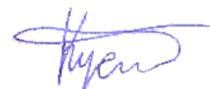


Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Федеральный исследовательский центр

«Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук»

На правах рукописи



Кустов Даниил Максимович

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

Специальность: 1.3.19. Лазерная физика

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

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

Москва – 2026

Оглавление

Оглавление	2
Введение	4
Глава 1. Аналитический обзор литературы по теме исследования	14
1.1. Распространение лазерного излучения в биологических тканях.....	14
1.2. Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия	22
1.3. Фотосенсибилизаторы	26
1.4. Современные методики лазерной диагностики и лечения опухолей труднодоступной и глубокозалегающей локализации	30
1.5. Методики определения оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном русле крови.....	33
Заключение к главе 1.....	35
Глава 2. Материалы, инструменты, оборудование и методы исследования	37
2.1. Оптические фантомы	37
2.2. Методика интраоперационной оценки накопления фотосенсибилизатора	40
2.3. Методика исследования оксигенации гемоглобина в биологических тканях	42
2.4. Моделирование распространения лазерного излучения методом Монте-Карло	43
2.5. Установка для спектроскопического измерения степени оксигенации гемоглобина	48
2.6. Двух-канальная видео-система для флуоресцентной диагностики и определения локализации опухоли, ее границ и патологической ткани по флуоресценции фотосенсибилизатора, накопленного в опухолевой ткани	49
2.7. Диагностическая канюля, разработанная на базе стереотаксической иглы для биопсии с одновременным спектроскопическим контролем для определения локализации труднодоступной опухоли и ее границ	51
2.8. Лазерный спектроскопический комплекс с пикосекундным разрешением для измерения времени жизни флуоресценции фотосенсибилизатора.....	52
2.9. Лазерный сканирующий микроскоп.....	55
Заключение к главе 2.....	56
Глава 3. Разработка неинвазивной лазерно-спектроскопической методики оценки оксигенации гемоглобина в БИК-диапазоне	58
3.1. Методика неинвазивного измерения тканевой сатурации оксигемоглобина в смешанной крови микроциркуляторного русла мозга в ближнем инфракрасном диапазоне.....	58
3.2. Моделирование распространения света в ткани для определения глубины зондирования лазерного излучения при БИК-спектроскопии.....	64
3.3. Неинвазивное измерение тканевой сатурации оксигемоглобина в смешанной крови микроциркуляторного (церебрального) русла мозга в БИК-диапазоне	72
Заключение к главе 3.....	79
Глава 4. Разработка спектроскопической методики контроля лазерного воздействия на глубокозалегающие и труднодоступные опухоли и исследование времени жизни РrIX в средах с повышенным и низким содержанием кислорода	80

4.1. Методика спектроскопического контроля лазерного воздействия на глубокозалегающие и труднодоступные опухоли головного мозга.....	80
4.2. Влияние поглощения гемоглобина в крови на интенсивность лазерно-индуцированной флуоресценции РrIX и лазерного сигнала при изменении оксигенации гемоглобина	85
4.3. Время жизни флуоресценции фотосенсибилизатора РrIX в опухоли головного мозга с повышенным и низким содержанием кислорода	89
4.4. Моно-волоконная система доставки и регистрирования лазерного излучения и флуоресценции для определения концентрации фотосенсибилизатора РrIX, спектроскопической диагностики и эндоскопического контроля ФДТ труднодоступных и глубокозалегающих опухолей	97
Заключение к главе 4.....	105
Глава 5. Разработка неинвазивной лазерно-спектроскопической методики определения фотопродуктов РrIX при ФДТ и оценки оксигенации гемоглобина в видимом диапазоне излучения....	106
5.1. Алгоритм оценки степени насыщения гемоглобина кислородом с учетом влияния рассеяния клеток ткани на спектр затухания.....	106
5.2. Методика контроля оксигенации гемоглобина в поверхностных слоях молочной железы, стенки кишки в видимом диапазоне спектра	111
5.3. Результаты оценки тканевой сатурации гемоглобина кислородом при хирургии молочной железы и стенки кишки	115
5.4. Разработка методики спектрально-флуоресцентного исследования образования фотопродуктов РrIX при лазерно-индуцированном фотодинамическом воздействии на биологические ткани.....	122
5.5. Результаты оценки накопления фотопродуктов РrIX при фотодинамической терапии кожных новообразований.....	128
Заключение к главе 5.....	139
Заключение	140
Список сокращений.....	142
Список литературы.....	143

Введение

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 объёме 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 РрIX и Се6 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 (РрIX) и хлорина е6 (Се6) по моно-волокну. Определить чувствительность измерения интенсивности флуоресценции фотосенсибилизаторов РрIX и Се6 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 Е6 с соотношением сигнал/шум достаточным для оценки концентрации используемых в клинической практике фотосенсибилизаторов.
6. 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 PpIX 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 международных и всероссийских 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. РФФИ 22-72-10117 Разработка методов контроля оксигенации опухолей и повышения эффективности фотодинамической терапии при помощи метиленового синего. Основной исполнитель. 2022 – 2025 г.
3. РФФИ 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.

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. 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. – Т. 12. – № 3. – С. 1761–1773. 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. Shiryayev, V.B. Loschenov [et al.] // Photonics. – 2021. – Т. 8. – № 10. – С. 427. 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. – Т. 9. – № 11. – С. 821. DOI: 10.3390/photronics9110821
5. 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. – Т. 11. – №6. – С. 514. DOI: 10.3390/photronics11060514
 6. 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. – Т. 45. – С. 103937. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2023.103937
 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. – Т. 14. – С. 36–46. DOI: 10.24931/2413-9432-2025-14-1-36-46
 8. Monitoring the accumulation and photobleaching of protoporphyrin IX and photo-protoporphyrin 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. – Т. 56. – С. 105074. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2025.105074

Благодарности

Автор благодарит научного руководителя Лощёнова Виктора Борисовича за неоценимую помощь на каждом этапе проведения исследований, чуткое руководство и ценные замечания, которые позволили достичь поставленных целей.

Автор выражает благодарность сотрудникам лаборатории лазерной биоспектроскопии и персонально коллегам к.ф.-м.н. Савельевой Т.А., к.ф.-м.н. Макарову В.И., Романишкину И.Д., Ахлюстиной Е.В., Козликиной Е.И. и Кривецкой А.А. за научные дискуссии. Особая благодарность к.ф.-м.н. Грачеву П.В., к.ф.-м.н. Эфендиеву К.Т., к.ф.-м.н. Алексеевой П.А., Москалеву А.С. и Яковлеву Д.В. за дружескую поддержку и ценные советы, к.т.н. Линькову К.Г. и Бородкину А.В. за помощь в создании конструктивно-технических решений.

Автор благодарит сотрудников Первого МГМУ им. И.М. Сеченова д.м.н. профессора Левкина Владимира Вениаминовича и д.м.н. Ширяева Артема Анатольевича, сотрудников МГМСУ им. А. И. Евдокимова к.м.н. Трифонова Игоря Сергеевича и д.м.н. профессора Крылова Владимира Викторовича за помощь и возможность проведения клинических исследований.

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.

Глава 1. Аналитический обзор литературы по теме исследования

В данной главе рассмотрены существующие методы лазерного воздействия и спектроскопического исследования биологических тканей, и основные факторы, описывающие характер распространения светового излучения в биологической ткани. В первом разделе рассмотрены оптические свойства биологических тканей, определяющие параметры оптической среды и особенности взаимодействия светового излучения с тканью. Во втором разделе разобран процесс фотодинамической терапии, описаны параметры энергетических уровней молекул фотосенсибилизатора и кислорода, энергетические переходы между ними. В третьем разделе представлены сведения о роли фотосенсибилизаторов в фотодинамической терапии, спектральных характеристиках флуоресценции и поглощения, молекулярной структуре и особенности метаболизма в живом организме. В четвертом разделе первой главы приводится обзор существующих методов контроля лазерного воздействия на биологические ткани, содержащие фотосенсибилизатор, и спектроскопических методов флуоресцентной диагностики. Особое внимание уделено способам оценки патологически измененной опухолевой ткани по экзогенной флуоресценции. В пятом разделе первой главы рассматривается роль кислорода при заживлении тканей. Проведен обзор применяемых методик исследования оксигенации гемоглобина в мягких тканях и полых органах.

1.1. Распространение лазерного излучения в биологических тканях

Биологическая ткань представляет собой оптически неоднородную среду и свет, проходя через неё, может подвергаться ослаблению вследствие поглощения и рассеяния. Под поглощением понимают процессы, при которых энергия фотона света поглощается молекулой. Поглощенная энергия может либо превратиться в тепло путем безызлучательных переходов, либо излучиться. Рассеяние представляет собой процессы, при которых начальное направление фотона изменяется при взаимодействии с рассеивающим объектом. В этом контексте выделяют два вида рассеяния: упругое и неупругое. В случае упругого рассеяния фотоны сохраняют свою энергию в процессе взаимодействия. При неупругом рассеянии энергия и, следовательно, длина волны фотона изменяются в процессе рассеяния. Биологическую ткань можно разделить на модели оптических сред, в зависимости от условий: поглощение преобладает над рассеянием; поглощение и рассеяние имеют почти равное влияние; рассеяния преобладает над поглощением.

При взаимодействии лазерного излучения с веществом, лазерный пучок уширяется и ослабляется по мере распространения в ткани. Это происходит за счет многократного рассеяния и поглощения. Рассеяние в объеме является основной причиной возникновения обратно-

рассеянного излучения. Проходя в глубь биологической ткани, происходит частичное поглощение света, часть лазерного излучения отражается, другая часть рассеивается (Рисунок 1.1). Поглощение является процессом, при котором энергия фотона преобразуется во внутреннюю энергию среды, в которой он движется, и зависит от молекулярных свойств материала. Поскольку биологические ткани являются оптически неоднородными поглощающими средами то при попадании в ткань падающего излучения, за счет многократных процессов рассеяния и поглощения, лазерный пучок уширяется и затухает, постепенно проходя вглубь ткани.

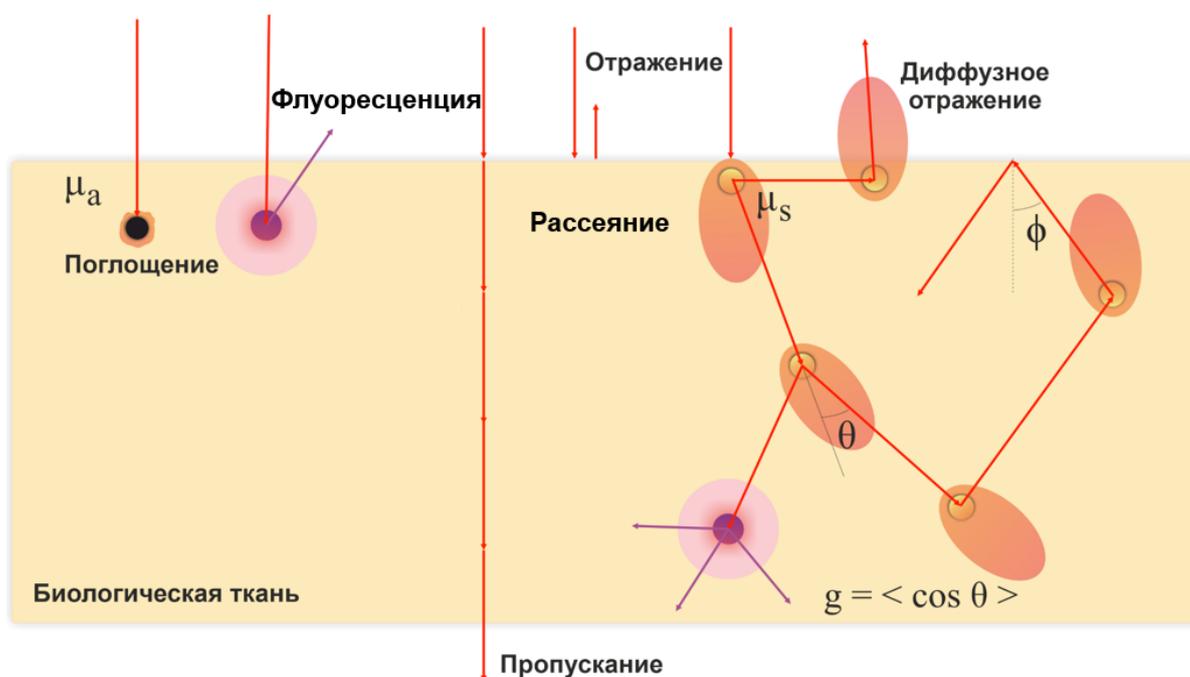


Рисунок 1.1 – Процессы, происходящие при воздействии излучения на биологическую ткань.

Значительный вклад в поглощающие и рассеивающие свойства просвечиваемой области ткани вносит кожа и костные структуры. С оптической точки зрения кожа – это многослойная поглощающая среда с ярко выраженными рассеивающими свойствами [1]. Взаимодействие излучения с такой средой носит сложный характер, который начинает проявляться уже при прохождении фотонами границы раздела кожа-воздух. Из-за различающихся показателей преломления воздуха и рогового слоя кожи, падающее излучение частично отражается. Таким образом, сигнал от источника излучения, пройдя по определенной траектории через ткань к детектору, затухает. Несмотря на значительное затухание излучения из-за процессов поглощения и рассеяния, в регистрируемом сигнале сохраняются спектроскопические параметры, характеризующие ткань, через которые они прошли на пути к детектору.

Количественное соотношение отраженного, поглощенного и рассеянного света, и, следовательно, глубина проникновения, зависит от длины волны λ падающего излучения. Данное соотношение определяется показателями преломления n , фактором анизотропии g , коэффициентами поглощения μ_a и рассеяния μ_s каждого из слоев для конкретной длины волны λ . Показатель преломления также определяет и полную отражательную способность среды.

Процесс поглощения излучения при прохождении мутной среды, содержащей поглощающий компонент, описывается законом Бугера-Ламберта-Бера [2]. Этот закон широко используется в области биомедицинской оптики, например, для вычисления насыщения кислородом в тканях организма [3,4,5], для определения концентрации компонентов гемоглобина [6], а также оптической длины пути через ткань [7]. При этом предполагается, что среда не является рассеивающей:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = kCd, \quad (1.1)$$

где A – оптическая плотность просвечиваемой среды; C – концентрация поглощающего вещества в среде; I – интенсивность светового излучения после прохождения среды; I_0 – интенсивность падающего светового излучения на среду; d – толщина просвечиваемого слоя (среды); k – коэффициент пропорциональности, зависящий от длины волны падающего излучения и природы самого вещества.

Оптическая плотность A является аддитивной величиной, что является отличительной чертой параметра. В случае, когда исследуемый объект состоит из нескольких компонентов, суммарная оптическая плотность равна сумме оптических плотностей каждого из компонентов раствора [2].

Коэффициент k является характеристикой данного вещества, который представляет собой молярный коэффициент поглощения данного вещества при заданной длине волны λ . Значение коэффициента не зависит от концентрации вещества в среде. В случае отсутствия взаимодействия между молекулами величина является функцией длины волны света. Отношение I/I_0 принято называть коэффициентом пропускания. Упругое рассеяние преобладает в биологических тканях. Оно возникает вследствие разницы показателей преломления между внутриклеточной и межклеточной жидкостями.

Коэффициент пропускания связан с оптической плотностью A следующим образом:

$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-\varepsilon Cl} = 10^{-A}, \quad (1.2)$$

ε – молярный коэффициент экстинкции [л/моль.см], C – концентрация хромофоров [моль/л]; l – оптический путь (см); D – оптическая плотность (ОП) или экстинкция.

При этом вводится в рассмотрение коэффициент поглощения μ_a , равный

$$\mu_a = \sigma_a * N = \varepsilon C \ln(10), \quad (1.3)$$

где σ_a – эффективное сечение поглощения (см^2); N_a – объемная плотность поглощающих молекул (см^{-3}); и обратная величина коэффициенту поглощения, равная длине свободного пробега фотона в среде до столкновения с поглотителем:

$$l_a = \frac{1}{\mu_a}. \quad (1.4)$$

При рассмотрении рассеивающих сред вводится коэффициент рассеяния μ_s и длина свободного пробега до акта столкновения фотона с частицей, приводящего к рассеянию фотона:

$$\mu_s = \sigma_s l, \quad (1.5)$$

$$l_s = \frac{1}{\mu_s}. \quad (1.6)$$

В таком случае в приближении однократного рассеяния ослабление света средой определяется согласно закону Бугера-Ламберта-Бэра, в котором вместо коэффициента поглощения использована сумма коэффициентов поглощения и рассеяния, учитывающая изъятие света из изначального потока за счет обоих эффектов, и определяется коэффициентом ослабления:

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s, \quad (1.7)$$

Интенсивность излучения при учете коэффициента ослабления по закону Бугера-Ламберта-Бэра будет определяться:

$$I = I_0 e^{-\mu_t l}. \quad (1.8)$$

Длину пути, пройденного каждым фотоном, определяет величина средней длины пробега фотона между актами рассеяния и поглощения:

$$l_{ph} = \mu_t^{-1}. \quad (1.9)$$

При рассмотрении биологической ткани в виде сильнорассеивающей оптической среды, используют эффективный коэффициент ослабления:

$$\mu_{eff} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu_s(1 - g))}, \quad (1.10)$$

где g – фактор анизотропии, учитывающий индикатрису рассеяния в каждом конкретном случае.

Биологические ткани в качестве оптических сред в большинстве случаев представляются сильно рассеивающими средами. Сильно рассеивающими средами являются кожа, мозг, молочная железа, кишки, желудок. Оптические свойства этих объектов можно аналитически описать с помощью модели теории переноса излучения (ТПИ), которая рассматривает перенос световой энергии в среде. [8]. ТПИ не учитывает волновые свойства света, поляризацию и интерференцию. Данная модель определяет процесс переноса световой энергии в среде. При этом используют средние оптические характеристики, усредненные по определенному элементарному объему. Эти характеристики включают коэффициент поглощения, коэффициент рассеяния и фактор анизотропии. Часто вводится редуцированный коэффициент рассеяния, который учитывает необходимость большего числа столкновений в анизотропной среде по сравнению с изотропной для того, чтобы излучение изменяло свое направление на тот же угол, что и в изотропной среде, и выражается формулой:

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

где g – фактор анизотропии рассеяния, который учитывает индикатрису рассеяния и может принимать абсолютные значения от 0 до 1: $g = 0$ – изотропное рассеяние, $g = 1$ – рассеяние вперед, отрицательные значения g означают обратное рассеяние.

Теория переноса излучения эффективна в случае ансамбля рассеивателей, находящихся достаточно далеко друг от друга, и успешно используется при решении различных прикладных задач в оптике биотканей. Основное уравнение теории переноса излучения для стационарного режима с монохроматическим светом можно выразить следующим образом [8]:

$$\frac{\partial}{\partial s} I(r, s) = -\mu_t I(r, s) + \mu_s \int p(s, s') I(r, s') d\omega', \quad (1.12)$$

где $I(r, s)$ – лучевая интенсивность света в точке r в направлении s ; $d\omega'$ – единичный телесный угол в направлении s' ; $p(s, s')$ – фазовая функция рассеяния.

Фазовая функция $p(s, s')$ описывает характеристики рассеивания в среде и представляет собой плотность вероятности для рассеяния фотона в направлении s' . Другими словами, эта функция описывает вероятность элементарного процесса рассеяния. В случае симметричного рассеяния относительно направления падающей волны, фазовая функция зависит только от угла θ между направлениями s и s' .

В условиях диффузионного приближения рассматривается случай, при котором коэффициент рассеяния μ_s существенно превосходит коэффициент поглощения μ_a . В этом

контексте применяется уравнение диффузии, которое связывает поток энергии с её распределением в среде. Это приближение эффективно описывает распространение света на больших расстояниях от источника излучения и применимо только в случае изотропной среды.

Пучок лазерного излучения можно рассматривать как совокупность траекторий распространения каждого фотона [9]. При прохождении границы биообъект-воздух и попадании в ткань, фотоны отклоняются от своей первоначально заданной траектории распространения из-за участия в многократных актах рассеяния.

Средняя длина пробега фотонов в ткани и глубина зондирования зависит от поглощающих и рассеивающих свойств ткани, а также от длины волны падающего излучения. Сложная пространственная неоднородная структура тканей обуславливает дополнительное искривление траекторий фотонов. Объемное рассеяние является причиной распространения значительной дозы излучения в обратном направлении. Обратное рассеянное (диффузно-отраженное) излучение несет информацию об объекте и может регистрироваться методами спектроскопии.

Таким образом, распространение света в ткани зависит от рассеивающих и поглощающих свойств ее компонентов: клеток, клеточных органелл и разнообразных волокнистых структур. В зависимости от геометрических размеров этих структур, показателя преломления слоев биоткани по отношению к окружающему веществу, от поляризационного состояния падающего света меняется характер распространения света внутри ткани [10].

Биологическая ткань включает в себя набор молекул, в составе которых присутствуют различные хромофоры и флуорофоры, способные к поглощению света и возбуждению флуоресценции в определенном спектральном диапазоне. При исследовании взаимодействия светового излучения эти явления могут быть использованы для характеристики тканей, но могут являться факторами, влияющими на искажение полезного сигнала.

Чтобы проанализировать распространение света в биологических тканях с многократным рассеянием, предполагают, что распределение поглощающих и рассеивающих центров равномерно. Для многих тканей, например кожа, кровь, сетчатка глаза, характерна неоднородность поглощения. Рассеяние лазерного света клетками, ядрами, митохондриями, лизосомами, макромолекулами, мембранами и другими компонентами клеток приводит к диффузии света в биологических тканях. Оптическое рассеяние возникает в результате взаимодействия света с биологическими структурами, начиная от клеточных мембран и заканчивая целыми клетками. Размер этих рассеивателей варьируется от 10 нм до 10 мкм. Эти рассеиватели распределены в биологической ткани случайным образом; фотоны обычно переживают множественные акты рассеяния. Сильная анизотропия рассеяния биологических тканей и многократный характер процесса приводят к изменению характера пропускания света.

Излучению ближнего ИК, видимого и ультрафиолетового диапазона характерно анизотропное рассеяние. Такое рассеяние характеризуется сильной направленностью однократно рассеянных фотонов. Это связано с наличием больших клеточных органелл, таких как лизосомы и митохондрии. Основными поглотителями коротковолновых составляющих видимого излучения являются меланин, жиры, гемопротеины. Длинноволновое излучение поглощается водой, как одной из основных составляющих биологической ткани.

Поглощение воды в длинноволновом спектральном диапазоне обусловлено колебательно-вращательными переходами. Воду можно рассматривать как диполь, который взаимодействует с электромагнитным полем света. В длинноволновом спектральном диапазоне излучение взаимодействует с молекулами воды, которые становятся все более и более поляризованными с увеличением длины волны излучения. Это приводит к увеличению коэффициента поглощения в соответствующем длинноволновом спектральном диапазоне. Кроме того, вода взаимодействует с молекулами, которые обладают дипольными моментами, такими как водородные связи, что приводит к увеличению оптической плотности воды и ослаблению излучения по мере распространения в биоткани.

На коротковолновой границе оптического спектра в диапазоне длин волн видимого света 400 – 700 нм вода слабо поглощает излучение, поскольку величина энергии светового излучения в этом диапазоне слишком высока для колебательных переходов и ниже величины энергии, необходимой для электронных переходов.

Между 700 и 1000 нм находится широкое окно прозрачности ткани. Рядом с длинами волн 1300 и 1600 нм находятся более узкие окна прозрачности, имеющие большую поглощающую способность. С целью увеличения глубины зондирования излучения в ткань, используется излучение с длиной волны, лежащей в диапазонах окон прозрачности.

Существуют разработки лазерных методов диагностики от научных коллективов в области длин волн третьего окна прозрачности био-ткани [11, 12]. Поскольку глубина проникновения лазерного излучения по своей природе ограничена поглощением и многократным рассеянием света внутри образца, поглощение в данном диапазоне выше, чем в коротковолновом диапазоне, рассеяние существенно слабее оказывает влияние на распространение излучения (Рисунок 1.2).

В биомедицинских исследованиях важно улучшить как глубину проникновения, так и пространственное разрешение, поскольку образцы тканей обычно толстые, и часто требуется визуализировать внутреннюю часть таких образцов для детального изучения их структуры. Недавние исследования способов увеличения глубины проникновения показывают, что спектральное окно 1550 – 1800 нм является многообещающим выбором для визуализации сильно рассеивающих образцов с низким содержанием воды. [13, 14, 15]. В частности, диапазон длин

волн 1600 – 1700 нм признан перспективным спектральным окном для био-визуализации из-за относительно низкого поглощения света водой в этой области.

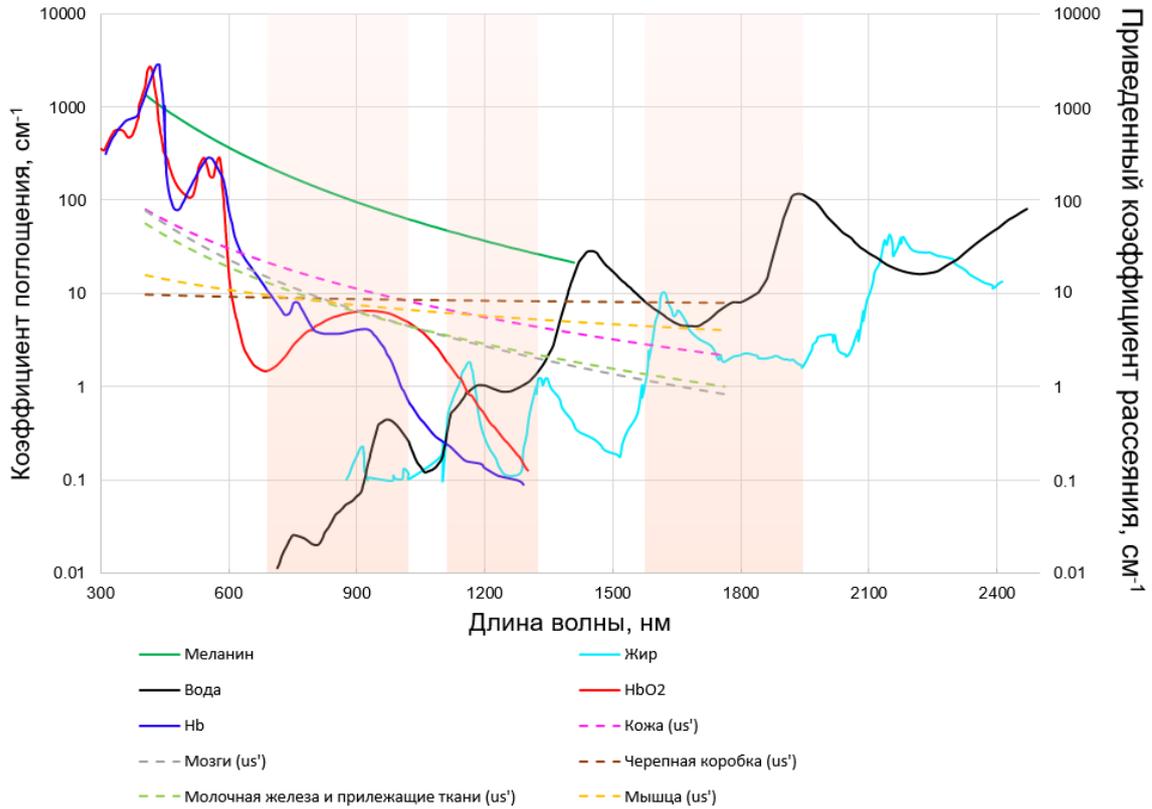


Рисунок 1.2 – Спектр поглощения и рассеяния хромофоров, присутствующих в биологической ткани. Оранжевыми полосами выделены окна прозрачности биологической ткани.

Помимо воды биологические ткани содержат липиды, входящие в состав жировой ткани ограничивающие их прозрачность. Выступающие в роли поглотителя липиды оказывают влияние на оптические свойства биологической ткани. В зависимости от концентрации липидов в клетках и тканях изменяется коэффициент поглощения света, что влияет на прохождение света через ткань. Липиды могут оказывать влияние на коэффициент рассеяния света в ткани за счет изменения показателя преломления среды при переходе светового излучения из одной среды в другую. Профиль распространения излучения зависит от изменения физических свойств тканей, таких как плотность, толщина и вязкость.

1.2. Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия

Биологическую молекулу можно рассматривать как квантовую систему с собственными уровнями энергии (колебательные и вращательные уровни). Каждая молекула имеет электронные орбитали, которые могут быть заполнены или свободны. Поглощение кванта света дает дополнительную энергию электрону, что приводит к его переходу на незаполненную орбиталь с большей энергией. Поскольку увеличивается величина электронной и колебательной составляющей общей энергии, молекула переходит на более высокий энергетический уровень (находится в возбужденном состоянии). Каждый из этих уровней энергии состоит из множества колебательных подуровней, а те в свою очередь состоят из множества вращательных подуровней. Полная энергия состояния молекулы складывается из энергии электронного возбуждения, колебательной и вращательной энергии.

Процедура фотодинамической терапии (ФДТ) включает два основных этапа. На первом этапе вводится в организм пациента фотосенсибилизатор (ФС), который обладает способностью селективно накапливаться или удерживаться (аккумулироваться) в опухолевых тканях. Затем, на втором этапе, осуществляется воздействие на сенсибилизированные ткани светом с длиной волны, соответствующей пикам поглощения ФС. Это приводит к активации процесса генерации активных форм кислорода (АФК), в основном синглетного кислорода 1O_2 . АФК обладают высокой реакционной способностью и коротким периодом полураспада, их жизнь ограничена временем порядка 10 – 320 нс, что ограничивает их диффузию в клетках до примерно 10 – 500 нм, что обеспечивает локализованность воздействия.

В процессе ФДТ образованные АФК могут быть направлены для прямого повреждения клеток или для разрушения/частичного закрытия кровеносных сосудов опухоли. Важно отметить, что для успешной ФДТ в большинстве случаев необходимо наличие кислорода в тканях опухоли. Процесс ФДТ опухоли можно разделить на три основных этапа (см. 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.

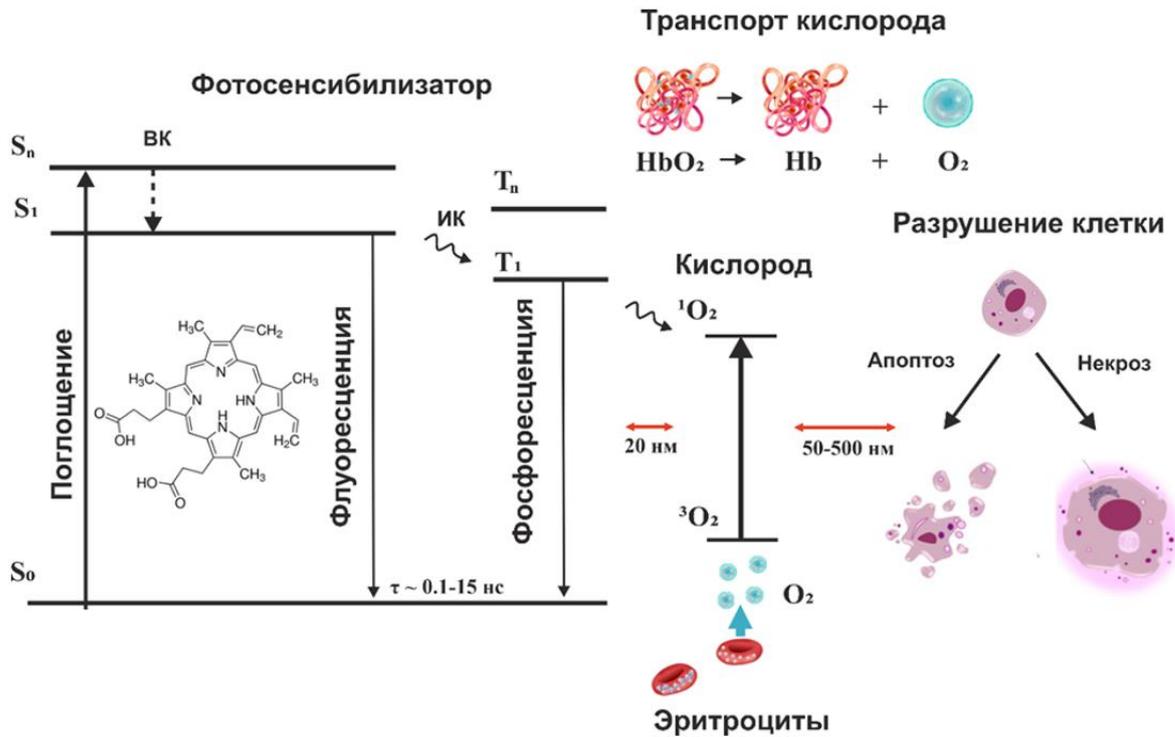


Рисунок 1.3 – Электронные переходы в биомолекулах (диаграмма Яблонского) [3]: S_0 – основное состояние; S_1 , S_n и T_1 , T_n – возбужденные синглетные и триплетные состояния. 1O_2 и 3O_2 синглетное и триплетное состояние кислорода. ВК – внутренняя конверсия (переходы электрона без обращения спина); ИК – интеркомбинационная конверсия (переходы электрона с обращением спина). Кислород для фотодинамической реакции потребляется из гемоглобина в биологической ткани. При воздействии молекул кислорода в синглетном состоянии и АФК происходит разрушение клетки по двум путям: апоптоза и некроза.

Процесс возврата молекулы ФС из возбужденного синглетного состояния S_1 в основное состояние S_0 представляет собой излучательный переход с испусканием кванта света. Этот процесс имеет короткое время жизни ($\tau \sim 10$ нс). Заселение долгоживущего триплетного уровня T_1 из возбужденного синглетного состояния S_1 происходит посредством интеркомбинационной конверсии. Поскольку правила отбора накладывают запрет на излучательный переход в основное состояние (фосфоресценцию), триплетное состояние обладает продолжительным временем жизни.

Когда молекулярный кислород присутствует в тканях опухоли, энергия с триплетного состояния ФС может быть передана 3O_2 молекулярному кислороду, что запускает процесс генерации АФК, способных разрушать молекулы ФС и наносить повреждения тканям опухоли.

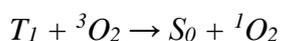
Из-за короткого времени жизни молекулы ФС в возбужденном синглетном состоянии S_1 , вероятность ее взаимодействия с биологическими субстратами очень низка, вследствие короткого времени жизни ($10^{-9} - 10^{-8}$ сек). Молекула ФС может перейти из синглетного

состояния S_1 в более устойчивое возбужденное триплетное состояние с помощью интеркомбинационной конверсии. В состоянии T_1 спины электронов становятся параллельными. Также возможен обратный переход молекулы ФС из состояния T_1 в S_0 с последующим испусканием фосфоресцентного кванта света. Переход из T_1 в основное состояние является “медленным”, так как запрещен по спину правилами отбора, но спин-орбитальное взаимодействие позволяет частично снять этот запрет.

Процесс ФДТ разделяется на реакции Типа I и Типа II, которые включают участие кислорода и приводят к образованию цитотоксических активных форм кислорода, в результате чего происходит фотодинамическое повреждение клеток и опухолевых тканей. В реакциях Типа I взаимодействие молекулы ФС с биологическими молекулами приводит к передаче на них электрона или протона, образуя анионные или катионные радикалы. Эти радикалы могут далее реагировать с молекулярным кислородом, образуя различные АФК, такие как супероксид и гидропероксильный радикал. Когда АФК взаимодействуют с ненасыщенными жирными кислотами в биологических мембранах, это может привести к цепным реакциям окисления липидов и повреждению мембран с нарушением их функций.

Реакции Типа I протекают наиболее эффективно в условиях высокой концентрации биологического субстрата и при низком содержании молекулярного кислорода. Молекулярный кислород выступает в роли конкурента для биологических молекул, мешая им взаимодействовать с ФС в возбужденном триплетном состоянии T_1 .

В реакциях Типа II энергия от триплетного состояния ФС переходит к основному триплетному состоянию кислорода 3O_2 , что приводит к образованию синглетного кислорода 1O_2 . Молекула ФС при этом возвращается в основное состояние S_0 .



Синглетный кислород 1O_2 имеет значительно более высокую реакционную способность и окислительный потенциал по сравнению с другими АФК, что делает его примерно в 100 раз более эффективным в окислении биомолекул. Важно отметить, что синглетный кислород 1O_2 , образующийся в процессе ФДТ, активен только в микроокружении, близком к месту его образования, обычно в радиусе от 10 до 500 нм.

Дифференцирующим фактором между фотодинамическими реакциями Типа I и Типа II является доминирующая роль синглетного кислорода в иницировании цитотоксичности. В фотореакциях Типа I, вклад синглетного кислорода 1O_2 в общую фотодеструкцию является незначительным. Кинетика и эффективность фотодинамического процесса Типа II определяются главным образом активностью синглетного кислорода. Данные реакции присходят

одновременно. Их относительный вклад сильно меняется в зависимости от концентраций кислорода, биологического субстрата и ФС.

Таким образом, в процессе ФДТ молекула ФС может претерпевать фотобликинг. В результате фотохимических изменений молекула ФС может временно потерять способность к флуоресценции или полностью разрушиться, необратимо утратив свои флуоресцентные свойства. Потеря флуоресцентных свойств ФС при фотообесцвечивании происходит необратимо по двум основным путям:

1. АФК-опосредованный механизм: Необратимое разрушение и потеря флуоресцентных свойств молекулой ФС, вызванная атакой АФК, главным образом синглетным кислородом 1O_2 .
2. Не-АФК-опосредованный механизм: Деструкция ФС происходит в результате прямого воздействия молекулы, находящейся в возбужденном триплетном состоянии T_1 , либо с компонентами биологической среды (мембраной или другими молекулами), либо непосредственно при взаимодействии с молекулярным кислородом 3O_2 .

И как минимум есть один обратимый путь [16, 17]:

1. уменьшение интенсивности флуоресценции ФС в образце при уменьшении содержания в нем молекулярного кислорода, происходящее в результате связывания двух молекул синглетного кислорода 1O_2 с дальнейшей передачей энергии на синглетное состояние S_1 молекулы ФС.

Если сравнивать скорость дезоксигенации эритроцитарной массы в плазме и в физиологическом растворе, то в плазме она выше, а если сравнивать скорость дезоксигенации эритроцитарной массы и гемоглобина (при одинаковой концентрации гемоглобина в обоих случаях), то эритроцитарная масса быстрее отдает кислород, чем молекулы гемоглобина без мембранной оболочки. В первом случае это можно объяснить большей скоростью потребления кислорода, так как в плазме больше акцепторов для синглетного кислорода, а во втором, – разной микрогеометрией образцов: ФС в системе с эритроцитами находится на их мембранах, и образовавшийся синглетный кислород быстрее утилизируется, окисляя полиненасыщенные жирные кислоты, чем когда образовавшийся синглетный кислород обратимо дезактивируется.

Однако относительное влияние каждого механизма в ходе ФДТ не является постоянным и может изменяться. Причиной служат химические взаимодействия в биологической среде, которая представляет собой многокомпонентную систему с неоднородным пространственным распределением кислорода и ФС. «Концентрационное тушение» флуоресценции наблюдается при высоких концентрациях ФС в образце, связанное с существенным перекрытием спектров поглощения и флуоресценции, что провоцирует уменьшение измеряемой интенсивности флуоресценции в результате реабсорбции излучения.

Ключевым компонентом механизма ФДТ является молекулярный кислород. Кислород имеет решающее значение для производства АФК во время ФДТ. Концентрация кислорода в

тканях действительно влияет на эффективность лечения ФДТ. На самом деле концентрация кислорода может значительно различаться между разными опухолями и даже между разными участками одной и той же опухоли, в зависимости от плотности сосудистой сети. Недостаток кислорода может быть ограничивающим фактором, особенно в более глубоких солидных опухолях, часто характеризующихся бескислородным микроокружением. Облучение опухоли с высокой интенсивностью светового потока может привести к временному локальному истощению кислорода. Это приводит к прекращению образования АФК и снижению эффективности лечения. Кислородное истощение происходит, когда скорость потребления кислорода фотодинамической реакцией превышает скорость диффузии кислорода в облученной области. Кроме того, ФДТ может вызывать окклюзию сосудистой сети опухоли, уменьшая приток крови к опухолевой ткани, еще больше усиливая гипоксию [18, 19].

Измерение уровня кислорода в тканях в режиме реального времени до и во время ФДТ является одной из основных задач ближайшего будущего. Это позволяет оптимизировать терапевтический результат ФДТ, регулируя интенсивность светового потока, увеличивая время облучения для поддержания общей световой дозы, или используя дробную световую дозу.

1.3. Фотосенсибилизаторы

Фотосенсибилизатор – это фоточувствительное соединение, которое при воздействии света определенной длины волны активируется и может индуцировать различные фотохимические или фотофизические процессы. Эти процессы могут включать образование АФК, таких как синглетный кислород, которые представляют собой высокореактивные молекулы, способные повреждать клеточные структуры, включая ДНК и белки. Фотосенсибилизаторы часто используются в медицинских целях, таких как фотодинамическая терапия и флуоресцентная визуализация.

При ФДТ пациенту вводят фотосенсибилизатор, а затем на ткань-мишень воздействуют светом с определенной длиной волны. Активированный фотосенсибилизатор взаимодействует с кислородом, присутствующим в ткани, с образованием активных форм кислорода, что приводит к гибели клеток в опухолевых тканях.

Фотосенсибилизаторы тщательно выбираются на основе их свойств поглощения и излучения, а также их способности генерировать желаемый тип реактивных частиц при активации. Это могут быть органические молекулы, комплексы металлов или наночастицы. В медицинских приложениях выбор правильного фотосенсибилизатора имеет решающее значение для достижения желаемого терапевтического результата при минимальном повреждении

здоровых тканей. Выбор подходящего ФС является одним из наиболее важных этапов при планировании ФДТ и для повышения эффективности лечения [20].

Протопорфирин IX (PpIX) представляет собой эндогенный порфирин присутствующий в организме и является предшественником в биосинтезе гема, важнейшего компонента гемоглобина и миоглобина. Гем имеет решающее значение для транспорта и хранения кислорода в красных кровяных тельцах и мышечных клетках. PpIX производится в митохондриях как промежуточный этап биосинтеза гема [21]. Попав внутрь клетки, 5-аминолевулиновая кислота (5-АЛК) входит в путь биосинтеза гема, где она последовательно превращается в порфобилиноген, гидроксиметилбилан, уропорфириноген III, копропорфириноген III, протопорфириноген IX, PpIX и гем (Рисунок 1.4). В раковых клетках на этапе преобразования 5-АЛК в порфобилиноген, активность порфобилиноген деаминазы высока, что приводит к быстрому процессу преобразования 5-АЛК в PpIX. На этапе когда PpIX превращается в гем из-за низкой активности феррохелатазы, такое преобразование протекает медленно и приводит к избирательному накоплению PpIX в клетках опухоли. Воздействие лазерным излучением на накопленный в клетках опухоли PpIX приводит к возбуждению и последующей флуоресценции. Применение 5-аминолевулиновой кислоты к клеткам, тканям и целым организмам существенно повышает концентрацию PpIX в опухолевых тканях [22].

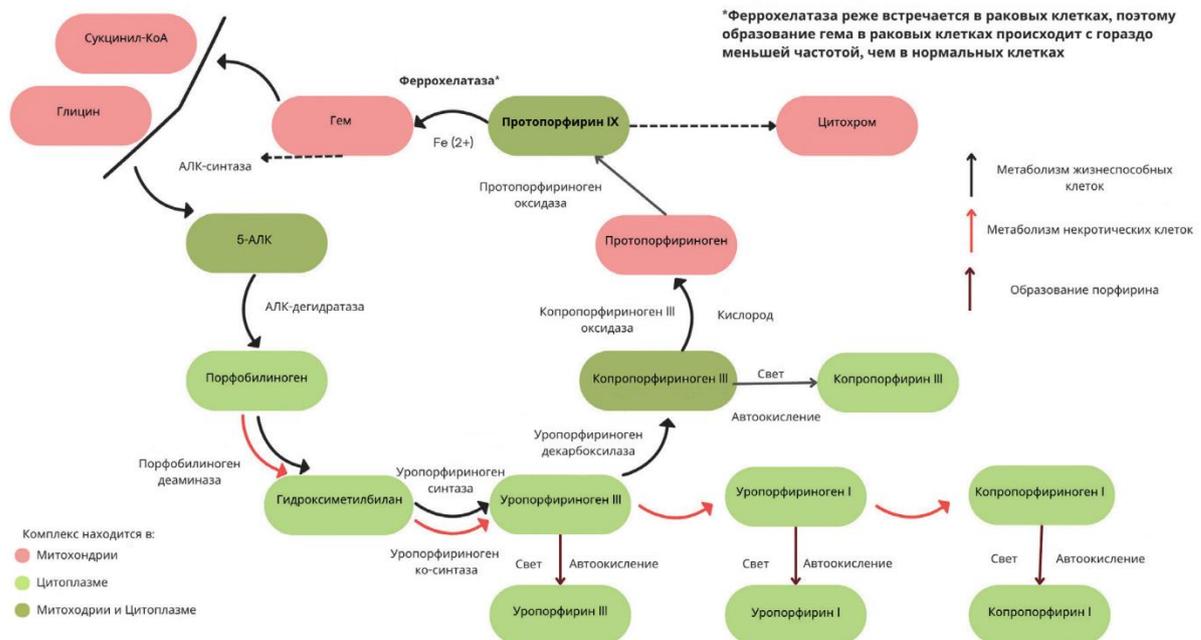


Рисунок 1.4 – Схема метаболических путей в нормальных, раковых и некротических клетках.

Порфирины содержат макроцикл, представляющий собой плоскую высокосопряженную систему, в котором четыре пиррольных остатка связаны одноуглеродными мостиками.

Делокализация электрона распространяется по всему макроциклу, что способствует его легкому возбуждению в видимом диапазоне спектра.

Структура спектров поглощения различных порфиринов, присутствующих в организме, характеризуется значительным сходством, а отдельные линии могут перекрываться вплоть до полного совпадения их положений. В связи с этим для определения содержания различных порфиринов в тканях требуется анализ спектрального диапазона, включающего равное число искомым хромофоров число неперекрывающихся, либо отличающихся по относительной интенсивности, линий поглощения.

Гемоглобин является гемопротеином, предназначенным для связывания и транспорта молекулярного кислорода. В свободном состоянии занято пять из шести координационных связей железа в геме. Оксигенация, то есть связывание гема с кислородом, приводит к переходу железа из состояния с высоким в состояние с низким спином, изменению длины связей и втягиванию атома железа в плоскость гемового кольца [23]. Указанные конформационные изменения влияют на электронный спектр поглощения, различия в котором для оксигемоглобина и восстановленного гемоглобина приведены на рис. 1.2.

Протопорфирин IX, являющийся метаболическим предшественником гема, не содержит в координационном центре иона железа. Это обуславливает отличия его спектра электронных переходов от спектра гема [24]. В спектре поглощения PpIX представлено большее число линий Q-полосы поглощения. При этом PpIX характеризуется достаточно высоким квантовым выходом флуоресценции, в то время как при возбуждении молекулы гема происходит перенос энергии от порфиринового кольца к иону железа с последующей безызлучательной дезактивацией. В связи с этим PpIX зачастую используется как флуоресцентный маркер метаболических изменений, происходящих в клетках, в которых наблюдается дефицит феррохелатазы, присоединяющей к нему атом железа.

Накопление PpIX происходит преимущественно в митохондриях клеток. Раковые клетки демонстрируют более высокую скорость клеточного деления и часто имеют метаболический дисбаланс по сравнению с нормальными клетками. Селективное накопление ФС в клетках опухоли происходит из-за того, что раковые клетки часто имеют измененные метаболические пути, которые приводят к увеличению продукции PpIX и уменьшению распада. Лазерное возбуждение на длине волны, соответствующей максимуму поглощения PpIX позволяет возбудить флуоресценцию и провести детектирование локализацию клеток опухоли в биологической ткани.

Естественная флуоресценция PpIX также может быть использована для фотодетекции рака мочевого пузыря [25, 26] или флуоресцентной хирургической резекции глиомы головного мозга высокой степени злокачественности с использованием перорально вводимой АЛК [27],

поскольку РрIX при возбуждении лазерным излучением 635 нм (Рисунок 1.5) проявляет характерную флуоресценцию в диапазоне 700 нм. Используя лазерный источник возбуждения с длиной волны, попадающей в полосу Соре, возможно возбудить флуоресценцию стандартным хирургическим интраоперационным флуоресцентным микроскопом в синем диапазоне света 410 нм.

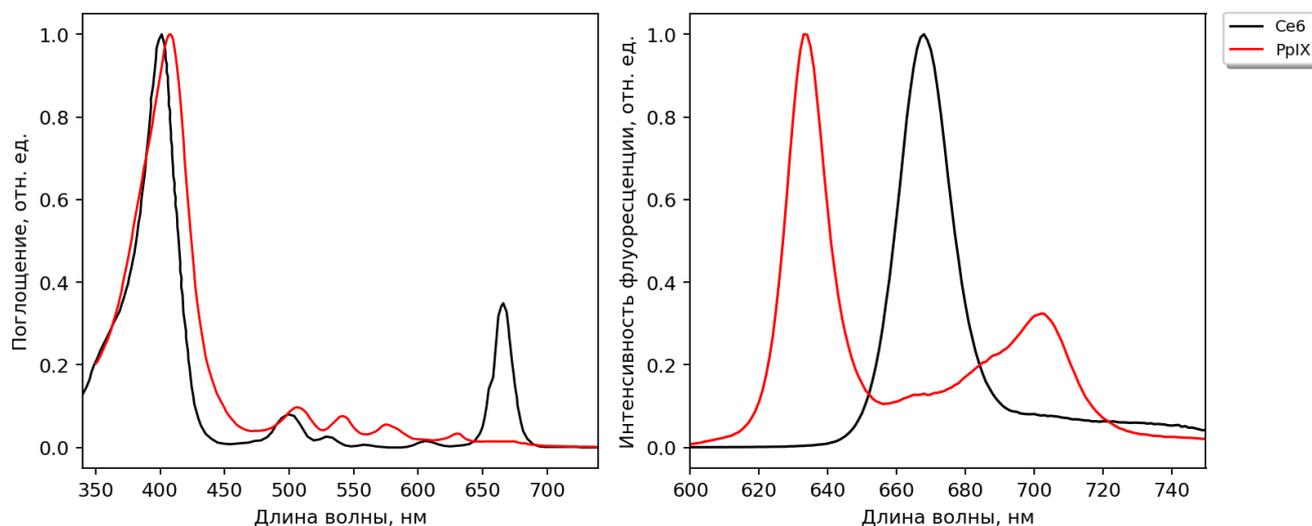


Рисунок 1.5 – Спектры поглощения и флуоресценции Себ и РрIX.

Хлорин Е6 (Себ) является фотосенсибилизатором второго поколения и клинически используемым, который характеризуется высокой сенсibiliзирующей эффективностью и быстрым выведением из организма. Себ используется в фотодинамической терапии, подобно РрIX, который разрешен к клиническому применению при лечении опухолей головного мозга. Это синтетическая молекула, полученная из хлорофилла, пигмента, ответственного за улавливание световой энергии растениями во время фотосинтеза.

Себ накапливается в основном в клетках крови и кровеносных сосудах. Однако, циркулирующий по кровеносным сосудам Себ демонстрирует высокую способность к диффузии в опухолевую ткань благодаря повышенной проницаемости сосудов опухоли относительно сосудистой сети здоровой ткани [28].

Путем специфического облучения областей ткани, накопившей ФС, можно достичь разрушения сосудов, обеспечивающих кровоснабжение опухоли. Этот метод эффективен благодаря более высокой склонности таких сосудов к образованию тромбов. Помимо этого, применение Себ в антитуморальной терапии также включает в себя нанесение ущерба как патологическим клеткам посредством индукции некроза или апоптоза, так и опухоли-ассоциированным макрофагам. В результате данного эффекта возможно значительное подавление роста опухоли.

Себ можно возбудить с помощью лазера с длиной волны 660 – 670 нм, который может проникать глубже в ткани человека, чем лазер с длиной волны 630 нм, используемый для обычных фотосенсибилизаторов или фотосенсибилизаторов первого поколения, таких как Photofrin [29, 30]. При облучении Себ имеет высокий квантовый выход синглетного кислорода (1O_2) и проявляет низкую темновую токсичность, что делает Себ подходящим ФС для ФДТ. Обнадеживающие клинические преимущества были получены с Себ-опосредованной ФДТ для лечения рака легких, мочевого пузыря, кожи и головы и шеи [31].

Кроме того, Себ демонстрирует улучшенную терапевтическую эффективность и уменьшенные побочные эффекты по сравнению с обычными фотосенсибилизаторами, происходящими из производных гематопорфирина [32]. Однако клиническое использование Себ в первую очередь ограничивается его плохой растворимостью в воде. Для улучшения плохой растворимости Себ в воде для ФДТ используются различные виды наноразмерных носителей лекарств. Из-за этого характерные свойства Себ для ФДТ часто подавляются при включении его в наноносители из-за тушения [33, 34]. При высоких дозах введения препарата наблюдается небольшая селективность накопления в опухолевой ткани.

1.4. Современные методики лазерной диагностики и лечения опухолей труднодоступной и глубокозалегающей локализации

Современными тенденциями развития новых методов диагностики и лечения в онкологии являются наукоемкие технологии, минимизирующие инвазивность воздействия на организм пациента. Сложностью при лечении опухоли труднодоступной и глубокозалегающей локализации является выбор оборудования для доступа к опухоли. Из-за труднодоступной локализации патологической ткани осуществить прямой доступ к опухоли без повреждения здоровых тканей не всегда представляется возможным. При проведении фотодинамической терапии важно провести облучение всех опухолевых клеток с достаточной дозой излучения для достижения полной резорбции опухолевой ткани за счет фотодинамического эффекта.

На данный момент распространенным стандартом лечения опухолевых заболеваний является проведение комплекса медицинских операций, включающих в себя хирургическую резекцию, химио- и лучевую терапию. Недостатком данного лечения является влияние на иммунитет пациента, что приводит к неспособности организма сопротивляться росту опухоли и негативному исходу лечения. Методы флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии широко используется в клиниках по всему миру, как дополнительный метод лечения, позволяющий увеличить объем резецированной опухолевой ткани и воздействовать на опухолевые клетки, которые могли быть пропущены в ходе хирургической операции.

К примеру, одним из ключевых условий безрецидивности хирургической операции по удалению опухоли мозга является полнота удаления всех пораженных участков ткани мозга. При этом принятая в общей онкологии традиционная тактика удаления прилегающей здоровой ткани имеет ограничения, связанные с возможностью нарушения функциональности жизненно важных органов. Поэтому дифференциальная диагностика микроучастков опухолевой ткани с последующим их удалением или деструкцией является актуальной задачей, определяющей успех операции в целом.

При фотодинамической терапии опухолей головного мозга высокой степени злокачественности используется фотосенсибилизатор талапорфин натрия (TPS). Разрешенность его к клиническому применению варьируется в различных странах, что ограничивает его применение повсеместно [35]. Поскольку механизм накопления различного рода фотосенсибилизаторов в клетках опухоли различен, проводятся исследования по определению наиболее эффективного фотосенсибилизатора для лечения конкретного типа опухоли. Талапорфин является фотосенсибилизатором второго поколения, он был одобрен в Японии в 2013 году в качестве агента для ФДТ у пациентов с раком легких на ранней стадии. Одновременно с этим препарат и совместимый лазерный источник излучения с длиной волны, попадающей в пик поглощения фотосенсибилизатора, были одобрены для компенсации медицинского страхования. TPS показывает себя как перспективный ФС для лечения опухолей головного мозга, поскольку удалось достичь показателя средней выживаемости без прогрессирования (СВП) заболевания для ФДТ и контрольной группы составляло 19,6 и 9,0 месяцев, с 6-месячной частотой СВП 86,3% и 64,9% соответственно. Было достигнуто 98 – 100% средней резекции опухоли (СРО) у пациентов с первичной опухолью мозга, 88 – 92% СРО у пациентов с рецидивом.

В случаях с глиобластомой IV степени интенсивная флуоресценция наблюдалась у 93,3% первичных опухолей и в 61,5% у пациентов с рецидивом, и не было случаев без флуоресценции. У пациентов с рецидивом интенсивность флуоресценции, как правило, была слабее, чем наблюдаемая в недавно диагностированных случаях. Причина этого может быть связана с использованием лучевой терапии в этих случаях.

В сравнении с клинически разрешенным ФС при лечении опухолей головного мозга (ГМ), даже в случаях глиом более низкой степени, при которых выявление флуоресценции с использованием 5-АЛК затруднено, наблюдалась слабая флуоресценция. Эти результаты свидетельствуют о полезности флуоресцентной навигации с использованием TPS при всех операциях на глиомах. Помимо этого, сильная флуоресценция наблюдалась в случаях пилоцитарной астроцитомы. Кроме того, сильная флуоресценция наблюдалась также в случаях

злокачественной лимфомы, метастазов и злокачественной менингиомы, что обуславливает перспективность использования данного ФС при лечении опухолей ГМ.

Для решения задач интраоперационной детекции микроучастков опухоли в настоящее время разрабатываются технологии изготовления ультракомпактных микрооптических элементов для эндоскопических инструментов и миниатюрных микроскопов. Такие системы позволяют проводить неинвазивное и неразрушающее исследование микроструктур и их окружения не только в режиме отраженного света, но и в режиме флуоресцентного сканирования. Они могут обеспечить немедленную диагностику с разрешением субклеточного уровня, которая практически соответствует гистологическому диагнозу, позволяющему, например, дифференцировать границы между злокачественными и доброкачественными тканями [36, 37, 38, 39, 40].

Существует ряд недостатков представленных систем: сам принцип лазерной конфокальной сканирующей микроскопии в приложении к интраоперационному анализу. Достаточно большое время сканирования (в среднем порядка 1 секунды для 1 кадра для разных систем) приводит к возникновению сдвиговых артефактов и снижению дешифровочных свойств получаемых изображений; существующие на настоящий момент системы для эндомикроскопии используют для возбуждения флуоресценции синий свет, что не является оптимальным выбором с точки зрения глубины проникновения света в биологические ткани и создает дополнительные методологические сложности для интраоперационной навигации; из-за технологических ограничений размеры зонда значительно превышают 3мм, что сильно увеличивает объем повреждений ткани во время внутритканевых исследований.

Возможность позиционирования оптического волокна, доставляющего лазерное излучение к патологическим тканям из-за труднодоступности опухоли, часто ограничена, что делает используемые на сегодняшний день в клинике оптические оптоволоконные средства доставки непригодными для лечения глубокозалегающих опухолей. В связи с этим существует потребность в разработке систем доставки широкоапертурного лазерного излучения к опухоли и равномерным распределением плотности мощности в области воздействия, передающей лазерное излучения в широком спектральном диапазоне для возможности использования многих контрастирующих агентов (фотосенсибилизаторов), и обеспечивающее передачу необходимой дозы световой энергии за приемлемое время в условиях операции с возможностью одновременного осуществления контроля накопления ФС в биологических тканях и фотобличинга ФС в процессе ФДТ.

В настоящее время существует ряд отечественных и зарубежных аналогов разрабатываемого спектроскопического оборудования для проведения флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии. Известна оптоволоконная система на основе

Multiloop-MIR Fiber Optic ATR Probes (Harrick Scientific, Pleasantville, NY), которая позволяет проводить оптико-спектроскопический анализ различных био-образцов в ближнем и среднем инфракрасном диапазоне спектра [41]. Недостатком такой системы является значительная толщина оптического зонда, что не позволяет обеспечить совместное использование с медицинскими эндоскопами с инструментальным каналом до 10 мм.

Известен волоконно-оптический зонд для спектроскопии упругого рассеяния света *in vivo* с поляризованным возбуждением и поляризационно-чувствительным детектированием [42]. В исследовании применялись световоды с диаметром 200 мкм и числовой апертурой NA равной 0.22. Недостатком такого зонда является низкая числовая апертура, ограниченная возможность равномерного облучения значительной площади при малом расстоянии между световодом и биологической тканью.

Известна оптическая волоконная система с иглой для обнаружения рака и терапии, позволяющая проводить диагностику и деструкцию опухоли инвазивно [43]. Недостатком такого решения является получение спектров только при проникновении светочувствительной иглы в биологическую ткань.

1.5. Методики определения оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном русле крови

Мониторинг оксигенации гемоглобина является актуальной задачей во многих областях медицины – онкологии, трансплантологии, психиатрии [44, 45, 46, 47, 48]. Своевременная фиксация происходящих изменений, связанных с кислородом, позволяет выявить физиологические отклонения в организме связанные с протекающим патологическим процессом.

Контроль наличия кислорода в тканях является ключевым фактором, влияющим на положительный эффект при проведении ФДТ. Поскольку при проведении ФДТ расходуется кислород, то недостаточная концентрация может привести к снижению эффективности фотодинамического эффекта, что проявляется в малом количестве образованных АФК в результате взаимодействия молекулы ФС с биологическими молекулами с образованием анионных и катионных радикалов, что приводит к окислению липидов и повреждению мембран клеток, или сниженной активности процессов передачи энергии от триплетного состояния ФС на основное триплетное состояние кислорода 3O_2 , что приводит к образованию синглетного кислорода 1O_2 , и к образованию АФК, которые способны наносить повреждения тканям опухоли.

Кислород активно участвует в заживлении тканей после трансплантации или при сшивании краев резецированного органа между собой. Активное снабжение кислородом оперированных тканей определяет наличие адекватного кровоснабжения в месте раны и приводит к ускоренному

заживлению поврежденных тканей [49]. Микроциркуляторному руслу крови требуется 1 – 2 дня для восстановления поврежденных тканей [50, 51]. Чтобы оценить качество кровоснабжения и оценить наличие кислорода в поврежденных тканях достаточного для пролиферации клеток, необходимо осуществлять контроль за кровотоком во время операции и в послеоперационном периоде.

Существует ряд разработок для измерения оксигенации гемоглобина в тканях. Научный коллектив N. Clancy [52] разработал систему мультиспектральной визуализации, способную интраоперационно отслеживать изменения оксигенации тканей на примере абдоминальных операций у свиней. Получение полного мультиспектрального набора данных включало сканирование при длинах волн в видимом диапазоне от 500 до 620 нм с шагом 10 нм. Измерения проводились с учетом компенсации движения лапароскопа относительно измеряемой ткани, и измерением «темнового спектра» для исключения влияния рассеяния на сигнал. Для интерпретации отраженного светового сигнала использовалась линейная модель ослабления света. Она строится на предположениях, что: кровь является главным поглотителем в исследуемой области; каждая длина волны проходит одинаковый путь в ткани и потери рассеяния примерно равны во всём интересующем диапазоне длин волн. Оценка оксигенации гемоглобина проводилась по значениям яркости, полученной за счет использования монохромной CCD-камеры.

Недостатками данной системы является наличие пост-обработки результатов, полученных в процессе съемки. Для своевременного контроля и исключения возможности проведения повторной операции необходимо проводить обработку данных непосредственно в режиме реального времени. Существуют случаи, когда во время операции необходимо оценить кровоснабжение пришиваемых концов резецируемого органа, и выявить участки ткани с недостаточным кровоснабжением для резекции и последующего сшивания тканей с активным кровоснабжением. В случае сшивания участков тканей с недостаточным кровоснабжением повышается риск нежелательных последствий после операции (перитонита).

Существуют разработки устройств с использованием метода оптической биопсии на основе спектроскопии диффузного отражения [53,54]. Измерения спектров диффузного отражения были проведены с помощью специально разработанной оптической иглы для биопсии, совмещенной с одним осветительным волокном диаметром 100 мкм и двумя приемными волокнами диаметром 200 мкм. Оптоволокна были соединены с двумя спектрометрами, которые обрабатывают данные в видимом диапазоне длин волн и ближнем инфракрасном диапазоне. После измерения данные от двух спектрометров были соединены вместе для формирования непрерывного спектра в диапазоне длин волн между 400 и 1600 нм. По полученным спектрам диффузного отражения формировали вывод о кровоснабжении и наличии опухолевой ткани в исследуемом участке.

Прямое измерение с помощью оптических методов оксигенации гемоглобина в тканях молочной железы при наличии злокачественных образований может использоваться для клинического применения. Благодаря своей совместимости с обычно используемыми биопсийными иглами спектроскопия диффузного отражения может быть использована во время биопсии, обеспечивая измерение в режиме реального времени.

Недостатками данной системы является инвазивный способ получения спектров диффузного рассеяния. Неинвазивный способ является более предпочтительным за счет отсутствия микротравм при диагностике, которые могут спровоцировать дополнительную травматизацию биологических тканей при заживлении.

Полученные значения оксигенации гемоглобина в тканях (StO_2) для здоровой и опухолевой тканей варьируется в научной литературе, поскольку не существует единого стандарта соответствия значений тканям, имеющим активное или недостаточное кровоснабжение. Исходя из этого, сравнивать полученные значения при хирургических операциях, соответствующим одному органу, является затруднительным.

Заключение к главе 1

Множество научно-исследовательских коллективов концентрируют свои усилия на разработке новых и совершенствовании существующих подходов, использующих методы ФД и ФДТ для обнаружения опухолевых клеток и эффективного воздействия на злокачественные новообразования. Характер распространения светового излучения в биологической ткани зависит от оптических свойств, таких как поглощение и рассеяние, поэтому структурные различия опухоли, степень злокачественности, локализация и гетерогенность опухоли у различных пациентов могут влиять на достижение требуемой дозы энергии в области патологии. Противоопухолевая эффективность ФДТ связана с множеством факторов: плотность мощности лазерного излучения, время воздействия, тип применяемого ФС, спектральные характеристики поглощения и флуоресценции ФС, а также от особенностей метаболизма и селективного накопления в опухолевых тканях. Кислород имеет двойную роль, поскольку является ключевым компонентом как для индукции цитотоксического эффекта ФДТ, так и для последующего заживления тканей. Разработка новых методик для исследования оксигенации гемоглобина кислородом является важным аспектом как для контроля процесса лечения, так и для прогнозирования его исхода. Совершенствование существующих спектроскопических методов флуоресцентной диагностики для определения патологически измененной опухолевой ткани по экзогенной флуоресценции ФС и методик контроля лазерного воздействия на ткани, содержащих ФС, необходимо для минимизации необратимого повреждения нормальной ткани. При этом

контроль фотообесцвечивания ФС при накоплении необходимой дозы световой энергии обеспечивает условие для достижения полной резорбции опухолевой ткани за счет фотодинамического эффекта, что критически важно для предотвращения прогрессирования и метастазирования опухоли, и как следствие, повысит выживаемость пациентов.

Глава 2. Материалы, инструменты, оборудование и методы исследования

Вторая глава посвящена описанию материалов и методов исследования. Рассмотрены устройства и описаны характеристики оборудования, принцип их функционирования, а также экспериментальные биологические модели, применяемые в исследованиях. Особое внимание уделено методам ФД, важным достоинством которых является оперативность регистрирования информации. Методы спектрально-флуоресцентной диагностики и видео-флуоресцентной навигации могут обеспечить выраженную взаимосвязь между регистрируемыми параметрами – поглощением, флуоресценцией и рассеянием.

2.1. Оптические фантомы

При проведении флуоресцентной диагностики измерение спектров поглощения и флуоресценции после введения ФС позволяет оценить распределение концентрации в опухолевой и нормальной ткани. Для этого был разработан способ оценки 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 в различных концентрациях. Поскольку в живой ткани после введения ФС накопление происходит неравномерно, значение интенсивности возбуждаемой флуоресценции ФС будет зависеть от концентрации ФС в ткани в точке исследования. Для сопоставления полученных сигналов флуоресценции с концентрацией ФС перед исследованием необходимо провести калибровку с применением эталонных образцов, в качестве которых выбраны оптические фантомы (рис. 2.1).



Рисунок 2.1 – Изображение оптических фантомов, содержащих ФС в различных концентрациях, при лазерном возбуждении флуоресценции и фактическое изображение образцов.

Для создания оптического фантома необходимо наличие среды, обеспечивающей рассеивание света, и поглощающей среды. В качестве рассеивающей среды широко используют жировые эмульсии, а для создания поглощающей среды могут использовать цельную кровь или эритроцитарную массу. Жировые эмульсии демонстрируют высокую стабильность во времени и минимальные вариации оптических характеристик между разными изготавливаемыми партиями [55]. В работе была выбрана жировая эмульсия в виде раствора липофундина МСТ/ЛСТ 10%, разведенная в требуемой концентрации для достижения необходимых оптических свойств рассеяния, соответствующих исследуемой ткани. Для расчета оптических свойств жировых эмульсий используют следующие формулы:

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

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

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

где y_0 , a и b параметры аппроксимации, значения которых для жировой эмульсии представлены в таблице.

Таблица 2.1 – Полученные параметры при расчете коэффициента рассеяния, редуцированного коэффициента рассеяния, фактора анизотропии.

Параметры	$\mu_s, \text{мм}^{-1}$	$\mu'_s, \text{мм}^{-1}$	$g,$
y_0	-	4.98004E+1	-
a	7.48816E7	-9.16E-2	1.05744
b	-2.31847	4.71697E-5	-9.71609E-4
R^2	0.99914	0.99825	0.99967

Далее представлены графики изменения коэффициента рассеяния μ_s , редуцированного коэффициента рассеяния μ'_s и фактора анизотропии g от длины волны λ (рис. 2.2).

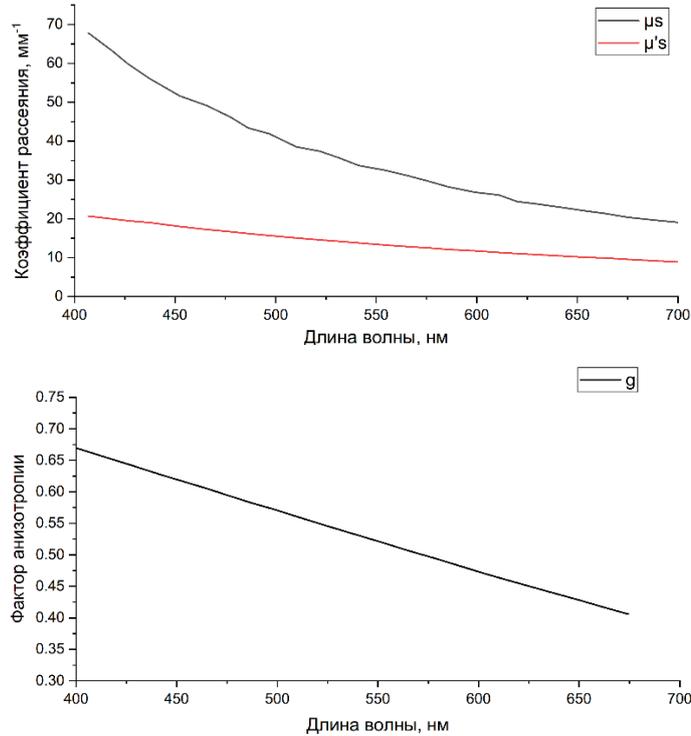


Рисунок 2.2 – Зависимость от длины волны коэффициента рассеяния μ_s , редуцированного коэффициента рассеяния μ'_s , фактора анизотропии g .

В спектральном интервале 500 – 600 нм редуцированный коэффициент рассеяния жировой эмульсии Intralipid 10% принимает значения от 17.3 до 12.5 mm^{-1} . Определение концентрации жировой эмульсии, необходимой для моделирования оптического фантома, основывалось на использовании редуцированного коэффициента рассеяния кожи μ'_s , в спектральном диапазоне длин волн 500 – 600 нм его значение находится в пределах от 2.5 до 3.5 mm^{-1} . [56]. Для моделирования оптических параметров кожи жировая эмульсия разбавлялась дистиллированной водой до концентрации 1.6%. При исследовании биологических тканей коры головного мозга использовали в качестве поглощающей среды цельную кровь, рассеивающей – интралипид 1%. В экспериментах с кровью или эритроцитарной массой применяли физ. раствор NaCl 0.9% для разбавления и смешивания различных сред.

Концентрации ФС в оптических фантомах составляли 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 мг/кг. Наибольший интерес представляли значения от 0.1 до 5 мг/кг, поскольку такой диапазон значений соответствует наблюдаемым концентрациям ФС в тканях опухоли пациентов. Проведение ФД на эталонных образцах (оптических фантомах), имитирующих оптические свойства реальной ткани с наличием ФС, позволяет оценить концентрационное распределение ФС в исследуемых биологических тканях.

2.2. Методика интраоперационной оценки накопления фотосенсибилизатора

Флуоресцентные свойства фотосенсибилизаторов позволяют контролировать их поглощение тканями и последующее выведение. Активация процесса генерации АФК при фотодинамической активации коррелирует с повышением противоопухолевой эффективности. Быстрое выведение из здоровых тканей, селективность накопления в тканях опухоли, а также интенсивное поглощение и флуоресценция в красном или БИК-диапазоне обеспечивают высокую точность и эффективность процедур ФД и ФДТ. Способность ФС селективно накапливаться в опухолевых тканях помогает снизить риск повреждения здоровых тканей при воздействии лазерным излучением, в то время как использование источников света в красном или БИК-диапазоне позволяет обнаружить и воздействовать на наиболее глубоко расположенные очаги патологически измененной ткани.

Для интраоперационной флуоресцентной диагностики распределения ФС в ткани часто используются спектроскопические и видео-флуоресцентные методы анализа флуоресцентного сигнала ФС. Исследование распределения ФС выполнено с использованием методик и аппаратуры для флуоресцентной спектроскопии обратного диффузного отражения, разработанных в лаборатории Лазерной биоспектроскопии Института общей физики им. А.М. Прохорова РАН [57, 58]. Схема разработанной установки для метода спектроскопического исследования изображено на рис. 2.3. При измерении приемное и излучающее волокна располагаются на некотором расстоянии l друг от друга. Расстояние l может быть увеличено для достижения более глубоких слоев ткани за счет увеличения траектории наиболее вероятного распространения фотонов в биологической ткани.

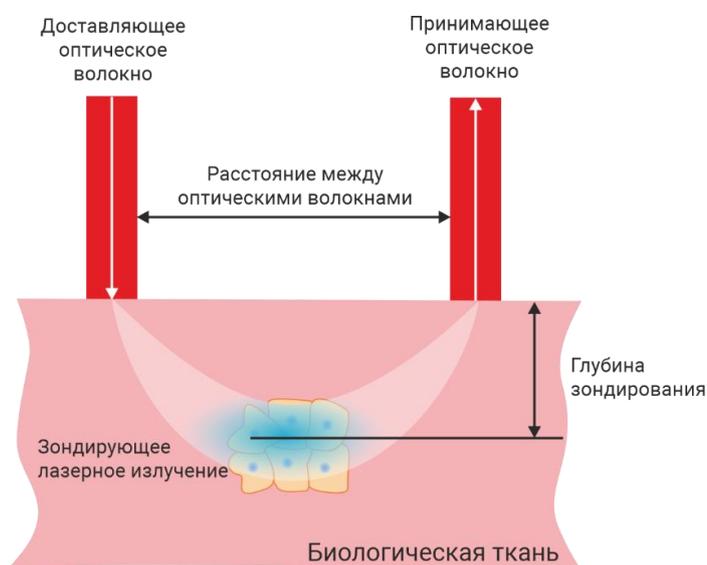


Рисунок 2.3 – Схематическое изображение системы, реализующей метод спектроскопического измерения накопления ФС в ткани.

Для определения глубины зондирования можно использовать следующие аналитические уравнения:

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

$$Z = \left(\frac{ld}{2}\right)^{\frac{1}{2}}, l \gg \delta \text{ (сильное поглощение среды)} \quad (2.5)$$

Средняя длина пути l_{cp} прохождения фотонов через ткань значительно превышает расстояние между доставляющим и приемным оптическими волокнами, которая определяется через безразмерный коэффициент дифференциального пути β :

$$l_{cp} = \beta d . \quad (2.6)$$

Коэффициент дифференциального пути β в случае если расстояние между оптическими волокнами больше длины рассеяния l/μ'_s определяется следующим образом:

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

Глубина проникновения света δ в ткань определяется как обратное значение эффективного ослабления μ_{eff} :

$$\delta = \frac{1}{\mu_{eff}} = \frac{1}{\sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu_s(1-g))}} \approx \frac{1}{\sqrt{3\mu_a\mu'_s}} . \quad (2.8)$$

При комбинации оптических волокон (6 приемных и 1 передающее световое излучение с диаметрами $d = 200$ мкм), используемых в исследовании, глубина зондирования составляет около 0.5 мм. При спектроскопии обратного диффузного отражения (ОДО) расстояние между волокнами увеличивают до 5 – 10 мм, глубина зондирования увеличивается до 6 мм. Проведение спектрально-флуоресцентной диагностики до и после введения ФС позволяет оценить концентрационное распределение и накопление ФС в ткани, после ФДТ – оценить фотоблиндинг в процессе светового воздействия и контроль процесса лазерной терапии.

Длительность экспонирования, использованная в ходе спектрально-флуоресцентной диагностики, варьировалась в интервале от 10 до 200 мс. При выполнении ФД, реализованной в конфигурации «мягкого контакта» проводили многократное измерение спектров (не менее пяти) с последующей процедурой усреднения для повышения статистической достоверности.

Для количественной оценки флуоресценции использовали индекс флуоресценции IF , который представляет собой отношение интегральной интенсивности под кривой спектра

флуоресценции $I_{\text{флуор}}(\lambda)$ к интегральной интенсивности под кривой обратно-рассеянного лазерного излучения $I_{\text{лазер}}(\lambda)$:

$$IF = \frac{\int_{\lambda} I_{\text{флуор}}(\lambda)d(\lambda)}{\int_{\lambda} I_{\text{лазер}}(\lambda)d(\lambda)}. \quad (2.9)$$

В рамках спектрально-флуоресцентного анализа с фотосенсибилизатором PpIX интенсивность флуоресценции $I_{\text{флуор}}(\lambda)$ рассчитывали в диапазоне спектральных длин волн 680 – 720 нм. При лазерном возбуждении 635 нм интенсивность лазерного излучения $I_{\text{лазер}}(\lambda)$ рассчитывали в диапазоне 625 – 645 нм. Для анализа фотопродуктов PpIX использовали синий лазер с длиной волны 405 нм, при этом значение интегральной интенсивности под кривой обратно-рассеянного лазерного излучения $I_{\text{лазер}}(\lambda)$ определяли в диапазоне 385 – 415 нм.

2.3. Методика исследования оксигенации гемоглобина в биологических тканях

Для количественного определения степени оксигенации и концентрации гемоглобина использовался логарифм обратного отражения:

$$A_{\text{exp}}(\lambda) = \ln\left(\frac{I_{\text{ref}} - I_{\text{dark}}}{I - I_{\text{dark}}}\right), \quad (2.10)$$

где A_{exp} – коэффициент ослабления света, I_{ref} – интенсивность отраженного сигнала от образца, выбранного за эталон (BaSO_4), имеющего коэффициент отражения близкий к единице в исследуемом спектральном диапазоне, I_{dark} – темновой сигнал (шум) при отсутствии света, I – интенсивность сигнала, диффузно-отраженного от ткани.

При интерпретации спектров отражения использовался закон Ламберта-Бэра в диффузионном приближении [59]. Данный подход учитывает неоднородность спектрального распределения широкополосного источника света и пропускания оптических волокон, а также учитывает чувствительность детектора спектрометра. Таким образом, достигается устойчивость метода по отношению к спектральным изменениям в широком диапазоне длин волн. Экспериментальная зависимость $A_{\text{exp}}(\lambda)$ описывается с помощью модельной функции, аппроксимирующей затухание света разложением в ряд Тейлора:

$$A_{\text{model}}(\lambda) = c_0 + c_1(\lambda) + c_2(\lambda)^2 + \langle L \rangle * (c\text{Hb} * \varepsilon\text{Hb}(\lambda) + c\text{HbO}_2 * \varepsilon\text{HbO}_2(\lambda)) * \ln(10), \quad (2.11)$$

где I_0 – интенсивность падающего света, I – интенсивность регистрируемого света, λ – длина волны [нм], $\langle L \rangle$ – средняя длина пути фотонов в образце между излучающим и приемным волокнами, $c\text{HbO}_2$ и $c\text{Hb}$ – концентрации оксигенированного и редуцированной формы

(дезоксигенированного) гемоглобина соответственно, εHbO_2 – молярный коэффициент экстинкции оксигенированного гемоглобина, εHb – молярный коэффициент экстинкции дезоксигенированного гемоглобина, c_0 , c_1 , c_2 – коэффициенты, учитывающие вклад поглощения и рассеяния ткани.

При расчете полученные спектральные зависимости сигнала сравниваются с модельными спектрами гемоглобина, путем минимизации разницы между спектрами методом наименьших квадратов определяются значения c_0 , c_1 , c_2 , cHb и $cHbO_2$:

$$\chi^2 = \sum_{\lambda_i=\lambda_{min}}^{\lambda_i=\lambda_{max}} [A_{model}(\lambda_i) - A_{exp}(\lambda_i)]^2, \quad (2.12)$$

где λ_i – значения длин волн, при которых измеряется затухание света в диапазоне от λ_{min} до λ_{max} , и осуществляется аппроксимация полученных спектров предлагаемой моделью.

Степень насыщения гемоглобина кислородом в крови StO_2 и относительная концентрация гемоглобина HbT рассчитывается с учетом представленных выше коэффициентов следующим образом:

$$StO_2 = \frac{\langle L \rangle_{cHbO_2}}{\langle L \rangle_{cHbO_2} + \langle L \rangle_{cHb}} = \frac{cHbO_2}{cHbO_2 + cHb}, \quad (2.13)$$

$$HbT = \langle L \rangle (cHbO_2 + cHb). \quad (2.14)$$

Стоит отметить, что при измерении *in vivo* может возникнуть движение приемного волокна относительно ткани за счет естественной физиологии (дыхания) объекта, и может вызвать случайные колебания $\langle L \rangle$, что, соответственно, может привести к ошибкам в контроле относительной концентрации гемоглобина. При этом величина насыщения крови кислородом менее восприимчива к этим изменениям, поскольку в большей степени зависит от геометрии во время измерений.

2.4. Моделирование распространения лазерного излучения методом Монте-Карло

Для исследования глубины зондирования лазерного излучения в модели головы человека при разработке метода измерения степени оксигенации гемоглобина в БИК-диапазоне было проведено моделирование с помощью численного метода модифицированного Монте-Карло (МК). Этот подход заключается в вычислении случайного перемещения групп фотонов внутри рассеивающей среды [60] и основан на численном моделировании распространения фотонов в оптически мутных средах. В процессе миграции фотоны, движущиеся внутри биологической

ткани, подвергаются многократному рассеянию и поглощению. На рис. 2.4 представлен набор шагов для реализации данной модели многократного рассеяния.

Алгоритм работы метода МК начинается с запуска фотона в ткань с определенным начальным направлением: вглубь ткани, в случае коллимированного падающего пучка, или случайно при диффузном рассеянии. Широко распространенным в настоящее время является общедоступный алгоритм, который был разработан Жаком для многослойных биологических тканей [61]. Этот алгоритм основан на передаче большого количества фотонов (т.е. «пакета» фотонов) по различным направлениям. У каждого «пакета» фотонов есть свой «вес», который с течением времени убывает экспоненциально, в соответствии с оптическими параметрами ткани – коэффициентами поглощения и рассеяния. Когда "вес" фотона достигает заданного минимального уровня, случайным образом определяется, будет ли фотон поглощен или продолжит свой путь. В данной работе использован модифицированный алгоритм метода численного моделирования Монте-Карло, разработанный в лаборатории Лазерной биоспектроскопии ИОФ РАН [62]. Слои гетерогенной структуры расположены перпендикулярно начальному направлению распространения фотонов.

В процессе каждой итерации цикла требуется определение следующих случайных величин:

- γ_1 – для вычисления длины свободного пробега фотона (l);
- γ_2, γ_3 – для вычисления зенитного угла (θ) и азимутального угла (ψ), определяющих направление отклонения фотона от первоначального направления распространения в результате акта рассеяния;
- γ_4 – для расчета вероятности испускания фотона флуоресценции в результате поглощения фотона, возбуждающего лазерного излучения, при наличии в среде фотосенсибилизатора;
- γ_5 – для расчета вероятности отражения/преломления при переходе фотона через границу раздела сред с различающимися показателями преломления.

Движение фотона анализируется до тех пор, пока он не поглотится или не покинет пределы экспериментального объема. Для предотвращения бесконечного выполнения цикла ограничивается количество шагов фотона. Для получения надежных результатов алгоритм повторяется для числа фотонов, превышающего 10^6 . Если рассматривать движение каждого отдельного фотона, то распространение фотона происходит отдельными «прыжками» между актами рассеяния. При этом длина прыжка должна быть меньше средней длины свободного пробега фотона в ткани, которая задается формулой:

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

где μ_t , μ_a и μ_s – коэффициенты полного ослабления, поглощения и рассеяния соответственно. Ограничения такого приближения заключается в том, что если размер такого шага будет мал, то взаимодействие фотона с тканью представляется маловероятным процессом. В случае если шаг будет очень большой, то путь, проходимый фотоном, не будет в должной степени соответствовать пути реального фотона.

Для наибольшей эффективности вводят переменную длину «прыжка»:

$$l_{ph} = - \frac{\ln(\gamma_1)}{\mu_t}, \quad (2.16)$$

где γ_1 – случайное число от 0 до 1. Перемещение фотона в среде при этом рассчитывается по направляющим косинусам. Поглощение в среде определяет потерю «веса» фотона в конце каждого шага. Величина потери «веса» фотона равняется весу фотона, умноженному на $(1 - \Lambda)$, где Λ – альбедо. После того, как фотон рассеивается, новое направление фотона выбирается исходя из фазовой функции рассеяния, аппроксимированной функцией Хеньи-Гринштейна:

$$p(\cos\theta) = \frac{1 - g^2}{2(1 + g^2 - 2g \cos\theta)^{\frac{3}{2}}}, \quad (2.17)$$

где g – параметр анизотропии рассеяния (средний косинус угла рассеяния θ):

$$g = \langle \cos\theta \rangle = \int_0^\pi p(\theta) \cos\theta \cdot 2\pi \sin\theta \, d\theta. \quad (2.18)$$

Значение g меняется в диапазоне $[-1, 1]$ и означает преобладающее рассеяние вперед. В случае изотропного рассеяния принимается значение $g \rightarrow 0$.

Для определения значения при изменении угла на величину, не равную 0 можно записать следующим образом:

$$\cos\theta = \frac{1}{2g} \left[1 + g^2 - \left(\frac{1 - g^2}{1 - g + 2g\gamma_2} \right)^2 \right]. \quad (2.19)$$

В этом случае считается, что процесс является симметричным относительно зенитной оси и равномерно распределен в интервале от 0 до 2π .

$$\psi = 2\pi\gamma_3. \quad (2.20)$$

Когда фотон пересекает границу с внешней средой, его «вес» вносит вклад в акт диффузного отражения или пропускания. В случае отражения, пакет фотонов продолжает движение, в другом случае движение фотона прекращается.

Определение глубины зондирования биологической ткани проводилось в случае постановки волокон на некотором расстоянии друг от друга. Если разместить источник лазерного излучения и приёмник рассеянного излучения на определенном расстоянии друг от друга, то излученные фотоны от одного волокна будут проходить к другому в области, которая по виду напоминает форму "банана" в полубесконечной среде (см. рис. 2.3). Эта форма формируется путем решения уравнения диффузии аналитическим методом [63], а также с использованием моделирования с применением метода Монте-Карло.

При условии симметричности и изотропности рассеивающей среды, в данном случае при изменении местами излучателя и приемника форма области наиболее вероятных путей перемещения фотонов от излучателя к приемнику остается неизменной, интенсивности полей будут накладываться друг на друга. Распределение фотонов, подверженных диффузии, мигрирующих между волокнами, не изменится ввиду того, что поля от волокон-источников не взаимодействуют друг с другом. Получив изображения распространения фотонов между волокнами-источниками, можно найти область наиболее вероятного прохождения фотонов между волокнами и определить глубину зондирования рассеянным излучением. С использованием разработанного метода Монте-Карло можно создать модель распространения лазерного излучения в многослойной среде, при условии, что источниками излучения являются два волокна, размещенных на некотором расстоянии друг от друга.

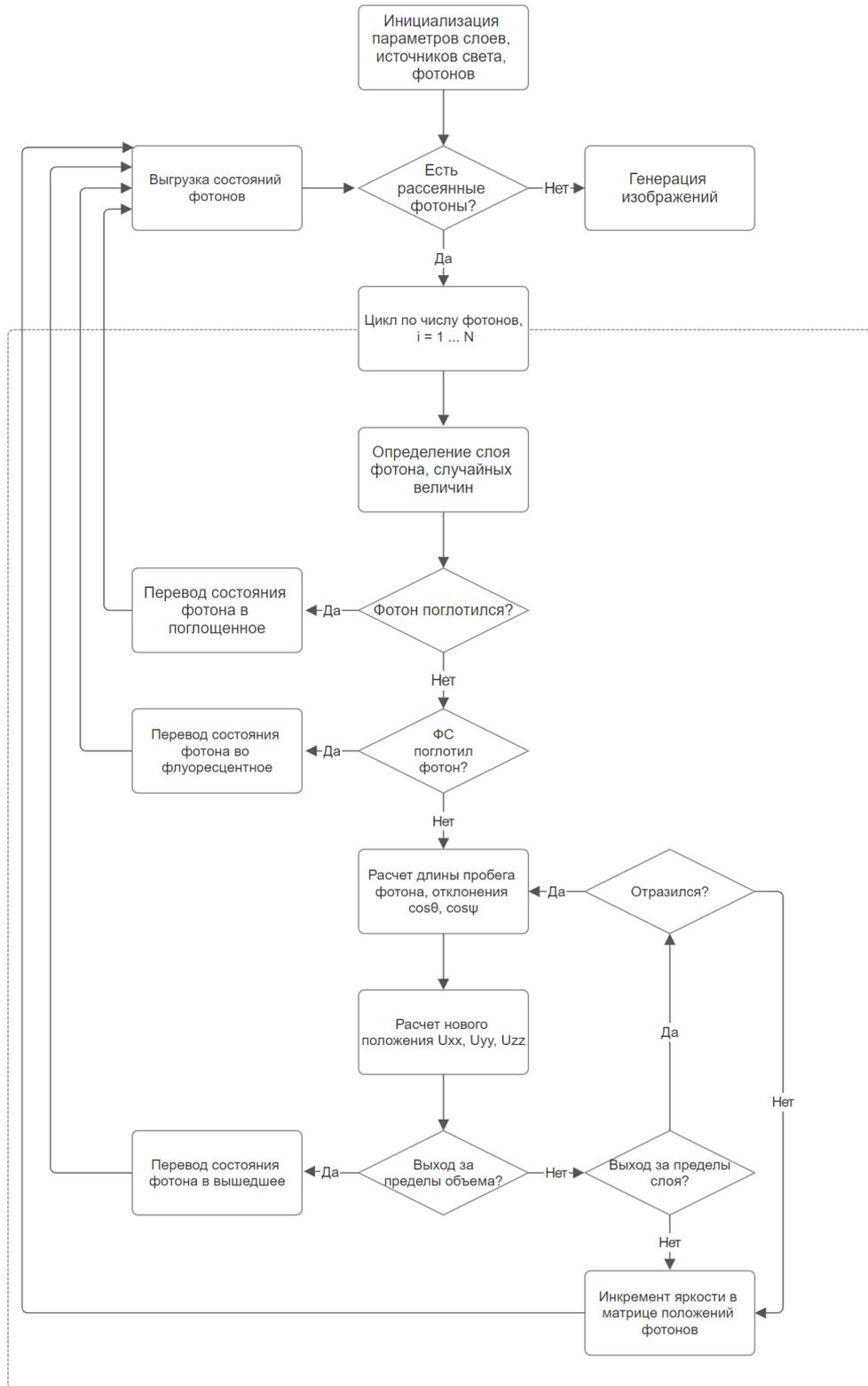


Рисунок 2.4 – Блок-схема алгоритма моделирования модифицированным методом МК.

2.5. Установка для спектроскопического измерения степени оксигенации гемоглобина

Экспериментальная установка для измерения степени оксигенации гемоглобина в видимом диапазоне (рис. 2.5) состояла из источника белого света, спектрометра с оптоволоконным входом, оптоволоконного зонда, ПК со специальным программным обеспечением для регистрации и обработки спектра. Для регистрации спектра использовался спектроанализатор LESA-01-BIOSPEC. В диапазоне спектра 500 – 600 нм была реализована запись спектров диффузного отражения и их передачи, которая позволяет количественно оценить концентрацию гемоглобина в оксигенированной и редуцированной форме.

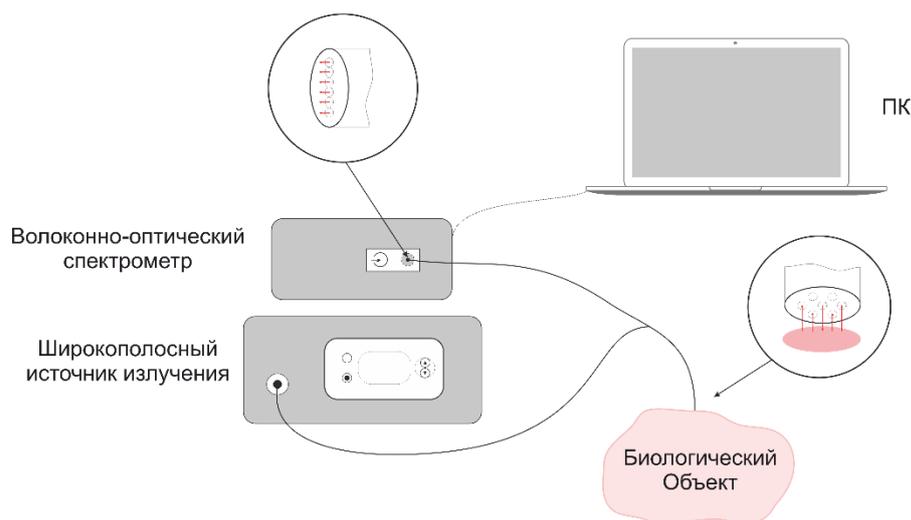


Рисунок 2.5 – Схема установки, состоящая из источника широкополосного излучения, волоконно-оптического спектрометра, ПК для записи измерений.

В качестве источника широкополосного света использовалась светодиодная лампа с волоконно-оптическим выходом. Мощность источника света регулировалась в пределах до 1 Вт, а цветовая температура составляла 5000 – 6500 К. Спектр источника света в диапазоне 500 – 600 нм имел однородность, достаточную для анализа спектров диффузного рассеяния. Спектры диффузного отражения были зарегистрированы относительно стандартного образца (BaSO_4) с отражательной способностью, близкой к единице в спектральном диапазоне, представляющем для нас интерес (500 – 600 нм).

При размещении волокон в геометрии на просвет для измерения тканевой сатурации в проходящем свете внутри катетера Фолея был установлен диффузор из волоконно-оптического полимера. Катетер Фолея использовали для равномерного освещения биологического объекта изнутри, чтобы измерить диффузно рассеянный свет, который проходил насквозь био-ткани. Катетер Фолея был заполнен жировой эмульсией (Интралипид МСТ / ЛСТ 10%) разбавлен до 1%

с помощью NaCl 0.9%, который был выбран в качестве среды для рассеяния с целью обеспечения равномерной индикатрисы рассеяния. Длина диффузора составила 10 мм.

Стандартный оптоволоконный зонд (включенный в LESA-01-BIOSPEC) с центральным осветительным волокном и шестью периферийными приемными волокнами использовался как для освещения (в случае размещения волокон с одной стороны), так и для записи диффузно отраженного и прошедшего света. Во время измерения дистальная поверхность волоконно-оптического зонда находилась в мягком контакте с биологической тканью.

Приемные волокна на входе в спектрометр образовывали линию, служащую входной щелью монохроматора, и располагались перпендикулярно плоскости дифракции диспергирующего элемента. Диаметр каждого световода составлял 250 мкм, который определялся расстоянием между центрами волокон, расположенными близко друг к другу. Числовая апертура каждого световода составила 0.22.

2.6. Двух-канальная видео-система для флуоресцентной диагностики и определения локализации опухоли, ее границ и патологической ткани по флуоресценции фотосенсибилизатора, накопленного в опухолевой ткани

Для определения локализации патологической ткани и улучшения полноты хирургической резекции опухоли головного мозга было проведено клиническое исследование с участием пациентов с опухолью головного мозга.

Экспериментальная установка состояла из двухканальной видеосистемы для флуоресцентной диагностики (УФФ-630-01, БИОСПЕК). На рис. 2.6 представлена схема двухканальной видеосистемы. Установка состояла из лазерного источника, источника белого света, системы оптических фильтров и оптического эндоскопа, с помощью которых хирург мог анализировать интересующие области поверхности головного мозга. Источник лазерного излучения имел длину волны излучения 635 нм, что соответствует длине волны пика поглощения PpIX. Флуоресцентный сигнал PpIX измеряли при длине волны 705 нм. Двухканальная видеосистема позволяет получать изображения в черно-белом и цветном режимах. Затем эти изображения можно наложить друг на друга, при этом флуоресцентные зоны окрашиваются в зеленый цвет для визуальной оценки границ опухолевых очагов. Система также позволяет оценивать индекс флуоресценции в исследуемой области опухоли. Для обнаружения остаточной флуоресценции использовали жесткий эндоскоп с наклоном дистального конца на 45°.

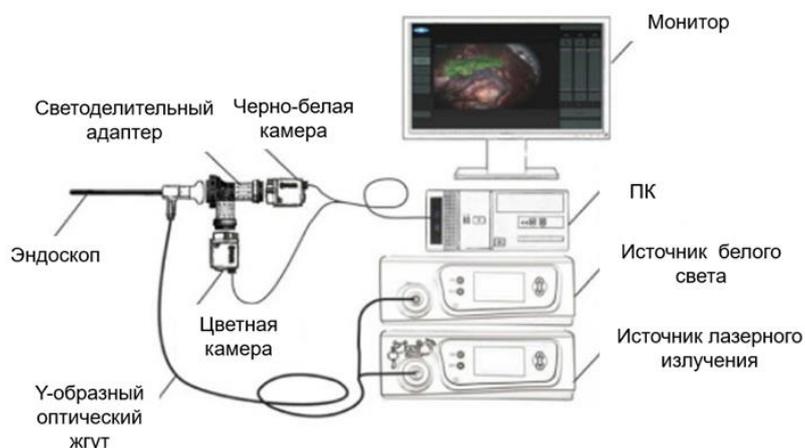


Рисунок 2.6 – Двух-канальная видео-система для флуоресцентной диагностики.

Для регистрации обратноотраженного и флуоресцентного излучения использовалось универсальное устройство, оснащенное высокочувствительной черно-белой цифровой CCD-камерой, которая регистрирует 60% света, отраженного от исследуемой ткани, а также цифровой цветной навигационной камерой, которая получает 20% света, отраженного от биологических тканей. Излучение, попадающее в универсальное устройство, проходило через дихроический делитель и оптические фильтры. Черно-белая камера получала излучение после прохождения через оптический фильтр, который пропускает только длины волн выше 650 нм, а цветная камера получала излучение после прохождения через оптический фильтр, который пропускает видимые длины волн до 625 нм. Для осмотра изучаемых областей биологической ткани при работе с видеосистемой использовался эндоскоп. Программное обеспечение для работы с двухканальной флуоресцентной видеосистемой было разработано сотрудниками Лаборатории лазерной биоспектроскопии ИОФ РАН.

Во время флуоресцентной диагностики степень накопления и выгорания ФС в биологической ткани количественно оценивалась по индексу флуоресценции ФС, измеренному в исследуемой области биологической ткани. Индекс флуоресценции ФС рассчитывался программно по следующему принципу: вычислялось среднее значение яркости пикселей изображения, полученного с черно-белой камеры в области, выделенной диагностическим курсором, и нормировалось на параметры черно-белой камеры. Затем вычислялось среднее значение яркости пикселей изображения красного канала цветной камеры в области, выделенной диагностическим курсором, и нормировалось на параметры цветной камеры. Затем первое значение нормировалось на второе для расчета индекса флуоресценции ФС. Перед флуоресцентной диагностикой биологической ткани индекс флуоресценции ФС нормировался на область с наименьшим флуоресцентным сигналом (здоровая биологическая ткань), которой присваивалось значение 10 отн. ед. Проведение флуоресцентной диагностики перед ФДТ

позволяло выявить области наибольшего накопления ФС – патологическую ткань (индекс флуоресценции ФС > 10 отн. ед.). На основе результатов флуоресцентной диагностики после ФДТ оценивалась степень выгорания ФС в биологической ткани.

Данные записывались в формате видеофайлов и изображений для дальнейшей обработки результатов. Для оценки накопления ФС в опухолевых тканях проведен сравнительный анализ показателей флуоресценции опухолевых тканей и оптических фантомов ткани головного мозга с РrIX в концентрациях 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 мг/кг при однократной калибровке видеосистемы.

2.7. Диагностическая канюля, разработанная на базе стереотаксической иглы для биопсии с одновременным спектроскопическим контролем для определения локализации труднодоступной опухоли и ее границ

Диагностическая канюля, разработанная на базе стереотаксической иглы для биопсии с одновременным спектроскопическим контролем и закрепленными внутри оптическими волокнами подключалась к источнику лазерного излучения и оптоволоконному спектрометру (ЛЕСА-01-БИОСПЕК). На рис. 2.7(а) показано изображение стереотаксического устройства. Стереотаксическую иглу вводили в наружную стереотаксическую иглу с приемным окном, расположенным на латеральной стороне ближе к дистальному концу. Приемное окно было предусмотрено для того, чтобы хирург мог легко взять биопсию опухолевой ткани во время ФД для дальнейшего гистологического анализа. В стереотаксической канюле было закреплено два световода, излучающего и детектирующего, и отражающая поверхность с наклоном под углом 45°. Лазерное излучение отражалось по световоду от наклонной поверхности и попадало на биологический объект с накопленным ФС. Возбужденный сигнал флуоресценции отражался от наклонной поверхности и попадал в приемное волокно, проходя по которому попадало в вход спектрометра. Сигнал флуоресценции был представлен в виде спектра, по форме которого можно было определить соответствие с спектром флуоресценции применяемого ФС РrIX. По отношению между максимумом флуоресценции и обратно-рассеянной лазерной линии определялся индекс флуоресценции, по которому проводилась оценка интенсивности флуоресценции ФС.

На рис. 2.7(б) показана схема экспериментальной установки для спектроскопической диагностики, состоящая из лазерного источника (1), подсоединенного к нему световода для передачи лазерного излучения к био-объекту (2), тройника Люэра (3), стереотаксической биопсийной канюли (4), приемного волокна (5), спектрометра (6) с полихроматором (8) и оптоволоконным вводом излучения, содержащим фильтр (7), фотодиодную матрицу (9), блок регистрации (10) и персональный компьютер (11)

Рассчитанный индекс флуоресценции нес информацию о концентрации ФС в опухолевой ткани. Длина стереотаксической иглы 295 мм, диаметр 1,50 мм. Диаметр каждого оптического волокна составлял 250 мкм. Длина приемного окна – 11 мм. Чувствительность прибора позволила определить концентрацию РrIX 0.25 мг/кг в оптическом фантоме опухоли головного мозга.

Приемное окно в первой версии диагностической канюли позволяет взять биопсию ткани во время стереотаксического исследования. Но налипание крови/ткани на окно обнаружения диагностической канюли может повлиять на принимаемый сигнал. Второй вариант диагностической канюли имеет прозрачную оболочку в приемном окне, что предотвращает налипание биологической жидкости на оптических волокнах.

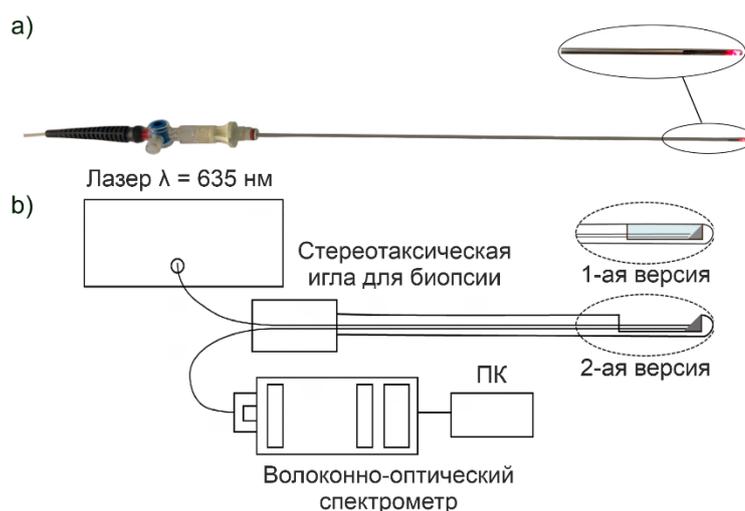


Рисунок 2.7 – (а) Изображение стереотаксической канюли для биопсии с одновременным спектроскопическим контролем с увеличенным изображением приемного окна длиной 11 мм. (б) Схема экспериментальной установки для спектроскопической диагностики.

2.8. Лазерный спектроскопический комплекс с пикосекундным разрешением для измерения времени жизни флуоресценции фотосенсибилизатора

Для определения времени жизни и кинетики флуоресценции фотосенсибилизаторов коллективом лаборатории была разработана система на основе стрик-камеры Hamamatsu C10627-13, с временным разрешением 15 пс, сопряжённой с волоконно-оптическим спектрометром (рис. 2.8). Для возбуждения флуоресценции использовался полупроводниковый лазер с длиной волны 637 нм и длительностью импульса 100 пс. В процессе измерений использовался метод называемый “Коррелированный по времени счет единичных фотонов”. В процессе исследования флуоресценция объекта возбуждается короткими лазерными импульсами, следующими с постоянной частотой. Далее анализируют распределение зарегистрированных фотонов по времени. Частоту импульсов и временную развёртку стрик камеры подбирают таким образом,

чтобы время жизни флуоресценции τ_F было соизмеримо с временной разверткой и интервалом между импульсами.

Возбужденная лазерным источником флуоресценция в образце собирается в оптическое волокно и попадает в полихроматор. Далее излучение формирует на фотокатоде изображение, которое преобразуется в электронный сигнал. Ускоряющее поле, находящееся внутри электронно-оптического преобразователя, заставляет их двигаться от фотокатода к фосфорному экрану. К электронам прикладывается переменное поле в процессе движения, перпендикулярное направлению их движения, осуществляющее развертку по времени. Далее после развертки электроны попадают на микроканальную пластину, которая является усилителем потока электронов в результате вторичной эмиссии. Полученный сигнал регистрируется CCD камерой (рис. 2.9) и передается на ПК, где выполняются алгоритмические процедуры для анализа полученной кинетики флуоресценции. Целью обработки является извлечение данных о времени жизни флуоресценции и о распределении числа фотонов, зарегистрированных стрик-камерой между компонентами времени жизни. Для восстановления параметров времен жизни флуоресценции применяется численная аппроксимация, позволяющая разделить вклад быстро и медленно затухающих каналов излучения. Результирующая информация визуализируется в виде карт пространственно-временного распределения интенсивности излучения.

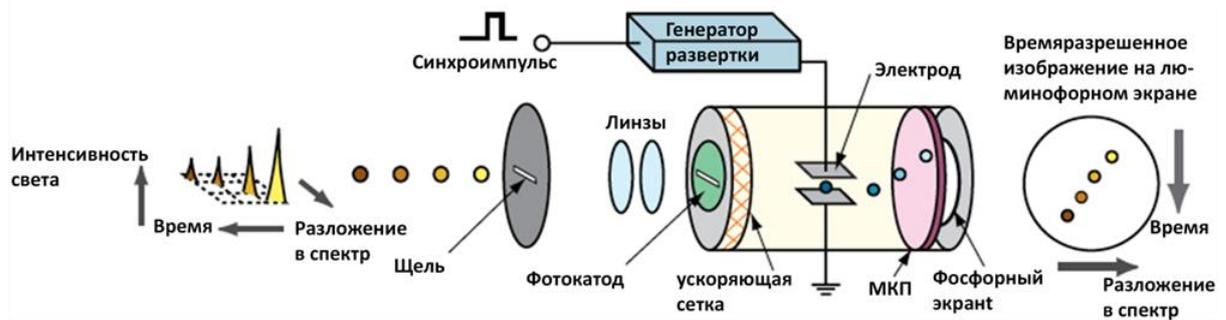


Рисунок 2.8 – Схема работы электронно-оптического преобразователя (стрик-скопа) Hamamatsu.

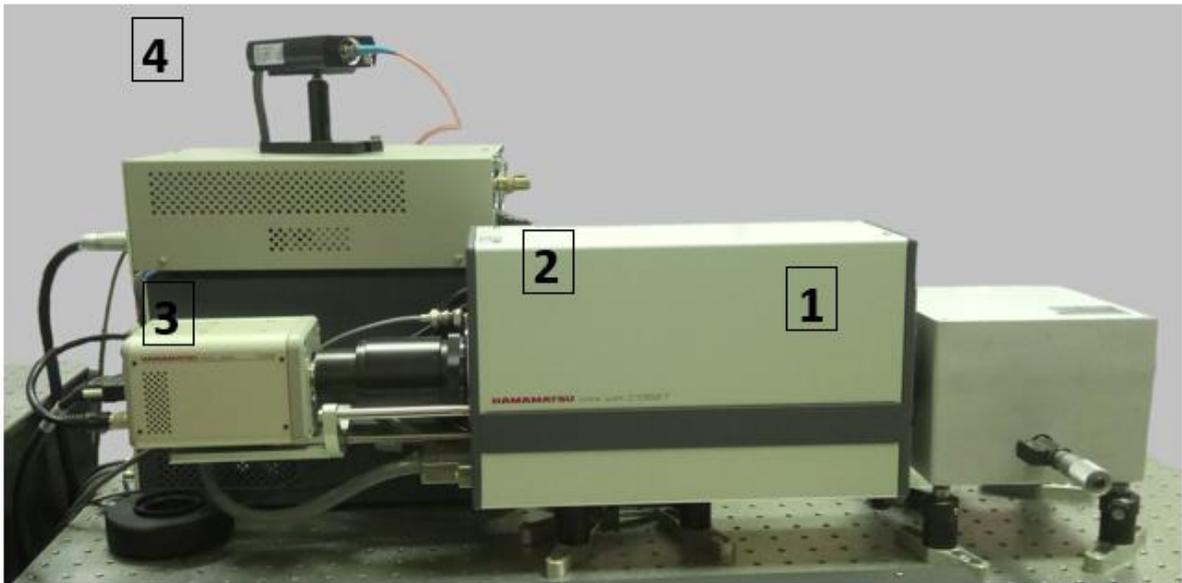


Рисунок 2.9 – Изображение экспериментального комплекса. 1) полихроматор; 2) стрик-скоп; 3) CCD камера 4) лазер с оптоволоконным выходом.

Электронно-оптический преобразователь Hamamatsu используется для изучения кинетики затухания флуоресценции и обладает временным разрешением в 15 пикосекунд. Для синхронизации работы источника лазерного излучения с Hamamatsu стрик-камерой используется синхронный генератор задержки Hamamatsu. Этот генератор задержки работает в двух режимах: "Внутреннем", когда синхронизация происходит по внутренним часам генератора задержки, и "Внешнем", когда синхронизация происходит по внешнему импульсу, поступающему от источника лазерного излучения. Управление генератором задержки осуществляется через ПК.

Для записи распределения фотонов, выходящих из электронно-оптического преобразователя, используется цифровая CCD-камера Hamamatsu. Эта камера оснащена VGA интерфейсом, имеет систему охлаждения матрицы с использованием элементов Пельтье, что значительно снижает уровень темнового шума. Кроме того, 12-битный цифровой выход способствует дополнительному снижению шумов.

Управление работой камеры осуществляется через ПК. Данная CCD-камера обладает спектральной чувствительностью достаточной для исследования флуоресценции как в видимом, так и в ближнем инфракрасном диапазонах. Для доставки лазерного импульса и приема флуоресцентного сигнала использовались Y-образное оптическое волокно. Это позволяет проводить измерения *in vivo*, и не ограничивает размеры исследуемого образца.

Уникальностью данного приборного комплекса является разработанная в лаборатории схема доставки лазерного импульса и приема флуоресцентного сигнала по оптическим волокнам. Это позволяет проводить измерения *in vivo*, а также не ограничивает размеры исследуемого образца. Для подачи лазерного излучения было применено одно многомодовое оптическое

волокно из кварц-полимерного материала с диаметром световода 50 мкм и числовой апертурой $NA = 0.22$. В качестве приемных волокон использовались шесть многомодовых оптических волокон из кварца с диаметром сердцевины 200 мкм и числовой апертурой $NA = 0.22$. Общая длина оптического кабеля в данной конфигурации измерительной системы составила 4 метра.

2.9. Лазерный сканирующий микроскоп

Для проведения микроскопической оценки распределения РрIX в тканях опухоли использовался лазерный сканирующий микроскоп LSM-710-NLO (Carl Zeiss, Германия), изображенный на рис. 2.10, в комплексе с мультифотонным фемтосекундным перестраиваемым лазером Chameleon Ultra II (680 – 1080 нм) (Coherent, США). Метод конфокальной лазерной сканирующей микроскопии демонстрирует существенные преимущества в пространственном разрешении и контрасте по сравнению с классической световой микроскопией. Такой эффект достигается за счет использования апертурного ограничителя, размещенного в плоскости изображения и ограничивающий поток фонового рассеянного света, отсекает паразитную засветку, поступающую из областей, расположенных вне зоны резкости фокусирующей оптики. Поскольку в каждый момент времени на образце регистрируется только одна флуоресцирующая точка, то для построения полной картины требуется растровое сканирование образца. Во время сканирования лазерный пучок перемещается по образцу в горизонтальной плоскости. Перемещение зондирующего луча в поперечном направлении обеспечивается системой зеркал с управляемым углом наклона.

Процесс формирования изображения с двумерного объекта, находящегося в зоне фокусировки, включает следующие этапы:

- Последовательное сканирование образца сфокусированным лазерным лучом, отклоняемым по осям X и Y принимаемым гальванометрическими сканерами.
- Попиксельный прием флуоресцентного сигнала деталей исследуемого образца посредством фотоумножителя.
- Преобразование информации, содержащейся в сигнале фотоумножителя в цифровой формат с последующей визуализацией, для отображения данных попиксельно переносится с цифровой матрицы на экран монитора.

Фокусирующая оптика направляет зондирующий луч на образец, инициируя возбуждение флуоресценции. Флуоресцентное излучение собирается объективом и перенаправляется в регистрирующий приемник при помощи дихроического расщепителя луча. Необходимый спектральный диапазон выделяется узкополосным фильтром, установленным на пути возбуждающей лазерной линии. Точечная диафрагма размещается перед детектором в плоскости,

соответствующей фокальной плоскости объектива. Свет, исходящий из плоскостей выше и ниже фокальной плоскости при прохождении через центральное отверстие оказывается расфокусированным, и эффективно блокируется, что обеспечивает высокую контрастность итогового изображения за счет подавления внефокусной засветки. Конфокальный микроскоп имеет разрешение σ и оно ограничено дифракционным пределом:

$$\sigma = \frac{\lambda}{\pi(NA)}, \quad (2.21)$$

где λ – длина волны излучения, NA – числовая апертура объектива, n – показатель преломления среды между образцом и объективом. В видимом диапазоне разрешение составляет 250 нм (NA = 1.45, n=1.51). Для возбуждения флуоресценции образцов в системе микроскопа используются лазеры с заранее отъюстированными световодами.



Рисунок 2.10 – Лазерный сканирующий микроскоп LSM-710-NLO.

Заключение к главе 2

Описаны применяемые методики и оборудование, которые использовались в научной работе для исследования биологических образцов, численного моделирования процессов,

связанных с распространением лазерного излучения в среде, для микроскопической оценки распределения ФС в опухоли. Представлены методы создания и моделирования оптических сред, содержащих фотосенсибилизатор и имитирующих оптические свойства поглощения и рассеяния реальной ткани (оптических фантомов ткани с опухолью). Изложены подходы флуоресцентной диагностики и ФДТ, которые обеспечивают анализ динамики накопления ФС в биологической ткани и обеспечивают видео-флуоресцентную навигацию по флуоресценции экзогенных флуорофоров в биологических тканях. Описан спектроскопический подход на базе метода обратно-диффузного отражения для анализа оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном русле. Представлен лазерный спектроскопический комплекс с пикосекундным разрешением для измерения времени жизни флуоресценции фотосенсибилизатора в биологическом объекте.

Глава 3. Разработка неинвазивной лазерно-спектроскопической методики оценки оксигенации гемоглобина в БИК-диапазоне

В данной 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. Проведено исследование степени оксигенации гемоглобина на образцах, имитирующих оптические свойства реальной ткани (оптических фантомах головного мозга). Исследование динамики изменения степени оксигенации гемоглобина было проведено на мелких лабораторных животных (мышях). После проведенного спектроскопического анализа в результате эксперимента по изменению обратно-рассеянного лазерного сигнала была выявлена зависимость изменения степени оксигенации от времени при снижении общей оксигенации мозга.

3.1. Методика неинвазивного измерения тканевой сатурации оксигемоглобина в смешанной крови микроциркуляторного русла мозга в ближнем инфракрасном диапазоне

Исследование степени оксигенации органов с глубокой локализацией является одной из важнейших проблем экспериментальной и клинической медицины. Например, отклонения от нормы уровня насыщения кислородом тканей мозга свидетельствуют о развитии возможной патологии, требующей тщательной диагностики. Своевременная регистрация нарушений функций мозга позволяет минимизировать риск развития осложнений на фоне развивающегося заболевания и выбрать эффективный метод лечения. Для обеспечения возможности исследования удаленных от поверхности слоев ткани наиболее релевантным для решения данной задачи по сравнению с видимым диапазоном является дальний красный и БИК-диапазон лазерного излучения.

Для определения степени оксигенации ткани широко применяются оксиметры, которые позволяют измерить насыщенность крови кислородом (SpO_2) артериального кровеносного русла в месте крепления детектора, используя лазерное излучение двух длин волн (рис. 3.1). Диапазон длин волн излучения подбирается таким образом, чтобы при одной длине волны оксигемоглобин поглощал в большей степени по сравнению с редуцированной формой гемоглобина, при другой

деоксигенированный гемоглобин имеет наибольшее поглощение. Изменение взаимной концентрации двух форм гемоглобина в зоне исследования оказывает влияние на поглощающие свойства объекта, что обуславливает изменение интенсивности обратно- (или диффузно) рассеянного лазерного сигнала. Таким образом, существующие технологии оксиметрии позволяют определить насыщенность кислородом пульсирующей крови. При исследовании головного мозга необходимо измерять оксигенацию микроциркуляторного русла локально в месте исследования (StO_2) с глубиной зондирования излучения затрагивающей кору головного мозга.

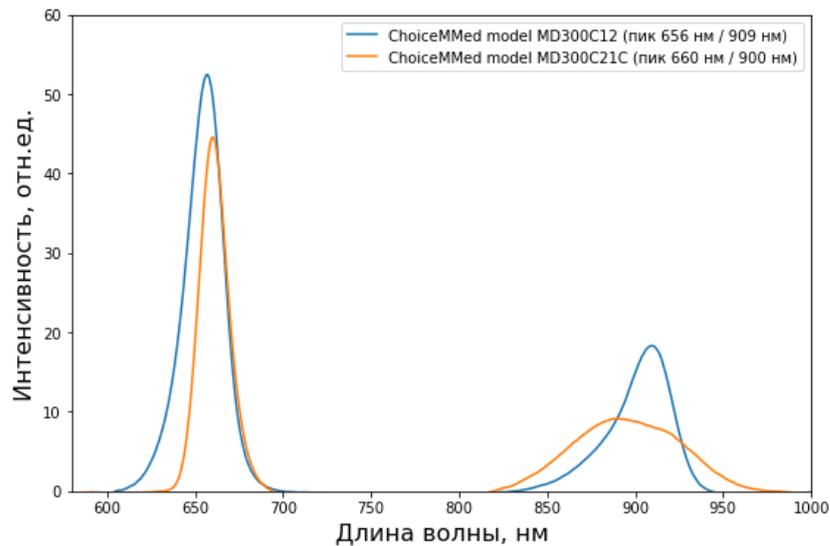


Рисунок 3.1 – Спектры лазерных источников света пульсоксиметров.

Недостатками данной системы является разница между интенсивностями двух лазерных пиков, при снижении оксигенации в образце, пик соответствующий большому поглощению Hb будет снижаться быстрее, чем увеличение пика соответствующего большому поглощению HbO_2 , что может оказывать влияние на точность измерений. Помимо этого, измерение стандартным пульсоксиметром проводят когда устройство закреплено на пальце, а требуется измерять оксигенацию локально в любой области исследования биологической ткани.

Для устранения описанных недостатков была разработана и применена неинвазивный метод определения оксигенации гемоглобина в БИК-диапазоне. Метод оценки состояния микроциркуляции тканей реализован путем спектроскопического анализа оксигенированной и деоксигенированной (редуцированной) формы гемоглобина.

Установка для неинвазивной оценки степени оксигенации (рис. 3.2) состояла из двух лазерных источников с длинами волн лазерного излучения в дальнем красном и БИК-диапазоне спектра 687 нм и 804 нм, спектрометра для регистрирования спектров обратного рассеяния, Y-образного оптического волоконного жгута для флуоресцентной диагностики, оптического жгута

для передачи лазерного излучения к биологическому объекту, крепления для обеспечения равного расстояния между волокнами и ПК для записи полученных измерений.

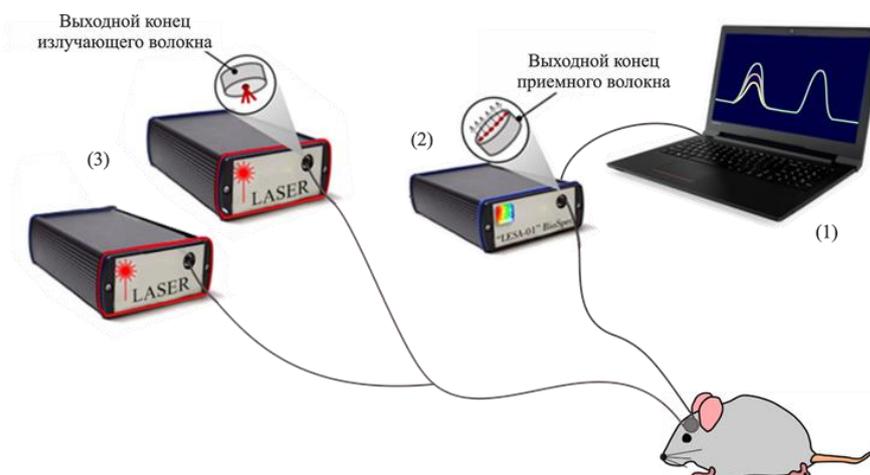


Рисунок 3.2 – Схема установки. (1) ПК для записи измерений, (2) спектрометр, (3) лазерные источники света.

Установка работает следующим образом: излучение от лазерных источников вводится в входной конец оптического жгута для передачи лазерного излучения к биологическому объекту. Лазерное излучение передается к внешнему слою биологического объекта, часть излучения, диффундируя вглубь через каждый слой структуры, регистрировалась приемным волокном. Детектирующее волокно имело апертуру $NA = 0.22$, и состояло из 6 моноволокон с диаметром 250 мкм. Полученный сигнал поступал на микроконтроллеры аналогового-цифрового преобразователя, конвертировался в цифровой сигнал и в дальнейшем передавался в ОЗУ компьютера. Параметр экспозиции был установлен 300 мс, что позволяло регистрировать измерения с низкой задержкой, необходимой для экспресс-диагностики. При помощи специализированного программного обеспечения производился непрерывный мониторинг изменения степени оксигенации, запись спектров обратного-рассеяния и формирование временной зависимости. Установленное значение промежутка времени, необходимого для формирования временной зависимости, равнялось 1 секунде.

Сатурация крови используется для обозначения насыщенности гемоглобина кислородом в ткани, которая определяется как:

$$StO_2 = \frac{cHbO_2}{cHbO_2 + cHb} \cdot 100\%, \quad (3.1)$$

где $cHbO_2$ представляет собой концентрацию оксигенированного гемоглобина в крови, а cHb представляет собой концентрацию дезоксигенированного гемоглобина. Согласно модифицированному закону Ламберта-Бера и теории переноса излучения выбираются две

различные длины волны для регистрирования изменения пропускания/отражения ($I_{\lambda 1}$ и $I_{\lambda 2}$) двух пучков света во времени. Величину сатурации крови можно выразить как:

$$StO_2 = A \cdot R + B, \quad (3.2)$$

где R – соотношение интенсивностей $I_{\lambda 2}$ и $I_{\lambda 1}$, A и B – эмпирические коэффициенты, определяемые путем калибровки. Соотношение оптических сигналов с вкладом поглощения от окси- и восстановленной формы гемоглобина позволяет определить изменение уровня оксигенации и оценить состояние микроциркуляторного русла ткани.

Теоретически R должно быть линейным или почти линейным с StO_2 . При выборе длины волны для двухволнового измерения оксигенации крови следует руководствоваться двумя принципами. Во-первых, коэффициенты поглощения HbO_2 и Hb на одной длине волны должны сильно различаться. Второе – примерно равный коэффициент поглощения в пересчете на HbO_2 и Hb на другой длине волны для оценки общей концентрации гемоглобина. В оксиметрах обычно используются длины волн 660 и 940 нм.

Отношение R рассчитывалось как отношение интегральной интенсивности под спектральным пиком сигнала обратного-рассеяния $I_2(\lambda)$ к интегральной интенсивности под спектральной кривой обратно рассеянного лазерного излучения $I_1(\lambda)$:

$$R = \frac{\int_{\lambda} I_2(\lambda)d(\lambda)}{\int_{\lambda} I_1(\lambda)d(\lambda)}. \quad (3.3)$$

Длины волн лазерных источников излучения были подобраны с учетом различий поглощательной способности двух форм гемоглобина. На рис. 3.3 представлены спектры поглощения гемоглобина. На 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 примерно одинаково.

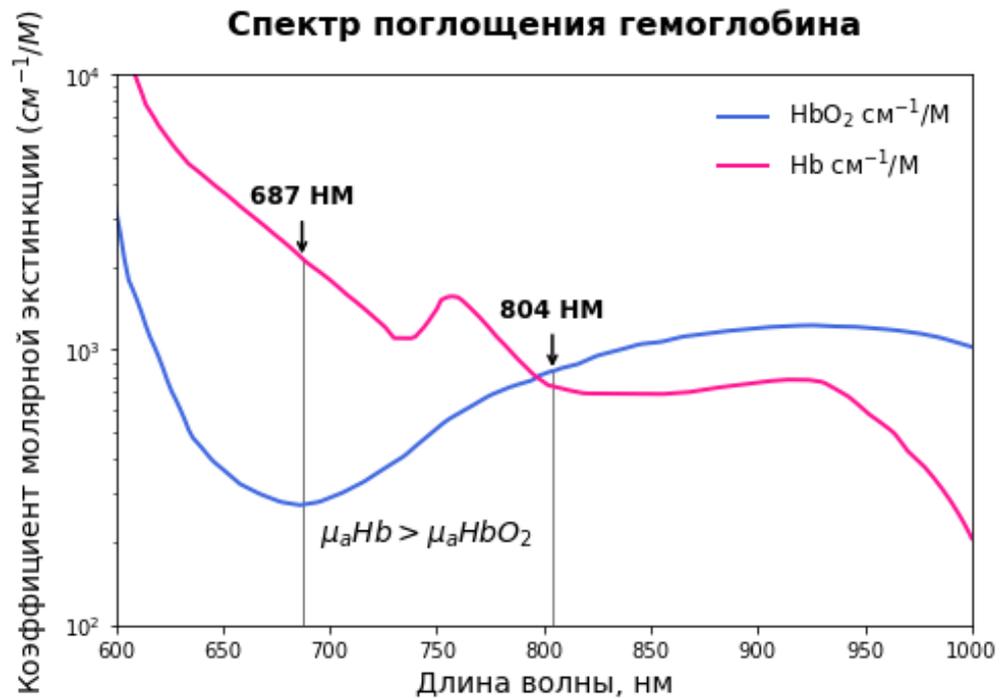


Рисунок 3.3 – Спектры поглощения гемоглобина: оксигемоглобина и дезоксигемоглобина. Линией отмечены лазерные пики, которые использовались при диагностике [64].

Поскольку поглощение оптического излучения двумя формами гемоглобина на длине волны 804 нм примерно одинаково, регистрируемый сигнал на протяжении измерения должен оставаться неизменным. При длине волны 687 нм восстановленный гемоглобин поглощает сильнее, чем оксигенированная. В зависимости от снижения или повышения концентрации форм гемоглобина изменяется интенсивность обратного рассеяния, что свидетельствует о состоянии кровенаполнения ткани. Однако линейность R и StO_2 будет зависеть от разницы между проникновением 687 нм и 804 нм. Поэтому необходимо проверить линейность при StO_2 когда выбраны две длины волны.

Проверка линейности полученных результатов проводилась методом оценки степени оксигенации гемоглобина по поглощению в видимом диапазоне [58]. Приемное волокно фиксировалось на расстоянии 1 – 3 см от излучателя, и на основе регистрируемого диффузно-рассеянного сигнала, степень оксигенации рассчитывалась в автоматическом режиме. Повторяющиеся события рассеяния и изменение траектории фотона вызывали возврат значительной части излучения в приповерхностный слой в результате диффузного рассеяния с противоположным направлением первоначального распространения. Диффузно-рассеянное назад излучение несло информацию о биологическом объекте, и передавалось по приемным волокнам диагностического оптического жгута в приемное окно спектрометра. Для установления чувствительности разработанной системы полученные данные StO_2 были проверены с помощью способа оценки оксигенации гемоглобина в видимом диапазоне света, выбранным в качестве

эталонного метода, основанного на измерении спектров обратного рассеяния, погрешность метода составила 2.5%. Проверка значений StO_2 производилась в начале эксперимента и промежуточных точках.

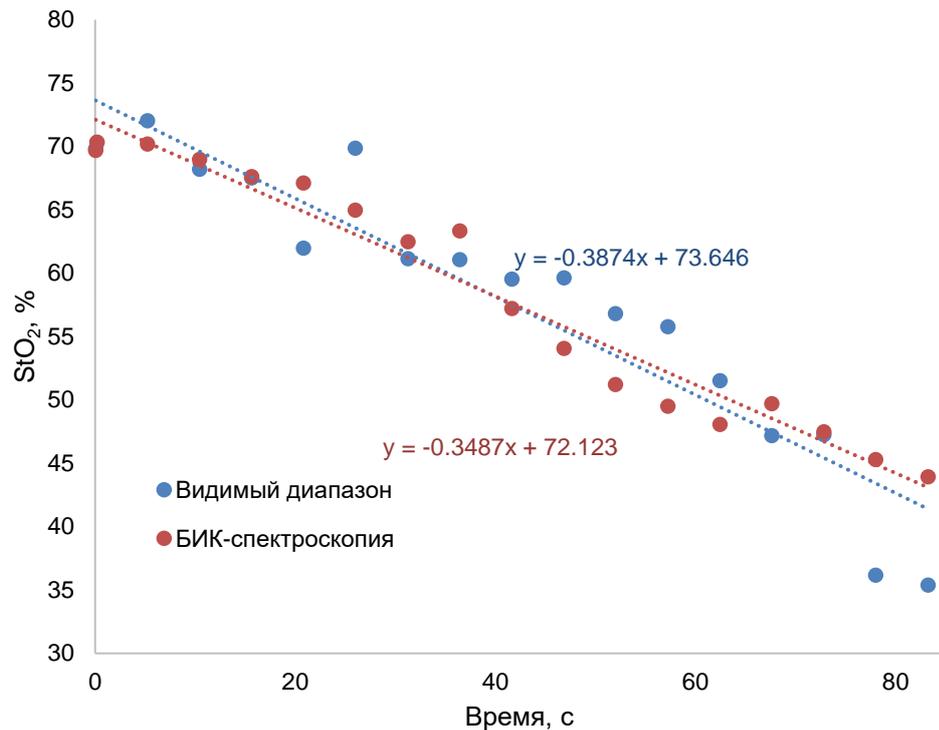


Рисунок 3.4 – Сравнение StO_2 , измеренного предложенной неинвазивной установкой, и методом оценки оксигенации по степени поглощения гемоглобином в видимом диапазоне, в зависимости от времени. Линейная аппроксимационная кривая StO_2 и R (действительные данные в серой области).

Получение эмпирических коэффициентов A и B : после проведения серии измерений человеческих пальцев, для калибровки эмпирических коэффициентов A и B использовались 10 наборов данных, полученных от 10 измерений на оптических фантомах мозга. В каждом наборе данных получены достоверные точки, как показано на рис. 3.4. Затем методом наименьших квадратов производилась линейная аппроксимация этих данных для получения значений эмпирических коэффициентов A и B . Таким образом, подстановка A и B в уравнение (3.2) приводит к следующему виду:

$$StO_2 = 140 - 71.4 \cdot R . \quad (3.4)$$

Важным параметром воздействия лазерного излучения на ткань является плотность мощности светового излучения. Величина плотности мощности для безопасного воздействия на ткани человека не должна превышать $P_{crit} = 200 - 300$ мВт/см² [65]. При превышении этого

значения возможно гипертермическое воздействие на метаболизм биологической ткани. Плотность мощности используемого в нашем исследовании лазерного излучения равна 23 ± 5 мВт/см², что значительно ниже допустимых пределов безопасности, и исключает риск термического повреждения, что позволяет в непрерывном режиме проводить измерения в течение длительного времени.

Для снижения плотности мощности и увеличения глубины зондирования лазерного излучения в качестве излучающего волокна был выбран оптический жгут с диаметром 4.2 мм. Числовая апертура жгута была измерена и значение составило $NA = 0.25$. Время экспозиции измерения варьировалось в диапазоне от 25 до 200 мс для различных биологических объектов (оптических фантомов, мозга мыши), что позволяло получать данные в режиме реального времени.

Крепление, разработанный в лаборатории, обеспечивал расстояние между центрами приемного и излучающего волокон равное 3 см. При таком расстоянии обеспечивалась глубина проникновения лазерного излучения в био-ткань равная 15.6 мм. Значение было определено теоретически с помощью метода Монте-Карло для многослойной среды с оптическими параметрами, соответствующими слоям реальной структуры мозга человека с прилежащими тканями. Численный метод хорошо известен и широко используется для определения оптических свойств биологических тканей, основан на численном моделировании распространения фотонов в мутных средах и описан в §2.4.

3.2. Моделирование распространения света в ткани для определения глубины зондирования лазерного излучения при БИК-спектроскопии

При изучении многослойных биологических объектов, в данной работе – головы человека, необходимо учитывать геометрические размеры и оптические параметры каждого слоя всей многослойной структуры. Поскольку голова человека является многослойной, она имеет неоднородную структуру, что обуславливает неоднородность оптических параметров среды. Помимо этого, она является оптически мутной средой, что определяет наличие поглощения и рассеяния в ткани. Основными элементами многослойной структуры головы человека является кожа, кость, цереброспинальная жидкость, серое и белое вещество мозга. Первоочередное изменение кровоснабжения, указывающее на наличие патологического процесса, находится в коре мозга. Важно определить параметры установки для достижения необходимой глубины зондирования лазерного излучения в биологическую ткань, достаточную для изучения церебрального кровоснабжения. Для определения глубины зондирования лазерного излучения в

биологической ткани был проведен теоретический расчет глубины проникновения лазерного излучения (ЛИ) с длиной волны 687 нм и 804 нм в ткань методом МК.

Оптические свойства объекта определялись свойствами каждого слоя с отличающимися оптическими параметрами μ_a , μ_s , g и геометрическими – различной средней толщиной l , и показателем преломления среды n . Параметры, используемые для моделирования, представлены в таблице 3.1 [66, 67].

Таблица 3.1 – Оптические параметры тканей головы человека при длинах волн 687 и 804 нм.

Слой объекта	$\mu_s, \text{см}^{-1}$		$\mu_a, \text{см}^{-1}$		g	n	$l, \text{мкм}$
	687 нм	804 нм	687 нм	804 нм			
Кожа	84	71	0.12	0.16	0.9	1.37	3000
Кость черепной коробки	103	91	0.12	0.16	0.9	1.43	7000
Цереброспинальная жидкость (ЦСЖ)	270	240	0.02	0.04	0.9	1.33	2000
Серое вещество мозга	255	232	0.18	0.36	0.9	1.37	4000
Белое вещество мозга	165	145	0.09	0.14	0.9	1.37	20000

Когда лазерное излучение проникает вглубь ткани оно подвергается многократному рассеянию из-за неоднородного характера ткани. Эти события рассеяния заставляют фотоны выбирать случайные пути, фотоны диффундируют через ткань. В случае если источник света помещается на поверхность ткани и рядом с ней помещается оптоволоконный детектор для обнаружения света – часть фотонов оказываются диффундирующими от источника излучения к приемнику проходя через ткань по траектории, состоящей из наиболее вероятных путей пройденных фотонами, образуя область напоминающую по форме "банан", прежде чем достичь детектора [62].

Условия, при которых выполнялось численное моделирование, представлены на рис. 3.5. Моделирование распространения лазерного излучения проводилось на модели, содержащей 5 слоев, оптические волокна были расположены на фиксированном расстоянии r между друг другом. Моделирование выполнялось при значениях $r = 15, 20, 30, 45$ мм. В исследовании диаметр излучающего волокна $D_{ист} = 4,2$ см был выбран с целью уменьшения плотности мощности для избегания возможности термического воздействия при длительном времени

измерений. В качестве приемника использовался диагностический катетер, состоящий из 6 кварцевых волокон для приема лазерного излучения. Диаметр каждого волокна составил $D_{\text{прием}} = 250$ мкм, числовая апертура была равна $NA = 0.22$. В процессе моделирования расстояние между волокнами варьировалось для достижения наибольшей глубины зондирования.

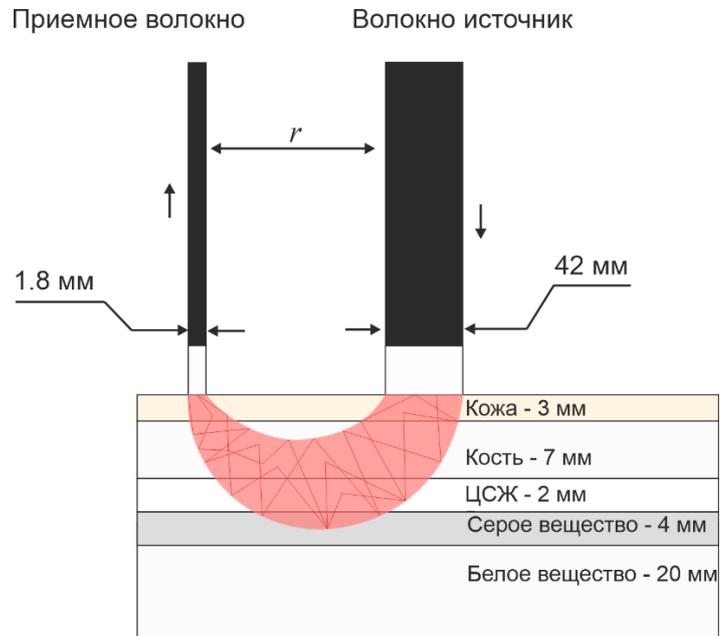


Рисунок 3.5 – Схема постановки волокон при спектроскопической диагностике в БИК-диапазоне.

Для обработки полученных изображений использовалась разработанная в лаборатории лазерной биоспектроскопии программа TiffReader [Ошибка! Закладка не определена.]. Чтение и запись файлов осуществляется в соответствии со спецификацией формата «tif». Данная программа позволяет обрабатывать графические файлы *.tif с глубиной цвета более чем 24 бита без потери глубины цвета изображения, позволяет измерять расстояния между заданными точками на изображении, строить профили яркости, как на прямой, так и на выделенной области. В программу входят алгоритмы поиска максимума яркости на изображении и поиска глубины зондирования.

Результаты расчетов представлены в виде черно-белого изображения распределения интенсивности, наиболее вероятная траектория перемещения фотонов, попавших в детектор, выделена синим цветом. Такое представление понятно и позволяет сравнивать с экспериментальными данными. Каждый пиксель черно-белого изображения соответствует точке пространства. Чем больше фотонов рассеются в данной точке, тем ярче будет пиксель. Изображение имеет 32-битную глубину цвета, что позволяет уловить малые изменения яркости в световом поле, и хранятся в формате «tif».

На рис. 3.6 показана картина распределения светового поля рассеянного лазерного излучения от двух волокон в оптической среде с параметрами рассеяния и поглощения μ_a , μ_s , g , показателями преломления n , соответствующими параметрам головного мозга человека с прилежащими тканями: кожа, кость черепной коробки, ЦСЖ, серое и белое вещество мозга (таблица 3.1).

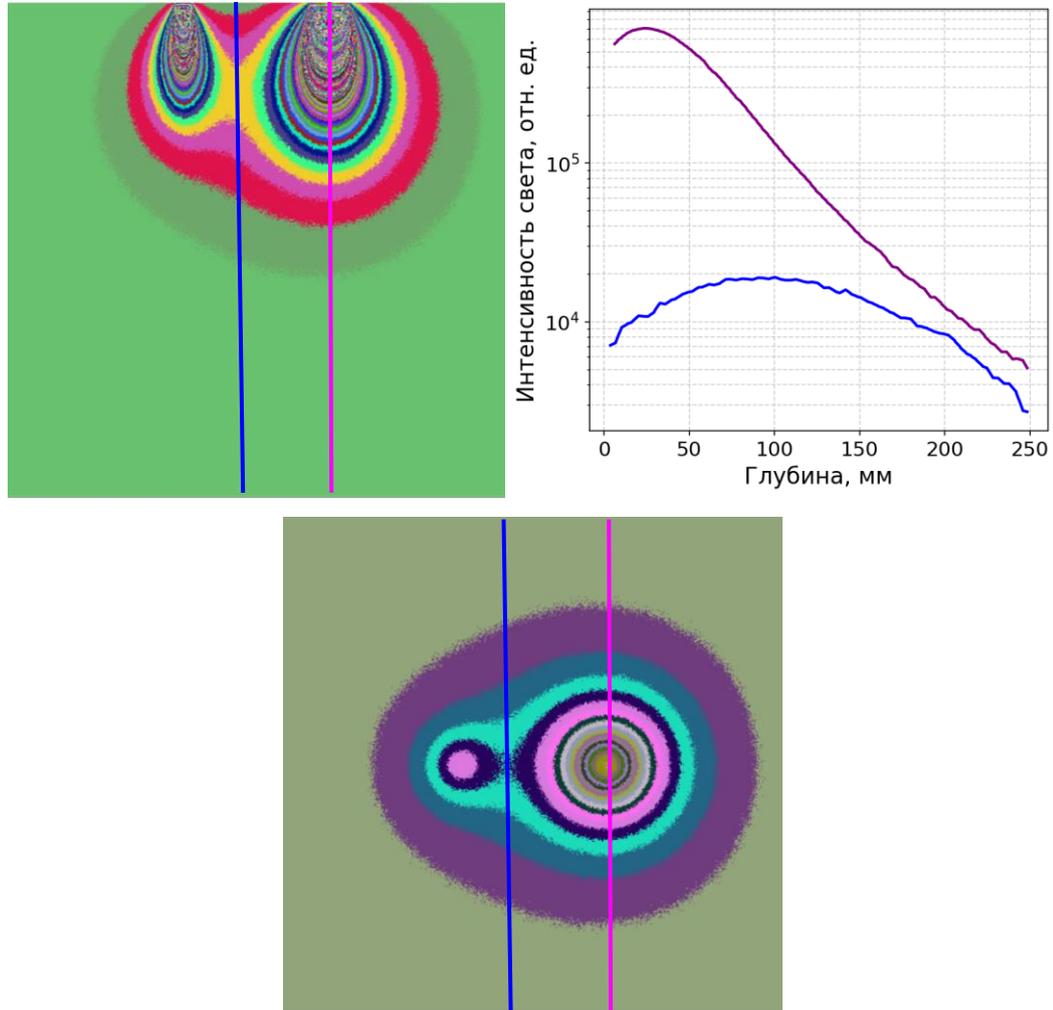


Рисунок 3.6 – а) обработанное изображение проекция Y светового поля рассеянного лазерного излучения от двух волокон с межволоконным расстоянием 15 мм. б) Профили интенсивность распределения светового поля в ткани. в) проекция Z на глубине 7 мм.

На рис. 3.7 представлен результат моделирования для случая, когда расстояние между источником излучения и детектором равнялось $r = 30$ мм. Линиями выделены границы слоев многослойной структуры. За счет многократных актов поглощения и рассеивания, излучение экспоненциально затухает по мере распространения вглубь ткани. В уравнении (1.8) при $\delta = 1/\mu_{eff}$ поток излучения ослабнет примерно в e раз. Для данного случая глубина проникновения δ была равна 7.9 мм, глубина залегания области наиболее вероятного прохождения рассеянных фотонов соответствуют значения – верхней границы 0.7 мм, нижней 15.6 мм. В данной модели

белое вещество находится на расстоянии 16 мм от внешней поверхности слоя кожи, поэтому излучение проникает в серое вещество, но не несет информации о белом веществе.

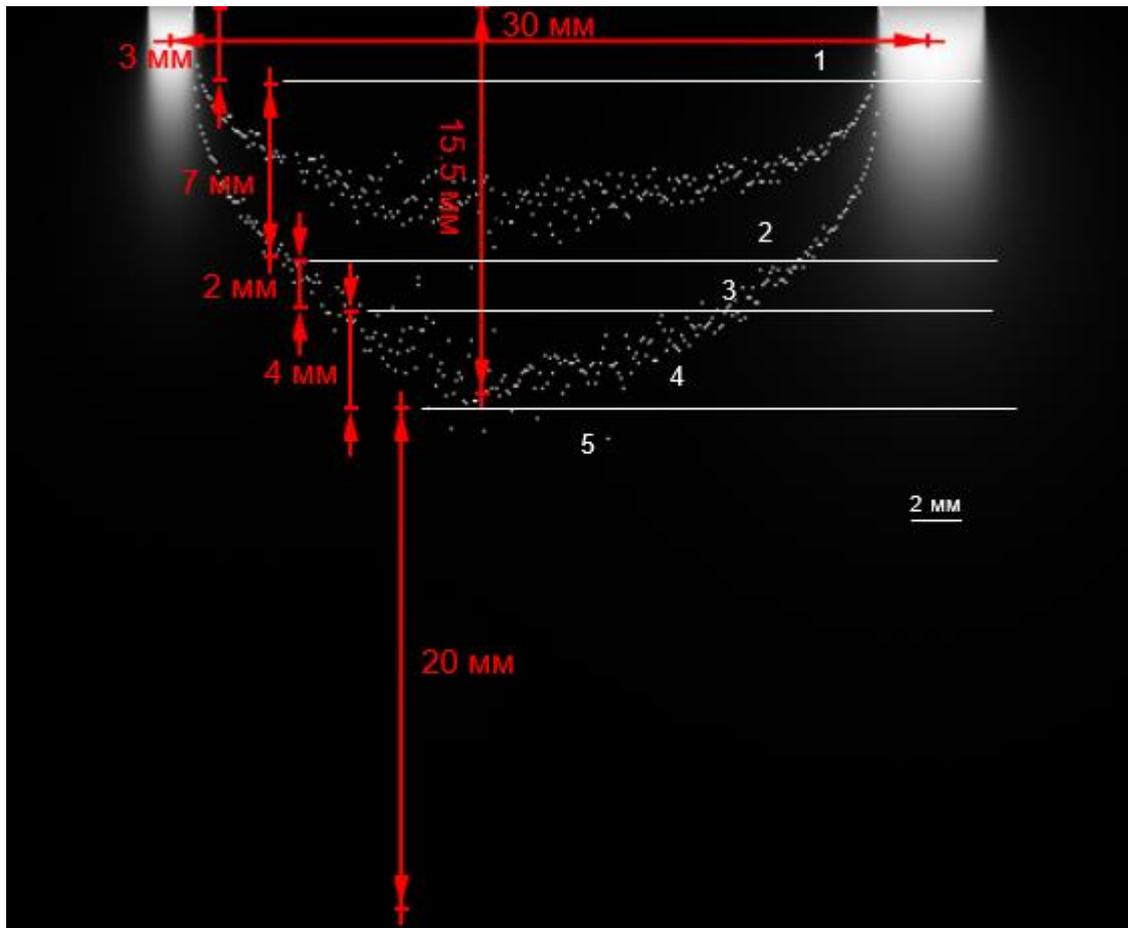


Рисунок 3.7 – Изображение профиля распространения лазерного излучения в многослойной структуре с оптическими параметрами сред, характерных для головы человека. При расстоянии между волокнами 30 мм соблюдается глубина 15.5 мм, где 1 – слой кожи, 2 – кость черепной коробки, 3 – ЦСЖ, 4 – серое вещество, 5 – белое вещество. Цветом выделена наиболее вероятная область распространения фотонов от излучателя до приемника.

Зависимость затухания интенсивности лазерного излучения по мере прохождения вглубь биологической ткани приведена на рис. 3.8. Максимальная глубина проникновения соответствует значению при половине интенсивности. Результаты численного моделирования распределение фотонов по пробегу в коже с хорошей точностью соответствует логнормальному распределению вида:

$$y(l) = y_0 + \frac{s}{\sqrt{2\pi}\sigma l} e^{-\frac{[\ln \frac{l}{l_0}]^2}{2\sigma^2}}, \quad (3.4)$$

где l – длина пробега фотона, l_c – средняя длина пробега фотона, S – площадь под кривой (соответствует суммарной длине пробега всех фотонов), σ – стандартное отклонение, y_0 – значение шума.

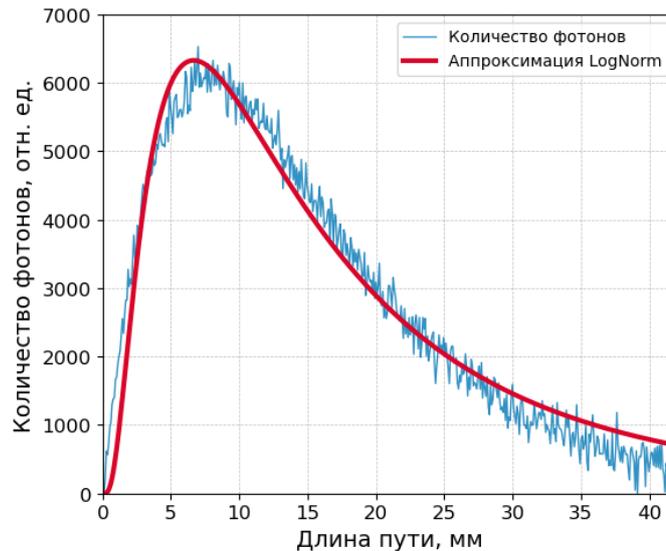


Рисунок 3.8 – Зависимость затухания интенсивности лазерного излучения по мере прохождения вглубь биологической ткани.

В случае если поменять волокно-приемник на волокно-источник, то картина распределения фотонов не изменится, вследствие отсутствия корреляции между световым полем от волокна-источника. Области наиболее вероятного прохождения фотонов от первого волокна ко второму и от второго к первому будут совпадать, а интенсивности суммироваться. Чем больше фотонов рассеются в данной точке, тем ярче будет пиксель. Рассчитанные методом МК области наиболее вероятного прохождения рассеянных фотонов представлены на рис. 3.9. Подавление шума достигнуто сглаживающими линейными фильтрами с выбором масок Собела и Превитта. В результате обработки данных определен максимум яркости на изображении, а также установлена глубина зондирования, что позволило выявить область наиболее вероятного пути фотонов.

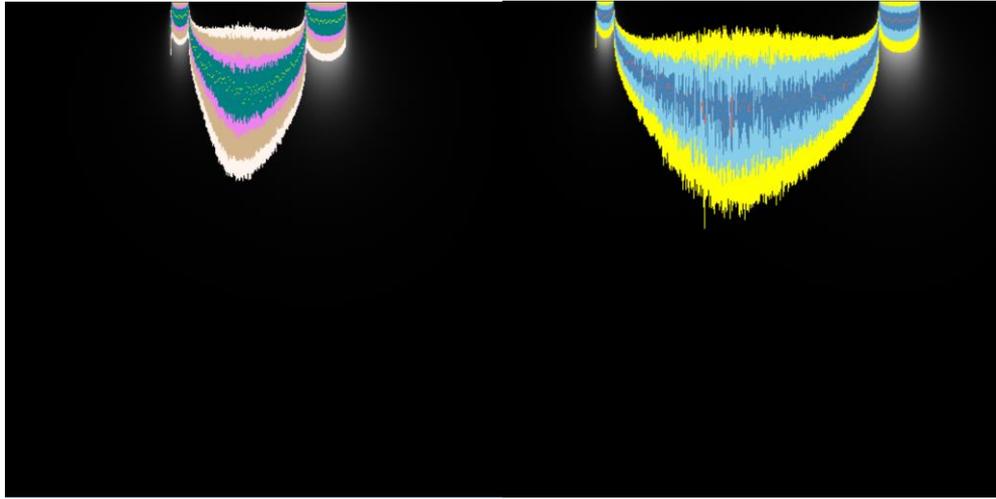


Рисунок 3.9 – Картина распределения наиболее вероятного пути фотонов в ткани для межволоконного расстояния: а) $r = 15$ мм и б) $r = 30$ мм.

В контексте изучения психических расстройств и динамики изменения степени оксигенации присущих областей мозга, для наиболее достоверного результата необходимо получить информацию о кровоснабжении глубокозалегающих слоев ткани. Белое вещество является основной частью глубокозалегающих областей мозга, состоящее из аксонов, покрытых миелином. За счет этого происходит кратное возрастание рассеяния, в 4 раза выше, чем у серого вещества. Изменения в миелине были связаны с рядом психических состояний, таких как шизофрения, депрессия, аутизм, посттравматическое стрессовое расстройство, болезнь Альцгеймера, дислексия, синдром дефицита внимания и гиперактивности, обсессивно-компульсивное расстройство и синдром Туретта. Варьируя расстояние между волокнами, можно увеличить глубину зондирования, что позволит излучению достигнуть белого вещества.

При расстоянии 45 мм глубина зондирования соответствовала наиболее удаленной вглубь ткани границе области наиболее вероятного распространения фотонов от излучающего к приемному волокну и равнялась ~ 19 мм (рис. 3.10). При данном расстоянии появляется возможность получить информацию о белом веществе, помимо серого. Данный факт является ключевым моментом использования метода для диагностики психических отклонений на ранних стадиях. Используя расстояние 15 мм между волокнами, лазерное излучение будет проходить слой кожа-кость-ЦСЖ и лишь в малой степени проникать в серое вещество. При увеличении расстояния между волокнами, помимо изменения глубины зондирования, увеличивается количество фотонов, которые несут информацию непосредственно об исследуемой ткани. Доля вклада тканей коры головного мозга в общий сигнал при расстоянии в 15 мм между волокнами составляет $<33\%$, при расстоянии в 30 мм – 55% , при 45 мм – $>69\%$ [68].

Зависимость глубины зондирования излучения от расстояния между оптическими волокнами описывается логарифмической функцией:

$$y = a * \ln(r) - b , \quad (3.5)$$

где r – расстояние между оптическими волокнами, a и b – коэффициенты пропорциональности. Увеличение расстояния между оптическими волокнами приводило к росту глубины зондирования лазерного излучения в биологическую ткань.

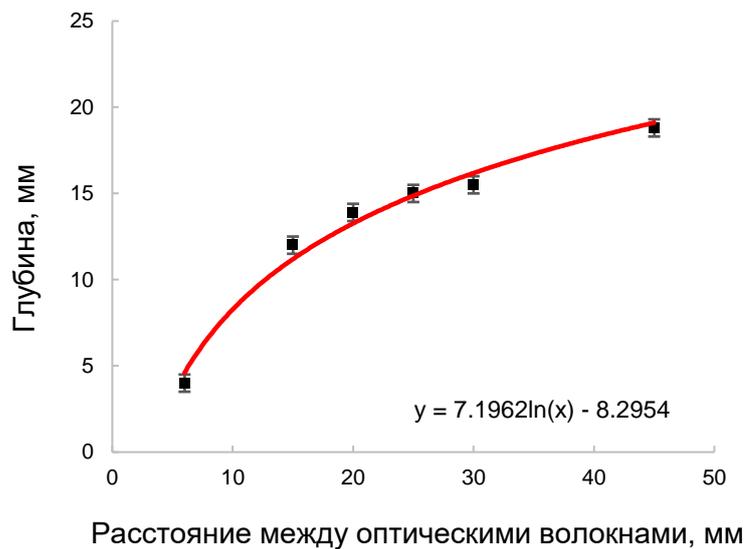


Рисунок 3.10 – Изменение глубины зондирования лазерного излучения при изменении межволоконного расстояния в биологической ткани.

По профилям распределения было рассчитано время, за которое отдельный фотон попадает в детектор по наиболее вероятной траектории распространения лазерного излучения. На рис. 3.11 представлен профиль распространения излучения при фиксированном расстоянии между волокнами 45 мм. Каждый пиксель на изображении соответствует 100 мкм. Для того, чтобы найти время, затрачиваемое на прохождение траектории, необходимо рассчитать скорость света в среде, с показателем преломления отличным от показателя преломления воздуха. Всем слоям в моделировании был задан показатель преломления $n = 1.45$. Данное значение выбрано как характерное для внешнего слоя структуры, а именно для эпидермиса [69], и лежит в пределах типичного диапазона (1.33 – 1.45) для мягких тканей и кости. В условиях диффузионного распространения фотонов в БИК-диапазоне вклад преломления на границах слоёв незначителен по сравнению с эффектами поглощения и рассеяния. Скорость света зависит от показателя преломления среды, соответственно для нахождения времени нам необходимо дополнительно учесть расстояние траектории в пикселях.

$$t = \frac{l_{pd} * n}{c}, \quad (3.6)$$

где c – скорость света в среде. За расстояние l_{pd} принималось количество пикселей на изображении, составляющие минимальную траекторию, среднюю и максимальную траекторию миграции от излучателя к детектору, учитывая скорость света в среде находили $t_{мин}$, $t_{ср}$ и $t_{макс}$ для каждой траектории.

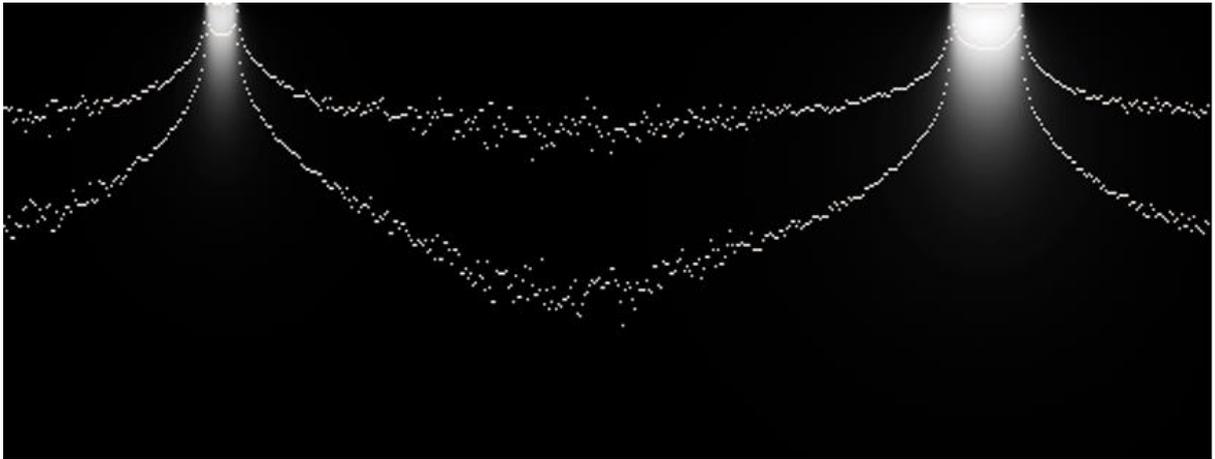


Рисунок 3.11 – Наиболее вероятная область миграции фотонов от излучающего волокна до детектора при расстоянии между волокнами 45 мм.

Поскольку значения оптических коэффициентов поглощения и рассеяния различны для излучения с отличающимися длинами волн, расчет проводился с коэффициентами, соответствующими длинам волн 687 нм и 804 нм, используемым в экспериментах по определению сатурации гемоглобина кислородом ткани в БИК-диапазоне. В результате при расстоянии между волокнами 45 мм и длиной волны 804 нм время прохождения равнялось $t_{мин} = 233$ пс; $t_{ср} = 256$ пс; $t_{макс} = 326$ пс. При длине волны 687 нм и расстоянии между волокнами 45 мм: $t_{мин} = 232$ пс; $t_{ср} = 249$ пс; $t_{макс} = 258$ пс.

3.3. Неинвазивное измерение тканевой сатурации оксигемоглобина в смешанной крови микроциркуляторного (церебрального) русла мозга в БИК-диапазоне

Для отработки способа и подбора оптимальных режимов работы экспериментальной установки проводилась серия экспериментов на оптических фантомах, моделирующих спектральные и структурные свойства реальной ткани. Оптический фантом многослойной структуры головы человека изготавливался на основе 1% раствора липофундина МСТ/ЛСТ 10%,

донорской крови в пропорции 1/16 от всего объема фантома и раствора NaCl 0.9%. Данное соотношение было выбрано из-за особенности мозгового кровообращения. Поскольку между кровью и тканями мозга имеется гематоэнцефалический барьер, который обеспечивает избирательную проницаемость веществ в церебральную ткань, объем церебральной крови приблизительно равен 4% от общего объема мозга [70].

При исследовании многослойной структуры головного мозга человека с прилежащими тканями в качестве модели черепа, был создан пластиковый макет из PLA-пластика (полилактид). Для управления концентрацией насыщенного кислородом гемоглобина (и влияния на степень оксигенации гемоглобина) был выбран способ подачи азота (N_2) в газообразном состоянии непосредственно в объем оптического фантома (рис. 3.12). По мере увеличения концентрации азота в теле оптического фантома, из оксигенированного гемоглобина происходило вытеснение кислорода, который выходил из проделанного в изолирующей пленке отверстия по трубке. Регулируя скорость потока газа, происходило изменение динамики протекания процесса деоксигинации оптического фантома. Излучающий световой поток волоконно-оптический кабель имел диаметр 4.2 мм, чтобы обеспечить плотность мощности, не превышающую порог безопасного воздействия. Шесть приемных оптических волокон (диаметром 200 мкм) были собраны в волоконный жгут с общим диаметром 1.8 мм.

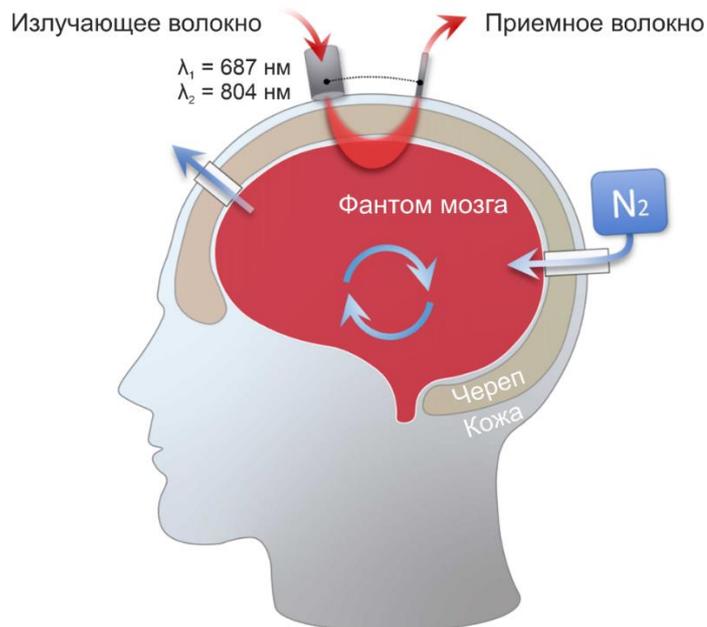


Рисунок 3.12 – Схематическое изображение модельной многослойной структуры и протекающих в ней процессов обмена.

Необходимо было принять во внимание отклонения от средних значений геометрических параметров макета, которые впоследствии проявят себя как индивидуальные особенности строения головы при исследовании реальной структуры головы человека. Утолщения стенки

череп, отличающиеся расстояние между костной стенкой и корой могут существенно повлиять на интерпретацию сигнала. Изначальная степень оксигенации во всем объеме оптического фантома составляла 98%.

Значения интенсивности сигналов регистрировались волоконно-оптическим спектрометром и записывались в автоматическом режиме. Лазерное излучение попадало на внешний слой объекта часть излучения, диффундируя вглубь через каждый слой структуры, поглощалось гемоглобином, диффузно-рассеянная часть сигнала регистрировалась приемным волокном. Полученные спектры диффузно-рассеянного лазерного излучения с длинами волн 804 нм и 687 нм, прошедшего через оптический фантом представлены на рис. 3.13. Регистрируемый сигнал при длине волны 804 нм, был взят в качестве калибровочного, исходя из оптических свойств окси- и дезоксигемоглобина – значение интенсивности поглощения, при применении монохроматического излучения с данной длиной волны, остается постоянным.

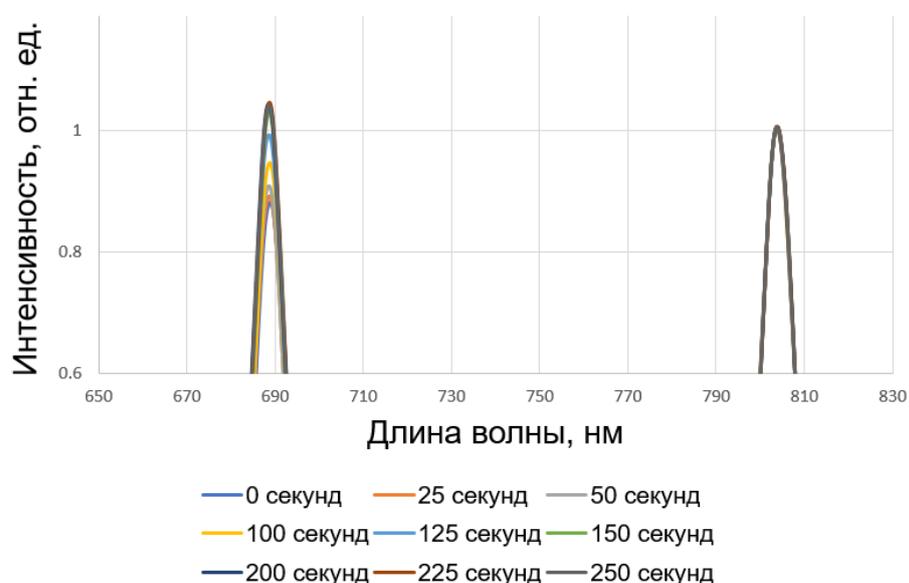


Рисунок 3.13 – Спектры Hb и HbO_2 модели головы человека, зарегистрированные при прохождении лазерного излучения через оптический фантом. Нормировка производилась на пик с длиной волны 804 нм.

После подбора оптимальных параметров было записано изменение сигнала с течением времени. По изменению соотношения между пиками регистрируемого сигнала формировалась временная зависимость, после производилась обработка данных и делался вывод о состоянии кровенаполненности ткани. На рис. 3.14 изображено изменение степени оксигенации многослойной структуры головы человека при деоксигенации азотом. В начале эксперимента степень оксигенации равнялась 98%, по истечении 30 минут – 71%, через час – 59%. Степень оксигенации в конце эксперимента *in vivo* установилась на значении 40%. Результат совпал с

данными, регистрируемыми с помощью метода определения степени оксигенации в видимом диапазоне, выбранном в качестве контрольного метода.

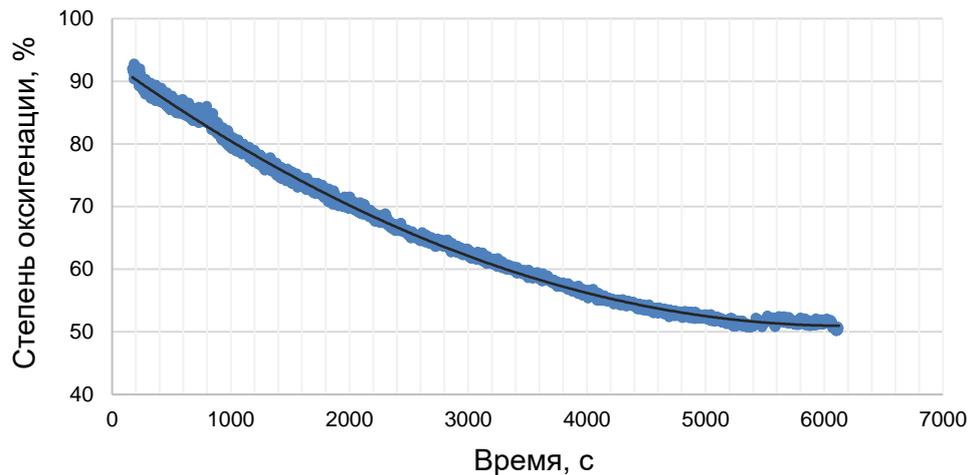


Рисунок 3.14 – Изменение степени оксигенации гемоглобина в крови, полученное по отношению значений интенсивности пиков поглощения окси- и дезоксигемоглобина с течением времени. В этом случае характерно постепенное снижение степени оксигенации на всем промежутке времени.

Для определения подходящих параметров мощности лазерного излучения, была измерена числовая апертура жгута, которая составляла $NA = 0.25$, плотность мощности излучения $P_s = 23 \pm 5$ мВт/см². Данное значение не превышает порог плотности мощности 200 – 300 мВт/см² для безопасного воздействия на ткань. Более высокие значения лазерного облучения не применялись из-за возможного воздействия на метаболизм тканей мозга при исследованиях мозга человека *in vivo*.

Эксперимент *in vivo* мозг мыши. Перед тем как перейти к исследованиям на живых организмах (мелких лабораторных животных – мышах) было проведен эксперимент с оптическим фантомом мозга мыши для определения энергетических параметров экспериментальной установки и подбора оптических волокон, подходящих для такого исследования. Способ контроля оксигенации схож со способом, используемом в предыдущем эксперименте (рис. 3.15).

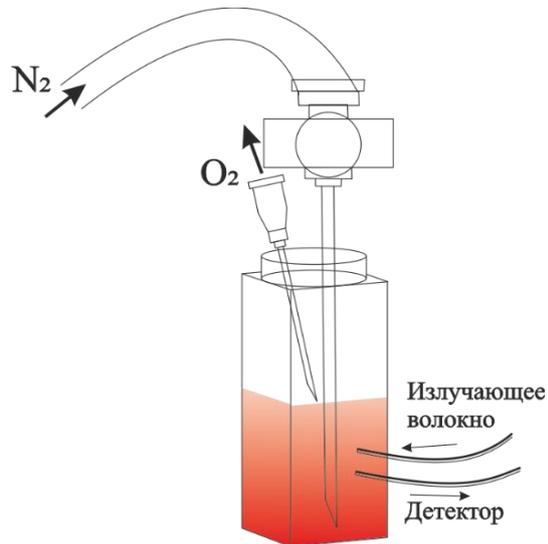


Рисунок 3.15 – Схема эксперимента по измерению оксигенации гемоглобина в оптическом фантоме, имитирующем оптические свойства мозга мыши.

По результатам эксперимента была составлена зависимость значений степени оксигенации от времени деоксигенации объекта (рис. 3.16). В начале эксперимента степень оксигенации равнялась 74%, по истечении 15 минут – 30%, спустя 250 минут – 5%. Неравномерность снижения степени оксигенации связана с процессом передачи кислорода подаваемым потоком газообразного азота в объем оптического фантома, а также со спецификой строения гемоглобина, в котором четыре молекулы кислорода удерживаются связями разной силы. В интервале до 2000 секунд наблюдается резкий спад, так как высвобождение первых двух молекул O_2 меняет структуру белка, что приводит к снижению прочности остальных связей между железом гемоглобина и оставшимися молекулами O_2 . Однако оставшиеся молекулы удерживаются гораздо крепче, переход гемоглобина в «напряженное» состояние обуславливает длительный и плавный спад до 15000 секунд. При этом на динамику также влияют температура и кислотность среды, повышение которых дополнительно ослабляет данные связи и ускоряет деоксигенацию.

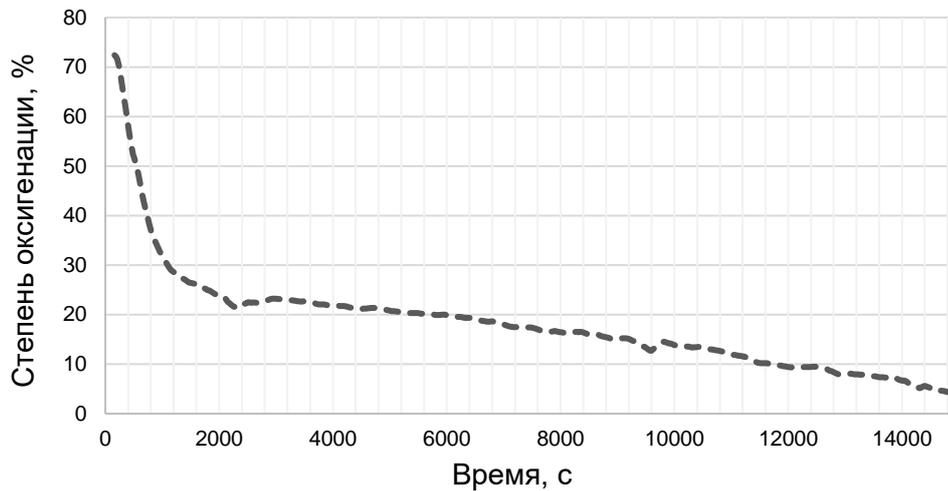


Рисунок 3.16 – Изменение степени оксигенации гемоглобина в крови, полученное по отношению значений интенсивности пиков поглощения окси- и дезоксигемоглобина с течением времени. Первым 30 минутам характерно быстрое снижение степени оксигенации, далее процесс происходил более медленно.

Для определения возможности измерить изменение значений гемодинамических параметров мозга при использовании данного способа, исследования проводились на лабораторных животных (мышях) *in vivo* (рис. 3.17). Для измерения были выбраны несколько расстояний 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). Вес мыши составлял 25 г.



Рисунок 3.17 – Изображение волокон при измерении оксигенации головного мозга мыши во время эксперимента.

Параметр экспозиции равнялся 100 мс, временной промежуток регистрации данных – 400 мс. С целью снижения степени оксигенации был выбран аналогичный способ подачи азота в

газообразном состоянии (кратковременное повышение концентрации азота в воздухе, вдыхаемом мышью). По мере быстрого увеличения концентрации азота в организме происходило вытеснение кислорода и увеличение восстановленного гемоглобина в тканях мозга мыши и наблюдалось изменение регистрируемого сигнала. Для поддержания оптимальных условий с целью безопасного процесса получения параметров, временной интервал каждого измерения был установлен в 15 минут, с учетом времени, когда измерения не проводились.

На рис. 3.18 продемонстрирована временная зависимость изменения степени оксигенации гемоглобина в мозге мыши *in vivo*, полученное по отношению площадей под кривой спектра каждого из пиков двух длин волн лазерного излучения. На 60-й секунде в дыхательную систему подавался газобразный азот N_2 . На 280-й секунде поток газа прекращался, наблюдался возврат к изначальному значению степени оксигенации. Видно, что при измерениях *in vivo* наблюдается схожий характер снижения концентрации гемоглобина, что и при измерениях на оптических фантомах. После прекращения подачи азота наблюдался быстрый возврат значений степени оксигенации гемоглобина к исходным значениям до процесса деоксигенации азотом, сопровождающийся эффектом гиперкомпенсации. Значение оксигенации превышало начальный уровень за счет резкого повышения чувствительности белка к кислороду, начальное взаимодействие с O_2 снимало структурное напряжение молекулы гемоглобина, провоцируя ускоренное заполнение оставшихся вакантных мест и обеспечивало высокую скорость насыщения гемоглобина кислородом.

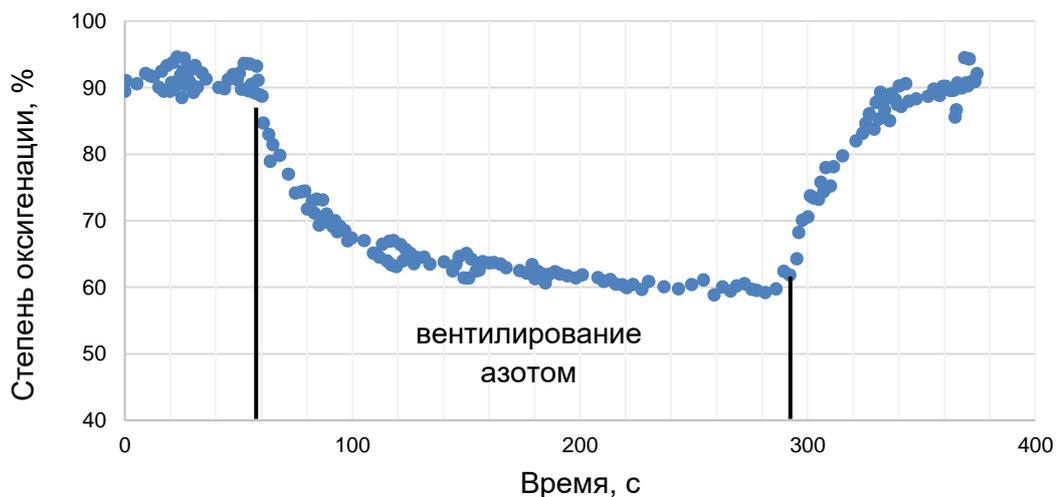


Рисунок 3.18 – Изменение степени оксигенации гемоглобина от времени в мозге мыши *in vivo* эксперименте с вентилированием азотом. После прекращения подачи газа степень оксигенации возвращалась к изначальному значению.

Различие по количеству затрачиваемого времени при проведении деоксигенации образца и живого объекта обусловлено тем, что эффективность пропускаемой способности легких выше, чем у оптического фантома, кислородный обмен в живом организме происходит быстрее. Из-за этого свойства добиться схожей скорости кислородного обмена не представлялось возможным.

Заключение к главе 3

Разработана диагностическая методика с подбором оптимальных параметров для компонентов установки на основе технологии БИК-спектроскопии. Данная технология позволяет проводить спектроскопическую диагностику оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном кровеносном русле головного мозга с поверхности головы человека неинвазивно, не нарушая целостности структуры биообъекта. Проведено численное моделирование и анализ распространения лазерного излучения на модели мозга человека с прилежащими тканями, имеющей многослойную структуру. В качестве объектов исследования были выбраны биологические ткани лабораторных мышей (мозг) *in vivo* и разработаны оптические фантомы, воспроизводящие спектрально-структурные свойства тканей головы мыши и человека. Для установления чувствительности всей системы в целом использовался референтный метод, основанный на измерении спектров обратного рассеяния в видимом диапазоне, погрешность метода составила 2.5%. Таким образом, полученные данные имеют достаточно хорошую корреляцию с классическими методами. Данный метод может быть использован для усовершенствования ряда методов исследования нейронной активности и микроциркуляции мозгового кровотока в таких областях, как нейрохирургия, неврология и психиатрия.

Глава 4. Разработка спектроскопической методики контроля лазерного воздействия на глубокозалегающие и труднодоступные опухоли и исследование времени жизни PpIX в средах с повышенным и низким содержанием кислорода

В данной главе представлены результаты исследований, полученных при разработке методики спектроскопического контроля лазерного воздействия на глубокозалегающие и труднодоступные опухоли с применением 5-АЛК индуцированного PpIX, включающий в себя использование моно-волоконной системы доставки лазерного излучения и получения флуоресцентного сигнала по одному волокну, на основе волокна с меньшим диаметром, чем стереотаксическая игла для хирургических операций. Данная разработка позволит уменьшить необходимый диаметр отверстия, используемого для доступа к опухоли и при интраоперационном применении, позволит уменьшить повреждение здоровых тканей на пути от поверхности головы до опухоли. Представлены результаты исследования влияния поглощения гемоглобина в крови на сигнал флуоресценции PpIX, а также исследовано изменение времени жизни PpIX в среде с повышенным и низким содержанием кислорода. Полученные в главе методики и разработанные системы доставки позволят использовать их в качестве инструментария для определения концентрации фотосенсибилизатора, накопленного в труднодоступной и глубокозалегающей опухоли и осуществлять контролируемое ФДТ в точке исследования.

4.1. Методика спектроскопического контроля лазерного воздействия на глубокозалегающие и труднодоступные опухоли головного мозга

При лечении опухолей головного мозга вероятность долгосрочного и положительного прогноза у пациента зависит от качества проведенной хирургической резекции. Глиомы высокой степени злокачественности имеют диффузный и инфильтративный характер роста клеток опухоли, что затрудняет осуществление полной резекции опухоли. Определение границ опухоли и областей остаточной флуоресценции, определяющих патологически измененную ткань, по накопленному ФС в тканях является основным фактором, определяющим качество хирургической резекции.

Достижение максимальной степени резекции во время операции затруднено из-за неточного определения инвазии опухоли при визуальном осмотре в условиях обычного освещения. Сравнивая полученные данные флуоресцентной навигации с использованием 5-АЛК индуцированного PpIX и интраоперационной навигации при белом свете, более чем у половины пациентов границы опухоли не совпадали [71, 72, 73]. Чтобы улучшить качество мониторинга и

ФДТ при лечении ложа послеоперационной опухоли, было проведено клиническое исследование с использованием двухканальной видеосистемы для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии вместо обычно используемого хирургического микроскопа [74].

Обычно для выполнения резекции под контролем флуоресценции используется хирургический микроскоп с возбуждением $\lambda_{\text{лазер}} = 405$ нм. Поскольку глубина проникновения света в ткань для этой длины составляет 2 – 3 мм, а глубина зондирования флуоресценции составляет 0.5 мм, такой выбор длины волны возбуждения не является оптимальным. Кроме того, при выполнении операции с использованием излучения с длиной волны в синем диапазоне спектра, поверхностный слой фотосенсибилизатора выгорает быстрее, чем при возбуждении красным светом. Длина волны возбуждающего излучения $\lambda_{\text{лазер}}$, использованного в видеосистеме, составило 635 нм, значения которого попадает в окно оптической прозрачности биологической ткани (625 – 950 нм). Глубина проникновения лазерного излучения с длиной волны $\lambda_{\text{лазер}} = 635$ нм в биологические ткани головы человека составляет 7 – 13.5 мм [75, 76].

Пример полученных изображений опухоли головного мозга с помощью данной двухканальной видеосистемы представлен на рис. 4.1. Для определения локализации и размеров остаточных участков с опухолевыми клетками после резекции проводили видео-флуоресцентную диагностику ложа опухоли. В результате диагностики были обнаружены две области остаточной флуоресценции диаметром $d_{\text{фл1}} = 50$ мм и $d_{\text{фл2}} = 40$ мм. Препарат 5-АЛК, индуцированный РrIX вводили пациенту перорально за 7 часов до начала флуоресцентной диагностики. Проведена ФДТ в двух областях ложа опухоли с дозами облучения 30 Дж/см². Время облучения первой области составило $t_{\text{обл.ч.}} = 20$ мин, второй области $t_{\text{обл.ч.}} = 6$ мин. После каждой фракции ФДТ выполняли флуоресцентную диагностику для оценки флуоресценции отдельных зон ложа опухоли. Индексы флуоресценции (IF) составили 33 и 24. После сеансов ФДТ значение IF снизились до 3 и 11.

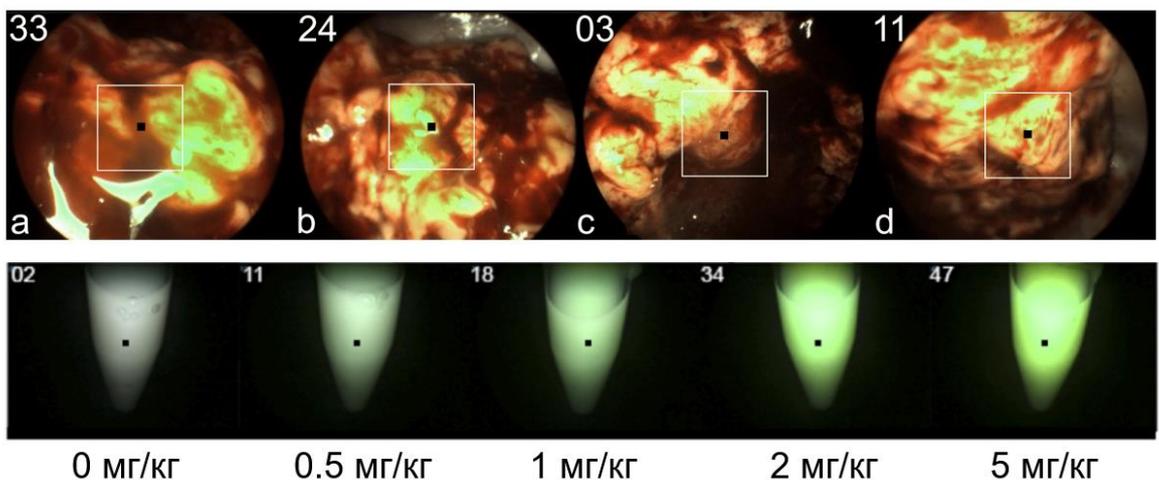


Рисунок 4.1 – Снимки флуоресцентных участков ткани головного мозга до ФДТ (а) и (б). Снимки флуоресцентных участков ткани головного мозга после ФДТ (с) и (д). Белым квадратом

отмечена зона наиболее интенсивной флуоресценции РрIX. В верхнем левом углу каждого снимка показаны индексы флуоресценции, рассчитанные в точках, где стоит черный маркер. Серия изображений испускаемой флуоресценции РрIX в эталонных образцах, сигнал флуоресценции выделен зеленым цветом и совпадал с реальным изображением.

Для определения концентрации РрIX в клетках опухоли по показателю флуоресценции, полученного со снимков, перед операцией проводили калибровку на эталонных образцах, в качестве которых выступали оптические фантомы опухоли головного мозга с концентрацией $C_{PpIX} = 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20$ мг/кг и концентрацией жировой эмульсии $C_{IL} = 1\%$, выбранной в качестве рассеивающей среды. В качестве метода контроля флуоресценции был выбран спектроскопический метод исследования. Данные образцы применялись в дальнейшем при стереотаксической флуоресцентной диагностике.

Иногда прямой доступ к опухоли не представляется возможным, например, если опухоль является глубокозалегающей и труднодоступной. В таком случае применяют стереотаксическую хирургию – минимально инвазивный метод, за счет прицельного воздействия на опухоль, уменьшая повреждение ближайших к опухоли здоровых тканей, позволяет уменьшить травму мозга и улучшить послеоперационное восстановление. Существует опыт применения стереотаксической хирургии совместно флуоресцентной диагностикой и ФДТ [77, 78].

Применимость данного метода определено встраиванием оптических волокон в хирургический инструмент, например стереотаксическую канюлю, которая доставляет свет к опухоли и позволяет определить центр, границы опухоли, а также проводить фотодинамическое воздействие в случае, когда хирургическое удаление не представляется возможным (рис. 4.2). Научные исследования продемонстрировали, что использование оптических волокон приводит к улучшению результатов за счет нацеливания на злокачественные клетки опухоли, минимизируя повреждение здоровых структур мозга [79, 80].

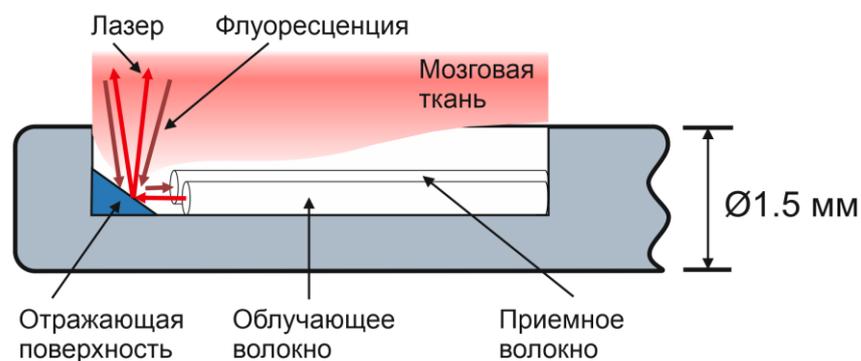


Рисунок 4.2 – Изображение диагностической канюли для стереотаксической биопсии опухоли головного мозга с непрерывным спектроскопическим контролем.

Разработанную диагностическую канюлю с одновременным спектроскопическим контролем для определения локализации труднодоступной опухоли и ее границ применяли в условиях хирургической операции на опухоли головного мозга. Перед исследованием проводили калибровку на свежеприготовленных оптических фантомах опухоли головного мозга с фотосенсибилизатором, регистрировали спектры флуоресценции РrIX. Соотношение сигнал/шум позволило определить концентрацию фотосенсибилизаторов в каждом из образцов по интенсивности испускаемой флуоресценции (рис. 4.3).

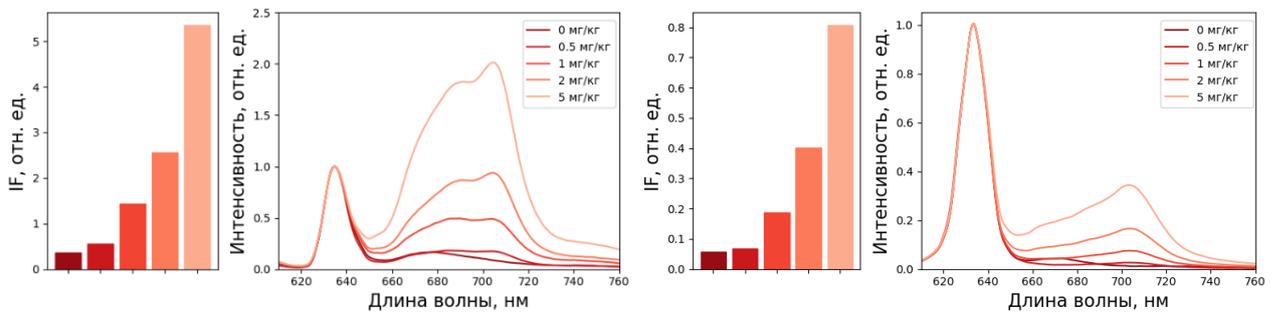


Рисунок 4.3 – Спектры флуоресценции оптических фантомов опухоли головного мозга с РrIX, полученные с помощью диагностической канюли, нормированные на лазерный сигнал. Каждый цвет спектра соответствует концентрации РrIX 0, 0.5, 1, 2, 5 мг/кг. Гистограммы отображают соотношение интенсивности флуоресценции ФС к интенсивности возбуждающего лазерного излучения, которое определяется индексом флуоресценции (IF). Лазерному пику соответствует длина волны $\lambda_{\text{лазер}} = 635$ нм, пику флуоресценции РrIX соответствует длина волны $\lambda_{\text{флуор.}} = 704$ нм. Увеличение интенсивности флуоресценции в спектрах соответствуют увеличению концентрации РrIX в оптических фантомах.

Ключевым этапом планирования стереотаксической ФДТ является интраоперационная флуоресцентная диагностика, направленная на выявление зон повышенного накопления фотосенсибилизатора для точного определения границ опухоли и ее центра. Спектры флуоресценции регистрировали волоконно-оптическим спектрометром с оптическим фильтром для уменьшения интенсивности лазерного излучения. Препарат 5-АЛК, индуцированный РrIX вводили пациенту перорально за 5 часов до начала флуоресцентной диагностики. Флуоресцентную диагностику проводили от самой глубокой части опухоли к поверхности головы. Шаг иглы между точками составил 5 мм (рис. 4.4). Каждый спектр записывали 5 раз, чтобы исключить возможную потерю сигнала из-за изменения расстояния между приемным окном и опухолевой тканью. Для фотодинамической терапии опухоль была разделена на 3 зоны: по обеим границам опухоли и в центре. Каждую зону облучали в 4-е фракции при положении с

поворотом иглы на 90 градусов. Время облучения одной фракции составило 6.5 минут. Для каждой зоны время облучения составило 26 минут.

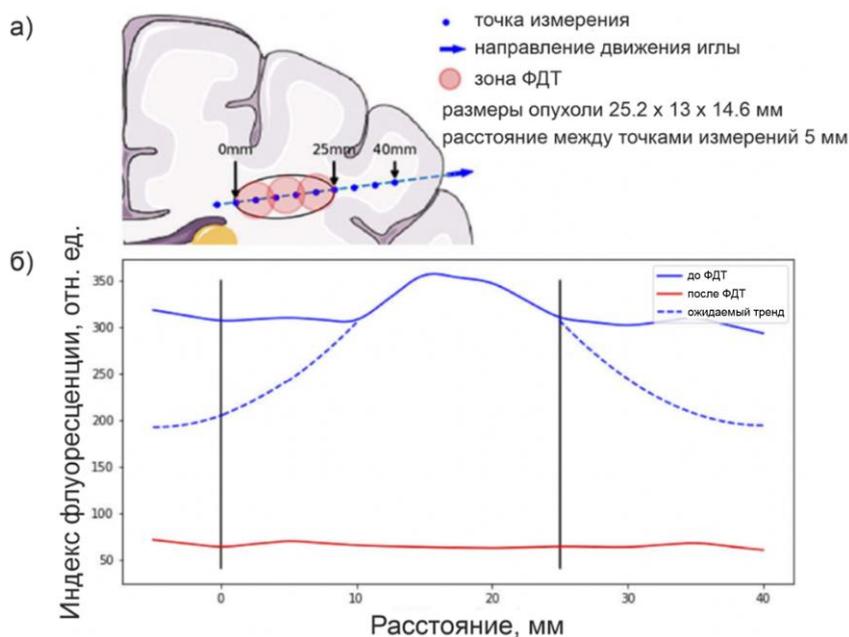


Рисунок 4.4 – а) Схематический рисунок локализации опухоли с отмеченной траекторией диагностической канюли. Шаг канюли между точками измерения 5 мм. Отправной точкой была выбрана граница опухоли с наиболее глубокой локализацией в головном мозге. б) Измерение индекса флуоресценции IF , полученные с помощью оптоволоконного спектрометра. Точка 0 мм – глубокозалегающая граница опухоли. Точка 40 мм – здоровая ткань.

По результатам стеретаксического исследования были выявлены отклонения регистрируемого сигнала от ожидаемого. При перемещении детектора относительно опухоли ожидаемый индекс флуоресценции IF за пределами опухоли должен соответствовать минимальному накоплению РрIX в силу особенностей метаболизма ФС. Из-за избирательности накопления РрIX максимальное накопление происходит в опухолевых клетках, в то время как в здоровых тканях накопление ФС минимально. По данным флуоресцентной диагностики показатель флуоресценции оставался высоким вне основной части опухоли. Возможные объяснения определены двумя причинами: в отеке вокруг опухоли также накапливался ФС; по мере продвижения к внешней границе опухоли окно приема сигнала закрывалось «биологическим веществом», в котором накапливался ФС, способствовавший регистрации сигнала. Окно приема было модифицировано для исключения второй причины впоследствии. Модификация исключала возможность проведения биопсии, поскольку биопсийное окно стало закрыто прозрачной трубкой. На рис. 4.5 представлены результаты микроскопического исследования биоптата опухоли мозга спустя 5 часов после перорального введения РрIX в процессе операции. По полученным спектрам заметно наличие РрIX в клетках биоптата до ФДТ.

В ходе исследования регистрировали спектры флуоресценции PpIX до и после ФДТ. После обработки спектров была составлена графическая зависимость показателя флуоресценции от положения иглы. Предрезекционный индекс флуоресценции IF составил 325, максимальное значение 350, что соответствует максимальному накоплению через 6 часов после введения ФС. Выгорание ФС оценивали интраоперационно по индексу флуоресценции IF , который был снижен на 80%, что свидетельствовало о фотобличинге ФС в результате фотодинамической терапии.

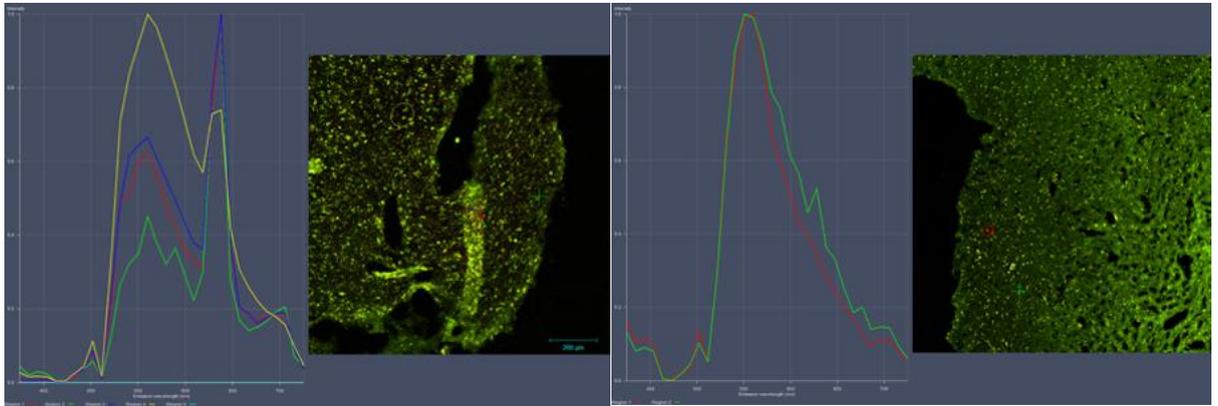


Рисунок 4.5 – Снимок образца биопсии до и после ФДТ, полученный с помощью исследования на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе. Интенсивность флуоресценции в диапазоне 636 нм и 704 нм соответствует максимумам флуоресценции PpIX, что сигнализирует о накоплении препарата в клетках опухоли.

4.2. Влияние поглощения гемоглобина в крови на интенсивность лазерно-индуцированной флуоресценции PpIX и лазерного сигнала при изменении оксигенации гемоглобина

Поскольку стеретакатическая канюля находится в контакте с кровью, поглощение вокруг области оптического волокна значительно влияет на распределение и интенсивность лазерного излучения, применяемого при ФДТ. Свет, проходя через волокно и попадая в ткань, проходит через жидкость с неоднородными оптическими свойствами, различным поглощением из-за присутствия крови. Кровь поглощает значительную часть светового спектра, особенно в видимом диапазоне около 635 нм, который часто используется для ФДТ с PpIX [81, 82].

При взаимодействии с гемоглобином лазерное излучение переживает акты рассеяния и поглощения. Дезоксигенированная кровь имеет более высокий коэффициент поглощения на определенных длинах волн, например, на длине волны $\lambda_{\text{лазер}} = 635$ нм ($\mu_a \text{Hb} = 4602 \text{ см}^{-1} \text{ моль}^{-1}$ и $\mu_a \text{HbO}_2 = 478 \text{ см}^{-1} \text{ моль}^{-1}$ для оксигенированной формы), что позволит предположить, что эффективность от ФДТ может быть снижена при нацеливании на области, богатые злокачественными клетками, где локальная перфузия крови угнетена и ФС выступает не

основным поглотителем [83, 84]. При лечении глиомы, используя стереотаксическую внутриопухолевую ФДТ в качестве метода терапии, научные публикации показывают, что данный подход обеспечивает уменьшение размера опухоли, одновременно управляя окружающим отеком [80, 85].

Более того, реакция мозга на ФДТ, характеризующаяся отеком и некрозом тканей при превышении допустимой дозы энергии, обуславливает потребность в прецизионном контроле дозы света, получаемой патологически измененной тканью [86, 87]. Также, пороги повреждения здоровых тканей мозга чувствительны к воздействию света, что требует учета как доставки света, так и контроля состояния окружающих тканей [83]. В зависимости от длительности фракции ФДТ, глубина проникновения света в мозговую ткань значительно варьируется, при этом измерения показывают глубину от 1 см до почти 5 см, в зависимости от факторов, таких как тип используемого оптического волокна и наличия крови [88].

Для оценки вклада поглощения образца с кровью и РrIX при лазерном излучении с длиной волны 635 нм был проведен эксперимент по измерению обратно-рассеянного лазерного излучения и флуоресценции РrIX в двух геометриях: на просвет и при расположении приемного и излучающего волокон с одной стороны (рис. 4.6).

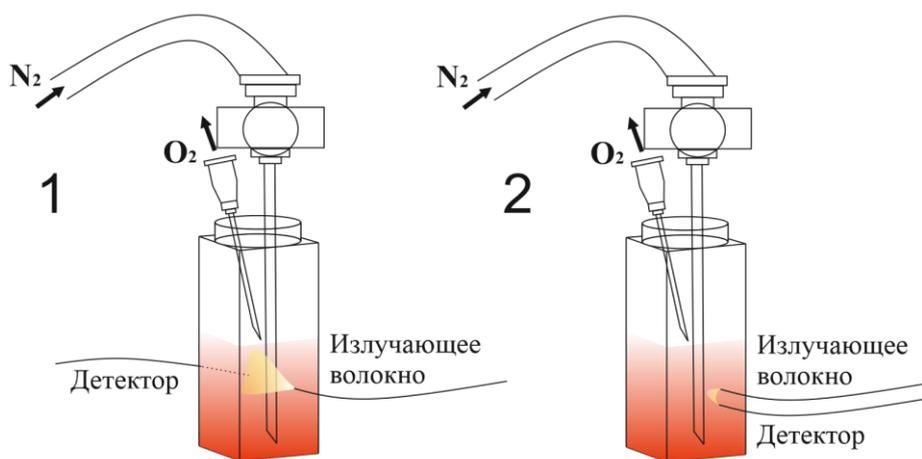


Рисунок 4.6 – Схема измерений обратного диффузного рассеяния и пропускания. Желтым выделена область миграции фотонов в геометрии диффузного отражения и диффузного пропускания.

Концентрация РrIX составила 5 мг/кг, что соответствует концентрации ФС, накопленной в опухоли глиобластомы при хирургической операции, и была получена в результате клинического исследования [74]. В качестве рассеивающей среды был выбран раствор интралипида в концентрации 1, 2%, оптические свойства которого соответствуют оптическим свойствам опухоли ГМ. В качестве поглощающей среды была выбрана эритроцитарная масса в

концентрации 2, 4, 8% от общего объема раствора. Для деоксигенации раствора был выбран способ подачи газообразного азота N_2 , аналогичный способ описан в предыдущей главе 3.

В результате эксперимента получены зависимости интенсивности флуоресценции, обратно-рассеянного лазерного излучения от времени деоксигенации и изменение степени оксигенации в процессе эксперимента (рис. 4.7).

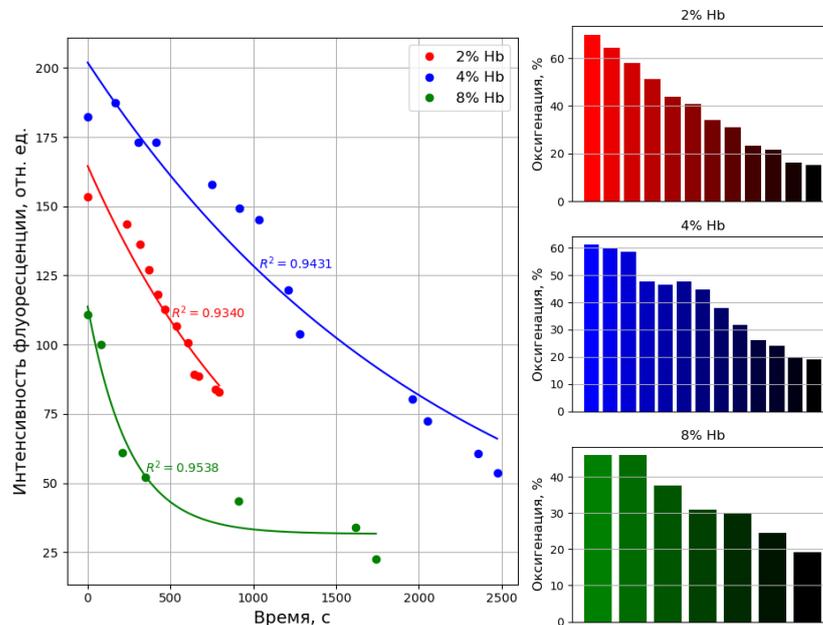


Рисунок 4.7 – Изменение интенсивности флуоресценции и оксигенации гемоглобина в процессе деоксигенации образцов. Отличия во времени деоксигенации объясняется различной величиной потока азота N_2 подаваемой в образец при попытках установить вентиль баллона в одинаковое положение между измерениями.

Полученные зависимости изменения интенсивности лазерно-индуцированной флуоресценции $PrIX$ в процессе деоксигенации образца были аппроксимированы экспериментальной функцией

$$IF_{PrIX}(t) = A \cdot e^{-B \cdot t} + const, \quad (4.1)$$

где IF_{PrIX} – интенсивность флуоресценции $PrIX$ каждого образца, A – коэффициент аппроксимации, B – скорость затухания флуоресценции в процессе деоксигенации, t – время процесса деоксигенации. Коэффициент B является обратной величиной времени t и зависит от параметров системы, таких как скорости удаления кислорода из системы и диффузии газообразного азота N_2 при поступлении в систему, изменений оптических свойств среды по мере перехода HbO_2 в восстановленную форму гемоглобина Hb .

Значения интенсивности измеряли на вершине пика флуоресценции при длине волны $\lambda = 704$ нм, что соответствует пику флуоресценции $PrIX$. На рис. 4.7, отражающем изменение

интенсивности флуоресценции РrIX во времени в процессе деоксигенации образца, заметно снижение величины интенсивности при снижении оксигенации гемоглобина в образце с течением времени. Это можно объяснить различием в значении коэффициента поглощения μ_a за счет перехода гемоглобина из окси-формы (при длине волны $\lambda_{704\text{нм}}$ $\mu_a\text{HbO}_2 = 298 \text{ см}^{-1} \text{ моль}^{-1}$) в дезоксигемоглобин (при длине волны $\lambda_{704\text{нм}}$ $\mu_a\text{Hb} = 1688 \text{ см}^{-1} \text{ моль}^{-1}$), различие составляет примерно в 5.6 раз.

Начальное значение оксигенации гемоглобина StO_2 соответствовало 70 – 45%, в конце эксперимента 15% (рис. 4.8). Поскольку положение волокон было выбрано «на просвет» при повышении концентрации *Hb* в образце происходило увеличение доли поглощения сигнала, другая часть светового излучения попадала в приемное волокно, что приводило к увеличению шумов в спектре затухания. Дальнейшее снижение степени оксигенации гемоглобина не проводилось во избежание разрушения эритроцитов и значительного увеличения времени эксперимента. С целью минимизирования ошибки измерения были выбраны границы аппроксимации спектра затухания $\lambda_{min} = 520 \text{ нм}$, $\lambda_{max} = 600 \text{ нм}$.

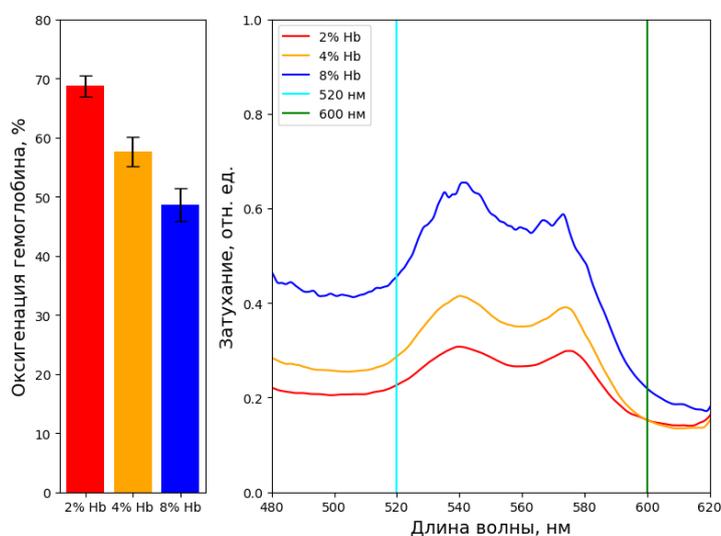


Рисунок 4.8 – Спектры затухания, полученные в эксперименте, при увеличении концентрации вклад шума вклад в сигнал увеличивается. Погрешность гистограмм определена как стандартное отклонение между 3-мя измерениями в одной точке.

При установке оптических волокон с одной стороны и малой концентрации крови в образце, заметно увеличивается сигнал флуоресценции с уменьшением оксигенации гемоглобина. Коэффициент поглощения гемоглобина на длине волны 632.8 нм слишком мал, чтобы оказать значительное влияние на сигнал ДО (рис. 4.9). Однако необходимо учитывать, что в оптических фантомах использовался практически полностью оксигенированный гемоглобин, в то время как с падением уровня оксигенации коэффициент поглощения гемоглобина изменяется. При такой

геометрии измерений влияние оптических свойств поглощения гемоглобина на лазерный сигнал и флуоресценцию ФС оказывается незначительным.

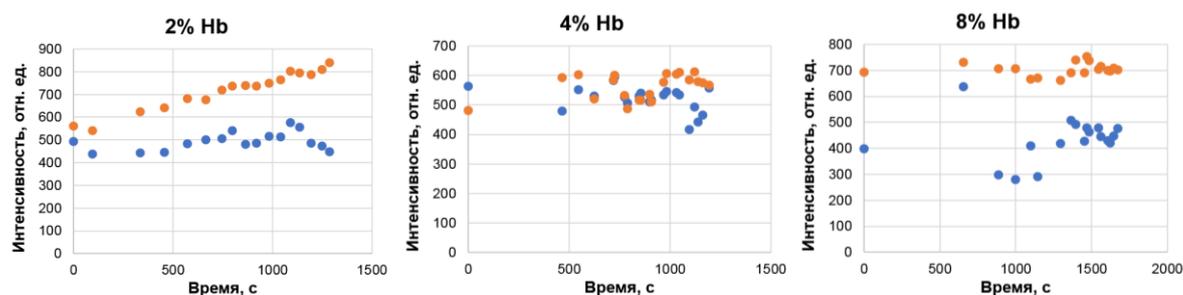


Рисунок 4.9 – Зависимость интенсивности лазерного сигнала и флуоресценции от изменения степени оксигенации в процессе вентилирования азотом.

4.3. Время жизни флуоресценции фотосенсибилизатора РrIX в опухоли головного мозга с повышенным и низким содержанием кислорода

Наличие кислорода является необходимым условием для фотодинамической терапии. Потребляющийся из клеток в биологической ткани, в частности в гемоглобине, в процессе фотодинамической реакции в тканях опухоли, при столкновении возбужденной молекулы РrIX и кислорода, энергия первого возбужденного триплетного состояния РrIX (T_1) передается основному триплетному состоянию (T_0) молекулярного кислорода, что приводит к образованию синглетного кислорода. Таким образом, наличие достаточного количества кислорода в микроокружении определяет эффективность фотодинамической реакции.

При лазерном возбуждении флуоресценции фотосенсибилизатора в условиях отсутствия или малого количества кислорода в окружении молекулы ФС наблюдается замедленная флуоресценция [89]. Фосфоресценция или замедленная флуоресценция – хорошо известные явления, которые могут возникать после лазерно-индуцированного возбуждения флуоресценции РrIX. Их время жизни отражает время жизни первого возбужденного триплетного состояния и поэтому обычно намного больше, чем время жизни мгновенной флуоресценции. Таким образом, поскольку присутствие кислорода влияет на время жизни триплетного состояния, фосфоресценцию и замедленную флуоресценцию можно использовать для количественного измерения кислорода [90].

Для контроля образца во время процесса деоксигенации было проведено измерение спектра экстинкции на спектрофотометре Hitachi U-3400. Образец содержал эритроцитарную массу и фотосенсибилизатор РrIX. Для измерений использовались миллиметровые кюветы, что позволило проводить измерения в приближении однократного рассеяния.

На рис. 4.10 приведены спектры поглощения до и после деоксигенации образца с концентрацией РrIX 10 мг/кг и 0.05% эритроцитарной массы. На спектре видно, что проведение деоксигенации раствора не повлияло на поглощающие свойства объекта. РrIX имеет пиковую длину волны поглощения (полоса Соре) в видимой области спектра, в диапазоне от 400 до 420 нм. Также спектр демонстрирует более слабые полосы поглощения в более длинноволновой области (Q-полосы).

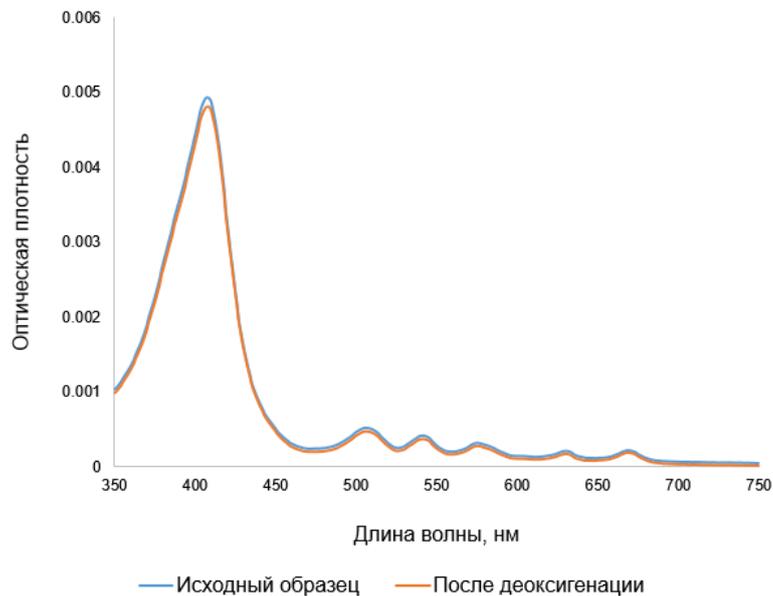


Рисунок 4.10 – Спектры поглощения до и после деоксигенации образца, содержащего РrIX и эритроцитарную массу.

При измерении кинетики флуоресценции РrIX на рис. 4.11 представлен спектр, полученный с использованием разработанной в лаборатории системы, основанной на стрик-камере Namamatsu. По вертикальной оси на графике представлено время в диапазоне от 0 до 20 наносекунд, что соответствует заданному временному интервалу $t_{исслед.}$, в котором происходит сбор данных с электронно-оптического преобразователя. Изображение формируется путем накопления фотонов, и каждая точка на графике представляет собой определенное количество собранных фотонов. Интенсивность спектров флуоресценции РrIX при обработке изображений развертки измерялась в области 660 – 720 нм и временном диапазоне от 0 до 20 нс, лазерного импульса в диапазоне 625 – 640 нм и временном диапазоне до 1 нс.

Цвет точек зависит от количества фотонов, собранных в данной точке. Цветовая палитра начинается с синего, постепенно переходя в светло-зеленый, затем в желтый, оранжевый, и после становится черной в области, где количество собранных фотонов максимально на данной диаграмме. Аппроксимация полученных данных кинетики снижения интенсивности флуоресценции от времени после возбуждающего импульса проводилась экспоненциальной

функцией вида:

$$I(t) = A_1 e^{-\frac{x}{\tau_1}} + A_2 e^{-\frac{x}{\tau_2}} + \dots, \quad (4.2)$$

где $A_1, A_2 \dots$ – амплитуды различных компонент времени жизни флуоресценции, прямо пропорциональные вкладу каждой из компонент, а $\tau_1, \tau_2 \dots$ – соответствующие показатели времени жизни, в данном эксперименте измеряющиеся в наносекундах.

Количество экспоненциальных компонент подбирается таким образом, чтобы величина редуцированного распределения «хи-квадрат» для кривой аппроксимации составила значение близкое к единице ($\chi^2 = 1$).

Величина χ^2 называется редуцированным распределением Пирсона,

$$\chi^2 = \frac{1}{V} \sum_i \frac{(M_i - C_i)^2}{M_i}, \quad (4.3)$$

где M_i – значение экспериментально исследуемой величины в i -ой точке, C_i – математически аппроксимированное значение исследуемой величины в i -ой точке, V – количество степеней свободы. Для идеально аппроксимированной кривой условием является $\chi^2 = 1$.

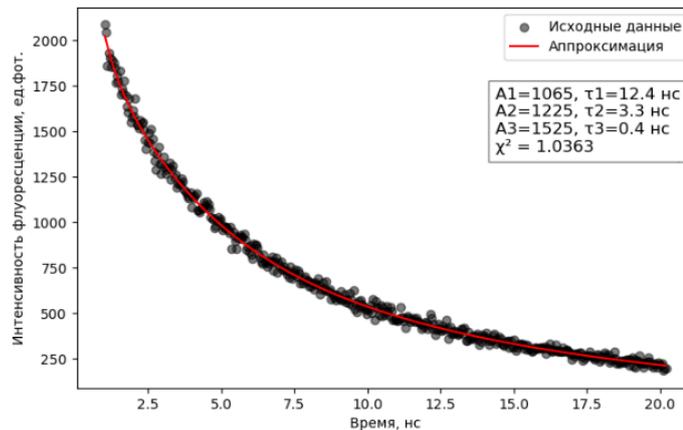
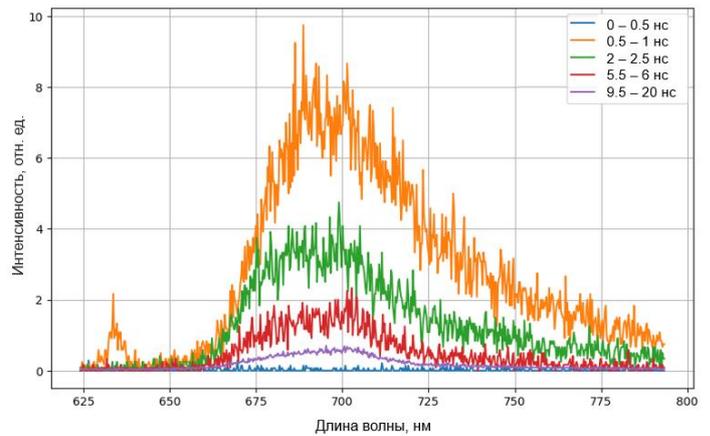
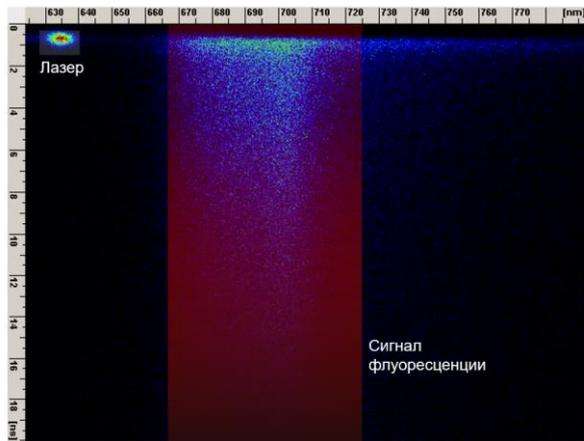


Рисунок 4.11 – Разрешенный по времени спектр флуоресценции образца с эритроцитарной массой 0.2% и РрIX 10 мг/кг.

Интенсивность при обработке изображений оценивалась как прямоугольная область для лазерной линии и как полоса в диапазоне длин волн 660 – 720 при анализе сигнала флуоресценции. Основной пик флуоресценции находится на длине волны 704 нм, форма спектра соответствует форме спектра флуоресценции РrIX. В области длин волн 625 – 635 нм находится пятно лазера, осуществляющее возбуждение флуоресценции. Интенсивность лазера уменьшена до минимального значения на входе в стрик-камеру с помощью оптического фильтра. Лазерный пик требуется для осуществления свёртки при компьютерной обработке спектра.

На рис. 4.11 (справа) приведены спектры флуоресценции, соответствующие нескольким временным диапазонам, образца с РrIX, сделанные за интервал времени: 0 – 0.5 нс, 0.5 – 1 нс, 2 – 2.5 нс, 5.5 – 6 нс, 9.5 – 20 нс с момента возбуждения. Проведя визуальный анализ данных заметно, что в спектре кинетики затухания флуоресценции присутствуют как минимум два времени жизни.

Первый пик флуоресценции, находящийся на длине волны 680 нм, является наиболее интенсивным для данного фотосенсибилизатора в диапазоне времени 0.5 – 1 нс. Видно, что флуоресценция на этой длине волны разгорается до максимальной интенсивности за время порядка 1 нс и полностью затухает за время, превышающее 20 нс с момента возбуждения.

В спектре кинетики флуоресценции присутствует второй максимум, находящийся на длине волны 704 нм. Разгорание флуоресценции этой компоненты происходит чуть дольше и к моменту времени 20 нс все еще активна. Пик флуоресценции на данной длине волны является характерным для фотосенсибилизатора. Заметно, что наибольший темп снижения интенсивности флуоресценции характерное для длин волн 680 нм.

Компьютерный анализ спектров кинетики затухания флуоресценции РrIX с концентрацией 10 мг/кг и наличием оксигенированного гемоглобина с показателем степени оксигенации $StO_2 = 90\%$ показал наличие двух компонент времени жизни: $\tau_1 = 1.2$ нс и $\tau_2 = 15.9$ нс, при такой аппроксимации $\chi_2 = 1.35$. Разница между полученным значением и идеально аппроксимированной кривой составила 35%, поэтому была выбрана трех экспоненциальная модель аппроксимации, которая позволила снизить значение $\chi_2 = 1.04$.

После деоксигенации раствора и проведенных измерений спустя 1 час заметно значительное снижение времени жизни флуоресценции (рис. 4.12). Флуоресцентный сигнал сосредоточен в диапазоне 660 – 720 нм, РrIX после деоксигенации являлся основным флуоресцентным агентом в биологическом образце. Интенсивность флуоресценции в начале измерений имеет высокое значение с четко определенным и постоянным сигналом. В конце эксперимента интенсивность флуоресценции значительно снизилась. Флуоресценция РrIX имеет резкое затухание быстрой компоненты сигнала, снижение медленной компоненты сигнала после 10 нс проявляется

медленнее. У образца после проведения процесса снижения оксигенации гемоглобина с временной разверткой до 20 нс заметно увеличение компонент времени жизни $\tau_1 = 0.5$ нс, $\tau_2 = 4.2$ нс и $\tau_3 = 17.9$ нс.

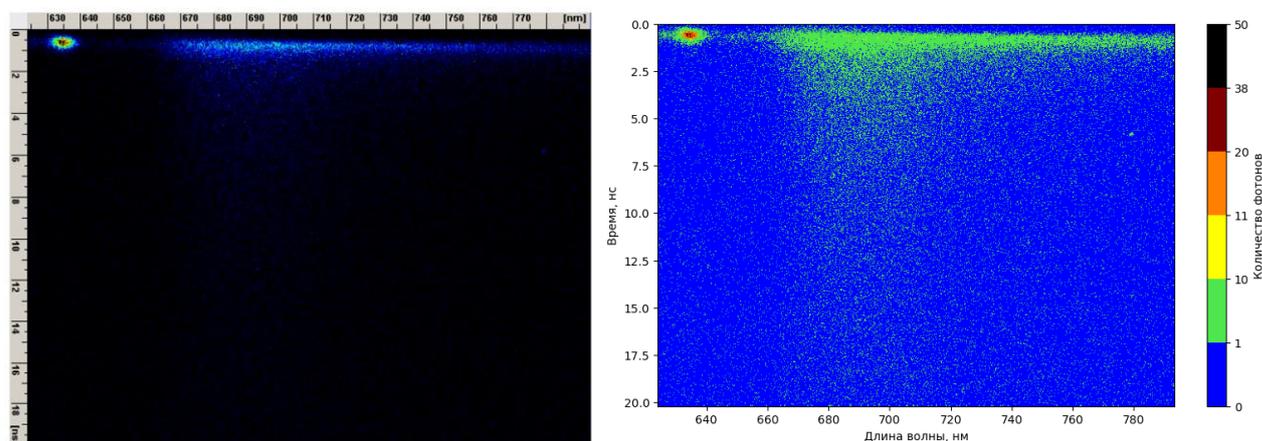


Рисунок 4.12 – Образец с содержанием ФС РрIX 10 мг/кг и сниженной оксигенацией гемоглобина StO_2 до 10% в результате процесса деоксигенации.

При увеличении концентрации РрIX до 20 мг/кг первое время жизни приходится на временной диапазон 2 – 2.5 нс (рис. 4.13). Разгорание второго пика флуоресценции происходит за время между 2.5 и 5 нс. Компьютерный анализ спектров кинетики затухания флуоресценции РрIX с концентрацией 20 мг/кг и значением оксигенации гемоглобина $<90\%$ показал наличие двух компонент времени жизни $\tau_1 = 2.2$ нс и $\tau_2 = 10.3$ нс. При такой аппроксимации величина редуцированного распределения «хи-квadrat» составила $\chi_2 = 0.98$.

Вклад короткоживущего компонента указывает на очень быстрое гашение флуоресценции, что может быть связано с агрегацией РрIX или внутренним самогашением при высокой концентрации. Такое поведение характерно эффекту «гашения» флуоресценции при повышении концентрации красителя. У РрIX наблюдается склонность к агрегации, что приводит к немедленной дезактивации возбужденного состояния.

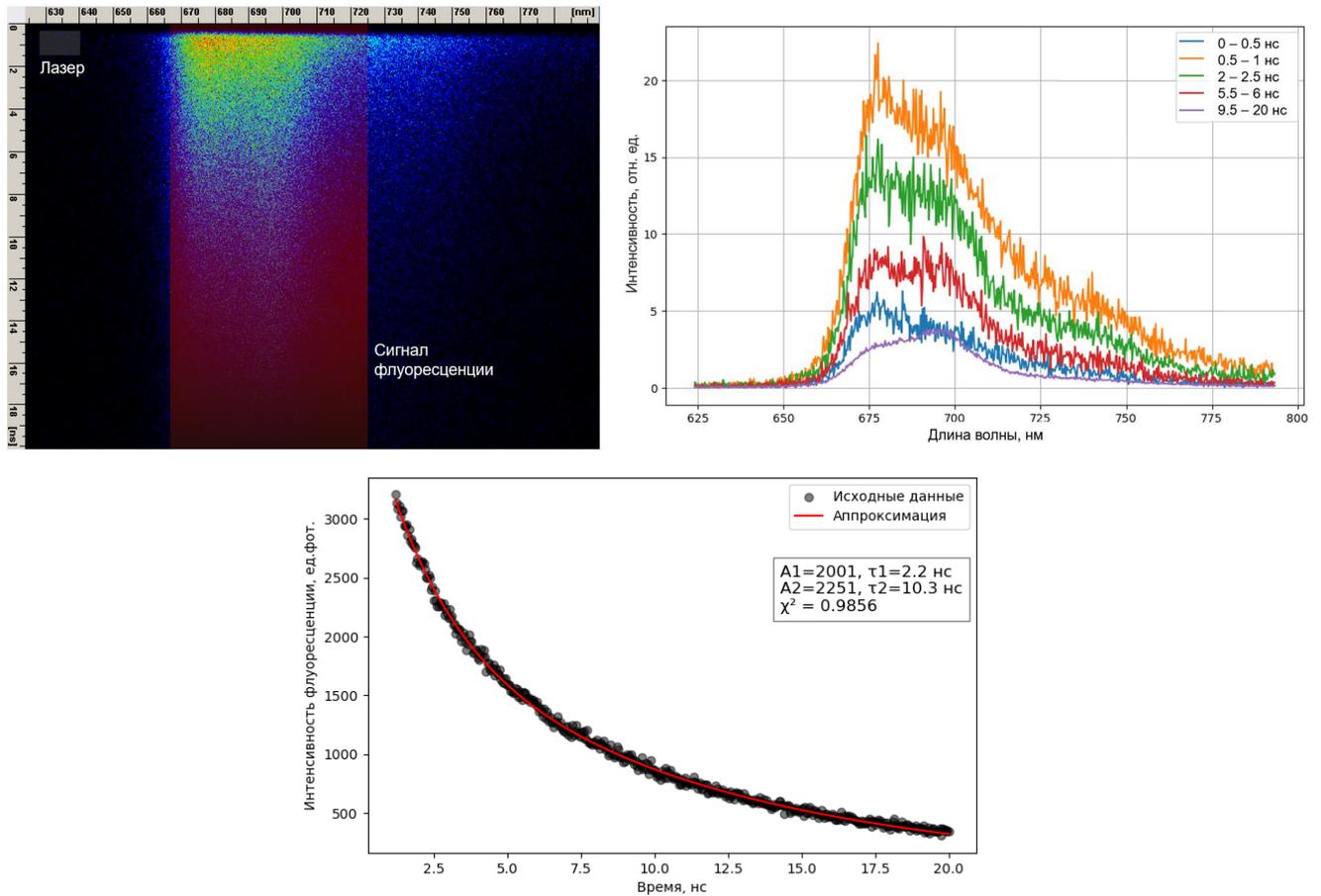


Рисунок 4.13 – Разрешенный по времени спектр флуоресценции образца с эритроцитарной массой 0.2% и PrIX 20 мг/кг.

На рис. 4.14 представлены время-разрешенные данные после деоксигенации образца до значения степени оксигенации гемоглобина 20%. В данном случае образец с высокой концентрацией кислорода обладает быстрым затуханием до 6 – 8 нс. В свою очередь образец с низкой концентрацией кислорода обладает выраженным медленным временем жизни до 10 – 12 нс. Ширина спектра после деоксигенации более узкая, лазерный пик выражен больше. Максимум спектрального распределения остается около 690 нм, что соответствует PrIX. После деоксигенации интегральная интенсивность флуоресценции затухает медленнее, чем у образца с высоким содержанием кислорода. При аппроксимации определено две компоненты времени жизни $\tau_1 = 3.6$ нс и $\tau_2 = 13$ нс, величина редуцированного распределения «хи-квadrat» составила $\chi^2 = 0.99$.

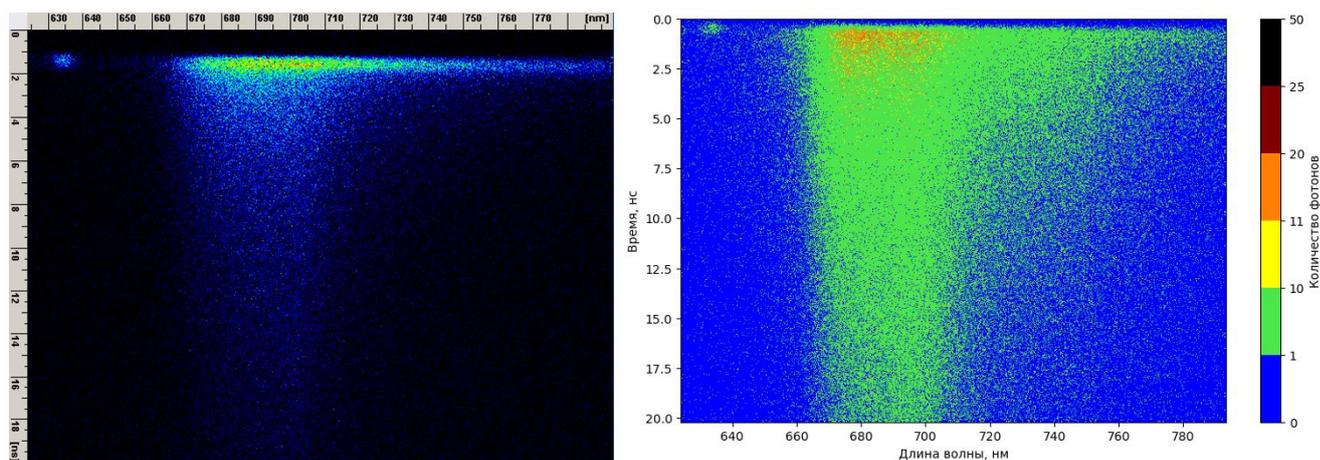


Рисунок 4.14 – Образец с содержанием PrIX 20 мг/кг и кровью 0.2%. Степень оксигенации гемоглобина $StO_2 = 20\%$ в конце процесса деоксигенации раствора.

При рассмотрении перехода от быстрой флуоресценции к замедленной был расширен диапазон временного измерения до 100 нс. Быстрая флуоресценция PrIX обычно измеряется в течение первых 0 – 40 нс после возбуждения, поскольку синглетное состояние имеет короткое время жизни (~16 нс). После данного временного периода начинает проявляться задержанная флуоресценция, которая возникает из более долгоживущих возбужденных состояний. Диапазон между 40 – 100 нс может содержать тонкие изменения в сигнале замедленной флуоресценции, определяющие начало механизмов задержанной флуоресценции, поскольку в этом диапазоне вклад быстрой компоненты флуоресценции в основном затухает (порядка 90% фотонов испускаются к этому времени), происходит переход к началу замедленной флуоресценции.

На рис. 4.15 представлено изменение интегральной интенсивности в диапазоне спектра 670 – 710 нм с временной границей 100 нс. Заметно что величина интегральной интенсивности сигнала увеличилась, затухание сигнала выражено более резко в диапазоне быстрой компоненты флуоресценции. При аппроксимации значение компонент времени жизни $\tau_1 = 4.7$ нс, $\tau_2 = 81.1$ нс для образца, прошедшего процесс деоксигенации и $\tau_1 = 3.7$ нс, $\tau_2 = 79.5$ нс для исходного образца.

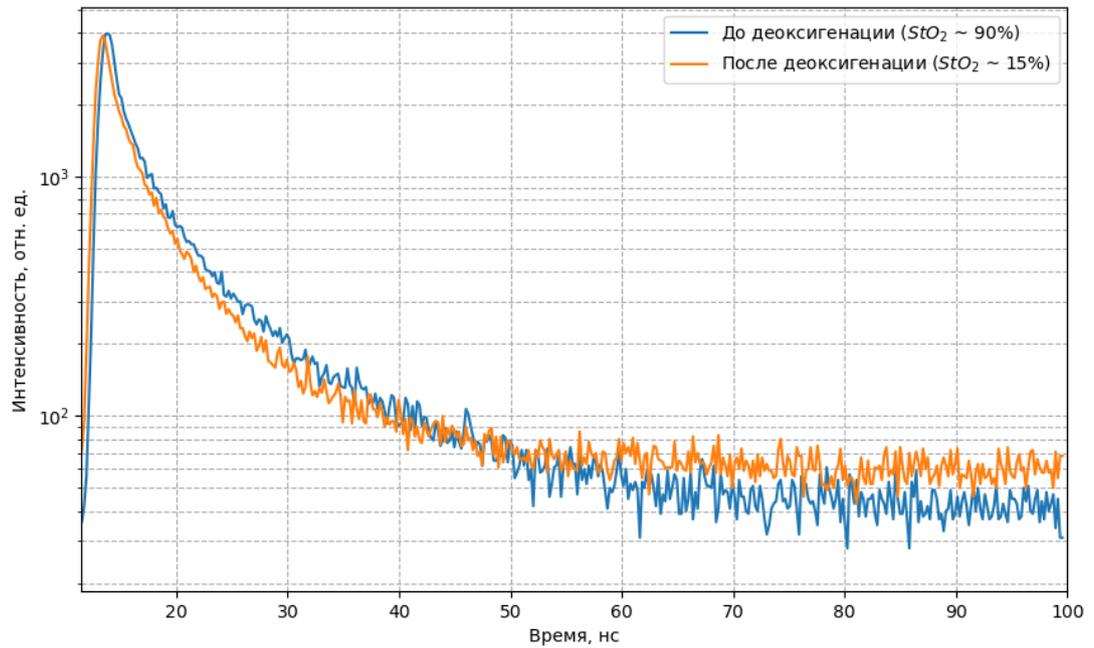


Рисунок 4.15 – Изменение значения интегральной интенсивности флуоресценции образца с концентрацией РrIX 20 мг/кг, кровью 0.2%.

Полученные результаты кинетики времени жизни флуоресценции фотосенсибилизатора РrIX в концентрации 10, 20 мг/кг в образце с кровью представлены в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – время жизни флуоресценции РrIX в концентрации 10, 20 мг/кг в оптическом фантоме при степени оксигенации гемоглобина 90% и 10%.

Образец	Время жизни, τ_i , нс		Распределение фотонов по τ_i , %	Число фотонов пришедших за время t
	$StO_2 > 90\%$	$StO_2 < 10\%$		
РrIX 10 мг/кг	$\tau_1 = 0.4$	$\tau_1 = 0.5$	43	3815
	$\tau_2 = 3.3$	$\tau_2 = 4.2$	30	
	$\tau_3 = 12.4$	$\tau_3 = 17.9$	27	
РrIX 20 мг/кг	$\tau_1 = 2.2$	$\tau_1 = 3.6$	47	4252
	$\tau_2 = 10.3$	$\tau_2 = 13$	53	
РrIX 20 мг/кг (100 нс)	$\tau_1 = 3.7$	$\tau_1 = 4.7$	98	81776
	$\tau_2 = 79.5$	$\tau_2 = 81.1$	1.3	

Результаты исследования показывают, что при снижении показателя оксигенации гемоглобина в биологическом объекте, содержащим фотосенсибилизатор РrIX, время жизни флуоресценции увеличивается. На основе полученных данных можно сделать вывод о том, что при наличии крови вблизи волокна, богатой эритроцитами насыщенными дезоксигенированным гемоглобином, существует вероятность снижения эффективности ФДТ за счет поглощения части

сигнала лазерного излучения кровью, что ведет к снижению дозы энергии, полученной тканью, а также запуска процессов передачи энергии, связанных с замедленной флуоресценцией, несущих информацию о наличии кислорода в области воздействия.

4.4. Моно-волоконная система доставки и регистрирования лазерного излучения и флуоресценции для определения концентрации фотосенсибилизатора РrIX, спектроскопической диагностики и эндоскопического контроля ФДТ труднодоступных и глубокозалегающих опухолей

Спектрально-флуоресцентный анализ накопления ФС в труднодоступной опухоли и контроль выгорания РrIX во время процесса ФДТ осложнен тем, что доступ к опухоли осуществляется через отверстие малого диаметра. Таким образом существует ограничение размеров диаметра волокна, доступного к применению. Уменьшение диаметра влечет за собой наличие ряда факторов, ограничивающих проведение флуоресцентной диагностики и ФДТ, например, снижение предельной передаваемой мощности излучения, кратное повышение плотности мощности на излучающем торце волокна из-за уменьшения площади излучающей поверхности, превышающее предел безопасной для биологической ткани величины плотности мощности. Необходимость использовать более прецизионные оптические системы для ввода лазерного излучения в световод влечет за собой увеличение размеров системы доставки и удорожание применяемой установки.

Решение, при котором система доставки лазерного излучения с приемным и излучающим волокнами заменяется на одно волокно представляется выгодным для исключения факторов, влияющих на качество сигнала. Также использование одного волокна в качестве приемного и излучающего позволит передавать лазерное излучение к биологическому объекту с мощностью достаточной для ФДТ, и получать лазерно-индуцированную флуоресценцию флуоресцирующего агента непосредственно в точке проведения, что позволит использовать одну установку для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии.

Для проведения фотодинамической терапии с одновременным определением локализации опухоли по накоплению фотосенсибилизатора в ткани и осуществлению передачи и получения лазерного и флуоресцентного излучения по одному волокну была разработана моно-волоконная система доставки лазерного излучения с применением тонких волокон, в качестве которых могут использоваться микроструктурированные волокна с высокой числовой апертурой. В лаборатории лазерной биоспектроскопии ИОФ РАН подобрана комбинация оптических фильтров, состоящая из цветных стеклянных фильтров, которая подавляла лазерный сигнал и позволяла одновременно

регистрировать диффузно рассеянное лазерное излучение и сигнал флуоресценции РrIX в дальнем красном диапазоне длин волн 660 – 720 нм.

Экспериментальная установка (рис. 4.16) состояла из одного оптического волокна, светоделительного блока, оптических фильтров и CCD-камеры для регистрации флуоресцентного сигнала. Светоделительный блок использовали для разделения света от лазерного источника излучения к волокну для передачи излучения к биологическому объекту и передачи лазерно-индуцированной флуоресценции фотосенсибилизатора к CCD-камере для регистрации сигнала. Для передачи лазерного излучения и получения флуоресцентного сигнала от биологического объекта с ФС использовали одно оптическое волокно с диаметром $d = 600$ мкм и торцевым направлением распространения лазерного излучения. Сигнал флуоресценции зависел от положения оптического волокна относительно источника флуоресценции.

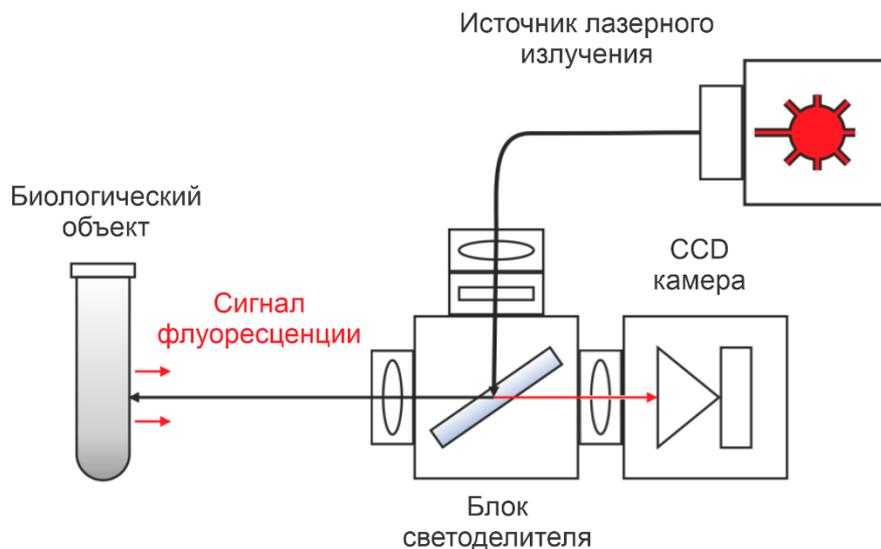


Рисунок 4.16 – Схема моно-волоконной системы доставки лазерного излучения. Длина волны используемого лазерного источника излучения равна $\lambda = 635$ нм. Линза перед CCD-камерой используется для увеличения интенсивности светового пятна после фокусировки на матрице.

Оценка интенсивности флуоресценции проводилась по параметру среднего серого полученного сигнала, при расчете использовали 2 участка яркости – участок светового пятна и темный участок изображения, уровень яркости которого принимался как шум.

$$G_{\text{чист}} = G_{\text{фл}} - G_{\text{шум}}, \quad (4.4)$$

где $G_{\text{фл}}$ – среднее значение яркости пикселей в выбранной области изображения с сигналом флуоресценции, $G_{\text{шум}}$ – значение уровня яркости вне области интереса.

Лазерный источник излучения имел длину волны $\lambda_{\text{лазер}} = 635$ нм, что соответствует значению длины волны пика поглощения PrIX. Для фильтрации лазерного излучения использовали интерференционный фильтр. Для разделения лазерного излучения и флуоресцентного сигнала использовали дихроический светоделительный фильтр, имеющий перегиб при длине волны $\lambda = 652$ нм. Зависимость оптической плотности от длины волны для используемых фильтров представлена на рис. 4.17.

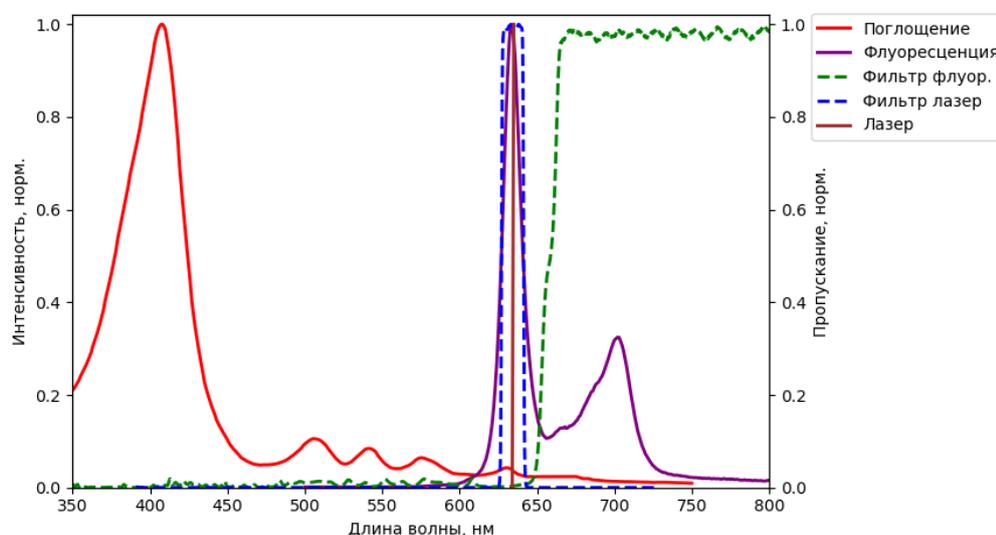


Рисунок 4.17 – Нормированные спектры поглощения (красный цвет) и флуоресценции (фиолетовый цвет) PrIX при возбуждении лазером с длиной волны $\lambda = 635$ нм. Спектры пропускания фильтров для лазера (синий цвет) и для флуоресценции (зеленый цвет) отображены пунктиром.

В качестве объектов исследования в экспериментах использовали оптические фантомы опухоли головного мозга с PrIX в концентрациях 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 мг/кг. Образец содержал рассеивающую среду (1% интралипид МЛТ/ЛСТ), итоговые растворы разделены по пробиркам. Исследование проводили совместно с образцами, содержащими Себ, с целью дальнейшего применения с накопленными двумя фотосенсибилизаторами в биологическом объекте. На рис. 4.18 представлены изображения, полученные CCD-камерой с помощью моноволоконной системы доставки. Участку 1 соответствует область, в которой рассчитывается среднее значение яркости пикселей $G_{\text{фл}}$, участку 2 соответствует область со значением уровня яркости $G_{\text{шум}}$ вне области интереса.

Применение двух ФС для навигации и ФДТ в хирургических операциях на опухолях ГМ является фактором, позволяющим улучшить качество диагностики наличия опухолевых клеток по распределению фотосенсибилизатора в биологической ткани за счет различного механизма

накопления в органнелах клеток и иметь возможность воздействовать на те опухолевые клетки, в которых накопление одного из ФС оказалось минимальным.

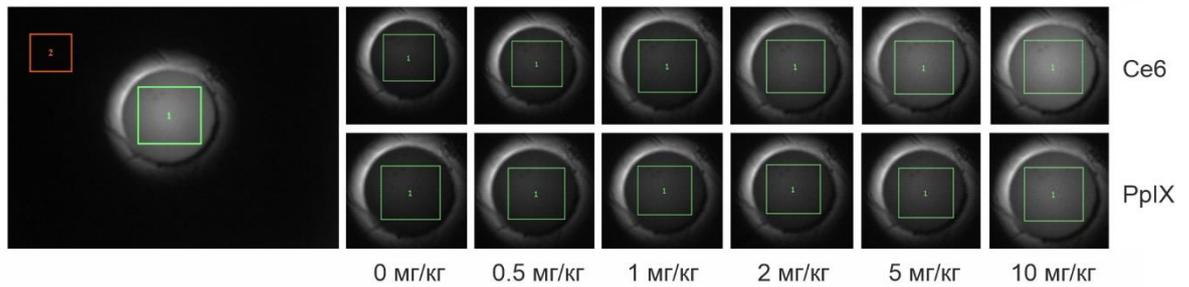


Рисунок 4.18 – Изображения полученные CCD-камерой с помощью моно-волоконной системы доставки. Каждому снимку соответствует концентрация фотосенсибилизатора указанная снизу.

В таблице 4.2 приведены значения $G_{чист}$ среднего уровня серого для каждого из оптических фантомов. Образец 0 мг/кг (без ФС) использовали в качестве контроля, значение среднего уровня серого определяет минимальное значение яркости с обратно-рассеянным лазерным излучением. Оба фотосенсибилизатора демонстрируют линейную зависимость интенсивности флуоресценции от роста концентрации. При высоких концентрациях определяется дифференцирование сигнала по уровню яркости среднего серого $G_{чист}$. По полученным результатам построены калибровочные кривые для оценки соотношения сигнал/шум (рис. 4.19).

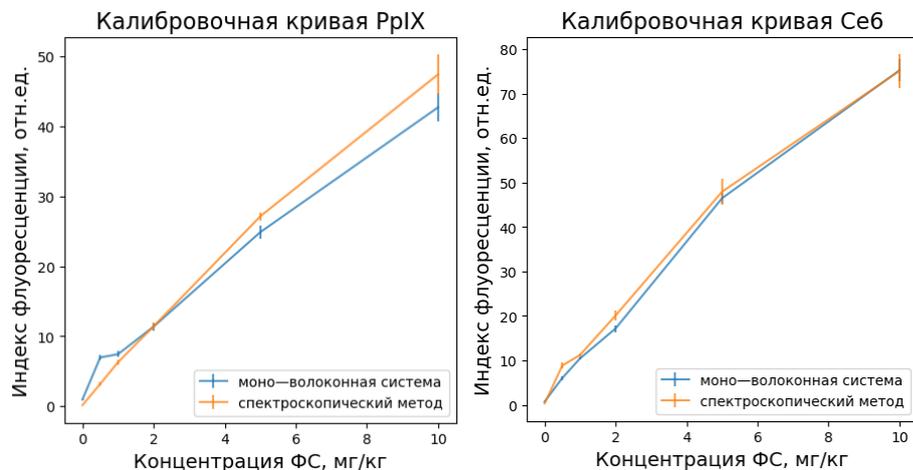


Рисунок 4.19 – Калибровочные кривые разработанной моно-волоконной системы доставки на основе данных, полученные с помощью CCD-камеры.

В качестве эталонного метода определения флуоресценции ФС был выбран спектроскопический метод исследования с использованием оптического-волоконного спектрометра. Значения $G_{чист}$ были приведены к одному масштабу с индексом флуоресценции IF .

Оба метода показывают увеличение интенсивности флуоресценции с увеличением сигнала. Спектрокопический метод предоставляет более высокие индексы флуоресценции для высоких концентраций ФС в образце. Калибровочные кривые для РрIX и Себ демонстрируют линейные зависимости между концентрацией ФС и индексом флуоресценции, что позволяет проводить количественные измерения этих фотосенсибилизаторов. Использование моно-волоконной системы доставки и анализ концентрации РрIX по уровню яркости среднего серого вносит нелинейность при низких концентрациях ФС.

Таблица 4.2 – Значение уровня среднего серого $G_{уст}$ для оптических фантомов опухоли ГМ, содержащих фотосенсибилизаторы РрIX и Себ в различных концентрациях.

Концентрация ФС	РрIX	Себ
0 мг/кг	34.95	33.73
0.5 мг/кг	40.96	39.06
1 мг/кг	41.43	43.46
2 мг/кг	44.37	51.18
5 мг/кг	57.87	80.46
10 мг/кг	75.72	109.23

С целью увеличения чувствительности системы доставки лазерного излучения при малых концентрациях ФС за счет снижения площади анализируемого лазерного пучка был применен оптический волоконный спектрометр с оптическим фильтром, которым была заменена CCD-камера.

Экспериментальная установка (рис. 4.20) была аналогична предыдущей и состояла из лазерного источника света с длиной волны 635 нм, светоделительного блока, спектрометра для регистрирования спектров флуоресценции, оптических фильтров и оптических волокон. Одно волокно для передачи лазерного излучения и приема флуоресцентного сигнала, второе для передачи оптического излучения от светоделительного блока к спектрометру. За счет прикрепления коллимирующей линзы удалось добиться большей фокусировки флуоресцентного излучения и как следствие увеличить полезный сигнал при увеличении соотношения сигнал-шум.

Моно-волоконная система доставки лазерного излучения работает следующим образом. К биологической ткани с накопленным фотосенсибилизатором 1 подводят дистальный конец световода. Из лазерного источника света 2 поступает лазерное излучение через оптическое волокно для доставки лазерного излучения, входной порт светоделительного блока и оптический фильтр попадает в светоделительный блок 3, проходя через дихроичный оптический фильтр и отражаясь под углом 45° лазерное излучение попадает через порт светоделительного блока в световод. Сигнал флуоресценции фотосенсибилизатора, накопленного в биологическом объекте, возбуждаемой излучением лазерного источника света 2 собирают в входной порт светоделительного блока. Излучение поступает в светоделительный блок, проходит через дихроичный оптический фильтр и коллиматор, фокусируется на торце оптического волокна для доставки сигнала флуоресценции РrIX, и, проходя через световод, попадает в спектрометр 4 для регистрирования спектров флуоресценции.

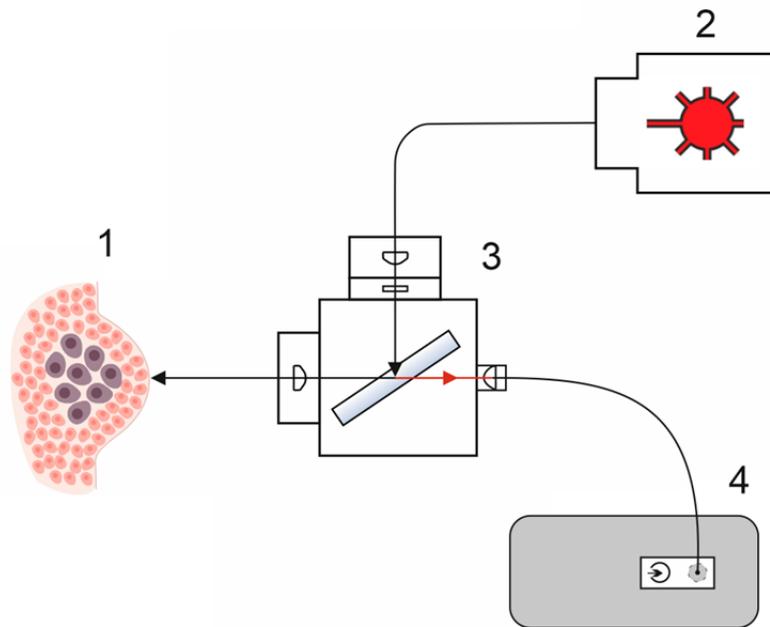


Рисунок 4.20 – Моно-волоконная система доставки лазерного излучения и флуоресценции фотосенсибилизатора, накопленного в биологическом образце, с возможностью получения данных в спектральном виде. 1) биологический объект, 2) источник лазерного излучения с длиной волны $\lambda = 635$ нм, 3) светоделительный блок, 4) оптико-волоконный спектрометр.

В результате эксперимента с оптическими фантомами опухоли головного мозга с РrIX в различных концентрациях были построены калибровочные кривые (рис. 4.21), интенсивность флуоресценции оценивали по индексу флуоресценции IF – отношению между интенсивностями пика флуоресценции фотосенсибилизатора к лазерному излучению. Диапазон длин волн флуоресценции был выбран 650 – 710 нм, характерный РrIX пик определяли на длине волны 704

нм. Спектроскопию проводили с использованием светоделителя и без него. Параметры экспозиции были выбраны 250 и 1000 мс.

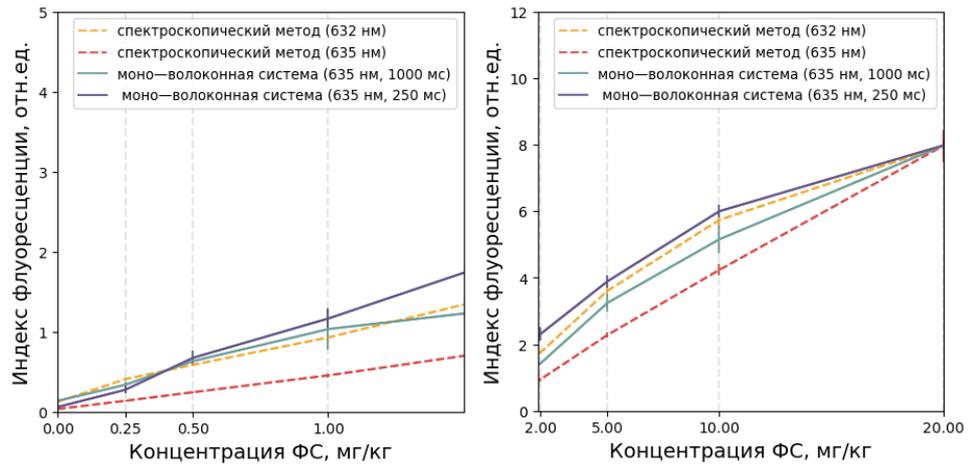


Рисунок 4.21 – Калибровочные кривые разработанной моно-волоконной системы доставки и полученных при спектроскопической диагностике на оптическом фантоме опухоли головного мозга, содержащего фотосенсибилизатор PpIX.

Определено два рабочих режима данной системы, на рис. 4.22 представлены спектры флуоресценции PpIX. В первом режиме обратно-рассеянный сигнал лазера был значительно снижен, определение индекса флуоресценции IF проводили по половине пика лазера. Спектр имеет характерный PpIX пик при длине волны $\lambda_{флуор} = 704$ нм, пик при длине волны $\lambda_{возб.} = 635$ нм соответствует пику обратно-рассеянного лазерного излучения. Индексы флуоресценции имеют линейную зависимость, что при данных параметрах системы позволяет различить концентрации фотосенсибилизатора PpIX в концентрациях от 0.25 до 20 мг/кг.

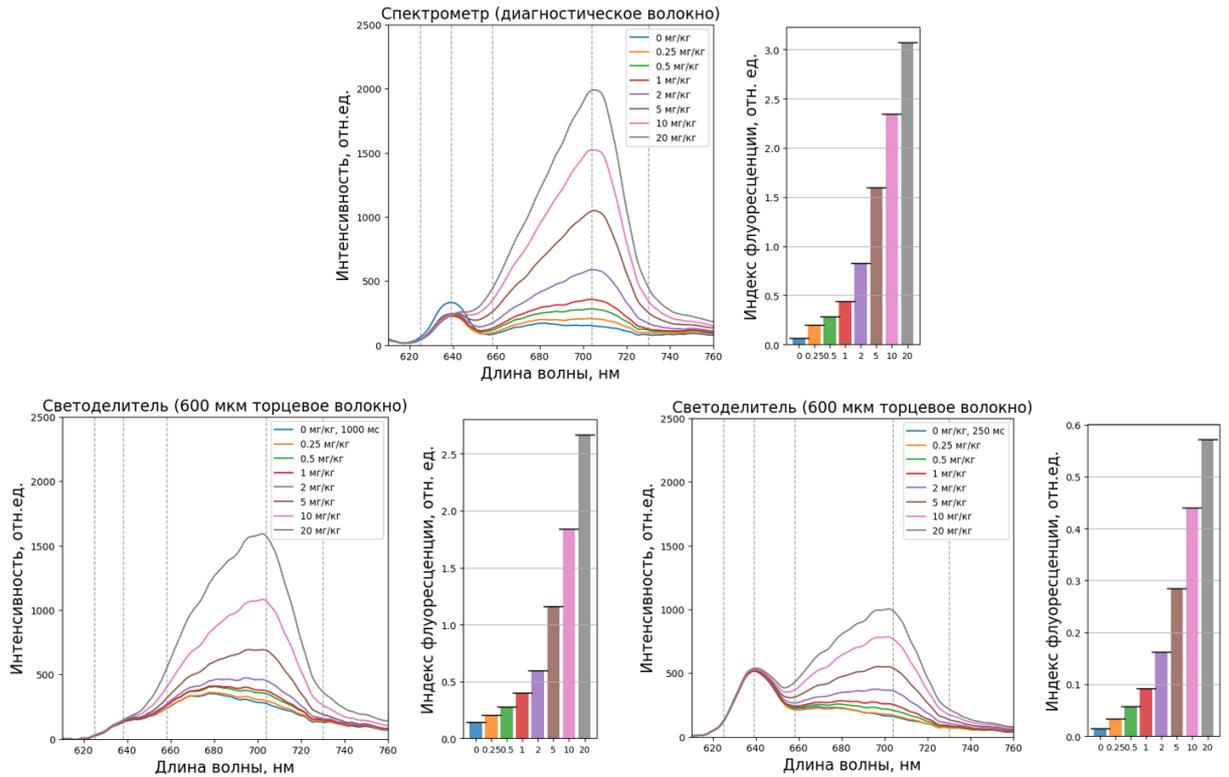


Рисунок 4.22 – Спектры флуоресценции PrIX, полученные с применением моно-волоконной системы доставки лазерного излучения и спектроскопически без светоделителя. Ненулевое значение индекса флуоресценции 0 мг/кг соответствовало пропусканью части обратно-рассеянного сигнала лазерного излучения через оптические фильтры.

На рис. 4.23 показано распределение отношения «сигнал/шум», которое представлено в виде отношения общей интенсивности флуоресценции в диапазоне волн от 660 до 710 нм к интенсивности обратно-рассеянного лазерного сигнала от оптического фантома с концентрацией PrIX 0 мг/кг в том же диапазоне. Для этого спектры предварительно были нормированы на интенсивность диффузно-рассеянного лазерного излучения. Чем выше отношение «сигнал/шум», тем больше вероятность обнаружения соответствующей концентрации фотосенсибилизатора. Значения, где отношение «сигнал шум» равно 1, показывают, что сигнал флуоресценции находится на уровне фонового шума.

По полученным данным «сигнал/шум» при использовании лазерного источника излучения с длиной волны 635 нм, полученные торцевым волокном с диаметром $d = 600$ мкм в 3.2 раза ниже при концентрации PrIX 20 мг/кг, чем при использовании диагностического катетера 2.5 мм. Для концентраций, соответствующим накоплению в опухолевой ткани головного мозга кратность составляет 1.8. Общий диаметр оптического волокна для доставки лазерного излучения и приема флуоресцентного сигнала снизился в 4.2 раза, что позволяет использовать систему доставки лазерного излучения и возбужденную флуоресценцию фотосенсибилизаторов на основе PrIX и Себ при меньшем диаметре отверстия доступа к опухоли.

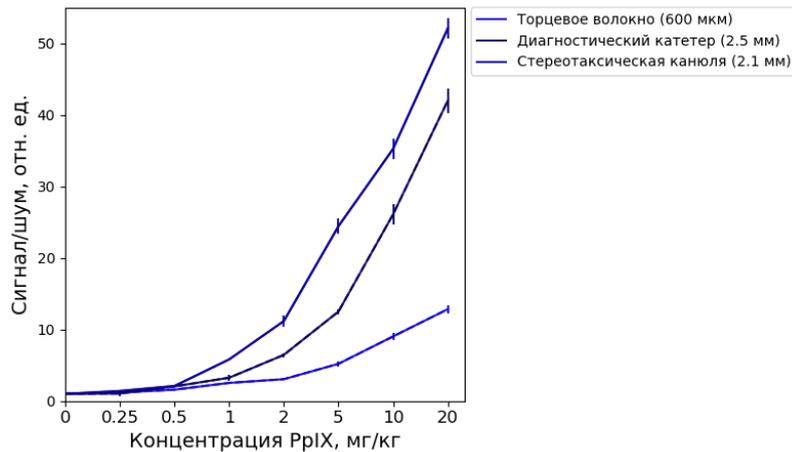


Рисунок 4.23 – Распределение отношения сигнал/шум при лазерном возбуждении флуоресценции с использованием фотосенсибилизатора PpIX.

Разработанное устройство позволило снизить расстояние между торцом волокна и объектом исследования с 5 см при использовании стандартных световодов, значение числовой апертуры которых равно $NA = 0.22$, до 1.35 см с использованием световода с числовой апертурой $NA = 0.66$. Диаметр пятна лазерного излучения при таком расстоянии составило 3 см. Возможность регистрировать флуоресценцию при малых концентрациях ФС при передаче лазерного излучения по одному волокну является определяющим достоинством данной системы, поскольку позволяет уменьшить размер оптических волокон, используемых в операциях на труднодоступных и глубокозалегающих опухолях ГМ.

Заключение к главе 4

Разработанное устройство для спектроскопического контроля лазерного воздействия на глубокозалегающие и труднодоступные опухоли с применением 5-АЛК индуцированного PpIX, который включает использование моно-волоконной системы доставки, разработанной для передачи лазерного излучения и приема флуоресцентного сигнала по одному волокну, на основе волокна с меньшим диаметром, чем стереотаксическая игла для хирургических операций. Данная разработка позволит уменьшить необходимый диаметр отверстия, используемого для доступа к опухоли и в результате уменьшить повреждение здоровых тканей на пути от поверхности головы до опухоли. 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.

Глава 5. Разработка неинвазивной лазерно-спектроскопической методики определения фотопродуктов PpIX при ФДТ и оценки оксигенации гемоглобина в видимом диапазоне излучения

В данной главе описан подход к неинвазивному измерению оксигенации гемоглобина в видимом диапазоне излучения. Определен алгоритм для оценки степени насыщения гемоглобина кислородом на основе разложения коэффициента ослабления света в ряд Тейлора. Особое внимание уделено влиянию рассеяния света на спектр диффузного отражения и определена конфигурация оптических волокон для измерения оксигенации гемоглобина в поверхностном капиллярном кровотоке. Проведено исследование образования фотопродуктов PpIX в процессе ФДТ, фотопорфирина Prr и выявлены временные интервалы, наиболее подходящие для проведения ФДТ, связанные с концентрацией PpIX и Prr, а также оптимизирован режим облучения при ФДТ. Спектральное определение фотопродуктов PpIX позволит проводить детальный мониторинг процесса ФДТ, повышая селективность терапии и снижая риск возникновения нежелательных процессов в биологической ткани.

5.1. Алгоритм оценки степени насыщения гемоглобина кислородом с учетом влияния рассеяния клеток ткани на спектр затухания

В главе 3 описан метод определения оксигенации гемоглобина StO_2 с помощью средств БИК-спектроскопии. Глубина зондирования данного метода составляет 15 см при рассмотрении биологического объекта головы человека. В медицине существует потребность в методах исследования оксигенации гемоглобина в поверхностном капиллярном кровотоке и слизистых тканях в видимом диапазоне света. Необходимость наличия большого расстояния между волокнами l для достижения наибольшей глубины, ограниченное использование при совместном применении с ФС являются недостатками данного метода при применении в контексте существующей потребности. Длина волны излучения $\lambda_{\text{лазер}}$ применяемая в данной системе определена диапазоном 687 – 804 нм, в случае применения совместно с ФС, имеющими поглощение в данной области спектра, приведет к потере части сигнала и неверной интерпретации сигнала.

Для исследования поверхностного кровообращения предложено применение светового излучения в видимом диапазоне спектра $\lambda = 500 - 600$ нм. Данный подход позволил минимизировать влияние структуры слоев биологической ткани и связанных с этим изменений светового сигнала, что обусловлено меньшей глубиной зондирования при переходе к более коротковолновому спектральному диапазону. Однако при использовании широкополосного

светового излучения возникает увеличение вклада рассеяния биологических тканей, что особенно выражено в неоднородных биологических средах, где свет рассеивается на клеточных структурах, что усложняет количественный анализ параметров оксигенации.

Затухание A определяется коэффициентами рассеяния μ'_s и поглощения μ_a при заданной длине волны:

$$\mu_t = \mu_s + \mu_a \quad (5.1)$$

$$A = \mu_t L \quad (5.2)$$

$$A = (\mu_a + \mu'_s) L \quad (5.3)$$

Для оценки насыщения гемоглобина кислородом по спектрам диффузного рассеяния предложен алгоритм, разделяющий регистрируемый спектр на составляющие, обусловленные поглощением и рассеянием, в квадратичном виде:

$$A_{model}(\lambda) = c_0 + c_1(\lambda) + c_2(\lambda)^2 + \langle L \rangle * (cHb * \varepsilon Hb(\lambda) + cHbO_2 * \varepsilon HbO_2(\lambda)) * \ln(10). \quad (5.4)$$

Значение каждого c_i , а также значения cHb и $cHbO_2$ получаются путем минимизации целевой функции:

$$\chi^2 = \sum_{\lambda_i=\lambda_{min}}^{\lambda_i=\lambda_{max}} [A_{model}(\lambda_i) - A_{exp}(\lambda_i)]^2, \quad (5.5)$$

где λ – длина волны, ограниченная спектральным диапазоном, в котором мы аппроксимируем экспериментальный спектр предложенной моделью. Уравнение направлено на минимизацию величины χ^2 суммы остатков приближения данных модели к экспериментальным данным.

Применение такого подхода позволяет рассчитывать концентрации окси- и дезоксигемоглобина лишь до значения среднего пробега фотонов в ткани, которое можно приближенно определить через расстояние между излучающим и приемными волокнами. Однако при расчете насыщения гемоглобина кислородом коэффициент, соответствующий длине пути света в ткани, уменьшают, поскольку степень насыщения рассчитывали, как отношение концентрации оксигемоглобина к суммарной концентрации окси- и дезоксигемоглобина:

$$SO_2 = \frac{cHbO_2}{cHbO_2 + cHb}, \quad (5.6)$$

где cHb – концентрация восстановленного гемоглобина, $cHbO_2$ – концентрация оксигенированного гемоглобина.

При измерениях сильнорассеивающих тканей этот метод имеет ограниченную применимость, с увеличением расстояния между оптическими волокнами наблюдается размытие спектра затухания, что обусловлено увеличением вклада рассеяния неоднородной среды в сигнал. Это связано с тем, что спектральные компоненты излучения испытывают различные степени поглощения и рассеяния при прохождении через среду. При увеличении расстояния между волокнами увеличивается глубина зондирования лазерного излучения в биологическую ткань, что приводит к изменению формы спектра в зависимости от пройденного оптического пути. При увеличении расстояния между волокнами и рассмотрении сильнорассеивающих тканей, необходимо ввести учет анизотропии рассеяния [91]. Приведенный коэффициент рассеяния рассчитывали с помощью степенной функции:

$$\mu'_s(\lambda) = a_0 \left(\frac{\lambda}{\lambda_0}\right)^{-a_1}, \quad (5.7)$$

где $\lambda_0 = 550$ нм. В модели зависимость от длины волны описывается в терминах отдельных вкладов рассеяния Ми и Рэлея, а также их суперпозиции, которая определяется степенным коэффициентом a_1 , равным 1.5 или 4 соответственно:

$$\mu'_s(\lambda) = a' \left(f_{Ray} \left(\frac{\lambda}{\lambda_0}\right)^{-a_1} + (1 - f_{Ray}) \left(\frac{\lambda}{\lambda_0}\right)^{-a_2} \right). \quad (5.8)$$

Баланс между компонентами Рэлея и Ми в рассеянии тканей определяется коэффициентами $(1 - f_{Ray})$ для Ми рассеяния и членом f_{Ray} , который указывает долю Рэлеевского рассеяния, присутствующую в уравнении рассеяния Ми. Конечный вид модельной функции затухания:

$$A(\lambda) = c_0 \cdot \frac{\lambda^{-a_1}}{550} + c_1 \cdot \frac{\lambda^{-a_2}}{550} + \langle L \rangle \cdot (c_{Hb} \cdot \varepsilon_{Hb}(\lambda) + c_{HbO_2} \cdot \varepsilon_{HbO_2}(\lambda)) \cdot \ln(10). \quad (5.9)$$

Для оценки абсолютной концентрации гемоглобина в оксигенированной и восстановленной форме можно использовать данные о средней длине пробега фотонов в тканях между излучателем и приемником на основе других моделей. Для этого мы использовали численное моделирование распространения света в тканях методом Монте-Карло с расчетом функции распределения фотонов по длине пути. Для числовой апертуры оптического волокна $NA = 0.22$ и расстояния между излучающим и приемным волокнами $l = 250$ мкм, мода такой функции распределения приходилась на 570 ± 12 мкм.

Оптические свойства отдельных слоев кишечной стенки в качестве входных данных для численного моделирования были взяты из публикации [92, 93, 94]. В результате анализа этих источников коэффициент поглощения был принят равным 6.5 см^{-1} для мышечного слоя, 1 см^{-1} для подслизистого слоя и 3.5 см^{-1} для слизистой оболочки. Коэффициент рассеяния $\mu_s = 100 \text{ см}^{-1}$ и

коэффициент анизотропии $g = 0.89$ были выбраны для мышечного слоя. Для подслизистого слоя значения соответствовали $\mu_s = 100 \text{ см}^{-1}$ и $g = 0.9$, для слизистой оболочки $\mu_s = 300 \text{ см}^{-1}$ и $g = 0.9$ соответственно.

Было проведено моделирование спектров затухания света от стенки кишки, минимизируя разность между моделируемым и экспериментальным спектром методом наименьших квадратов. Метод наименьших квадратов был применен для нахождения оптимальных параметров модели, минимизирующих суммарное квадратичное отклонение между моделируемыми и экспериментальными данными спектров диффузного рассеяния. При этом зависимость коэффициента рассеяния $\mu_s(\lambda)$ от длины волны аппроксимировали с использованием следующих видов зависимости: линейная $c_0 + c_1(\lambda)$, квадратичная $c_0 + c_1(\lambda) + c_2(\lambda)^2$, кубическая $c_0 + c_1(\lambda) + c_2(\lambda)^2 + c_3(\lambda)^3$, и суперпозицию показательных функций рассеивателей Ми и Рэлея.

При проведении расчетов и моделирования выбран диапазон длин волн 520 – 590 нм. Обоснование данного диапазона заключается в наличии значительных изменений в коэффициентах рассеяния μ_s в этом спектральном диапазоне, что позволяет наиболее точно оценить параметры модели. В результате моделирования была построена графическая зависимость коэффициента затухания $A_{model}(\lambda)$ от длины волны (рис. 5.1) и модельные функции, аппроксимирующие спектр коэффициента затухания, полученный экспериментально.

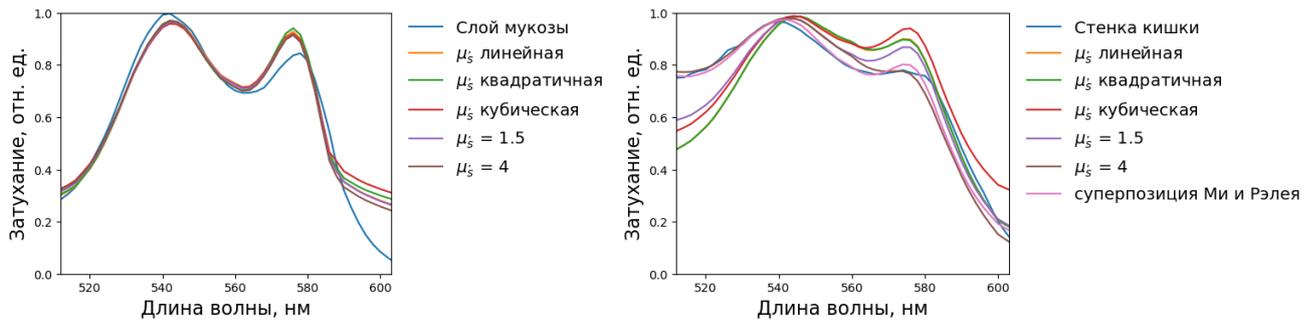


Рисунок 5.1 – Полученные спектры диффузно-рассеянного сигнала и моделируемые спектры затухания света от стенки кишки. Спектр изменения коэффициента затухания, полученный экспериментально при постановке волокон с одной стороны и «на просвет» выделены синим цветом.

Результаты моделирования показали, что минимальная ошибка между экспериментальным спектром и моделью в случае постановки волокон с одной стороны соответствовала модели с линейной зависимостью показателя рассеяния μ_s , где ошибка составляла $\chi^2 = 0.0034$. Также была оценена эмпирическая модель с коэффициентом $a_1 = 4$, при которой ошибка составляла $\chi^2 = 0.0029$. В случае постановки волокон на просвет минимальную ошибку наблюдали при

использовании эмпирической модели для суперпозиции функций для рассеивателей Ми, и составила всего $\chi^2 = 0.0003$.

Таблица 5.1 Величина ошибки между моделируемыми спектрами и спектрами, полученными экспериментально

	Значение χ^2	
	Одна сторона стенки кишки	Насквозь стенки кишки
μ'_s линейная	0.0034	0.7449
μ'_s квадратичная	0.0039	0.7452
μ'_s кубическая	0.0054	0.1211
$\mu'_s a_1 = 1.5$	0.0033	0.1906
$\mu'_s a_1 = 4$	0.0029	0.0204
Функция суперпозиции для Ми рассеивателей	2.7220	0.0003

Различие в применении моделей, которые дают наименьшую ошибку при разных конфигурациях эксперимента, указывает на то, что геометрия и направление ввода света существенно влияют на характер рассеяния и поглощения света в ткани. При измерении обратного диффузного рассеяния, наиболее подходящей является модель с описанием основного вклада рассеяния Рэлея, поскольку значительная часть рассеяния обусловлена мелкими структурами или неоднородностями, которые вносят значительный вклад в изменение света при таком типе геометрии постановки волокон.

При измерении пропускания, суперпозиция функций для рассеивателей Ми лучше описывает рассеяние при прохождении света через толщину ткани, различие в величине ошибки по сравнению с другими методами составляет 2 порядка. Свет взаимодействует с широким набором структурных элементов, включающих частицы, размер которых сопоставим с длиной волны, так и крупные компоненты, что соответствует условиям рассеяния Ми, где размеры рассеивателей значительно превышают длину волны видимого света.

5.2. Методика контроля оксигенации гемоглобина в поверхностных слоях молочной железы, стенки кишки в видимом диапазоне спектра

Используя метод измерения StO_2 в сильнорассеивающих средах сигнал в основном детектируется на поверхности. При рассмотрении биологических тканей, кровотоки которых залегают под слоем жировой ткани, в качестве многослойной оптической системы с слоем сильнорассеивающей среды можно рассмотреть ткани молочной железы. Для определения глубины зондирования света была выполнена серия экспериментов, выполненная на многослойном оптическом фантоме груди человека.

Ткани молочной железы состоят из железистой и жировой ткани. Структура груди молодых женщин характеризуется плотной, железистой, и, следовательно, богатой водой тканью. Грудь женщин старшего возраста напротив, представляет собой структуру с уменьшенным объемом желез и увеличенным относительным количеством жировой ткани. Для исследования выделили два вида молочных желез: насыщенная водой (62% воды и 16% липидов) и насыщенная липидами (12% воды и 68% липидов) [95]. Таким образом, для второго вида тканей молочной железы оптические свойства в основном определяются количеством жировой ткани. Так как у воды в диапазоне длин волн от 500 до 600 нм коэффициент рассеяния μ_s и поглощения μ_a меньше, чем у липидов, для первой группы ожидается большее проникновение света вглубь ткани [91, 96, 97]. Для определения предельной толщины ткани, при которой возможно получение спектров оксигенации без значимых искажений, необходимо исследовать второй вид биологической ткани.

Для оценки оптических свойств был взят образец свиной жировой ткани. Он был помещен в пробирку толщиной 1 см. В аналогичных пробирках была подготовлена рассеивающая среда, жировая эмульсия в концентрациях $C_{scat.} = 0.4\%, 0.5\%, 1\%, 2.5\%, 5\%$, разбавленная дистиллированной водой в соответствующих концентрациях. Необходимое количество вещества отмеряли с помощью автоматических пипетов-дозаторов, предназначенных для дозирования объемов до 1000 мкл. Для каждого образца были зарегистрированы спектры обратного рассеяния и пропускания. Для этого была использована установка, состоящая из лазерного источника на длине волны $\lambda_{laser} = 532$ нм, оптико-волоконного спектрометра ЛЭСА-01-БИОСПЕК, оптических волокон и программного обеспечения для регистрации и обработки спектров Uno.

Было рассчитано отношение интенсивности обратно-рассеянного и проходящего через образец света. Результаты вычислений приведены в таблице 5.2. По полученным данным наиболее подходящим для имитации оптических свойств тканей молочной железы является образец с концентрацией $C_{scat.} = 0.4\%$. Выбор такой концентрации определен наиболее близким

значением отношения интенсивности обратно-рассеянного и проходящего света к полученному значению для свиного жира в соответствующем спектральном диапазоне.

Таблица 5.2 – Значения отношений обратно-рассеянного сигнала (Rd) и пропускания (T) для исследуемых образцов.

Исследуемый образец	Rd/T , отн. ед.
Свиной жир	3,2
Интралипид 5%	13,9
Интралипид 2,5%	12,5
Интралипид 1%	4,0
Интралипид 0,5%	3,7
Интралипид 0,4%	2,8

Выбор концентрации интралипида $C_{scat.}$ для имитации мягких биологических тканей подтверждается литературными источниками [98, 99, 100]. Полученные результаты подтверждаются литературными данными при сопоставлении значений коэффициента рассеяния и поглощения для тканей молочной железы и интралипида в рассматриваемой области спектра [91, 100, 101, 102, 103].

Для оценки насыщения кислородом гемоглобина в условиях измерения подкожного кровотока была создана модель сосудов в сильнорассеивающей среде, представляющая собой чашку Петри, на дне которой располагались силиконовые трубки диаметром 2.5 мм и толщиной стенки 0.5 мм, заполненные кровью. Постепенно емкость наполняли раствором интралипида с концентрацией 0.4% в качестве рассеивающей среды. Значение концентрации $C_{scat.}$ было подобрано эмпирически и с помощью литературных источников. Фоторафия оптического фантома и схема эксперимента представлена на рис. 5.2. Измерения тканевой сатурации StO_2 проводили с помощью установки, схема которой представлена в пункте 2.5. Мощность источника белого света составила 8 мВт. Так как диаметр осветительного волокна составил $d_{emit.} = 600$ мкм, плотность мощности на выходе оптического волокна составила примерно $P_s = 2.8$ Вт/см².

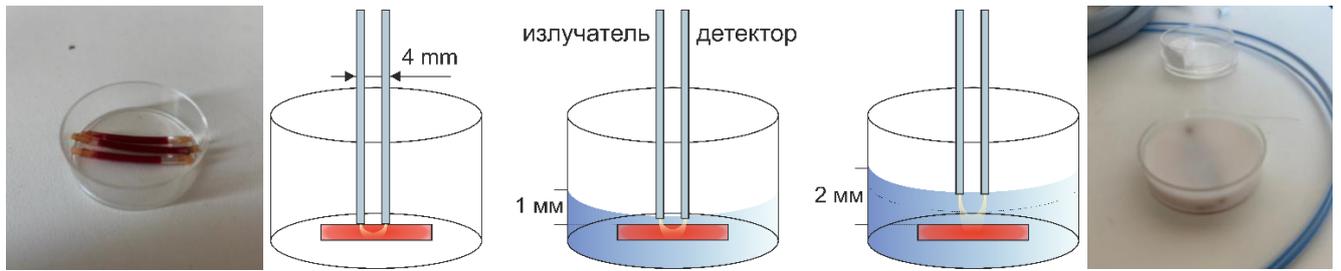


Рисунок 5.2 – Схема имитированного сосуда с кровью с обозначением каждого этапа. Трубки, наполненные кровью, лежали на дне емкости, концы трубок закрыты резиновыми прокладками. Фотографии оптического фантома, имитирующего сосуда и подкожную жировую прослойку молочной железы, при залегании сосудов 0.2 – 0.5 см от поверхности.

В начале эксперимента измеренная степень сатурации кислородом крови в трубках соответствовала $StO_2 = 63\%$ (рис. 5.3). После этого постепенно добавляли раствор рассеивающей среды, и на каждом этапе проводили измерение значения StO_2 . С ростом глубины залегания сосудов увеличивалось значение StO_2 , что может быть связано с увеличением вкладов рассеяния на сигнал. Форма спектра также менялась с увеличением глубины – левый пик гемоглобина на спектре затухания поднимался выше. При дальнейшем увеличении глубины свыше 15 мм при выбранной конфигурации определение StO_2 приводило к увеличению ошибки χ_2 .

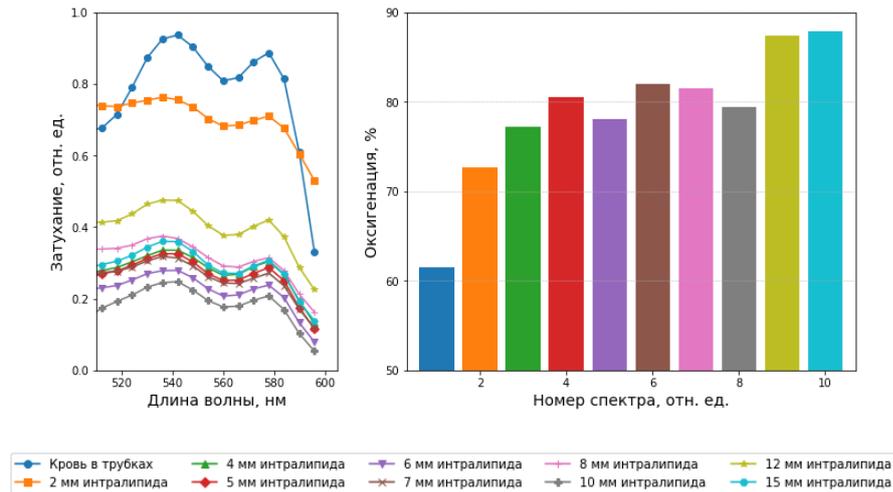


Рисунок 5.3 – Спектры диффузно-рассеянного сигнала (R_d) крови в трубке на различной глубине. Значение степени сатурации гемоглобина кислородом StO_2 при различной глубине расположения трубок с кровью.

При проведении измерений оптические волокна приемника и излучателя устанавливаются при одном фиксированном расстоянии l между друг другом. Данное значение расстояния между волокнами l определяет величину интенсивности получаемого сигнала и искажение диффузно-рассеянного света R_d , получаемым приемным волокном из глубины ткани. Для определения

необходимого расстояния l между волокнами, при котором измерение StO_2 проходит с подходящей глубиной зондирования был проведен эксперимент по регистрации спектров диффузно-рассеянного сигнала при расстоянии $l = 2, 4, 7$ мм между приемным и излучающим волокном. Измерения проводили поочередно для трех значений расстояния между волокнами. Регистрирование спектров проводили сначала на поверхности трубки с кровью, без жировой эмульсии и при поэтапном добавлении с шагом покрытия трубки 1 мм. Результаты измерений представлены на рис. 5.4.

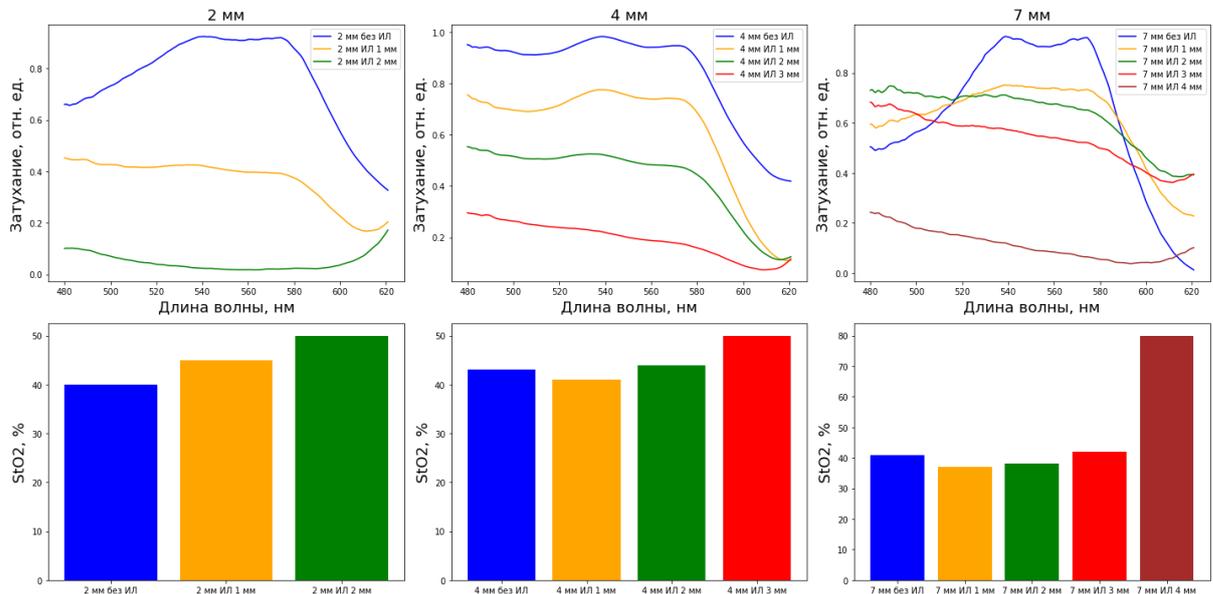


Рисунок 5.4 – Спектры диффузно-рассеянного сигнала $Rd(\lambda)$ при расстоянии между волокнами $l = 2, 4, 7$ мм (верхний ряд) и полученные гистограммы, отражающие значения StO_2 (нижний ряд). Измерение степени насыщения кислородом гемоглобина соответствует увеличению вклада рассеяния в результирующий спектр при увеличении глубины залегания сосуда в оптическом фантоме.

Уровень интенсивности сигнала уменьшается с увеличением толщины слоя рассеивающей среды. Это обусловлено влиянием вклада рассеяния на регистрируемый сигнал. Измерения проводили при различном времени экспозиции для каждого расстояния l между волокнами. При значениях 2, 4 и 7 мм оно было равно 100, 150 и 200 мс, соответственно. Таким образом, с увеличением расстояния между волокнами необходимое для регистрирования спектров время экспозиции увеличивалось. Поскольку при увеличении расстояния детектируемое излучение должно пройти больший путь, в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера, большее количество фотонов переживут акты поглощения и рассеяния, поэтому потребуется увеличить время накопления сигнала.

Для оценки влияния меланина на получаемый сигнал при данной конфигурации установки провели эксперимент с использованием свиной кожи с подкожным слоем жира. Установка, используемая для измерения StO_2 аналогична используемой в предыдущем эксперименте. Имитированные сосуды из трубок с кровью, располагавшиеся на дне сосуда, покрывали свиной кожей и проводили измерения StO_2 . Суммарная толщина кожи и жира составила 5.5 мм. Схема измерений представлена на рис. 5.5. При проведении измерений определено оптимальное расстояние между осветительным и приемным волокнами, равное $l = 7$ мм. Полученное значение $StO_2 = 57\%$.

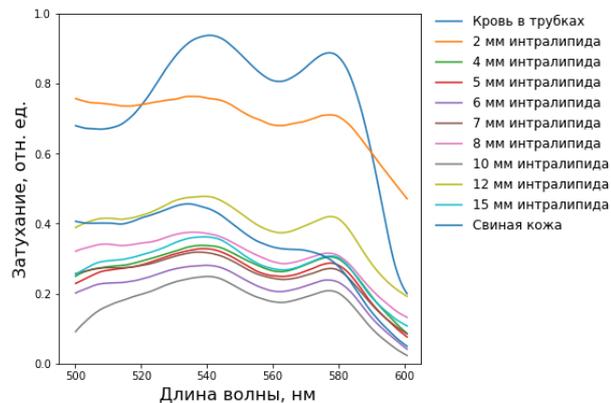
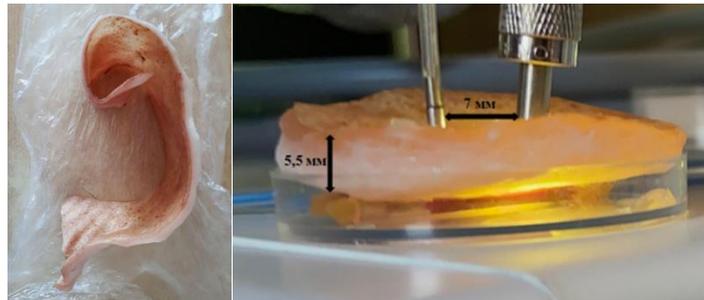


Рисунок 5.5 – Фотография образца свиной кожи с подкожным слоем жира, используемого в эксперименте. Схема проведения эксперимента с тканями свиньи. Спектр диффузно-рассеянного сигнала для биологического объекта, используемого в измерениях.

5.3. Результаты оценки тканевой сатурации гемоглобина кислородом при хирургии молочной железы и стенки кишки

Полученные в результате экспериментального исследования параметры светового излучения и межволоконного расстояния были апробированы при интраоперационном измерении тканевой сатурации гемоглобина кислородом у 40 пациентов на тканях пищевода, желудка, стенки кишки у пациентов с диагнозом опухоль сигмовидной кишки, которым была выполнена левосторонняя гемиколэктомия, и тканях молочной железы у пациентов с диагнозом опухоль молочной железы, которым были выполнены резекции молочной железы

кожесохранного характера с лимфаденэктомией и одномоментным реконструктивным компонентом. Плотность мощности и расстояние l между источником и детектором устанавливали в зависимости от локализации опухоли. Это позволило определить тканевую сатурацию гемоглобина кислородом StO_2 с обеспечением подходящей глубины зондирования света в ткани при рассмотрении различных многослойных биологических структур.

При анализе только поверхностного кровотока и всех слоев стенки кишки измеряли обратное диффузное рассеяние и пропускание, приемное волокно и излучающее располагались рядом с одной стороны стенки кишки и в геометрии «на просвет» (рис. 5.6). В качестве излучающего волокна в просвет кишки помещали катетер Фолея, внутри баллона помещали оптоволоконный полимерный диффузорный излучатель. Катетер Фолея был наполнен жировой эмульсией в концентрации $C_{scat.} = 1\%$, выбранной в качестве рассеивающей среды для обеспечения равномерной индикатрисы рассеяния. Рассеивающая среда необходима для обеспечения равномерного сигнала при измерении диффузно рассеянного света, прошедшего через стенку кишки наружу. Длина полимерного диффузорного излучателя составила 10 мм.

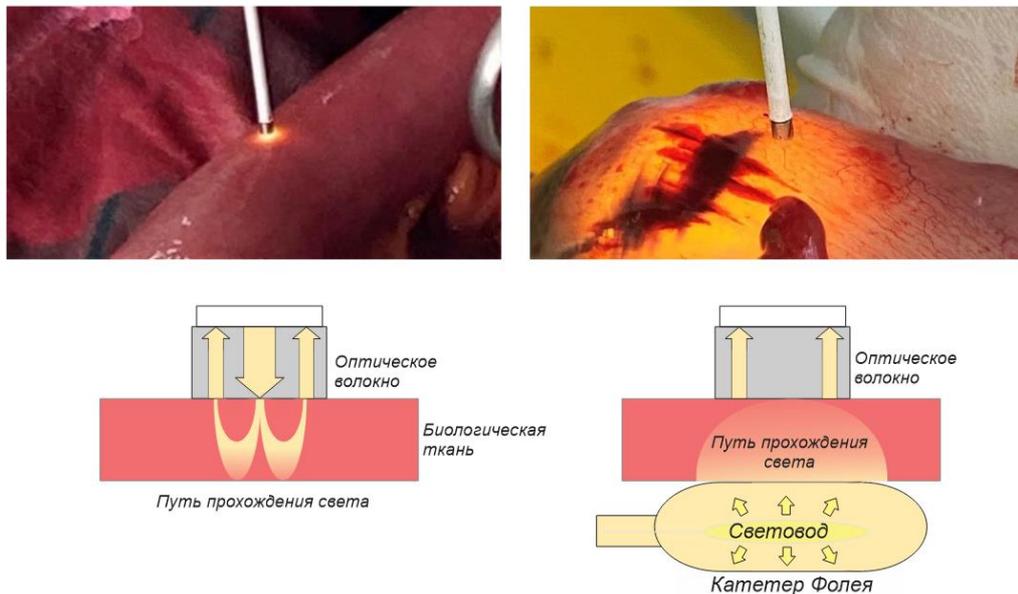


Рисунок 5.6 – Схематическое и реальное изображение волокон при проводимых измерениях тканевой сатурации гемоглобина в тонкой кишке, выбор линии резекции определялся по полученным значениям StO_2 . Слева представлено постановка излучающего и приемного оптических волокон с одной стороны, справа – в геометрии «на просвет».

Анализ содержания кислорода в гемоглобине проводили по параметру тканевой сатурации StO_2 . Измерения выполняли в нескольких точках относительно опухоли вверх и вниз по кишке, общий размер области изучения составил 30 см. Отправной точкой был центр опухоли T , верхнюю и нижнюю границу опухоли обозначали как $T+$ и $T-$ (рис. 5.7). Измерения проводили с

шагом 5 см для выявления зон недостаточной перфузии, определения оптимального места формирования анастомоза и оценки адекватности кровоснабжения после мобилизации кишки. Для повышения степени достоверности полученных данных проводили измерения в трех близко расположенных точках в пределах одной зоны, расстояние между которыми составило 1 – 2 мм.

Ниже представлены данные одного клинического случая, который выбран для детального рассмотрения. На рис. 5.7 справа представлены спектры диффузно-рассеянного сигнала и соответствующие гистограммы значений StO_2 в исследуемых точках до и после мобилизации участка кишечника, включающая в себя наложение зажимов и пересечение артериальных и венозных сосудов, питающих кишку. Полученные спектры демонстрируют пики характерные для оксигемоглобина при длинах волн 542 нм и 576 нм. Погрешность каждого измерения основана на стандартном отклонении. Значения тканевой сатурации StO_2 до пересечения питающих сосудов соответствовали от 85% до 72%, после от 68% до 57%. Снижение величины тканевой сатурации StO_2 связано с уменьшением притока оксигемоглобина $cHbO_2$ и увеличением концентрации восстановленного гемоглобина cHb в тканях кишечной стенки с течением времени. Увеличение концентрации восстановленного гемоглобина cHb связано с диффузией кислорода из оксигемоглобина в клетки соседних тканей. Время от пересечения сосудов до начала измерений составило 30 мин. Такой временной интервал выбран для того чтобы учесть период устранения шумовых компонентов сигнала вызванных перестальтикой, пульсацией сосудов и активации резервных сосудистых путей, что в совокупности обеспечивает стабилизацию оптических параметров тканей кишки, в частности коэффициентов рассеяния и поглощения. Заметно, что в точках за зажимами, где кровоснабжение было регулярным, значение тканевой сатурации StO_2 возросло по сравнению с значением до мобилизации участка кишки.

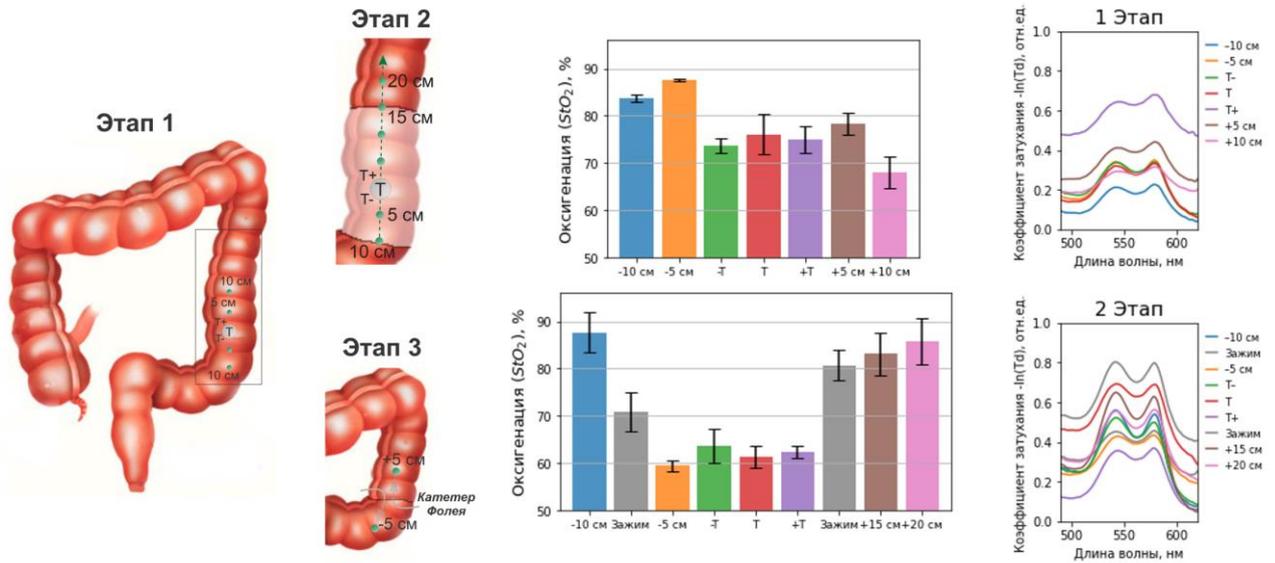


Рисунок 5.7 – Схема операции с отмеченными точками, где проводили измерение тканевой сатурации StO_2 . Точки 0 и 20 см являлись границами анастомоза. Черным выделен резецируемый участок кишки, края которого сшивали между собой после операции для образования анастомоза.

Результаты динамики изменения сатурации до и после мобилизации кишки в точках измерения для 10 пациентов с диагнозом опухоль сигмовидной кишки представлены на рис. 5.8 слева. В частности, после лигирования магистральных сосудов, предусмотренных объемом оперативного вмешательства и наложения зажимов на кишку в зонах пересечения кишки отмечено 2 характера изменения кровообращения: повышение значения тканевой сатурации StO_2 до 82% или существенное снижение до 55%. В центре и на границах опухоли отмечено снижение тканевой сатурации StO_2 по отношению к здоровым участкам ткани кишки на 10% (63% для опухоли и 75% для здоровой ткани). При оценке динамики изменения оксигенации гемоглобина кислородом в тканях кишки до мобилизации и после наложения анастомоза определена зависимость изменения сатурации до мобилизации и после анастомоза участка кишки (рис. 5.8 справа). Значения тканевой сатурации после наложения анастомоза соответствовало $StO_2 = 76\%$ и сравнительно с значением до мобилизации $StO_2 = 73\%$. Послеоперационный период у каждого пациента проходил без осложнений, появление септического перитонита из-за несостоятельности анастомоза спустя 10 дней после операции не выявлено.

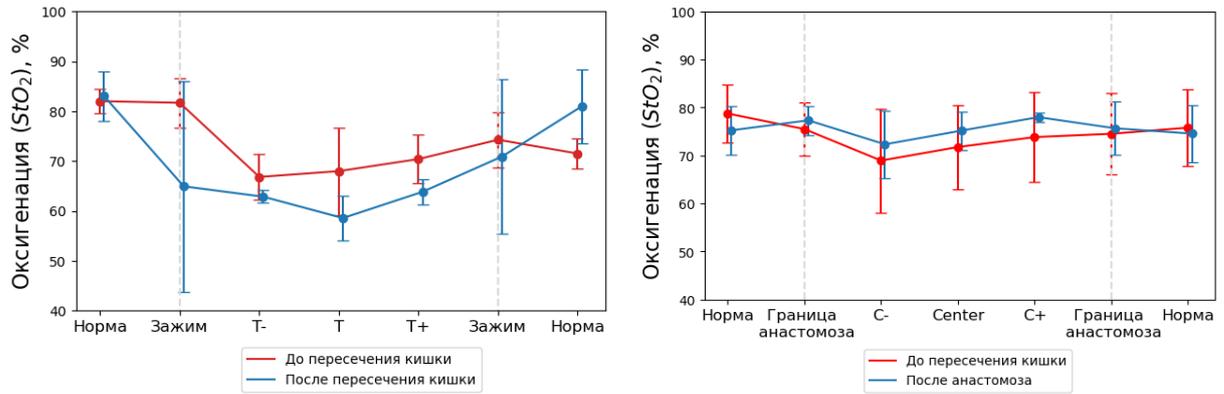


Рисунок 5.8 – Зависимость изменения StO_2 от точки измерения до и после мобилизации участка кишки (слева), до мобилизации и после анастомоза участка кишки (справа). Пунктирными линиями выделены точки, где располагались границы анастомоза.

Результирующий спектр диффузно-рассеянного сигнала при постановке волокон с одной стороны состоит из нескольких компонент связанных со слоями ткани, участвующими во взаимодействии со светом, доминирующие вклады в сигнал определены внешними слоями ткани в первую очередь. Для точной интерпретации снижения значения StO_2 оценена общая перфузия стенки кишки с использованием внутрипросветного диффузорного излучателя, помещенного в катетер Фолея. Измерения в проходящем свете проводили на мобилизованной части кишки через разрез. Результаты диагностики представлены на рис. 5.9. Спектры имеют два пика в области 542 – 578 нм, соответствующие пикам оксигемоглобина. Различия в амплитуде сигнала отражает неоднородность слоев по плотности сосудов и толщине. Диффузно-рассеянный сигнал, полученный от серозы имеет самый низкий уровень сигнала Rd от 0.4 до 0.6, что может коррелировать с меньшим содержанием гемоглобина или худшей перфузией. При этом слизистая имеет более выраженное поглощение $Rd = 0.8$, что предполагает лучшую васкуляризацию. По данным гистограмм заметно значительное различие StO_2 для внешнего слоя серозы, которая составила 45%, в то время как для слизистой и внутренних слоев значения StO_2 выше от 68 до 81%. В контексте анастомоза это критично, поскольку низкое значение StO_2 может сигнализировать о риске ишемии. При рассмотрении спектров, полученных в положении «на просвет», значения тканевой сатурации StO_2 более равномерны и соответствовали 60 – 81%. Среднеквадратичное отклонение для измерений в каждой точке при такой геометрии ниже ($\sigma = 1.6$), чем при размещении волокон на одной стороне ($\sigma = 2.1$). Отклонение значений может быть связано с перистальтикой кишечника, физиологическим дыханием, поскольку при этом расстояние между световодом и стенкой кишечника меняется во времени.

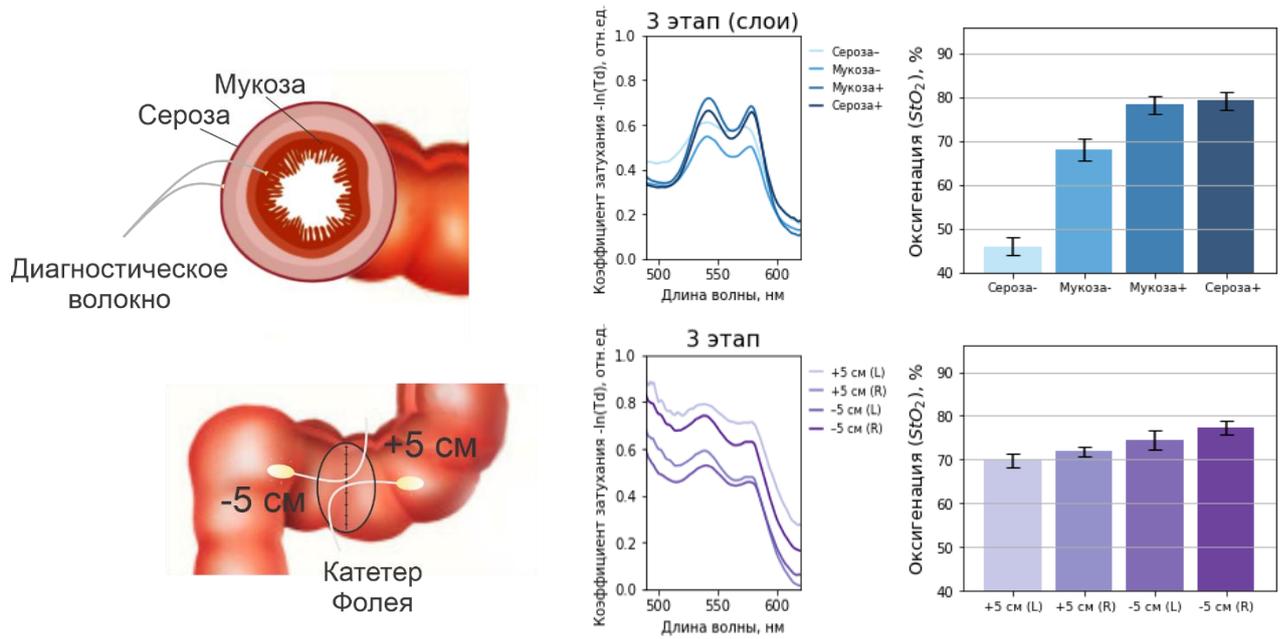


Рисунок 5.9 – Схема измерений с обозначением слоев стенки кишки. Спектры диффузно-рассеянного сигнала и соответствующие гистограммы значений StO_2 перед наложением анастомоза. Измерения проводились послойно и с помощью внутрисветного диффузорного излучателя.

Интраоперационный контроль степени оксигенации кожных рубцов при хирургической резекции опухоли молочной железы. При интраоперационном контроле тканевой сатурации StO_2 опухоли молочной железы получены спектры диффузно-рассеянного сигнала до операции и в течение 2.5 месяца после. На рис. 5.10 слева показана схема расположения точек измерения, включая сосково-ареолярный комплекс (САК), спектры диффузно-рассеянного сигнала и полученная графическая зависимость StO_2 в точках исследования в ключевые дни до и после операции. Толщина исследуемых кожно-жировых лоскутов составила 7 – 8 мм. Толщина свободно пересаживаемых тканей САК составила 2 – 3 мм. Контрольные измерения были проводились на ткани неоперированной молочной железы.

Спектр диффузно-рассеянного сигнала отражает поглощение, связанное с гемоглобином, поскольку отмечены характерные длины волн для оксигемоглобина $\lambda_{HbO_2} = 542$ нм и 578 нм, восстановленной формы $\lambda_{hb} = 558$ нм. Кривые демонстрируют тренд монотонного уменьшения затухания с ростом длины волны, постепенным снижением уровня затухания с течением времени после операции. До операции наблюдается высокий уровень поглощения, соответствующий для исходного состояния тканей. Значение затухания $Rd(\lambda_{542nm}) = 0.7$ и $Rd(\lambda_{578nm}) = 0.55$, заметный провал в области 540 – 580 нм, отражающий вклад пиков оксигемоглобина. После операции появляется характерный восстановленному гемоглобину Hb пик на 558 нм с соответствующим значением затухания $Rd(\lambda_{558nm}) = 0.92$. Спустя 2 месяца поглощение практически идентично

предоперационному с минимальными изменениями, что может говорить о стабилизации ткани. Значение затухания пиков оксигемоглобина соответствовали $Rd(\lambda_{542\text{нм}}) = 0.68$ и $Rd(\lambda_{578\text{нм}}) = 0.54$. Соотношение затухания при этих длинах волн $Rd\lambda_{542\text{нм}} / Rd(\lambda_{578\text{нм}})$ остается относительно стабильным в ранние периоды и соответствует 1.27, но слегка снижается к моменту 2.5 месяцев.

Результаты оптико-спектрального контроля насыщения кислородом StO_2 тканей молочной железы и ареолы для 14 пациентов, измеренные в ключевые дни до и после операции, представлены на рис. 5.10. Кожные лоскуты характеризуются равномерным повышением насыщения тканей кислородом к 5-м суткам. Значение StO_2 у молочной железы не имеет выраженных колебаний, исходный уровень соответствовал 55 – 60%, к 2-м месяцам 50%. Резкий спад на 10 день $StO_2 = 30\%$ может указывать на нестабильность процесса восстановления кровоснабжения в молочной железе, возможно, связанную с локальными изменениями кровоснабжения или воспалением. При исследовании кровоснабжения ареолы значения тканевой сатурации демонстрируют заметные колебания с чередующимися подъемами и спадами, например, подъем на 1 день после операции. Отмечено, что после операции характерно резкое снижение кровоснабжения до $StO_2 = 25\%$, которое постепенно восстанавливалось и достигало максимума на 3-и и 10-е сутки. На 10-е сутки у пациентов с толщиной подкожного слоя менее 7 мм отмечалось снижение показателя насыщения тканей кислородом StO_2 до 55–60%. После сильных колебаний в первые 10 дней после операции, тренд стабилизируется на более низком уровне к 2 месяцам.

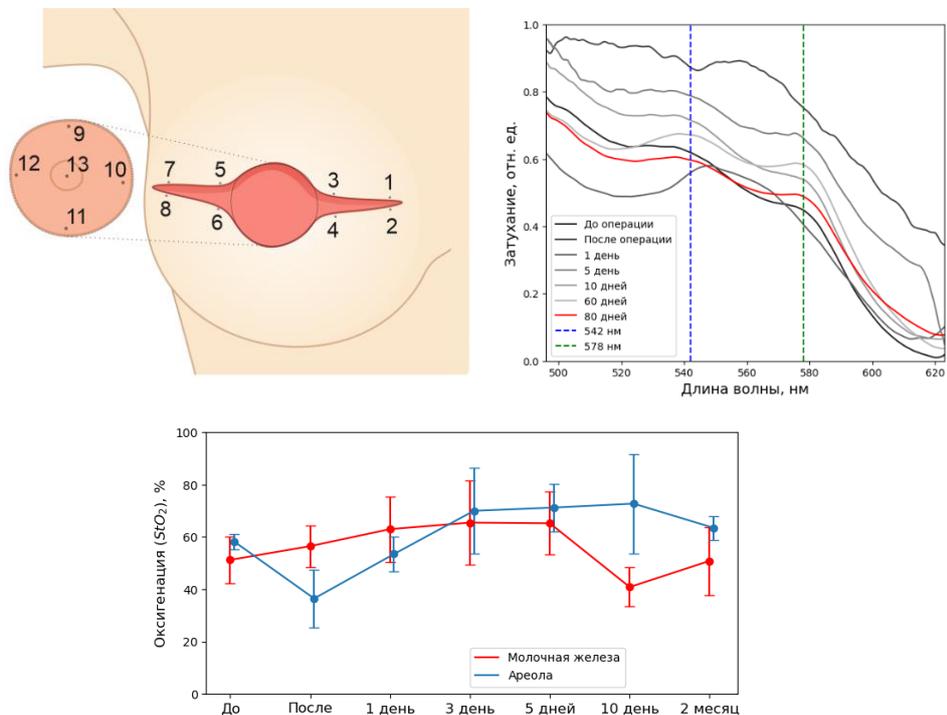


Рисунок 5.10 – Схема расположения точек оптико-спектрального контроля оксигенации гемоглобина в области кожных разрезов (до и после ушивания краев раны). Спектры диффузно-

рассеянного сигнала $Rd(\lambda)$ в ключевые этапы заживления. Графическая зависимость изменения StO_2 от точки измерения в ключевые дни до и после операции.

При формировании кожных лоскутов с толщиной подкожной клетчатки менее 7 – 8 мм к 10-м суткам наблюдался отек оперированных тканей, так как он был причиной нарушения артериального кровотока за счет сдавливания сосудов. В клинической практике отек при операциях на тканях молочной железы может появиться начиная с 5-и до 7 – 12 дней как реакция на проведенное хирургическое лечение. Через 2 месяца значения тканевой сатурации у пациентов сравнимы со значениями StO_2 до операции. У больных заживление биологических тканей протекало без возникновения серьезных нарушений на протяжении всего послеоперационного периода.

5.4. Разработка методики спектрально-флуоресцентного исследования образования фотопродуктов РрIX при лазерно-индуцированном фотодинамическом воздействии на биологические ткани

Для исследования динамики формирования фотопродуктов РрIX – в частности фотопорфирина (Ррр) на рис. 5.11 представлена схема измерения скорости фотообесцвечивания РрIX в фантоме в процессе фотодинамического воздействия, а также измерения скорости образования фотопродуктов Ррр.

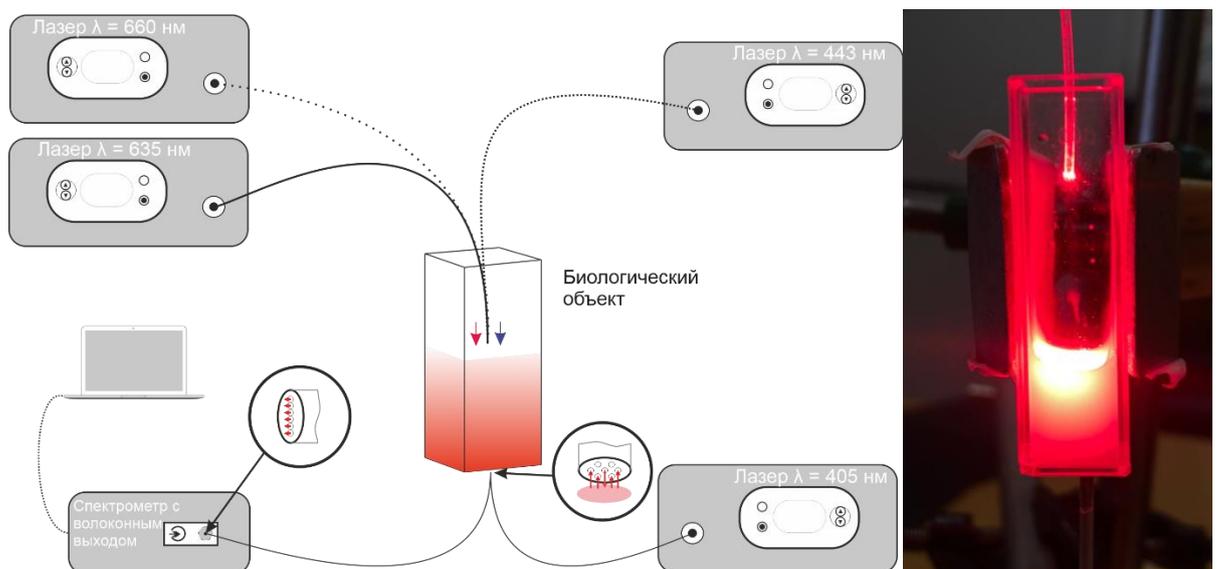


Рисунок 5.11 – Схема экспериментальной установки для исследования образования и флуоресценции фотопорфиринов Ррр при лазерно-индуцированном фотодинамическом воздействии на модели биологических тканей.

В ходе исследования оптический фантом размещался на лабораторном металлическом штативе с держателем, в которую вставляли пластиковую пробирку толщиной 1 см. В качестве образцов использовали оптические фантомы опухоли ГМ с ФС РrIX в концентрациях 2, 5, 10, 20 мг/кг. К верхней поверхности фантома подводилось волоконно-оптическое излучающее волокно с торцевым направлением распространения лазерного, обеспечивающее доставку излучения от терапевтического лазера с длиной волны 660 нм, при дозе энергии 100 Дж/см² (плотностью мощности $P_s = 40$ мВт/см²), 200 Дж/см² (плотностью мощности $P_s = 40$ мВт/см², дополнительно $P_s = 300$ мВт/см²) при диаметре 1 см. Толщина волокна составила 600 мкм. Оптическое волокно закреплялось с помощью держателя на лабораторном штативе с возможностью регулировки размера пятна лазерного излучения для обеспечения диаметра 1 см на поверхности фантома. Для приема обратно-рассеянного лазерного излучения и флуоресценции ФС использовали оптиковолокнистый жгут, состоящий из 7 моноволокон с диаметром каждого волокна в оболочке 250 мкм и числовой апертурой $NA = 0.22$, закрепленных посредством специального держателя, расположенного на дополнительном лабораторном штативе. Один из дистальных концов оптических волокон применялся для доставки излучения от лазера с длиной волны 405 нм для возбуждения флуоресценции РrIX, другие шесть использовали для регистрации обратно-рассеянного лазерного излучения и флуоресценции ФС. Измерение спектров обратно-рассеянного лазерного излучения и флуоресценции РrIX и Рrr, а также спектров диффузного отражения в образце осуществляли до и после фотодинамического воздействия с помощью оптиковолокнистого спектрометра. Регистрация спектров обратно-рассеянного лазерного излучения до и после фотодинамического воздействия осуществляли с экспозицией 100 мс в диапазоне 398 – 415 нм, спектров флуоресценции – в диапазоне 635 – 670 нм. Индекс флуоресценции РrIX рассчитывали как отношение площади под спектром флуоресценции S_2 к площади под спектром обратно-рассеянного лазерного излучения S_1 (рис. 5.12).

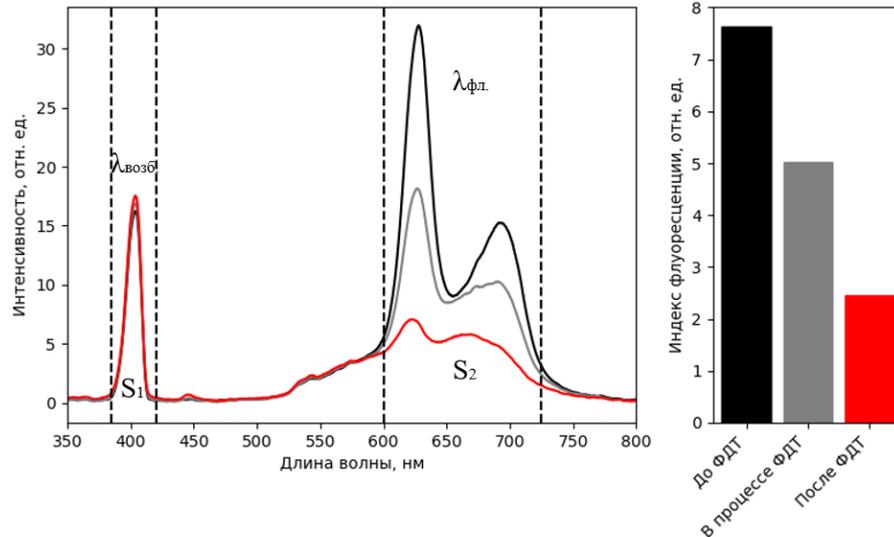


Рисунок 5.12 – Расчет индекса флуоресценции ФС.

Спектры флуоресценции регистрировали в диапазоне 600 – 730 нм. Образование фотопорфирина Rpp оценивали как отношение интенсивностей флуоресценции в диапазоне 645 – 680 нм к интенсивности флуоресценции в диапазоне 680 – 725 нм (рис. 5.13). Во время всех измерений торцы оптоволоконных зондов находились в мягком контакте (без давления) с образцом. Регистрация и обработка спектров были выполнены с помощью программы Uno, разработанной в лаборатории лазерной биоспектроскопии ИОФ РАН.

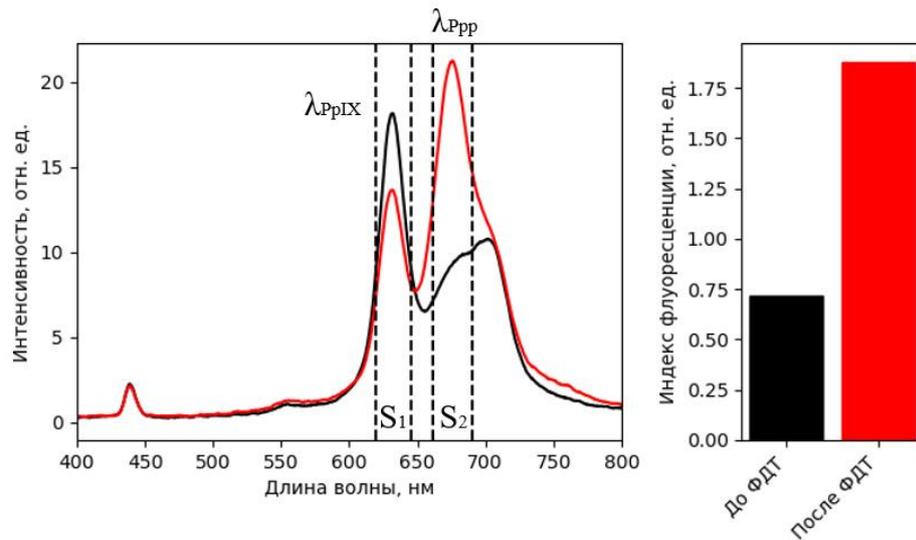


Рисунок 5.13 – Оценка образования фотопорфирина Rpp.

По полученным индексам флуоресценции были рассчитаны значения фотообесцвечивания PpIX в различной концентрации (рис. 5.14). Цветными линиями на графике показаны линии прогноза соответствующих зависимостей, серым цветом выделен диапазон фотообесцвечивания, при котором обеспечивается достаточный терапевтический эффект. При плотности энергии до

20 Дж/см² кривым характерен небольшой уклон и медленный темп фотообесцвечивания РrIX. Проявляется влияние эффектов, связанных с концентрацией, например доминирование механизмов тушения, фотообесцвечивание у образца 5 мг/кг происходит быстрее (20% при 10 минутах), чем у образца 20 мг/кг (7% при 10 минутах). Выход на плато обеспечивается при плотности энергии больше 100 Дж/см², дальнейшее облучение определяет замедление роста фотообесцвечивания РrIX. При фотодинамическом воздействии плотность мощности лазерного излучения использовали 40 мВт/см², которая была подобрана экспериментально. При такой плотности мощности не происходило разрушение РrIX, контроль образца осуществляли по анализу поглощения на спектрофотометре Hitachi до и после ФДТ.

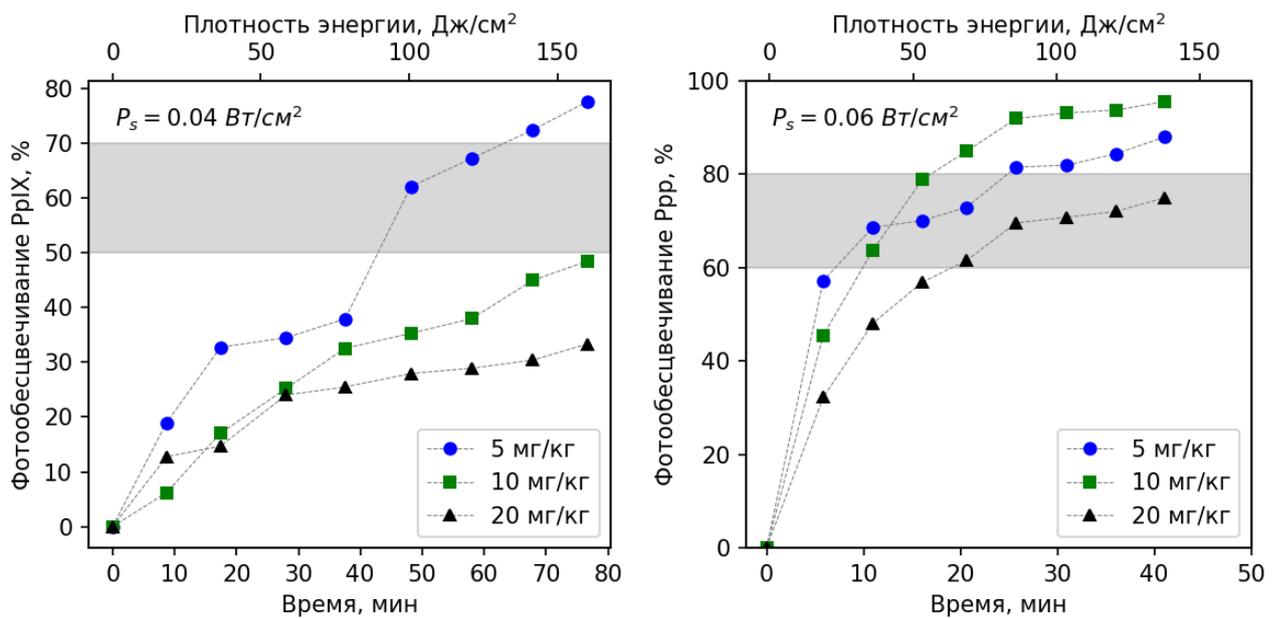


Рисунок 5.14 – Зависимость фотообесцвечивания РrIX и Рpr в концентрациях 5, 10, 20 мг/кг соответственно на модели биологической ткани от плотности энергии и времени воздействия лазерного излучения.

На рис. 5.14(б) представлена динамика фотообесцвечивания фотопорфирина Рpr, характеризующимся смещенными полосами поглощения, при лазерном возбуждении излучением с длиной волны $\lambda_{laser} = 660$ нм в его модифицированной Q-полосе на длине волны 668 нм. При более высокой плотности мощности 60 мВт/см² за счет увеличения потока фотонов происходило увеличение скорости заселения триплетного состояния с последующей передачей энергии молекулярному кислороду. Кинетика фотообесцвечивания демонстрирует схожий профиль, подобный фотообесцвечиванию РrIX: медленное начальное обесцвечивание при плотности энергии меньше 20 Дж/см², быстрое нарастание в диапазоне от 20 до 80 Дж/см² и насыщение при плотности энергии выше 100 Дж/см².

Спектры поглощения облученных образцов показали увеличение интенсивности полосы поглощения в диапазоне длин волн 650 – 670 нм и образованием пика на длине волны соответствующей 668 нм. Разностные спектры на рис. 5.15 получены путем вычитания спектров PpIX до облучения из спектра облученного образца при каждой плотности мощности. Разностные спектры показали увеличение поглощения на длинах волн 448 и 668 нм, что указывает на образование фотопродуктов. Увеличение интенсивности полосы поглощения на длине волны 668 нм принадлежит фотопродукту гидроксиальдегида хлоринового типа, фотопорфирина (Ppp) [104, 105, 106, 107]. Отмечена высокая интенсивность флуоресценции Ppp при возбуждении на длине волны 443 нм, что указывает на наличие полосы поглощения Ppp в диапазоне около 450 нм. Фотопорфирины хлоринового типа характеризуются наличием отличной от PpIX полосой поглощения в области 450 нм, что иногда используется для увеличения эффективности и контрастности 5-АЛК флуоресцентной навигации [108]. Воздействие лазерным излучением приводило к уменьшению интенсивности флуоресценции PpIX и сопровождалось появлением спектральной полосы на длине волны около 675 нм и «хвоста» в красной области спектра 710 – 780 нм [109].

Таким образом, можно предположить, что пик поглощения на длине волны 448 нм также принадлежит Ppp. Разностные спектры показывают, что образование Ppp благоприятствует более низкой плотности потока облучения, поскольку на спектре увеличение поглощения при длине волны 668 нм было заметно при облучении плотностью мощности $P_s = 40 \text{ мВт/см}^2$. При плотности мощности $P_s = 300 \text{ мВт/см}^2$ заметно уширение полосы поглощения в диапазоне 600 – 700 нм и увеличение поглощения при 448 нм.

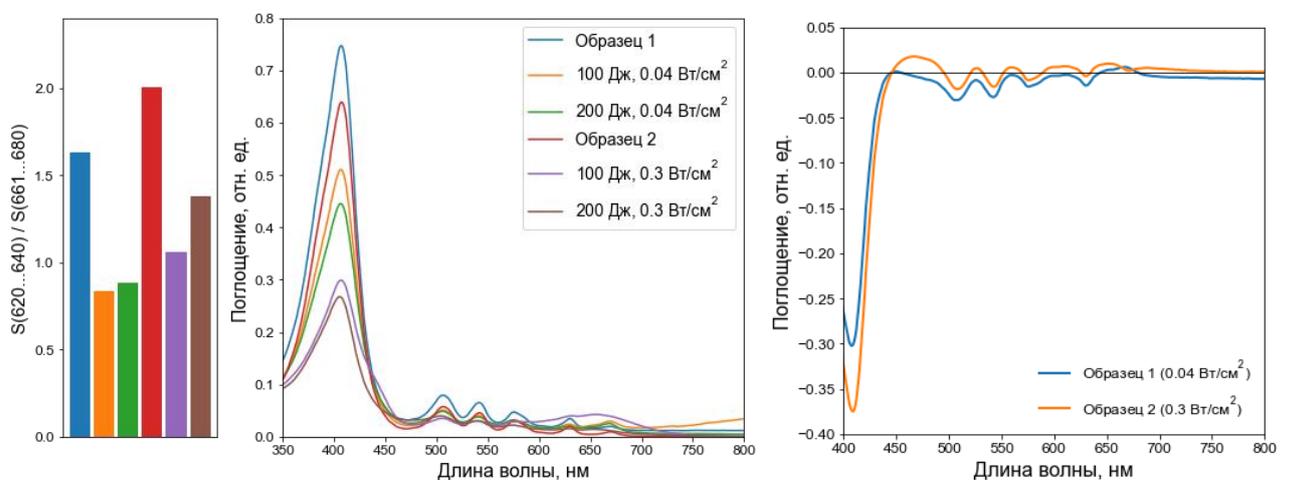


Рисунок 5.15 – Результаты измерения поглощения PpIX до и после фотодинамического воздействия. Образец PpIX 2 mg/kg + DMSO. При низкой плотности мощности пик поглощения в диапазоне 660 – 680 нм растет. Разностные спектры поглощения PpIX. Спектр ФС, полученный до облучения, был вычтен из спектров после облучения для получения разностных спектров.

В ходе фотодинамического воздействия заметно снижение полной флуоресценции PrIX и формирование пика флуоресценции в диапазоне длин волн 660 нм.

По мере облучения 635 нм лазером заметно снижение общей флуоресценции PrIX и образование пика флуоресценции в диапазоне 660 нм. Отношение интенсивности пика фотопродуктов к пикам флуоресценции PrIX увеличивается с ростом дозы энергии, получаемой образцом. При возбуждении лазерным излучением с длиной волны 443 нм пик фотопродуктов визуально различим сразу по достижении 20 Дж, в то же время в случае возбуждения 405 нм флуоресценция PrIX является доминирующей в сигнале и пик флуоресценции характерный фотопорфиру становится различим только по достижении 100 Дж. При этом значения гистограммы отношений вкладов в сигнал флуоресценции при возбуждении 443 нм выше, чем при возбуждении 405 нм.

После достижения дозы энергии 160 Дж образец облучали лазерным излучением с длиной волны 660 нм. Заметно значительное снижение пика флуоресценции на спектре в диапазоне 661 – 680 нм по достижении 20 Дж. Гистограмма показывает, что отношение интенсивности пика фотопродуктов к первому пику флуоресценции PrIX возрастает с ростом дозы энергии, получаемой образцом. Однако значения отношений ниже, чем при облучении 635 нм.

Таким образом, при диагностике с лазерным возбуждением 405 нм вклад флуоресценции фотопродуктов в сигнал меньше, чем при возбуждении с длиной волны 443 нм, что связано с более эффективным возбуждением PrIX по сравнению с Prp. При возбуждении 443 нм вклад флуоресценции фотопродуктов в сигнал больше. Это может быть связано с тем, что 443 нм свет более эффективен в возбуждении флуоресценции Prp за счет появления пика поглощения в этом диапазоне по мере облучения PrIX.

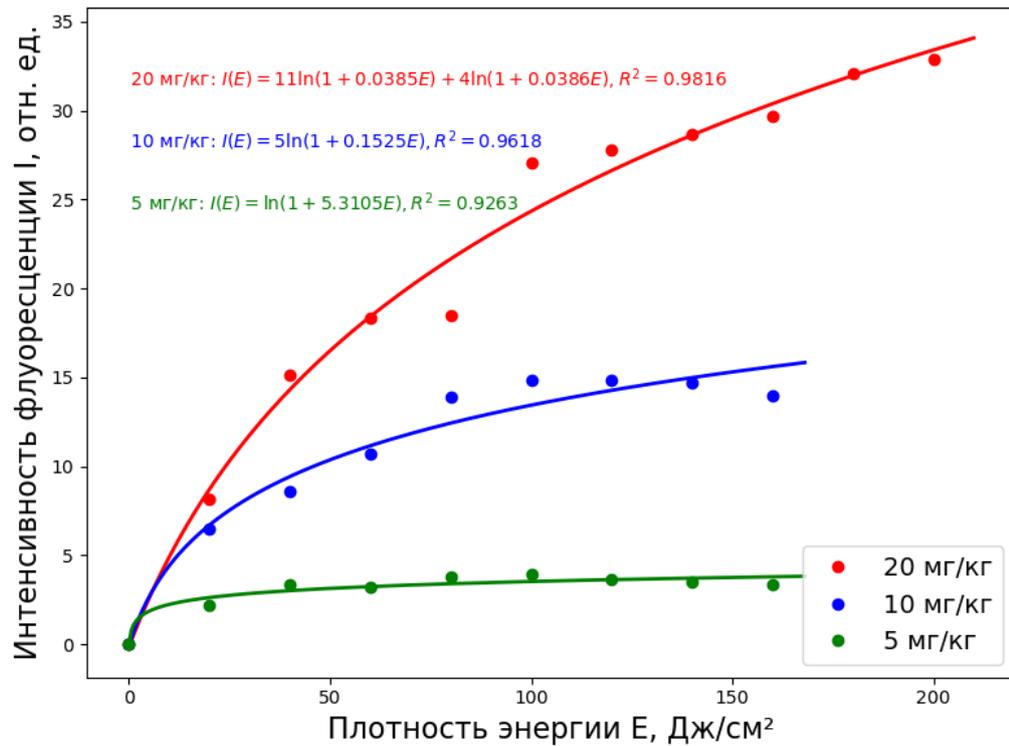


Рисунок 5.16 – Кинетика флуоресценции фотопродуктов Prr в образце опухоли ГМ с накопленным ФС в концентрациях 5, 10, 20 мг/кг при воздействии света 635 нм. Флуоресценцию измеряли при 673 нм при возбуждении 405 нм. Каждая точка данных представляет собой среднее значение из трех измерений и скорректирована с учетом обесцвечивания PpIX на длине волны измерения.

5.5. Результаты оценки накопления фотопродуктов PpIX при фотодинамической терапии кожных новообразований

В рамках исследования разработанный подход был апробирован на тканях кожи лица с доброкачественными новообразованиями кожи, дерматофибромы и врожденного меланоцитарного невуса.

Лечение пациентов методом ФДТ осуществляли в несколько этапов: 1) аппликационное нанесение препарата на кожу, 2) проведение спектрально-флуоресцентной диагностики для оценки динамики накопления препарата в патологически измененной ткани, 3) облучение лазерным излучением с длиной волны 635 нм и 660 нм с видео-флуоресцентным контролем участка кожи с повышенным содержанием ФС, 4) проведение спектрально-флуоресцентной диагностики после фотодинамического воздействия для оценки степени фотообесцвечивания PpIX и образования фотопорфирина Prr, 5) дополнительное облучение участка кожи с повышенным содержанием Prr лазерным излучением с длиной волны $\lambda_{\text{laser}} = 660$ нм, 6) оценка динамики изменения оксигенации гемоглобина в ткани до и после процедуры ФДТ.

На рис. 5.17 продемонстрирована схема исследования тканей новообразования кожи лица у пациентов. При проведении спектрально-флуоресцентного исследования использовали 20% водный раствор 5-АЛК, приготовленный непосредственно перед применением. Введение осуществлялось аппликационным методом, перед нанесением препарата кожа была очищена дистиллированной водой. Для предотвращения испарения препарата и улучшения его проникновения обработанную поверхность кожи покрывали пищевой пленкой.

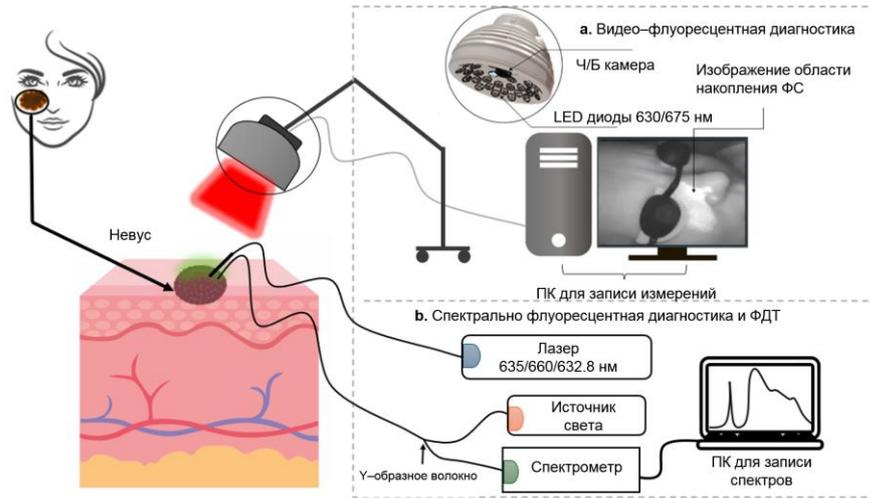


Рисунок 5.17 – Схема рабочего процесса исследования: а) Видеофлуоресцентная диагностика; б) Комплексная спектральная флуоресцентная диагностика и ФДТ.

Для установления эндогенной флуоресценции тканей перед введением ФС проводили спектрально-флуоресцентную диагностику тканей кожи (эталонное измерение кожи щеки) и кожного новообразования. В течение всего периода наблюдения за накоплением 5-АЛК-индуцированного РrIX (до 4 часов) пациент находился в затемненном помещении для минимизации воздействия внешнего света.

При спектрально-флуоресцентной диагностике измеряли спектры обратно-рассеянного лазерного излучения и флуоресценции ФС при мягком контакте оптоволоконного диагностического катетера с биологической тканью. Индекс флуоресценции ФС измеряли в центре опухоли кожи и ее периферии. Исследование динамики накопления 5-АЛК индуцированного РrIX проводили при лазерном возбуждении с длиной волны 405 и 632.8 нм. Данный подход позволил диагностировать поверхностные и более глубокие ткани [110]. На рис. 5.18 представлены регистрируемые спектральные данные накопления РrIX во всех исследуемых зонах пациента с дерматофибромой, включающие диффузно рассеянное лазерное излучение и флуоресценцию тканей.

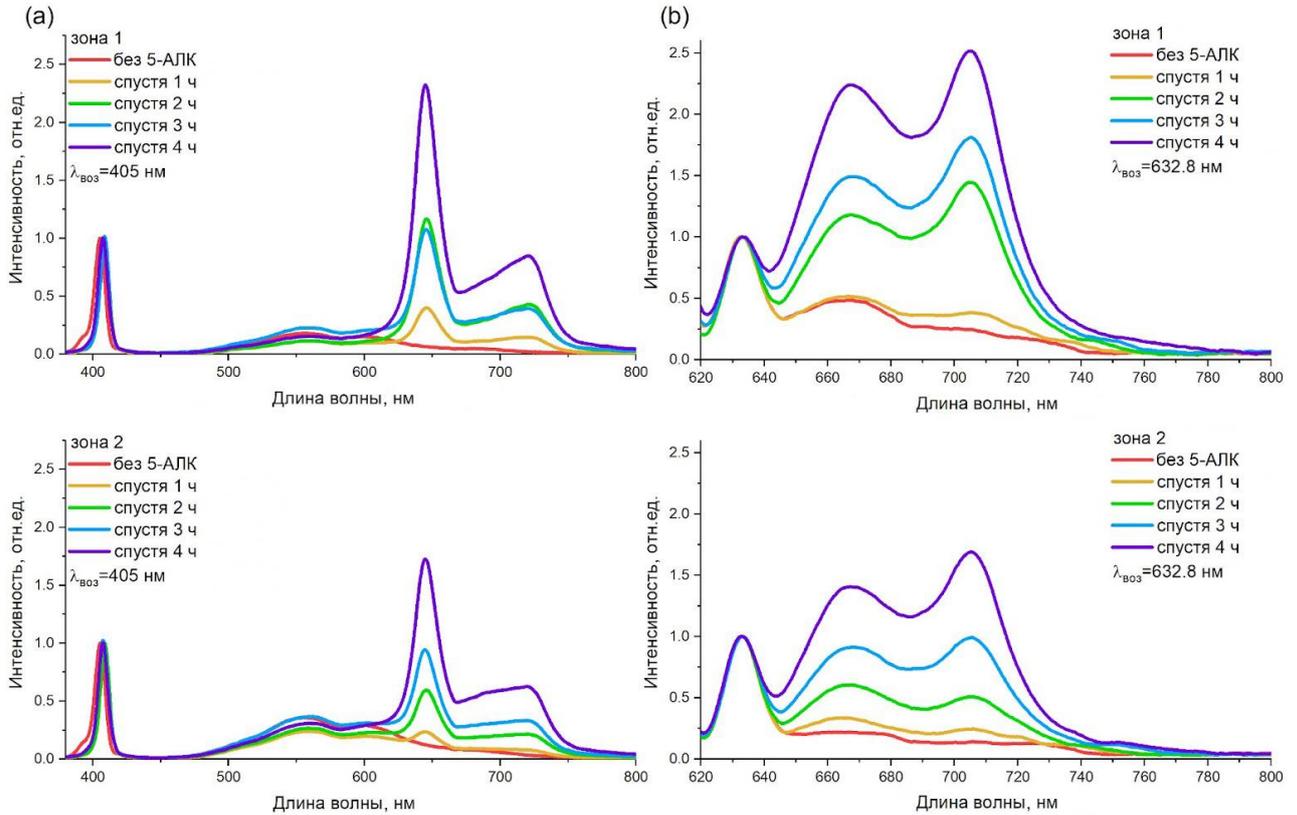


Рисунок 5.18 – Спектры полученные в результате диагностики, включающие диффузно-рассеянное лазерное излучение и флуоресценцию центральной зоны 1 опухоли кожи и приграничной зоны 2 образования после введения 5-АЛК: (а) возбуждение флуоресценции лазером с длиной волны $\lambda_{\text{воз}} = 405$ нм; (б) возбуждение флуоресценции лазером с длиной волны $\lambda_{\text{воз}} = 632.8$ нм. Спектры были нормированы на максимальное значение диффузно-рассеянного лазерного излучения.

По спектрам обратно-рассеянного лазерного излучения и флуоресценции, представленным на рис. 5.18, были рассчитаны индексы флуоресценции ФС. При $\lambda_{\text{laser}} = 405$ нм регистрировали два пика флуоресценции в области 625 – 670 нм и 700 – 740 нм, соответствующие пикам PrIX, а при $\lambda_{\text{laser}} = 632.8$ нм регистрировали пик флуоресценции в области 690 – 740 нм. На рис. 5.19 представлено распределение интегральных интенсивностей флуоресценции в указанных диапазонах. Из полученных результатов видно, что в течение 4 часов наблюдения после аппликационного введения 5-АЛК заметно увеличение накопления PrIX как в поверхностных (рис. 5.19 a,b), так и в более глубоких слоях тканей (рис. 5.19 c).

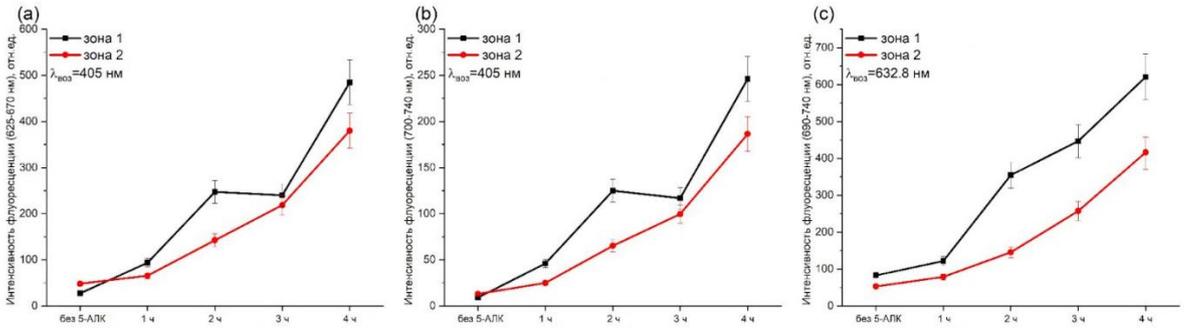


Рисунок 5.19 – Распределение интенсивностей флуоресценции центральной зоны 1 и приграничной зоны 2 образования: (а) интегральная интенсивность флуоресценции в области 625-670 нм, (б) интегральная интенсивность флуоресценции в области 700 – 740 нм, (с) интегральная интенсивность флуоресценции в области 690 – 740 нм.

После определения накопления РrIX в тканях опухоли кожи проводили ФДТ. Каждую зону исследования облучали лазерным излучением с диаметром пятна 10 мм. В случае если площадь новообразования была больше, чем диаметр пятна, проводили полипозиционную ФДТ в каждой области на поверхности кожи, где предварительно был определен максимум накопления РrIX. Кварцевое оптическое волокно с торцевым облучателем и полимерной оболочкой диаметром $d = 600$ мкм применяли для облучения областей опухоли кожи. Кожные новообразования были облучены непрерывным лазерным излучением ($\lambda_{laser} = 635$ нм) с плотностью мощности $P_s = 410$ мВт/см² и дозой энергии $E_s = 100$ Дж/см². В результате проведения ФДТ определено появление нового пика флуоресценции на спектре в области 670 – 700 нм при возбуждении $\lambda_{laser} = 405$ нм (рис. 5.20).

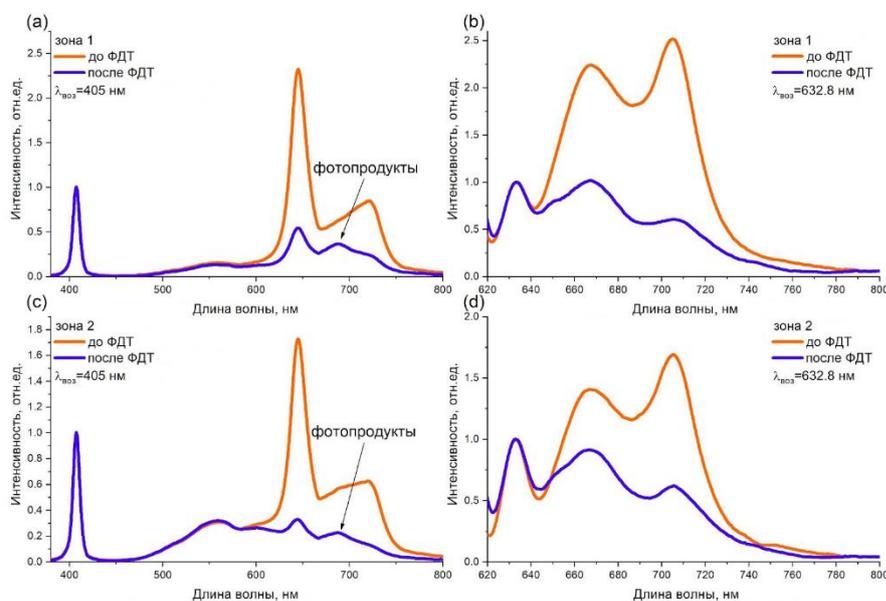


Рисунок 5.20 – Результаты спектрально-флуоресценонной диагностики в зоне 1 и зоне 2 пациента с дерматофибромой до и после ФДТ с лазерным облучением $\lambda_{laser} = 635$ нм. (а,б)

возбуждение флуоресценции лазерным излучением с длиной волны 405 нм, (с,d) возбуждение флуоресценции лазерным излучением с длиной волны 632.8 нм.

При появлении болевого эффекта лазерное излучение прекращали. Спустя 10-20 секунд после начала непрерывного облучения зафиксировано значительное усиление болевых ощущений, превышающее болевой порог, после чего провели облучение в импульсном режиме. Импульсное облучение патологически измененной ткани с накоплением РrIX способствует уменьшению болевых ощущений у пациентов в области светового воздействия [111]. Для минимизации воздействия на окружающие здоровые ткани перед импульсным облучением на область патологических тканей предварительно накладывали медицинскую повязку с вырезанным отверстием диаметром 10 мм. Для проведения импульсной ФДТ использовали импульсную систему на основе кольцевой ксеноновой газоразрядной лампы (ООО БИОСПЕК, Москва). Пациентам провели 10 – 12 последовательных импульсов со средней плотностью энергии 1 Дж/см² и суммарной дозой энергии 10 – 12 Дж/см². Применение импульсного режима позволило снизить болевые ощущения у пациентов при ФДТ тканей с накоплением РrIX.

По спектрам обратно-рассеянного лазерного излучения и флуоресценции, представленным на рис. 5.20, были рассчитаны индексы флуоресценции РrIX (рис. 5.21). Полученные данные демонстрируют максимум накопления ФС в зоне 2. Индекс флуоресценции РrIX по всем зонам новообразования кожи выше от 7 до 16 раз выше значения индекса флуоресценции ФС в здоровой ткани, выбранной в качестве нормы. После ФДТ заметно снижение индекса флуоресценции ФС по всем исследуемым зонам опухоли кожи.

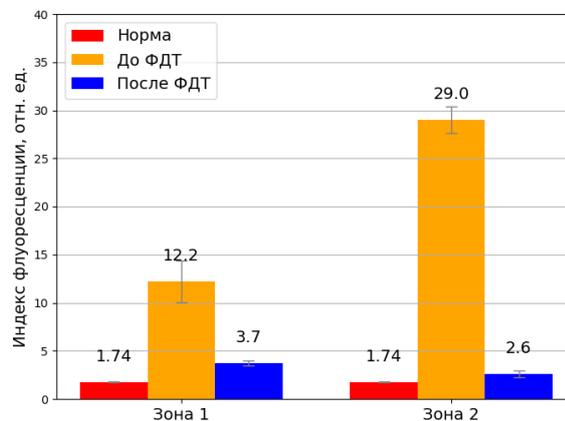


Рисунок 5.21 – Распределение индексов флуоресценции ФС центральной зоны 1 опухоли кожи и приграничной зоны 2 новообразования пациента с дерматофибромой.

На рис. 5.22 показаны значения фотообесцвечивания ФС по зонам дерматофибромы по сравнению с нормой. Фотообесцвечивание ФС относительно нормы составило в зоне 1 – 81%,

зоне 2 – 96%. Среднее значение фотообесцвечивания ФС по всем зонам опухоли кожи составило 88%.

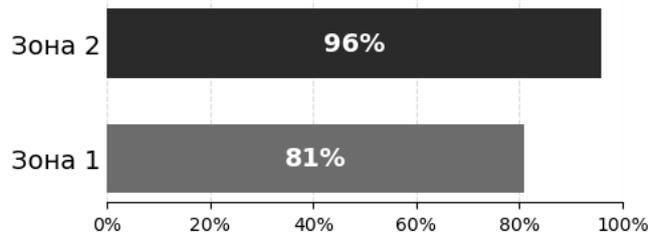


Рисунок 5.22 – Фотообесцвечивание ФС зон пациента с дерматофибромой кожи.

Ранее было показано, что лазерное облучение с длиной волны $\lambda_{laser} = 635$ нм и дозой энергии $E_s = 43$ Дж/см² опухолевых клеток кожи (Human adenocarcinoma cells) с накопленным РрIX приводит к образованию фотодинамически активных фотопродуктов, которые флуоресцируют с небольшим коротковолновым смещением и характеризуются, как смесь фотопорфиринов хлоринового типа [109]. Было отмечено, что основным фотопродуктом в этой смеси является фотопорфирин, который представляет собой два гидроксильных изомера хлоринового типа и имеет флуоресценцию в диапазоне 670 – 690 нм.

После ФДТ в зоне 1 и зоне 2 также регистрировали увеличение интенсивности флуоресценции тканей в области 670 – 700 нм. Фотопродукты РрIX обладают фотодинамической активностью и могут быть использованы при 5-АЛК-ФДТ. Квантовый выход синглетного кислорода для фотопорфирина составляет 0.69 [112]. Для оценки вклада флуоресценции Ррr в регистрируемый сигнал был рассчитан индекс флуоресценции фотопорфирина Ррr как отношение интегральных интенсивностей флуоресценции в диапазоне 625 – 670 нм и 670 – 700 нм (рис. 5.23).

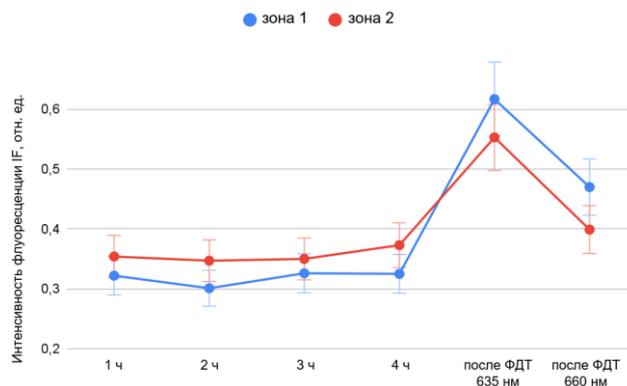


Рисунок 5.23 – Изменение флуоресценции фотопродуктов Ррr в процессе накопления 5-АЛК индуцированного РрIX, а также ФДТ с лазерным облучением $\lambda_{laser} = 635$ нм (плотность мощности $P_s = 380$ мВт/см², доза энергии $E_s = 100$ Дж/см²).

Для исследования динамики накопления фотопродуктов Ppp после ФДТ проводили спектрально-флуоресцентную диагностику с лазерным возбуждением $\lambda_{laser} = 660$ нм для достижения увеличенной глубины проникновения в ткань с регистрированием длинноволнового плеча флуоресценции в БИК-диапазоне 725 – 800 нм. После спектрально-флуоресцентной диагностики и анализа накопления фотопродуктов Ppp проводили ФДТ непрерывным лазерным излучением ($\lambda_{laser} = 660$ нм) с плотностью мощности $P_s = 320$ мВт/см² и дозой энергии $E_s = 50$ Дж/см². Снижение интенсивности флуоресценции I_{Ppp} в результате ФДТ подтверждалось результатами спектрально-флуоресцентной диагностики с возбуждением $\lambda_{laser} = 660$ нм с регистрацией длинноволнового плеча флуоресценции в ближнем инфракрасном диапазоне 725 – 800 нм (рис. 5.24).

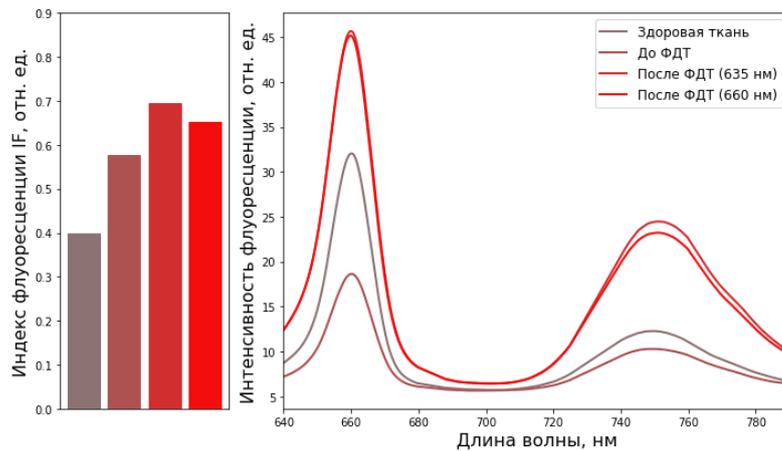


Рисунок 5.24 – Спектрально-флуоресцентная диагностика фотопродуктов Ppp до и после 5-АЛК опосредованной ФДТ. Индекс флуоресценции рассчитывался как отношение интенсивности диффузно рассеянного лазерного излучения в диапазоне 650 – 670 нм к интенсивности флуоресценции в диапазоне 720 – 780 нм.

У пациентки с гиперпигментацией кожи в процессе исследования наблюдали схожую динамику накопления 5-АЛК индуцированного PpIX, спустя 1 час после аппликационного введения 5-АЛК регистрировали интенсивное накопление PpIX как в зонах с повышенным содержанием меланоцитов (зоны 1 – 3), так и в зоне, относительно свободной от меланоцитов (зона 4). При лазерном возбуждении $\lambda_{laser} = 405$ нм регистрировали два интенсивных пика в области 625 – 670 нм и 700 – 740 нм, а при $\lambda_{laser} = 632.8$ регистрировали пик флуоресценции в области 690 – 740 нм. На рис. 5.25 представлено распределение интегральных интенсивностей флуоресценции в указанных диапазонах. В отличие от тканей дерматофибромы, полученные результаты показали, что в поверхностных тканях (при $\lambda_{laser} = 405$ нм) исследуемых зон 3 и 4 максимум накопления PpIX регистрировали спустя 3 часа после аппликационного введения 5-

АЛК (рис. 5.25 а,б). При этом в более глубоких слоях (при $\lambda_{laser} = 632.8$) регистрировали увеличение накопления 5-АЛК индуцированного РrIX спустя 4 часа после введения (Рис. 5.25 с).

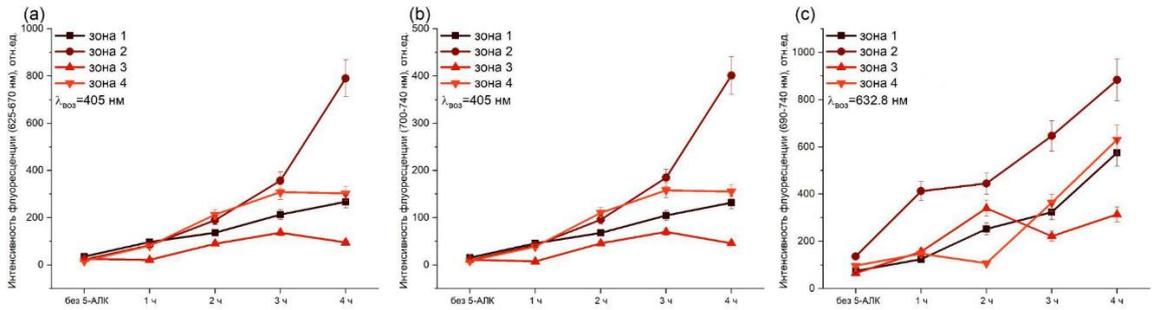


Рисунок 5.25 – Распределение интегральных интенсивностей флуоресценции тканей меланоцитарного невуса в зонах с повышенным содержанием меланоцитов (зоны 1 – 3) и в зоне, относительно свободной от меланоцитов (зона 4): а – в диапазоне 625 – 670 нм; б – в диапазоне 700 – 740 нм; с – в диапазоне 690 – 740 нм.

В зонах накопления РrIX проводили ФДТ лазерным излучением с длиной волны $\lambda_{laser} = 635$ нм. В результате наблюдали фотообесцвечивание РrIX как в поверхностных, так и в более глубоких слоях тканей (рис. 5.26).

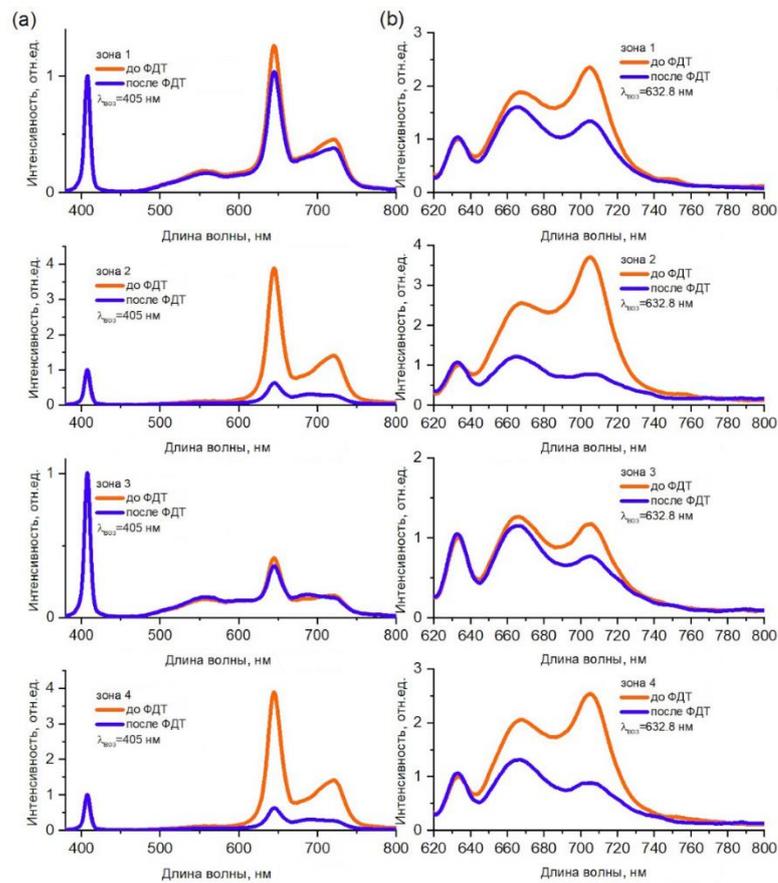


Рисунок 5.26 – Результаты спектрально-флуоресцентной диагностики меланоцитарного невуса в зонах с повышенным содержанием меланоцитов (зоны 1 – 3) и в зоне, относительно

свободной от меланоцитов (зона 4): (а) до ФДТ (спустя 4 ч. После введения 5-АЛК), (б) после ФДТ.

По спектрам обратно-рассеянного лазерного излучения и флуоресценции, представленным на рис. 5.26, были аналогично рассчитаны индексы флуоресценции PpIX (рис. 5.27). Полученные данные демонстрируют максимум накопления ФС в зоне 2. Индекс флуоресценции PpIX по всем зонам новообразования кожи от 7 до 80 раз выше значения индекса флуоресценции ФС в здоровой ткани, выбранной в качестве нормы. После ФДТ заметно снижение индекса флуоресценции ФС по всем исследуемым зонам меланоцитарного невуса.

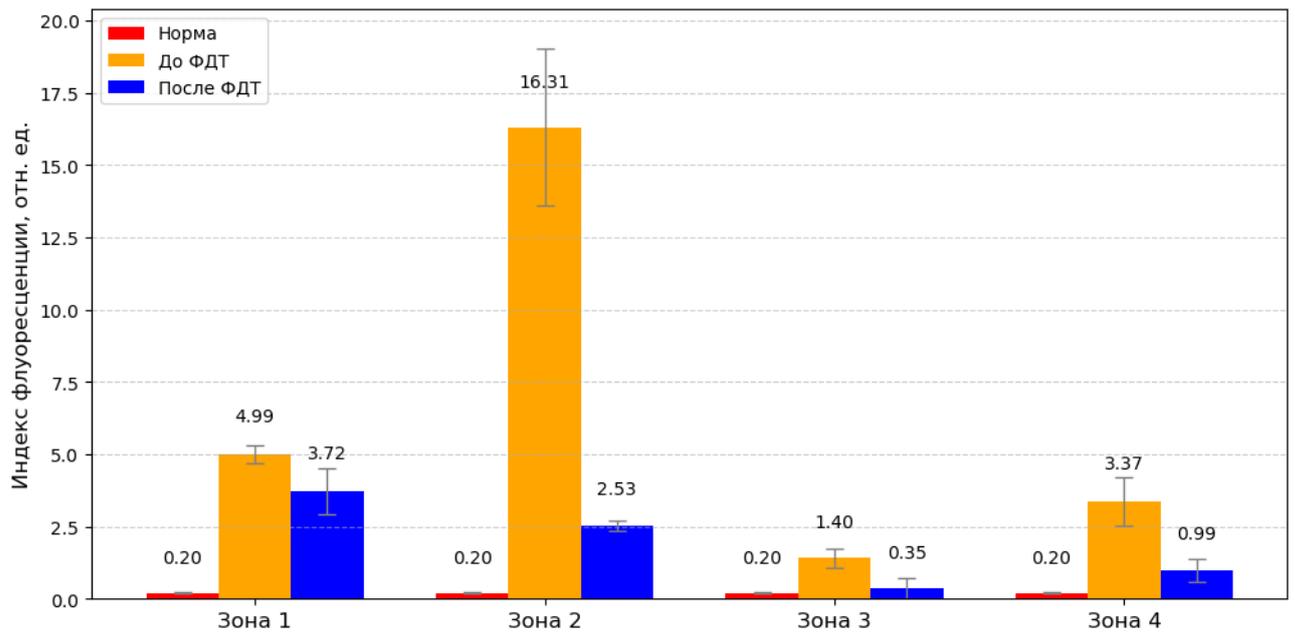


Рисунок 5.27 Распределение индексов флуоресценции ФС зоны с повышенным содержанием меланоцитов (зоны 1 – 3) и в зоне, относительно свободной от меланоцитов (зона 4), пациента с меланоцитарным невусом.

На рис. 5.28 показаны значения фотообесцвечивания ФС по зонам меланоцитарного невуса по сравнению с нормой. Фотообесцвечивание ФС относительно нормы составило в зоне 1 – 25%, в зоне 2 за счет максимального накопления PpIX в этой зоне – 84%, в зонах 3 и 4 от 71% до 75%. Среднее значение фотообесцвечивания ФС по всем зонам опухоли кожи составило 63%.

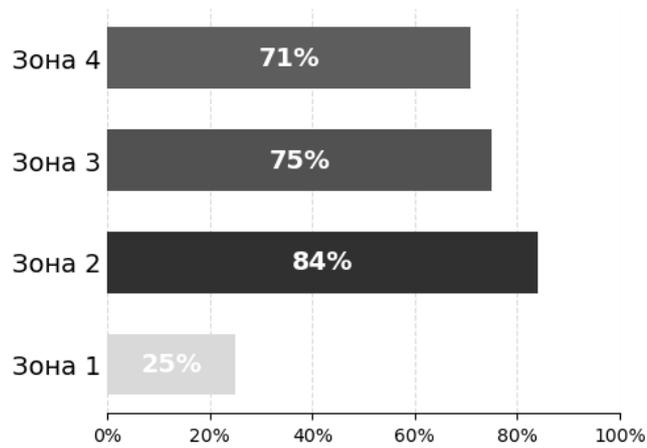


Рисунок 5.28 Фотообесцвечивание ФС в зонах 1 – 4 пациента с меланоцитарном невусом.

После проведения ФДТ во всех исследуемых зонах меланоцитарного невуса наблюдали образование фотопорфирина Prr (рис. 5.26). При этом корреляция между интенсивностью образования фотопорфирина Prr и интенсивностью накопления PpIX отсутствовала (рис. 5.29).

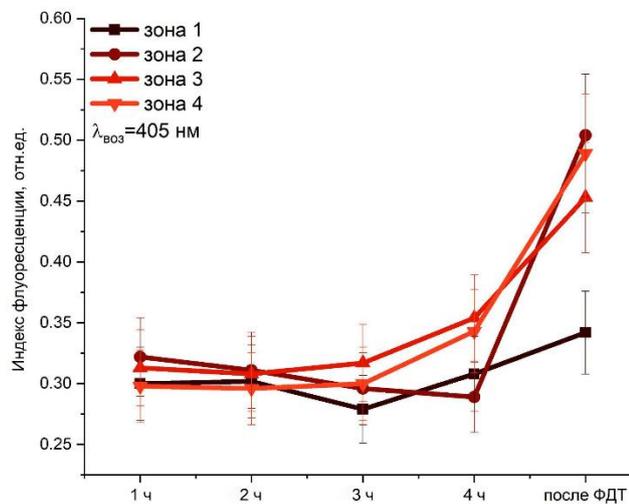


Рисунок 5.29 Изменение флуоресценции фотопродуктов хлоринового типа в процессе накопления 5-АЛК-индуцированного PpIX и после проведения ФДТ меланоцитарного невуса ($\lambda_{laser} = 635$ нм, плотность мощности $P_s = 380$ мВт/см², доза энергии $E_s = 100$ Дж/см²).

Степень накопления PpIX в зоне опухоли кожи последовательно измеряли методами видео-флуоресцентной диагностики и спектрально-флуоресцентной диагностики через 1 и 2 часа после нанесения препарата 5-АЛК (рис. 5.30). Во время видео-флуоресцентной диагностики записывали фотоизображения, видео файлы и оценивали степень накопления PpIX по измеренному индексу флуоресценции ФС в исследуемых зонах. Индекс флуоресценции ФС измеряли в центре и на границах новообразования. После ФДТ проводили спектрально-флуоресцентную диагностику и

видео-флуоресцентную диагностику в каждой исследуемой зоне опухоли кожи и определяли степень фотообесцвечивания РrIX.

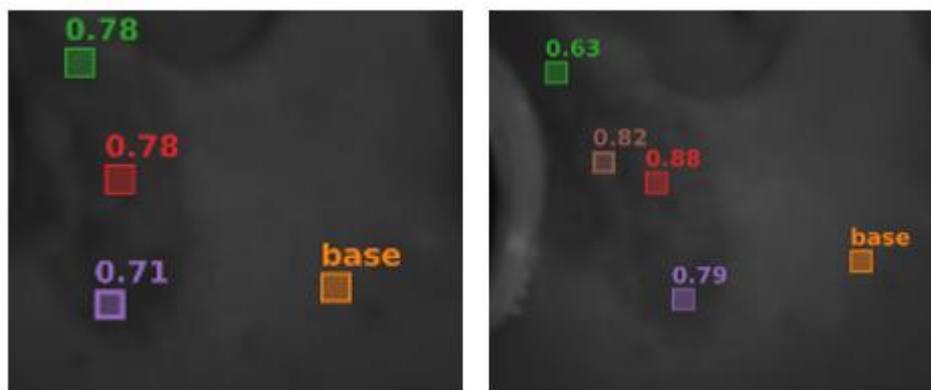


Рисунок 5.30 Результаты видео-флуоресцентной диагностики во всех зонах, зарегистрированные после нанесения препарата и спустя 3 часа накопления

На рис. 5.31 представлены изображения врожденного меланоцитарного невуса с указанием зон, в которых проводилась спектрально-флуоресцентная диагностика. Измерения проводили в нескольких точках измерения относительно новообразования, для повышения степени достоверности измерений проводили измерения в трех соседних позициях на одном уровне, расстояние между которыми составило 1 мм.



а



б

Рисунок 5.31 Новообразование с указанием зон пациента с врожденным меланоцитарным невусом, где проводили флуоресцентные исследования а) зоны 1 – 3 являются областями с повышенным содержанием меланоцитов; зона 4 – область свободная от меланоцитов, б) Изображение невуса пациента до и после ФДТ.

Заключение к главе 5

Методика спектроскопической оценки оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном русле ткани позволяет определить качество сшиваемых тканей по значению оксигенации гемоглобина в диапазоне длин волн 500 – 600 нм в крови с учетом вкладов рассеяния Ми и Рэлея на распространение сигнала в биологической среде. Разработанная методика спектрально-флуоресцентного определения фотопродуктов РrIX при ФДТ и оценки 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.

Заключение

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/см².
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 Еб. 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 сокращений

ОП – оптическая плотность,
ТПИ – теория переноса излучения,
АФК – активные формы кислорода,
ФДТ – фотодинамическая терапия,
ФД – флуоресцентная диагностика,
ФС – фотосенсибилизатор,
РrIX – протопорфирин 9,
5-АЛК – 5-аминолевулиновая кислота,
Се6 – хлорин Е6,
TPS – талапорфин натрия,
СВП – средняя выживаемость без прогрессирования,
СРО – средняя резекция опухоли,
ГМ – головной мозг,
StO₂ – оксигенация гемоглобина в тканях,
ЛИ – лазерное излучение,
БИК – ближний инфракрасный диапазон,
ОДО – обратное диффузное отражение,
МК – метод Монте–Карло,
ЦСЖ – Цереброспинальная жидкость,
ДО – диффузное отражение,
САК – сосково-ареолярный комплекс,
Ррр – фотопорфирин.

Список литературы

1. Синичкин, Ю. П. In vivo отражательная и флуоресцентная спектроскопия кожи человека / Ю. П. Синичкин, С. Р. Утц // Саратов: Изд-во Сарат. ун-та. – 2001.
2. Владимиров, Ю. А. Физико-химические основы фотобиологических процессов / Ю. А. Владимиров, А. Я. Потапенко // Дрофа. – 2006.
3. Obrig, H. Beyond the visible—imaging the human brain with light / H. Obrig, A. Villringer // Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 2003. – Т. 23. – № 1. – С. 1–18.
4. Huong, A. Towards skin tissue oxygen monitoring: an investigation of optimal visible spectral range and minimal spectral resolution. / A. Huong, K. G. Tay, X. Ngu // Univers. J. Electr. Electron. Eng. – 2019. – Т. 6. – № 5. – С. 49–54.
5. León-Carrión, J. Functional near-infrared spectroscopy (fNIRS): principles and neuroscientific applications. / J. León-Carrión, U. León-Domínguez // Neuroimaging methods. – 2012. – С. 48–74.
6. Estimation of the hemoglobin concentration and the anatomic structure of muscle by analyzing the near infrared scattering images. / Y.U. Ri, Y.H. Pyon, H.H. Ri, K.R. Sin // Biomedical Signal Processing and Control. – 2020. – Т. 61. – С. 102058.
7. Estimation of optical pathlength through tissue from direct time of flight measurement. / D.T. Delpy, M. Cope, P. van der Zee, S. Arridge, S. Wray, J.S. Wyatt [et al.] // Physics in Medicine & Biology. – 1988. – Т. 33. – № 12. – С. 1433–1442.
8. Исимару, А. Распространение и рассеяние волн в случайно-неоднородных средах. / А. Исимару // Мир. – 1981. – Т. 1.
9. Prahl, S. A. Monte Carlo model of light propagation in tissue / S. A. Prahl // Dosimetry of laser radiation in medicine and biology. – 1989. – Т. 10305. – С. 105–114.
10. Mueller, G. J. Medical Optical Tomography: Functional Imaging and Monitoring / G. J. Mueller // SPIE Optical Engineering Press. – 1993. – Т. 11.
11. Ultrahigh resolution spectral-domain optical coherence tomography using the 1000–1600 nm spectral band / L. Bernstein, A. Ramier, J. Wu, V.D. Aiello, M.J. Béland, C.P. Lin, S.H. Yun [et al.] // Biomedical Optics Express. – 2022. – Т. 13. – № 4. – С. 1939–1947.
12. Yamanaka, M. High-power supercontinuum generation using high-repetition-rate ultrashort-pulse fiber laser for ultrahigh-resolution optical coherence tomography in 1600 nm spectral band / M. Yamanaka, H. Kawagoe, N. Nishizawa // Applied Physics Express. – 2016. – Т. 9 – № 2. – С. 022701.
13. Ultrahigh-resolution optical coherence tomography in 1.7 μm region with fiber laser supercontinuum in low-water-absorption samples / S. Ishida, N. Nishizawa, T. Ohta, K. Itoh // Applied physics express. – 2011. – Т. 4. – № 5. – С. 052501.
14. Ishida, S. Quantitative comparison of contrast and imaging depth of ultrahigh-resolution optical coherence tomography images in 800–1700 nm wavelength region / S. Ishida, N. Nishizawa // Biomedical optics express. – 2012. – Т. 3. – № 2. – С. 282–294.

15. Development of a high power supercontinuum source in the 1.7 μm wavelength region for highly penetrative ultrahigh-resolution optical coherence tomography / H. Kawagoe, S. Ishida, M. Aramaki, Y. Sakakibara, E. Omoda, H. Kataura, N. Nishizawa [et al.] // *Biomedical optics express*. – 2014. – Т. 5. – № 3. – С. 932–943.
16. Butorina, D.N. Effect of blood plasma on laser-excited singlet oxygen phosphorescence in aqueous buffer solutions of water-soluble porphyrins / D.N. Butorina, M.E. Bashtanov, A.A. Krasnovsky Jr, A.V. Prieszev // *SPIE Proceedings*. – 2000. – Т. 4001. – С. 385–389.
17. Рябова, А.В. Комбинированный спектроскопический метод анализа эффективности сенсбилизаторов в биологических объектах / А.В. Рябова // Дис. канд. физ.-мат. наук: 01.04.21, Институт общей физики им. АМ Прохорова Российской академии наук. – 2006.
18. Rocha, L.G.B. Development of a Novel Photosensitizer for Photodynamic Therapy of Cancer / L.G.B. Rocha // Ph.D. Thesis, University of Coimbra (Portugal). – 2015.
19. Rodrigues, J.A.O. Therapy in Invasive Medical Devices with Image / J.A.O. Rodrigues // Ph.D. Thesis, University of Minho. – 2019.
20. Photodynamic therapy for cancer: role of natural products / B. Mansoori, A. Mohammadi, M.A. Doustvandi, F. Mohammadnejad, F. Kamari, M.F. Gjerstorff, B. Baradaran, M.R. Hamblin [et al.] // *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. – 2019. – Т. 26. – С. 395–404.
21. Poulson, R.O. The enzymic conversion of protoporphyrinogen IX to protoporphyrin IX in mammalian mitochondria / R.O. Poulson // *Journal of Biological Chemistry*. – 1976. – Т. 251. – № 12. – С. 3730–3733.
22. Fukuda, H. Aminolevulinic acid: from its unique biological function to its star role in photodynamic therapy / H. Fukuda, A. Casas, A. Batlle // *The international journal of biochemistry & cell biology*. – 2005. – Т. 37. – № 2. – С. 272–276.
23. Mairbäurl, H. Oxygen transport by hemoglobin / H. Mairbäurl, R. E. Weber // *Comprehensive physiology*. – 2012. – Т. 2. – № 2. – С. 1463–1489.
24. Experimental investigation of a combinational iron chelating protoporphyrin IX prodrug for fluorescence detection and photodynamic therapy / A. Magnussen, C. Reburn, A. Perry, M. Wood, A. Curnow [et al.] // *Lasers in Medical Science*. – 2022. – Т. 37. – № 2. – С. 1155–1166.
25. Photodetection of early human bladder cancer based on the fluorescence of 5-aminolaevulinic acid hexylester-induced protoporphyrin IX: a pilot study / N. Lange, P. Jichlinski, M. Zellweger, M. Forrer, A. Marti, L. Guillou, P. Kucera, G. Wagnières, H. van den Bergh [et al.] // *British journal of cancer*. – 1999. – Т. 80. – № 1. – С. 185–193
26. Transurethral resection and surveillance of bladder cancer supported by 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence endoscopy / M. Kriegmair, D. Zaak, H. Stepp, R. Baumgartner, R. Knuechel, A. Hofstetter [et al.] // *European urology*. – 1999. – Т. 36. – № 5. – С. 386–392.
27. 405 nm versus 633 nm for protoporphyrin IX excitation in fluorescence-guided stereotactic biopsy of brain tumors / N. Markwardt, N.A. Haj-Hosseini, B. Hollnburger, H. Stepp, P. Zelenkov, A.J. Rühm [et al.] // *Journal of biophotonics*. – 2016. – Т. 9. – № 9. – С. 901–912.

28. Comparative study of tissue distribution of chlorin e6 complexes with amphiphilic polymers in mice with cervical carcinoma / M.V. Shirmanova, A.I. Gavrina, N.A. Aksenova, N.N. Glagolev, A.B. Solovieva, B.E. Shakhov, E.V. Zagaynova [et al.] // *Journal of analytical and bioanalytical techniques*. – 2014. – T. 1. – № 8.
29. Detty, M.R. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy / M.R. Detty, S.L. Gibson, S.J. Wagner // *Journal of medicinal chemistry*. – 2004. – T. 47. – № 16. – C. 3897–3915.
30. Fluorescence imaging and phototoxicity effects of new formulation of chlorin e6-polyvinylpyrrolidone / W.W.L. Chin, W.K.O. Lau, P.W.S. Heng, R. Bhuvaneswari, M.J. Olivo [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2006. – T. 84. – № 2. – C. 103–110.
31. Photodynamic Therapy in Oncology / M. Triesscheijn, P. Baas, J.H.M. Schellens, F.A. Stewart // *The oncologist*. – 2006. – T. 11. – № 9. – C. 1034–1044.
32. Effects of chlorin e6-mediated photodynamic therapy on human colon cancer SW480 cells / Y. Li, Y. Yu, L. Kang, Y. Lu // *International journal of clinical and experimental medicine*. – 2014. – T. 7. – № 12. – C. 4867–4876.
33. Black Phosphorus Nanosheets Immobilizing Ce6 for Imaging-Guided Photothermal/Photodynamic Cancer Therapy / X. Yang, D. Wang, Y. Shi, J. Zou, Q. Zhao, Q. Zhang, W. Huang, J. Shao, X. Xie, X. Dong [et al.] // *ACS applied materials & interfaces*. – 2018. – T. 10. – № 15. – C. 12431–12440.
34. Versatile Prodrug Nanoparticles for Acid-Triggered Precise Imaging and Organelle-Specific Combination Cancer Therapy / B. Feng, F. Zhou, Z. Xu, T. Wang, D. Wang, J. Liu, Y. Fu, Q. Yin, Z. Zhang, H. Yu, Y. Li [et al.] // *Advanced Functional Materials*. – 2016. – T. 26. – № 41. – C. 7431–7442.
35. Cramer, S.W. Photodynamic therapy for the treatment of glioblastoma / S.W. Cramer, C.C. Chen // *Frontiers in surgery*. – 2020. – T. 6. – C. 81.
36. Microphotonic needle for minimally invasive endoscopic imaging with sub-cellular resolution / M.A. Tadayon, I. Pavlova, K.M. Martyniuk, A. Mohanty, S.P. Roberts, F. Barbosa, C.A. Denny, M. Lipson [et al.] // *Scientific reports*. – 2018. – T. 8. – № 1. – C. 10756.
37. In vivo fiber-optic confocal reflectance microscope with an injection-molded plastic miniature objective lens / K. Carlson, M. Chidley, K.B. Sung, M. Descour, A. Gillenwater, M. Follen, R. Richards-Kortum [et al.] // *Applied optics*. – 2005. – T. 44. – № 10. – C. 1792–1797.
38. In vivo brain imaging using a portable 3.9 gram two-photon fluorescence microendoscope / B.A. Flusberg, J.C. Jung, E.D. Cocker, E.P. Anderson, M.J. Schnitzer [et al.] // *Optics letters*. – 2005. – T. 30. – № 17. – C. 2272–2274.
39. Barretto, R.P. In vivo fluorescence imaging with high-resolution microlenses / R.P. Barretto, B. Messerschmidt, M.J. Schnitzer // *Nature methods*. – 2009. – T. 6. – № 7. – C. 511–512.
40. In vivo minimally invasive interstitial multi-functional microendoscopy / A. Shahmoon, S. Aharon, O. Kruchik, M. Hohmann, H. Slovin, A. Douplik, Z. Zalevsky [et al.] // *Scientific reports*. – 2013. – T. 3. – № 1. – C. 1805.
41. Use of an endoscope-compatible probe to detect colonic dysplasia with Fourier transform infrared spectroscopy / M.A. Mackanos, J. Hargrove, R. Wolters, C.B. Du, S. Friedland, R.M. Soetikno, C.H.

- Contag, M.R. Arroyo, J.M. Crawford, T.D. Wang [et al.] // *Journal of biomedical optics*. – 2009. – T. 14. – № 4. – C. 044006.
42. Fiber optic probe for polarized reflectance spectroscopy in vivo: design and performance / A.V. Myakov, L. Nieman, L. Wicky, U. Utzinger, R. Richards-Kortum, K. Sokolov [et al.] // *Journal of biomedical optics*. – 2002. – T. 7. – № 3. – C. 388-397.
43. Fiber-Optic Theranostics (FOT): Interstitial Fiber-Optic Needles for Cancer Sensing and Therapy / Y. Ran, Z. Xu, M. Chen, W. Wang, Y. Wu, J. Cai, J. Long, Z.S. Chen, D. Zhang, B.O. Guan [et al.] // *Advanced Science*. – 2022. – T. 9. – № 15. – C. 2200456.
44. Application of functional near-infrared spectroscopy in psychiatry / A.C. Ehlis, S. Schneider, T. Dresler, A.J. Fallgatter // *NeuroImage*. – 2014. – T. 85. – C. 478–488.
45. Jean-Pierre, P. Integrating functional near-infrared spectroscopy in the characterization, assessment, and monitoring of cancer and treatment-related neurocognitive dysfunction / P. Jean-Pierre // *NeuroImage*. – 2014. – T. 85. – C. 408–414.
46. Continuous monitoring of cerebral oxygen saturation in elderly patients undergoing major abdominal surgery minimizes brain exposure to potential hypoxia / A. Casati, G. Fanelli, P. Pietropaoli, R. Proietti, R. Tufano, G. Danelli, G. Fierro, G. De Cosmo, G. Servillo [et al.] // *Anesthesia & Analgesia*. – 2005. – T. 101. – № 3. – C. 740–747.
47. Intraoperative measurement of bowel oxygen saturation using a multispectral imaging laparoscope / N.T. Clancy, S. Arya, D. Stoyanov, M. Singh, G.B. Hanna, D.S. Elson [et al.] // *Biomedical optics express*. – 2015. – T. 6. – № 10. – C. 4179–4190.
48. Oxyhemoglobin-monitoring photodynamic theranostics with an 808 nm-excited upconversion optical nanoagent / W. Fang, Y. Wei, Y. Ye, T. Zhang, D. Xing [et al.] // *Chemical Engineering Journal*. – 2018. – T. 350. – C. 108–119.
49. The role of oxygen in wound healing: a review of the literature / P.G. Rodriguez, F.N. Felix, D.T. Woodley, E.K. Shim // *Dermatologic surgery*. – 2008. – T. 34. – № 9. – C. 1159–1169.
50. Oxygen Penetration through Full-Thickness Skin by Oxygen-Releasing Sutures for Skin Graft Transplantation / W. Zai, Y. Yuan, L. Kang, J. Xu, Y. Hu, L. Kang, J. Wu [et al.] // *Engineering*. – 2023. – T. 29. – C. 83–94.
51. Tissue oximetry monitoring in microsurgical breast reconstruction decreases flap loss and improves rate of flap salvage / S.J. Lin, M.D. Nguyen, C. Chen, S. Colakoglu, M.S. Curtis, A.M. Tobias, B.T. Lee [et al.] // *Plastic and reconstructive surgery*. – 2011. – T. 127. – № 3. – C. 1080–1085.
52. Intraoperative measurement of bowel oxygen saturation using a multispectral imaging laparoscope / N.T. Clancy, S. Arya, D. Stoyanov, M. Singh, G.B. Hanna, D.S. Elson [et al.] // *Biomedical optics express*. – 2015. – T. 6. – № 10. – C. 4179–4190.
53. Quantitative optical spectroscopy: a robust tool for direct measurement of breast cancer vascular oxygenation and total hemoglobin content in vivo / J.Q. Brown, L.G. Wilke, J. Geradts, S.A. Kennedy, G.M. Palmer, N. Ramanujam [et al.] // *Cancer Research*. – 2009. – T. 69. – № 7. – C. 2919–2926.

54. Towards the use of diffuse reflectance spectroscopy for real-time in vivo detection of breast cancer during surgery / L.L. De Boer, T.M. Bydlon, F. Van Duijnhoven, M.J. Vranken Peeters, C.E. Loo, G.A. Winter-Warnars, J. Sanders, H.J. Sterenborg, B.H. Hendriks, T.J. Ruers [et al.] // *Journal of translational medicine*. – 2018. – Т. 16. – № 1. – С. 367.
55. Di Ninni, P. Intralipid: towards a diffusive reference standard for optical tissue phantoms / P. Di Ninni, F. Martelli, G. Zaccanti // *Physics in Medicine & Biology*. – 2010. – Т. 56. – № 2. – С. N21.
56. Chromophore concentrations, absorption and scattering properties of human skin in-vivo / S.H. Tseng, P. Bargo, A. Durkin, N. Kollias // *Optics express*. – 2009. – Т.17. – № 17. – С. 14599–14617.
57. Loschenov, V.B. Photodynamic therapy and fluorescence diagnostics / V.B. Loschenov, V.I. Konov, A.M. Prokhorov // *LASER PHYSICS-LAWRENCE-*. – 2000. – Т. 10. – № 6. – С. 1188–1207.
58. Использование спектроскопии обратного диффузного отражения света для мониторинга состояния тканей при фотодинамической терапии / А.А. Стратонников, Г.А. Меерович, А.В. Рябова, Т.А. Савельева, В.Б. Лощенов [и др.] // *Квантовая электроника*. – 2006. – Т. 36. – № 12. – С. 1103–1110.
59. Stratonnikov, A.A. Evaluation of blood oxygen saturation in vivo from diffuse reflectance spectra / A.A. Stratonnikov, V.B. Loschenov // *Journal of biomedical optics*. – 2001. – Т. 6. – №4. – С. 457–467.
60. Prahl, S.A. A Monte Carlo model of light propagation in tissue / S.A. Prahl // *Dosimetry of laser radiation in medicine and biology*. – 1989. – Т. 10305. – С. 105–114.
61. Wang, L. MCML—Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues. / L. Wang, S.L. Jacques, L. Zheng // *Computer methods and programs in biomedicine*. – 1995. – Т. 47. – №2. – С. 131–146.
62. Scattered and fluorescent photon track reconstruction in a biological tissue. / M.N. Kholodtsova, P.V. Grachev, T.A. Savelieva, N.A. Kalyagina, W. Blondel, V.B. Loschenov [et al.] // *International Journal of Photoenergy*. – 2014. – №1. – С. 517510.
63. Feng, S. Photon migration in the presence of a single defect: a perturbation analysis / S. Feng, F. A. Zeng, B. Chance // *Applied optics*. – 1995. – Т. 34. – № 19. – С. 3826–3837.
64. Prahl, S.A. A compendium of tissue optical properties / S.A. Prahl // *OMLC*. – 2012. – <http://omlc.ogi.edu/spectra/hemoglobin>
65. Safe Use of Lasers ANSI Z136.1–2000 American National Standard for Safe Use of Lasers (Orlando, FL: Laser Institute of America).
66. Wu, L. Effect of human brain edema on light propagation: a Monte Carlo modeling based on the visible Chinese human dataset / L. Wu, Y. Lin, T. Li // *IEEE Photonics Journal*. – 2017. – Т. 9. – №5. – С. 1–10.
67. Patient-oriented simulation based on Monte Carlo algorithm by using MRI data / C.C. Chuang, Y.T. Lee, C.M. Chen, Y.S. Hsieh, T.C. Liu, C.W. Sun [et al.] // *Biomedical engineering online*. – 2012. – Т. 11. – №1. – С. 1–16.
68. Quantitative evaluation of the relative contribution ratio of cerebral tissue to near-infrared signals in the adult human head: a preliminary study / S. Kohri, Y. Hoshi, M. Tamura, C. Kato, Y. Kuge, N. Tamaki [et al.] // *Physiol Meas*. – 2002. – Т. 23. – № 2.

69. Refractive indices of human skin tissues at eight wavelengths and estimated dispersion relations between 300 and 1600 nm / H. Ding, J.Q. Lu, W.A. Wooden, P.J. Kragel, X.H. Hu [et al.] // *Physics in Medicine & Biology*. – 2006. – T. 51. – № 6. – C. 1479.
70. Shaffer, C.L. Defining neuropharmacokinetic parameters in CNS drug discovery to determine cross-species pharmacologic exposure–response relationships / C. L. Shaffer // *Press*. – 2010. – T. 45.
71. Fluorescence-guided resection of brain tumor: review of the significance of intraoperative quantification of protoporphyrin ix fluorescence / Z. Huang, H. Qiu, S. Shi, D. Li, J. Zou, S. Hu [et al.] // *Neurophotonics*. – 2017. – T. 4. – № 1. – C. 011011.
72. 5-aminolevulinic acid (5-ALA) fluorescence guided surgery of high-grade gliomas in eloquent regions assisted by functional mapping. our experience and review of the literature / A. Della Puppa, S. De Pellegrin, E. d'Avella, G. Gioffre, M. Rossetto, A. Gerardi, G. Lombardi, R. Manara, M. Munari, M. Saladini, R. Scienza [et al.] // *Acta neurochirurgica*. – 2013. – T. 155. – № 6. – C. 965–972.
73. Surgery guided by 5-aminolevulinic fluorescence in glioblastoma: volumetric analysis of extent of resection in single-center experience / R. Diez Valle, S. Tejada Solis, M. A. Idoate Gastearena, R. García de Eulate, P. Domínguez Echávarri, J. Aristu Mendiroz [et al.] / *Journal of neuro-oncology*. – 2011. – T. 102. – № 1. – C. 105–113.
74. 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, Y.S. Maklygina, I.S. Trifonov, A.V. Baranov, E.F. Stranadko, D.N. Panchenkov, V.V. Krylov [et al.] // *Biomedical Optics Express*. – 2021. – T. 12. – №3. – C. 1761–1773.
75. Combination of ala-induced fluorescence-guided resection and intraoperative open photodynamic therapy for recurrent glioblastoma: case series on a promising dual strategy for local tumor control / S. Schipmann, M. Müther, L. Stögbauer, S. Zimmer, B. Brokinkel, M. Holling, O. Grauer, E.S. Molina, N. Warneke, W. Stummer [et al.] / *Journal of neurosurgery*. – 2021. – T. 134. – №2. – C. 426–436.
76. Stepp, H. 5-ALA in the management of malignant glioma / H. Stepp, W. Stummer // *Lasers in surgery and medicine*. – 2018. – T. 50. – № 5. – C. 399–419.
77. Photodynamic therapy and associated targeting methods for treatment of brain cancer / D. Bartusik-Aebisher, I. Serafin, K. Dynarowicz, D. Aebisher // *Frontiers in Pharmacology*. – 2023. – T. 14.
78. Stereotactic photodynamic therapy of recurrent malignant gliomas / A.A. Rafaelian, B.V. Martynov, K.A. Chemodakova, A.I. Kholyavin, R.S. Martynov, E.Y. Klimenkova, M.Y. Prokudin, G.V. Papayan, I.V. Boykov, D.V. Svistov [et al.] // *Sovremennye Tehnologii v Medicine*. – 2024. – T. 16. – №2. – C. 58–65.
79. Walstad, Y. J. D. Improved survival from intracavitary photodynamic therapy of rat glioma / Y. J. D. Walstad, J. T. Brown, S. K. Powers // *Photochemistry and Photobiology*. – 1992. – T. 56. – №3. – C. 385–390.
80. Stereotactic intratumoral photodynamic therapy for recurrent malignant brain tumors / S.K. Powers, S.S. Cush, D.L. Walstad, L. Kwock // *Neurosurgery*. – 1991. – T. 29. – №5. – C. 688–696.
81. Photodynamic therapy of high grade glioma–long term survival / S.S. Stylli, A.H. Kaye, L. MacGregor, M. Howes, P. Rajendra [et al.] // *Journal of Clinical Neuroscience*. – 2005. – T. 12. – №4. – C. 389–398.

82. Photodynamic therapy and possible action against SARS-CoV-2 / G.B. Queiroz, A.A. Foggiato, J.L. Neto, D.F. da Silva // *Brazilian Journal of Development*. – 2020. – T. 6. – № 7. – C. 52313–52327.
83. Damage threshold of normal rat brain in photodynamic therapy / Q. Chen, M. Chopp, L. Madigan, M.O. Dereski, F.W. Hetzel [et al.] // *Photochemistry and Photobiology*. – 1996. – T. 64. – № 1. – C. 163–167.
84. In vivo determination of optical properties of normal and tumor tissue with white light reflectance and an empirical light transport model during endoscopy / P.R. Bargo, S.A. Prahl, T.T. Goodell, R.A. Slevin, G. Koval, G. Blair, S.L. Jacques [et al.] // *Journal of Biomedical Optics*. – 2005. – T. 10. – № 3. – C. 034018.
85. Abdurashitov, A. Photodynamic therapy of brain tumors and novel optical coherence tomography strategies for in vivo monitoring of cerebral fluid dynamics / A. Abdurashitov, V. Tuchin, O. Semyachkina-Glushkovskaya // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. – 2020. – T. 13. – № 02. – C. 2030004.
86. Intraoperative thermal control of perifocal edema in photodynamic therapy of malignant brain tumors / I.A. Medyanik, M.G. Volovik, A.V. Dydykin, K.S. Yashin, K.V. Kulakova, S.N. Bugrov, N.N. Karyakin [et al.] // *Sovremennye Tehnologii v Medicine*. – 2016. – T. 8. – № 3. – C. 82–89.
87. Hirschberg, H. Photodynamic therapy mediated immune therapy of brain tumors / H. Hirschberg, K. Berg, Q. Peng // *Neuroimmunology and Neuroinflammation*. – 2018. – T. 5. – № 7. – C. 27.
88. Müller, P. J. Photodynamic therapy of malignant primary brain tumours: clinical effects, postoperative ICP, and light penetration of the brain / P. J. Müller, B. C. Wilson // *Photochemistry and Photobiology*. – 1987. – T. 46. № 5. – C. 929–935.
89. Mitochondrial PO₂ measured by delayed fluorescence of endogenous protoporphyrin IX / E.G. Mik, J. Stap, M. Sinaasappel, J.F. Beek, J.A. Aten, T.G. van Leeuwen, C. Ince [et al.] // *Nature methods*. – 2006. – T. 3. – № 11. – C. 939–945.
90. An optical method for measurement of dioxygen concentration based upon quenching of phosphorescence / J.M. Vanderkooi, G. Maniara, T.J. Green, D.F. Wilson // *Journal of Biological Chemistry*. – 1987. – T. 262. – №12. – C. 5476–5482.
91. Jacques, S. L. Optical properties of biological tissues: a review / S. L. Jacques // *Physics in Medicine & Biology*. – 2013. – T. 58. – №. 11. – C. R37.
92. Differences in optical properties between healthy and pathological human colon tissues using a Ti: Sapphire laser: An in vitro study using the Monte Carlo inversion technique / H.J. Wei, D. Xing, G.Y. Wu, H.M. Gu, J.J. Lu, Y. Jin, X.Y. Li [et al.] // *Journal of Biomedical Optics*. – 2005. – T. 10. – № 4. – C. 044022.
93. Kinetics of Optical Properties of Colorectal Muscle During Optical Clearing / I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira, V.V. Tuchin [et al.] // *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. – 2018. – T. 25. – № 1. – C. 1–8.
94. Normal colonic wall thickness at CT and its relation to colonic distension / W. Wiesner, K.J. Mortelé, H. Ji, P.R. Ros // *Journal of computer assisted tomography*. – 2002. – T. 26. – № 1. – C. 102–106.
95. Spectroscopic time-resolved diffuse reflectance and transmittance measurements of the female breast at different interfiber distances / A. Pifferi, J. Swartling, E. Chikoidze, A. Torricelli, P. Taroni, A. Bassi, S. Andersson-Engels, R. Cubeddu [et al.] // *Journal of biomedical optics*. – 2004. – T. 9. – № 6. – C. 1143–1151.

96. Современные методы оценки кислородного статуса и состояния микроциркуляции биотканей: оптическая диффузионная спектроскопия (обзор) / В.В. Бесчастнов, М.Г. Рябков, И.В. Павленко, М.В. Багрянцев, И.Л. Дезорцев, В.В. Кичин, М.С. Балеев, А.В. Масленникова, А.Г. Орлова, М.С. Кleshнин, И.В. Турчин [и др.] // *Современные технологии в медицине*. – 2018. – Т. 10. – № 4. – С. 183–195.
97. Validation of interventional fiber optic spectroscopy with MR spectroscopy, MAS-NMR spectroscopy, high-performance thin-layer chromatography, and histopathology for accurate hepatic fat quantification / R. Nachabé, J.W. van der Hoorn, R. van de Molengraaf, R. Lamerichs, J. Pikkemaat, C.F. Sio, B.H. Hendriks, H.J. Sterenborg [et al.] // *Investigative radiology*. – 2012. – Т. 47. – № 4. – С. 209–216.
98. Subochev, P. Cost-effective imaging of optoacoustic pressure, ultrasonic scattering, and optical diffuse reflectance with improved resolution and speed / P. Subochev // *Optics letters*. – 2016. – Т. 41. – № 5. – С. 1006–1009.
99. Nanoparticles as contrasting agents in diffuse optical spectroscopy / A. Krainov, A. Mokeeva, E. Sergeeva, S. Zobotnov, M. Kirillin [et al.] // *Progress in Biomedical Optics and Imaging. Proceedings of SPIE*. – 2013. – Т. 8699. – С. 198–205.
100. Media Characterization under Scattering Conditions by Nanophotonics Iterative Multiplane Spectroscopy Measurements / I. Yariv, C. Shapira, H. Duadi, D. Fixler // *ACS Omega*. – 2019. – Т. 4. – № 10. – С. 14301–14306.
101. Assadi, H. Optical Scattering Properties of Intralipid Phantom in Presence of Encapsulated Microbubbles / H. Assadi, R. Karshafian, A. Douplik // *International Journal of Photoenergy*. – 2014. – № 1. – С. 1–9.
102. Optical properties of normal and diseased human breast tissues in the visible and near infrared / V.G. Peters, D.R. Wyman, M.S. Patterson, G.L. Frank // *Physics in Medicine & Biology*. – 1990. – Т. 35. – №9. – С. 1317–1334.
103. Optical attenuation characteristics of breast tissues at visible and near-infrared wavelengths / H. Key, E.R. Davies, P.C. Jackson, P.N. Wells // *Physics in medicine & biology*. – 1991. – Т. 36. – № 5. – С. 579–590.
104. Phototransformations of 5-aminolevulinic acid–induced Protoporphyrin IX in vitro: a spectroscopic study / S. Bagdonas, L.W. Ma, V. Iani, R. Rotomskis, P. Juzenas, J. Moan [et al.] // *Photochemistry and Photobiology*. – 2000. – Т. 72. – № 2. – С. 186–192.
105. Theodossiou, T. Comparison of the photodynamic effect of exogenous photoporphyrin and protoporphyrin IX on PAM 212 murine keratinocytes / T. Theodossiou, A.J. MacRobert // *Photochemistry and Photobiology*. – 2002. – Т. 76. – № 5. – С. 530–537.
106. Photodynamic and sonodynamic therapy with protoporphyrin IX in vitro and in vivo studies / E.T.P. Ayala, F.A.D. de Sousa, J.D. Vollet-Filho, M.R. Garcia, L. De Boni, V.S. Bagnato, S. Pratavieira [et al.] // *Ultrasound in Medicine Biology*. – 2021. – Т. 47. – № 4. – С. 1032–1044.
107. Charlesworth, P. The use of 5-aminolevulinic acid (ALA) in photodynamic therapy (PDT) / P. Charlesworth, T.G. Truscott // *Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology*. – 1993. – Т. 18. – № 1. – С. 99–100.

108. Increased fluorescence observation intensity during the photodynamic diagnosis of deeply located tumors by fluorescence photoswitching of protoporphyrin IX / S.J. Ogbonna, W.Y. York, T. Nishimura, H. Hazama, H. Fukuhara, K. Inoue, K. Awazu [et al.] // *Journal of Biomedical Optics*. – 2023. – T. 28. – № 5. – C. 055001–055001.
109. Phototransformations of 5-Aminolevulinic Acid–induced Protoporphyrin IX in vitro: A Spectroscopic Study / S. Bagdonas, L.W. Ma, V. Iani, R. Rotomskis, P. Juzenas, J. Moan [et al.] // *Photochemistry and photobiology*. – 2000. – T. 72. – № 2. – C. 186-192.
110. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods / C. Ash, M. Dubec, K. Donne, T. Bashford // *Lasers in medical science*. – 2017. – T. 32. – № 8. – C. 1909–1918.
111. Comparative investigation of 5-aminolevulinic acid and hexyl aminolevulinate-mediated photodynamic diagnostics and therapy of cervical dysplasia and vulvar leukoplakia / K.T. Efendiev, P.M. Alekseeva, I.R. Bikmukhametova, L.S. Piterskova, K.F. Orudzhova, U.D. Agabekova, E.K. Slovokhodov, V.B. Loschenov [et al.] // *Laser Physics Letters*. – 2021. – T. 18. – № 6. – C. 065601.
112. Photooxydation and singlet oxygen sensitization by protoporphyrin IX and its photooxydation products / G.S. Sidney, C. Bobillier, D.G. Whitten [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology*. – 1982. – T. 36. – № 4. – C. 401–407.