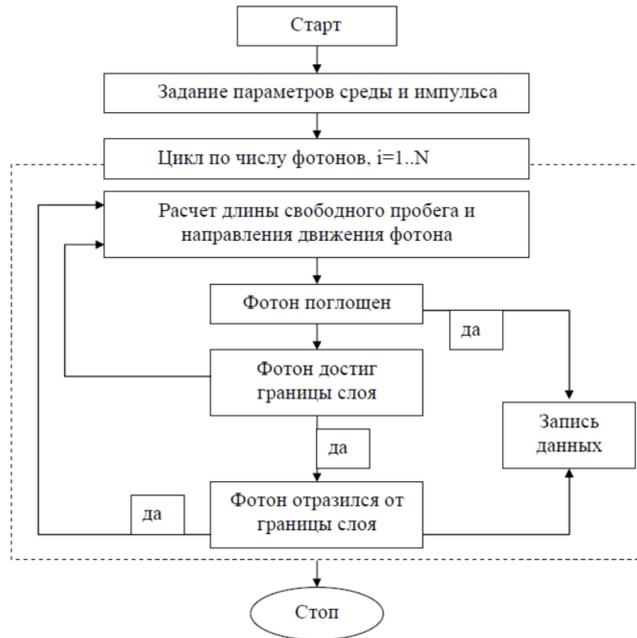


Рисунок 2.9 – Блок-схема алгоритма моделирования ММК [12].

Общая схема ММК основана на центральной предельной теореме теории вероятности, где случайная величина $\sum_{i=1}^N X_i$, равна сумме большого количества N случайных величин X_i с одинаковыми математическими ожиданиями m и дисперсиями σ^2 [20]. ММК имеет распределение по нормальному закону $N \cdot m$ с математическим ожиданием и дисперсией $N \cdot \sigma^2$ [12].

Трехслойная модель кожи человека задавалась толщиной $L_{\text{ср}}$, коэффициентом рассеяния μ_s , коэффициентом поглощения μ_a , средним косинусом угла рассеяния (фактором анизотропии) g и относительным показателем преломления n . Падающий поток состоял из 10^6 фотонов. Все расчеты производились в трехмерной декартовой системе координат.

После входа фотона в образец определяются длина свободного пробега фотона в среде и угол рассеяния θ , который задается фазовой функцией рассеяния:

$$p = p(\theta)p(\psi) \quad (2.13)$$

Угол рассеяния θ , в случае биологических тканей с сильным рассеянием, можно определить из фазовой функции Хени-Гринштейна (выражение 1.13). На каждом шаге события угол θ определяется относительно «старого» направления распространения, а угол ψ - в плоскости, перпендикулярной «новому» направлению движения. Длина свободного пробега фотонов определяется функ-

цией плотности вероятности [8]:

$$p(L) = \left(\frac{1}{l_{ph}} \right) e^{-\frac{L}{l_{ph}}} \quad (2.14)$$

Средняя длина свободного пробега фотона l_{ph} определяется как:

$$l_{ph} = \frac{1}{\mu_a + \mu_s} \quad (2.15)$$

Так как $\int_0^\infty p(L)dL = 1$, то для вычисления длины свободного пробега берется случайное число $\zeta \in (0, 1)$ [8]:

$$\zeta = \int_0^L p(L)dl \quad (2.16)$$

Таким образом, длина свободного пробега фотона определяются выражениями:

$$L = -l_{ph} \ln(1 - \zeta) \quad (2.17)$$

Вероятности рассеяния и поглощения фотонов частицами определяется выражениями:

$$p_s = \frac{\mu_s}{\mu_s + \mu_a} \quad (2.18)$$

$$p_a = \frac{\mu_a}{\mu_s + \mu_a} = 1 - p_s \quad (2.19)$$

В случае, когда генератор выдает случайное число в диапазоне $(0, p_s)$, то считается, что фотон рассеян, а в противном случае фотон поглощен. Если фотон рассеян, то новое направление движения и координаты фотона рассчитываются по формулам [20]:

$$\begin{cases} x = x_0 + L \sin \theta \cos \phi \\ y = y_0 + L \sin \theta \sin \phi \\ z = z_0 + L \cos \theta \end{cases} \quad (2.20)$$

где x_0, y_0, z_0 - координаты фотонов до события рассеяния. Далее все координаты пересчитываются в первоначальную систему координат. Расчет продолжается до тех пор, пока фотон не поглотиться, либо не выйдет за границы моделиру-

емой среды или не попадет на нее ($z = 0$ или $z = L_{cp}$) [20]. Полное внутреннее отражение на границах разных слоев с показателями преломления n учитывается при помощи соотношения $\theta_{кр} = \sin^{-1} \left(\frac{1}{n} \right)$ [8].

2.8 Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Микроскопическая оценка распределения Себ в тканях опухоли проводилось методом конфокальной микроскопии. Биоптат фиксировался в 4%-ном растворе формалина. Фиксированные образцы заключались в среду для замораживания срезов Neg-50 (Richard-Allan Scientific, США) и подвергались быстрому охлаждению до затвердевания среды. Из полученных блоков на замораживающем микротоме Microm HM 540 (Thermo Fisher Scientific Microm International GmbH, США) изготавливались срезы толщиной в 20 мкм, которые затем наносились на предметные стёкла и заключались в глицерин под покровным стеклом. Дополнительная окраска срезов не производилась.



Рисунок 2.10 – Лазерный сканирующий микроскоп Zeiss LSM и оптическая схема работы конфокального микроскопа

Срезы анализировались при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM-710 NLO (Carl Zeiss, Германия) (Рисунок 2.10) в комплексе с мультифотонным фемтосекундным перестраиваемым лазером Chameleon Ultra II (680-1080 нм) (Coherent, США).

Автофлуоресценция возбуждалась на длине волны 488 нм, а флуоресценция ФС на длине волны 633 нм. Для получения изображений применялся объектив Plan-Apochromat 20x/0.8 и объектив на масляной иммерсии Plan-Apochromat 63x/1.4. Данный конфокальный микроскоп имеет разрешение $\sigma \sim 240$ нм.

Заключение к главе 2

Описаны основные методики и оборудование, которые использовались в работе для исследования биологических тканей, численного моделирования распространения света и для микроскопической оценки распределения ФС в опухоли. Представлены методы моделирования оптических фантомов, содержащих ФС и имитирующих рассеивающие свойства биологических тканей. Проведен многосторонний анализ процессов, происходящих в опухоли при проведении ФДТ с применением РrIX и Себ. Описаны подходы фототераностики, включающей проведение спектрально-флуоресцентной диагностики и ФДТ, которые обеспечивают флуоресцентную навигацию распределения экзогенных и эндогенных флуорофоров в биологических тканях.

Глава 3

Разработка метода спектроскопической диагностики в БИК-диапазоне с фотосенсибилизаторами Себ и РrIX

В данной главе представлены результаты исследований, направленных на разработку методов спектроскопического контроля фототерапии в процессе лазерного облучения опухолей с применением 5-АЛК-индуцированного РrIX и Себ, который включает проведение ФД в БИК-диапазоне. Данный подход позволит увеличить глубину фотодинамического воздействия и, за счет контролирования фотоблинка ФС в процессе ФДТ, определить оптимальную плотность энергии, необходимую для обеспечения полного терапевтического эффекта. Представленные в главе методы могут внести дополнительный вклад в оптимизацию процедур ФД и ФДТ и позволят использовать их в качестве интраоперационных дозиметрических систем.

3.1 Метод спектроскопической диагностики в БИК-диапазоне

Сложность спектрально-флуоресцентного контроля фотоблинка РrIX или Себ непосредственно в процессе ФДТ связана с тем, что максимумы флуоресценции данных ФС на длинах волн 635 и 665 нм, соответственно, имеют стоксов сдвиг 2 – 5 нм относительно пиков Q-полосы поглощения в красном диапазоне спектра, а также вследствие того, что спектральная ширина полупроводниковых терапевтических источников лазерного излучения составляет порядка 10 нм. Для решения данной проблемы были проведены исследования на оп-

тических фантомах, в процессе которых в лаборатории лазерной спектроскопии ИОФ РАН была подобрана комбинация полосовых оптических фильтров (ОФ1), состоящего из цветных стеклянных фильтров, который позволял в процессе лазерного воздействия одновременно регистрировать диффузно рассеянное лазерное излучение и длинноволновое «плечо» флуоресценции PrIX и Ce6 в БИК-диапазоне.

Перед спектрометром был установлен оптический фильтр ОФ1, ослабляющий более чем в 10^4 возбуждающее флуоресценцию ФС терапевтическое лазерное излучение в спектральной области 620-680 нм. Перед терапевтическим лазером с длиной волны генерации 635 ± 5 нм был установлен интерференционный фильтр с центром на 636 нм и шириной полосы 16 нм (ОФ2). Перед терапевтическим лазером с длиной волны генерации 660 ± 5 нм был установлен интерференционный фильтр с центром на 660 и шириной полосы 26 нм (ОФ3). Данная конфигурация позволяла наблюдать рассеянное лазерное излучение и длинноволновое ($\lambda > 710$ нм) «плечо» флуоресценции PrIX и Ce6 в одном динамическом диапазоне. На Рисунке 3.1 представлены спектры пропускания оптических фильтров ОФ1, ОФ2, ОФ3 и спектры флуоресценции PrIX и Ce6.

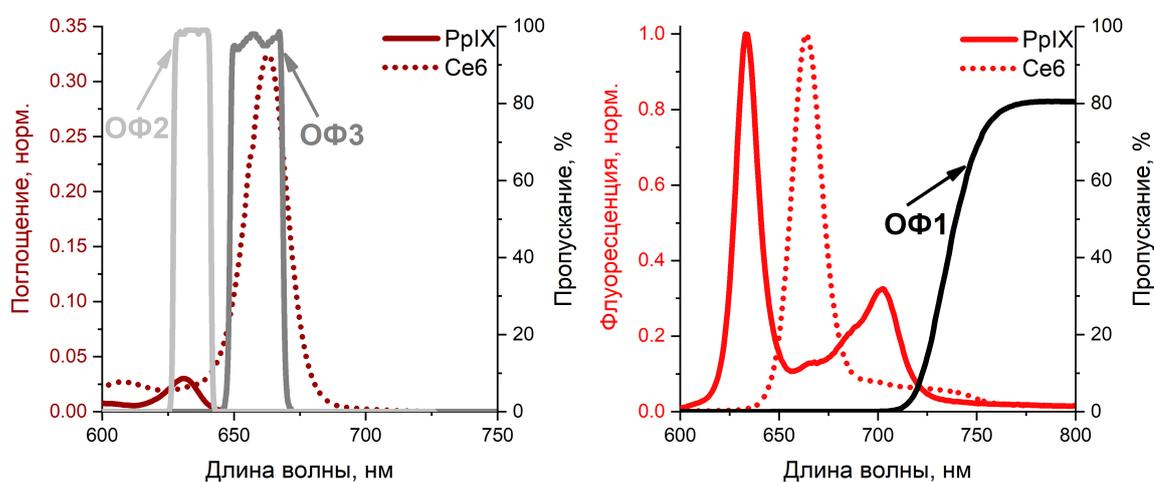


Рисунок 3.1 – Спектры пропускания оптических фильтров ОФ1, ОФ2 и ОФ3 и нормированные спектры поглощения и флуоресценции PrIX и Ce6.

Спектральная характеристика оптических фильтров характеризуется численным значением показателя поглощения k_λ или оптической плотности D_λ для различных длин волн и спектральными кривыми коэффициента пропускания τ_λ , оптической плотности D_λ и логарифма оптической плотности lgD_λ .

Показатель поглощения оптического фильтра k_λ вычисляется по формуле:

$$k_\lambda = \frac{-lg\tau_\lambda}{l} \quad (3.1)$$

где τ_λ - коэффициент пропускания стекла толщиной l [мм] для монохроматического света длиной волны λ . Оптическая плотность D_λ фильтра связана с показателем поглощения k_λ и коэффициентом пропускания τ_λ следующей формулой:

$$D_\lambda = -lg\tau_\lambda = k_\lambda l \quad (3.2)$$

Аппаратная функция спектрометра, измеренная при использовании данного фильтра с применением галогенового источника белого света, приведена на Рисунке 3.2.

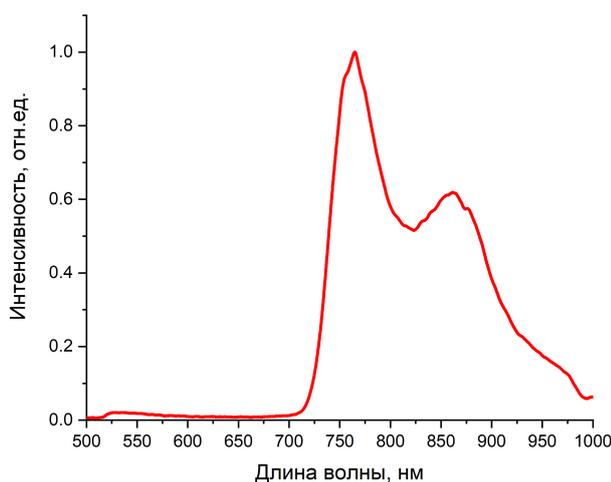


Рисунок 3.2 – Аппаратная функция спектрометра в случае проведения фототерапии в БИК-диапазоне.

Знание аппаратной функции спектрометра позволяет сравнивать регистрируемые спектры с данными, полученными с применением другого оборудования. Таким образом, это позволяет осуществлять персонализированное планирование фотодинамического воздействия в разных клиниках с применением различных устройств. Фототерапия в БИК-диапазоне включала проведение спектрально-флуоресцентной навигации распределения ФС и ФДТ с применением одного и того же лазера. Спектрально-флуоресцентная диагностика проводилась с использованием спектрометра ЛЭСА-01-БИОСПЕК. Данная установка позволяет локально исследовать флуоресцентные, рассеивающие и поглощающие свойства в любых тканях пациента, доступных для волоконно-

оптического зонда, диаметр которого может варьироваться от 1 до 2 мм. Флуоресценция оптических фантомов возбуждалась терапевтическими полупроводниковыми лазерами ЛФТ-02-БИОСПЕК с длинами волн генерации 635 ± 5 и 660 ± 5 нм и максимальной выходной мощностью лазерного излучения 2 Вт. В дальнейшем данные источники лазерного излучения будут обозначаться как лазеры 635 и 660 нм. Спектральный сигнал регистрировался в диапазоне от 350 до 900 нм, который включает диффузно рассеянное лазерное и флуоресцентное излучение. Данный метод чувствителен к различию рассеивающих свойств среды на длине волны возбуждения и эмиссии при неизменной концентрации ФС. Для обработки регистрируемых сигналов использовалась авторская программа Uno Momento.

Доставка и регистрация излучения производилась Y-образным оптическим волокном, состоящий из 6 приемных и 1 облучающего оптического волокно (Рисунок 3.3).

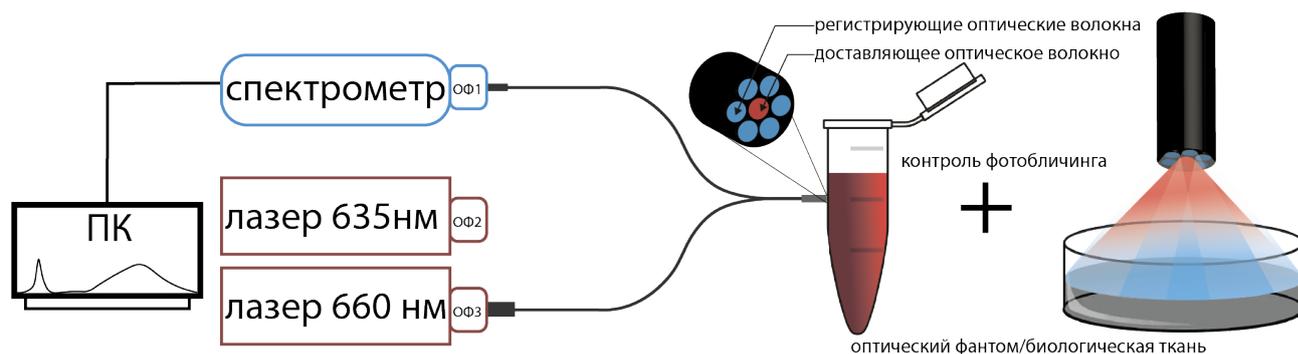


Рисунок 3.3 – Схема лазерно-индуцированного спектрального контроля процесса фототераностики оптических фантомов.

Спектроскопическая диагностика проводилась в двух режимах: 1) при расположении торца оптического волокна в «мягком контакте» с исследуемой поверхностью, что подразумевает вертикальное расположение диагностического торца в контакте с тканью без влияния на кровообращение в исследуемой зоне [127]; 2) при удалении торца оптического волокна от поверхности опухоли на расстоянии, необходимом для равномерного лазерного облучения всей поверхности новообразования [7], что позволяет регистрировать кинетику фотоблинка ФС в процессе ФДТ (Рисунок 3.4).

Время экспозиции при проведении спектрально-флуоресцентной диагностики варьировалось от 10 до 100 мс. Временной интервал регистрации спектров в процессе ФДТ составлял 3 – 5 с. При проведении ФД в «мягком контакте»

регистрировалось не менее 5 спектров, которые в дальнейшем усреднялись.

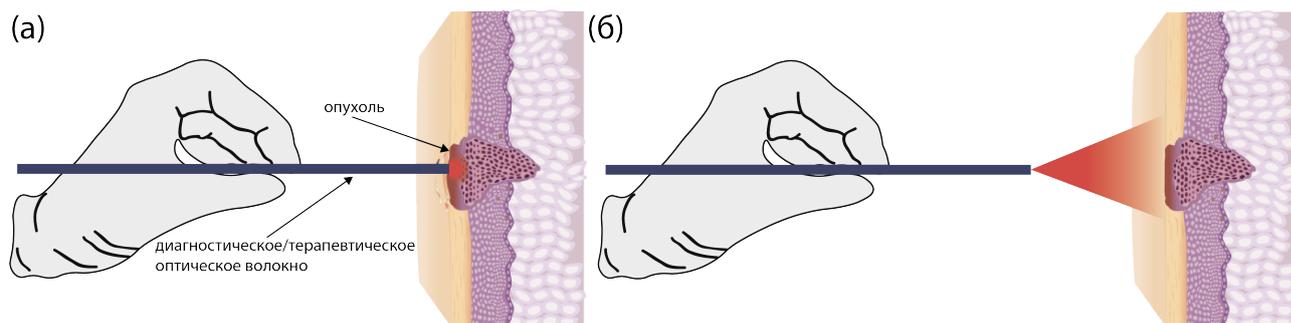


Рисунок 3.4 – Режимы фототерапии биологических тканей: (а) в “мягком контакте”, когда волоконно-оптический зонд находится в контакте с тканями опухоли; (б) в процессе ФДТ, когда волоконно-оптический зонд находится на расстоянии от опухоли.

Интенсивность флуоресценции оценивалась по индексу флуоресценции IF , который рассчитывался как отношение интегральной интенсивности под спектральной кривой флуоресценции $I_f(\lambda)$ к интегральной интенсивности под спектральной кривой обратно рассеянного лазерного излучения $I_{bs}(\lambda)$:

$$IF = \int_{\lambda} I_f(\lambda) d(\lambda) / \int_{\lambda} I_{bs}(\lambda) d(\lambda) \quad (3.3)$$

При проведении спектрально-флуоресцентной навигации в БИК-диапазоне $I_f(\lambda)$ рассчитывался в диапазоне 725 – 780 нм. В случае применения лазера 635 нм $I_{bs}(\lambda)$ рассчитывался в диапазоне 625 – 645 нм, а в случае лазера 660 нм – в диапазоне 650-670 нм. В случае применения He-Ne лазера $I_{bs}(\lambda)$ рассчитывалась в диапазоне 625 – 645 нм, а $I_f(\lambda)$ в диапазонах 665 – 690 нм для Себ и 700 – 710 нм для РрIX. Данный метод спектрально-флуоресцентной навигации чувствителен к различиям рассеивающих свойств среды на длине волны возбуждения и эмиссии при неизменной концентрации ФС.

Наиболее часто флуоресценция РрIX и Себ регистрируется в диапазоне длин волн 620 – 710 нм. На Рисунке 3.5 представлены характерные результаты спектроскопической диагностики оптических фантомов, содержащих РрIX и Себ с регистрацией флуоресценции ФС в красном ($\lambda_{exc}=632,8$ нм) в БИК-диапазонах ($\lambda_{exc}=635/660$ нм).

Максимумы флуоресценции РрIX и Себ в красном и БИК-диапазоне образуются в результате обрезания спектра флуоресценции ФС оптическими фильтрами, установленными перед спектрометром. На Рисунке 3.6 представлены

результаты спектроскопической диагностики оптических фантомов в БИК - диапазоне, содержащих различные концентрации РrIX и Се6.

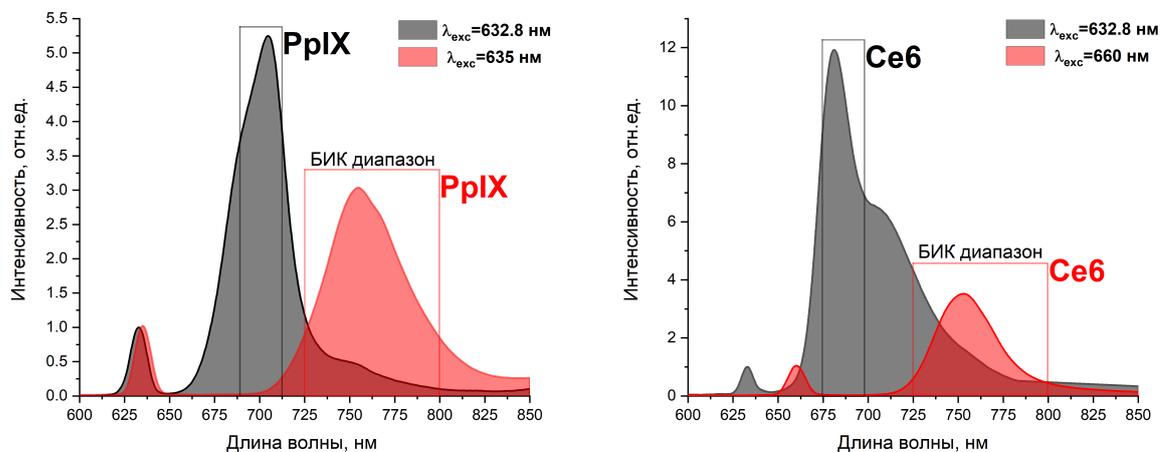


Рисунок 3.5 – Спектроскопическая диагностика оптических фантомов с регистрацией флуоресценции ФС в красном и БИК-диапазонах: (а) фантом с РrIX; (б) фантом с Се6.

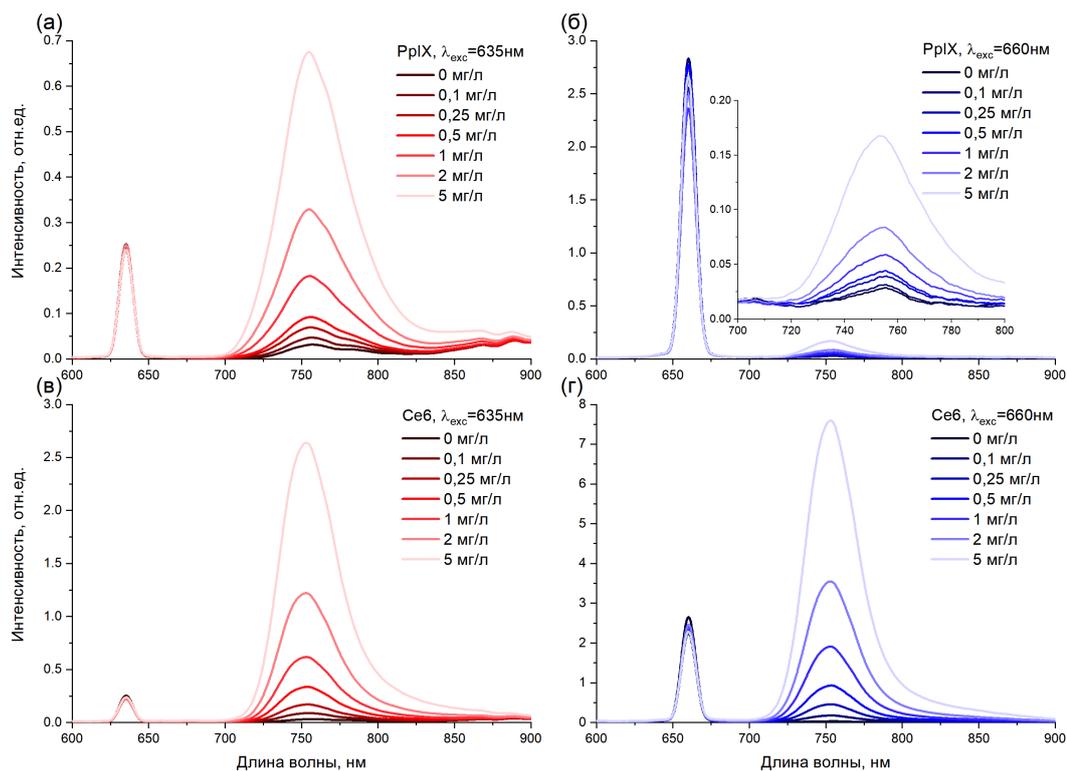


Рисунок 3.6 – Спектроскопическая диагностика в БИК-диапазоне: (а,б) фантомы с РrIX; (в,г) фантомы с Се6.

Интенсивная флуоресценция РrIX и Се6 была зарегистрирована в диапазоне 725 – 800 нм. Применение источника 660 нм показало низкую эффективность возбуждения флуоресценции РrIX, однако позволило выявить флуоресцентные

различия при концентрациях РрІХ > 0,25 мг/кг (Рисунок 3.5б). Проведенное ранее исследование демонстрирует, что для ФДТ тканей с накоплением РрІХ возможно применение источников света лазерного излучения 660 нм [128], что может позволить увеличить глубину фотодинамического воздействия. Однако, следует учитывать, что на длине волны 660 нм практически отсутствует поглощение РрІХ, что ограничивает эффективность применения источников света в данном диапазоне. Для всех случаев фантомов были рассчитаны индексы флуоресценции, распределения которых представлены на Рисунке 3.7.

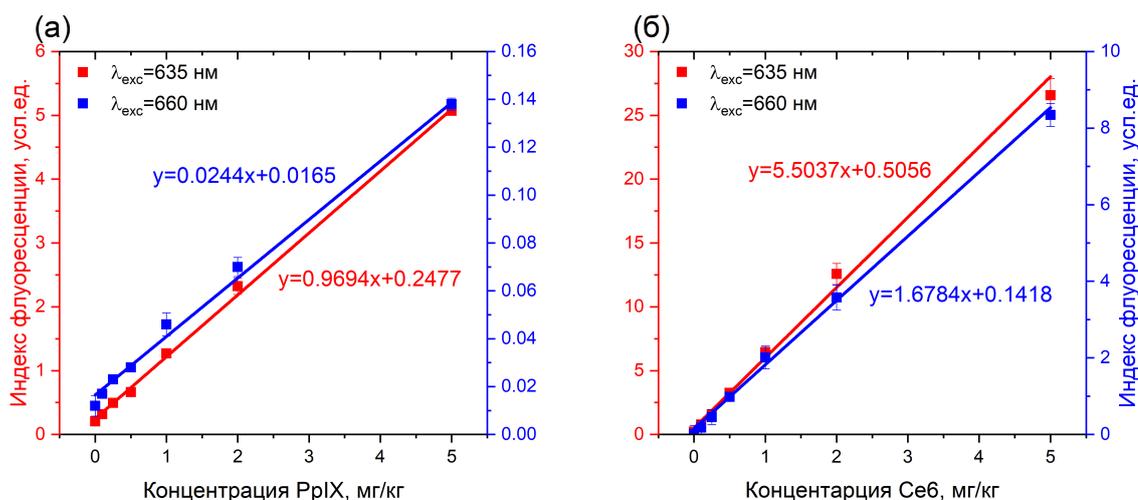


Рисунок 3.7 – Распределение индексов флуоресценции оптических фантомов: (а) фантомы с РрІХ; (б) фантомы с Себ.

Во всех случаях индексы флуоресценции оптических фантомов изменялись по линейному закону

$$IF = kx + b \quad (3.4)$$

где IF - индекс флуоресценции; x - концентрация ФС; k, b - коэффициенты аппроксимации. Данные результаты демонстрируют положительную корреляцию между интенсивностью флуоресценции в БИК-диапазоне и концентрацией РрІХ и Себ. Полученные калибровочные графики могут быть использованы для количественной оценки концентрации РрІХ или Себ в тканях опухоли.

Также были исследованы амплитуды интенсивностей флуоресценции $I(\lambda)$ и обратно рассеянного лазерного излучения $I(\lambda)_{bs}$ при разных длинах волн возбуждающего излучения, что позволило рассчитать коэффициент флуоресцентной контрастности $k(\lambda)$ для оптических фантомов содержащих РрІХ или

Себ в концентрации 5 мг/кг:

$$k(\lambda) = 1 + \frac{(I(\lambda)_{5\text{мг/кг}} - I(\lambda_{0\text{мг/кг}})) - I(\lambda)_{bs}}{(I(\lambda)_{5\text{мг/кг}} - I(\lambda_{0\text{мг/кг}})) + I(\lambda)_{bs}} \quad (3.5)$$

где $I(\lambda)_{5\text{мг/кг}}$ - регистрируемое максимальное значение интенсивности флуоресценции фантома с ФС; $I(\lambda)_{0\text{мг/кг}}$ - регистрируемое максимальное значение интенсивности флуоресценции фантома без ФС [129]. Данный вид расчета позволяет представить $k(\lambda)$ в диапазоне значений от 0 до 2 (Рисунок 3.8).

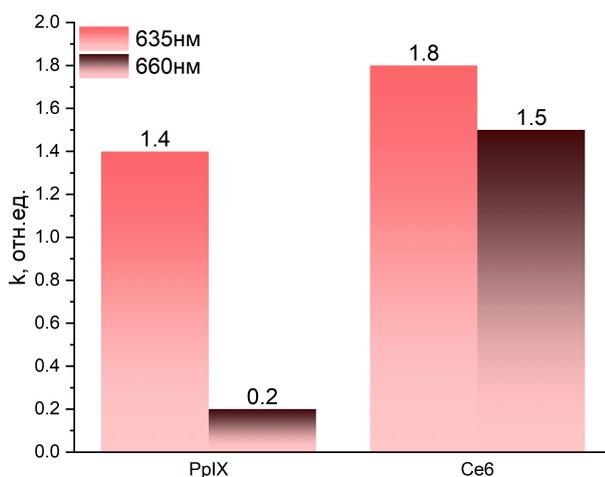


Рисунок 3.8 – Коэффициенты флуоресцентной контрастности фантомов с PrIX/Себ при возбуждении флуоресценции ФС на длинах волн 635 и 660 нм.

Полученные результаты демонстрируют, что использование источника лазерного излучения с длиной волны 635 нм позволяет достигать наибольших значений коэффициента флуоресцентной контрастности в случае с PrIX и Себ, которые составляют 1,4 и 1,8, соответственно, в сравнении с лазерным источником 660 нм. В случае всех фантомов также были получены соотношения «сигнал/шум». На Рисунке 3.9 представлено распределение соотношения «сигнал / шум» как отношение интегральной интенсивности флуоресценции фантомов в диапазоне 725-800 нм к интегральной интенсивности сигнала от оптического фантома без ФС в том же диапазоне. Предварительно спектры были нормированы на диффузно рассеянное лазерное излучение.

Чем выше соотношение «сигнал/шум», тем выше вероятность выявления соответствующей концентрации ФС. Значения соотношения «сигнал/шум»=1 демонстрируют, что регистрируемый сигнал флуоресценции на уровне шумов. Наибольшее значение «сигнал/шум» в случае фантомов с PrIX наблюдалось

при $\lambda_{exc}=635$ нм, а в случае фантомов с Себ при $\lambda_{exc}=660$ нм и составляло 25 ± 3 и 308 ± 31 , соответственно.

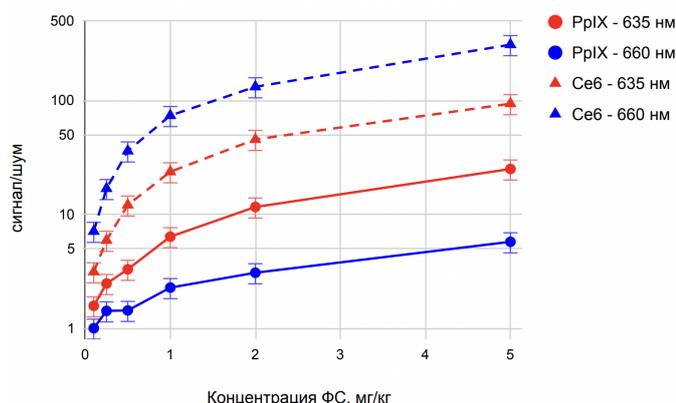


Рисунок 3.9 – Распределение соотношения «сигнал/шум» фантомов с PpIX и Себ при возбуждении флуоресценции на длинах волн 635 и 660 нм.

При проведении спектроскопической диагностики важно регистрировать флуоресценцию ФС и рассеянное лазерное излучение в одном динамическом диапазоне. Это позволяет оценить распределение индексов флуоресценции в исследуемых тканях, содержащих PpIX или Себ, с применением источников лазерного излучения с длинами волн генерации 635 и 660 нм. На Рисунке 3.8 представлены результаты спектрально-флуоресцентной диагностики фантомов, содержащих PpIX и Себ в концентрации 0,5 мг/кг.

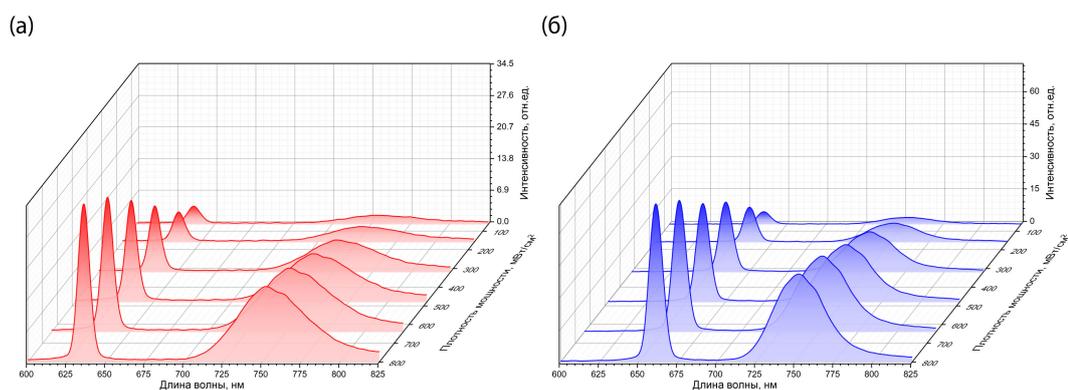


Рисунок 3.10 – Спектры оптических фантомов с PpIX или Себ зарегистрированные при плотностях мощности лазерного излучения 64, 160, 320, 480, 640 и 800 мВт/см².

Данные результаты демонстрируют соотношение интенсивности обратного рассеянного лазерного излучения и длинноволнового плеча флуоресценции PpIX и Себ в БИК-диапазоне при терапевтических плотностях мощности лазерного излучения более 50 мВт/см².

3.2 Преимущества флуоресцентной навигации в БИК-диапазоне

Основной целью современной клинической онкологии является повышение эффективности хорошо зарекомендовавших себя методов лечения. Например, персонификация методов ФД и процесса лазерного воздействия на опухоли различных локализаций может позволить улучшить результаты лечения методами ФДТ. Современные клинически разрешенные ФС, такие как 5-АЛК-индуцированный РrIX и Себ охватывают широкий диапазон длин волн флуоресценции 400–750 нм, а диапазон 700–900 нм является наиболее оптимальным для ФД за счет большей глубины проникновения света и минимизации вклада эндогенной флуоресценции тканей по сравнению с диапазоном длин волн 400–700 нм [130]. Авторы [131] продемонстрировали существенные различия в интенсивности эндогенной флуоресценции тканей опухоли и прилегающих тканей в диапазоне 700–1000 нм при возбуждении 532 и 632,8 нм. Известно, что среди основных эндогенных флуорофоров биологических тканей только порфирины обладают интенсивной флуоресценцией в красном и БИК-диапазонах. Эндогенная флуоресценция тканей может препятствовать специфическому обнаружению флуоресценции ФС. Следует отметить, что флуоресценция основных флуорофоров биологических тканей находится в диапазоне длин волн 280–700 нм [3]. Однако, в тканях злокачественных новообразований интенсивность эндогенной флуоресценции в диапазоне 600–700 нм может значительно возрастать [132]. Это обусловлено флуоресценцией эндогенных порфиринов, концентрация которых в опухолях в несколько раз выше чем в здоровых тканях.

Для проведения ФД новообразований с 5-АЛК чаще всего применяются источники света с длиной волны около 405 нм и регистрацией флуоресценции на длине волны 635 нм [92] или 700 нм [133]. Ранее проведенные исследования показали высокую эффективность ФД и ФДТ очагов накопления РrIX с применением лазеров в красном диапазоне при совместном применении видео- и спектрально-флуоресцентной диагностики [134]. Использование источников света в красном диапазоне позволяет достигать большей глубины фотодинамического воздействия по сравнению с источниками широкополосного белого, зеленого или синего излучения. На данный момент имеются устройства для ФДТ и видео-флуоресцентного мониторинга фотобличинга РrIX на длине вол-

ны около 700 нм с возбуждением флуоресценции на 633 нм [135].

В отличие от РrIX (ФС клеточного типа) [136], Се6 является препаратом преимущественно сосудистого типа [72]. Для проведения ФДТ опухолей с применением Се6 чаще всего используются источники света с длинами волн 400 – 405 нм или 650 – 665 нм. Ранее, при исследовании аутофлуоресценции в БИК-диапазоне с возбуждением источником света 650 нм было отмечено, что вклад гемоглобина в появление артефактов на регистрируемых изображениях был минимальным в сравнении с белым светом [137]. Поэтому применение нами возбуждение флуоресценции Се6 на длине волны 660 нм и регистрация флуоресцентного сигнала в БИК-диапазоне 725 – 800 нм позволило минимизировать вклад эндогенной флуоресценции в результирующий сигнал.

Представленная в данной главе конфигурация установки также позволяет помимо регистрации флуоресценции Се6 и РrIX оценить эндогенную флуоресценцию тканей в диапазоне 725-800 нм при возбуждении на длинах волн 635 и 660 нм (Рисунок 3.11).

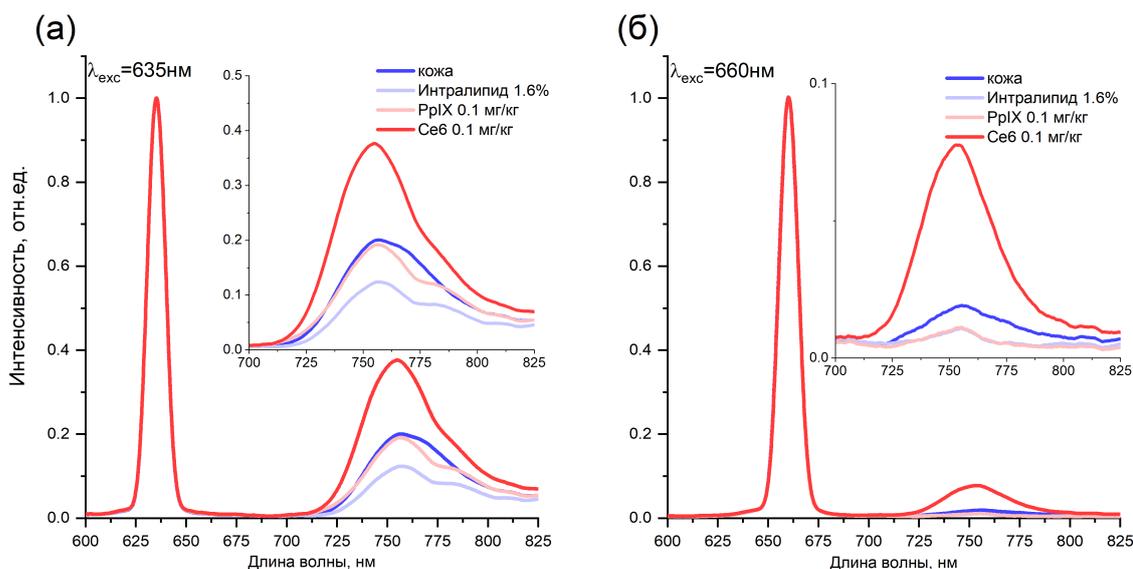


Рисунок 3.11 – Спектроскопическая диагностика кожи человека, оптических фантомов без ФС (Intralipid 1.6%) и содержащих РrIX или Се6 в концентрации 0,1 мг/кг в БИК-диапазоне: (а) $\lambda_{exc} = 635 \text{ нм}$; (б) $\lambda_{exc} = 660 \text{ нм}$.

Для получения истинных спектров эндогенной флуоресценции была учтена аппаратная функция спектрометра, на входе которого был установлен оптический фильтр (Рисунок 3.12). Зарегистрированные спектры были нормированы на спектр широкополосного источника белого света.

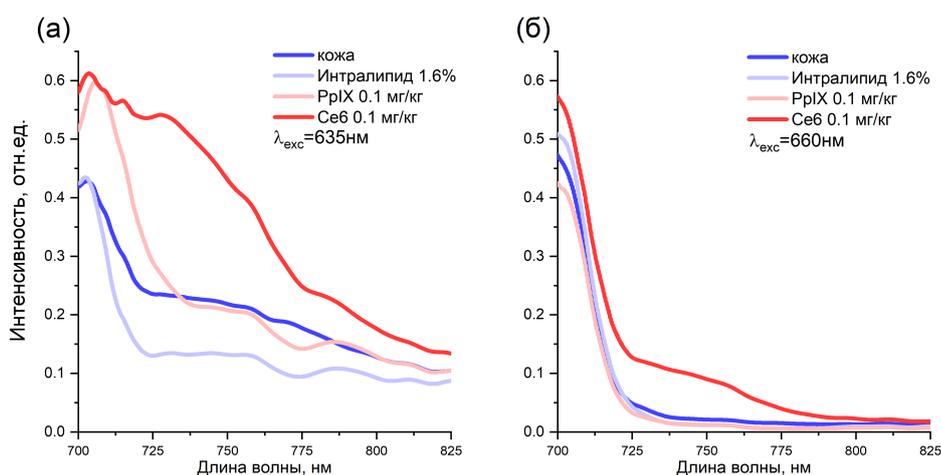


Рисунок 3.12 – Спектры флуоресценции кожи, жировой эмульсии и фантомов, содержащих РрIX и Се6: (а) $\lambda_{exc}=635$ нм; (б) $\lambda_{exc}=660$ нм.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что при $\lambda_{exc}=635$ нм, помимо экзогенной флуоресценции РрIX и Се6, возможна регистрация эндогенной флуоресценции тканей в диапазоне 725 – 775 нм. Тогда как, в случае $\lambda_{exc}=660$ нм была зарегистрирована флуоресценция только Се6, а флуоресцентный сигнал от РрIX и кожи практически отсутствовал.

Применение методов ФД в БИК-диапазоне позволяет с большей специфичностью и на большей глубине выявлять гетерогенность опухолей, что может позволить своевременно менять тактику лечения. Поэтому проведение ФД с регистрацией экзогенной флуоресценции ФС в БИК-диапазоне позволит наиболее точно определить патологические зоны ткани, накопившие препарат. Флуоресценция РрIX/Се6 наиболее часто возбуждается в области 400 – 405 нм и регистрируется в диапазоне 620 – 720 нм. Однако, в данном диапазоне высокие коэффициенты поглощения гемоглобина, меланина и билирубина способствуют ослаблению проникновения света в биологические ткани [94]. РрIX и Се6 также имеют максимумы поглощения в красном диапазоне на длинах волн 635 и 660 нм, соответственно, которые в несколько раз меньше, чем в полосе Соре, что уменьшает интенсивность возбуждаемой флуоресценции.

ФДТ с использованием источников лазерного излучения в красном диапазоне также обеспечивает большую глубину фотодинамического воздействия, поскольку в диапазоне 600–900 нм находится «терапевтическое окно» биологических тканей, где поглощение основных эндогенных абсорбирующих компонент биологических тканей минимально.

Важным фактором, обеспечивающим эффективность ФДТ, является прове-

дение ФД, используемой в качестве дозиметрического метода, который обеспечивает оценку распределения концентрации ФС в опухоли и контроль изменения интенсивности его флуоресценции в процессе фотодинамического воздействия [138]. Одним из самых распространенных способов определения фотодинамической дозы в процессе ФДТ является контроль уровня фотобличинга ФС, который может служить показателем эффективности генерации синглетного кислорода для оценки эффективности терапии [139]. Контроль концентрации синглетного кислорода также является дозиметрическим методом контроля ФДТ [140], однако клиническое применение данного подхода является сложным из-за технической сложности интраоперационной реализации.

Проведенные ранее исследования продемонстрировали, что фотодинамическую дозу можно эффективно определить посредством измерения фотобличинга РrIX [135] и Себ [141]. Флуоресцентные свойства ФС позволяют мониторить распределение ФС в перерывах между процедурами ФДТ, а также оценивать фотобличинг ФС непосредственно в процессе лазерного облучения.

3.3 Спектроскопическая диагностика оптических фантомов в БИК-диапазоне

Фототераностика, сочетающая флуоресцентную навигацию/диагностику и ФДТ является новым направлением в клинической медицине. Метод спектроскопического контроля эффективности фототераностики с регистрацией флуоресценции в БИК-диапазоне позволил в процессе фотодинамического воздействия оценить кинетику фотобличинга РrIX и Себ. Для оценки кинетики фотобличинга были подготовлены оптические фантомы на основе агарозы (PanEco, Россия) и жировой эмульсии (Lipofundin MCT/LCT 10%) объемом 2 мл с добавлением 30 мг агарозы без ФС и содержащие РrIX/Себ в концентрациях 1, 2 и 5 мг/кг. Для моделирования рассеивающих свойств использовался раствор жировой эмульсии, разбавленный водой до концентрации 1,6%. Агар был выбран из-за его способности образовывать стабильные матрицы, которые позволяют включать различные объекты для имитации оптических свойств фантомной среды, аналогичной свойствам биологической ткани [142] и для предотвращения диффузии ФС с глубоких слоев фантома к поверхностным слоям в процессе лазерного облучения. Поверхностная плотность мощности лазерного излучения в

процессе фотодинамического воздействия составляла 165 мВт/см^2 , а суммарная плотность энергии - 100 Дж/см^2 . Оптические фантомы с РrIX облучались лазерным излучением $\lambda=635\pm 5 \text{ нм}$, а фантомы с Себ - излучением с длиной волны $660\pm 5 \text{ нм}$. В процессе фотодинамического воздействия спектральные сигналы, включающие диффузно рассеянное лазерное излучение и флуоресценцию ФС, регистрировались с накоплением (экспозицией) одного спектра $20 - 30 \text{ мс}$ и временным интервалом регистрации $3 - 5 \text{ сек}$. Пример регистрируемых в процессе ФДТ спектральных сигналов представлены на Рисунке 3.13.

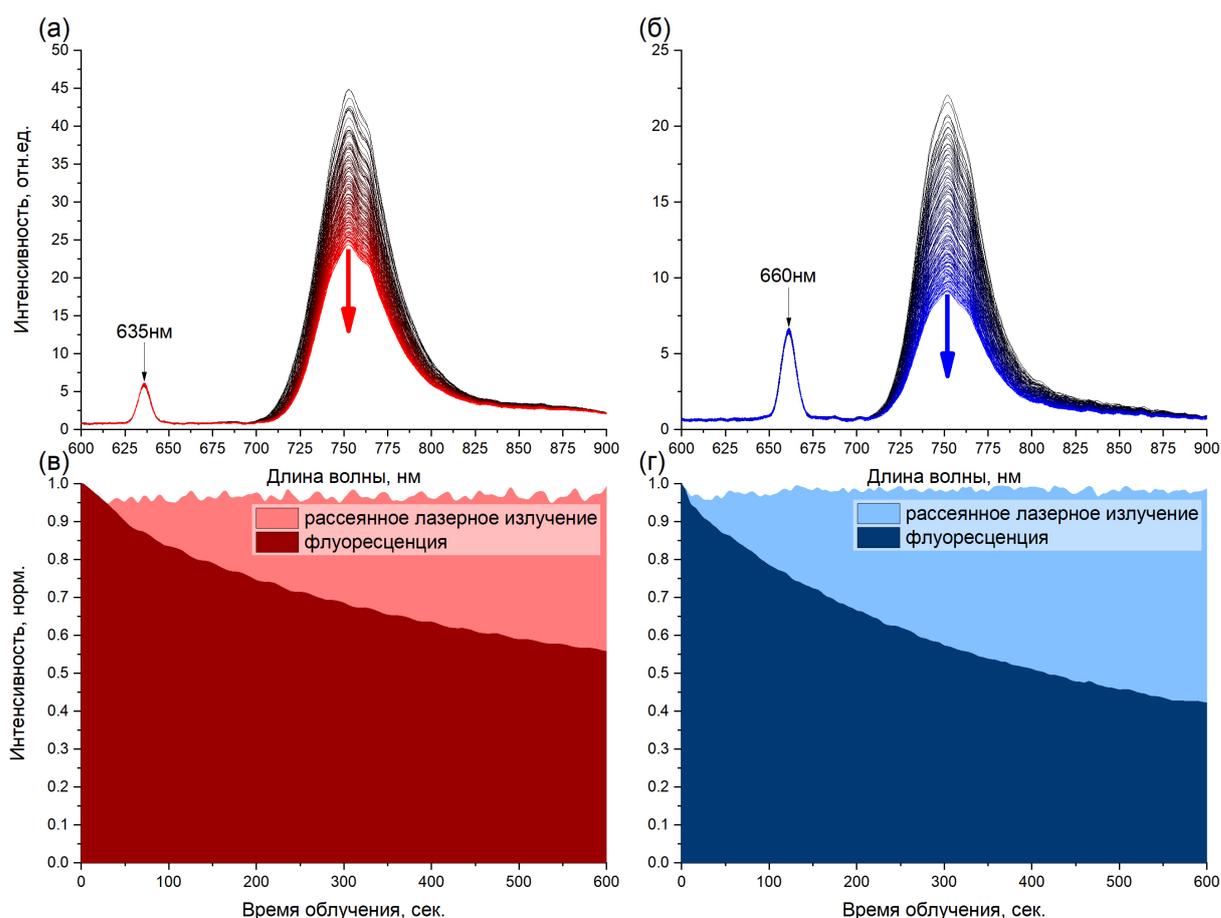


Рисунок 3.13 – Спектроскопическая диагностика в процессе лазерного облучения: (а) спектры фантома с РrIX, $C_{PrIX}=2 \text{ мг/кг}$; (б) спектры фантома с Себ, $C_{Seб}=2 \text{ мг/кг}$; (в) распределение интенсивностей диффузно отраженного лазерного излучения и флуоресценции РrIX, $\lambda_{exc} = 635 \text{ нм}$; (г) распределение интенсивностей диффузно отраженного лазерного излучения и флуоресценции Себ, $\lambda_{exc} = 660 \text{ нм}$.

В процессе лазерного облучения наблюдалось уменьшение интенсивности флуоресценции РrIX и Себ (Рисунок 3.13а,б), т.е. наблюдался фотобликинг за счет деструкции молекул ФС под действием света. Интенсивность обратно рассеянного лазерного излучения оставалась приблизительно на одном уровне

(Рисунок 3.13в,г). Одновременно, с помощью программного обеспечения рассчитывались изменяющиеся в процессе лазерного воздействия индексы флуоресценции ФС. Результаты распределения индексов флуоресценции фантомов с РрIX и Себ представлены на Рисунке 3.14.

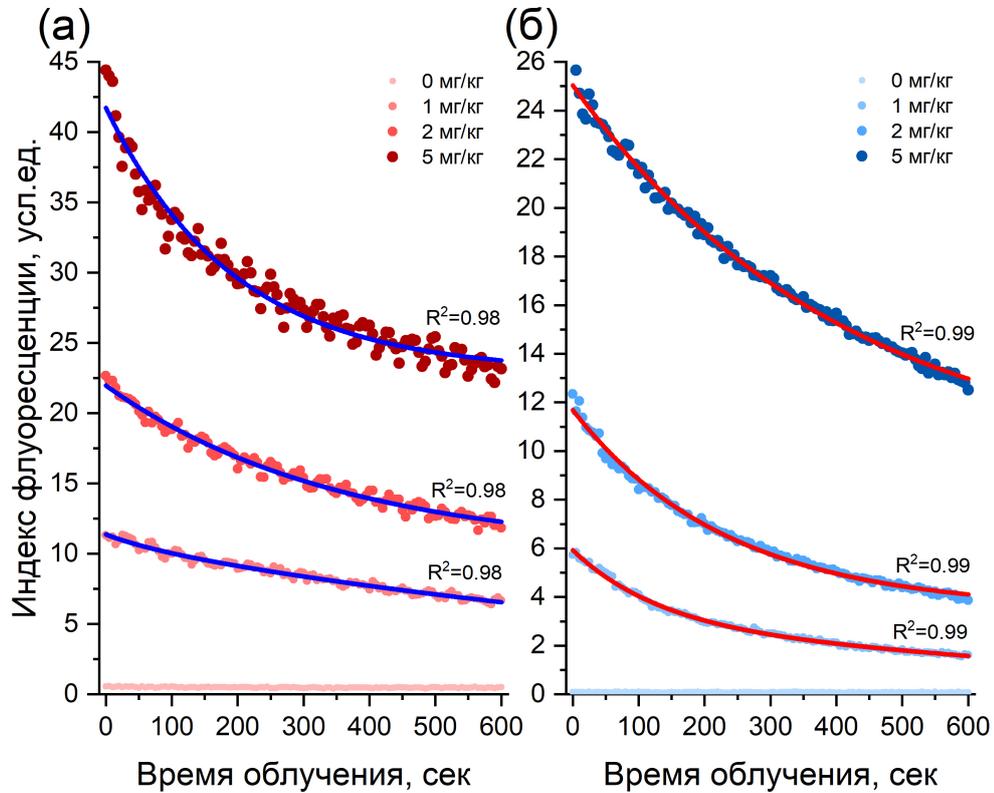


Рисунок 3.14 – Распределение индексов флуоресценции в процессе лазерного облучения оптических фантомов, содержащих ФС в концентрации 0, 1, 2 и 5 мг/кг: (а) фантомы с РрIX, $\lambda_{exc}=635$ нм; (б) фантомы с Себ, $\lambda_{exc}=660$ нм.

Полученные зависимости фотобликинга ФС в процессе лазерного воздействия были аппроксимированы экспоненциальной функцией:

$$IF(t) = A \cdot e^{\frac{t}{\tau}} + \text{const} = A \cdot e^{-kt} + \text{const} \quad (3.6)$$

где $IF(t)$ - индексы флуоресценции в процессе облучения; A - коэффициент аппроксимации; t - время облучения; $k = 1/\tau$ - скорость фотобликинга ФС. Следует учитывать, что в клинической практике фотобликинг РрIX и Себ не может быть описан одной экспоненциальной функцией, однако в оптических фантомах без форменных элементов крови изменение интенсивности флуоресценции может подчиняться простому экспоненциальному закону пропорциональному изменению концентрации ФС.

3.4 Интраоперационная флуоресцентная диагностика в БИК-диапазоне

Для подтверждения клинической применимости предложенного метода контроля процесса лазерного облучения с Себ и РrIX проводилась спектроскопическая диагностика с регистрацией флуоресценции в красном и БИК-диапазонах у пациентов с БКР и лейкоплакией полости рта в рамках стандартных процедур ФДТ. Перед проведением спектрально-флуоресцентной навигации проводилась лазерно-индуцированная видео-флуоресцентная визуализация границ опухоли с использованием двухканальной флуоресцентной видеосистемы. Это позволило визуально определить границы опухолей и рассчитать в выделенной зоне коэффициент контрастности флуоресценции до и после ФДТ (Рисунок 3.15).

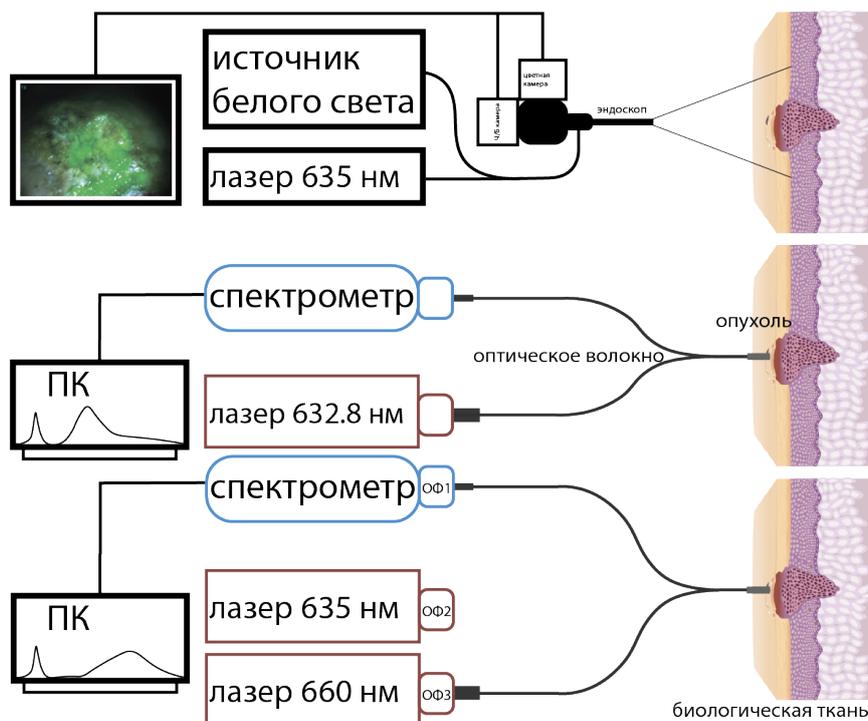


Рисунок 3.15 – Схема поэтапного проведения видео-флуоресцентной визуализации и спектроскопической флуоресцентной диагностики опухоли.

Дополнительное проведение ФД в красном диапазоне с возбуждением флуоресценции *He-Ne* источником лазерного излучения ($\lambda=632,8$ нм, $P_{max}=25$ мВт) позволило достоверно определить зоны накопления РrIX и Себ. Для фототерапии использовались, как было указано выше, полупроводниковые источники лазерного излучения с длинами волн 635 и 660 нм.

Флуоресценция 5-АЛК-индуцированного РrIX попеременно возбуждалась

в одних и тех же зонах на длинах волн 632,8 и 635 нм, а флуоресцентный сигнал регистрировался в красном и БИК-диапазонах, соответственно. ФДТ проводилась с применением того же источника лазерного излучения $\lambda = 635$ нм. Плотность мощности лазерного излучения на поверхности опухоли составляла 410 – 420 мВт/см², а плотность энергии 140 – 150 Дж/см². У пациентов с лейкоплакией полости рта до и после ФДТ в процессе видео-флуоресцентной визуализации были выявлены границы опухоли (Рисунок 3.16).

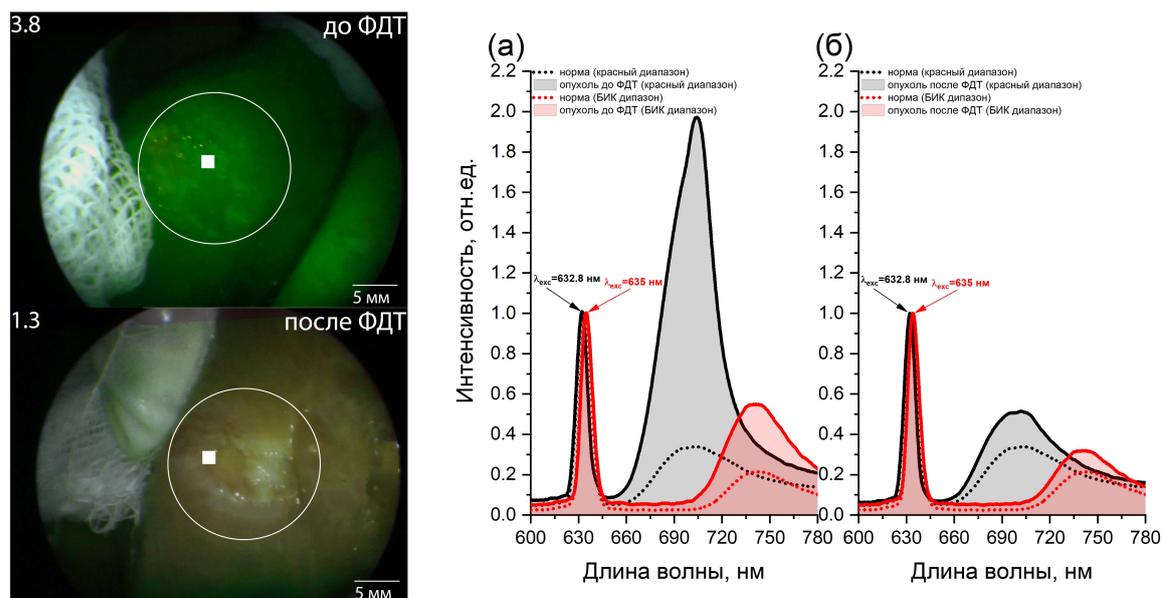


Рисунок 3.16 – Флуоресцентная визуализация опухоли пациента с лейкоплакией полости рта и результаты спектроскопической диагностики: (а) до ФДТ; (б) сразу после ФДТ.

В выявленных зонах с интенсивной флуоресценцией РrIX одновременно проводилась спектроскопическая диагностика в красном и БИК-диапазонах с регистрацией спектров флуоресценции опухоли и нормальных тканей до и после ФДТ (Рисунок 3.16а,б). На зарегистрированных спектрах наблюдался интенсивный пик флуоресценции в диапазоне 700 – 710 нм, характерный для флуоресценции РrIX. Была выявлена высокая селективность накопления РrIX в опухоли по сравнению с нормальными тканями. Спектрально-флуоресцентная диагностика в БИК-диапазоне также позволила выявить зоны с интенсивной флуоресценцией в опухоли в диапазоне длин волн 725 – 780 нм (Рисунок 3.16а).

Флуоресценция Се6, в случае фототерапии пациентов с БКР, также попеременно регистрировалась в красном и БИК-диапазонах. При проведении ФДТ плотность мощности лазерного излучения 660 нм составляла 350 мВт/см², а плотность энергии 100 – 110 Дж/см². Пациентам с БКР до и после ФДТ также

проводилась видео-флуоресцентная визуализация и были выявлены границы опухоли (Рисунок 3.17).

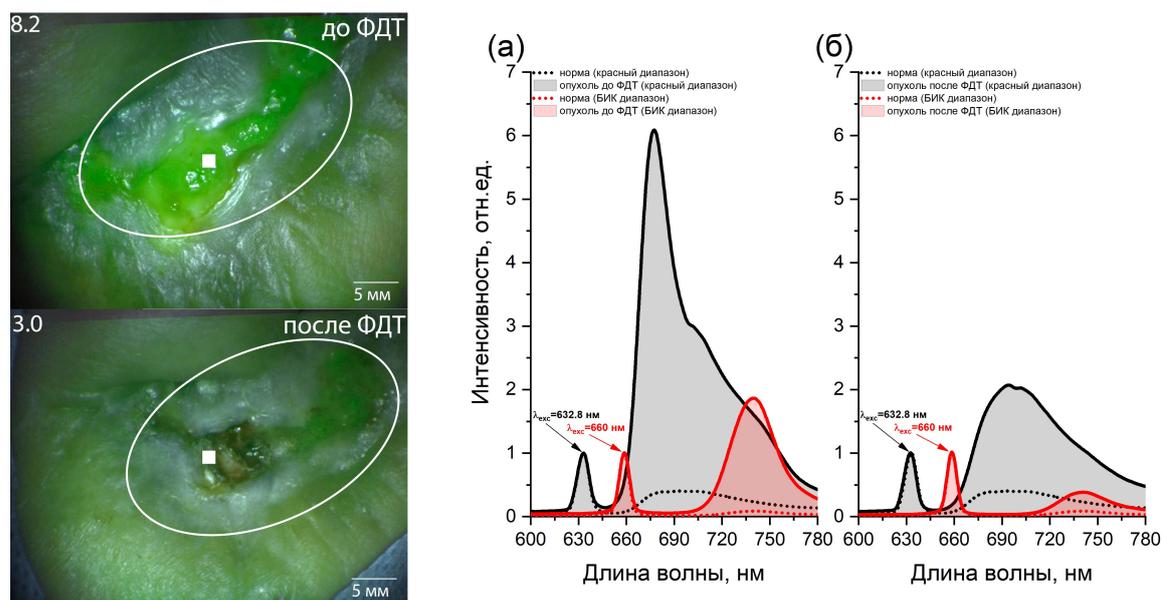


Рисунок 3.17 – Флуоресцентная визуализация опухоли пациента с БКР и результаты спектроскопической диагностики: (а) до ФДТ; (б) сразу после ФДТ.

В зонах с интенсивной флуоресценцией Себ проводилась спектроскопическая диагностика в красном и БИК-диапазонах с регистрацией спектров флуоресценции в центральной части опухоли и нормальных тканях до и после ФДТ (Рисунок 3.17а,б). На зарегистрированных спектрах наблюдался интенсивный пик флуоресценции в диапазоне 665 – 690 нм и плечо на длине волны 710 нм, характерные для флуоресценции Себ. Результаты спектроскопической диагностики в БИК-диапазоне также позволили выявить зоны с интенсивной флуоресценцией в диапазоне 725 – 780 нм.

В тканях опухоли после ФДТ наблюдалось уменьшение интенсивности флуоресценции ФС, что также подтверждалось результатами видео-флуоресцентной визуализации. На Рисунке 3.18 представлены соответствующие индексы флуоресценции ФС в исследуемых тканях пациентов с лейкоплакией полости рта (Рисунок 3.18а) и БКР кожи (рисунок 3.18б) до и после ФДТ.

У пациентов с лейкоплакией полости рта максимальная интенсивность флуоресценции РrIX наблюдалась в опухоли, а индексы флуоресценции составляли 0,18/0,8 при возбуждении флуоресценции на длинах волн 632,8/635 нм. Значения индексов флуоресценции нормальной ткани составляли 0,01/0,35.

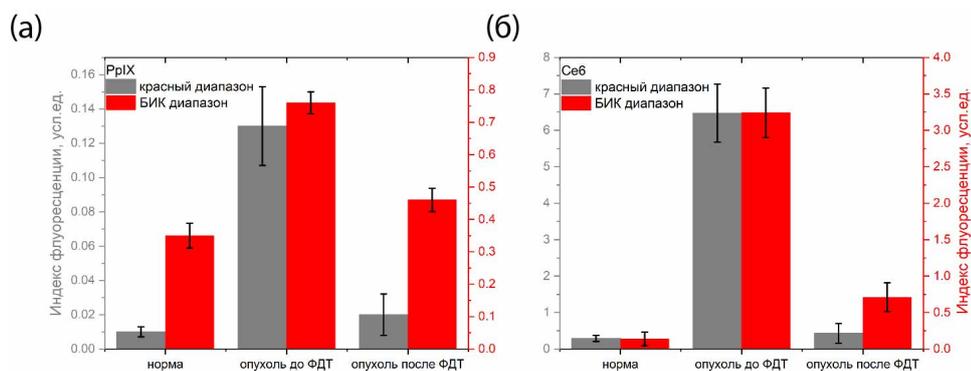


Рисунок 3.18 – Распределение индексов флуоресценции до и после ФДТ: (а) лейкоплакия полости рта с накоплением 5-АЛК индуцированного RrIX; (б) БКР с накоплением Се6.

В случае пациентов с БКР кожи при возбуждении флуоресценции Се6 на длинах волн 632,8/660 нм максимальная интенсивность флуоресценции в обоих случаях наблюдалась в опухоли с индексами флуоресценции 6,47/3,24. Значения индексов флуоресценции нормальной ткани составляли 0,29/0,14.

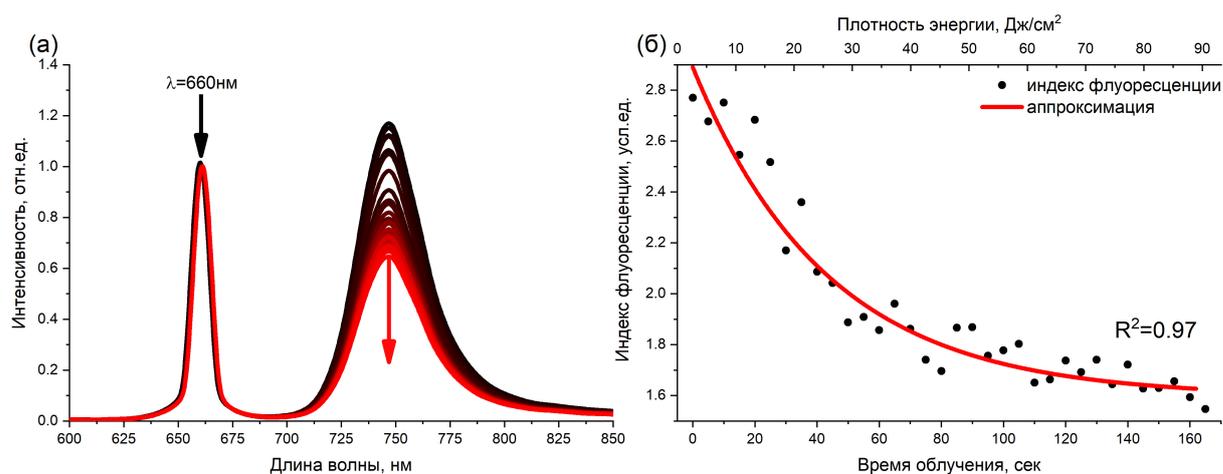


Рисунок 3.19 – Спектроскопический контроль ФДТ опухоли в процессе лазерного облучения: (а) спектральная информация; (б) распределение индексов флуоресценции.

Разработанный метод, обеспечивающий контроль фотобликинга ФС в БИК диапазоне, также использовался непосредственно в процессе проведения ФДТ опухоли с Се6. В случае ФДТ пациентов с применением 5-АЛК индуцированного RrIX флуоресцентная навигация в процессе лазерного облучения не проводилась, в связи с труднодоступностью опухолевого очага и необходимости прерывания лазерного воздействия. На Рисунке 3.19 представлены примеры регистрируемых спектров и распределения изменяющихся в процессе лазерного воздействия индексов флуоресценции опухоли с накоплением Се6.

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

$$IF(t) = A_1 \cdot e^{-k_1 t} + A_2 \cdot e^{-k_2 t} + \text{const} \quad (3.7)$$

где $IF(t)$ - индексы флуоресценции, A_1, A_2 - коэффициенты аппроксимации; t - время облучения; k_1, k_2 - скорости фотобликинга ФС. В процессе ФДТ в опухоли наблюдался фотобликинг ФС, что подтверждалось результатами видеофлуоресцентной визуализации и спектрально-флуоресцентной диагностики. Таким образом регистрация длинноволнового плеча флуоресценции РrIX и Себ в БИК-диапазоне позволяет контролировать ФДТ не прерывая процесса лазерного облучения, за счет оценки фотобликинга ФС.

Неоднородность фотобликинга ФС в тканях опухоли может объясняться разницей в послойном распределении ФС в облучаемом объеме ткани и, следовательно, разным изменением его профиля по глубине [143]. При оценке уровня фотобликинга ФС методами ФД следует учитывать, что регистрируемый сигнал флуоресценции усредняется по всей глубине воздействия лазерного излучения. Применение источников света в красном диапазоне обеспечивает большую глубину фотодинамического воздействия в сравнении с источниками в синем или зеленом диапазоне. Как отмечалось ранее, применение разных источников света позволяет определить распределение ФС в опухоли по глубине. Проведенные авторами [144] исследования с возбуждением флуоресценции РrIX в красном диапазоне выявили значительно больший сигнал флуоресценции из более глубоких тканей по сравнению с возбуждением флуоресценции РrIX в диапазоне длин волн 400 – 532 нм, а источник света с $\lambda=633$ нм обеспечивает наибольший фотобликинг РrIX на глубине более 1 мм. В случае опухолей с Себ применение источников 660 нм также обеспечивает получение большего сигнала флуоресценции ФС в сравнении и источником 405 нм [145]. В данном случае, по результатам моделирования ММК, было получено, что при облучении на длине волны 405 нм основной фотодинамический эффект наблюдается на глубине до 0,5 мм, в то время как при длине волны 660 нм эта величина составит порядка 2 мм.

Согласно исследованию [146] между уровнем фотобликинга ФС и фотодинамической эффективностью наблюдается положительная корреляция. Фотобликинг Себ при относительно низких концентрациях уменьшается по экспоненциальному закону с интенсивностью примерно пропорциональной concentra-

ции ФС [41], что также наблюдается в полученных результатах на оптических фантомах (Рисунок 3.14б). В процессе лазерного облучения опухоли наблюдалось двухэкспоненциальное уменьшение интенсивности флуоресценции Себ (Рисунок 3.19б). ФС на основе Себ являются препаратами преимущественно сосудистого типа, которые могут вызывать полное тромбирование кровеносных сосудов в зоне лазерного воздействия [147], что ограничивает доступ гемоглобина и вызывает «осветление» тканей с последующим выраженным некрозом опухоли [72].

Нами дополнительно оценивалось изменение интенсивностей диффузно рассеянного лазерного излучения и флуоресценции Себ в процессе ФДТ с плотностью мощности лазерного излучения $\lambda_{exc}=660$ нм на поверхности тканей 565 мВт/см² (Рисунок 3.20).

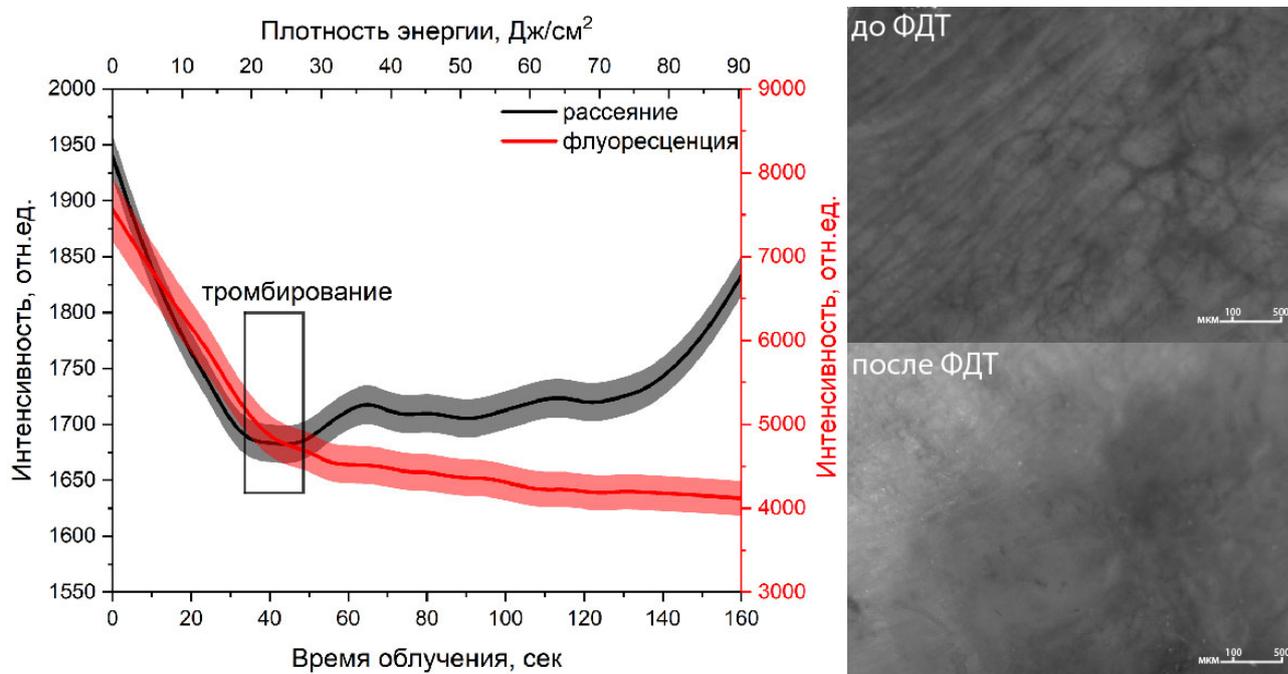


Рисунок 3.20 – Распределение интенсивностей диффузно отраженного лазерного излучения и флуоресценции Себ и результаты видео-капилляроскопии опухоли до и после ФДТ.

Оптические свойства биологических тканей обусловлены изменениями ее физиологических параметров: содержания крови (кровенаполненности), степени оксигенации, содержания и перемещения воды [148]. 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, насыщение кислородом которой в среднем составляет 97%, а венозной – 75%. В артериальных сосудах быстрый

кровоток снижает концентрацию плазменных коагуляционных факторов, поэтому в тромбогенезе ведущую роль играют тромбоциты, которые за короткое время ($t < 5$ мин) прилипают к месту повреждения и вместе с лейкоцитами образуют «белый тромб». Позднее в нем откладывается фибрин, в нитях которого застревают эритроциты и образуется «красный тромб». Пока к зоне облучения поступала кровь, наблюдался быстрый фотобличинг Себ, за счет поступления оксигенированной формы гемоглобина (Рисунок 3.20). Ранее было обнаружено, что реакция переноса электрона между молекулой Себ в триплетном состоянии T_1 и молекулами кислорода 3O_2 является основным механизмом фотобличинга Себ [41]. Одновременно наблюдалось уменьшение интенсивности диффузно отраженного лазерного излучения, что связано со скоростью потребления кислорода в процессе ФДТ, так как поглощение дезоксигенированной формы гемоглобина в диапазоне длин волн 600-700 нм примерно в 10 раз больше, чем оксигенированной формы [6]. Таким образом, когда произошло полное тромбирование кровеносных сосудов скорость фотобличинга ФС уменьшилась, а за счет увеличения плотности тканей увеличилась интенсивность диффузно рассеянного лазерного излучения. Тромбирование сосудистой системы тканей при ФДТ также было подтверждено результатами видео-капилляроскопии (Рисунок 3.20). Данные результаты демонстрируют возможность интраоперационного спектроскопического контроля процесса тромбирования кровеносных сосудов, непосредственно в процессе ФДТ. Следует отметить, что итоговый цитотоксический эффект ФДТ зависит от уровня исходной концентрации ФС, содержания молекулярного кислорода в опухолевой ткани, а также длины волны, плотности мощности и плотности энергии лазерного излучения. При этом наличие остаточных опухолевых клеток в области проведения терапии, вследствие недостаточного облучения, обычно считается одним из самых сильных предикторов рецидива и продолженного роста опухоли.

3.5 Метод спектроскопического комбинированного контроля фотодинамического воздействия в процессе лазерного облучения

Существующие системы оценки оптимальных энергетических доз фотодинамического воздействия методами ФД, в большинстве случаев, предполагают

использование, помимо терапевтического лазера для ФДТ, отдельного источника света для диагностики, которые можно использовать попеременно, т.е. применяется интегральный подход фототераностики, когда достаточность фотодинамического воздействия оценивается только до и после ФДТ [149]. Недостатками данных систем являются отсутствие возможности одновременного интраоперационного контроля фотобличинга ФС, оксигенации и изменяющихся в процессе светового воздействия оптических свойств биологических тканей. Так, если в процессе ФДТ к тканям не будет непрерывно подаваться кислород, эффективность дальнейшей терапии может быть ограничена, поэтому важно последовательно контролировать уровень оксигенации тканей непосредственно в процессе светового воздействия, что может иметь решающее значение для проведения эффективной ФДТ. Ранее был предложен метод анализа биологических тканей с одновременным количественным определением таких параметров, как кровенаполнение, уровень оксигенации гемоглобина, накопление ФС и изменение рассеивающих свойств [6, 125]. Данный метод включает регистрацию спектров диффузного отражения и флуоресценции ФС с применением волоконно-оптических зондов и двух отдельных источников лазерного излучения для ФД и ФДТ. Данный подход не позволял проводить спектроскопический контроль ФДТ в процессе лазерного облучения, поэтому диагностика проводилась только в момент прерывания фотодинамического воздействия. Тогда как при ФДТ является важным наличие информации о скорости запускаемых процессов в биологических тканях в начале облучения, таких как фотобличинг ФС, нарушение целостности клеток, насыщенности кислородом облучаемых тканей или скорости утилизации кислорода. Поэтому, на основе предложенных методов, нами был разработан спектроскопический метод комбинированного контроля эффективности ФДТ, обеспечивающий одновременную оценку степени оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном русле и уровня кровенаполненности, изменения интенсивности флуоресценции ФС в БИК-диапазоне и изменения интенсивности диффузно рассеянного лазерного излучения. Регистрация спектроскопических сигналов проводилась с экспозицией 20 – 50 мс и временным интервалом регистрации спектров 3 – 5 сек, непосредственно в процессе лазерного облучения с применением одного источника лазерного излучения, который одновременно используется для ФД и ФДТ. Схема экспериментальной установки приведена на Рисунке 3.21.

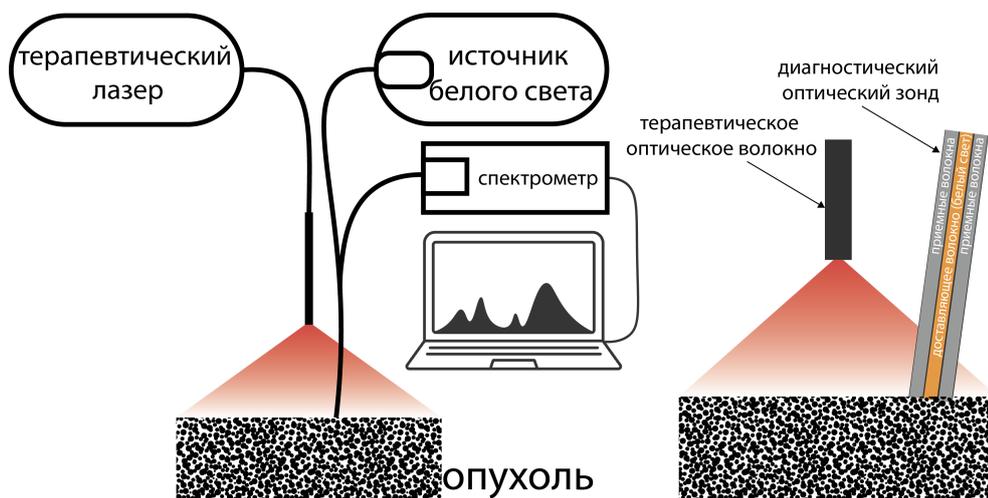


Рисунок 3.21 – Схема проведения спектроскопического комбинированного контроля фотодинамического воздействия на биологические ткани.

Флуоресценция ФС возбуждалась полупроводниковым источником лазерного излучения ($\lambda=660\pm 5$ нм, $P_{max}=2$ Вт), что позволяло создавать плотности мощности на поверхности тканей до 1000 мВт/см². Лазерное излучение к биологическим тканям доставлялось с использованием оптического волокна с сердцевинной диаметром 600 мкм и $NA=0,22$. Диаметр зоны облучения варьировался от 1 до 5 см. Торцев диагностического оптоволоконного зонда устанавливался на поверхности облучаемых тканей в «мягком контакте». Неоднородность распределения света на поверхности биологических тканей не превышала 10% .

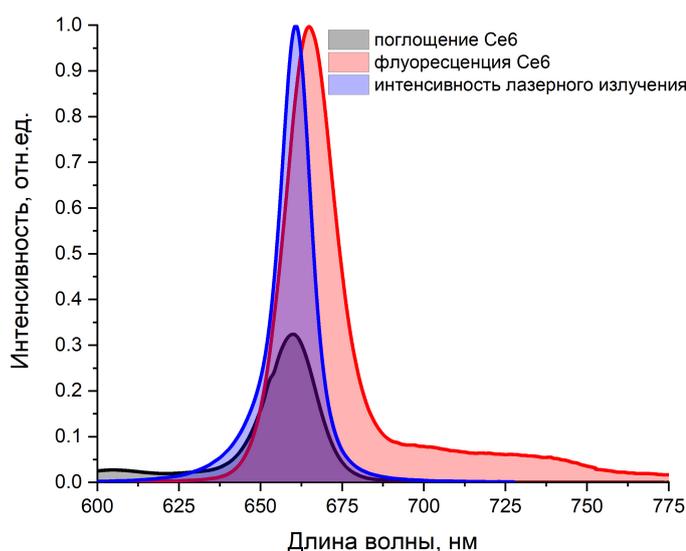


Рисунок 3.22 – Спектры поглощения и флуоресценции Себ и спектр излучения полупроводникового лазера с длиной волны генерации 660 нм.

Сложность спектрально-флуоресцентного контроля фотоблинка Себ непосредственно в процессе ФДТ связана с тем, что максимум флуоресценции ФС

хлоринового ряда при 665 нм имеет стоксов сдвиг на 4-5 нм относительно пика Q-полосы поглощения в красном диапазоне спектра, а также вследствие того, что спектральная ширина полупроводниковых источников лазерного излучения составляет порядка 10 нм. (Рисунок 3.22).

Для решения данной проблемы были проведены исследования на оптических фантомах, в процессе которых были подобраны оптические фильтры. Конфигурация узкополосного фильтра, установленного перед спектрометром позволяла в одном динамическом диапазоне одновременно регистрировать диффузно отраженный свет источника белого света ($\lambda = 400 - 600$ нм), диффузно рассеянное лазерное излучение ($\lambda = 650 - 670$ нм) и длинноволновое плечо флуоресценции Се6 ($\lambda = 725 - 800$ нм). Перед входом спектрометра был установлен оптический фильтр с коэффициент подавления более чем 10^4 в спектральной области 640 – 680 нм (Рисунок 3.23).

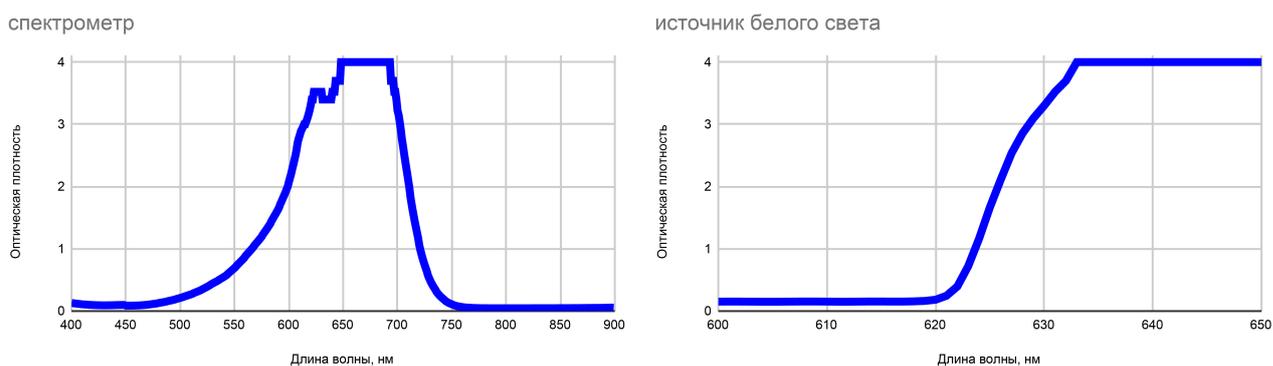


Рисунок 3.23 – Спектры оптической плотности фильтров установленных перед спектрометром и источником белого света.

Экспериментально было подтверждено, что при включенном источнике белого света и выключенном лазерном источнике уровень оксигенации остается на одном уровне, а интенсивность сигнала флуоресценции ФС сравнима с шумами. Спектральные данные, регистрируемые в процессе комбинированного контроля лазерно-индуцированного фотодинамического воздействия, представлены на Рисунке 3.24.

В области длин волн 450 – 620 нм представлен спектр ОДО без нормировки на спектр от источника белого света. Интенсивный пик на длине волны 660 нм представляет собой диффузно рассеянное лазерное излучения, а пик в диапазоне длин волн 725 – 800 нм представляет собой спектр флуоресценцию Се6, скорректированный в БИК-диапазоне оптическим фильтром.

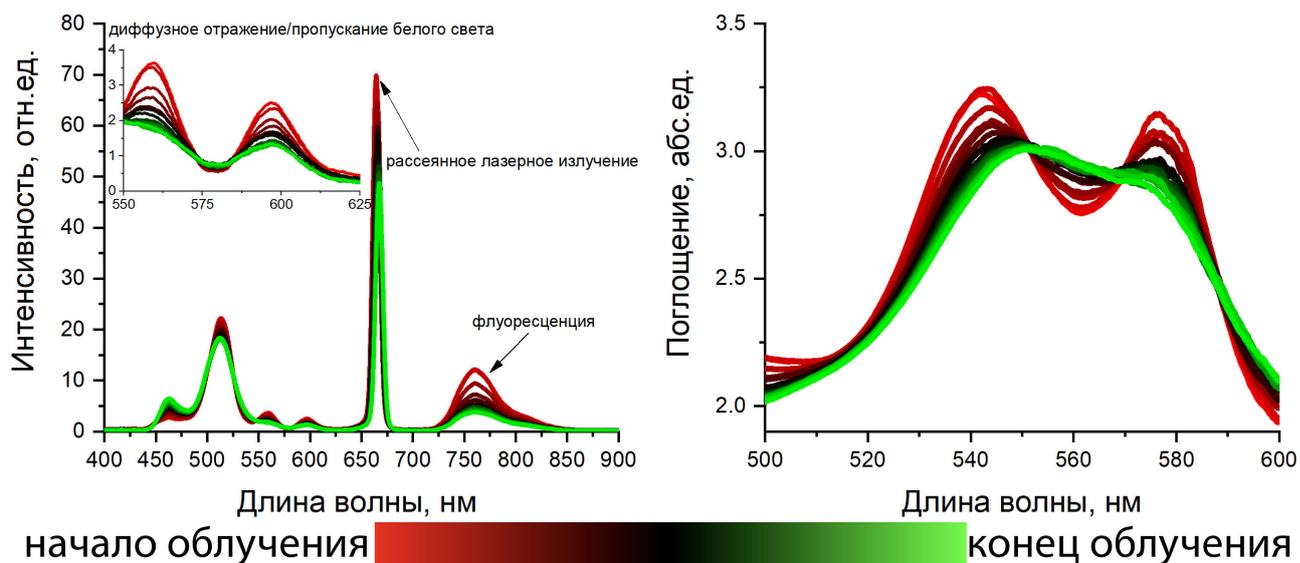


Рисунок 3.24 – Спектроскопический комбинированный контроль лазерно- индуцированного фотодинамического воздействия: (а) диффузно отраженные белый свет и лазерное излучение, а также флуоресценция Себ в БИК-диапазоне; (б) поглощение гемоглобина.

Из Рисунка 3.24 видно, что в процессе лазерного облучения «двугорбый» спектр поглощения, соответствующий HbO_2 , трансформируется в «одногорбый», соответствующий Hb . Метод расчета количественного значения уровня оксигенации гемоглобина приведен в **пункте 2.6**.

Модификация установки для спектроскопического контроля состояния биологических тканей в процессе фотодинамического воздействия позволила провести лабораторные исследования фотодинамической активности Себ. Схема модифицированной экспериментальной установки приведена на Рисунке 3.25.

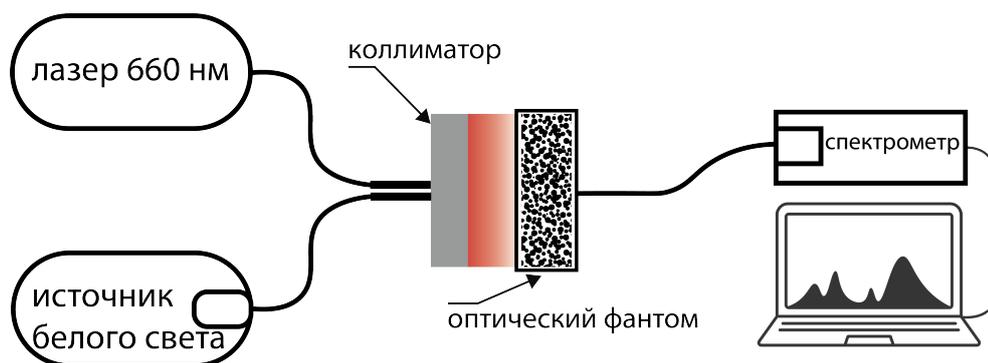


Рисунок 3.25 – Схема экспериментальной установки для исследования фотодинамической активности ФС.

В данном случае световое облучение оптических фантомов, содержащих ФС и эритроциты, белым светом и лазерным излучением проводилось напросвет. Равномерность облучения обеспечивалась установкой коллиматора перед

доставляющими кварцевыми оптическими волокнами с сердцевинной диаметром 600 мкм, что позволяло получить параллельный пучок света.

3.6 Спектроскопический комбинированный контроль лазерного облучения оптических фантомов

С помощью разработанного метода спектроскопического контроля эффективности фототераностики были проведены исследования с применением оптических фантомов, содержащих различные концентрации Себ. В исследованиях использовалась эритроцитарная масса человека с добавлением гепарина, предоставленная банком крови Сеченовского университета. Процентное содержание эритроцитарной массы от общего объема оптических фантомов составляло $\sim 10\%$. Эритроцитарная масса растворялась в физрастворе (натрия хлорид 0,9%). В качестве ФС использовался Фотолон®. Себ добавлялся в фантом в концентрациях 0,5 – 50 мг/л. Исследования на оптических фантомах проводились в кварцевых кюветах толщиной 0,1 см и шириной 1 см. Объем фантомов составлял 125 мкл. В процессе светового воздействия кювета герметично запечатывалась для избежания диффузии кислорода в среду.

Так как основными рассеивающими центрами в оптических фантомах были целые эритроциты, то по величине интенсивности диффузно рассеянного лазерного излучения можно было характеризовать процессы, происходящие с эритроцитами в процессе лазерного облучения [7]. В начале лазерного облучения в оптических фантомах может наблюдаться временное гиперосмотическое разбухание эритроцитов и, соответственно, увеличение интенсивности рассеяния, вследствие увеличения размеров рассеивающих частиц. В дальнейшем происходит разрушение мембран эритроцитов с выбросом гемоглобина, вследствие атаки АФК. Также следует учитывать, что уменьшение интенсивности рассеянного лазерного излучения ($\lambda = 650 - 670$ нм) происходит из-за дезоксигенации гемоглобина, поглощение которого увеличивается в области 660 нм.

Дальнейшее разрушение эритроцитов способствует увеличению интенсивности диффузно прошедшего лазерного излучения из-за уменьшения концентрации рассеивающих центров (эритроцитов). По одновременно регистрируемым в процессе ФДТ спектрам флуоресценции Себ в диапазоне длина волн 725 – 800 нм и спектрами поглощения в диапазоне длин волн 500 – 600 нм можно опре-

делять скорости фотобликинга ФС и дезоксигенации гемоглобина.

Были проведены сравнительные исследования комбинированного контроля лазерно-индуцированного фотодинамического воздействия с применением оптических фантомов, содержащих различные концентрации Себ. Плотность мощности лазерного излучения ($\lambda_{exc} = 660$ нм) на поверхности фантома составляла 173 ± 5 мВт/см², а плотность мощности белого света - 11 ± 3 мВт/см² (Рисунок 3.26).

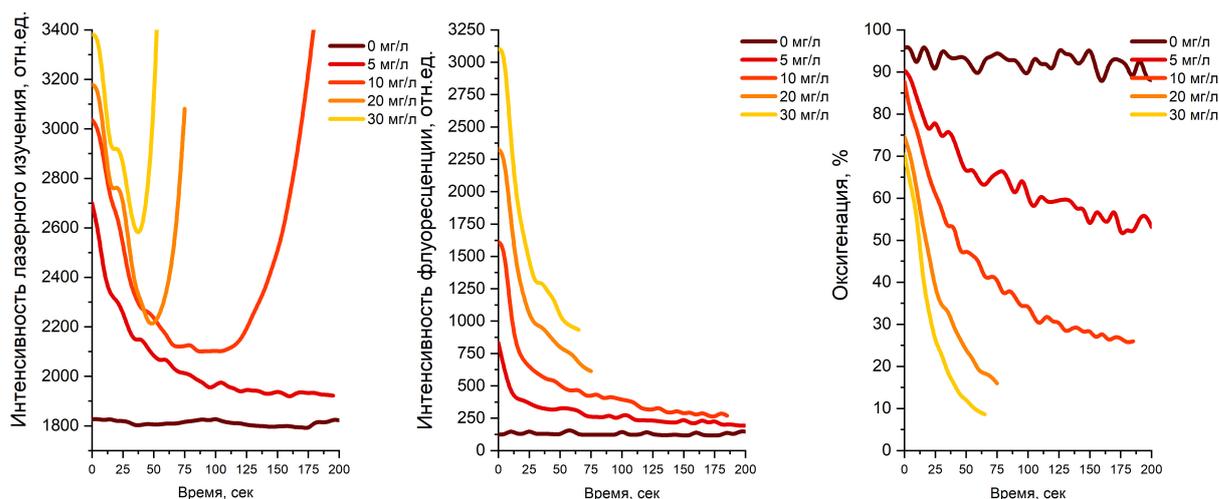


Рисунок 3.26 – Распределения интенсивностей диффузного пропускания лазерного излучения, флуоресценции Себ и оксигенации гемоглобина в процессе лазерного облучения. Концентрации Себ - 5, 10, 20 и 30 мг/л. Временной интервал регистрации спектров - 5 сек.

На 20 – 25 сек после начала облучения наблюдалось временное гиперосмотическое разбухание эритроцитов. В дальнейшем, с увеличением концентрации Себ до 10 – 30 мг/л, наблюдалось увеличение интенсивности диффузного пропускания лазерного излучения из-за разрушения эритроцитов и, соответственно, уменьшения количества рассеивающих частиц в среде. Также, с увеличением концентрации Себ наблюдалось увеличение скорости дезоксигенации гемоглобина и фотобликинга Себ. Процесс фотобликинга Себ происходил по двухэкспоненциальному закону (Рисунок 3.27).

Представленные результаты демонстрируют, что потребление кислорода в данном случае минимально, при этом фотобликинг Себ на уровне 50% достигался на 30 сек (~ 5 Дж/см²) при концентрации 2 мг/л и 18 сек (~ 3 Дж/см²) при концентрации 5 мг/л. Ранее отмечалось, что основным механизмом фотобликинга Себ является реакция взаимодействия молекулы Себ в состоянии T₁ с молекулярным кислородом в основном состоянии ³O₂ [41].

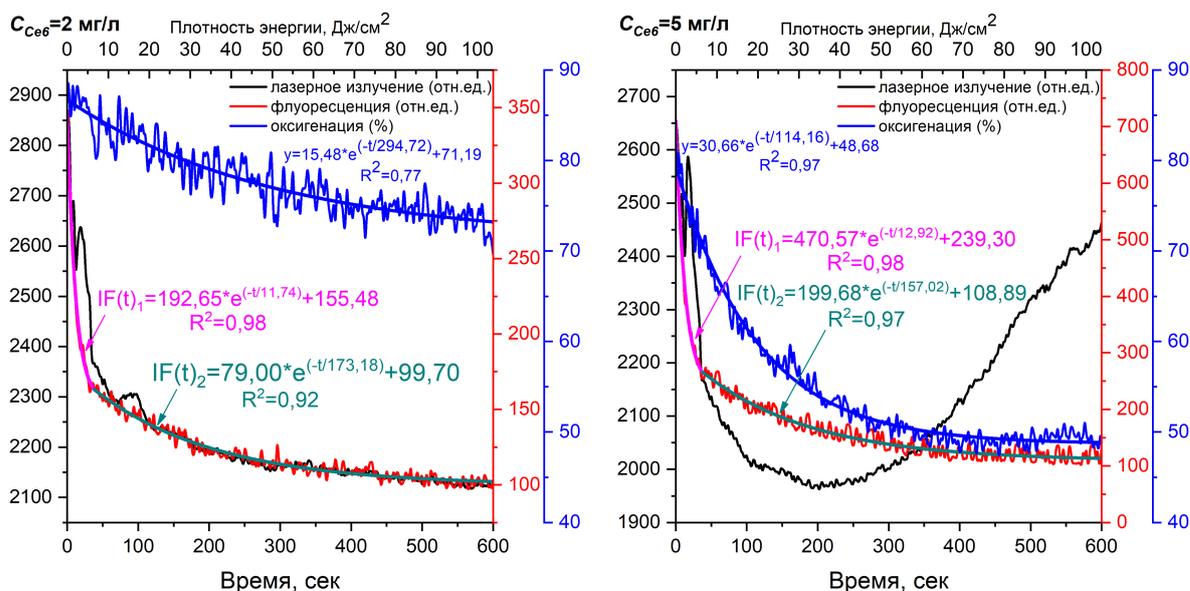


Рисунок 3.27 – Распределения интенсивностей диффузного пропускания лазерного излучения, флуоресценции Себ и оксигенации гемоглобина.

В процессе ФДТ с применением Себ могут происходить изменения спектров поглощения, что свидетельствует о фотомодификации и/или образовании фотопродуктов [150]. Процессы фотобличинга ФС и образования фотопродуктов оказывают значительное влияние на эффективность ФДТ. Авторы [151] выявили, что при облучении Себ, растворенного в натрий-фосфатном буфере, лазерным излучением $\lambda=630$ нм одновременно с фотобличингом Себ наблюдается образование фотопродуктов с полосой поглощения при 668 нм, цитотоксичность и фотостабильность которых была почти вдвое выше.

В процессе лазерного облучения, несмотря на быстрый фотобличинг Себ наблюдалась дезоксигенация гемоглобина. В случае, когда концентрация Себ составляла 5 мг/л на 200 сек облучения наблюдался лизис эритроцитов. Фотобличинг ФС в данном случае продолжался, однако скорость данного процесса k ($k_{IF_1}=0,085$ и $k_{IF_2}=0,005$ при концентрации Себ - 2 мг/л; $k_{IF_1}=0,077$ и $k_{IF_2}=0,006$ при концентрации Себ - 5 мг/л) в среднем уменьшалась в 14 раз.

3.7 Интраоперационный спектроскопический комбинированный контроль лазерного облучения

Представленный комбинированный спектроскопический метод контроля фотодинамического воздействия был апробирован на пациентах. Спустя 3 часа по-

сле внутривенного капельного введения раствора ФС в концентрации 1 мг/кг до ФДТ, пациентам проводилась видео-флуоресцентная визуализация границ сенсibilизированных тканей опухоли (Рисунок 3.28). Выявленные зоны подвергались фотодинамическому воздействию. Торец диагностического Y-образного оптоволоконного зонда устанавливался в «мягком контакте» на поверхности опухоли.

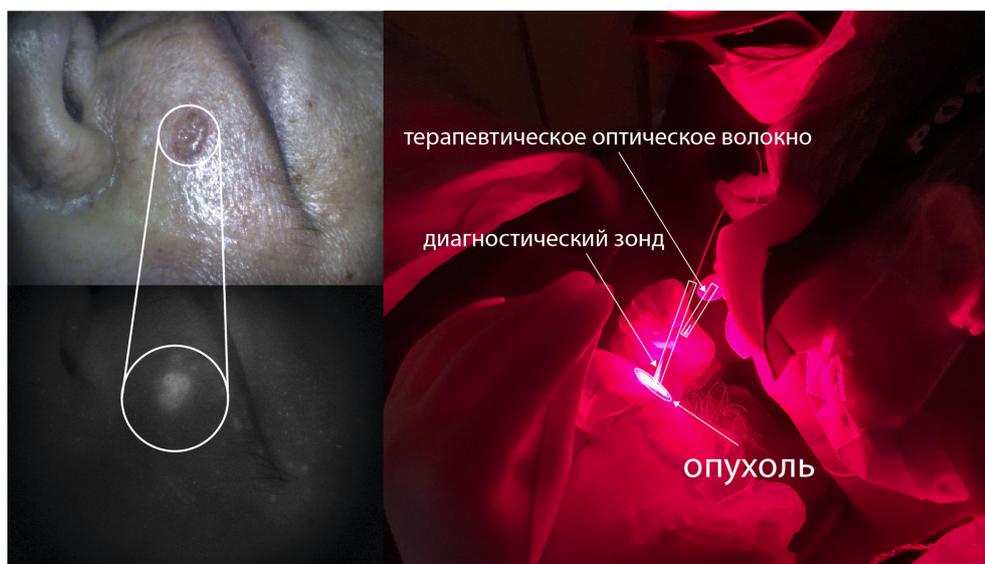


Рисунок 3.28 – Интраоперационный процесс фототерапии с комбинированным спектроскопическим контролем и видео-флуоресцентной визуализации опухоли.

Специальное программное обеспечение на персональном компьютере позволяло в режиме реального времени в процессе ФДТ обрабатывать регистрируемые с временным интервалом 3 – 5 сек спектры и рассчитывать: уровень оксигенации гемоглобина, интегральные интенсивности диффузно рассеянного лазерного излучения в диапазоне 655 – 675 нм и флуоресценции Себ в БИК диапазоне 725 – 800 нм. Плотность мощности лазерного излучения на поверхности опухоли в разных случаях может варьироваться и составлять 50-800 мВт/см². Суммарная плотность энергии в зоне облучения составляла 50 – 200 Дж/см². Фотодинамическое воздействие прекращалось при достижении фотоблинка ФС на уровне более 70% и оксигенации тканей на уровне 0 – 10%. В процессе лазерного облучения двугорбый спектр поглощения, соответствующий HbO_2 с максимумами при 542 и 576 нм, трансформировался в одногорбый с максимумом при 540 ± 5 нм, характерный для Hb . Наблюдалась селективность накопления Себ в тканях опухоли в сравнении с нормальными тканями кожи пациентов. По результатам спектроскопической диагностики отмечалась селек-

тивность накопления Себ в опухоли по сравнению с нормальными тканями. При этом выделялись случаи с высоким уровнем накопления Себ (Рисунок 3.29а,в) и низким уровнем накопления Себ (Рисунок 3.29б,г) в опухоли. Низкий уровень накопления Себ преимущественно наблюдался у пациентов, которым проводилась повторная процедура ФДТ. На Рисунке 3.29 представлены результаты спектроскопического комбинированного контроля лазерно-индуцированного фотодинамического воздействия в процессе лазерного облучения опухоли.

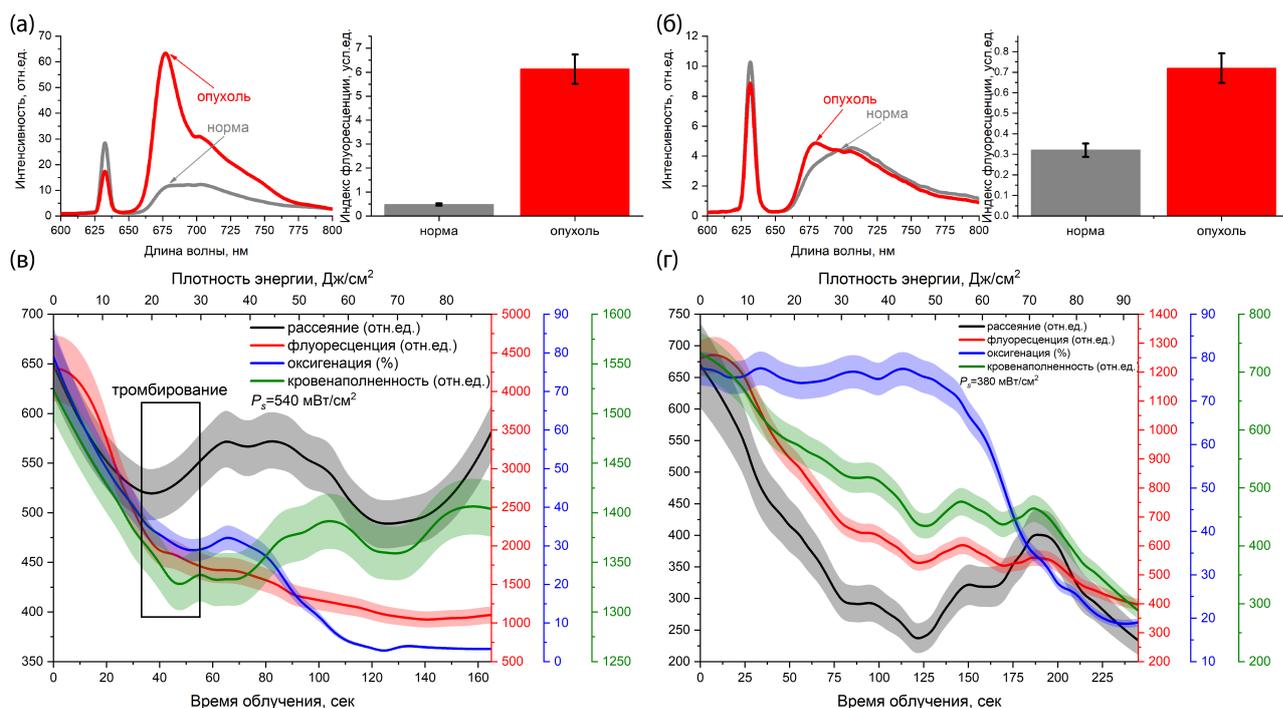


Рисунок 3.29 – Спектроскопический комбинированный контроль фототерапии опухоли: (а,б) спектроскопическая диагностика до ФДТ, $\lambda_{exc}=632,8$ нм; (в,г) распределения интенсивностей диффузно рассеянного лазерного излучения (650–670 нм), флуоресценции Себ (725–800 нм), уровня оксигенации гемоглобина и кровенаполненности опухоли (520–590 нм) в процессе лазерного облучения.

В начале светового облучения наблюдалось резкое уменьшение интенсивности флуоресценции Себ и оксигенации тканей, связанное с утилизацией молекулярного кислорода, так как основным цитотоксическим агентом при ФДТ является синглетный кислород. В процессе ФДТ скорость фотоблисинга Себ уменьшалась. Интенсивность обратно рассеянного лазерного излучения в начале терапии также резко уменьшалась, что преимущественно было связано с переходом гемоглобина из окси формы в дезоксигенированную, коэффициент поглощения которого значительно больше на длине волны 660 нм [94].

В случае с высоким уровнем накопления Себ в процессе ФДТ интенсивность

диффузно отраженного лазерного излучения в определенный момент времени начинала увеличиваться, а скорость фотобличинга ФС уменьшаться, в связи с полным тромбированием сосудистой системы в облучаемой зоне и, соответственно, увеличением плотности тканей [77]. Как отмечалось ранее, Себ может вызывать полное тромбирование кровеносных сосудов в зоне лазерного воздействия [147]. Пока к опухоли поступала кровь, наблюдался быстрый фотобличинг Себ за счет притока оксигемоглобина, что подтверждалось результатами оценки кровенаполненности. В случае с низким накоплением Себ, уровень оксигенации гемоглобина в начале облучения оставалась на одном уровне. При этом интенсивности диффузно отраженного лазерного излучения и кровенаполненности уменьшались, что может быть связано с временным сосудистым сужением и, вследствие этого, «просветлением» облучаемых биологических тканей.

Кинетика фотобличинга Себ в оптических фантомах, содержащих эритроцитарную массу хорошо согласуется с результатами, полученными при ФДТ опухоли и не соответствует результатам, полученным на фантомах только на основе жировой эмульсии, что свидетельствует преимущественному взаимодействию молекул Себ с мембранами эритроцитов (Рисунок 3.30).

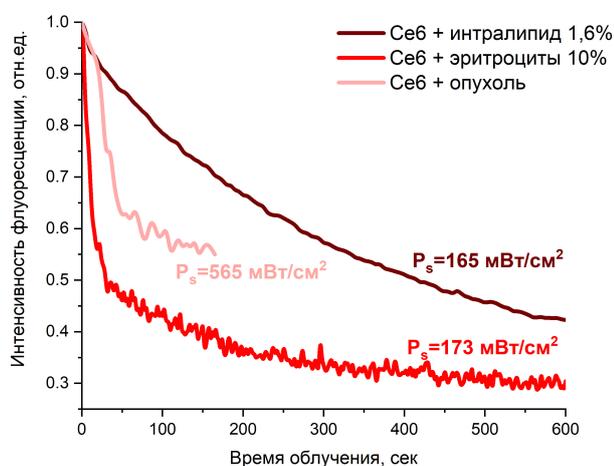


Рисунок 3.30 – Распределение интенсивностей флуоресценции в процессе лазерного облучения фантома на основе жировой эмульсии, эритроцитарной массы и опухоли.

Таким образом, спектроскопический комбинированный метод контроля лазерно - индуцированного фотодинамического воздействия на биологические ткани демонстрирует возможность спектрально-флуоресцентного контроля фотобличинга Себ, оксигенации гемоглобина и процесса тромбирования кровеносных сосудов непосредственно в процессе лазерного воздействия, что позволяет персонализировать энергетические дозиметрические параметры ФДТ.

Заключение к главе 3

Показана возможность флуоресцентной навигации концентрационного распределения PrIX и Себ в тканях опухоли за счет регистрации длинноволнового плеча флуоресценции в БИК диапазоне ($\lambda = 725-800$) нм с возбуждением флуоресценции ФС в красной Q-полосе поглощения ФС. Данный подход позволяет снизить вклад эндогенной флуоресценции тканей в регистрируемый сигнал и, тем самым, увеличить специфичность обнаружения экзогенной флуоресценции ФС. Использование одного источника лазерного излучения ($\lambda=635$ нм в случае применения PrIX и $\lambda=660$ нм в случае применения Себ), который одновременно используется для ФД и ФДТ (фототераностики) обеспечивает проведение спектроскопического контроля изменения интенсивности флуоресценции ФС в процессе лазерного облучения.

Метод спектроскопического контроля эффективности фототераностики в БИК-диапазоне был верифицирован на серии оптических фантомов и тканях опухоли, содержащих PrIX и Себ. Данный метод позволяет проводить флуоресцентную навигацию не прерывая фотодинамического воздействия с плотностью мощности лазерного излучения $50 - 800$ мВт/см². Мониторинг фотобликинга ФС в режиме реального времени наиболее интересен, учитывая важную информацию, которую можно получить в начале фотодинамического воздействия. Выявлено, что при проведении ФДТ с внутривенным введением ФС на основе Себ в концентрации 1 мг/кг и временем накопления 3 – 3,5 часа в процессе лазерного воздействия наблюдается быстрое экспоненциальное уменьшение интенсивности флуоресценции Себ и дальнейшее уменьшение скорости фотобликинга ФС, что обусловлено тромбированием сосудистой системы опухоли с последующим ограничением доступа оксигемоглобина. Кинетика фотобликинга Себ в оптических фантомах, содержащих эритроцитарную массу хорошо согласуется с результатами, полученными при ФДТ опухоли и не соответствует результатам, полученным на серии оптических фантомов только на основе жировой эмульсии, что свидетельствует о преимущественном взаимодействии молекул Себ с мембранами эритроцитов.

Разработанный спектроскопический метод комбинированного контроля лазерно - индуцированного фотодинамического воздействия на ткани опухолей позволяет непосредственно в процессе лазерного облучения контролировать

концентрационное распределение ФС, кинетику изменения интенсивности флуоресценции ФС, состояние сосудистой системы облучаемых тканей, уровень оксигенации гемоглобина и уровень кровенаполненности микроциркуляторного русла. Данные показатели могут использоваться в качестве критериев оценки эффективности проводимой ФДТ. Метод обеспечивает регистрацию спектральных данных с накоплением (экспозицией) одного спектра 20 – 30 мс и временным интервалом регистрации 3 – 5 сек.

Выявлены различия в процессах фотодинамического воздействия на опухоль при разных концентрация Себ в опухоли. Внедрение в клиническую практику спектроскопического комбинированного контроля может сократить время проведения процедуры ФДТ и персонализировать время светового воздействия на разные зоны гетерогенных тканей опухолей. Таким образом, возможность проведения фототераностики опухолей с применением РrIX или Себ может увеличить преимущества ФДТ по сравнению с другими методами терапии.

Глава 4

Разработка устройства для ИК-визуализации кровеносных сосудов

В данной главе представлены результаты разработки устройства для неинвазивной ИК-визуализации кровеносных сосудов. Представлен эффективный подход к получению ИК изображений с использованием метода регистрации и анализа обратного рассеяния лазерного излучения. Определен оптимальный диапазон длин волн для ИК-визуализации кровеносных сосудов. Представлены результаты моделирования глубины зондирования лазерного излучения ММК в модели кожи человека. Представленные в данной главе подходы обеспечивают неинвазивный контроль сосудистой системы опухоли при проведении ФДТ.

4.1 Предпосылки создания устройства для визуализации кровеносных сосудов

Визуализация и анализ кровеносных сосудов являются важными задачами для медицинских целей. Сосудистые изменения в процессе лазерного воздействия сопровождаются сужением, расширением или тромбированием их просвета и сопровождаются нарушением кровообращения, что влияет на эффективность ФДТ [152]. Также визуализация кровеносных сосудов используется для проведения процедуры венопункции, которая является одной из самых распространенных медицинских процедур. В настоящее время в медицинской практике для получения изображений кровеносной системы, чаще всего, используются рентгеновская визуализация, ультразвуковое сканирование и ИК-визуализация. При этом, рентгеновская визуализация является инвазивным методом, требующим введения контрастного вещества, а ультразвуковое

сканирование требует нанесения геля на поверхность кожи, что осложняет процесс проведения процедуры. ИК-визуализация позволяют получать структурную информацию о кровеносных сосудах, а также определять локализацию их неоднородностей. В настоящее время различают два метода ИК-визуализации вен: «пропускание света» и «отражение света» (Рисунок 4.1).

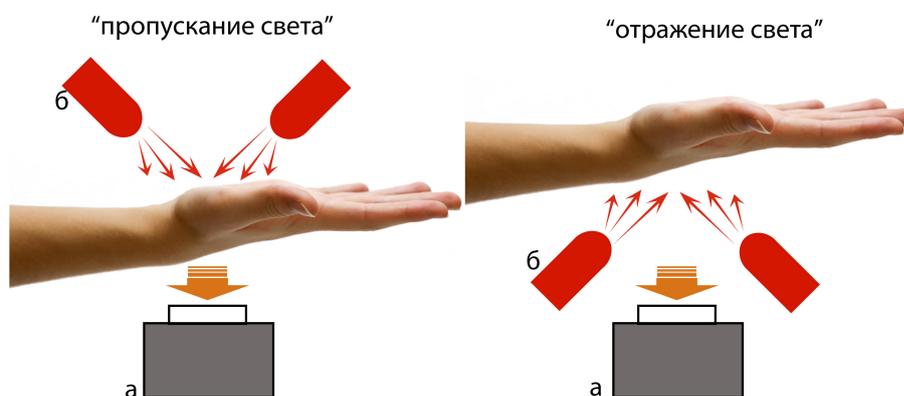


Рисунок 4.1 – Методы ИК-визуализации кровеносных сосудов: (а) камера; (б) источник лазерного излучения.

При методе отражения ИК-излучение проецируется на зону исследования спереди или по окружностям. Данный метод имеет ограничения, связанные с глубиной визуализации (до 5 мм) [153]. При методе пропускания регистрируется диффузно рассеянное ИК-излучение, которое проходит через исследуемую ткань [154, 155]. Данный метод имеет ограничения связанные с толщиной исследуемого участка тела, однако визуализация вен возможна на глубине до 15 мм. При этом, большинство из имеющихся устройств применяется лишь для визуализации кровеносных сосудов охватывающих только руки.

Также имеются разрозненные данные по выбору длины волны для получения наибольшего контраста между кровеносными сосудами и кожей (высококонтрастных изображений) при ИК-визуализации. В работах [154] для визуализации методом пропускания использовались светодиоды с длиной волны 850 нм, а перед камерой устанавливался фильтр 800 нм, тогда как авторы [155] использовали фильтр на 750 нм. При этом в работе [156] наибольшая контрастность кровеносных сосудов относительно остальной ткани наблюдалась в диапазоне от 850 до 900 нм. В работе [153] при визуализации методом отражения было выявлено, что лучшие изображения получаются на длине волны 800 нм, тогда как авторы [157] указывают, что наибольшая контрастность кровеносных сосудов относительно остальной ткани наблюдается на длине волны 850 нм.

Следовательно было необходимо проведение исследования для выявления оптимального диапазона длин волн для высококонтрастной ИК-визуализации. Также, существует потребность в устройстве для ИК-визуализации кровеносных сосудов на любом выбранном участке тела, которая позволит контролировать состояние сосудистой системы тканей при проведении ФДТ или диагностировать сосудистые патологии.

4.2 Устройство для ИК-визуализации кровеносных сосудов

Построение 3D модели осуществлялось в комплексном облачном инструменте для промышленного дизайна и машиностроительного проектирования - Autodesk Fusion 360. Каркас устройства состоит из 2 составных элементов: основания, для фиксации оптических волокон, объектива, камеры и внешнего корпуса, для защиты внутренних компонент от внешнего воздействия. 3D модели различных элементов каркаса представлены на Рисунке 4.2.

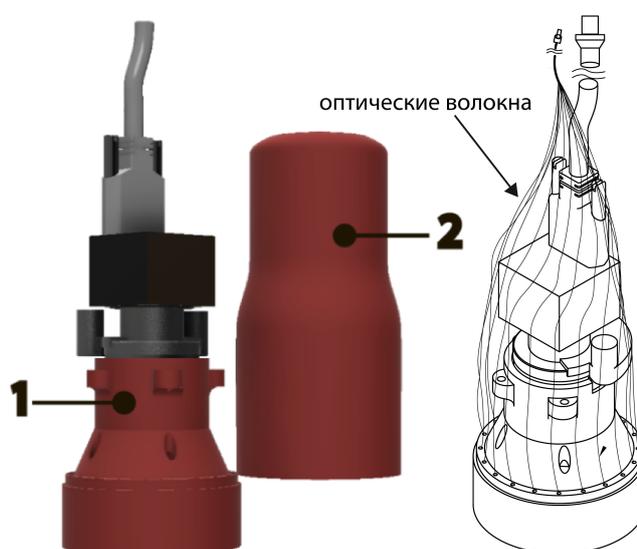


Рисунок 4.2 – 3D модель устройства: (1) основание; (2) корпус.

Материалом для печати был выбран полилактид, что позволило уменьшить массу и повысить надежность при эксплуатации. В Таблице 4.1 представлены основные свойства полилактида, который является биосовместимым материалом и разрешен для изготовления продукции медицинского назначения. Сборка системы начинается с жесткой фиксации выходов оптических волокон, далее

Таблица 4.1 – Основные свойства полилактида

Свойство	Значение
плотность	1,2 -1,4 г/см ³
температура размягчения материала	52 – 165 °С
температура плавления	165 – 195 °С
поглощение влаги	0,5 – 50 %

устанавливается объектив. Фиксирование камеры производится на объективе. Вывод проводов питания и оптических волокон осуществляется через один выход, расположенный в верхней части системы.

Отличительной особенностью данного устройства является волоконный способ доставки лазерного излучения в зону визуализации. В данном устройстве применяется источник лазерного излучения в БИК-диапазоне (760 – 800 нм), что обусловлено «окном прозрачности» биологических тканей. Доставка лазерного осуществляется с помощью системы оптических волокон, расположенных по окружности исследуемой области, для достижения равномерного распределения лазерного излучения. В соответствии с диффузионным приближением теории переноса фотоны в полубесконечной среде с наибольшей вероятностью будут распространяться через область формы “банана” (Рисунок 4.3) [158].

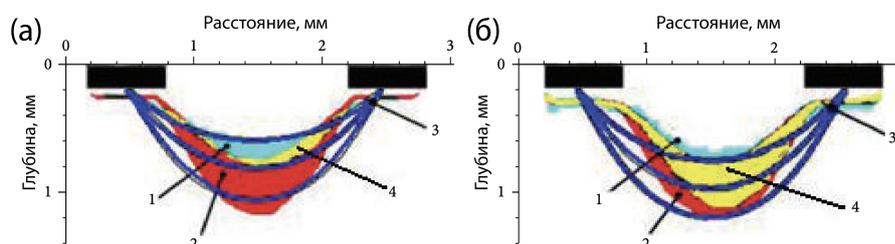


Рисунок 4.3 – Наиболее вероятное распределение фотонов между двумя источниками: (а) $\lambda=532$ нм; (б) $\lambda=632,8$ нм (1 - эксперимент, 2 – моделирование ММК, 3 – диффузионное приближение, 4 – пересечение 1 и 2).

Система оптических волокон включает 20 полимерных оптических волокон (Рисунок 4.2), которые соединены в один SMA-905 разъем (Рисунок 4.4).

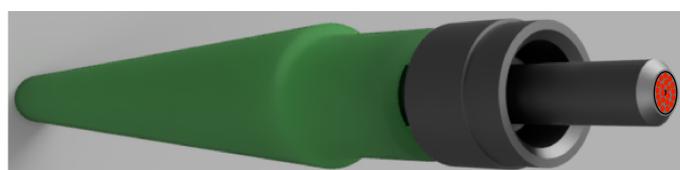


Рисунок 4.4 – Разъем системы оптических волокон.

Для вывода лазерного излучения из источника и дальнейшего ввода в систему оптических волокон применяется торцевое волокно диаметром 400 мкм и $NA=0,25$ с SMA-905 разъемом на выходе. Для соединения двух SMA разъемов был разработан специальный адаптер, размеры которого представлены на Рисунке 4.5.

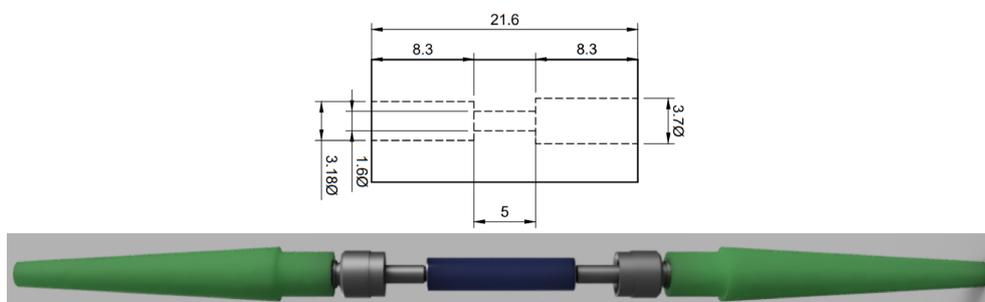


Рисунок 4.5 – Размеры адаптера для соединения двух SMA разъемов и ввод лазерного излучения в систему оптических волокон (1 - SMA разъем системы оптических волокон; 2 - SMA разъем оптического волокна, вводящего лазерное излучение).

Основными требованиями предъявляемыми для оптических волокон видеофлуоресцентной системы являются: наличие высокой устойчивости к динамическим механическим нагрузкам, хорошая пропускная способность (необходимо достижение выходной мощности на каждом оптическом волокне $\sim 5-20$ мВт; числовая апертура $NA=0,22$; легкость. Всем этим требованиям отвечают полимерные оптические волокна, которые способны выдерживать многократные деформации (изгибы), чего нельзя сказать об обычном кварцевом волокне, и в 3 раза легче кварцевых волокон. Также следует отметить, что полимерные волокна обладают самой низкой стоимостью исходных материалов.

Внешний вид и схема работы системы визуализации кровеносных сосудов методом регистрации обратно рассеянного лазерного излучения представлена на Рисунке 4.6. Она включает в себя: источник лазерного излучения, 20 полимерных оптических волокон диаметром 500 мкм, вариофокальный объектив с фокусным расстоянием 3,6-10 мм, что обеспечивает поле зрения от 30 до 100 мм и цифровую ИК-камеру с CMOS матрицей. Данная камера сочетает поддержку широкого динамического диапазона с высокой скоростью передачи данных. Максимальное разрешение данной камеры - 1280x1024, видеопоток такого разрешения передается со скоростью свыше 60 кадров в секунду. Минимальные размеры (26x26x26 мм) позволяют применять камеры серии XIMEA USB 3.0 в условиях ограниченного пространства.

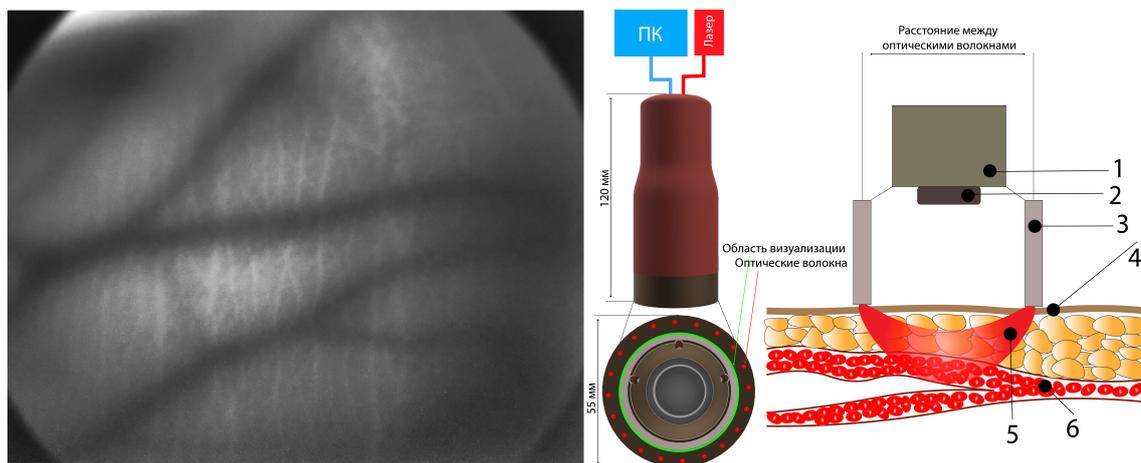


Рисунок 4.6 – Пример регистрируемых изображений, внешний вид устройства для визуализации кровеносных сосудов и схема его работы: (1) ИК камера; (2) объектив; (3) оптические волокна; (4) кожа; (5) зондирующее лазерное излучение; (6) кровеносные сосуды.

Излучение от лазера через оптические волокна, в режиме контакта (оптическое волокно – кожа), попадает в биологические ткани. Мощность лазерного излучения на каждом оптическом волокне составляет не менее 2 – 3 мВт. Далее происходит рассеяние и поглощение лазерного излучения. В кровеносных сосудах лазерное излучение преимущественно поглощается. ИК-камера регистрирует обратно рассеянное лазерное излучения и на экране монитора отображается изображение поглощение кровеносных сосудов. Специальное программное обеспечение позволяет записывать видеосигнал и в дальнейшем обрабатывать его. Она позволяет оценить распределение интенсивности обратно рассеянного излучения вдоль выбранного профиля и определить истинные границы кровеносных сосудов (границы с наименьшим размытием). Оптические волокна распределены равномерно по окружности исследуемой области. Облучение происходит в контакте с кожей, что позволяет увеличить глубину зондирования при равномерном распределении излучения.

4.3 Метод определения оптимальных длин волн для ИК-визуализации кровеносных сосудов

С целью определения оптимального диапазона длин волн для ИК - визуализации кровеносных сосудов методом регистрации обратно рассеянного лазерного излучения была проведена численная оценка резкости их границ. Исследова-

ние распространения лазерного излучения проводилось в диапазоне длин волн от 700 до 860 нм с шагом 10 нм. Схема проведения исследования представлена на Рисунке 4.7.

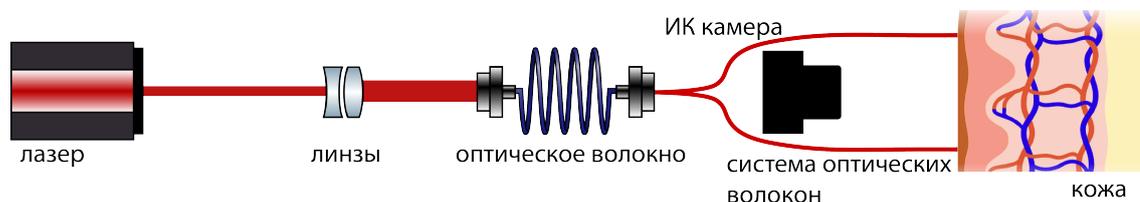


Рисунок 4.7 – Схема проведения исследования по определению оптимальной длины волны лазерного излучения для ИК-визуализации кровеносных сосудов.

Лазерное излучение генерировалось фемтосекундным лазером Chameleon Discovery (COHERENT) с диапазоном перестройки длин волн от 680 до 1300 нм и длительностью импульса 140 ± 20 фс. Мощность лазерного излучения на каждом оптическом волокне составляла 2 – 3 мВт. Время экспозиции на камере было установлено на уровне 16 мс. Критерием оценки изображений была резкость границ кровеносных сосудов. Граница кровеносного сосуда с окружающей тканью - это скачок яркости, а скорость этого скачка характеризует степень размытия границы. Для численной оценки резкости сначала выделялась интересующая область в виде прямоугольника (Рисунок 4.8а), далее для уменьшения шума усредняются горизонтальные профили (Рисунок 4.8б) и полученный средний профиль дифференцирован с последующей аппроксимацией сигмоидальной функцией (Рисунок 4.8в):

$$\sigma(x) = \frac{L}{1 + e^{-k(x-x_0)}} - A \quad (4.1)$$

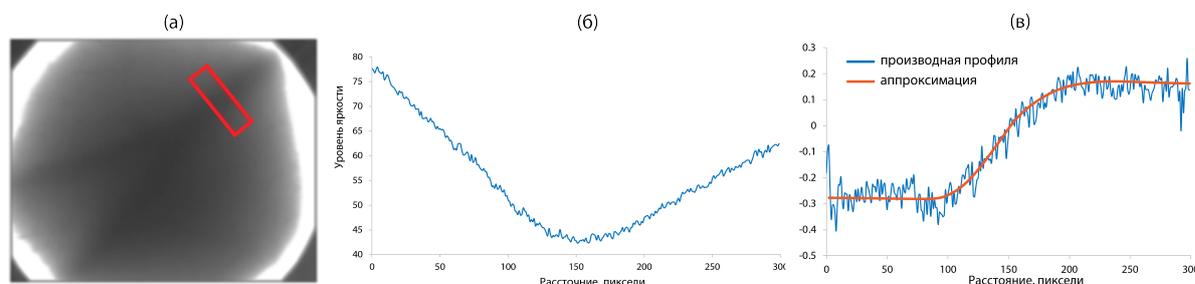


Рисунок 4.8 – Этапы численной оценки резкости границ кровеносного сосуда: (а) изображение кровеносного сосуда с выделенной прямоугольной зоной для анализа; (б) усредненный горизонтальный профиль; (в) производная профиля.

Параметры L , x_0 , k и A задают размах по оси ординат, абсциссу точки перегиба, крутизну кривой и сдвиг по оси ординат соответственно. Они находятся методом наименьших квадратов. Продифференцировав данную функцию получаем:

$$\frac{d\sigma}{dx} = Lk \frac{e^{-k(x-x_0)}}{(1 + e^{-k(x-x_0)})^2} \quad (4.2)$$

Максимум производной достигается в точке перегиба x_0 и равен $Lk/4$. Эта величина в дальнейшем будет называться коэффициентом резкости. По данному коэффициенту оценивалась резкость границ кровеносных сосудов.

4.4 Оптимальный диапазон длин волны для ИК-визуализации кровеносных сосудов

Излучение в БИК-диапазоне проникает глубже, чем излучение в видимом диапазоне [159]. Причина состоит в том, что коэффициенты рассеяния и поглощения хромофоров, входящих в состав кожи, сильно зависят от длины волны. Рассеивающие свойства ткани обусловлены свойствами затухания, присущими хромофорам, а также размерами частиц в ткани, которые также определяют тип рассеяния, а именно рассеяние Ми и Рэлея [160]. Глубина проникновения лазерного излучения в биологической ткани наибольшая в диапазоне длин волн 700 – 900 нм. Кровь, вода и меланин являются основными абсорбирующими компонентами кожи.

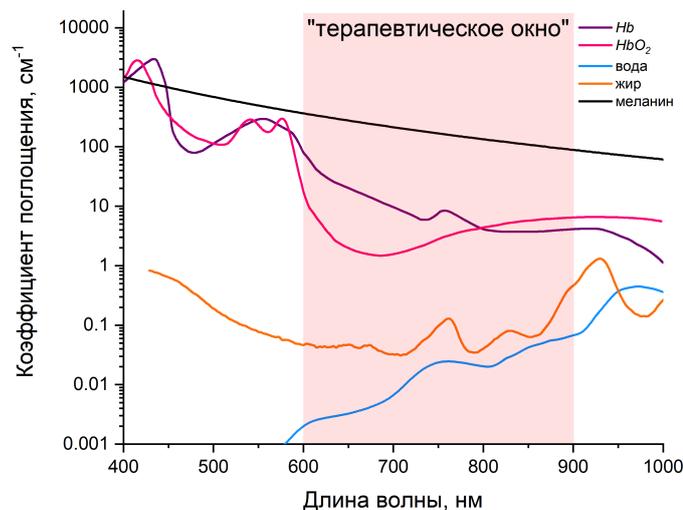


Рисунок 4.9 – Спектры поглощения дезоксигемоглобина (Hb), оксигемоглобина (HbO_2), жира, меланина и воды.

С увеличением длины волны рассеяние в коже человека уменьшается, также уменьшается и поглощение меланина [94]. Поглощение в БИК-диапазоне клетками крови (эритроцитами) тоже уменьшается, но относительно меньше по сравнению с другими хромофорами [161]. Сочетание этих свойств, т.е. низкое рассеяние и разница в поглощении между клетками крови и окружающими тканями дает возможность использовать излучение в БИК-диапазоне для визуализации кровеносных сосудов под кожей. На Рисунок 4.9 представлены спектры поглощения дезокси- и оксигемоглобина, воды, жира и меланина.

Результаты численной оценки резкости границ кровеносных сосудов представлены на Рисунке 4.10. С увеличением коэффициента резкости возрастает точность дифференциации истинных границ кровеносных сосудов. На Рисунке 4.10, для наглядности, представлены отсортированные изображения (слева направо по убыванию коэффициента резкости) выбранного участка кровеносного сосуда диаметром 2 мм.

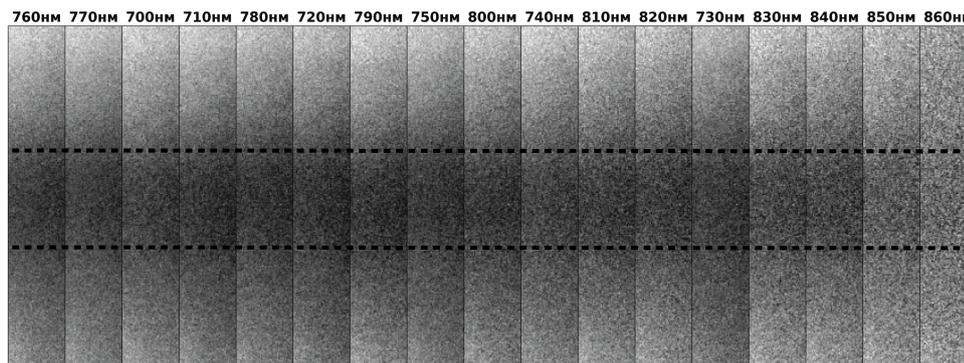


Рисунок 4.10 – Изображения выделенной прямоугольной зоны кровеносного сосуда диаметром 2 мм, отсортированные слева направо по убыванию коэффициента резкости.

Пунктирными линиями указаны истинные границы кровеносного сосуда.

Наибольшее значение коэффициента резкости наблюдалось на длине волны 760нм нм. Этому можно дать теоретическое объяснение, проанализировав отношение интенсивности излучения, прошедшего через кровеносный сосуд $I_{\text{вен}}$ к интенсивности излучения, прошедшего через остальную ткань $I_{\text{ткани}}$. Основным поглотителем в кровеносном сосуде является венозная кровь с оксигенацией около 70%. Основным поглотителем в остальной ткани является вода. Их коэффициенты поглощения обозначены как $\mu_{\text{вен}}$ и $\mu_{\text{ткани}}$, соответственно. Отношение интенсивностей прошедших через одинаковый по толщине слой l сосуда

и окружающей его ткани можно описать из закона Бугера-Ламберта-Бера:

$$\frac{I_{\text{вен}}}{I_{\text{ткани}}} = \frac{I_0 e^{-\mu_{\text{вен}} l}}{I_0 e^{-\mu_{\text{ткани}} l}} = e^{-(\mu_{\text{вен}} - \mu_{\text{ткани}}) l} \quad (4.3)$$

где I_0 - начальная интенсивность падающего излучения.

Нас интересовала ситуация, когда кровеносный сосуд сильно поглощает по сравнению с окружающей тканью. Для этого величина $\mu_{\text{вен}} - \mu_{\text{ткани}}$ должна быть как можно больше. На Рисунке 4.11 представлена зависимость коэффициента резкости и величины $\mu_{\text{вен}} - \mu_{\text{ткани}}$ от длины волны лазерного излучения.

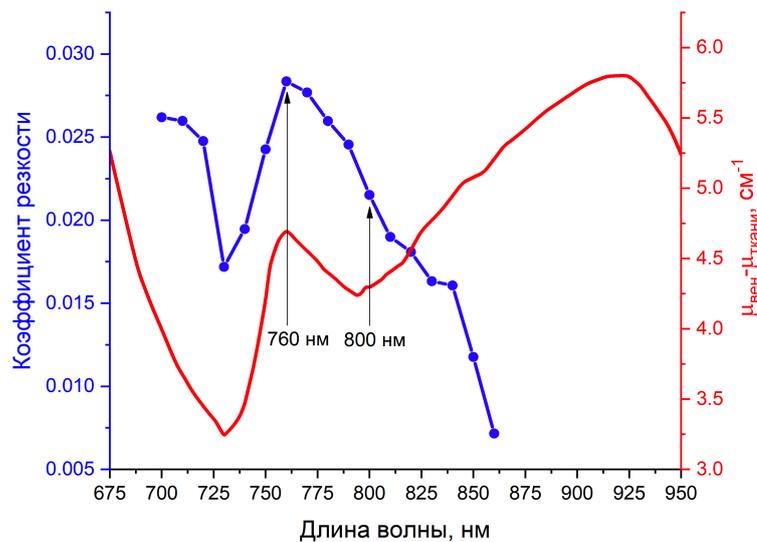


Рисунок 4.11 – Зависимость коэффициента резкости (синяя кривая) и величины $\mu_{\text{вен}} - \mu_{\text{ткани}}$ (красная кривая) от длины волны лазерного излучения.

Из полученных результатов видно, что их максимумы на $\lambda = 760$ нм совпадают, однако далее, приблизительно с длины волны 800 нм величина $\mu_{\text{вен}} - \mu_{\text{ткани}}$ увеличивается, тогда как коэффициент резкости продолжает уменьшаться. Это связано с тем, что с увеличением длины волны, в связи с уменьшением рассеяния увеличивается глубина проникновения лазерного излучения, из-за чего диффузно отраженного излучения становится меньше (Рисунок 4.12).

Следует учитывать, что на длине волны 760 нм наблюдается пик поглощения жира, который может в различных случаях, в зависимости от процентного содержания в тканях, уменьшать эффективность визуализации. Поэтому оптимальным диапазоном длин волн для ИК-визуализации кровеносных сосудов методом обратно рассеянного лазерного излучения является область БИК-диапазона от 760 до 800 нм. При этом наибольшая глубина проникновения в

этом диапазоне будет на длине волны 800 нм.

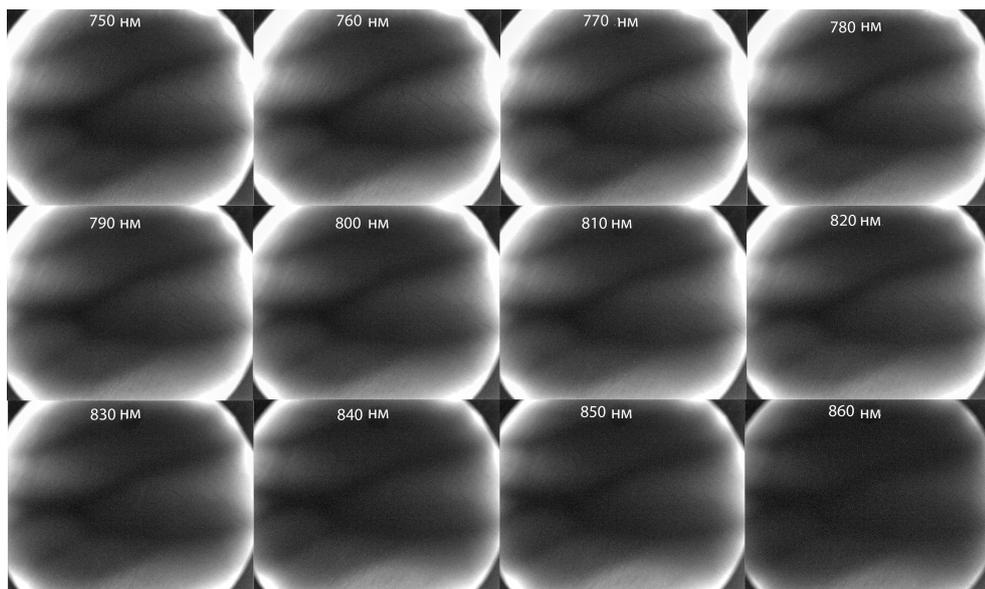


Рисунок 4.12 – Изображения кровеносных сосудов полученных с одного участка тела на разных длинах волн в диапазоне 750 – 860 нм.

4.5 Глубина зондирования лазерного излучения в модели кожи человека

В данной работе исследования *in vivo* проводились на коже человека. Кожа человека имеет неоднородную структуру и, соответственно, неоднородные оптические параметры. Она является оптически мутной средой (присутствуют как поглощение, так и рассеяние). Основными элементами кожи являются вода (70%) и белки (27%) [162]. Кожа состоит из основных трех слоев: эпидермиса, дермы и гиподермы [163]. На Рисунке 4.13 представлены основные компоненты кожи человека.



Рисунок 4.13 – Структура строения кожи человека.

Каждый слой кожи обычно характеризуется коэффициентом поглощения μ_a , коэффициентом рассеяния μ_s , средним косинусом угла рассеяния (фактором анизотропии) g , толщиной слоя d и средним показателем преломления среды n . Оптические параметры каждого слоя в БИК-диапазоне представлены в Таблице 4.2 [164, 165].

Таблица 4.2 – Оптические параметры кожи для длины волны 800 нм

Слой кожи	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	g	n	d , мкм
Эпидермис	4,0	93	0,80	1,34	100
Дерма	0,8	90	0,85	1,4	1500
Гиподерма	1,36	12	0,75	1,44	5000

Моделирование распространения лазерного излучения проводилось на трех-слойной модели, при этом источники лазерного излучения располагались на разных расстояниях. В качестве излучателей использовались 2 источника излучения с длиной волны 800 нм диаметрами $d=500$ мкм и числовой апертурой $NA=0,22$ расположенных симметрично относительно центра, на расстояниях: 28,5 мм; 38,5 мм; 48,5 мм; 58,5 мм. Результаты расчетов представлялись в виде черно-белого изображения распределения интенсивностей. Каждый пиксель Ч/Б изображения соответствует точке в среде. Чем больше фотонов рассеивается в этой точке, тем ярче пиксель. Глубина цвета изображений составляла 32 бит, что позволяло зафиксировать изменения в яркости. Для обработки полученных изображений использовалась авторская программа TiffReader, в которую входят алгоритмы поиска максимальной яркости и глубины оптического зондирования. В соответствии с этим, программа ищет самые яркие точки и получает область, где поток фотонов находится на самом высоком уровне. Расстояние между плоскостью поверхности и самой нижней точкой полученной области является глубиной зондирования, которая может быть измерена непосредственно в разработанной программе.

Моделирование распространения лазерного излучения в модели кожи человека позволило получить наиболее вероятное распределение фотонов между двумя источниками лазерного излучения (оптическими волокнами) и определить глубину зондирования лазерного излучения при данном методе ИК-визуализации кровеносных сосудов (Рисунок 4.14).

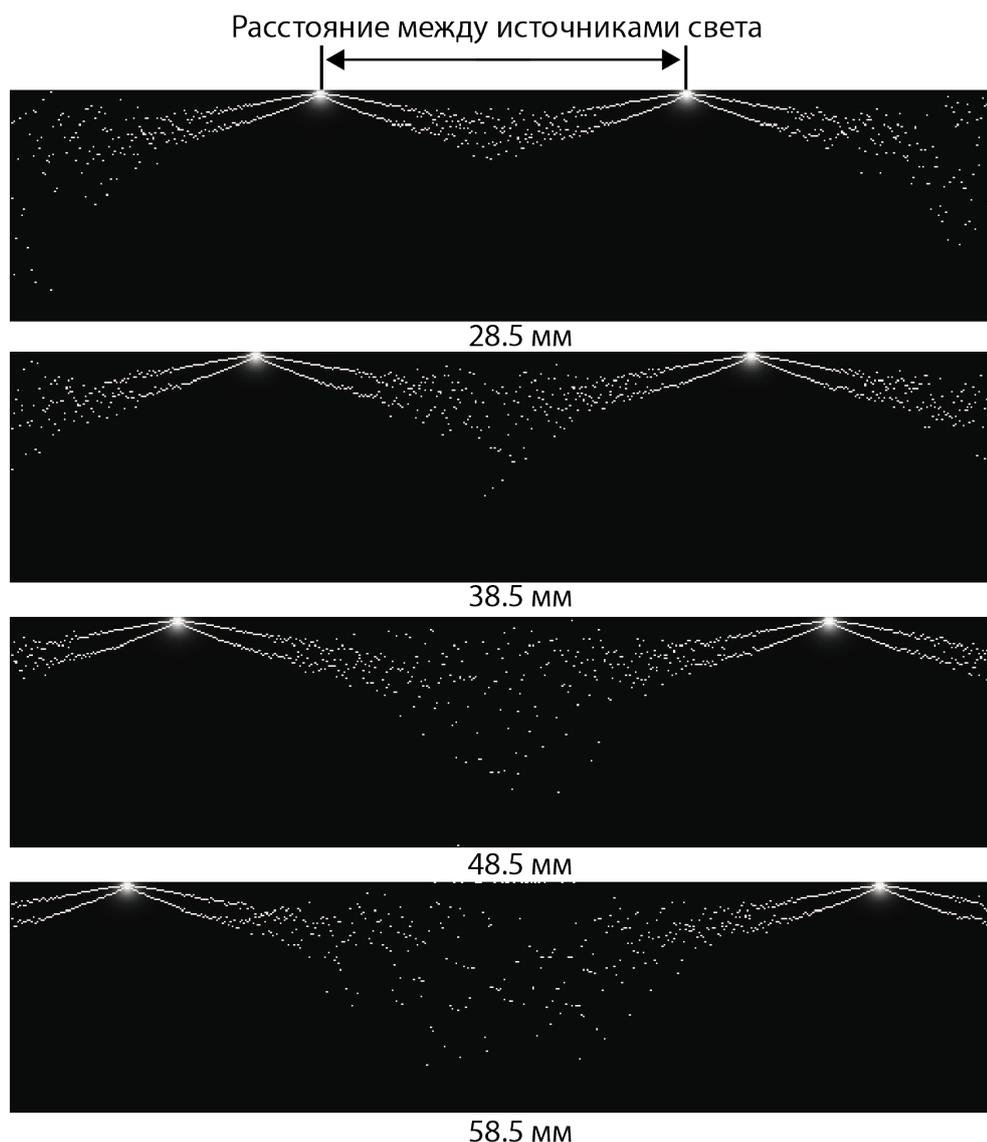


Рисунок 4.14 – Результаты моделирования ММК наиболее вероятного распределения фотонов между двумя источниками фотонов в модели кожи человека.

В соответствии с диффузионным приближением теории переноса, фотоны в полубесконечной среде с наибольшей вероятностью распространяются через область формы «банана» [158]. При расположении оптических волокон на расстоянии 28,5; 38,5; 48,5; 58,5 мм глубина зондирования составила $6,7 \pm 0,03$; $11,4 \pm 0,26$; $16,1 \pm 0,50$; $17,3 \pm 0,27$ мм соответственно (Рисунок 4.15).

Зависимость глубины зондирования излучением аппроксимируется функцией вида:

$$y(r) = a - b \cdot \ln(r + c) \quad (4.4)$$

где r – расстояние между оптическими волокнами, a , b и c – коэффициенты пропорциональности. С увеличением расстояния между оптическими волокнами увеличивается глубина зондирования лазерного излучения.

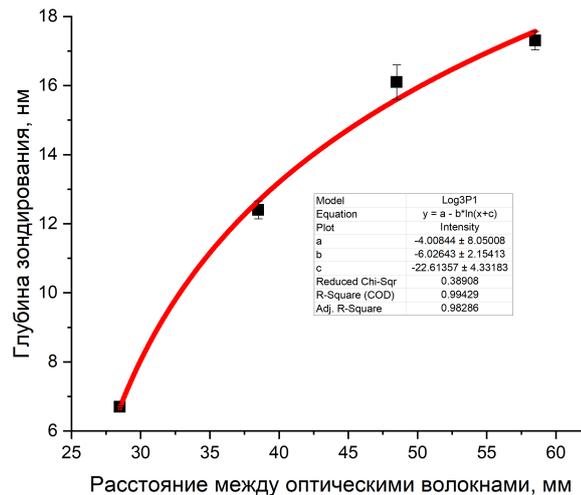


Рисунок 4.15 – Зависимость глубины зондирования фотонов при изменении расстояния между оптическими волокнами.

Изменяя расстояние между оптическими волокнами возможно регулирование глубины зондирования лазерного излучения. В ходе экспериментальных исследований было выявлено, что наиболее оптимальными расстояниями между оптическими волокнами являются 38,5 – 48,5 мм.

4.6 Преимущества ИК-визуализации методом регистрации диффузно рассеянного лазерного излучения

Отличительной особенностью данной системы визуализации кровеносных сосудов является способ доставки лазерного излучения. На Рисунке 4.16 представлены изображения кровеносных сосудов и усредненные профили выделенных зон. Изображения получены с различных участков тела человека, при двух способах доставки лазерного излучения $\lambda = 800$ нм: в контакте оптических волокон с кожей (Рисунок 4.16а) и методом «отражения света» (Рисунок 4.16б).

При методе прямого освещения визуализация кровеносных сосудов производится за счет различий в интенсивности отраженного света. Сильное отражение от поверхности кожи и неглубокое проникновение света под кожу дает незначительный контраст кровеносных сосудов. Кроме того, шероховатости и неровности на поверхности кожи способствуют неравномерному распределению

лазерного излучения, что препятствуют визуализации. Поэтому данный метод требует высокого уровня обработки полученных изображений.

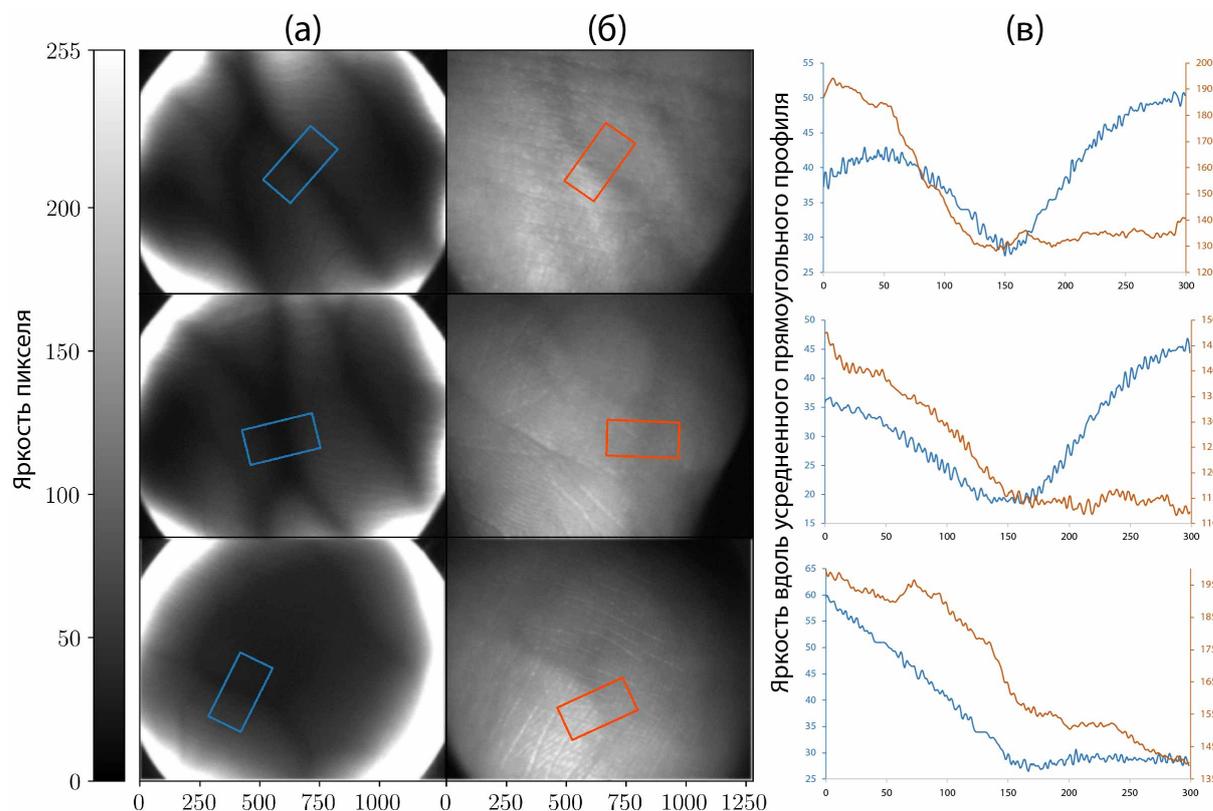


Рисунок 4.16 – ИК-визуализация одних и тех же зон при различных способах доставки лазерного излучения ($\lambda = 800$ нм): (а) в контакте оптических волокон с кожей по периметру исследуемой зоны; (б) методом прямого освещения поверхности; (в) усредненные профили яркости выделенных зон.

Сопоставление усредненных профилей яркости одних и тех же зон (Рисунок 4.16в), полученных двумя способами доставки лазерного излучения демонстрирует, что при визуализации методом обратно рассеянного лазерного излучения возможно получение высококонтрастных изображений кровеносных сосудов, даже без применения алгоритмов реконструкции русла кровеносных сосудов.

4.7 ИК-визуализация опухоли методом регистрации обратно рассеянного лазерного излучения

Возможность контролировать состояние сосудистой системы тканей опухоли во время ФДТ может послужить эффективным средством оптимизации процесса лечения в режиме реального времени. Хорошо известно, что ФДТ, в

частности с применением ФС сосудистого типа, оказывает сильное влияние на сосудистую систему опухоли во время лазерного воздействия при различных протоколах лечения [166].

На Рисунке 4.17 представлены изображения опухоли пациента с раком кожи, полученные с применением метода регистрации обратно рассеянного лазерного излучения $\lambda = 785$ нм до и после ФДТ. В процессе ФДТ опухоли проводилась спектрально-флуоресцентная диагностика, когда плотность мощности лазерного излучения $\lambda = 660$ нм на поверхности тканей составляла 367 мВт/см^2 , а суммарная плотность энергии 110 Дж/см^2 (Рисунок 4.18). На полученных изображениях наблюдались «теневые» изображения сосудистой системы тканей в зоне опухоли. Более «светлые» области соответствуют соседним тканям, в которых лазерное излучения $\lambda = 785$ нм преимущественное рассеивается. Повышенная неоваскуляризация (образование новой капиллярной сети) тканей опухоли обеспечивает способность опухоли к инвазивному росту и распространение на окружающие ткани [167].

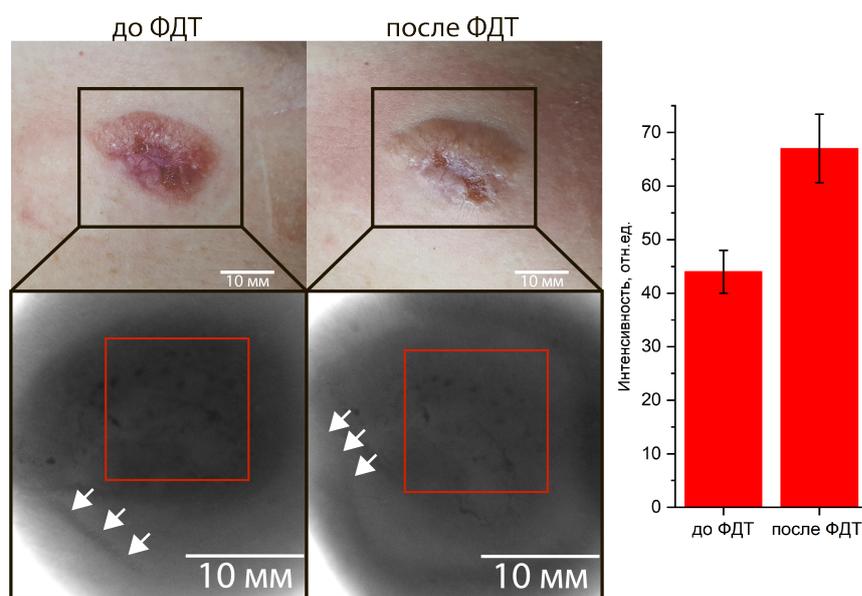


Рисунок 4.17 – Изображения тканей опухоли в цветном режиме и полученные методом обратно рассеянного лазерного излучения до и после ФДТ.

В артериальных сосудах быстрый кровоток снижает концентрацию плазменных коагуляционных факторов, поэтому в тромбогенезе ведущую роль играют тромбоциты, которые прилипают к месту повреждения и вместе с лейкоцитами образуют белый тромб. Позднее в нем откладывается фибрин, в нитях которого застревают эритроциты и тромб краснеет. Последствием тромбов в

артериальных сосудах является ишемия, постишемический стаз и некроз. В венозных сосудах с медленным током крови одновременно с активацией тромбоцитов происходит и активация коагуляционного гемостаза с образованием фибрина, поэтому за 4 – 9 мин образуется «красный тромб» [88]. Кинетика фотобликинга Себ была аппроксимирована двухэкспоненциальной функцией с достоверностью $R^2 = 0,98$ (Рисунок 4.18).

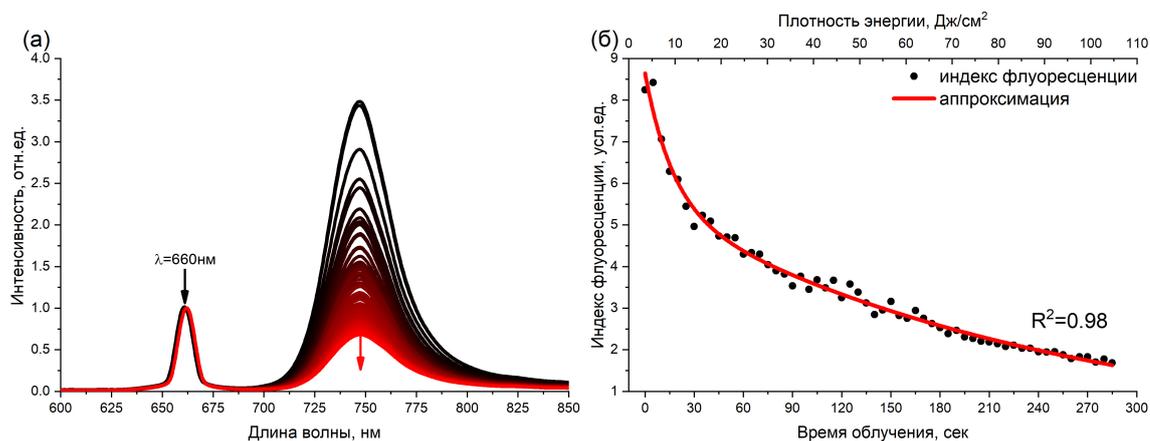


Рисунок 4.18 – Спектроскопический контроль фототерапии опухоли в процессе лазерного облучения: (а) регистрируемая спектральная информация; (б) распределение индексов флуоресценции опухоли. Время экспозиции - 20 мс. Временной интервал регистрации спектров - 3 сек.

Также в данном случае оценивалось изменение интенсивностей обратно рассеянного лазерного излучения и флуоресценции Себ (Рисунок 4.19).

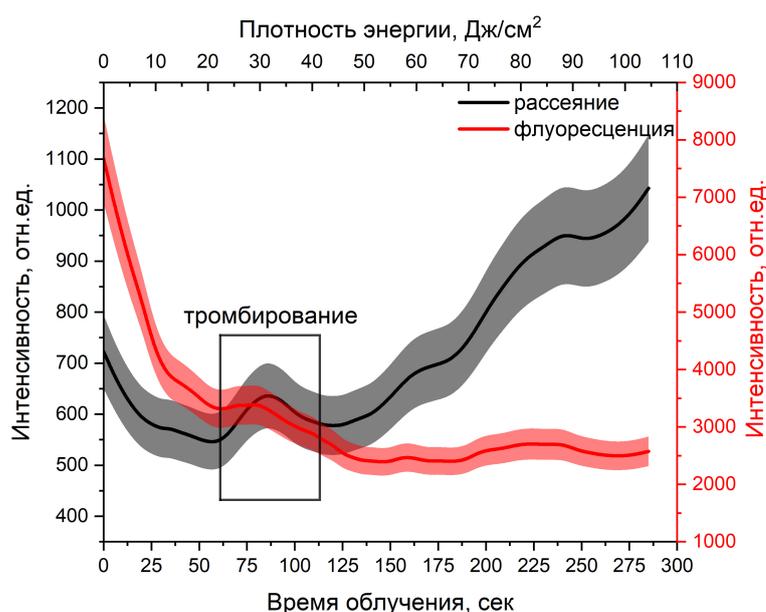


Рисунок 4.19 – Распределение интенсивностей диффузно отраженного лазерного излучения (650 – 670 нм) и флуоресценции Себ (725 – 800 нм).

На данных результатах можно наблюдать, что на 2 минуте ФДТ произошло полное тромбирование кровеносных сосудов и фотобликинг ФС практически прекратился, при этом, за счет тромбирования сосудов (увеличения плотности тканей) увеличилась интенсивность обратно рассеянного лазерного излучения. Полученные результаты демонстрируют возможность спектроскопического контроля тромбирования кровеносных сосудов, непосредственно в процессе лазерного облучения.

На Рисунке 4.20 представлены изображения 3-х зон сосудистой системы в зоне опухоли пациента с раком кожи, полученные с применением регистрации обратно рассеянного лазерного излучения $\lambda = 785$ нм до и после ФДТ. Пациенту за 3 часа до проведения исследования внутривенно вводился Себ в концентрации 1 мг/кг. При проведении ФДТ плотность мощности лазерного излучения $\lambda = 660$ нм во всех случаях составляла 565 мВт/см^2 , а суммарная плотность энергии составила: в зоне (1) - 200 Дж/см^2 , а в зонах (2),(3) - 130 Дж/см^2 .

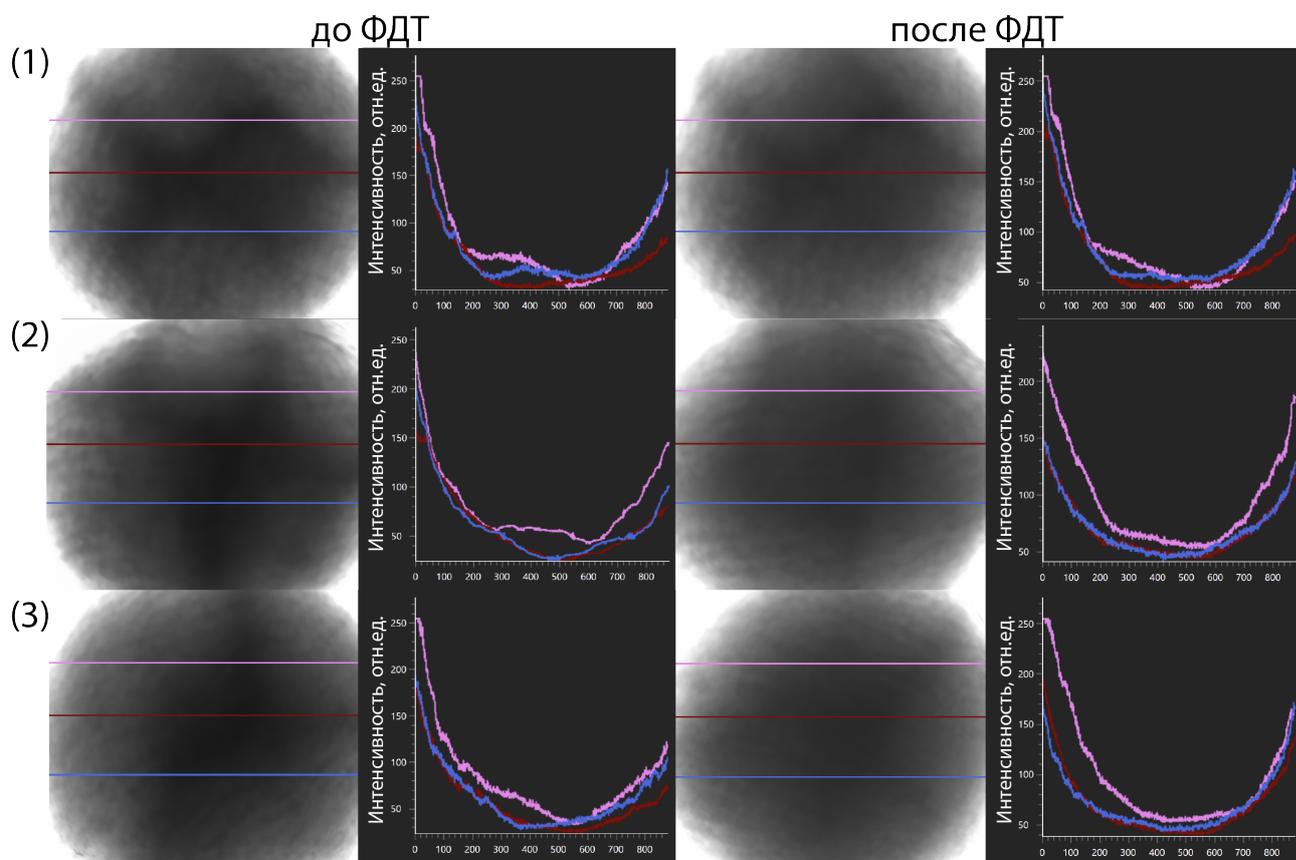


Рисунок 4.20 – Изображения сосудистой системы в зоне опухоли, полученные методом регистрации обратно рассеянного лазерного излучения и соответствующие распределения интенсивностей профилей яркости вдоль выделенных маркеров.

После проведения ФДТ границы кровеносных сосудов становятся менее контрастными в сравнении с изображениями до ФДТ, что также можно наблюдать по изменению распределения интенсивностей профилей яркости вдоль выделенных маркеров. Таким образом, после ФДТ в зоне лазерного воздействия уменьшилась концентрация поглощающих центров, а именно клеток гемоглобина. Так как Себ является ФС преимущественно сосудистого типа, ФДТ затруднило циркуляцию крови в тканях, что было подтверждено результатами оценки оксигенации тканей соответствующих тканей, которая уменьшилась после ФДТ в среднем на 20% (Рисунок 4.21). Себ прямо или косвенно разрушается синглетным кислородом при прохождении каждого цикла фотоактивации. Повышенный уровень фотоактивации пропорционален усиленному фотообличингу ФС [168]. В результате была выдвинута гипотеза, согласно которой больший фотообличинг ФС сопровождается большим производством синглетного кислорода, уменьшением уровня оксигенации и, следовательно, что повышает фотодинамическую эффективность [169]. Во всех случаях по результатам спектрально-флуоресцентной диагностики с возбуждением флуоресценции Себ He-Ne источником лазерного излучение ($\lambda = 632,8 \text{ нм}$) и регистрацией рассеянного назад лазерного и флуоресцентного излучений в красном диапазоне наблюдался фотообличинг ФС (Рисунок 4.21).

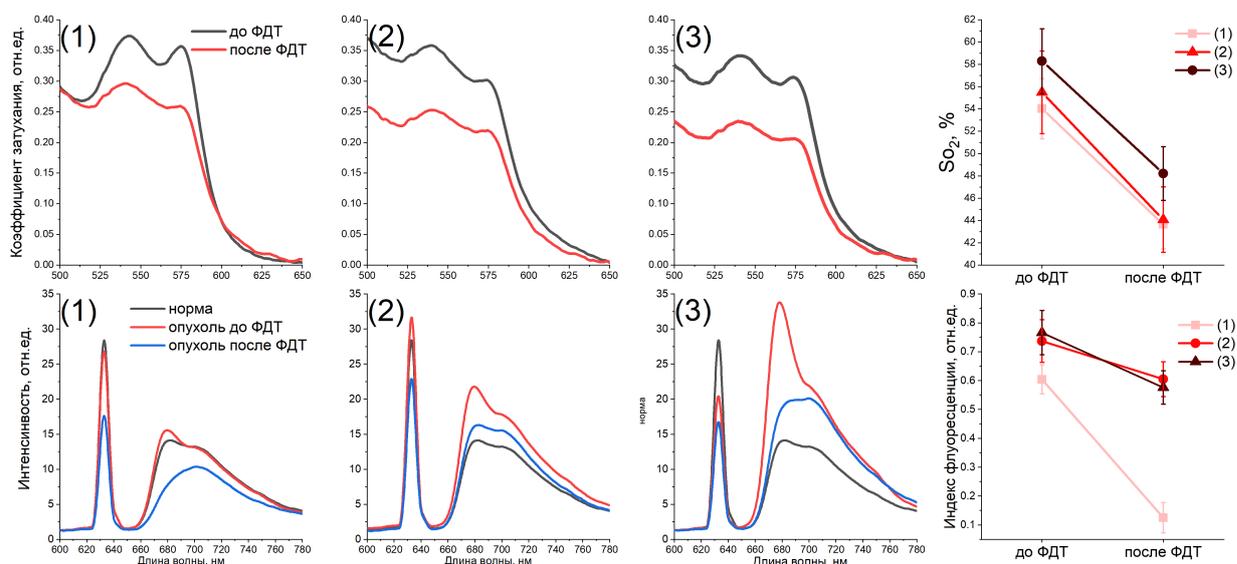


Рисунок 4.21 – Результаты спектроскопической оценки оксигенации и лазерно-индуцированной ФД опухоли кожи в 3-х зонах до и после ФДТ. Плотность мощности лазерного излучения при ФДТ - 565 мВт/см^2 . Суммарная плотность энергии в зоне (1) - 200 Дж/см^2 , в зонах (2),(3) - 130 Дж/см^2 .

После лазерного воздействия на ткани опухоли, наблюдалось уменьшение интенсивности рассеянного назад лазерного излучения в сравнении со значениями до ФДТ. Ранее в работе [6] отмечалось, что с уменьшением уровня оксигенации, при одном и том же содержании крови в образце, коэффициентов поглощения гемоглобина μ_a в красном диапазоне увеличивается, что уменьшает интенсивность рассеянного назад лазерного излучения. Если рассматривать случай, когда массовая доля крови в теле взрослого человека составляет 6-8%, коэффициент поглощения гемоглобина при уровнях оксигенации 50 и 75% составляют 1,196 и 0,726 см^{-1} . Таким образом на интенсивность диффузно рассеянного лазерного излучения влияют гетерогенность тканей и концентрация дезоксигемоглобина.

Следует отметить, что для получения высококонтрастных изображений и увеличения глубины визуализации можно увеличить направленность и выходную мощность источника света, однако это увеличит количество тепла, передаваемого ткани пациента, что может привести к дискомфорту или повреждению исследуемой ткани.

Заключение к главе 4

Разработано устройство, обеспечивающее локальную ИК - визуализацию кровеносных сосудов человека методом регистрации и анализа обратно рассеянного лазерного излучения, которые позволяют оценить кровенаполненность тканей при проведении ФДТ или провести процедуру венепункции. Разработан метод оценки резкости/контрастности границ изображений кровеносных сосудов кровеносных сосудов при ИК-визуализации. Экспериментально установлен оптимальный диапазон длин волн в БИК-диапазоне (700 – 860 нм с шагом 10 нм) для визуализации методом регистрации обратно рассеянного лазерного излучения. Наибольшая контрастность кровеносных сосудов наблюдается в диапазоне длина волн 700 – 800 нм, а наибольшее значение на длине волны 760 нм.

Моделированием распространения лазерного излучения ММК в трехслойной модели кожи человека определена глубина зондирования фотонов в случае различных расстояний между источниками света. Получена формула расчета глубины зондирования излучения в модели кожи человека $y(r) = a - b \cdot \ln(r + c)$,

где r – расстояние между оптическими волокнами, a , b , c – коэффициенты пропорциональности. Излучение с длиной волны 800 нм с волоконно-оптическим способом доставки света к биологическим тканям может обеспечить визуализацию кровеносных сосудов на глубине более 6 мм при расположении оптических друг от друга на расстоянии более 28,5 мм.

Разработанное устройство позволяет проводить неинвазивную оценку состояния сосудистой системы опухоли при фотодинамическом воздействии. Устройство может быть использовано для контролирования процесса ФДТ.

Глава 5

Разработка метода предварительного низкоинтенсивного лазерного облучения опухоли

В данной главе представлен метод, позволяющий увеличить концентрацию Себ в тканях опухоли за счет использования предварительного лазерного облучения опухоли, на примере опухолей кожи. Особое внимание уделено обнаружению различий степени накопления Себ в центральной зоне опухоли и в тканях границы/периферии опухоли (~ 5 мм) спектроскопическими методами. Проведена микроскопическая флуоресцентная оценка распределения Себ в опухоли до и после низкоинтенсивного лазерного облучения. Исследования динамики изменения интенсивности флуоресценции Себ в процессе низкоинтенсивного лазерного облучения проводились на 19 пациентах с гистологически подтвержденным раком кожи. После предварительного лазерного облучения опухоли с дозой энергии $10 - 20$ Дж/см² было выявлено увеличение индексов флуоресценции опухоли в сравнении со значениями до облучения.

5.1 Флуоресцентная навигация и фотодинамическая терапия с предварительным лазерным облучением

Противоопухолевая эффективность ФДТ зависит от множества параметров, таких как выбор ФС, спектральные характеристики источника света, плотность мощности, плотность энергии, уровень оксигенация и тип опухоли. При этом селективность накопления ФС и его концентрация в тканях опухоли являются одними из основных факторов, влияющих на эффективность проводимой

ФДТ [59]. Поэтому разработка методов, позволяющих: повысить эффективность ФДТ с низкими дозами энергии; регулировать концентрацию ФС в тканях опухоли и на границе опухоли в настоящее время являются важными практическими и сложными задачами.

ФС на основе Се6 обладают интенсивным поглощением в диапазоне от 640 до 700 нм и являются гидрофильными восстановленными порфиринами, поэтому их основная химическая структура аналогична порфиринам [98]. Се6 - ФС второго поколения, который обладает хорошей стабильностью в воде и практически не вызывает светочувствительности кожи [99].

При предварительном лазерном облучении плотность мощности лазерного излучения ($\lambda=660\pm 5$ нм) варьировалась в диапазоне 130 – 310 мВт/см². Лазерное воздействие проводилось с шагом плотности энергии 10 Дж/см². Время лазерного воздействия для каждого этапа облучения варьировалось от 32 до 77 сек. После предварительного лазерного облучения опухоль проводилось основное облучение (непрерывное ФДТ) с плотностью мощности 700 – 800 мВт/см² и плотностью энергии 100 – 150 Дж/см² для достижения фотобличинга Се6 на уровне более 50 – 60%.

5.1.1 Видео-флуоресцентная визуализация опухоли

Спустя 3 часа после введения Се6 каждому пациенту проводилась видео-флуоресцентная визуализация зон поражения с целью определения границ опухоли. У всех 19 пациентов, включенных в исследование, были получены изображения до и после ФДТ в трех режимах двухканальной видеосистемы: цветном, Ч/Б и совмещенном. На Рисунке 5.1 представлены изображения зоны поражения до и после ФДТ с указанием коэффициента флуоресцентной контрастности.

В данном случае до проведения ФДТ коэффициент контрастности флуоресценции тканей опухоли и границы составлял 32 – 35 и 20 – 23, соответственно. После ФДТ значения коэффициентов контрастности флуоресценции опухоли снизились до 15 – 22, а на границе до 08 – 12, что свидетельствует о фотобличинге Се6. Непосредственно в процессе предварительного лазерного облучения видео-флуоресцентная визуализация не проводилась в связи с необходимостью минимизации временных задержек между каждой процедурой предварительного облучения (2 – 3 сек) и исключения вклада широкополосного белого света и лазерного излучения 630 ± 5 нм в фотобличинг Се6.

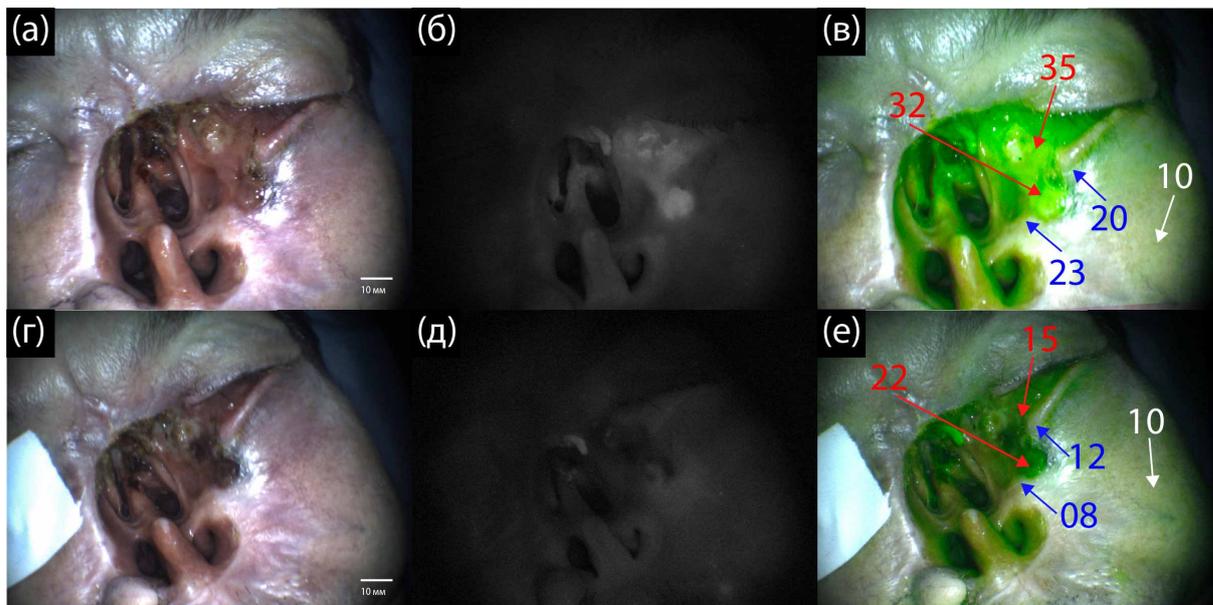


Рисунок 5.1 – Видео-флуоресцентная визуализация опухоли до и после ФДТ. (а,г) в цветном режиме; (б,д) в Ч/Б режиме; (в,е) в совмещенном режиме (стрелками указаны коэффициенты контрастности флуоресценции опухоли - красный цвет, границы опухоли - синий цвет и нормальной ткани - белый цвет).

5.1.2 Спектрально-флуоресцентная навигация Себ

Перед началом предварительного облучения, в случае каждого пациента, регистрировались спектры флуоресценции центральной части опухоли, границы опухоли и нормальной ткани. На Рисунках 5.2 - 5.3 представлены результаты спектроскопической диагностики и соответствующих индексов флуоресценции спустя 3 часа после введения Себ до ФДТ (Рисунок 5.2а) и после каждого предварительного лазерного облучения с шагом 10 Дж/см^2 (Рисунок 5.2б-е).

На зарегистрированных спектрах наблюдался интенсивный пик флуоресценции в диапазоне $665 - 690 \text{ нм}$, характерный для флуоресценции Себ. Была выявлена высокая селективность накопления Себ в тканях опухоли и на границе опухоли по сравнению с нормальными тканями (Рисунок 5.2а). Также наблюдалось различие в интенсивности рассеянного назад лазерного излучения в тканях опухоли/границы и нормальной ткани, что характеризует различия в оптических свойствах тканей. В данном случае до ФДТ в тканях опухоли была выявлена максимальная интенсивность флуоресценции исследуемых тканей. После облучения с плотностью энергии 10 Дж/см^2 интенсивность флуоресценции Себ в тканях опухоли и границы увеличилась в среднем на 42%.

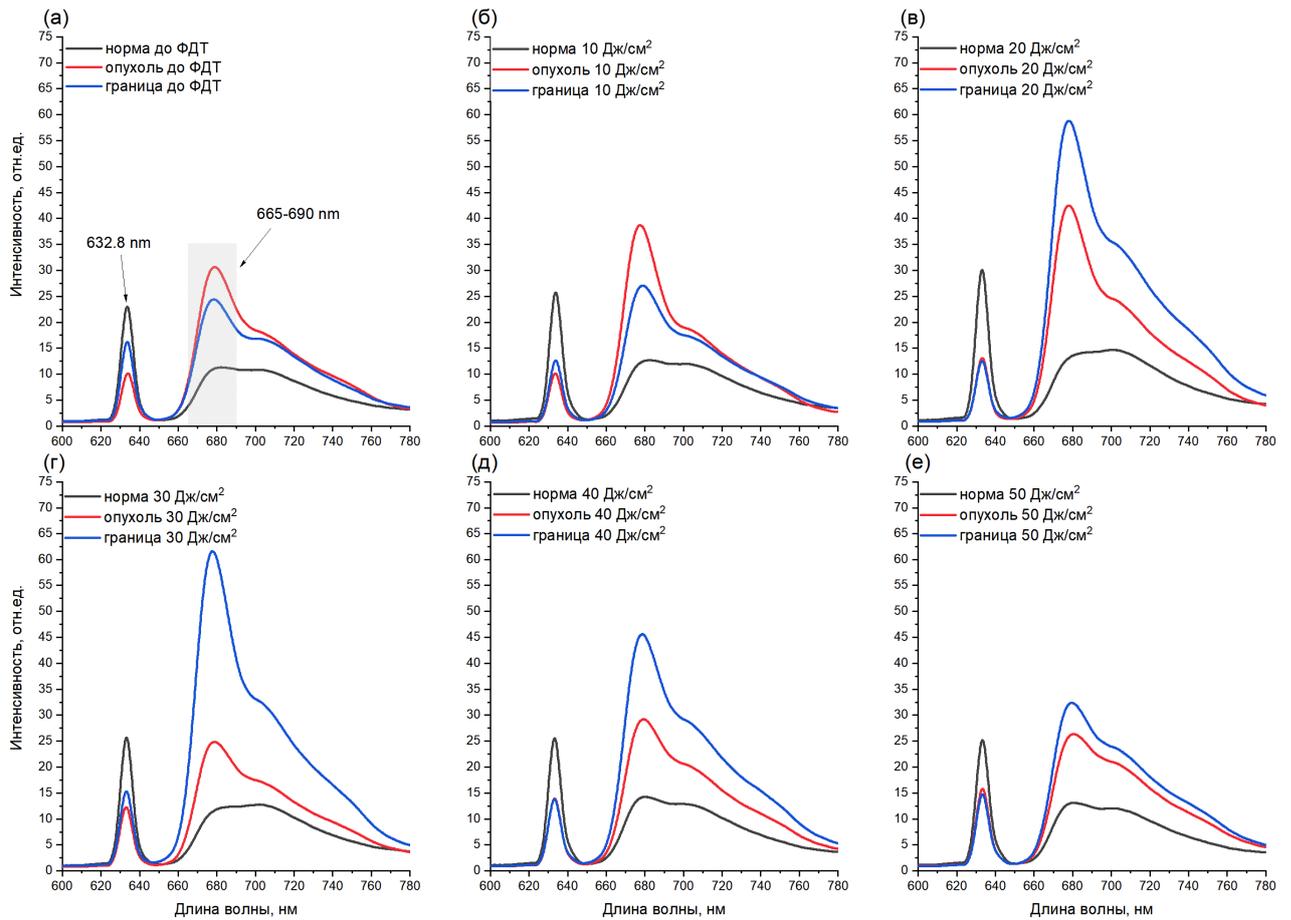


Рисунок 5.2 – Результаты спектрально-флуоресцентной диагностики кожи пациента: (а) до облучения; (б-е) в процессе предварительного облучения.

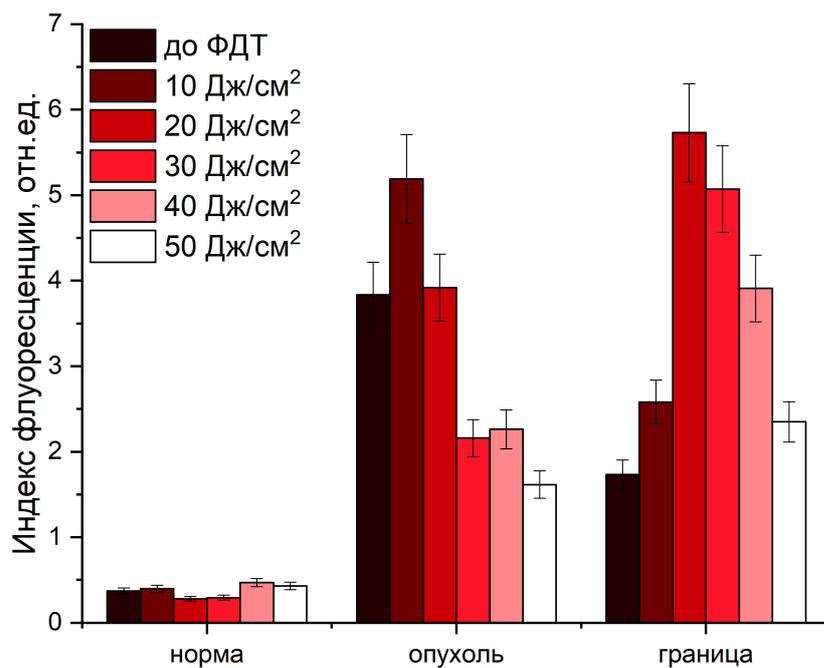


Рисунок 5.3 – Распределение индексов флуоресценции в нормальных тканях, тканях опухоли и ее границы до и после лазерного облучения.

После дальнейшего светового воздействия интенсивность флуоресценции Себ в тканях опухоли начала уменьшаться, тогда как в тканях границы наблюдалось увеличение интенсивности (Рисунок 5.3). Фотобличинг Себ в тканях опухоли и границы после воздействия излучения с плотностью энергии 50 Дж/см² по сравнению с максимальными значениями индексов флуоресценции (опухоль - 5,2; граница - 5,7) составил в среднем 60 и 70%, соответственно.

Для тканей центральной зоны опухоли, границы опухоли каждого пациента были получены распределения индексов флуоресценции до и после предварительного лазерного облучения с шагом плотности энергии 10 Дж/см², которые представлены на Рисунке 5.4.

В рамках исследования одного пациента, предварительное лазерное облучение иногда проводилась в двух разных очагах поражения и отмечалось как опухоль 1-2/граница 1-2. Представленные на Рисунке 5.4 результаты с градиентным окрашиванием увеличения/уменьшения индексов флуоресценции демонстрируют различия в распределении индексов в тканях опухоли и границы в процессе лазерного облучения. В большинстве случаев (65%) в тканях опухоли значения индексов флуоресценции после предварительного лазерного облучения превышали значения до ФДТ т.е. наблюдалось увеличение индексов флуоресценции до значений, превышающих значения до проведения ФДТ ($p < 0.01$, ранговый W -критерий Вилкоксона для $n=26$). При этом в тканях границы опухоли в большинстве случаев (58%) интенсивность отрицательного сдвига индексов флуоресценции превышает интенсивность положительного сдвига т.е. наблюдалось уменьшение индексов флуоресценции в сравнении со значениями до проведения ФДТ ($p < 0.01$, ранговый W -критерий Вилкоксона для $n=26$).

У всех пациентов, включенных в исследование, в тканях опухоли и границы наблюдался контраст накопления Себ по сравнению с окружающими нормальными тканями (Рисунок 5.5).

Также было оценено распределение количества случаев по плотностям энергии, когда индекс флуоресценции исследуемых тканей достигал максимальной интенсивности по сравнению со значениями до ФДТ (Рисунок 5.6). Коэффициент изменения индекса флуоресценции k рассчитывался как отношение индексов флуоресценции тканей после предварительного лазерного облучения

$Fl - after PDT_n$ к значениям до ФДТ $Fl - before PDT_n$:

$$k_n = \frac{Fl - after PDT_n}{Fl - before PDT_n} \begin{cases} k_n > 1 - \text{увеличение } IF \\ k_n < 1 - \text{уменьшение } IF \end{cases} \quad (5.1)$$

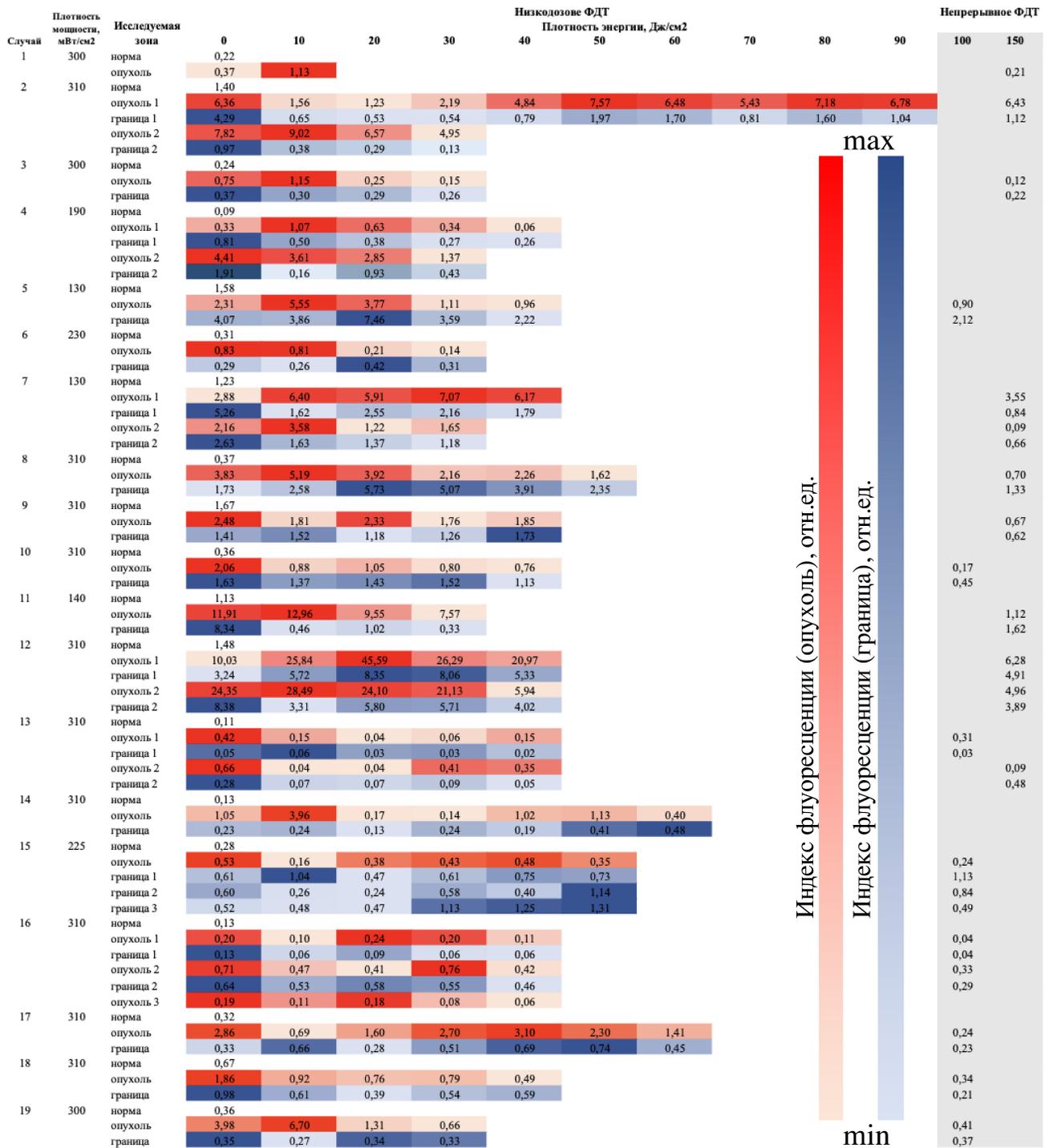


Рисунок 5.4 – Распределение индексов флуоресценции опухоли (красный маркер) и границы опухоли (синий маркер) в процессе предварительного лазерного облучения.

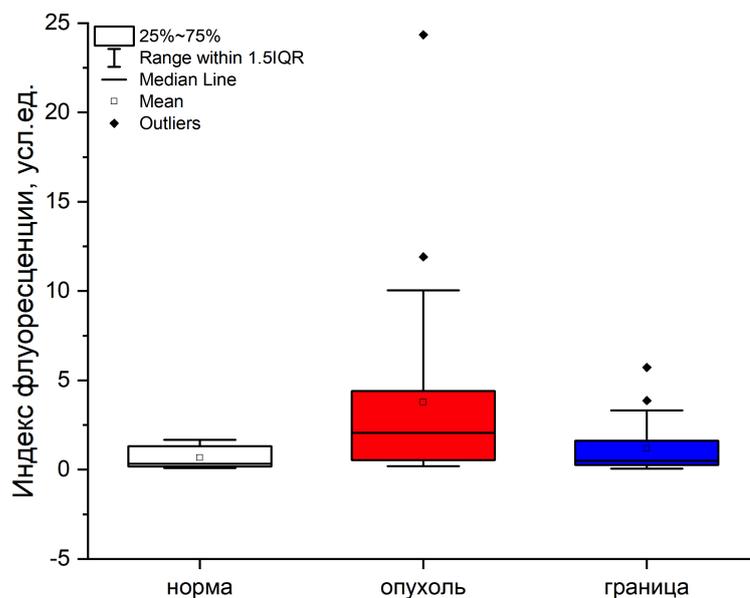


Рисунок 5.5 – Распределение индексов флуоресценции по всем пациентам спустя 3 часа после введения Себ до проведения ФДТ в нормальных тканях, опухоли и границе опухоли.

На Рисунке 5.6 представлено распределение коэффициента изменения индекса флуоресценции для каждой исследуемой зоны и распределение случаев достижения максимального значения k для каждой плотности энергии.

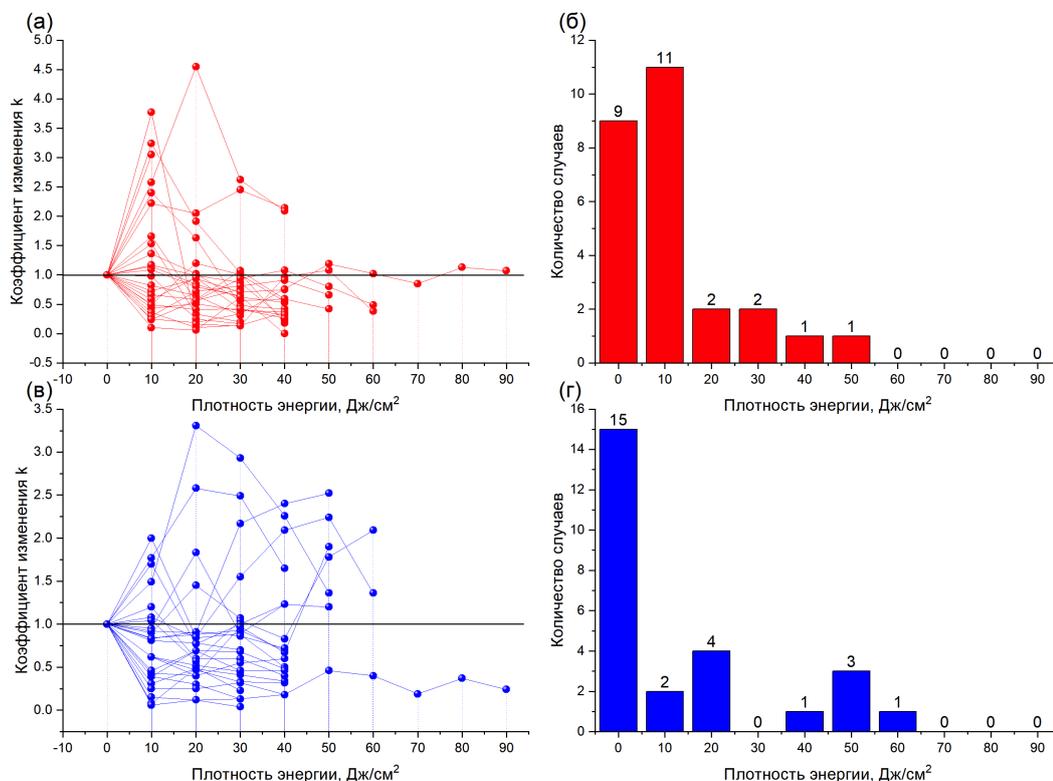


Рисунок 5.6 – Распределение коэффициента изменения индекса флуоресценции и количество случаев для каждой плотности энергии, в которых наблюдалось максимальное значение коэффициента k : (а,б) опухоль; (в,г) граница опухоли.

В опухоли после предварительного облучения с плотностью энергии 10 Дж/см^2 наблюдалось максимальное количество случаев, когда индекс флуоресценции превышал значения до облучения (Рисунок 5.6б). Тогда как в тканях границы опухоли наибольшее количество случаев с максимальным индексом флуоресценции наблюдалось до ФДТ (Рисунок 5.6г).

Следует отметить, что ограничивающим фактором полноценного проведения ФДТ при раке кожи является болевой синдром [170], появление которого во время лазерного облучения требует уменьшения плотности мощности или прекращения облучения, что может потребовать проведения повторных курсов ФДТ. Интенсивность боли во время ФДТ часто коррелирует с плотностью мощности лазерного излучения и временем фотодинамического воздействия [171]. В процессе проведения исследования было выявлено, что низкие дозы энергии излучения могут позволить уменьшить болевые ощущения в процессе ФДТ. Метод предварительного лазерного облучения может быть эффективным в клинических условиях за счет менее интенсивного повреждения кровеносных сосудов, вызванного низкой плотностью мощности излучения при ФДТ. В то время как высокая плотность мощности при Себ-ФДТ может резко снизить содержание доступного кислорода в опухолевых тканях, что приведет к неэффективному лечению [172]. Еще одним преимуществом предварительного лазерного облучения является то, что по изменению интенсивности флуоресценции в процессе терапии можно определить оптимальную дозу энергии, необходимую для обеспечения терапевтического эффекта [173]. Ранее авторы патента [174] сообщали, что при облучении опухолевой ткани терапевтическим световым излучением с плотностью мощности $100 - 800 \text{ мВт/см}^2$ и плотностью энергии $100 - 500 \text{ Дж/см}^2$ до введения АІРс и при низкодозовом облучении светом с плотностью мощности $20 - 800 \text{ мВт/см}^2$ и плотностью энергии $20 - 60 \text{ Дж/см}^2$ обеспечивается равномерность распределения АІРс в тканях опухоли и сокращается время экспозиции ФС.

Кинетика фотобличинга ФС в процессе ФДТ является одним из прогностических факторов эффективности фотодинамической реакции [175]. Следует отметить, что при наблюдении фотобличинга ФС путем *in vivo* регистрации флуоресценции оценка «истинной» скорости фотобличинга осложняется влиянием свойств поглощения и рассеяния тканей и, как следствие, неоднородным фотобличингом на разных глубинах. Неоднородность фотобличинга ФС также

может объясняться разницей в концентрации и распределении ФС в облучаемом объеме ткани и, следовательно, разным изменением его профиля по глубине в процессе ФДТ, а также, разницей в концентрации кислорода в поверхностных и более глубоких слоях биотканей, что может влиять на скорость фотообличинга в ходе фотохимических реакций [176]. В работе [177] было показано, что скорость образования синглетного кислорода увеличивается с увеличением концентрации Себ и дозы света (плотности энергии).

Для определения значения фотообличинга ФС требуется количественная оценка концентрации ФС в нормальных и опухолевых тканях до и после ФДТ [178]. В нашем исследовании концентрация ФС в биотканях количественно оценивалась посредством методов видео- и спектрально-флуоресцентной диагностики. Полученные результаты позволили рассчитать значение фотообличинга ФС. Фотообличинг не может быть единственным индикатором дозиметрии фотодинамического воздействия, так как генерация синглетного кислорода также зависит от микроокружения биоткани. Так, pO_2 может сильно различаться между тканями опухоли, границы опухоли и здоровыми тканями, в зависимости от развитости сосудистой сети тканей и скорости диффузии кислорода [179]. Как указывалось выше, это может влиять на скорость потребления кислорода и фотообличинг ФС во время ФДТ разных тканей при одинаковых плотностях мощности и энергии лазерного излучения [25]. Во время ФДТ концентрация кислорода в основном состоянии внутри кровеносных сосудов обычно считается постоянной и составляет приблизительно 80 мкМ [180]. Однако, ранее проведенные исследования показывают, что повышение температуры может вызывать относительное расширение сосудов биологической ткани, таким образом, увеличивая уровень снабжения тканей кислородом и, тем самым, увеличивая выработку синглетного кислорода при ФДТ. К примеру, авторы [181] наблюдали увеличение парциального давления кислорода в тканях на 32% при повышении температуры кожи на 2,7 °С. Клинические и лабораторные наблюдения показали, что изменение температуры может влиять на эффективность ФДТ, при этом более низкие температуры могут препятствовать эффективности ФДТ, а более высокие температуры приводят к улучшению результатов [182].

Температура на уровне 42 °С является важным температурным порогом, поскольку при более высоких температурах пациенты сообщают о болезненных ощущениях [183]. При этом сильное повышение внутриклеточной температу-

ры до 50 °С или выше может вызывать необратимые повреждения опухолевых клеток [184] и окружающих нормальных тканей. Авторы [185] при облучении кожи светом с длиной волны 635 нм и мощностью 110 мВт в течение 10 минут зарегистрировали повышение температуры на 2 – 4 °С. При этом через 3 – 4 минуты светового облучения температура оставалась почти постоянной, скорее всего, из-за увеличения притока крови к данной области. В нашем исследовании при измерении температуры с помощью ИК бесконтактного термометра Medisana FTN (Meckenheim, Германия) в зоне фотодинамического воздействия после каждого этапа облучения в 10 Дж/см² с плотностью мощностью 130-310 мВт/см² повышение температуры не наблюдалось.

В данном исследовании использовались ФС на основе Себ, которые наряду с 5-АЛК, являются наиболее часто применяемыми для ФДТ новообразований кожи [141]. Механизм разрушения опухоли при ФДТ происходит непосредственно через гибель опухолевых клеток из-за выделения синглетного кислорода и/или косвенно через нарушение сосудистой сети и воспаление. Считается, что 5-АЛК-опосредованная ФДТ оказывает меньшее воздействие на сосудистую систему, чем Себ [186]. При ФДТ с 5-АЛК вблизи зоны облучения наблюдается временное сосудистое сужение [87]. Между тем, оба ФС, как 5-АЛК, так и Себ могут стимулировать гибель клеток путем апоптоза, а в работе [187] авторы не наблюдали существенной разницы эффективности между применением 5-АЛК и Себ в лечении пациентов с базальноклеточной карциномой кожи. Однако согласно результатам прижизненной конфокальной микроскопии при 5-АЛК-ФДТ было выявлено уменьшение диаметра кровеносных сосудов после ФДТ менее чем на 80% диаметра, чем до ФДТ, в то время как в некоторых случаях непосредственно после ФДТ наблюдалась полная окклюзия сосудов [188].

Результаты сравнительного исследования тканевого распределения и селективности Себ, 5-АЛК и фотофрина на модели карциномы толстой кишки [189] показали, что при одинаковых параметрах облучения ФДТ в случае применения Себ наблюдалось более эффективное ингибирование роста опухоли, чем в случае применения 5-АЛК и Фотофрина. Также Себ вызывал минимальное повреждение нормальных тканей. В работе [190] было проведено численное моделирование изменения температуры поверхности кожи и глубоких участков дермы при импульсном и непрерывном облучении кожи светом с длиной волны 665 нм, соответствующим максимуму поглощения Себ. При непрерывном облу-

чении концентрация Себ слабо влияла на температурный режим ткани, что связано с особенностями нагрева среды красным светом, где основным тепловым процессом является передача тепла по объему ткани от эпидермиса, имеющего существенно больший коэффициент поглощения, чем у дермы в указанном спектральном диапазоне.

5.2 Концентрационное распределение Себ в процессе предварительного лазерного облучения

Проведение спектрально-флуоресцентной диагностики оптических фантомов с различными концентрациями Себ позволило количественно оценить концентрационное распределение в исследуемых тканях (Рисунок 5.7).

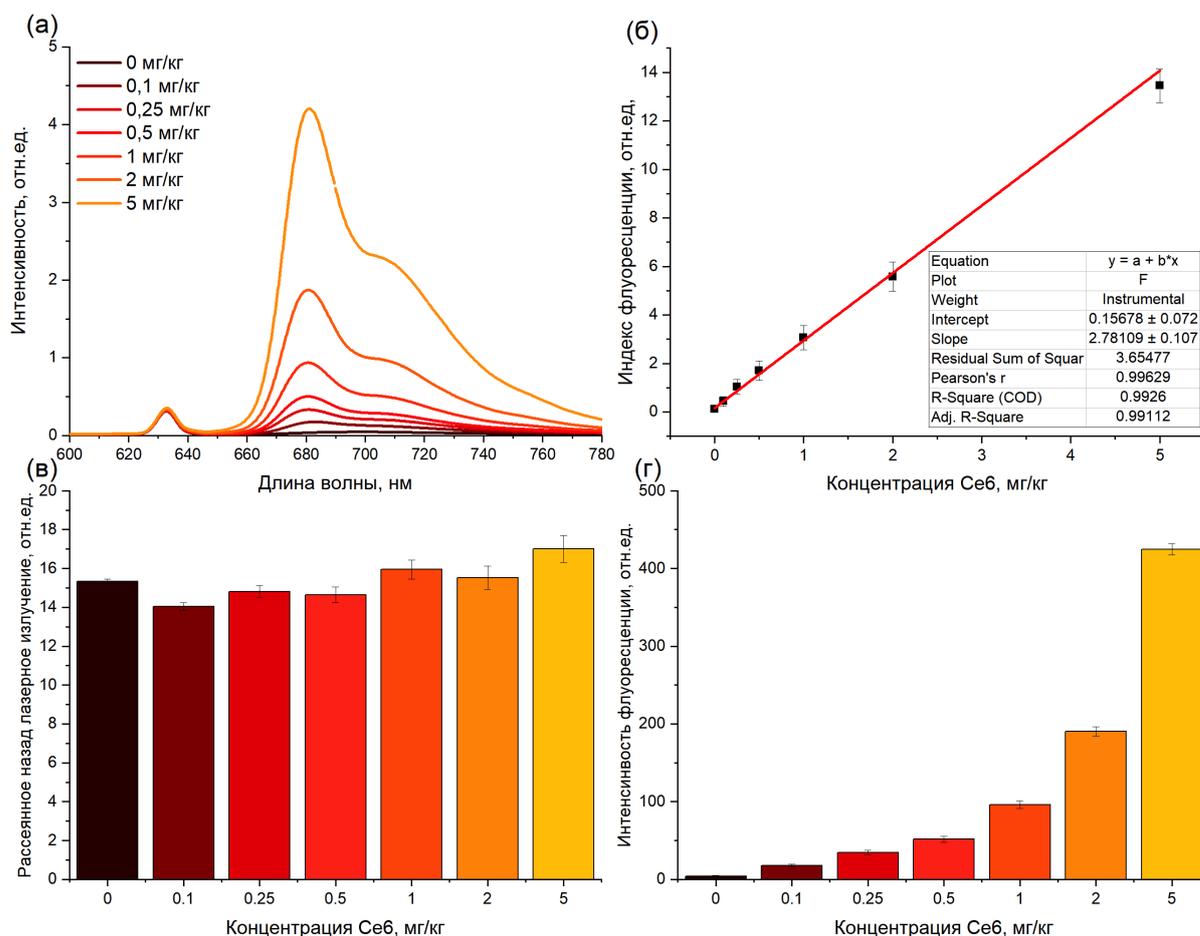


Рисунок 5.7 – Результаты спектрально-флуоресцентной диагностики оптических фантомов кожи человека, содержащих различные концентрации Себ: (а) спектры флуоресценции оптических фантомов; (б) распределение индексов флуоресценции; (в) распределение интенсивности диффузно рассеянного лазерного излучения; (г) распределение интенсивности флуоресценции Себ.

Как представлено на Рисунке 5.7 изменение концентрации Себ не вносит существенного вклада в распределение интенсивности рассеянного назад лазерного излучения. Индекс флуоресценции оптических фантомов изменялся по линейному закону:

$$IF = 0,16 + 2,78x \quad (5.2)$$

где IF — значения индексов флуоресценции; x — независимая переменная, определяющая концентрацию ФС. На Рисунке 5.8 представлено концентрационное распределение Себ в нормальных тканях, тканях опухоли и границы до и после предварительного лазерного облучения.

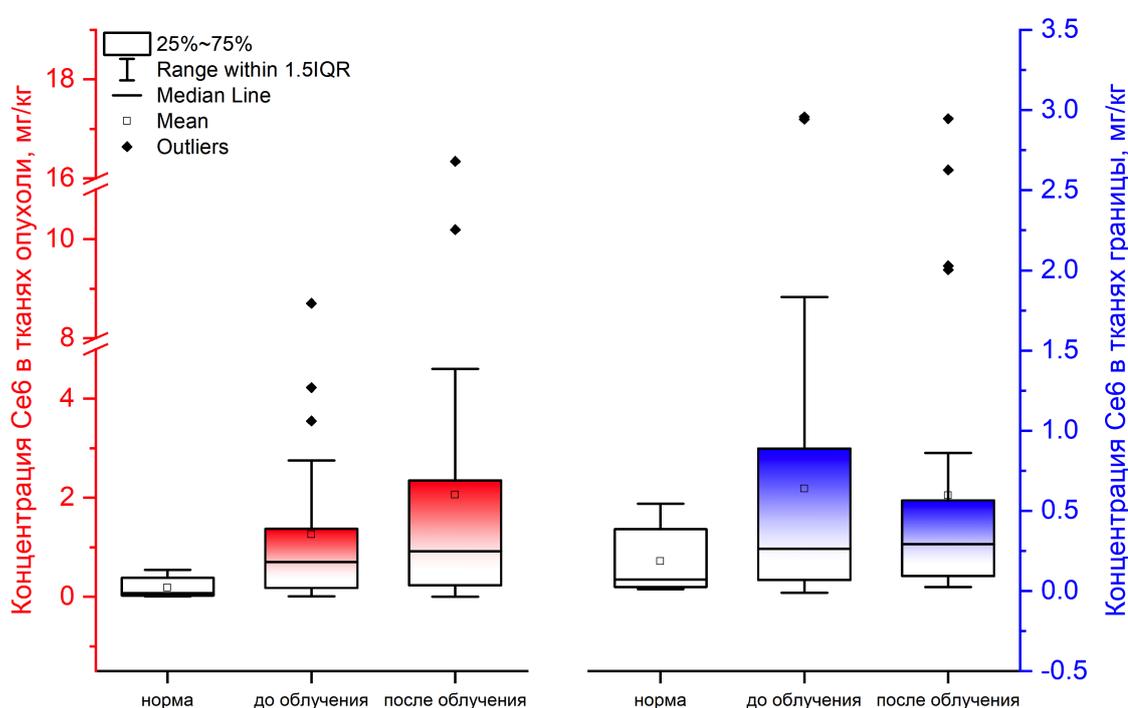


Рисунок 5.8 – Распределение концентраций Себ в норме (белый цвет), опухоли (красный цвет) и границе опухоли (синий цвет) до и после предварительного лазерного облучения.

Медиана выборки концентраций Себ до ФДТ в нормальных тканях 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 лазерного облучения с плотностью энергии 10 – 20 Дж/см² медианное значение концентрации Себ в опухоли составило 0,92 мг/кг (IQR=0,23 – 2,35 мг/кг), а в тканях границы опухоли - 0,29 мг/кг (IQR=0,09 – 0,57 мг/кг). Таким образом, в опухоли после предварительного лазерного облучения наблюдалось увеличение медианной концентрации Себ в 1,3 раза.

5.3 Микроскопическая оценка распределения Себ в опухоли после предварительного лазерного облучения

Микроскопическая оценка распределения Себ в тканях в центральной части и на границе опухоли и в нормальных тканях была проведена до и после низдозовой ФДТ с плотностью энергии 10 Дж/см² методом конфокальной микроскопии.

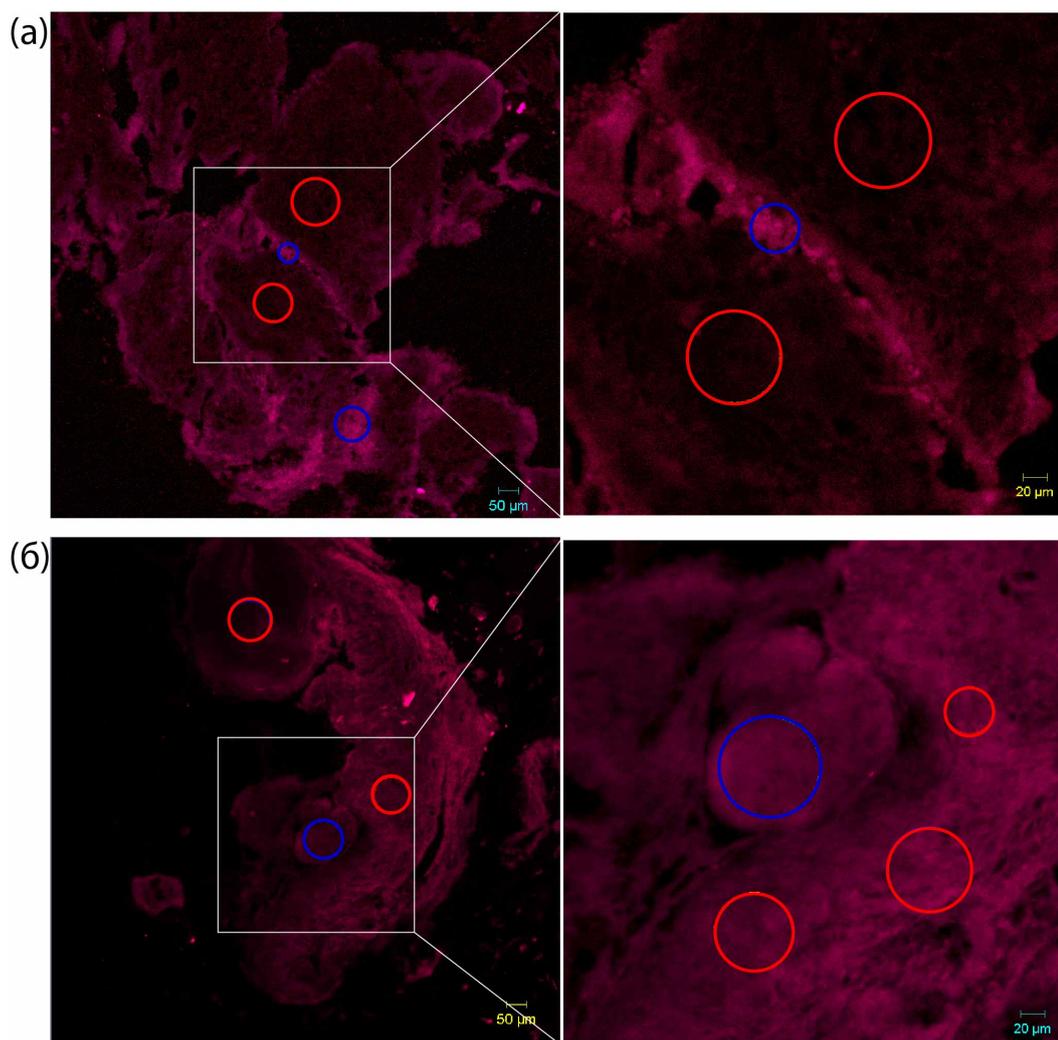


Рисунок 5.9 – Микроскопические флуоресцентные изображения тканей опухоли после внутривенного введения Себ (область кровеносного сосуда выделена синим; область паренхимы опухоли выделена красным): (а) до облучения; (б) после предварительного лазерного облучения.

Увеличение интенсивности флуоресценции Себ после предварительного лазерного облучения также наблюдалось по результатам проведения лазерной

сканирующей конфокальной микроскопии. В качестве наглядного результата на Рисунке 5.9 представлены микроскопические флуоресцентные изображения криосрезов тканей опухоли пациента с БКР спустя 3 часа после внутривенного капельного введения Себ до и после ФДТ с плотностью мощности 310 мВт/см² и плотностью энергии 10 Дж/см².

Данные результаты демонстрируют, что до предварительного лазерного облучения Себ преимущественно локализован в русле кровеносного сосуда. После ФДТ наблюдалось тромбирование кровеносных сосудов, а интенсивная флуоресценция Себ обнаруживалась и в тканях паренхимы опухоли. На Рисунке 5.10 представлены спектры флуоресценции выделенной области кровеносного сосуда (синий цвет) и области паренхимы опухоли (красный цвет).

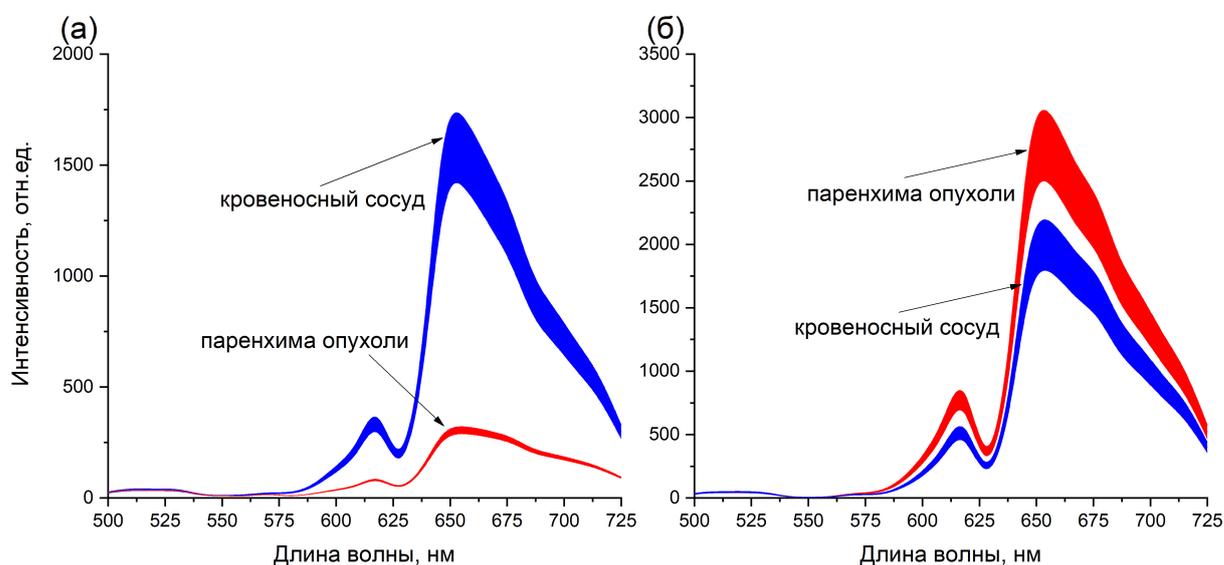


Рисунок 5.10 – Спектры флуоресценции криосрезов опухоли спустя 3 часа после внутривенного капельного введения Себ: (а) до ФДТ; (б) после ФДТ с плотностью мощности 310 мВт/см² и плотностью энергии 10 Дж/см².

На полученных спектрах наблюдался интенсивный пик флуоресценции на длине волны 665 нм, характерный для флуоресценции Себ. Также была оценена интегральная интенсивность флуоресценции в выбранных зонах, результаты которой представлены на Рисунке 5.11.

Полученные результаты демонстрируют, что наибольшая интенсивность флуоресценции Себ до ФДТ наблюдалась в области кровеносных сосудов, однако после фотодинамического воздействия с низкой плотностью энергии излучения интенсивность флуоресценции Себ в близлежащих тканях опухоли возросла.

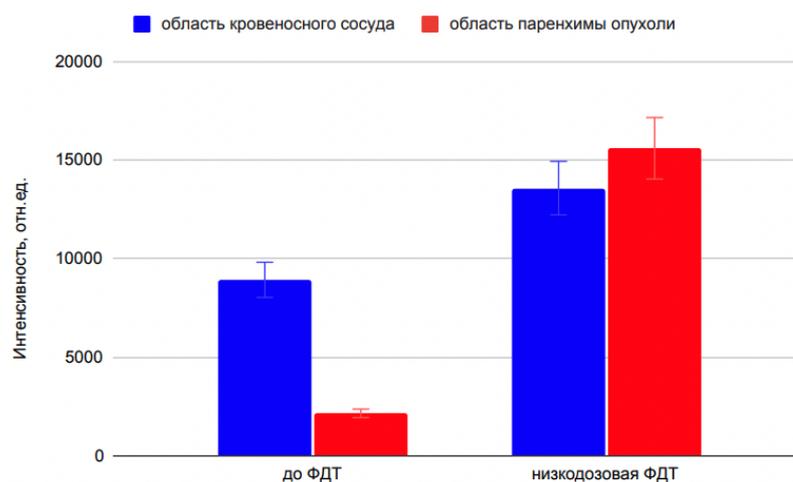


Рисунок 5.11 – Распределение интенсивности флуоресценции в области кровеносного сосуда и тканей опухоли до и после предварительного облучения.

Себ преимущественно является ФС сосудистого типа и накапливается в сосудистой системе опухоли за счет эффекта «повышенной проницаемости и удерживания» [191], что обеспечивает большую диффузию циркулирующих лекарственных средств в ткани опухоли. Ранее было показано, ФС хлоринового ряда преимущественно накапливаются в клетках эндотелия сосудов, а при ФДТ повреждаются эндотелий сосудов, что приводит к запуску процесса тромбирования сосудов [192]. Полученные нами микроскопические флуоресцентные изображения тканей опухоли спустя 3 часа после внутривенного введения Себ выявили увеличение интенсивности флуоресценции Себ в опухоли после предварительного лазерного облучения. При этом до ФДТ максимальная интенсивность флуоресценции наблюдалась в кровеносных сосудах. Мы предполагаем, что после предварительного лазерного облучения с плотностью энергии $10 - 20 \text{ Дж/см}^2$ и плотностью мощностью $130 - 310 \text{ мВт/см}^2$ происходит локальное тромбирование кровеносных сосудов и за счет уменьшения скорости потока крови происходит увеличение скорости диффузии Себ в ткани опухоли. ФС может диффундировать из кровеносных сосудов в окружающие ткани в соответствии с законами диффузии Фика [193] (Рисунок 5.12).

Циркулирующий по кровеносным сосудам Себ способен легко диффундировать в опухолевую ткань за счет их большей проницаемости в сравнении с сосудами здоровой ткани [100]. Кровеносные сосуды в опухоли неспособны к эффективному кровообращению, а растущие ткани опухоли сдавливают более мелкие сосуды делая их еще менее способными транспортировать кровь.

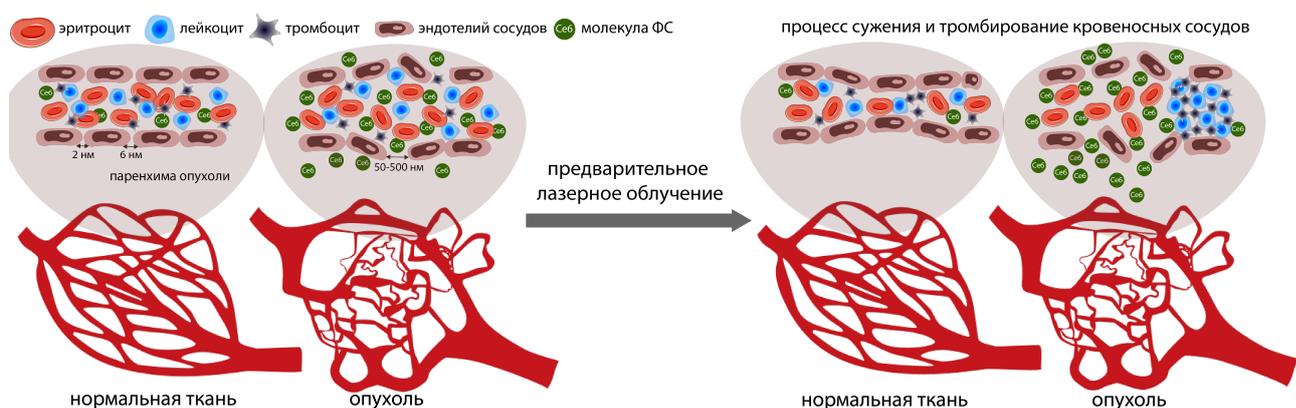


Рисунок 5.12 – Схема васкуляризации сосудистой системы тканей, сужения и тромбирования кровеносных сосудов в процессе предварительного лазерного облучения.

Следует отметить, что Себ демонстрирует слабое внутриклеточное накопление [194]. Авторы [103] отмечали, что при инкубации раковых клеток линии 9L/lacZ с Себ в течении 1 часа (концентрация Себ - 200 мг/мл), ФС преимущественно накапливается не в ядре клеток, а в цитоплазме. При этом, ФДТ светом $\lambda = 660 \pm 5$ нм, плотностью энергии 10 Дж/см² и плотностью мощности 25 мВт/см² у 76% клеток запускала гибель клеток по апоптозу, тогда как у 24% клеток отмечался некроз.

5.4 Спектроскопическая оценка оксигенации гемоглобина в процессе предварительного лазерного облучения

На Рисунке 5.13 представлены результаты спектроскопической оценки оксигенации гемоглобина в опухоли и границе опухоли пациента с раком кожи, у которого в процессе предварительного лазерного облучения помимо спектрально-флуоресцентной диагностики проводился оптико-спектральный контроль сатурации. На полученных спектрах наблюдаются характерные пики оксигемоглобина при 542 нм и 576 нм. До ФДТ уровень оксигенации гемоглобина в опухоли составляла 75,1%, а в тканях границы опухоли 56,4%. Согласно результатам некоторых авторов, соотношение артериальной и венозной крови составляет приблизительно 25/75%, а верхний предел оксигенации колеблется в диапазоне 81-86% [195].

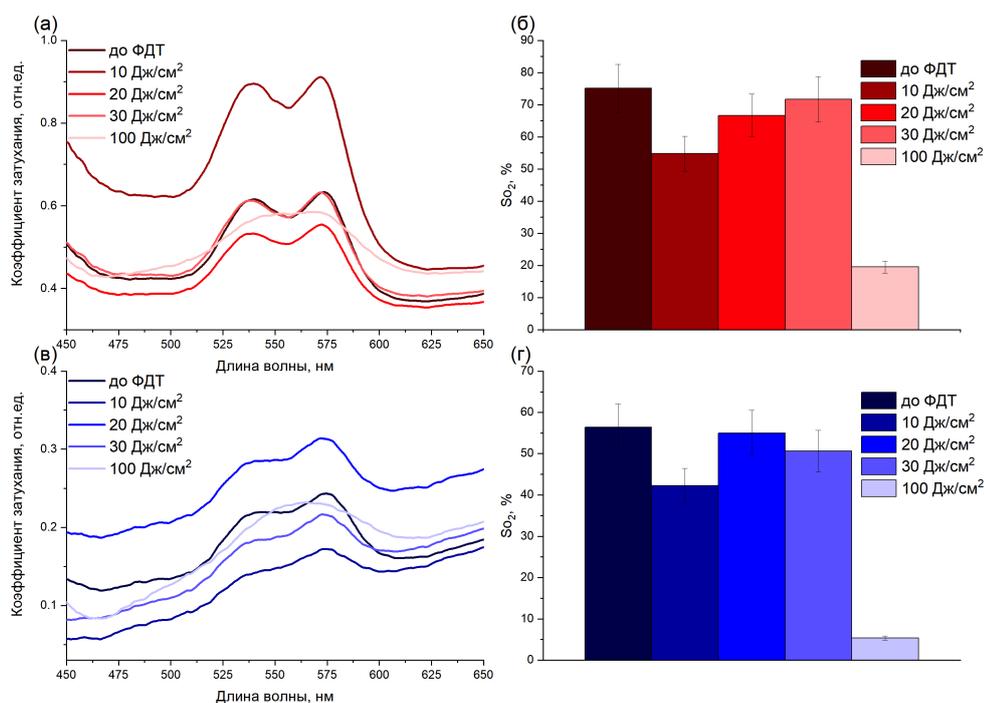


Рисунок 5.13 – Результаты спектроскопического контроля оксигенации в опухоли и границе опухоли: (а,в) спектры коэффициента ослабления света в диапазоне длин волн, в пределах которого рассчитывалась оксигенация гемоглобина; (б,г) оксигенация.

После предварительного лазерного облучения с плотностью энергии 10 Дж/см² оксигенация уменьшилась на 27% в тканях опухоли и на 25% в тканях границы опухоли. При дальнейшем фотодинамическом воздействии наблюдалось увеличение оксигенации и достижение уровня значений до ФДТ, однако после непрерывного ФДТ с плотностью мощности 700 мВт/см² и плотностью энергии 100 Дж/см² наблюдалась полная окклюзия кровеносных сосудов.

5.5 Клиническая эффективность предварительного лазерного облучения опухоли

Исследование клинической эффективности применения предварительного лазерного облучения проводилось в рамках стандартных процедур в Институте кластерной онкологии им. Л.Л.Левшина Сеченовского университета. В исследование вошли 19 пациентов в возрасте от 37 до 80 лет с морфологически подтвержденным раком кожи. Каждое исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Все пациенты подписывали информированное согласие на участие в исследовании.

ФДТ выполнялась последовательно в каждой зоне исследования. В процессе

проведения фотодинамического воздействия резюмировались болевые ощущения пациентов. Во время поступления пациентов фиксировались фотографии для документирования клинического результата. Эффективность обработанных зон оценивали через 1, 3, 5 и 14 дней после ФДТ. При наблюдении полной регрессии опухоли спустя 21 – 28 дней после 1 процедуры ФДТ проводилось гистологическое исследование биопсийного материала пациента.

Сравнительный анализ изменения индексов флуоресценции до и после предварительного лазерного облучения проводился с использованием методов математической статистики. За значения индексов флуоресценции после предварительного лазерного облучения принимались максимальные значения индексов флуоресценции в каждом случае. Для сравнения непараметрических данных, представленных в Таблице 5.2, использовался *W*-критерий знакового ранга Вилкоксона. Статистически значимыми считались значения $p < 0.01$.

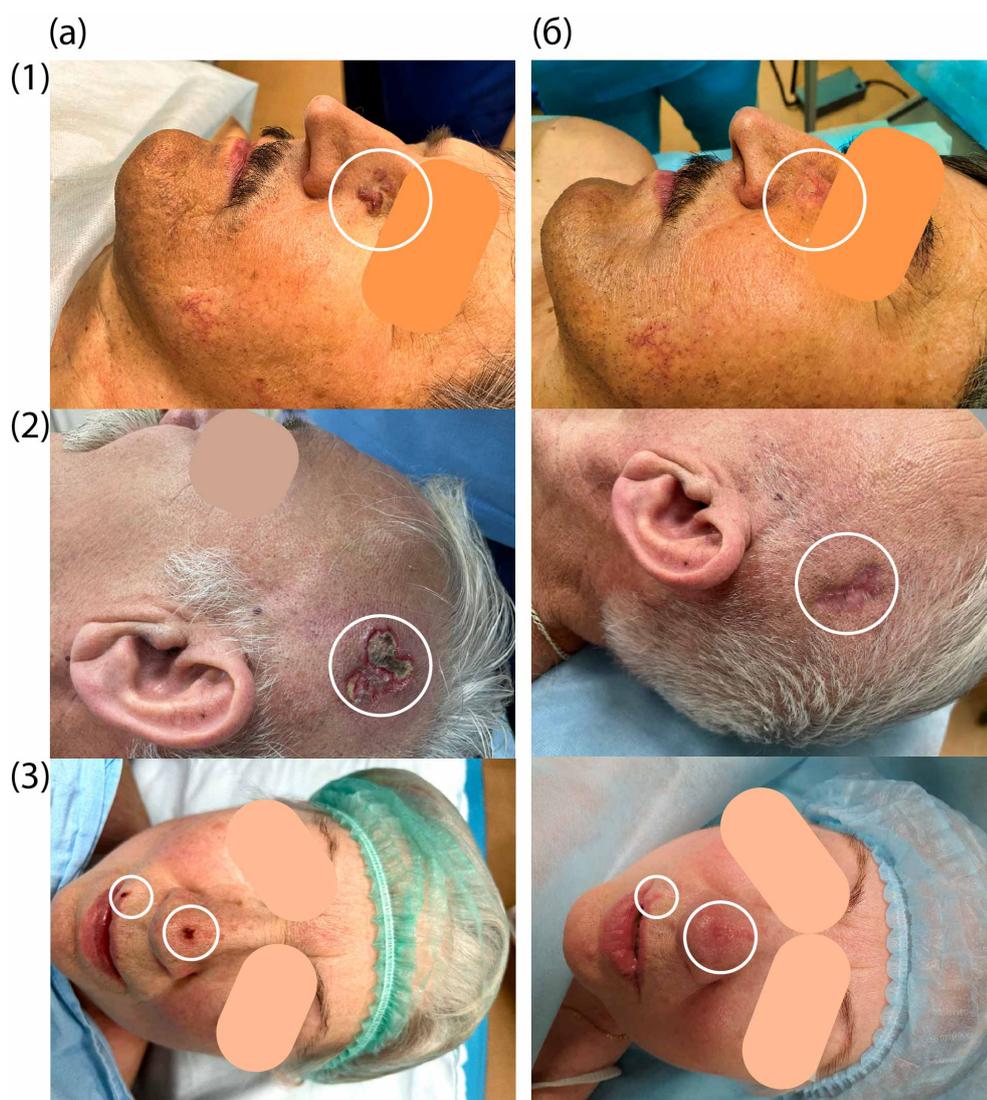


Рисунок 5.14 – Изображения опухолей кожи до ФДТ и спустя 1 месяц после ФДТ.

Предварительное лазерное облучение позволила получить у пациентов хороший терапевтический эффект уже после первого курса ФДТ. Результат нескольких таких случаев представлен на Рисунке 5.14. После ФДТ у пациента отмечалась полная регрессия опухоли с формированием небольшого рубца, что значительно повысило качество его жизни. По результатам гистологического исследования фрагмента кожи спустя 1 месяц после ФДТ наблюдалась гиперплазия эпидермиса с выраженным фиброзом дермы и периваскулярными лимфоидными инфильтратами. В объеме полученного материала опухолевого роста не наблюдалась. Описанные изменения могут иметь место при лечебном патоморфозе IV степени.

У 7 пациентов после проведения 1 курса ФДТ наблюдалась полная регрессия опухоли. При неполной регрессии опухоли 12 пациентам проводился повторный курс ФДТ, после которого полная регрессия опухоли была отмечена еще у 9 пациентов, что также подтверждено результатами гистологического исследования. У оставшихся 3 пациентов с T3-4N0M0 при визуальной регрессии опухоли после второго курса ФДТ также была взята контрольная биопсия. При гистологическом исследовании получен лечебный патоморфоз II-III степени, что потребовало проведения третьего курса ФДТ. К сожалению, хирургическое лечение в этих случаях ограничено локализацией и объемом опухоли. Отсутствие роста опухоли и антибластика за счет ФДТ в этих клинических случаях является положительным эффектом, а с учетом лечебного патоморфоза позволяет достичь длительного терапевтического эффекта.

Заключение к главе 5

Разработан метод предварительного лазерного облучения фотодинамического воздействия на ткани опухоли с применением ФС на основе Себ. У всех пациентов ($n=19$), включенных в исследование, спустя 3 – 3,5 часа после капельного внутривенного введения Себ в дозе 1 мг/кг методами видео- и спектрально-флуоресцентной диагностики выявлено преимущественное накопление ФС в тканях опухоли и ее границы (~ 5 мм).

Предварительное облучение лазерным излучением $\lambda=660\pm 5$ нм с плотностью мощности 130 – 310 мВт/см² и шагом плотности энергии, не превышающей 10 Дж/см², позволяет избежать быстрого преднамеренного разрушения

/ тромбирования сосудистой системы опухоли. Разработанный метод позволил увеличить концентрацию Себ в тканях опухоли в 65% случаев после 2-3 предварительных световых воздействий ($p < 0.01$, ранговый W-критерий Вилкоксона для $n=26$), тогда как в тканях границы опухоли наблюдалось уменьшение концентрации Себ. Выявлено, что после предварительного низкоинтенсивного лазерного облучения опухоли с плотностью энергии 10 – 20 Дж/см² медианное значение концентрации Себ увеличилось в 1,3 раза и составило 0,92 мг/кг (IQR=0,23 – 2,35 мг/кг).

Методами конфокальной флуоресцентной микроскопии опухоли выявлено, что Себ до фотодинамического воздействия преимущественно локализован в кровеносных сосудах опухоли. После ФДТ с плотностью энергии 10–20 Дж/см² наблюдается увеличение концентрации Себ в тканях паренхимы опухоли и достижение значений, наблюдаемых непосредственно в зоне кровеносных сосудов. Предварительное лазерное облучение позволяет избежать полного тромбирования кровеносных сосудов, что может обеспечить поступление ФС и кислорода, содержащихся в крови в облучаемые ткани в процессе светового воздействия и, тем самым, увеличить эффект ФДТ.

Разработанный метод предварительного лазерного облучения представляется оптимальным подходом, не вызывающим сильных болевых ощущений у пациентов в процессе фотодинамического воздействия, позволяющий локально увеличить концентрацию Себ в тканях опухоли, сократить время экспозиции или дозы вводимого ФС, уменьшить количество проводимых процедур ФДТ и избежать фотоповреждения здоровых тканей.

Заключение и выводы

1. Разработанный метод спектроскопического контроля процесса лазерного облучения опухолей с применением PrIX 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 фотобличинга 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, содержа-

щих 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 иллюстраций

Рисунок 1.1	Спектры поглощения и флуоресценции эндогенных флуорофоров [14].	16
Рисунок 1.2	Глубина проникновения лазерного излучения в модели кожи: (а) глубина проникновения сверху вниз; (б) распределение плотности потока [4].	17
Рисунок 1.3	Механизмы фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики.	21
Рисунок 1.4	Схема фотовозбуждения и фотобликинга ФС в присутствии кислорода и биомолекул. S_0 , S_1 и T_1 - основное, возбужденные синглетное и триплетные состояния ФС. 3O_2 и 1O_2 - основное триплетное и возбужденное синглетное состояние кислорода. O_2^- - супероксид, HO_2^* - гидропероксильный радикал, H_2O_2 - пероксид водорода.	22
Рисунок 1.5	Схема электронных переходов между основным и синглетными уровнями молекулы кислорода [36].	24
Рисунок 1.6	Механизмы разрушения опухоли при ФДТ [55].	29
Рисунок 2.1	Спектры: (а) поглощения Себ и РрIX; (б) флуоресценции Себ и РрIX. Себ растворен в дистиллированной воде. РрIX растворен в диметилсульфоксиде (ДМСО).	36
Рисунок 2.2	Схематическое устройство установки ЛЭСА-01-БИОСПЕК [111].	39
Рисунок 2.3	Схематическое устройство двухканальной видео-флуоресцентной системы УФФ-630/675-01-БИОСПЕК [113].	40
Рисунок 2.4	Схема получения изображений видео-флуоресцентной системой УФФ-630/675-01-БИОСПЕК в совмещенном режиме работы.	41

Рисунок 2.5	Схема приготовления оптических фантомов на основе жировой эмульсии: (а) процесс добавления основных компонент; (б) результаты визуализации оптических фантомов, содержащих ФС в различных концентрациях.	42
Рисунок 2.6	Распределения коэффициента рассеяния, редуцированного коэффициента рассеяния и фактора анизотропии Intralipid 10%.	43
Рисунок 2.7	Схема системы, реализующей методы спектрально-флуоресцентной диагностики или спектроскопии ОДО.	45
Рисунок 2.8	Спектры поглощения оксигенированного (HbO_2) и дезоксигенированного (Hb) гемоглобина.	48
Рисунок 2.9	Блок-схема алгоритма моделирования ММК [12].	49
Рисунок 2.10	Лазерный сканирующий микроскоп Zeiss LSM и оптическая схема работы конфокального микроскопа	51
Рисунок 3.1	Спектры пропускания оптических фильтров ОФ1, ОФ2 и ОФ3 и нормированные спектры поглощения и флуоресценции РrIX и Себ.	54
Рисунок 3.2	Аппаратная функция спектрометра в случае проведения фототераностики в БИК-диапазоне.	55
Рисунок 3.3	Схема лазерно-индуцированного спектрального контроля процесса фототераностики оптических фантомов.	56
Рисунок 3.4	Режимы фототераностики биологических тканей: (а) в “мягком контакте”, когда волоконно-оптический зонд находится в контакте с тканями опухоли; (б) в процессе ФДТ, когда волоконно-оптический зонд находится на расстоянии от опухоли.	57
Рисунок 3.5	Спектроскопическая диагностика оптических фантомов с регистрацией флуоресценции ФС в красном и БИК-диапазонах: (а) фантом с РrIX; (б) фантом с Себ.	58
Рисунок 3.6	Спектроскопическая диагностика в БИК-диапазоне: (а,б) фантомы с РrIX; (в,г) фантомы с Себ.	58
Рисунок 3.7	Распределение индексов флуоресценции оптических фантомов: (а) фантомы с РrIX; (б) фантомы с Себ.	59

Рисунок 3.8	Коэффициенты флуоресцентной контрастности фантомов с РрІХ/Себ при возбуждении флуоресценции ФС на длинах волн 635 и 660 нм.	60
Рисунок 3.9	Распределение соотношения «сигнал/шум» фантомов с РрІХ и Себ при возбуждении флуоресценции на длинах волн 635 и 660 нм.	61
Рисунок 3.10	Спектры оптических фантомов с РрІХ или Себ зарегистрированные при плотностях мощности лазерного излучения 64, 160, 320, 480, 640 и 800 мВт/см ²	61
Рисунок 3.11	Спектроскопическая диагностика кожи человека, оптических фантомов без ФС (Intralipid 1.6%) и содержащих РрІХ или Себ в концентрации 0,1 мг/кг в БИК-диапазоне: (а) $\lambda_{exc}=635$ нм; (б) $\lambda_{exc}=660$ нм.	63
Рисунок 3.12	Спектры флуоресценции кожи, жировой эмульсии и фантомов, содержащих РрІХ и Себ: (а) $\lambda_{exc}=635$ нм; (б) $\lambda_{exc}=660$ нм.	64
Рисунок 3.13	Спектроскопическая диагностика в процессе лазерного облучения: (а) спектры фантома с РрІХ, $C_{PpIX}=2$ мг/кг; (б) спектры фантома с Себ, $C_{Se6}=2$ мг/кг; (в) распределение интенсивностей диффузно отраженного лазерного излучения и флуоресценции РрІХ, $\lambda_{exc} = 635$ нм; (г) распределение интенсивностей диффузно отраженного лазерного излучения и флуоресценции Себ, $\lambda_{exc} = 660$ нм.	66
Рисунок 3.14	Распределение индексов флуоресценции в процессе лазерного облучения оптических фантомов, содержащих ФС в концентрации 0, 1, 2 и 5 мг/кг: (а) фантомы с РрІХ, $\lambda_{exc}=635$ нм; (б) фантомы с Себ, $\lambda_{exc}=660$ нм. . .	67
Рисунок 3.15	Схема поэтапного проведения видео-флуоресцентной визуализации и спектроскопической флуоресцентной диагностики опухоли.	68
Рисунок 3.16	Флуоресцентная визуализация опухоли пациента с лейкоплакией полости рта и результаты спектроскопической диагностики: (а) до ФДТ; (б) сразу после ФДТ. . .	69

Рисунок 3.17	Флуоресцентная визуализация опухоли пациента с БКР и результаты спектроскопической диагностики: (а) до ФДТ; (б) сразу после ФДТ.	70
Рисунок 3.18	Распределение индексов флуоресценции до и после ФДТ: (а) лейкоплакия полости рта с накоплением 5-АЛК индуцированного РrIX; (б) БКР с накоплением Себ.	71
Рисунок 3.19	Спектроскопический контроль ФДТ опухоли в процессе лазерного облучения: (а) спектральная информация; (б) распределение индексов флуоресценции.	71
Рисунок 3.20	Распределение интенсивностей диффузно отраженного лазерного излучения и флуоресценции Себ и результаты видео-капилляроскопии опухоли до и после ФДТ.	73
Рисунок 3.21	Схема проведения спектроскопического комбинированного контроля фотодинамического воздействия на биологические ткани.	76
Рисунок 3.22	Спектры поглощения и флуоресценции Себ и спектр излучения полупроводникового лазера с длиной волны генерации 660 нм.	76
Рисунок 3.23	Спектры оптической плотности фильтров установленных перед спектрометром и источником белого света.	77
Рисунок 3.24	Спектроскопический комбинированный контроль лазерно-индуцированного фотодинамического воздействия: (а) диффузно отраженные белый свет и лазерное излучение, а также флуоресценция Себ в БИК-диапазоне; (б) поглощение гемоглобина.	78
Рисунок 3.25	Схема экспериментальной установки для исследования фотодинамической активности ФС.	78
Рисунок 3.26	Распределения интенсивностей диффузного пропускания лазерного излучения, флуоресценции Себ и оксигенации гемоглобина в процессе лазерного облучения. Концентрации Себ - 5, 10, 20 и 30 мг/л. Временной интервал регистрации спектров - 5 сек.	80

Рисунок 3.27	Распределения интенсивностей диффузного пропускания лазерного излучения, флуоресценции Себ и оксигенации гемоглобина.	81
Рисунок 3.28	Интраоперационный процесс фототераностики с комбинированным спектроскопическим контролем и видеофлуоресцентной визуализации опухоли.	82
Рисунок 3.29	Спектроскопический комбинированный контроль фототераностики 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.	83
Рисунок 3.30	Распределение интенсивностей флуоресценции в процессе лазерного облучения фантома на основе жировой эмульсии, эритроцитарной массы и опухоли.	84
Рисунок 4.1	Методы ИК-визуализации кровеносных сосудов: (а) камера; (б) источник лазерного излучения.	88
Рисунок 4.2	3D модель устройства: (1) основание; (2) корпус.	89
Рисунок 4.3	Наиболее вероятное распределение фотонов между двумя источниками: (а) $\lambda=532$ нм; (б) $\lambda=632,8$ нм (1 - эксперимент, 2 – моделирование ММК, 3 – диффузионное приближение, 4 – пересечение 1 и 2).	90
Рисунок 4.4	Разъем системы оптических волокон.	90
Рисунок 4.5	Размеры адаптера для соединения двух SMA разъемов и ввод лазерного излучения в систему оптических волокон (1 - SMA разъем системы оптических волокон; 2 - SMA разъем оптического волокна, вводящего лазерное излучение).	91
Рисунок 4.6	Пример регистрируемых изображений, внешний вид устройства для визуализации кровеносных сосудов и схема его работы: (1) ИК камера; (2) объектив; (3) оптические волокна; (4) кожа; (5) зондирующее лазерное излучение; (6) кровеносные сосуды.	92

Рисунок 4.7	Схема проведения исследования по определению оптимальной длины волны лазерного излучения для ИК-визуализации кровеносных сосудов.	93
Рисунок 4.8	Этапы численной оценки резкости границ кровеносного сосуда: (а) изображение кровеносного сосуда с выделенной прямоугольной зоной для анализа; (б) усредненный горизонтальный профиль; (в) производная профиля. . .	93
Рисунок 4.9	Спектры поглощения дезоксигемоглобина (Hb), оксигемоглобина (HbO_2), жира, меланина и воды.	94
Рисунок 4.10	Изображения выделенной прямоугольной зоны кровеносного сосуда диаметром 2 мм, отсортированные слева направо по убыванию коэффициента резкости. Пунктирными линиями указаны истинные границы кровеносного сосуда.	95
Рисунок 4.11	Зависимость коэффициента резкости (синяя кривая) и величины $\mu_{\text{вен}} - \mu_{\text{ткани}}$ (красная кривая) от длины волны лазерного излучения.	96
Рисунок 4.12	Изображения кровеносных сосудов полученных с одного участка тела на разных длинах волн в диапазоне 750 – 860 нм.	97
Рисунок 4.13	Структура строения кожи человека.	97
Рисунок 4.14	Результаты моделирования ММК наиболее вероятного распределения фотонов между двумя источниками фотонов в модели кожи человека.	99
Рисунок 4.15	Зависимость глубины зондирования фотонов при изменении расстояния между оптическими волокнами. . . .	100
Рисунок 4.16	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.	101

Рисунок 4.17	Изображения тканей опухоли в цветном режиме и полученные методом обратно рассеянного лазерного излучения до и после ФДТ.	102
Рисунок 4.18	Спектроскопический контроль фототерапии опухоли в процессе лазерного облучения: (а) регистрируемая спектральная информация; (б) распределение индексов флуоресценции опухоли. Время экспозиции - 20 мс. Временной интервал регистрации спектров - 3 сек.	103
Рисунок 4.19	Распределение интенсивностей диффузно отраженного лазерного излучения (650 – 670 нм) и флуоресценции Се6 (725 – 800 нм).	103
Рисунок 4.20	Изображения сосудистой системы в зоне опухоли, полученные методом регистрации обратно рассеянного лазерного излучения и соответствующие распределения интенсивностей профилей яркости вдоль выделенных маркеров.	104
Рисунок 4.21	Результаты спектроскопической оценки оксигенации и лазерно-индуцированной ФД опухоли кожи в 3-х зонах до и после ФДТ. Плотность мощности лазерного излучения при ФДТ - 565 мВт/см ² . Суммарная плотность энергии в зоне (1) - 200 Дж/см ² , в зонах (2),(3) - 130 Дж/см ²	105
Рисунок 5.1	Видео-флуоресцентная визуализация опухоли до и после ФДТ. (а,г) в цветном режиме; (б,д) в Ч/Б режиме; (в,е) в совмещенном режиме (стрелками указаны коэффициенты контрастности флуоресценции опухоли - красный цвет, границы опухоли - синий цвет и нормальной ткани - белый цвет).	110
Рисунок 5.2	Результаты спектрально-флуоресцентной диагностики кожи пациента: (а) до облучения; (б-е) в процессе предварительного облучения.	111
Рисунок 5.3	Распределение индексов флуоресценции в нормальных тканях, тканях опухоли и ее границы до и после лазерного облучения.	111

Рисунок 5.4	Распределение индексов флуоресценции опухоли (красный маркер) и границы опухоли (синий маркер) в процессе предварительного лазерного облучения.	113
Рисунок 5.5	Распределение индексов флуоресценции по всем пациентам спустя 3 часа после введения Себ до проведения ФДТ в нормальных тканях, опухоли и границе опухоли.	114
Рисунок 5.6	Распределение коэффициента изменения индекса флуоресценции и количество случаев для каждой плотности энергии, в которых наблюдалось максимальное значение коэффициента k : (а,б) опухоль; (в,г) граница опухоли.	114
Рисунок 5.7	Результаты спектрально-флуоресцентной диагностики оптических фантомов кожи человека, содержащих различные концентрации Себ: (а) спектры флуоресценции оптических фантомов; (б) распределение индексов флуоресценции; (в) распределение интенсивности диффузно рассеянного лазерного излучения; (г) распределение интенсивности флуоресценции Себ.	118
Рисунок 5.8	Распределение концентраций Себ в норме (белый цвет), опухоли (красный цвет) и границе опухоли (синий цвет) до и после предварительного лазерного облучения. . . .	119
Рисунок 5.9	Микроскопические флуоресцентные изображения тканей опухоли после внутривенного введения Себ (область кровеносного сосуда выделена синим; область паренхимы опухоли выделена красным): (а) до облучения; (б) после предварительного лазерного облучения.	120
Рисунок 5.10	Спектры флуоресценции криосрезов опухоли спустя 3 часа после внутривенного капельного введения Себ: (а) до ФДТ; (б) после ФДТ с плотностью мощности 310 мВт/см ² и плотностью энергии 10 Дж/см ²	121
Рисунок 5.11	Распределение интенсивности флуоресценции в области кровеносного сосуда и тканей опухоли до и после предварительного облучения.	122

Рисунок 5.12	Схема васкуляризации сосудистой системы тканей, сужения и тромбирования кровеносных сосудов в процессе предварительного лазерного облучения.	123
Рисунок 5.13	Результаты спектроскопического контроля оксигенации в опухоли и границе опухоли: (а,в) спектры коэффициента ослабления света в диапазоне длин волн, в пределах которого рассчитывалась оксигенация гемоглобина; (б,г) оксигенация.	124
Рисунок 5.14	Изображения опухолей кожи до ФДТ и спустя 1 месяц после ФДТ.	125
Итого всего рисунков: 81.		

Список таблиц

Таблица 2.1	Основные параметры ФС, использованных в исследованиях	38
Таблица 2.2	Параметры для расчета фактора анизотропии, коэффициента рассеяния, редуцированного коэффициента рассеяния и соответствующих коэффициентов детерминации сглаживания	43
Таблица 4.1	Основные свойства полилактида	90
Таблица 4.2	Оптические параметры кожи для длины волны 800 нм . .	98

Итого всего таблиц: 4.

Литература

1. B. Pogue. Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry // Journal of biomedical optics. 2006. Т. 11, № 4. с. 041102.
2. Efendiev K. Alekseeva P. Bikmukhametova I. at 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.
3. Croce A. Bottiroli G. Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis // European journal of histochemistry: EJH. 2014. Т. 58, № 4.
4. Ruiz A. LaRoche E. Samkoe K. 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.
5. Efendiev K. Alekseeva P. Shiryaev A. at al. Near-infrared phototheranostics of tumors with protoporphyrin IX and chlorin e6 photosensitizers // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2023. с. 103566.
6. Т. Савельева. Комбинированный спектроскопический метод исследования сильнорассеивающих биологических сред. Ph.D. thesis: Институт общей физики им. АМ Прохорова Российской академии наук. 2013.
7. А. Рябова. Комбинированный спектроскопический метод анализа эффективности сенсibilizаторов в биологических объектах. Ph.D. thesis: Институт общей физики им. АМ Прохорова Российской академии наук. 2006.
8. Красников И. и др. Распространение оптического излучения в биологиче-

- ских тканях // Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина. 2013. № 4. С. 202–217.
9. Taroni P. Pifferi A. Torricelli A. et al. In vivo absorption and scattering spectroscopy of biological tissues // Photochemical & Photobiological Sciences. 2003. Т. 2, № 2. С. 124–129.
 10. Bachmann L. Zezell D. et al. Fluorescence spectroscopy of biological tissues—a review // Applied Spectroscopy Reviews. 2006. Т. 41, № 6. С. 575–590.
 11. Dremin V. Potapova E. Zhrebtsov E. et al. Optical percutaneous needle biopsy of the liver: a pilot animal and clinical study // Scientific Reports. 2020. Т. 10, № 1. С. 1–11.
 12. В. Тучин. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. 2022.
 13. Lynch R. Balaban R. Nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence spectroscopy and imaging of isolated cardiac myocytes. // Biophys J. 1989. Т. 55. С. 621–630.
 14. Семин Д. Дремин В. Жеребцова А. и др. Исследование влияния крови на спектр флуоресценции кожи при возбуждении светом длиной волны 450 нм // Информационные системы и технологии 2015. 2015. С. 27–27.
 15. Leblond F. Davis S. Valdés P. et al. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications // Journal of photochemistry and photobiology B: Biology. 2010. Т. 98, № 1. С. 77–94.
 16. Лопатин В. Приезжев А. Апонасенко А. и др. Методы светорассеяния в анализе дисперсных биологических сред. 2004.
 17. А. Сетейкин. Модель расчета температурных полей, возникающих при воздействии лазерного излучения на многослойную биоткань // Оптический журнал. 2005. Т. 72, № 7. С. 42–47.
 18. Y. Bayazitoglu. Nanoshell assisted cancer therapy: numerical simulations // International Conference on Micro/Nanoscale Heat Transfer. Т. 43918. 2009. С. 545–552.

19. Bulykina A. Ryzhova V. Korotaev V. et al. Design of the algorithm of photons migration in the multilayer skin structure // *Optical Methods for Inspection, Characterization, and Imaging of Biomaterials III*. Т. 10333. 2017. С. 199–207.
20. Пушкарева А.Е. Кузнецова А.А. Компьютерное моделирование в оптике биотканей // Санкт-Петербург: Университет ИТМО. 2016.
21. Chen B. Pogue B. Zhou X. et al. Effect of tumor host microenvironment on photodynamic therapy in a rat prostate tumor model // *Clinical cancer research*. 2005. Т. 11, № 2. С. 720–727.
22. M. Dysart J. Patterson. Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro // *Physics in Medicine & Biology*. 2005. Т. 50, № 11. с. 2597.
23. Chen B. Pogue B. Hoopes P. et al. Vascular and cellular targeting for photodynamic therapy // *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*. 2006. Т. 16, № 4.
24. Lovell J. Liu T. Chen J. et al. Activatable photosensitizers for imaging and therapy // *Chemical reviews*. 2010. Т. 110, № 5. С. 2839–2857.
25. Pogue B. Sheng C. Benavides J. et al. Protoporphyrin IX fluorescence photobleaching increases with the use of fractionated irradiation in the esophagus // *Journal of Biomedical Optics*. 2008. Т. 13, № 3. с. 034009.
26. Ю. Владимиров. Аюб Потапенко АЯ Физико-химические основы фотобиологических процессов // *Высшая школа*. 1989.
27. D. Dexter. A theory of sensitized luminescence in solids // *The journal of chemical physics*. 1953. Т. 21, № 5. С. 836–850.
28. Dos R. Cristobal G. Moens P. Fluorescence resonance energy transfer spectroscopy is a reliable "ruler" for measuring structural changes in proteins: dispelling the problem of the unknown orientation factor // *Journal of structural biology*. 1995. Т. 115, № 2. С. 175–185.
29. Е. Пиняскина. Фотодинамические процессы в клетках. Первичные механизмы // *Известия Дагестанского государственного педагогического университета. Естественные и точные науки*. 2010. № 1. С. 51–57.

30. Li M. Xia J. Tian R. et al. Near-infrared light-initiated molecular superoxide radical generator: rejuvenating photodynamic therapy against hypoxic tumors // *Journal of the American Chemical Society*. 2018. Т. 140, № 44. С. 14851–14859.
31. Catalá Angel. Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the “Fluid Mosaic Model” to the “Lipid Whisker Model” // *Biochimie*. 2012. Т. 94, № 1. С. 101–109.
32. Castano A. Demidova T. Hamblin M. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization // *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2004. Т. 1, № 4. С. 279–293.
33. Bradley D. Min D. Singlet oxygen oxidation of foods // *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*. 1992. Т. 31, № 3. С. 211–236.
34. Moan J. Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen // *Photochemistry and photobiology*. 1991. Т. 53, № 4. С. 549–553.
35. Allison R. Moghissi K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms // *Clinical endoscopy*. 2013. Т. 46, № 1. С. 24–29.
36. А. Красновский. Фотодинамическая регуляция биологических процессов: первичные механизмы // *Проблемы регуляции в биологических системах/Под общей ред. АБ Рубина.–М.-Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика*. 2006. С. 223–254.
37. А.Б. Рубин. *Биофизика*. 2013.
38. Kimel S. Tromberg B. Roberts W. et al. Singlet oxygen generation of porphyrins, chlorins, and phthalocyanines // *Photochemistry and photobiology*. 1989. Т. 50, № 2. С. 175–183.
39. Redmond R. Gamlin J. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules // *Photochemistry and photobiology*. 1999. Т. 70, № 4. С. 391–475.

40. Georgakoudi I. Foster T. Singlet oxygen-versus nonsinglet oxygen-mediated mechanisms of sensitizer photobleaching and their effects on photodynamic dosimetry // *Photochemistry and photobiology*. 1998. T. 67, № 6. C. 612–625.
41. Beltukova D. Semenova I. Smolin A. et al. Kinetics of photobleaching of Radachlorin® photosensitizer in aqueous solutions // *Chemical Physics Letters*. 2016. T. 662. C. 127–131.
42. Coutier S. Mitra S. Bezdetnaya L. et al. Effects of Fluence Rate on Cell Survival and Photobleaching in Meta-Tetra-(hydroxyphenyl) chlorin–photosensitized Colo 26 Multicell Tumor Spheroids // *Photochemistry and photobiology*. 2001. T. 73, № 3. C. 297–303.
43. Vyklický V. Dědic R. Curkaniuk N. et al. Spectral-and time-resolved phosphorescence of photosensitizers and singlet oxygen: From in vitro towards in vivo // *Journal of luminescence*. 2013. T. 143. C. 729–733.
44. Höckel M. Schlenger K. Aral B. et al. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix // *Cancer research*. 1996. T. 56, № 19. C. 4509–4515.
45. Chen H. Tian J. He W. et al. H₂O₂-activatable and O₂-evolving nanoparticles for highly efficient and selective photodynamic therapy against hypoxic tumor cells // *Journal of the American Chemical Society*. 2015. T. 137, № 4. C. 1539–1547.
46. Van Geel I. Oppelaar H. Rijken P. et al. Vascular perfusion and hypoxic areas in RIF-1 tumours after photodynamic therapy // *British journal of cancer*. 1996. T. 73, № 3. C. 288–293.
47. Zhang S. Li Y. Dong R. et al. All-in-one device for mapping the interactive effects of photodynamic therapy dosimetry in tumor gaseous microenvironment // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2022. c. 112645.
48. Shen L. Huang Y. Chen D. et al. pH-responsive aerobic nanoparticles for effective photodynamic therapy // *Theranostics*. 2017. T. 7, № 18. c. 4537.

49. Kuang Y. Balakrishnan K. Gandhi V. et al. Hydrogen peroxide inducible DNA cross-linking agents: targeted anticancer prodrugs // *Journal of the American Chemical Society*. 2011. T. 133, № 48. C. 19278–19281.
50. Hu D. Sheng Z. et al. Activatable albumin-photosensitizer nanoassemblies for triple-modal imaging and thermal-modulated photodynamic therapy of cancer // *Biomaterials*. 2016. T. 93. C. 10–19.
51. Zhao L. Zheng R. et al. Self-delivery nanomedicine for O₂-economized photodynamic tumor therapy // *Nano Letters*. 2020. T. 20, № 3. C. 2062–2071.
52. Zhang H. Chen B. Jiang H. et al. A strategy for ZnO nanorod mediated multi-mode cancer treatment // *Biomaterials*. 2011. T. 32, № 7. C. 1906–1914.
53. Liu C. Dong H. Wu N. et al. Plasmonic resonance energy transfer enhanced photodynamic therapy with Au@ SiO₂@ Cu₂O/perfluorohexane nanocomposites // *ACS applied materials & interfaces*. 2018. T. 10, № 8. C. 6991–7002.
54. Dolmans D. Fukumura D. Jain R. Photodynamic therapy for cancer // *Nature reviews cancer*. 2003. T. 3, № 5. C. 380–387.
55. Correia J. et al. Photodynamic therapy review: Principles, photosensitizers, applications, and future directions // *Pharmaceutics*. 2021. T. 13, № 9. c. 1332.
56. Castano A. Mroz P. Hamblin M. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity // *Nature Reviews Cancer*. 2006. T. 6, № 7. C. 535–545.
57. Elkabir J. Anson K. Energy sources in urology // *The Scientific Basis of Urology*. 2004. C. 577–594.
58. Nirmala J. Lopus M. Cell death mechanisms in eukaryotes // *Cell biology and toxicology*. 2020. T. 36, № 2. C. 145–164.
59. Castano A. Demidova T. Hamblin M. Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death // *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2005. T. 2, № 1. C. 1–23.
60. Сербин М. Щербак Е. Апоптоз и его молекулярные эффекторы // *Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии: Сборник/под ред.*

- проф., д. м. н. НН Ильинских. Томск: Сибирский государственный медицинский университет. 2004. Т. 1.
61. Borges Rocha Luís Gabriel. Development of a novel photosensitizer for Photodynamic Therapy of cancer. Ph.D. thesis. 2016.
 62. Hamblin M. Huang Y. Imaging in Photodynamic Therapy. 2017.
 63. Dąbrowski J. Arnaut L. Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment // Photochemical & Photobiological Sciences. 2015. Т. 14, № 10. С. 1765–1780.
 64. Falk-Mahapatra R. Gollnick S. Photodynamic therapy and immunity: an update // Photochemistry and photobiology. 2020. Т. 96, № 3. С. 550–559.
 65. F. Fitzgerald. Photodynamic Therapy (PDT). 2017.
 66. Soyama T. et al. Photodynamic therapy exploiting the anti-tumor activity of mannose-conjugated chlorin e6 reduced M2-like tumor-associated macrophages // Translational oncology. 2021. Т. 14, № 2. с. 101005.
 67. Yu T. et al. Chlorin e6-induced photodynamic effect facilitates immunogenic cell death of lung cancer as a result of oxidative endoplasmic reticulum stress and DNA damage // International Immunopharmacology. 2023. Т. 115. с. 109661.
 68. Yu T. et al. Macrophages mediated delivery of chlorin e6 and treatment of lung cancer by photodynamic reprogramming // International Immunopharmacology. 2021. Т. 100. с. 108164.
 69. Muñoz-Mata L. López-Cárdenas M. Espinosa-Montesinos A. et al. Photodynamic therapy stimulates IL-6 and IL-8 in responding patients with HPV infection associated or not with LSIL // Journal of Photochemistry and Photobiology. 2022. Т. 11. с. 100137.
 70. Andersen M. et al. Cytotoxic T cells // Journal of Investigative Dermatology. 2006. Т. 126, № 1. С. 32–41.
 71. Reinert M. et al. Quantitative modulation of PpIX fluorescence and improved glioma visualization // Frontiers in surgery. 2019. Т. 6. с. 41.

72. Dong J. Toh H. Thong P. et al. Hemodynamic monitoring of Chlorin e6-mediated photodynamic therapy using diffuse optical measurements // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2014. T. 140. C. 163–172.
73. Zhu T. Finlay J. The role of photodynamic therapy (PDT) physics // Medical physics. 2008. T. 35, № 7Part1. C. 3127–3136.
74. Wilson B. Patterson M. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy // Physics in Medicine & Biology. 2008. T. 53, № 9. c. R61.
75. Glassman P. Myerson J. Ferguson L. et al. Targeting drug delivery in the vascular system: Focus on endothelium // Advanced drug delivery reviews. 2020. T. 157. C. 96–117.
76. Vaupel P. Kallinowski F. Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review // Cancer research. 1989. T. 49, № 23. C. 6449–6465.
77. C. Abels. Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT) // Photochemical & photobiological sciences. 2004. T. 3, № 8. C. 765–771.
78. Henderson B. Fingar V. Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor // Cancer research. 1987. T. 47, № 12. C. 3110–3114.
79. Gomer C. et al. Photodynamic therapy: combined modality approaches targeting the tumor microenvironment // Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery. 2006. T. 38, № 5. C. 516–521.
80. Siemann D. et al. Differentiation and definition of vascular-targeted therapies // Clinical Cancer Research. 2005. T. 11, № 2. C. 416–420.
81. Cottrell W. Paquette A. Keymel K. et al. Irradiance-dependent photobleaching and pain in δ -aminolevulinic acid-photodynamic therapy of superficial basal cell carcinomas // Clinical cancer research. 2008. T. 14, № 14. C. 4475–4483.

82. Henderson B. Waldow S. Mang T. et al. Tumor destruction and kinetics of tumor cell death in two experimental mouse tumors following photodynamic therapy // *Cancer research*. 1985. Т. 45, № 2. С. 572–576.
83. Lim Y. Yoo J. Park D. et al. Antitumor effect of photodynamic therapy with chlorin-based photosensitizer DH-II-24 in colorectal carcinoma // *Cancer science*. 2009. Т. 100, № 12. С. 2431–2436.
84. Triesscheijn M. Ruevekamp M. Aalders M. et al. Outcome of mTHPC mediated photodynamic therapy is primarily determined by the vascular response // *Photochemistry and photobiology*. 2005. Т. 81, № 5. С. 1161–1167.
85. Wang W. Moriyama L. Bagnato V. Photodynamic therapy induced vascular damage: an overview of experimental PDT // *Laser physics letters*. 2012. Т. 10, № 2. с. 023001.
86. Curnow A. Haller J. Bown S. Oxygen monitoring during 5-aminolaevulinic acid induced photodynamic therapy in normal rat colon: comparison of continuous and fractionated light regimes // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2000. Т. 58, № 2-3. С. 149–155.
87. Becker T. Paquette A. Keymel K. et al. Monitoring blood flow responses during topical ALA-PDT // *Biomedical optics express*. 2011. Т. 2, № 1. С. 123–130.
88. Г. Порядин. Патофизиология гемореологии и микроциркуляции // М., РГМУ. 2007.
89. Корчагина К. Гамаюнов С. Воропаева Л. и др. Патоморфологические изменения тканей после проведения ФДТ (обзор литературы) // *Поволжский онкологический вестник*. 2017. № 3 (30). С. 64–68.
90. Abrahamse H. Hamblin M. New photosensitizers for photodynamic therapy // *Biochemical Journal*. 2016. Т. 473, № 4. С. 347–364.
91. Allison R. Downie G. Cuenca R. et al. Photosensitizers in clinical PDT // *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2004. Т. 1, № 1. С. 27–42.
92. Harada Y. et al. 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin IX Fluorescence Imaging for Tumor Detection: Recent Advances and Challenges // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Т. 23, № 12. с. 6478.

93. Myrzakhmetov B. et al. Photophysical properties of protoporphyrin IX, pyropheophorbide-a, and Photofrin® in different conditions // *Pharmaceuticals*. 2021. T. 14, № 2. c. 138.
94. S. Jacques. Optical properties of biological tissues: a review // *Physics in Medicine & Biology*. 2013. T. 58, № 11. c. R37.
95. Celli J. Spring B. Rizvi I. et al. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization // *Chemical reviews*. 2010. T. 110, № 5. C. 2795–2838.
96. Farrakhova D. Shiryaev A. Yakovlev D. et al. Trials of a fluorescent endoscopic video system for diagnosis and treatment of the head and neck cancer // *Journal of Clinical Medicine*. 2019. T. 8, № 12. c. 2229.
97. Gilyadova A. Ishchenko A. Shiryaev A. et al. Phototheranostics of cervical neoplasms with chlorin e6 photosensitizer // *Cancers*. 2022. T. 14, № 1. c. 211.
98. Yano S. Hirohara S. et al. Current states and future views in photodynamic therapy // *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2011. T. 12, № 1. C. 46–67.
99. Ferreira J. et al. Can efficiency of the photosensitizer be predicted by its photostability in solution? // *Laser physics*. 2009. T. 19, № 9. C. 1932–1938.
100. Shirmanova M. et al. Comparative study of tissue distribution of chlorin e6 complexes with amphiphilic polymers in mice with cervical carcinoma // *J Anal Bioanal Tech S*. 2014. T. 1. c. 008.
101. Shliakhtsin S. et al. Pharmacokinetics and biodistribution of Photolon®(Fotolon®) in intact and tumor-bearing rats // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2009. T. 6, № 2. C. 97–104.
102. Parihar A. et al. Conjugation of chlorin p 6 to histamine enhances its cellular uptake and phototoxicity in oral cancer cells // *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2011. T. 68, № 2. C. 359–369.
103. Fontana L. et al. Comparison of the Photodynamic Effect of Two Chlorins, Photodithazine and Fotoenticine, in Gliosarcoma Cells // *Photochem*. 2022. T. 2, № 1. C. 165–180.

104. Isakau H. et al. Toward understanding the high PDT efficacy of chlorin e6–polyvinylpyrrolidone formulations: Photophysical and molecular aspects of photosensitizer–polymer interaction in vitro // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2008. T. 92, № 3. C. 165–174.
105. Lee S. et al. Pulsed diode laser-based monitor for singlet molecular oxygen // Journal of biomedical optics. 2008. T. 13, № 3. C. 034010–034010.
106. Losev A. et al. Energetics of chlorins: a potent photosensitizer of PDT // Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy V. T. 2675. 1996. C. 243–251.
107. Ulatowska-Jarza A. et al. Spectroscopic properties of a chlorophyll-based photosensitive dye entrapped in sol-gel fibre-optic applicators // Materials Science-Poland. 2005. T. 23, № 1. C. 111–122.
108. Ramaswamy B. et al. Photodynamic diagnosis of a human nasopharyngeal carcinoma xenograft model using the novel Chlorin e6 photosensitizer Fotolon® // International journal of oncology. 2005. T. 26, № 6. C. 1501–1506.
109. Cunderlikova B. et al. Acid–base properties of chlorin e6: relation to cellular uptake // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 1999. T. 53, № 1-3. C. 81–90.
110. Alekseeva P. Efendiev K. Shiryaev A. et al. Sublingual administration of 5-ALA for laser-induced photodiagnosics and PDT of oral cavity and larynx cancers // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2021. T. 34. c. 102289.
111. Loschenov V. Konov V. Prokhorov A. Photodynamic therapy and fluorescence diagnostics // LASER PHYSICS-LAWRENCE-. 2000. T. 10, № 6. C. 1188–1207.
112. Markwardt N. et al. 405 nm versus 633 nm for protoporphyrin IX excitation in fluorescence-guided stereotactic biopsy of brain tumors // Journal of biophotonics. 2016. T. 9, № 9. C. 901–912.
113. Loshchenov M. et al. Laser-induced fluorescence diagnosis of stomach tumor // Lasers in Medical Science. 2020. T. 35, № 8. C. 1721–1728.

114. Лощенов М.В. и др. Способ количественной оценки концентрации фотосенсибилизатора по видеоизображению в режиме реального времени при проведении флуоресцентного исследования. 2018.
115. Di Ninni P. et al. Intralipid: towards a diffusive reference standard for optical tissue phantoms // *Physics in Medicine & Biology*. 2010. Т. 56, № 2. с. N21.
116. Michels R. et al. Optical properties of fat emulsions // *Optics express*. 2008. Т. 16, № 8. С. 5907–5925.
117. Tseng S. et. al. In vivo determination of skin near-infrared optical properties using diffuse optical spectroscopy // *Journal of biomedical optics*. 2008. Т. 13, № 1. С. 014016–014016.
118. Bellnier D. at al. Clinical pharmacokinetics of the PDT photosensitizers porfimer sodium (Photofrin), 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a (Photochlor) and 5-ALA-induced protoporphyrin IX // *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*. 2006. Т. 38, № 5. С. 439–444.
119. Попов П. Нозик А. Обработка результатов учебного эксперимента. 2019.
120. Стратонников А. и др. Использование спектроскопии обратного диффузного отражения света для мониторинга состояния тканей при фотодинамической терапии // *Квантовая электроника*. 2006. Т. 36, № 12. С. 1103–1110.
121. Feng S. et al. Monte Carlo simulations of photon migration path distributions in multiple scattering media // *Photon Migration and Imaging in Random Media and Tissues*. Т. 1888. 1993. С. 78–89.
122. Лощенов В. Меерович Г. Стратонников А. Спектральное устройство для контроля и мониторинга процесса фотодинамической терапии. 2001.
123. Stratonnikov A. Douplik A. Loschenov V. Oxygen consumption and photobleaching in whole blood incubated with photosensitizer induced by laser irradiation // *Laser physics*. 2003. Т. 13, № 1. С. 1–21.
124. Stratonnikov A. Loschenov V. Evaluation of blood oxygen saturation in vivo from diffuse reflectance spectra // *Journal of biomedical optics*. 2001. Т. 6, № 4. С. 457–467.

125. Рябова А. Стратонников А. Лощенов В. Лазерно-спектроскопический метод оценки эффективности фотосенсибилизаторов в биологических средах // Квантовая электроника. 2006. Т. 36, № 6. С. 562–568.
126. S. Prahl. A Monte Carlo model of light propagation in tissue // Dosimetry of laser radiation in medicine and biology. Т. 10305. 1989. С. 105–114.
127. Филинов В. и др. Способ проведения фотодинамической терапии злокачественных опухолей. 2006.
128. Kozlikina E. et al. The Combined Use of 5-ALA and Chlorin e6 Photosensitizers for Fluorescence-Guided Resection and Photodynamic Therapy under Neurophysiological Control for Recurrent Glioblastoma in the Functional Motor Area after Ineffective Use of 5-ALA: Preliminary Results // Bioengineering. 2022. Т. 9, № 3. с. 104.
129. Dunaev A. et al. Analysis individual variability of parameters of laser fluorescence diagnostics // Biotechnosphere. 2013. Т. 2, № 26. С. 39–47.
130. Zhu S. et al. Near-infrared-II (NIR-II) bioimaging via off-peak NIR-I fluorescence emission // Theranostics. 2018. Т. 8, № 15. с. 4141.
131. Demos S. et al. Near-infrared autofluorescence imaging for detection of cancer // Journal of biomedical optics. 2004. Т. 9, № 3. С. 587–592.
132. Tsolekile N. et al. Porphyrin as diagnostic and therapeutic agent // Molecules. 2019. Т. 24, № 14. с. 2669.
133. Saito T. et al. A novel laparoscopic near-infrared fluorescence spectrum system for photodynamic diagnosis of peritoneal dissemination in pancreatic cancer // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2021. Т. 33. с. 102157.
134. Kustov D. Kozlikina E. Efendiev K. 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.
135. Garcia M. et al. Development of a system to treat and online monitor photodynamic therapy of skin cancer using PpIX near-infrared fluorescence // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2020. Т. 30. с. 101680.

136. Desgranges S. et al. Amphiphilic protoporphyrin IX derivatives as new photosensitizing agents for the improvement of photodynamic therapy // *Biomedicines*. 2022. T. 10, № 2. c. 423.
137. Jacobson M. et al. In vivo testing of a prototype system providing simultaneous white light and near infrared autofluorescence image acquisition for detection of bladder cancer // *Journal of biomedical optics*. 2012. T. 17, № 3. C. 036011–036011.
138. Pogue B. et al. Revisiting photodynamic therapy dosimetry: reductionist & surrogate approaches to facilitate clinical success // *Physics in Medicine and Biology*. 2016. T. 61, № 7. C. R57–R89.
139. Algorri J. et al. Light technology for efficient and effective photodynamic therapy: A critical review // *Cancers*. 2021. T. 13, № 14. c. 3484.
140. Li B. et al. Photosensitized singlet oxygen generation and detection: Recent advances and future perspectives in cancer photodynamic therapy // *Journal of biophotonics*. 2016. T. 9, № 11-12. C. 1314–1325.
141. Kirillin M. Kurakina D. Khilov A. et al. Red and blue light in antitumor photodynamic therapy with chlorin-based photosensitizers: a comparative animal study assisted by optical imaging modalities // *Biomedical Optics Express*. 2021. T. 12, № 2. C. 872–892.
142. Ntombela L. et al. Low-cost fabrication of optical tissue phantoms for use in biomedical imaging // *Heliyon*. 2020. T. 6, № 3. c. e03602.
143. Finlay J. Soumya P. Michael S. et al. Photobleaching kinetics of Photofrin in vivo and in multicell tumour spheroids indicate two simultaneous bleaching mechanisms // *Physics in Medicine & Biology*. 2004. T. 49, № 21. c. 4837.
144. Liu B. Farrell T. Patterson M. et al. Comparison of photodynamic therapy with different excitation wavelengths using a dynamic model of aminolevulinic acid-photodynamic therapy of human skin // *Journal of Biomedical Optics*. 2012. T. 17, № 8. C. 088001–088001.
145. Khilov A. Kirillin M. et al. Estimation of chlorin-based photosensitizer penetration depth prior to photodynamic therapy procedure with dual-

- wavelength fluorescence imaging // Laser Physics Letters. 2018. Т. 15, № 12. с. 126202.
146. Tasso T. Schlothauer J. et al. Photobleaching efficiency parallels the enhancement of membrane damage for porphyrazine photosensitizers // Journal of the American Chemical Society. 2019. Т. 141, № 39. С. 15547–15556.
 147. A. Juzeniene. Chlorin e6-based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis // Photodiagnosis and photodynamic therapy. 2009. Т. 2, № 6. С. 94–96.
 148. Зюрюкина О. Синичкин Ю. Динамика оптических и физиологических свойств кожи человека *in vivo* в процессе ее компрессии // Оптика и спектроскопия. 2019. Т. 127, № 3. с. 498.
 149. Kwaśny M. et al. Applications of Laser-Induced Fluorescence in Medicine // Sensors. 2022. Т. 22, № 8. с. 2956.
 150. Das K. Dube A. et al. A spectroscopic study of photobleaching of Chlorin p6 in different environments // Dyes and pigments. 2005. Т. 64, № 3. С. 201–205.
 151. Correa J. Bagnato V. Imasato H. et al. Previous illumination of a water soluble chlorine photosensitizer increases its cytotoxicity // Laser Physics. 2012. Т. 22. С. 1387–1394.
 152. Mitchell R. et al. Blood vessels // Robbins and Cotran: Pathologic Basis of Disease.(8th edition) Saunders Elsevier, Philadelphia, US. 2010. С. 516–17.
 153. Wang L. at al. Infrared imaging of hand vein patterns for biometric purposes // IET computer vision. 2007. Т. 1, № 3. С. 113–122.
 154. Cuper N. et al. Visualizing veins with near-infrared light to facilitate blood withdrawal in children. 2011. Т. 50, № 6. С. 508–512.
 155. Lee E. et al. New finger biometric method using near infrared imaging // Sensors. 2011. Т. 11, № 3. С. 2319–2333.

156. Cuper N. et al. Development and clinical trial of a practical vessel imaging system for vessel punctures in children // *Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic Systems VI*. T. 6848. 2008. C. 9–18.
157. Ai D. et al. Augmented reality based real-time subcutaneous vein imaging system // *Biomedical optics express*. 2016. T. 7, № 7. C. 2565–2585.
158. Kholodtsova M. et al. Scattered and fluorescent photon track reconstruction in a biological tissue // *International Journal of Photoenergy*. 2014. T. 2014.
159. Kwon K. et al. Enhancement of light propagation depth in skin: cross-validation of mathematical modeling methods // *Lasers in medical science*. 2009. T. 24, № 4. C. 605–615.
160. Ash C. et al. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods // *Lasers in medical science*. 2017. T. 32, № 8. C. 1909–1918.
161. B. Jayet. Acousto-optic and photoacoustic imaging of scattering media using wavefront adaptive holography techniques in NdYO4. Ph.D. thesis. 2015.
162. Rogov P. Bepalov V. Mathematical model of laser radiation femtosecond interaction with human skin // *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. 2016. T. 2, № 1. C. 010301–1.
163. Graham H. et al. Human skin: composition, structure and visualisation methods // *Skin Biophysics*. 2019. C. 1–18.
164. B. Masters. Book Review: *Biomedical Photonics Handbook*. 2004.
165. Paquit V. et al. Improving light propagation Monte Carlo simulations with accurate 3D modeling of skin tissue // 2008 15th IEEE International Conference on Image Processing. 2008. C. 2976–2979.
166. Busch T. et al. Fluence rate-dependent intratumor heterogeneity in physiologic and cytotoxic responses to Photofrin photodynamic therapy // *Photochemical & photobiological sciences*. 2009. T. 8, № 12. C. 1683–1693.
167. Ribatti D. Crivellato E. Immune cells and angiogenesis // *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009. T. 13, № 9a. C. 2822–2833.

168. James N. Cheruku R. Missert J. et al. Measurement of cyanine dye photobleaching in photosensitizer cyanine dye conjugates could help in optimizing light dosimetry for improved photodynamic therapy of cancer // *Molecules*. 2018. T. 23, № 8. с. 1842.
169. Wilson B. Weersink R. Lilge L. Fluorescence in photodynamic therapy dosimetry // *Handbook of biomedical fluorescence*. 2003. С. 529–562.
170. Radakovic-Fijan S. et al. Topical aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy as a treatment option for psoriasis? Results of a randomized, observer-blinded study // *British Journal of Dermatology*. 2005. T. 152, № 2. С. 279–283.
171. Wang B. et al. Gain with no pain? Pain management in dermatological photodynamic therapy // *British Journal of Dermatology*. 2017. T. 177, № 3. С. 656–665.
172. Wang L. et al. Novel Water-Soluble Chlorin-Based Photosensitizer for Low-Fluence Photodynamic Therapy // *ACS Pharmacology & Translational Science*. 2022. T. 5, № 2. С. 110–117.
173. Kim M. Darafsheh A. Light sources and dosimetry techniques for photodynamic therapy // *Photochemistry and photobiology*. 2020. T. 96, № 2. С. 280–294.
174. Лощенов В. и др. Способ фотодинамической терапии злокачественных новообразований. 2000.
175. Ong Y. Hong K. Michele M. et al. PDT dose dosimetry for Photofrin-mediated pleural photodynamic therapy (pPDT) // *Physics in Medicine & Biology*. 2017. T. 63, № 1. с. 015031.
176. Weston M. Patterson M. Monitoring oxygen concentration during photodynamic therapy using prompt photosensitizer fluorescence // *Physics in Medicine & Biology*. 2013. T. 58, № 20. с. 7039.
177. Bansal A. et al. In vivo wireless photonic photodynamic therapy // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018. T. 115, № 7. С. 1469–1474.

178. Patterson M. Wilson B. Theoretical study of the influence of sensitizer photobleaching on depth of necrosis in photodynamic therapy // *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy III*. T. 2133. 1994. C. 208–219.
179. Foster T. et al. Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy // *Radiation research*. 1991. T. 126, № 3. C. 296–303.
180. Liu B. et al. A dynamic model for ALA-PDT of skin: simulation of temporal and spatial distributions of ground-state oxygen, photosensitizer and singlet oxygen // *Physics in Medicine & Biology*. 2010. T. 55, № 19. c. 5913.
181. G. Hoffmann. Water-filtered infrared-A (wIRA) in acute and chronic wounds // *GMS Krankenhaushygiene interdisziplinär*. 2009. T. 4, № 2.
182. Mamalis A. et al. Temperature-dependent impact of thermal aminolaevulinic acid photodynamic therapy on apoptosis and reactive oxygen species generation in human dermal fibroblasts // *British Journal of Dermatology*. 2016. T. 175, № 3. C. 512–519.
183. Austin E. et al. Thermal photodynamic therapy increases apoptosis and reactive oxygen species generation in cutaneous and mucosal squamous cell carcinoma cells // *Scientific reports*. 2018. T. 8, № 1. C. 1–9.
184. Cherukuri P. et al. Targeted hyperthermia using metal nanoparticles // *Advanced drug delivery reviews*. 2010. T. 62, № 3. C. 339–345.
185. Svensson J. et al. Tissue temperature monitoring during interstitial photodynamic therapy // *Thermal Treatment of Tissue: Energy Delivery and Assessment III*. T. 5698. 2005. C. 126–136.
186. Henderson B. et al. Photosensitization of murine tumor, vasculature and skin by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin // *Photochemistry and photobiology*. 1995. T. 62, № 4. C. 780–789.
187. Kabingu E. et al. Enhanced systemic immune reactivity to a Basal cell carcinoma associated antigen following photodynamic therapy // *Clinical Cancer Research*. 2009. T. 15, № 13. C. 4460–4466.

188. Van Leeuwen-van Zaane F. et al. The effect of fluence rate on the acute response of vessel diameter and red blood cell velocity during topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2014. T. 11, № 2. C. 71–81.
189. Orenstein A. et al. A comparative study of tissue distribution and photodynamic therapy selectivity of chlorin e6, Photofrin II and ALA-induced protoporphyrin IX in a colon carcinoma model // British journal of cancer. 1996. T. 73, № 8. C. 937–944.
190. Barun V. Ivanov A. Temperature regime of biological tissue under photodynamic therapy // Biophysics. 2012. T. 57. C. 98–105.
191. Duncan R. et al. The dawning era of polymer therapeutics // Nature reviews Drug discovery. 2003. T. 2, № 5. C. 347–360.
192. Khludeyev I. et al. Speckle optical monitoring of blood microcirculation for different types of treatment of the vascular system // Journal of Applied Spectroscopy. 2013. T. 80. C. 299–304.
193. Huang N. et al. Influence of laser wavelength on the damage of comb's vasculature by photodynamic therapy—simulation and validation of mathematical models // Lasers in medical science. 2011. T. 26. C. 665–672.
194. Yang L. et al. Clickable amino acid tuned self-assembly of a nucleus-selective multi-component nanoplatfrom for synergistic cancer therapy // Chemical Science. 2021. T. 12, № 24. C. 8394–8400.
195. Sanders J. et al. Tissue oxygen saturation and outcome after cardiac surgery // American Journal of Critical Care. 2011. T. 20, № 2. C. 138–145.