

На правах рукописи



Кустов Даниил Максимович

**Опτικο-спектральный мониторинг оксигенации и флуоресценции при  
лазерном воздействии на мягкие ткани человека**

1.3.19. Лазерная физика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Москва – 2026

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

**Научный руководитель:**

**Лощёнов Виктор Борисович** – доктор физ.-мат. наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории лазерной биоспектроскопии отдела Светоиндуцированных поверхностных явлений Центра естественно–научных исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук» (ИОФ РАН).

**Официальные оппоненты:**

**Орлова Анна Олеговна** – доктор физ.-мат. наук, профессор, ведущий профессор Международного научно-образовательного Центра физики наноструктур Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО» (Университет ИТМО).

**Турчин Илья Викторович** – кандидат физ.-мат. наук, заведующий отделом радиофизических методов в медицине Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального исследовательского центра Институт прикладной физики им. А.В. Гапонова-Грехова Российской академии наук (ИПФ РАН).

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук.

Защита диссертации состоится 21 сентября 2026 года в 15:00 на заседании диссертационного совета 24.1.223.03 при ИОФ РАН по адресу: 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 38, корп. №1, конференц-зал.

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

Автореферат диссертации разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.223.03

канд. физ.-мат. наук

тел.: +7 (499) 503-8780



Осадчий Александр Валентинович

## **Общая характеристика работы**

Работа посвящена исследованию взаимодействия лазерного, флуоресцентного и широкополосного излучения с биологическими объектами, представляющими собой сильно рассеивающие оптические среды с содержанием флуоресцентного фотосенсибилизатора протопорфирина IX (PpIX) индуцированного 5-аминолевулиновой кислотой и развитию спектроскопических и видео-флуоресцентных методов анализа биологических сред для создания подхода к диагностике и лечению опухолей биологических тканей, обеспечивающий высокую эффективность передачи лазерного излучения и одновременный контроль за процессом терапии.

### **Актуальность темы исследования и степень разработанности**

В настоящее время происходит стремительное развитие новых подходов к диагностике и лечению опухолей методами флуоресцентной диагностики (ФД) и фотодинамической терапии (ФДТ), демонстрирующих высокую эффективность. Эффективность ФДТ напрямую зависит от концентрации фотосенсибилизатора (ФС) и локальной концентрации кислорода, который участвует в генерации цитотоксических форм кислорода, разрушающих патологические клетки. Из-за высокой гетерогенности опухолей распределение фотосенсибилизатора и молекулярного кислорода в объеме может динамически изменяться в ходе лазерного облучения, что затрудняет достижение равномерного терапевтического эффекта. Таким образом, существует потребность в разработке физических и технических решений для совершенствования методов проведения флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии с единовременным контролем за состоянием ткани для лечения прогрессирующих опухолей мягких тканей и полых органов.

Оценка кровоснабжения биологических тканей является ключевой задачей. При воздействии лазерного излучения на сенсibilизированные клетки, высокоактивный кислород приводит к повреждению структур биомолекул, сосудов и разрушению патологических сенсibilизированных клеток. Спектроскопическая оценка оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном русле позволяет в реальном времени контролировать состояние тканей и прогнозировать приживление трансплантатов. Однако глубина проникновения света ограничена из-за сильного рассеяния и поглощения в биологических тканях,

имеющих многослойную структуру. Особую сложность представляет доступ к патологическим очагам, залегающим на глубине, например глубокозалегающие опухоли мозга.

Для преодоления этих ограничений в настоящей работе разработана и реализована неинвазивная лазерная двухволновая волоконно-оптическая методика спектроскопического определения оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном кровеносном русле головного мозга с использованием лазерного излучения в БИК-диапазоне. Вместе с тем разработана методика одновременной передачи и получения лазерного излучения по одному волокну с высокой чувствительностью для определения интенсивности флуоресценции фотосенсибилизаторов РrIX и Себ при концентрациях, реализующихся в биологических тканях при клиническом применении.

### **Цель и задачи исследования**

Целью данной работы является разработка новых методов и устройств для определения оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном кровеносном русле и доставки лазерного излучения к глубокозалегающим и труднодоступным опухолям головного мозга, а также разработка лазерно-спектроскопической методики контроля хирургических операций по флуоресценции фотосенсибилизаторов и оксигенации гемоглобина в биологической ткани. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести моделирование профиля распространения лазерного излучения в дальнем красном и БИК-диапазонах, являющимися характерными диапазонами поглощения для окси- и дезоксигемоглобина в многослойной оптической среде с оптическими свойствами, соответствующими биологическим тканям мозга человека с прилежащими тканями.
2. Создать многослойные фантомы биологической ткани по результатам численного моделирования методом Монте-Карло, имитирующие оптические свойства мягких тканей мозга и молочной железы в диапазоне длин волн 500 – 850 нм.
3. Разработать неинвазивную лазерную двухволновую волоконно-оптическую методику спектроскопического определения оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном кровеносном русле головного мозга с использованием лазерного излучения в БИК-диапазоне.

4. Разработать методику одновременной доставки и регистрирования лазерного излучения и регистрации флуоресценции фотосенсибилизатора протопорфирина IX (PpIX) и хлорина е6 (Ce6) по моно-волокну. Определить чувствительность измерения интенсивности флуоресценции фотосенсибилизаторов PpIX и Ce6 при концентрациях, реализующихся в биологических тканях при клиническом применении.
5. Разработать методику определения оксигенации гемоглобина в тканях совместную с проведением флуоресцентной диагностики для определения границ опухолевой и нормальной ткани при их хирургическом удалении (резекции) и оценки качества сшиваемых тканей.

### **Научная новизна**

1. Разработана новая спектроскопическая методика неинвазивного измерения степени оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном русле мозга в БИК-диапазоне.
2. Разработана численная модель распространения лазерного излучения для случая специально созданного фантома мозга с многослойной структурой с оптическими параметрами, включающими показатели преломления, коэффициенты поглощения, рассеяния, фактора анизотропии и толщинами слоев.
3. Впервые создана система, позволившая измерить степень оксигенации на глубине до 15.5 мм, использующая источники лазерного излучения с длинами волн 687 нм и 804 нм.
4. Впервые разработана методика для малоинвазивной диагностики глубокозалегающих опухолей, которая позволила с высокой точностью измерять интенсивность флуоресценции фотосенсибилизатора как при прямом проходе через опухоль головного мозга, так и при обратном.
5. Впервые разработанная моно-волоконная система доставки лазерного излучения по одному волокну для передачи лазерного излучения к биологическому объекту и передачи флуоресцентного сигнала от фотосенсибилизатора, накопленного в биологическом объекте позволила оценить оптические свойства облучаемых тканей и одновременно провести диагностику в процессе лазерного облучения по интенсивности флуоресценции фотосенсибилизаторов на основе протопорфирина IX и хлорина E6 с

соотношением сигнал/шум достаточным для оценки концентрации используемых в клинической практике фотосенсибилизаторов.

- б. Разработана спектроскопическая методика оценки оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном русле, включающее последовательное измерение в положении на просвет ткани и на отражение, при хирургической резекции во время операций на полых органах и мягких тканях.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Метод неинвазивного измерения оксигенации гемоглобина в смешанной крови микроциркуляторного (церебрального) русла мозга в ближнем инфракрасном диапазоне позволил определить изменение оксигенации во времени неинвазивно с поверхности головы при понижении общей оксигенации мозга от задержки дыхания. Данный способ может найти применение для усовершенствования ряда методов исследования нейронной активности и мозговой микроциркуляции крови в таких областях науки как нейрохирургия, неврология и психиатрия.

Разработанный оптический фантом мозга человека стабилен и прост в изготовлении, и может быть использован при тестировании различных оптических методов диагностики. Результаты моделирования глубины проникновения лазерного излучения в многослойную биологическую ткань, могут быть использованы для решения прецизионных задач моделирования физических процессов, протекающих при воздействии лазерного излучения с тканью.

Разработанная методика спектрально-флуоресцентного определения фотопродуктов РrIX при ФДТ и оценки оксигенации гемоглобина в видимом диапазоне излучения позволяет контролировать процесс фотодинамического воздействия на ткани при возбуждении флуоресценции фотосенсибилизатора лазерным излучением с длиной волны 632.8 нм и возбуждением флуоресценции фотопродуктов лазерным излучением с длиной волны 660 нм.

Теоретическая значимость работы заключается в разработке нового алгоритма определения степени оксигенации гемоглобина кислородом с учетом баланса между компонентами рассеяния Рэлея и Ми в спектрах диффузного рассеяния при анализе многослойных биологических структур. Применение разработанной методики для контроля концентрации кислорода в микроциркуляторном кровеносном русле совместная с хирургической резекцией снижает частоту нежелательных эффектов после операции на полых органах ЖКТ и мягких тканях.

## **Методология и методы исследования**

В ходе выполнения диссертационной работы был использован комплексный подход, включающий оценку концентрации ФС в исследуемых тканях с применением эталонных образцов, в качестве которых выступают специально полученные оптические фантомы, имитирующие оптические свойства реальной ткани с содержанием ФС на основе протопорфирина 9 и хлорина Е6 в различных концентрациях. Методология включала в себя этапы подготовки эталонных образцов, измерения оптических свойств и последующий анализ данных с использованием математической обработки. Исследования выполнены с использованием современного измерительного оборудования, включающего измеритель мощности Thorlabs PM100D, спектрофотометр Hitachi U-3400. Лазерная спектроскопия рассеяния, спектроскопия диффузного отражения выполнена с применением спектрометра Biospec LESA-01-BIOSPEC. Лазерный сканирующий микроскоп Carl Zeiss LSM-710-NLO применялся для микроскопической оценки распределения PpIX в тканях опухоли головного мозга. При реализации подхода для оценки степени оксигенации гемоглобина на основе БИК-спектроскопии применяли лазерные источники излучения Biospec LFT-02-BIOSPEC. Для определения времени жизни флуоресценции использовалась система, разработанная в лаборатории, на основе стрик-камеры Hamamatsu C10627-13. Анализ спектральных характеристик, математическую обработку спектров проводили с использованием Python, в том числе модулей matplotlib, numpy. Для моделирования распространения лазерного излучения в многослойной структуре использовалась разработанная в лаборатории программа TiffReader. Для фотодинамической терапии с применением фотосенсибилизаторов на основе протопорфирина IX и хлорина Е6 применялись мощные светодиодные источники излучения с длинами волн в диапазоне 635 – 660 нм, обеспечивающие контролируемое воздействие в процессе ФДТ.

## **Положения, выносимые на защиту**

1. При межволоконном расстоянии 30 мм между излучающим оптическим волокном с числовой апертурой  $NA = 0.25$  и приемным диагностическим катетером, включающим 6 оптических волокон с числовой апертурой  $NA = 0.22$ , глубина зондирования регистрируемого диффузно-отраженного лазерного

излучения с длинами волн  $\lambda = 687$  нм и  $\lambda = 804$  нм достигает 8 – 15.5 мм, что обеспечивает достоверную спектроскопическую оценку изменения оксигенации гемоглобина в тканях головного мозга на этой глубине.

2. Метод лазерно-индуцированной флуоресцентной диагностики с применением стереотаксического волоконно-оптического устройства позволяет интраоперационно характеризовать спектрально-флуоресцентные свойства здоровых и опухолевых тканей головного мозга в диапазоне длин волн 680 – 720 нм с возбуждением флуоресценции ФС на основе протопорфирина IX при длине волны  $\lambda = 635$  нм.
3. Спектральное разделение возбуждающего лазерного излучения ( $\lambda = 635$  нм) и флуоресцентного сигнала ФС на основе протопорфирина 9 и хлорина Е6 в сочетании с регистрирующей оптической схемой на основе CCD-матрицы или волоконного спектрометра обеспечивает одновременную доставку излучения для фотодинамической терапии и регистрацию лазерно-индуцированной флуоресценции через одно и тоже оптическое волокно малого диаметра 400 – 600 мкм с числовой апертурой NA 0.22 – 0.66, что позволяет эффективно контролировать изменение фотообесцвечивания фотосенсибилизатора в диапазоне длин волн 650 – 800 нм в процессе лазерного облучения.
4. Методика спектроскопической оценки оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном русле с учетом вклада компонентов рассеяния Рэлея и Ми от оптических параметров тканей эпителия в диапазоне длин волн 500 – 600 нм, уменьшает ошибку измерений до 2-х порядков и позволяет определить качество сшиваемых тканей по значению оксигенации гемоглобина в крови.
5. Методика спектрально-флуоресцентной диагностики при фотодинамической терапии лазерным излучением  $\lambda = 635$  нм новообразования с накоплением протопорфирина IX и возбуждением флуоресценции на длинах волн  $\lambda = 405, 443, 632.8$  нм позволяет проводить мониторинг накопления протопорфирина IX и формирования его фотопродуктов в процессе лазерного облучения.

### **Личный вклад автора**

В диссертации изложены результаты работ, которые были выполнены автором лично или в соавторстве. В работах, выполненных в соавторстве и включенных в диссертацию, автор формулировал задачу, разрабатывал методики исследований, участвовал в проведении теоретических расчетов и экспериментов, проводил

обработку, анализ, интерпретацию и теоретическое обоснование результатов полученных результатов. Автором проведен анализ современной научной литературы, связанной с темой диссертационного исследования, разработаны методики измерения и экспериментального исследования распространения лазерного и флуоресцентного излучения в многослойных биологических структурах. Выполнен анализ и графическое представление полученных данных, сформулированы выводы на основе этих данных. Также автор принимал активное участие в проведении исследований, обработке и интерпретации данных, а также в подготовке научных публикаций. В направлении исследований связанных с оценкой оксигенации гемоглобина в тканях молочной железы и органов ЖКТ автор разрабатывал подход к анализу оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном русле ткани.

### **Достоверность результатов**

Обоснованность и достоверность полученных результатов обеспечивается использованием комплекса современных экспериментальных методов исследования, сравнением экспериментально полученных результатов с результатами численного моделирования, анализом литературных данных, выводами и результатами других исследователей. Достоверность и надежность результатов обоснована использованием научного оборудования, которое верифицируется в соответствии с международными стандартами обеспечения единства измерений и единообразием средств измерений.

### **Апробация работы**

Результаты диссертации были представлены в докладах на 19-и научных конференциях:

1. VIII International Youth Scientific School-Conference "Modern Problems of Physics and Technology" (Москва, 2019 г.);
2. Всероссийская учредительная конференция с международным участием «Современные проблемы нейропсихиатрии» (Москва, 2019 г.);
3. VIII Всероссийский конгресс с международным участием "Фотодинамическая терапия и фотодиагностика" (Москва, 2019 г.);
4. Школа – конференция молодых учёных «Прохоровские Недели» (Москва, 2019 г.);

5. 2-ая Межвузовская конференция на английском языке «Science, Engineering and Business» (Москва, 2020 г.);
6. IX Международный конгресс «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (Москва, 2020 г.);
7. 19th International Conference Laser Optics ICLO (онлайн, 2020 г.);
8. Школа-конференция молодых ученых “Прохоровские недели” (Москва, 2020 г.);
9. X Международный Конгресс "Фотодинамическая Терапия и Фотодиагностика" (Москва, 2021 г.);
10. Всероссийская Конференция по Волоконной Оптике «ВКВО 2021» (Пермь, 2021 г.);
11. 2022 International Conference Laser Optics (ICLO) (Санкт-Петербург, 2022 г.);
12. XI Международный Конгресс "Фотодинамическая Терапия и Фотодиагностика" (онлайн, 2022 г.);
13. Saratov Fall Meeting XXVI (онлайн, 2022 г.);
14. 18th International Photodynamic Association World Congress (онлайн, 2023 г.);
15. XII международный конгресс «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (Москва, 2023 г.);
16. International Conference Laser Optics (Санкт-Петербург, 2024 г.);
17. XIII международный конгресс «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (Москва, 2024 г.);
18. XIV международный конгресс «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (Москва, 2025 г.);
19. Шестая международная конференция «Физика — наукам о жизни» (Санкт-Петербург, 2025 г.).

На основании выполненных работ получен патент RU 230256 U1 Устройство со световодом для определения локализации опухоли спектрально-флуоресцентным способом от 12.12.2022.

Работа выполнена при частичной поддержке следующих грантов:

1. РФФИ 21-58-15005 НЦНИ\_а Бимодальный (в белом и флуоресцентном свете) панорамный имиджинг для навигации при цистоскопической хирургии. Код – CystoMos. Исполнитель. 2021 – 2022 г.

2. РФФ 22-72-10117 Разработка методов контроля оксигенации опухолей и повышения эффективности фотодинамической терапии при помощи метиленового синего. Основной исполнитель. 2022 – 2025 г.
3. РФФ 25-25-00516 Разработка метода спектроскопической диагностики и персонализированного планирования фотодинамической терапии органов ЖКТ. Исполнитель. 2025 – 2026 г.

### **Научные публикации**

По результатам диссертации опубликованы 8 печатных работ в рецензируемых журналах, включенных в перечень ВАК, из них 2 работы входят в международную базу Web of Science и 8 работ входят в базу данных Scopus.

### **Структура и объем диссертации**

Работа состоит из введения, пяти глав, заключения и списка литературы. Общий объем диссертации – 151 страниц, включая 87 рисунков, 6 таблиц и список литературы из 112 наименований.

### **Содержание работы**

Во **Введении** обоснована актуальность диссертационной работы, сформулирована цель и основные задачи работы, определены основные положения, выносимые на защиту, установлена научная новизна, достоверность и научно-практическая значимость полученных результатов.

В **первой главе** рассматриваются существующие методы лазерного воздействия и спектроскопического исследования биологических тканей, и основные факторы, описывающие характер распространения светового излучения в биологической ткани. В **§1.1** рассмотрены процессы, происходящие при воздействии лазерного излучения на биологическую ткань, влияющие на распространения света в биологической ткани, представлен спектр поглощения и рассеяния хромофоров и рассеивающих частиц, присутствующих в биологической ткани, приведены окна прозрачности биологической ткани. В **§1.2** описаны принципы лазерно-индуцированной флуоресцентной диагностики (ФД) и фотодинамической терапии (ФДТ), приведены пути потери флуоресцентных свойств ФС при фотообесцвечивании, связь процесса с потреблением кислорода и образованием активных форм кислорода (АФК), описаны типичные значения времен жизни для энергетических состояний молекулы ФС. В **§1.3** рассмотрены

фотосенсибилизаторы на основе протопорфирина IX (PpIX) и хлорина Е6 (Сe6), разрешенные к клиническому применению и использованные в данной работе, представлен метаболический путь преобразования 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК) в PpIX в нормальных, раковых и некротических клетках. В §1.4 описаны современные методики лазерной диагностики и лечения опухолей глубокозалегающей локализации, рассмотрены ограничения рассмотренных методик, обусловленные труднодоступностью локализации и диффузным инфильтративным ростом опухолевых клеток в головном мозге. В §1.5 представлены существующие методики определения степени оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном русле крови, описан ряд недостатков разработок для измерения оксигенации гемоглобина, приведен параметр для оценки микроциркуляторного кровотока в тканях опухолевой и здоровой ткани ( $StO_2$ ).

**Вторая глава** посвящена рассмотрению материалов и методов исследования, содержит описание экспериментальных установок, объектов исследования, используемых методов моделирования и обработки спектральных данных. В §2.1 представлена методика создания экспериментальных моделей биологических тканей (оптических фантомов) с содержанием ФС в концентрациях, реализующихся при клиническом применении. В §2.2 описана методика интраоперационной оценки накопления фотосенсибилизатора по регистрированию лазерно-индуцированной флуоресценции ФС, рассмотрена глубина проникновения света в ткань и зависимость глубины зондирования от расстояния между излучающим и приемным волокнами. В §2.3 представлена методика исследования оксигенации гемоглобина в биологических тканях на базе спектроскопического метода обратно-диффузного отражения. В §2.4 рассмотрен алгоритм моделирования распространения лазерного излучения методом Монте-Карло в многослойных биологических структурах, приведена зависимость индикатрисы рассеяния от параметра анизотропии рассеяния, представлена область наиболее вероятных траекторий распространения фотонов от излучающего к приемному волокну. В §2.5 описана экспериментальная установка для спектроскопического измерения степени оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном русле. В §2.6 рассмотрена двух-канальная видео-система для флуоресцентной диагностики и определения локализации опухоли, ее границ и патологической ткани по флуоресценции фотосенсибилизатора, накопленного в

опухолевой ткани. В §2.7 представлена диагностическая канюля для биопсии с одновременным спектроскопическим контролем для определения локализации труднодоступной опухоли и ее границ при доступе к опухоли головного мозга стереотаксическим способом. В §2.8 описана методика измерения времени жизни флуоресценции ФС с помощью лазерного спектроскопического комплекса с пикосекундным разрешением. В §2.9 представлен лазерный сканирующий микроскоп для исследования накопления ФС в клетках опухоли.

В третьей главе представлен неинвазивный лазерно-спектроскопический метод, позволяющий определить степень оксигенации гемоглобина в биологических тканях мозга в БИК-диапазоне с поверхности головы. Особое внимание уделено определению глубины зондирования лазерного излучения в биологической ткани, при вариативном взаимном положении излучающего и приемного оптических волокон, численным методом Монте-Карло, при разнородных оптических параметрах многослойной оптической среды, соответствующих реальной структуре головы человека. В §3.1 описана методика неинвазивного измерения оксигенации гемоглобина в смешанной крови микроциркуляторного русла мозга в ближнем инфракрасном (БИК) диапазоне. Лазерные источники с длиной волны излучения 687 нм и 804 нм, используемые в экспериментальной установке, подобраны с учетом различий поглощательной способности двух форм гемоглобина. При длине волны  $\lambda_1 = 687$  нм значение коэффициента молярной экстинкции восстановленного гемоглобина примерно в 10 раз больше, чем у оксигенированной формы ( $2115 \text{ см}^{-1} \text{ моль}^{-1}$  и  $274 \text{ см}^{-1} \text{ моль}^{-1}$  соответственно). В инфракрасном диапазоне при длине волны  $\lambda_2 = 804$  нм поглощение оптического излучения двумя формами гемоглобина одинаково, таким образом в зависимости от снижения или повышения концентрации форм гемоглобина изменяется интенсивность обратного рассеяния, что свидетельствует о состоянии кровенаполнения ткани. Оценку степени оксигенации ( $StO_2$ ) проводили исходя из:

$$StO_2 = A \cdot R + B, \quad (1)$$

где  $R$  – отношение интенсивностей  $I_{\lambda_2}$  и  $I_{\lambda_1}$ ,  $A$  и  $B$  – эмпирические коэффициенты, определяемые путем калибровки. Отношение  $R$  рассчитывалась как отношение интегральной интенсивности под спектральным пиком сигнала обратного-рассеяния  $I_2(\lambda)$  к интегральной интенсивности под спектральной кривой обратно рассеянного лазерного излучения  $I_1(\lambda)$ :

$$R = \frac{\int_{\lambda} I_2(\lambda)d(\lambda)}{\int_{\lambda} I_1(\lambda)d(\lambda)}. \quad (2)$$

В §3.2 представлены результаты моделирования распространения света в ткани для определения глубины зондирования лазерного излучения при БИК-спектроскопии методом Монте-Карло. Мозг человека с прилежащими тканями представляет собой многослойную структуру, оптические свойства определялись свойствами каждого слоя с отличающимися оптическими параметрами  $\mu_a$ ,  $\mu_s$ ,  $g$  и геометрическими – различной средней толщиной  $l$ , и показателем преломления среды  $n$ . Моделирование выполняли при значении расстояния между приемным и излучающим волокнами  $r = 15, 20, 30, 45$  мм. В этом исследовании источником излучения служило кварцевое оптическое волокно с диаметром  $D_{ист} = 4,2$  см, такой диаметр был выбран с целью уменьшения плотности мощности для избегания возможности термического воздействия при длительном времени измерений (рис. 1 (а)). В качестве приемника использовали диагностический катетер, состоящий из 5 кварцевых волокон для приема лазерного излучения. Диаметр каждого волокна составил  $D_{прием} = 250$  мкм, числовая апертура была равна  $NA = 0.22$ . По результатам моделирования получены картины распределения наиболее вероятного пути фотонов в ткани от излучающего волокна до детектора для каждого межволоконного расстояния  $r$ , получена зависимость роста глубины зондирования лазерного излучения в ткань при увеличении расстояния между оптическими волокнами (рис. 1 (б)). При межволоконном расстоянии  $r = 30$  мм, глубина зондирования ограничена расстоянием 15.5 мм, достигающая серого вещества мозга.

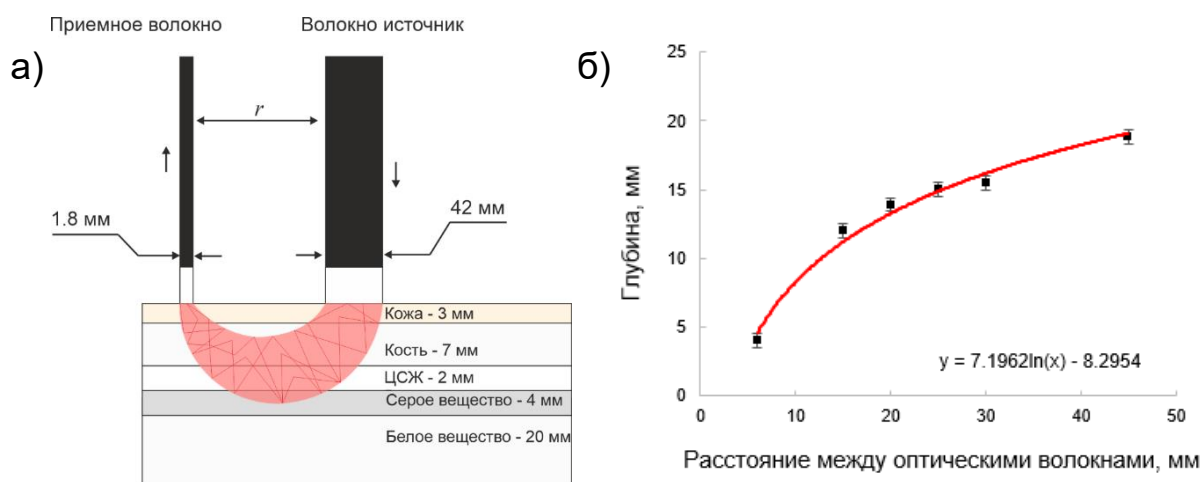


Рисунок 1 – Схема постановки волокон при спектроскопической диагностике в БИК-диапазоне. Изменение глубины зондирования лазерного излучения при изменении межволоконного расстояния в биологической ткани.

В §3.3 описаны результаты апробации разработанного метода при исследовании динамики изменения степени оксигенации гемоглобина на образцах, имитирующих оптические свойства реальной ткани (оптических фантомах мозга) и *in vivo* на мелких лабораторных животных (мышях). При исследовании многослойной структуры головного мозга человека с прилежащими тканями разработан многослойный фантом биологического объекта, имитирующий оптические свойства мозга и прилежащих тканей человека. Оптический фантом состоял из липофундина (составляющего 10% от общего объема) и донорской крови (6,25% по объему), в качестве черепа был создан пластиковый макет из PLA-пластика (полилактид). По полученным данным были получены значения степени оксигенации в процессе деоксигенации (рис. 2). В этом случае характерно постепенное снижение степени оксигенации на всем промежутке времени.

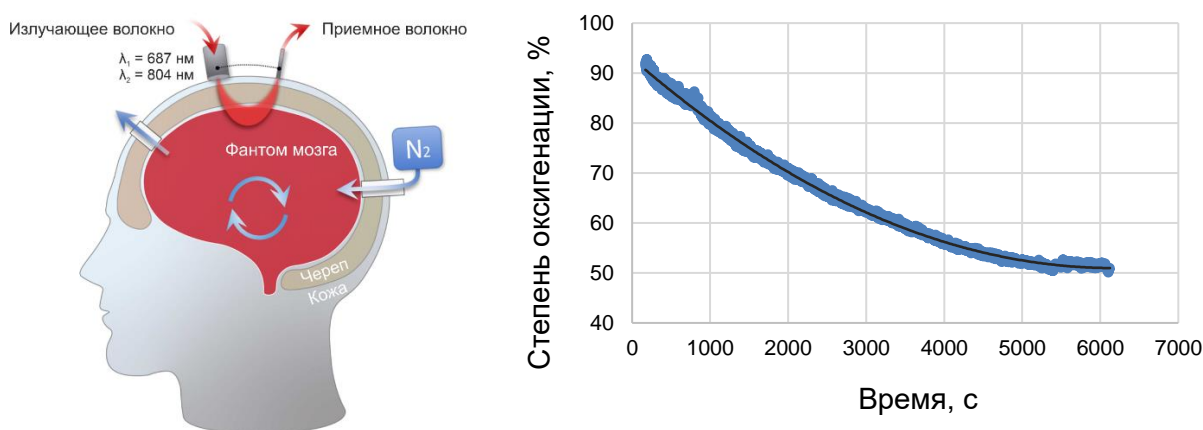


Рисунок 2 – Схематическое изображение многослойной структуры и всех протекающих в ней процессов обмена. Динамика изменения степени оксигенации многослойного оптического фантома головного мозга человека с течением времени.

При исследовании на лабораторных животных (мышях) *in vivo* было выбрано несколько межволоконных расстояний  $r$  между источником излучения и приемным волокном: 3 мм, 6 мм и 9 мм (при таких параметрах глубина зондирования составляла 1.6 мм, 2.3 мм, 3 мм соответственно). После проведенного спектроскопического анализа в результате эксперимента по изменению обратнорассеянного лазерного сигнала была выявлена динамика изменения степени оксигенации гемоглобина от времени при снижении общей оксигенации гемоглобина в мозге с помощью подачи газообразного азота ( $N_2$ ). По мере быстрого увеличения концентрации азота в организме происходило вытеснение кислорода и увеличение восстановленного гемоглобина в тканях мозга мыши и наблюдалось

изменение регистрируемого сигнала. После прекращения подачи газа степень оксигенации гемоглобина возвращалась к изначальному значению (рис. 3). Для поддержания оптимальных условий с целью безопасного процесса получения параметров, временной период каждого измерения был установлен в 15 минут, включая время между измерениями.

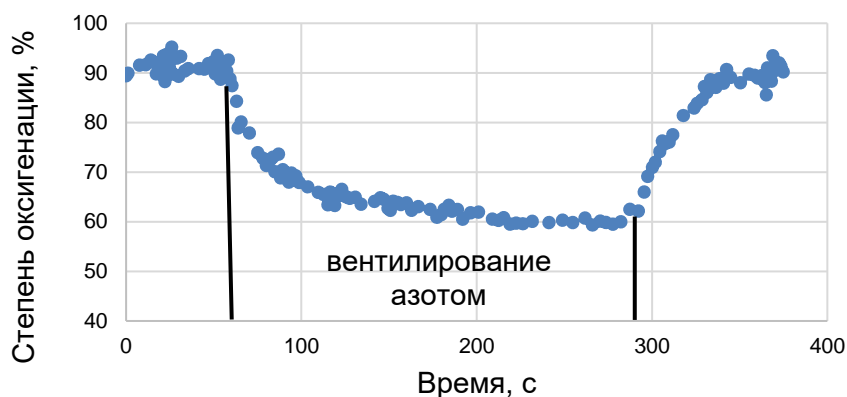


Рисунок 3 – График изменения степени оксигенации полученный *in vivo*, значения определены по отношению интегральных площадей под обратно-рассеянными лазерными пиками от времени.

В **четвертой главе** представлены результаты исследований, полученных при разработке методов спектроскопического контроля лазерного воздействия на глубокозалегающие и труднодоступные опухоли с применением 5-АЛК индуцированного РрIX. В §4.1 представлена методика спектроскопического контроля лазерного воздействия на глубокозалегающие и труднодоступные опухоли головного мозга с применением 5-АЛК индуцированного РрIX и использованием модифицированной стереотаксической иглы. Модифицированное волоконное оптическое устройство для малоинвазивной диагностики глубокозалегающих опухолей с системой экранирования исследуемой ткани в области измерения позволило с высокой точностью измерять интенсивность флуоресценции фотосенсибилизатора как при прямом проходе через опухоль головного мозга, так и при обратном (рис. 4).

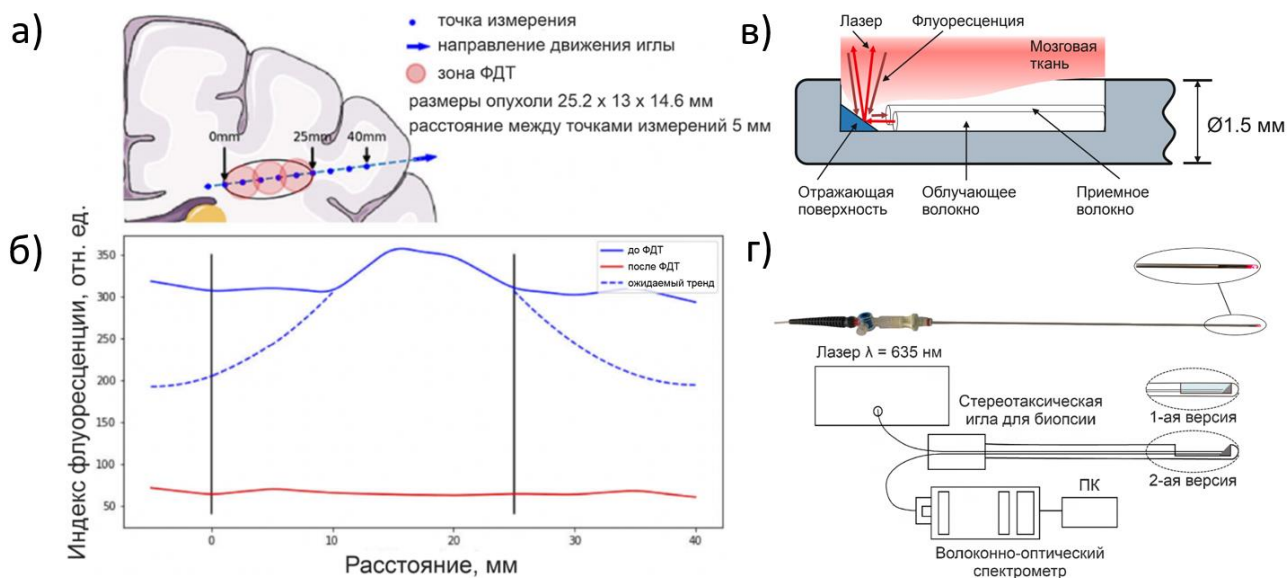


Рисунок 4 – а) Схематический рисунок локализации опухоли с отмеченной траекторией диагностической канюли. б) Измерения показателя индекса флуоресценции, полученные с помощью оптоволоконного спектрометра. в) Изображение канюли для стереотаксической биопсии опухоли головного мозга с непрерывным спектроскопическим контролем. г) Схема установки.

В §4.2 рассмотрено влияние поглощения гемоглобина в крови на интенсивность лазерно-индуцированной флуоресценции PpIX и лазерного сигнала при изменении оксигенации гемоглобина в положениях «на просвет» и одностороннем измерении. В §4.3 представлены результаты по измерению время жизни флуоресценции фотосенсибилизатора PpIX в опухоли головного мозга с повышенным и низким содержанием кислорода. В §4.4 представлена методика одновременной передачи лазерного излучения и получения лазерно-индуцированной флуоресценции фотосенсибилизаторов на основе PpIX и Себ по одному волокну (рис. 5). Разработанная моно-волоконная система доставки, на основе волокна с меньшим диаметром, чем стереотаксическая игла для хирургических операций, позволит уменьшить необходимый диаметр отверстия, используемого для доступа к опухоли и в результате уменьшить повреждение здоровых тканей на пути от поверхности головы до опухоли.

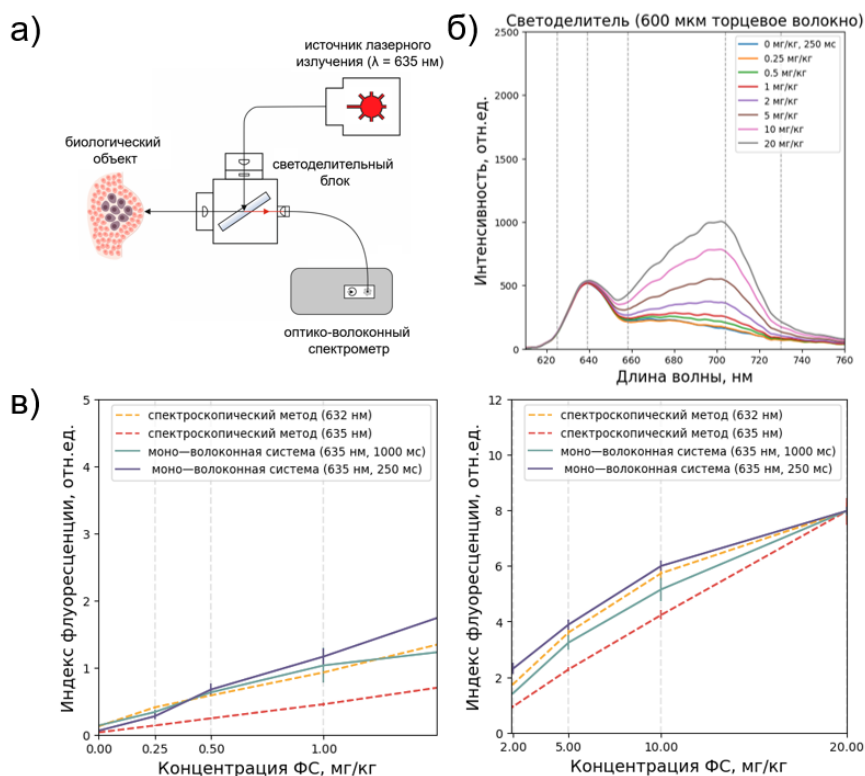


Рисунок 5 – а) Моно-волоконная система доставки лазерного излучения и флуоресценции фотосенсибилизатора, накопленного в биологическом образце, с возможностью получения данных в спектральном виде. б) Спектры флуоресценции PrIX, полученные с применением моно-волоконной системы доставки лазерного излучения. в) Калибровочные кривые разработанной моно-волоконной системы доставки.

Представленные в главе методы и разработанные системы доставки позволят использовать их в качестве инструментария для определения концентрации фотосенсибилизатора, накопленного в труднодоступной и глубокозалегающей опухоли, в процессе ФДТ.

**Пятая глава** посвящена разработке подхода к неинвазивной лазерно-спектроскопической методике определения фотопродуктов PrIX при ФДТ и оценки оксигенации гемоглобина в видимом диапазоне с уточненным влиянием рассеяния клеток на сигнал. В §5.1 определен алгоритм оценки степени оксигенации гемоглобина кислородом с учетом баланса между компонентами рассеяния Рэля и Ми. Для оценки насыщения гемоглобина кислородом по спектрам диффузного рассеяния предложен алгоритм, разделяющий регистрируемый спектр на составляющие, обусловленные поглощением и рассеянием, в квадратичном виде:

$$A(\lambda) = c_0 \cdot \frac{\lambda^{-a_1}}{550} + c_1 \cdot \frac{\lambda^{-a_2}}{550} + \langle L \rangle \cdot (cHb \cdot \varepsilon Hb(\lambda) + cHbO_2 \cdot \varepsilon HbO_2(\lambda)) \cdot \ln(10) \quad (3)$$

В результате моделирования была построена графическая зависимость коэффициента затухания  $A_{model}(\lambda)$  от длины волны и модельные функции, аппроксимирующие спектр коэффициента затухания, полученный экспериментально (рис. 6). Применение данного подхода позволило снизить ошибку при определении степени оксигенации стенки кишки при одностороннем измерении примерно в 2 раза, и в геометрии «насквозь» на 3 порядка.

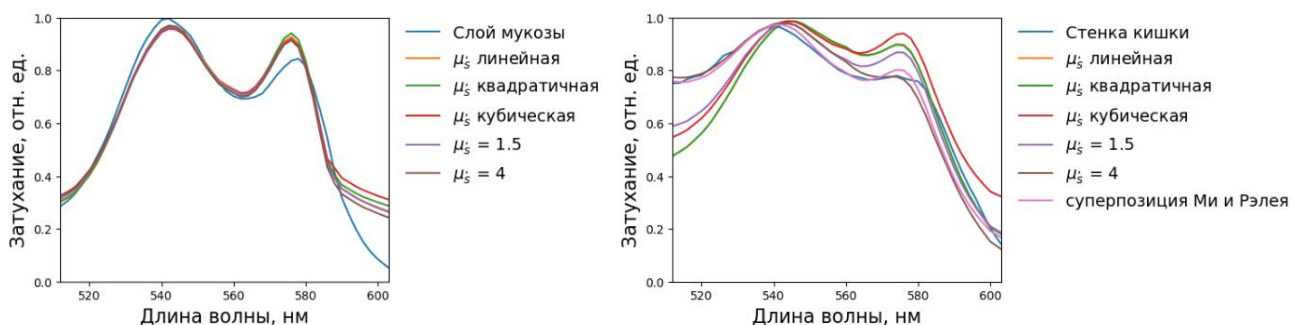


Рисунок 6 – Спектры диффузно-рассеянного сигнала и моделируемые спектры затухания света от стенки кишки.

Полученные результаты позволили уточнить значение степени оксигенации ( $StO_2$ ) от 2 до 15%. В §5.2 описан способ экспериментального определения оксигенации гемоглобина в фантомах, имитирующих оптические свойства поверхностных слоев молочной железы и стенки кишки, и определена глубина зондирования светового излучения при расстояниях между приемным и излучающими волокнами 2, 4, 7 мм. Достаточная глубина зондирования для определения степени оксигенации гемоглобина  $StO_2$  при таких расстояниях соответствовала 1, 2 и 3 мм. По результатам проведенного эксперимента с многослойной моделью молочной железы оценку степени оксигенации гемоглобина в крови можно проводить на глубине до 15 мм при наличии высокой плотности сосудов в области исследования. В §5.3 представлены результаты интраоперационной оценки степени оксигенации гемоглобина при хирургии молочной железы и стенки кишки (рис. 7).

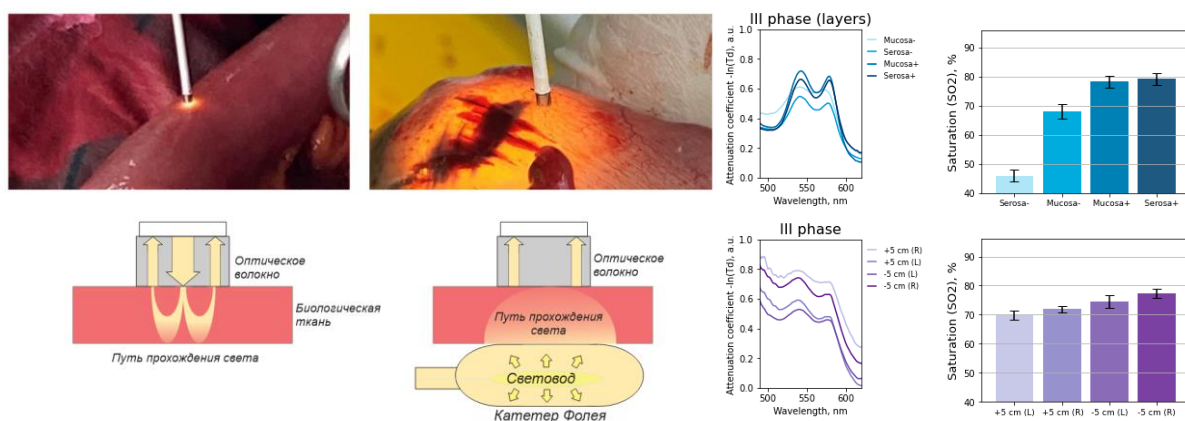


Рисунок 7 – Схематическое и реальное изображение волокон при проводимых измерениях тканевой сатурации гемоглобина в тонкой кишке, выбор линии резекции определялся по полученным значениям  $StO_2$ . Слева представлено постановка излучающего и приемного оптических волокон с одной стороны, справа – в геометрии «на просвет».

Плотность мощности и расстояние  $l$  между источником и детектором устанавливали в зависимости от локализации опухоли, что позволило определить степень оксигенации гемоглобина  $StO_2$  в двух проекциях – на просвет и при одностороннем измерении с обеспечением подходящей глубины зондирования света в ткани при рассмотрении различных многослойных биологических структур. §5.4 демонстрирует результаты экспериментов, связанных с исследованием динамики образования фотопродуктов PpIX при лазерном воздействии, а также описана методика спектрально-флуоресцентного контроля процесса ФДТ по интенсивности флуоресценции фотопорфирина Ppp, который является фотопродуктом хлоринового ряда, образующийся при лазерно-индуцированном фотодинамическом воздействии на биологические ткани, содержащие PpIX (рис. 8).

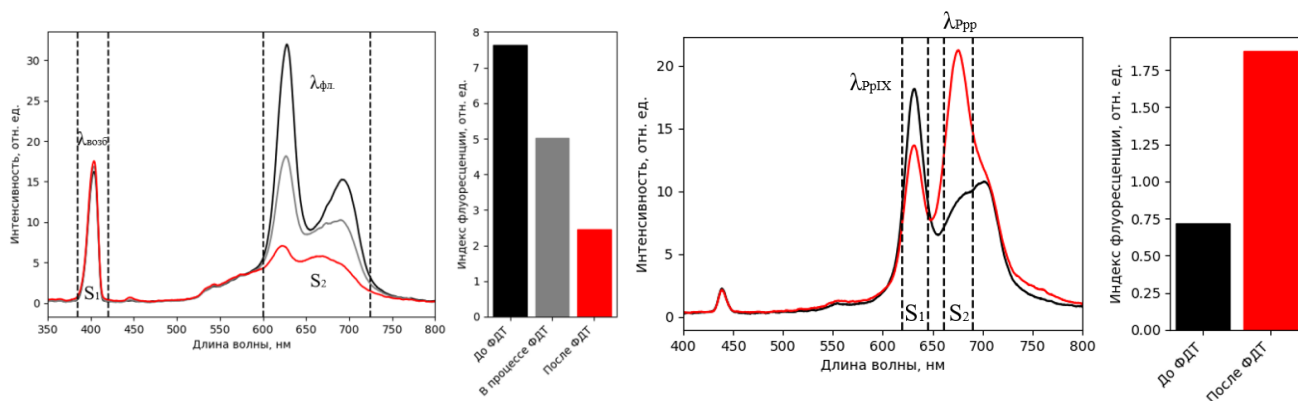


Рисунок 8 – Расчет индекса флуоресценции ФС. Оценка образования фотопорфирина Ppp.

Выявлены значения основных энергетических параметров дозы энергии и плотности мощности лазера, обеспечивающие высокое образование фотопорфирина Rrr и высокий ФДТ эффект, выявленный по степени фотообесцвечивания в процессе ФДТ фотопродуктов (рис. 9).

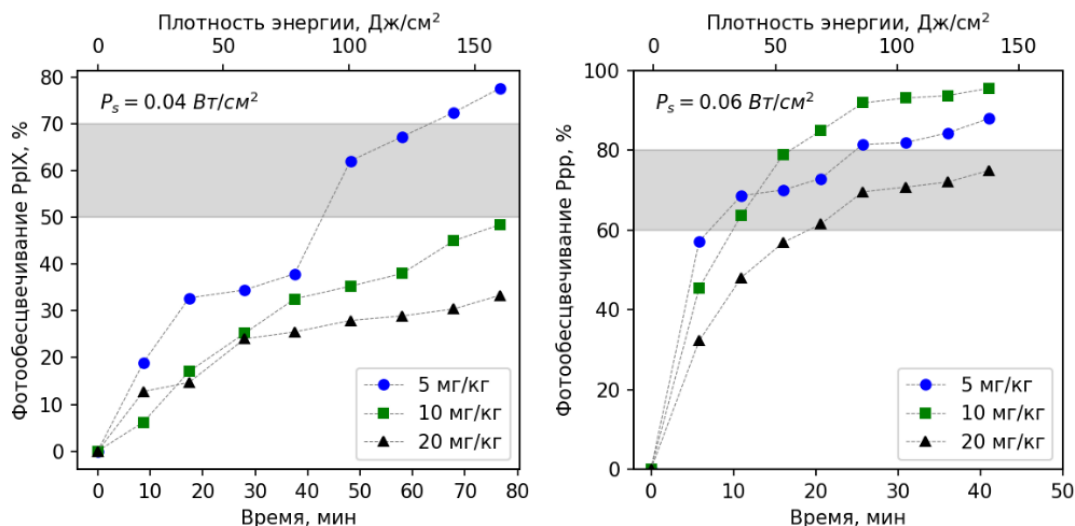


Рисунок 9 – Зависимость фотообесцвечивания PrIX и Rrr в концентрациях 5, 10, 20 мг/кг соответственно на модели биологической ткани от плотности энергии и времени воздействия лазерного излучения.

При анализе спектра поглощения определены полосы поглощения, характерные фотопорфиру Rrr, при воздействии лазерным излучением 635 нм с плотностью мощности  $P_s$  от 40 до 300 мВт/см² и плотностью дозы энергии  $E_s = 200 \text{ Дж/см}^2$ . В §5.5 представлены результаты применения описанного подхода и оценки накопления фотопродуктов PrIX при фотодинамической терапии кожных новообразований с последующим ФДТ фотопродуктов лазерным излучением с длиной волны 660 нм (рис. 10).

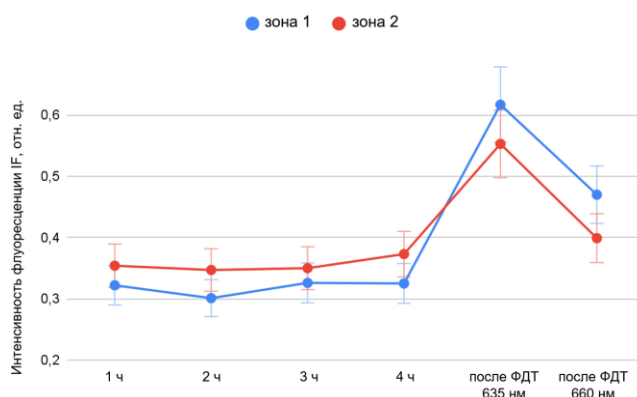


Рисунок 10 – Изменение флуоресценции фотопродуктов Rrr в процессе накопления 5-АЛК индуцированного PrIX, а также ФДТ с лазерным облучением  $\lambda_{\text{laser}} = 635 \text{ нм}$  (плотность мощности  $P_s = 380 \text{ мВт/см}^2$ , доза энергии  $E_s = 100 \text{ Дж/см}^2$ ).

**В заключении** подведены итоги работы, сформулированы основные выводы по результатам исследования. Обозначены перспективы дальнейшего развития методов для определения оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном кровеносном русле и разработки оптико-волоконных систем для доставки лазерного излучения к глубокозалегающим и труднодоступным опухолям головного мозга.

### **Основные выводы работы**

В данной диссертационной работе был разработан новый метод для определения оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном кровеносном русле с использованием лазерного излучения в БИК-диапазоне и устройство для доставки лазерного излучения к глубокозалегающим и труднодоступным опухолям головного мозга, а также лазерно-спектроскопическая методика контроля хирургических операций по флуоресценции фотосенсибилизаторов и оксигенации гемоглобина в биологической ткани.

1. Разработан лазерно-спектроскопический метод определения оксигенации гемоглобина и анализа обратно-рассеянного лазерного излучения в БИК-диапазоне с волоконно-оптическим способом доставки света к области исследования. Метод обеспечивает в режиме реального времени регистрирование спектроскопических сигналов с глубиной зондирования лазерного излучения до 15.5 мм при расстоянии 30 мм между приемным и излучающим волокном, и позволяет неинвазивно анализировать изменение кровотока коры головного мозга по двум длинам волн 687 нм и 804 нм с плотностью мощности лазерного излучения 25 мВ/см<sup>2</sup>.
2. Метод лазерно-индуцированной флуоресцентной диагностики с применением стереотаксического волоконно-оптического устройства позволяет проводить малоинвазивную спектрально-флуоресцентную навигацию глубокозалегающих опухолей мозга в диапазоне длин волн 680 – 720 нм при возбуждении флуоресценции ФС на основе протопорфирина IX при длине волны  $\lambda = 635$  нм с возможностью точной оценки границы опухолевого роста и приграничной области.
3. Разработано моно-волоконное устройство малого диаметра 400 – 600 мкм с фотоприемным устройством в виде CCD-матрицы или волоконного спектрометра, которое позволяет оценивать оптические свойства облучаемых

тканей и одновременно проводить диагностику в процессе лазерного облучения по интенсивности флуоресценции фотосенсибилизаторов на основе протопорфирина IX и хлорина Е6. Оптимизированы геометрические параметры используемых оптических волокон и оптические параметры используемых объективов, фильтров для получения сигналов отражения и флуоресценции по одному и тому же волокну.

4. Методика спектроскопической оценки оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном русле позволила с учетом вклада компонентов рассеяния Рэлея и Ми от оптических параметров тканей эпителия определить качество сшиваемых тканей по значению оксигенации гемоглобина в крови в диапазоне длин волн 500 – 600 нм.
5. Установлено, что определение фотопродуктов PpIX при ФДТ и оценка оксигенации гемоглобина в видимом диапазоне излучения, с возбуждением флуоресценции фотосенсибилизатора лазерным излучением с длиной волны 632.8 нм и возбуждением флуоресценции фотопродуктов лазерным излучением с длиной волны 660 нм позволяет контролировать процесс фотодинамического воздействия на ткани.

Предложенные методы и оптико-волоконные системы были успешно использованы для применения в нескольких клинических направлениях, таких как нейрохирургия опухоли мозга, интраоперационная абдоминальная хирургия и хирургическая пластика кожи. Перспективы развития предложенных методов заключаются в разработке алгоритмов машинного обучения для автоматической интерпретации спектров флуоресценции и диффузного отражения, что позволит повысить чувствительность и специфичность детектирования границ опухоли при инфильтративном росте.

#### Список работ, опубликованных автором по теме диссертации

1. Evaluating the dynamics of brain tissue oxygenation using near-infrared spectroscopy on various experimental models / **D.M. Kustov**, A.S. Sharova, V.I. Makarov, A.V. Borodkin, T.A. Saveleva, V.B. Loschenov [et al.] // Laser Physics Letters. – 2019. – Т. 16. – № 11. – С. 115602 (**Scopus Q2, Web of Science Q3**). DOI: 10.1088/1612-202X/ab4182
2. Laser-Induced Fluorescent Visualization and Photodynamic Therapy in Surgical Treatment of Glial Brain Tumors / **D.M. Kustov**, E.I. Kozlikina, K.T. Efendiev, M.V.

- Loshchenov, P.V. Grachev, Yu.S. Maklygina, I.S. Trifonov, A.V. Baranov, E.F. Stranadko, D.N. Panchenkov, V.V. Krylov, V.B. Loschenov [et al.] // *Biomedical optics express*. – 2021. – T. 12. – № 3. – C. 1761–1773 (**Scopus Q1, Web of Science Q1**). DOI: 10.1364/BOE.415936
3. Intraoperative Control of Hemoglobin Oxygen Saturation in the Intestinal Wall during Anastomosis Surgery / **D.M. Kustov**, T.A. Savelieva, T.A. Mironov, S.S. Kharnas, V.V. Levkin, A.S. Gorbunov, A.A. Shiryaev, V.B. Loschenov [et al.] // *Photonics*. – 2021. – T. 8. – № 10. – C. 427 (**Scopus Q2, Web of Science Q3**). DOI: 10.3390/photonics8100427
  4. Optical Spectral Approach to Breast Tissue Oxygen Saturation Analysis for Mastectomy Perioperative Control / **D.M. Kustov**, A.A. Krivetskaya, T.A. Savelieva, A.S. Gorbunov, E.P. Kashirina, S.S. Kharnas, V.V. Levkin, V.I. Krasnovsky, E.Y. Anosova, D.V. Momatiuk, R.S. Ibragimov [et al.] // *Photonics*. – 2022. – T. 9. – № 11. – C. 821 (**Scopus Q2, Web of Science Q3**). DOI: 10.3390/photonics9110821
  5. Evaluation of tissue blood supply during esophagectomy using fluorescent diagnostics and diffuse scattering spectroscopy in visible region / A.A. Krivetskaya, **D.M. Kustov**, V.V. Levkin, S.V. Osminin, S.S. Kharnas, E.V. Eventeva, F.P. Vetshev, R.N. Komarov, K.G. Linkov, T.A. Savelieva, V.B. Loschenov [et al.] // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2024. – T. 45. – C. 103937 (**Scopus Q2, Web of Science Q3**). DOI: 10.1016/j.pdpdt.2023.103937
  6. Validation of a White Light and Fluorescence Augmented Panoramic Endoscopic Imaging System on a Bimodal Bladder Wall Experimental Model / A. Moskalev, N. Kalyagina, E. Kozlikina, **D. Kustov**, M. Loshchenov, M. Amouroux, C. Daul, W. Blondel [et al.] // *Photonics*. – 2024. – T. 11. – №6. – C. 514 (**Scopus Q2, Web of Science Q3**). DOI: 10.3390/photonics11060514
  7. Dual-Wavelength Fluorescence Study of In Vivo Accumulation and Formation of 5-ALA-Induced Porphyrins / V.E. Zavedeeva, K.T. Efendiev, **D.M. Kustov**, L.U. Loschenova, V.B. Loschenov [et al.] // *Biomed. Photonics*. – 2025. – T. 14. – C. 36–46 (**Scopus Q3**). DOI: 10.24931/2413-9432-2025-14-1-36-46
  8. Monitoring the accumulation and photobleaching of protoporphyrin IX and photoporphyrin during photodynamic therapy under dual-wavelength fluorescence excitation / **D.M. Kustov**, K.T. Efendiev, V.E. Zavedeeva, L.U. Loschenova, V.B. Loschenov [et al.] // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2025. – T. 56. – C. 105074 (**Scopus Q2, Web of Science Q3**). DOI: 10.1016/j.pdpdt.2025.105074