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

<4

На правах рукописи

Грачев Павел Вячеславович

Исследование лазерно-индуцированных оптических и тепловых полей в биологических тканях, содержащих фотосенсибилизаторы

Специальность 01.04.21 – «Лазерная физика»

Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук

Научный руководитель: проф., д.ф.-м.н. Лощенов Виктор Борисович

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕ	СРЖАНИЕ	2
спис	СОК СОКРАЩЕНИЙ	5
введ	ЕНИЕ	6
Акт	гуальность диссертационной работы	6
Цел	ть и задачи исследований	7
Нау	/чная новизна	7
Нау	ично-практическая значимость работы	8
Пол	ложения, выносимые на защиту	9
Обо	основанность и достоверность полученных результатов	10
Апр	обация работы	10
Спи	исок основных докладов по теме диссертации	10
Лич	чный вклад автора	11
Гра	НТЫ	12
Бла	агодарности	12
Стр	уктура и объем диссертации	13
ГЛАВ	ВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМЕ	
ИССЛ	ІЕДОВАНИЯ	14
1.1	Оптические свойства биологических тканей	14
1.2	Особенности флуоресцентной визуализации в БИК и КВИК диа 18	пазоне
1.3	Модели распространения света в биологических тканях	20
1.4	Лазерно-индуцированные тепловые поля в биологических ткан	нях 25
1.5	Теоретическое описание процессов нагревания биологических 30	тканей
1.6	Зависимость оптических свойств биологических тканей от	
тем	пературного воздействия	
Зак	лючение к главе 1	
ГЛАВ	ВА 2. ИСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ, ПРИН	50РЫ И
ОБОР	удование	
2.1	Объекты исследования	
2.	1.1 Моделирование оптических параметров биологической такни	35
2.	1.2 Типы биологической ткани и их параметры	
2.	1.3 Подготовка образцов для исследования лазерно-индуцированного те	плового
BC	оздействия на биологические ткани	

2.1.4 Клинические исследования
2.2 Математическое моделирование гетерогенной структуры
биологической ткани, содержащей фотосенсибилизатор
2.3 Метод определения глубины зондирования биологических тканей41
2.3.1 Диффузионное приближение
2.3.2 Метод Монте Карло
2.3.3 Экспериментально на рассеивающей среде42
2.4 Моделирование прохождения лазерного излучения в изогнутом
оптическом волокне
2.5 Разработка программного обеспечения для моделирования
распространения лазерного излучения в изогнутом оптическом волокне 49
2.6 Обработка изображений с большой глубиной цвета
2.7 Спектроскопические исследования биологической ткани51
2.8 Микроскопические исследования при помощи лазерного
сканирующего микроскопа56
2.9 Моделирование лазерно-индуцированных тепловых полей при
охлаждении поверхности облучения56
2.10 Метод управления лазерно-индуцированными тепловыми полями в
биологических тканях57
2.11 Методика измерения лазерно-индуцированных тепловых полей60
2.12 Методика измерения рассеянного назад лазерного излучения на
изгибе волокна61
2.13 Метод определения концентрации фотосенсибилизатора ПпIХ в
биологических тканях по спектрам флуоресценции
2.14 Метод определения фактора анизотропии рассеивающей среды64
2.15 Система флуоресцентной визуализации в БИК диапазоне
Заключение к главе 2
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛАЗЕРНО-
ИНДУЦИРОВАННЫХ ТЕПЛОВЫХ И СВЕТОВЫХ ПОЛЕЙ В БИОЛОГИЧЕСКИХ
ТКАНЯХ 68
3.1 Результаты математического моделирования методом Монте Карло
многослойных гетерогенных тканей
3.2 Результаты измерения индикатрисы рассеяния Липофундина
3.3 Сопоставление глубины зондирования полученной метолом Монте
Карло и экспериментально

	3.4	Результаты математического моделирования распространения	
	лазе	рного излучения в изогнутом оптическом волокне. Сопоставления	I C
	эксп	ериментальными данными	76
	3.5	Результаты математического моделирования лазерно-	
	инд	уцированных тепловых полей в биологических тканях. Сопоставле	ние
	с эко	спериментальными данными	80
	3.6	Результаты исследования лазерно-индуцированного теплового	
	B034	цействия на биологические ткани	85
	3.7	Результаты измерения изменения оптических параметров	
	биол	логических тканей при лазерно-индуцированном нагреве	87
	3.8	Исследование распределения индоцианина зеленого в моделях	
	нери	зных тканей головного и спинного мозга	91
	Закл	іючение к главе 3	95
	ГЛАВА	А 4. ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	
	исслі	ЕДОВАНИЯ ЛАЗЕРНО-ИНДУЦИРОВАННЫХ СВЕТОВЫХ И ТЕПЛОВЫХ	K
	ПОЛЕ	Й, РАЗРАБОТАННЫХ СИСТЕМ В ПРАКТИКУ. ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ	
1	диагі	НОСТИКИ И ТЕРАПИИ	97
	4.1	Результаты клинических исследований с применением устройсте	a
	для	контактного облучения внутрикожных опухолей и метастазов с	
	элек	стронной системой охлаждения	97
	4.2	Рекомендации к применению устройства для внутритканевого	
	облу	/чения	102
	4.3	Применение системы для флуоресцентной визуализации в БИК	
	диаг	тазоне	104
	4.3	2.1 Определение параметров кровотока с помощью флуоресцентной	104
	ан: 4 3	гиографии	104
	4.4	БИК визуализация и гетерогенность опухоли	
	Закл	тючение к главе 4	
	ЗАКЛІ	ОЧЕНИЕ И ВЫВОЛЫ	
	СПИС	ОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	114
	СПИС	ОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БИК ближний инфракрасный
- НПВО нарушенное полное внутреннее отражение
- КВИК коротковолновый инфракрасный
- ПИД пропорционально-интегрально-дифференциальный
- ПЗС прибор с зарядовой связью
- ПК персональный компьютер
- 5-АЛК 5-аминолевулиновая кислота
- ПпІХ протопорфирин-9
- Себ хлорин еб
- ФДТ фотодинамическая терапия
- ФД флуоресцентная диагностика
- ФС фотосенсибилизатор
- АЦП аналого-цифровой преобразователь
- ФАГ флуоресцентная ангиография
- ЗАНК заболевания артерий нижних конечностей
- СД сахарный диабет
- КИНК критическая ишемия нижних конечностей

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность диссертационной работы

Наибольшее влияние на взаимодействие лазерного излучения с биологическими тканями оказывают их оптические и термические свойства. Поэтому изучению и табулированию последних посвящено большое количество работ.

Для описания распространения света в биологических тканях существует два основных пути - это решение уравнений Максвелла и решение уравнения теории переноса излучения. Решение уравнений Максвелла дает возможность быстрой оценки интенсивности светового поля для упрощенных случаев, например, в гомогенных изотропных средах. Такие решения не подходят для практического применения. Для решения уравнения теории переноса излучения, как правило пользуются методом Монте Карло. В нем рассматривается ход группы фотонов, задаваемый коэффициентами поглощения и рассеяния, а также фактором анизотропии среды. В результате расчета получается картина распределения рассеянных И поглощенных фотонов В сильнорассеивающих средах.

Моделируя конфигурацию источников излучения, С учетом зависимости распространения лазерного излучения от длины волны, можно существенно увеличить глубину зондирования биологических тканей, содержащих фотосенсибилизаторы (ФС). Тем самым можно увеличить информативность и точность таких важных в медицине процедур флуоресцентная (ФД), флуоресцентная ангиография (ΦΑΓ), как диагностика флуоресцентная визуализация.

Для описания тепловых полей в биологических тканях либо применяют уравнение теплопроводности, либо описывают биологическую ткань как пористую среду и описывают кровоток в гетерогенной среде при помощи уравнения Дарси. Накладывая различные граничные условия со стороны облучения можно существенно изменять форму результирующего теплового поля. Этот способ в сочетании с тем, что нагревание биологических тканей изменяет их оптические свойства и, как следствие, характер распространения световых полей в ткани, позволяет создавать новые методы терапии онкологических заболеваний.

Цель и задачи исследований

Целью данной работы являлось исследование лазерно-индуцированных тепловых и световых полей в биологических тканях, содержащих ФС, а также разработка новых методов регистрации тепловых и световых полей и устройств управления ими для ФД, фотодинамической терапии (ФДТ) и гипертермии.

Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие задачи:

- Исследовать оптические параметры биологических тканей, актуальных для практического применения и содержащих флуоресцентный краситель, в ближнем инфракрасном (БИК) диапазоне
- Разработать математические модели, описывающие распространение света в биологических средах, содержащих ФС, и провести сравнительный анализ полученных в результате моделирования результатов с экспериментальными.
- Разработать способ экспериментального исследования распространения лазерного и флуоресцентного излучения в сильнорассеивающих средах и фантомы биологических тканей для него.
- Разработать способ измерения интенсивности лазерного излучения, рассеиваемого и поглощаемого биологической тканью непосредственно во время облучения ткани, по нарушенному полному внутреннему отражению (НПВО) внутри оптического волокна.
- 5. Разработать экспериментальную установку, основанную на НПВО, для исследования процессов взаимодействия лазерного излучения с биологическими тканями, содержащими ФС, с целью практического использования результатов расчета полей лазерного излучения при облучении внутрикожных опухолей и новообразований.
- 6. Разработать алгоритм и методику регистрации флуоресцентных изображений в БИК диапазоне и оценки кровотока и лимфотока органов и тканей с сосудистыми нарушениями.
- **7.** Разработать методику и устройство для подкожного лазерного локального нагрева с автоматической регистрацией температурных полей облучаемой зоны.

Научная новизна

1. Показано, что применение лазерного излучения и БИК диапазона позволяет

получить высококонтрастные флуоресцентные изображения кровеносных сосудов в биологических тканях и оценивать скоростные параметры кровотока и лимфотока.

- 2. Разработана математическая модель и устройство, позволяющие управлять тепловыми полями при контактной гипертермии и ФДТ.
- На основе метода Монте Карло предложен новый алгоритм, позволяющий рассчитывать распространение лазерного и флуоресцентного излучения в многослойных гетерогенных биологических тканях, содержащих ФС.
- 4. Получены траектории наиболее вероятного прохождения фотонов лазерного и флуоресцентного излучения в тканях головного мозга, содержащих ФС протопорфирин-9 (ПпIХ), при различных расстояниях между излучающим и принимающим оптическими волокнами экспериментально, на основе метода Монте Карло и диффузионного приближения.
- 5. Показаны изменения оптических параметров различных биологических тканей в процессе лазерно-индуцированного нагрева путем регистрации рассеянного назад излучения, выходящего из облучающего волокна за счет нарушения полного внутреннего отражения.

Научно-практическая значимость работы

- На базе разработанных методов созданы объекты интеллектуальной собственности, защищенные патентами РФ в количестве 5 шт.
- 2. Применение разработанной системы для флуоресцентной визуализации в БИК диапазоне расширяет стандартный набор устройств и методик для определения параметров кровотока и лимфотока, позволяя проводить их исследование в тех условиях, при которых общепринятые клинические методики не применимы.
- 3. Разработанная система для флуоресцентной визуализации в БИК диапазоне апробирована на базе ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России и рекомендована Экспертному Совету Министерства Здравоохранения Российской Федерации для включения в клинические рекомендации для диагностики ишемической и нейро-ишемической формы синдрома диабетической стопы у пациентов с сахарным диабетом.
- 4. Применение устройства для облучения внутрикожных опухолей и новообразований с электронной системой охлаждения позволяет проводить сеансы ФДТ, совмещенные

с гипертермией, в полном объеме в зонах, богатых нервными окончаниями без применения дополнительных методов аналгезии, в том числе, и общего обезболивания. Разработанное устройство апробировано на базах Государственного научного центра лазерной медицины Минздрава России, Онкологического клинического диспансера № 1 г. Москва и МНИОИ им. П.А. Герцена.

5. Применение разработанного алгоритма расчета распространения фотонов в биологических тканях позволяет быстро оценивать глубину зондирования лазерным и флуоресцентным излучением при различных конфигурациях источников лазерного излучения, что дает важную информацию при конструировании зондов для спектроскопического анализа и систем для флуоресцентной визуализации.

Положения, выносимые на защиту

- Метод Монте Карло позволяет рассчитывать распространение лазерного и флуоресцентного излучения от источников в различных комбинациях и начальном положении относительно многослойных гетерогенных биологических тканях, содержащих фотосенсибилизаторы.
- 2. Рассеянное назад излучение в волокне позволяет зафиксировать изменение коэффициента рассеяния биологических тканей при внутритканевом облучении.
- Лазерное облучение внутрикожных опухолей и новообразований с позволяет создавать область повышенной температуры с контролируемой глубиной в биологических тканях, оставляя при этом неповрежденными поверхностные слои.
- 4. Флуоресцентная визуализация позволяет проводить флуоресцентную навигацию, определять скоростные параметры кровотока и лимфотока в ближнем ИК диапазоне.

Обоснованность и достоверность полученных 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

По результатам исследований опубликовано 20 статей в рецензируемых журналах, удовлетворяющих требованиям ВАК из них в журналах с квартилем 1 опубликовано 2 статьи, с квартилем 2 - 3 статьи, с квартилем 3 - 8 статей, 15 статей в сборниках трудов научных конференций, 42 тезиса на научных конференциях, 9 патентов. Каждая из четырех оригинальных глав диссертации написана на основе результатов, опубликованных в 13 статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК. Публикации автора отражены в следующих библиографических базах данных: Web of Science 10, Scopus 23, РИНЦ 33.

Список основных докладов по теме диссертации

- 1. **Grachev P.V.**, Ryabova A.V. The spectral-fiber analysis of the biological tissue condition at an interstitial laser irradiation // LALS. 2010. 9-11 June. C.290
- Grachev P.V., Romanishkin I.D., Pominova D.V., Burmistrov I.A., Kaldvee K., Sildos I., Vanetsev A.S., Orlovskaya E.O., Orlovskii u.V., Loschenov V.B., Ryabova A.V. Experimental modeling of local laser hyperthermia using thermosensitive nanoparticles absorbing in NIR // Saratov Fall Meeting SFM'17. - 2017. -September 26 - 29
- Grachev P., Linkov K., Loschenov V. Fiber optic device with electronic system of cooling for contact interstitial irradiation of tumors and metastases // 19th International Conference on Advanced Laser Technologies. - 2016. - C.112
- Kholodtsova M.N., Grachev P.V. Determining of the Optical Sampling Depth in Brain Tissue Using Different Approaches to Light Distribution Modeling // 20th International Laser PhysicsWorkshop. - 2016.
- 5. Грачев П.В., Брысин Н.Н., Линьков К.Г., Окушко А.Н., Филоненко Е.В., Филинов В.Л., Коган Б.Я. Волоконно-оптическое устройство с электронной системой охлаждения для контактного облучения внутрикожных опухолей и метастазов // Журнал Лазерная Медицина. - 2015. - С.119
- 6. Савельева Т.А., Грачёв П.В., Линьков К. Г., Лощенов М.В. Методы спектроскопической навигации и визуализации мультиспектральных изображений флуоресценции и степени оксигенации биологических тканей // Научно-практическая конференция "Фотодинамическая терапия и флуоресцентная диагностика". 2011. 20-21 мая

- 7. Холодцова М.Н., **Грачёв П.В.** Глубина зондирования биологической ткани лазерным излучением и флуоресценцией // Журнал Лазерная Медицина. 2011. С.114
- Кустов Д.М., Грачев П.В., Шарова А.С., Савельева Т.А., Лощенов В.Б. Моделирование профиля распространения лазерного излучения ближнего ИК-диапазона в многослойной структуре головы человека // VIII International Youth Scientific School-Conference "Modern Problems of Physics and Technology". - 2018.
- Москалев А.С., Грачев П.В., Макаров В.И., Козликина Е.И., Лощенов В.Б. Повышение резкости границ изображений биологических объектов с применением лазерноиндуцированной флуоресценции в ближнем инфракрасном диапазоне // Прохоровские недели. - 2019.
- 10. Грачев П.В., Макаров В.И., Джемилова З.Н., Линьков К.Г., Галстян Г.Р., Лощенов В.Б. Прецизионные средства доставки лазерного излучения при ФД и ФДТ // VII Всероссийский Конгресс с международным участием «ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ И ФОТОДИАГНОСТИКА». - 2018.

Личный вклад автора

Автором был проведен критический анализ научной литературы; разработаны методики измерения; выполнено математическое моделирование, описывающее распространение света в биологических средах, содержащих ФС, а также моделирование распространения оптических волокнах при НПВО; разработаны в методики экспериментального исследования распространения лазерного и флуоресцентного излучения в сильнорассеивающих средах, методики регистрации и оценки флуоресцентных изображений в БИК диапазоне, методики подкожного лазерного локального нагрева с автоматической регистрацией температурных полей облучаемой зоны; разработан экспериментальный стенд для исследования процессов взаимодействия лазерного излучения с биологическими тканями, содержащими ФС; разработан способ измерения интенсивности лазерного излучения, рассеиваемого и поглощаемого биологической тканью непосредственно во время облучения ткани; проведен анализ и интерпретация полученных результатов, сформулированы выводы. Автор принимал непосредственное участие в обсуждении полученных результатов, презентации результатов на конференциях и оформлении их в виде научных публикаций.

Гранты

Работа выполнена при частичной поддержке следующих грантов:

- "Фонд содействия развития малых форм предприятий в научно-технической сфере" -Государственный контракт №12604р/24393 от 15.09.2014 "Разработка макета устройства для стереотаксической биопсии новообразований головного мозга с непрерывным спектроскопическим контролем in situ" Руководитель, 26.09.2013 -30.03.2017.
- "Фонд содействия развития малых форм предприятий в научно-технической сфере" -Государственный контракт №10402ГУ2/2015 «Усовершенствование устройства для стереотаксической биопсии новообразований головного мозга с непрерывным спектроскопическим контролем in situ» (рук. Грачев П.В.) 2015-2016 гг.
- 3. Министерство образования и науки Российской Федерации Соглашение № 14.604.21.0014 от «17» июня 2014 г. «Разработка волоконно-оптических инструментов для спектроскопической диагностики, фотодинамической терапии и лазерной гипертермии новообразований головного и спинного мозга. Разработка новых технологий диагностики и лечения заболеваний мозга с применением разрабатываемых инструментов». Ответственный исполнитель, 17.06.2014-31.12.2015.

Благодарности

Автор благодарит своего научного руководителя Лощенова Виктора Борисовича за неоценимую помощь и чуткое руководство на всех этапах работы над диссертацией, за деликатную настойчивость, давшую начало данной работе. Автор выражает благодарность всем сотрудникам Лаборатории лазерной биоспектроскопии за полезные дискуссии и дружескую поддержку. Особая благодарность Рябовой Анастасии Владимировне и Поминовой Дарье Вячеславовне за профессиональные советы и помощь в реализации микроскопических исследований на биологических структурах, Владимиру Владимировичу Волкову за помощь в разработке волоконно-оптического инструментария, Линькову Кириллу Геннадиевичу, Валерию Александровичу Сердобову за помощь в решении инженерных и технических вопросов, Александру Бородкину за помощь В прототипировании макетов устройств, Макарову Владимиру Игоревичу за мотивационные беседы и помощь в подготовке лабораторных объектов исследований.

Автор также благодарит Джемилову (Абдульвапову) Зеру Нусредовну, Филинова Владимира Леонидовича за помощь при проведении клинических исследований.

Структура и объем диссертации

Работа состоит из введения, четырех глав, заключения и списка литературы. Общий объем диссертации 128 страниц, включая 55 рисунков, 7 таблиц и список литературы из 153 наименования.

ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной главе рассмотрены существующие на сегодняшний день математические модели и основные факторы, описывающие распространение тепловых и световых полей в биологических тканях.

В первом и втором параграфах рассмотрены оптические свойства биологических тканей и факторы, влияющие на их спектральные зависимости. Особое внимание уделено особенностям рассеяния и поглощения биологических тканей в БИК диапазоне.

В третьем, четвертом и пятом параграфах рассмотрены методы моделирования распространения тепловых и световых полей в мутных средах.

В шестом параграфе описаны процессы, происходящие в биологических тканях при их нагревании такие, как денатурация, коагуляция, карбонизация, а также влияние этих процессов на оптические характеристики тканей.

1.1 Оптические свойства биологических тканей

Для света биологическая ткань является оптически неоднородной. Это означает, что в процессе распространения в биологической ткани свет может поглощаться и рассеиваться [1]. Под поглощением понимаются те процессы, в которых энергия светового фотона поглощается молекулой. Поглощенная энергия при этом может как переходить в тепло за счет безызлучательных переходов, так и излучаться. Под рассеянием понимаются те процессы, в которых начальное направление фотона изменяется из-за взаимодействия с рассеивающим объектом. При этом можно выделить два случая: упругое и неупругое рассеяние. При упругом рассеянии фотоны не меняют энергию в процессе рассеяния. Для случая неупругого рассеяния энергия и, следовательно, длина волны фотона изменяются в процессе рассеяния.

Вероятности поглощения и рассеяния внутри биологической ткани непостоянны и зависят от типа ткани, ее температуры и других факторов. Для описания вероятностей поглощения и рассеяния вводятся соответствующие коэффициенты [2].

Коэффициент поглощения вводится в законе Бугера-Ламберта-Бэра, который описывает ослабление пучка света, распространяющегося в среде толщиной /[3]. При этом предполагается, что среда не является рассеивающей:

$$I = I_0 \cdot e^{\sigma_a \cdot l \cdot N} \tag{1}$$

I — интенсивность света, прошедшего слой вещества толщиной *l*, I_0 — интенсивность света на входе в вещество; σ_a – сечение поглощения; N – объемная плотность молекул поглотителя.

Рассматривая в единицах оптической плотности вводится в рассмотрение коэффициент поглощения μ_a , равный

$$\mu_a = \sigma_a \cdot N = \epsilon \cdot c \cdot ln(10) \tag{2}$$

ε – коэффициент молярной экстинкции; *с* – концентрация молекул поглотителя в растворе. Обратная коэффициенту поглощения μ_a величина *l_a* равна длине свободного пробега фотона в среде до столкновения с поглотителем:

$$l_a = \frac{1}{\mu_a}$$

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

$$\mu_s = \sigma_s \cdot l \tag{3}$$

$$l_s = \frac{1}{\mu_s} \tag{4}$$

В приближении однократного рассеяния ослабление света средой определяется согласно закону Бугера-Ламберта-Бэра(1), в котором использована сумма коэффициентов поглощения и рассеяния, так называемый коэффициент ослабления μ_t , учитывающий изъятие света из изначального потока за счет обоих эффектов $\mu_t = \mu_s + \mu_a$:

$$I = I_0 e^{-\mu_t \cdot l} \tag{5}$$

В сильнорассеивающих биологических средах используют эффективный коэффициент ослабления $\mu_{eff} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu_s(1-g))}$, где g – фактор анизотропии,

учитывающий индикатрису рассеяния в каждом конкретном случае.

Опубликовано достаточно большое количество обзоров, посвященных табулированию оптических свойств биологических тканей [4, 5], однако табулированные значения не всегда точны в силу биологического разброса при исследованиях *in vivo*, а также из-за разницы в геометрии измерений. Методы определения оптических параметров можно разделить на два типа: прямые и непрямые. Прямые методы используют закон Бугера-Ламберта-Бэра (5) и требуют строго соблюдения условий эксперимента: условие однократного рассеяния, разделения при регистрации баллистических и рассеянных фотонов [6, 7]. Измеряя таким образом величину ослабления, можно определить коэффициенты рассеяния и поглощения для конкретной длины волны.

Непрямые методы основаны на решении обратной задачи с применением теоретической модели распространения света в среде. Одним из распространенных методов является метод удвоения-добавления [8] с использованием двух интегрирующих сфер. В данном методике используется тонкий слой исследуемой ткани, расположенный между двумя интегрирующими сферами. Сферы регистрируют излучение, прошедшее через образец и рассеявшееся назад.

Для обобщенного описания оптических свойств биологических тканей и их зависимости от длины волны и типа биологоческой ткани используют аппроксимацию экспериментальных данных модельной зависимостью [9]. Выражения для аппроксимации, описанные в литературе были выведены для описания оптических свойств различных типов биологических тканей в видимом и БИК диапазонах. В зависимости от типа используемой модели различия в оптических параметрах биологической ткани могут достигать серьезных значений [10]. В связи с этим, требуется проводить детальное экспериментальное исследование рассеяния и поглощения конкретных типов биологических тканей для определенных длин волн, используемых в проводимом эксперименте или моделировании.





На рисунке 1 представлены основные поглотители в биологической ткани: вода, жиры, гемопротеины, меланин [11]. В длинноволновой области 1000 нм и более главным поглотителем излучения является вода. В зеленой и фиолетовой областях спектра поглощают в основном жиры и гемопротеины, меланин. При этом существует условная зона, называемая «биологическое окно прозрачности» в области 690-1050 нм. Она обусловлена минимальной суммой коэффициентов поглощения и рассеяния, а значит максимальной длиной пробега фотона.

Рассеяние света происходит в случае различия между показателями преломления структурного элемента и среды, в которой он находится. Биологическая ткань состоит из разнообразных структур на тканевом и клеточном уровне, которые содержат высокие концентрации белков, липидов, ДНК, отличающиеся по показателю преломления от межклеточной и внутриклеточной жидкости [12, 13, 14]

В биологической ткани рассеяние происходит как на малых по сравнению с длиной волны объектах, так и на больших. К малым можно отнести рибосомы, и внутренние элементы органелл, которые имеют размеры от 20 до 100 нм [15]. К большим относятся ядра, митохондрии, лизосомы с размерами 2-10 мкм, 0.5-10 мкм и 0.03-2 мкм соответственно [16, 17]. Индикатриса рассеяния зависит от соотношения длины волны и характерного размера объекта рассеяния. Рассеяние на малых частицах описывается приближением Рэлея-Ганса-Дебая, при котором интенсивность рассеянного излучения $I \sim I_0 / \lambda^4$ и имеет фактор анизотропии g равный нулю, что означает изотропное рассеяние во все стороны Рассеяние на крупных частицах описывается приближения направлена преимущественно вперед g > 0.7 [18, 19].

1.2 Особенности флуоресцентной визуализации в БИК и КВИК диапазоне

В обзоре, датированном 31 марта 2017 г. дан анализ в области онкологии по результатам обработки статистических данных нескольких штатов США [20]. Результаты анализа показывают, что несмотря на значительные научные и финансовые усилия, прикладываемые к повышению пятилетней выживаемости, статистика по многим типам рака улучшается незначительно. За счет использования оптических методов диагностики с применением абсорбционных и флуоресцентных красителей существенно улучшились показатели 5-летней выживаемости для некоторых типов рака. Однако, получение оптических изображений глубоких слоев биологических тканей с высокой контрастностью и разрешением представляет собой серьезную научную проблему, поскольку, как уже было отмечено ранее, биологическая ткань является оптически неоднородной средой, так как состоит из различных компонентов (коллагеновые волокна, эластин, жировая клетчатка, сосуды и капилляры с гемоглобином и т.д.) и имеет сильное рассеяние и поглощение [21].

Применяемые ведущими компаниями производителями источники излучения для возбуждения флуоресценции, в основном, имеют длину волны в синем диапазоне спектра, что существенно ограничивает глубину зондирования тканей. Известны приборы спектрального и видеофлуоресцентного анализа ткани с возбуждением флуоресценции не только в синем, но и в красном диапазоне спектра [22]. Это существенно продвинуло диагностические возможности оптических методов, потому что длина пробега фотона для красного диапазона спектра, существенно выше, чем для синего диапазона спектра [23]. Так, например, во время удаления опухоли при нейрохирургических операциях даже небольшое кровотечение полностью блокирует возможность регистрации флуоресценции при возбуждении в синем диапазоне за счет сильного поглощения в данном диапазоне кровью. При этом, при использовании лазеров с длинами волн в красном диапазоне регистрация флуоресцирующих участков возможна даже под слоем крови толщиной 1 мм.

Тем не менее во многих случаях требуется диагностика в режиме флуоресцентной навигации более глубоких слоев ткани [24]. Это, в первую очередь, важно для оценки глубины инвазии опухоли, чтобы определить объем удаляемой ткани. Другое не менее важное применение связано с необходимостью оценки возможных путей и типа метастазирования опухоли, в том числе, выявления пораженных лимфоузлов. Это возможно при условии разработки методов прецизионной регистрации оптических сигналов в ближнем инфракрасном диапазоне спектра, что в свою очередь требует существенной модификации существующих приборов и инструментов, разработанных для красного диапазона спектра.

Флуоресцентная навигация в БИК диапазоне позволяет проводить зондирование на значительной глубине до 1 см [25, 26] и в принципе позволяет значительно расширить область доклинических и клинических применений метода.

По сравнению с традиционными диагностическими методами визуализации тканей, такими как компьютерная томография, позитронно-эмиссионная томография и магнитнорезонансная томография, флуоресцентная визуализация в БИК диапазоне является недорогим и чувствительным методом визуализации, позволяющим проводить измерения в режиме реального времени непосредственно во время хирургической операции или ФДТ.

Существуют коммерчески доступные БИК-красители, включая разрешенный к клиническому применению контрастный агент, индоцианин зеленый, который обладает максимумом поглощения в диапазоне 750-800 нм и пиком флуоресценции в диапазоне 820-870 нм [27, 28].

В БИК диапазоне коэффициент рассеяния биологических тканей существенно ниже, что в совокупности с минимальным поглощением воды в этом диапазоне позволяет повысить глубину зондирования [29].

Однако внедрение БИК-визуализации в клиническую практику имеет определенные сложности. К ним можно отнести: отсутствие широкого спектра одобренных БИК флуорофоров; необходимость использования ПЗС матриц с расширенной в БИК диапазон чувствительностью.

При поиске флуоресцентных маркеров БИК диапазона в последнее десятилетие большое внимание уделяется нескольким классам красителей и наноматериалов: цианиновым красителям, комплексам лантанидов, платиновым комплексам, некоторым типам квантовых точек, наночастицам золота и однослойным углеродным нанотрубкам [30,

31, 32, [33]].

Для клинических применений требуются биосовместимые флуорофоры и с этой точки зрения наиболее актуально исследовать уже разрешенные препараты. В российских онкологических центрах для флуоресцентной визуализации и ФДТ опухолей используют в основном ФС на основе хлорина е6 (Себ), сульфированного фталоцианина алюминия или 5-АЛК индуцированного протопорфирина IX (Пп9) [34]. Визуализация производится в красном диапазоне видимого спектра (600-700 нм) с возбуждением флуоресценции лазерным излучением синего (400-450 нм) или красного диапазона (620-640 нм),

Большинство клинически используемых ФС флуоресцирует не только в красном диапазоне, в котором находится максимум флуоресценции, но и в БИК области спектра. Эта составляющая флуоресцентного сигнала обычно не используется для детекции опухоли вследствие малой ее интенсивности. Как показали наши исследования [35], несмотря на то, что интенсивность флуоресценции ФС в этом диапазоне значительно слабее, чем в красном, используя высокочувствительные детекторы и лазерное излучение, соответствующее максимальному поглощению ФС в крайней красной полосе, эту флуоресценцию можно зарегистрировать при световых дозах возбуждающего излучения, не приводящих к гипертермическому эффекту. За счет использования более длинноволнового излучения для возбуждения флуоресценции в максимум пика поглощения ФС и регистрации флуоресценции уже в БИК диапазоне достигается значимое увеличение контрастности изображения с большей глубины, так как рассеяние и поглощение тканей в данном диапазоне спектра значительно слабее [36].

1.3 Модели распространения света в биологических тканях

Для описания распространения света в биологических тканях существует два основных подхода: решение уравнения Максвелла и применение модели теории переноса излучения.

Как правило при решении уравнений Максвелла пользуются приближением Ми [37, 38]. В этом приближении клетки их органеллы, а также элементы межклеточного матрикса представляются сферами и цилиндрами. Их показатели преломления рассчитываются по содержанию в них белков и жиров.

Угловая зависимость интенсивности рассеянного излучения *I* от угла отклонения от первоначального распространения *θ* и азимутального угла *φ* выражается безразмерной функцией *F*(*θ*,*φ*), что позволяет выразить интенсивность рассеянного излучения как

$$I = \frac{I_0 \cdot F(\theta, \varphi)}{k^2 \cdot r^2} \tag{6}$$

где *r* – расстояние от рассеивателя, *k* – волновое число.

Рассеянная волна *u* на большом расстоянии является сферической волной с амплитудой, обратно пропорциональной расстоянию, что позволяет ввести в рассмотрение амплитудную функцию рассеивающей частицы S(θ,φ):

$$u = S(\theta, \varphi) \frac{e^{-ikr + i\omega t}}{ikr} \tag{7}$$

Тогда для интенсивности справедливо следующее соотношение:

$$I = \frac{I_0 \cdot S^2(\theta, \varphi)}{k^2 \cdot r^2} = \frac{I_0 \cdot F(\theta, \varphi)}{k^2 \cdot r^2}$$
(8)

Для учета многократного рассеяния используют сечение ослабления, являющееся суммой сечений рассеяния и поглощения:

$$\sigma_{
m ocn} = \sigma_{
m pac} + \sigma_{
m norn}$$

Основная формула ослабления [39] для направления вперед (θ =0), учитывающая наложение на падающую волну рассеянной с амплитудной функцией $S(0) = s(0)e^{i\sigma(0)}$, имеет вид:

$$\sigma_{\Pi O \Gamma \Lambda} = \frac{4\pi}{k^2} Re\{S(0)\}$$
(9)

Сечение рассеяния сферической частицей неполяризованного света, приведенное в [40], определено как:

$$\sigma_{\text{pacc}} = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) (|a_n|^2 + |b_n|^2),$$

$$k = \frac{2\pi}{\lambda} n_i$$
(10)

где *k*- волновое число, *n_i* – вещественная часть показателя преломления окружающей частицу среды, *a_n*, *b_n* – коэффициенты разложения рассеянной электромагнитной волны по сферическим гармоникам:

$$a_n = \frac{m\psi_n(mx)\psi'_n(x) - \psi_n(x)\psi'_n(mx)}{m\psi_n(mx)\xi'_n(x) - \xi_n(x)\psi'_n(mx)}$$
(11)

$$b_n = \frac{\psi_n(mx)\psi_n'(x) - m\psi_n(x)\psi_n'(mx)}{\psi_n(mx)\xi_n'(x) - m\xi_n(x)\psi_n'(mx)}$$

где $m = n_s/n_i$ – относительный показатель преломления; n_s –вещественная часть показателя преломления рассеивающей частицы; $x = ka = \frac{2\pi n_i a}{\lambda}$ – параметр дифракции; *a*-радиус рассеивающей частицы; $\psi_n(\rho) = \rho j_n(\rho)$ - функции Рикатти-Бесселя, производные для векторных гармоник, по которым осуществляется разложение падающей плоской волны; $h_n^{(1)}$ - сферическая функция Бесселя 1-го рода n-го порядка, $h_n^{(2)}$ - сферическая функция Бесселя 1-го рода n-го порядка, $h_n^{(2)}$ - сферическая первого и второго порядков:

$$\begin{split} h_{n}^{(1)}(\rho) &= j_{n}(\rho) + i y_{n}(\rho) \\ h_{n}^{(2)}(\rho) &= j_{n}(\rho) - i y_{n}(\rho) \end{split} \tag{12}$$

В случае сильного отличия рассеивающей структуры от сферической, решение Ми необходимо оптимизировать. Существует ряд решений для цилиндрических рассеивателей [41, 42].

В случае сильной гетерогенности среды и учете многократного рассеивания, решение уравнения Максвелла крайне затруднительно. Поэтому пользуются моделью теории переноса излучения [43]. Она не учитывает волновые свойства света, поляризацию, интерференцию. В данной модели рассматривается перенос световой энергии в среде. При этом используют усредненные по некоторому элементарному объему оптические характеристики: коэффициент поглощения, коэффициент рассеяния и фактор анизотропии. Часто вводят редуцированный коэффициент рассеяния $\mu'_s = \mu_s(1-g)$. Который учитывает насколько больше столкновений в анизотропной среде должно произойти по сравнению с

Основное стационарное уравнение теории переноса излучения для монохроматического света имеет вид [44]:

$$s \cdot \Delta L(r,s) = -(\mu_a + \mu_s) L(r,s) + \mu_s \int p(s,s') L(r,s') \mathrm{d}\omega' \quad (13)$$

где $\Delta L(r,s)$ – лучевая интенсивность света в точке r в направлении s; $d\omega'$ - элемент

телесного угла в направлении s'; p(s, s') – фазовая функция рассеяния.

Существует несколько подходов к решению данного интегро-дифференциального уравнения.

В диффузионном приближении рассматривается случай, при котором $\mu_s \gg \mu_a$. Используется уравнение диффузии, устанавливающее связь между потоком энергии и ее распределением в среде. Данное приближение хорошо описывает распространение света на большом расстоянии от излучателя. И применимо только для изотропной среды.

В связи с развитием вычислительной техники все более популярным становится способ численного моделирования распространения излучения в рассеивающих средах методом Монте Карло [45]. В алгоритме рассматривается ход единичного фотона, испытывающего акты поглощения, рассеивания и изменения угла распространения. Расчет движения фотона продолжается до тех пор, пока он не поглотится, либо выйдет за пределы экспериментального объема. Для предотвращения бесконечного выполнения цикла прохода фотона часто ограничивают число шагов фотона. Для получения достоверных результатов алгоритм повторяют для числа фотонов превосходящее 10⁶.

При выполнении итерации цикла требуется определять следующие случайные величины:

- *ү*₁ для расчета длины свободного пробега фотона *l*;
- γ₂ и γ₃ для расчета зенитного угла θ и азимутального угла ψ, определяющих направление отклонения фотона от первоначального направления распространения в результате рассеяния;
- *γ*₄ для расчета вероятности испускания фотона флуоресценции в результате поглощения фотона возбуждающего лазерного излучения;
- ү5 для расчета вероятности отражения/преломления при переходе фотона через границу раздела сред с различающимися показателями преломления.

Для оптимизации алгоритма рассматривают распространение не одного фотона, а пакета фотонов с весом W. При этом подразумевается, что на каждом шаге пакет фотонов теряет часть своего веса в соответствии с коэффициентом поглощения. Алгоритм начинается с запуска пакета фотонов с весом W.

Длина свободного пробега пакета фотонов зависит от суммы обратных величин коэффициентов поглощения и рассеяния μ_t (п.1.1), и первого случайного числа с

нормальным распределением от 0 до 1:

$$l = -\frac{\ln(\gamma_1)}{\mu_t} \tag{14}$$

Перемещение фотона при этом рассчитывается по направляющим косинусам [37].

Рассеяние фотона рассматривается как отклонение фотона на угол θ от первоначального направления. Для расчета рассеяния используется функция плотности вероятности Хеньи-Гринштейна *p*:

$$p(\cos\theta) = \frac{1 - g^2}{2(1 + g^2 - 2g \cdot \cos\theta)^{3/2}}$$
(15)

Тогда для изменения угла на величину не равную 0 можно записать:

$$\cos\theta = \frac{1}{2g} \left[1 + g^2 - \left(\frac{1 - g^2}{1 - g + 2g\gamma_2} \right)^2 \right]$$
(16)

При этом считается, что этот процесс симметричен относительно зенитной оси и равномерно распределен в интервале 0 до 2π

$$\psi = 2\pi\gamma_3$$

Таким образом новые координаты u_{xx}, u_{yy}, u_{zz} фотона на следующем шаге рассчитывается следующим образом:

$$u_{yy} = \frac{(u_y u_z \cos \psi - u_x \sin psi)}{\sqrt{1 - u_z^2}} \sin \theta + u_y \cos \theta$$
$$u_{xx} = \frac{(u_x u_z \cos \psi - u_y \sin psi)}{\sqrt{1 - u_z^2}} \sin \theta + u_x \cos \theta$$
(17)
$$u_{zz} = -\sin \theta \cos \psi \sqrt{1 - u_z^2} + u_z \cos \theta$$

где u_x , u_y , u_z – координаты фотона на предыдущем шаге.

1.4 Лазерно-индуцированные тепловые поля в биологических тканях

При распространении лазерного излучения в биологической ткани происходит его рассеивание то, есть отклонение от начальной траектории распространения, и поглощение. При поглощении лазерного излучения молекулами в биологической ткани, они переходят из основного состояния в возбужденное[46]. Переход с возбужденного состояния обратно в основное невозбужденное состояние может осуществляться несколькими путями: излучательным и безылучательным или их комбинацией (рисунок 2).



Рисунок 2. Энергетические уровни и переходы между ними в молекуле вещества.

Вероятности переходов обусловлены строением поглощающей молекулы. В процессе безызлучательных переходов часть энергии переходит в нагрев молекулы.

Как уже было сказано в п.1.1, основными поглотителями излучения в биологической ткани являются вода, жиры, белки, хромофоры. В разных типах тканей содержатся различные концентрации этих веществ, поэтому коэффициенты поглощения для тканей отличаются. В таблице представлены коэффициенты поглощения различных типов тканей для некоторых длин волн [47].

Тип биологической	Длина волны, нм	μ_a , см $^{-1}$	μ_s , см $^{-1}$
ткани			
Белое вешество	632.8	2.2 <u>±</u> 0.2	532 <u>+</u> 41
Белос вещество	1064	3.2±0.4	469 <u>+</u> 34
Серое вещество	632.8	2.7 <u>+</u> 0.2	354 <u>+</u> 37
Серое вещество	1064	5.0 <u>±</u> 0.5	134 <u>+</u> 14
Печень	630	3.2	414
	515	18.9	285
Мышечная ткань	630	1.0	40
	515	11.2	530

Таблица 1. Коэффициенты поглощения и рассеяния различных типов тканей.

Важно учитывать, что на характер тепловых полей в процессе нагревания биологических тканей влияют не только их свойства, но и параметры лазерного излучения: длина волны, плотность мощности лазерного излучения, режим возбуждения (импульсное/ непрерывное), длина импульса, частота импульсов и скважность [48, 49, 50].

На рисунке 3 представлены процессы, которые могут происходить в биологической ткани при различных способах облучения [51].



Рисунок З. Виды лазерного воздействия в зависимости от плотности мощности и времени облучения.

Можно выделить следующие температурные диапазоны и соответствующее воздействие на биологические ткани (Таблица 2)

Таблица	2.	Типы	лазерного	воздействия	НӘ	биологические	ткани	В	Зависимости	ОТ
температ	урь	ы.								

темп. (С)	воздействие на биологические ткани
37°	не имеется необратимых повреждений
40 - 45°	активация ферментов, образование отеков, изменение мембран и в зависимости от времени, смерть клеток
60°	денатурация протеина, начало коагуляции и некрозы
80°	денатурация коллагена, дефекты мембраны
100°	обезвоживание

Свыше 150°	обугливание
300°>	абляция, горение

Одно из главных отличий в воздействии обнаруживается при рассмотрении импульсных лазеров и непрерывных. Импульсные лазеры способны сообщить биологической ткани интенсивность от $10^6 \frac{B_T}{cM^2}$ за импульс длительностью всего сотни наносекунд. Такое количество энергии приводит к абляции биологической ткани [52][53]. В свою очередь непрерывные лазеры могут постепенно, равномерно нагревать большой объем биологической ткани, вызывая в нем коагуляцию, денатурацию. Рисунок 4 иллюстрирует данное различие:



Рисунок 4. Влияние, оказываемое на биологическую ткань: А) короткоимпульмным лазером и Б) непрерывным лазером.

Эти эффекты нашли свое применение в медицине. При помощи лазерной абляции удаляют камни в почках [54]. Лазерная литотрипсия является наиболее распространенной лазерной процедурой, выполняемой в урологии, приблизительно 300 000 случаев, выполняемых ежегодно [55]. Во время лазерной литотрипсии для камней малого и среднего размера (<1.5 см) через мочевой тракт вводится жесткий или гибкий уретероскоп для освещения и визуализации, а оптическое волокно вводится через рабочий канал уретероскопа для доставки лазерного излучения к камню в мочевом пузыре, мочеточнике или почке. Затем включается лазер, который дробит камень на более мелкие кусочки.

Фемтосекудные лазеры применяются для лечения сетчатки, стекловидного тела, хрусталика, ресничного тела, радужной оболочки, угла роговицы, роговицы, склеры, конъюнктивы и века [56].

Широкое применение находит использование лазеров при ангиопластике [57]. Лазерная ангиопластика - это процедура, при которой тонкий волоконно-оптический катетер вводится в артерию в ноге и под контролем рентгеноскопии доводится до нужного участка пораженной артерии. На волокне находится специальный наконечник, равномерно облучающий сосуд. Бляшка поглощает лазерное излучение и испаряется, при этом прилегающие ткани не повреждаются. Процедура может быть выполнена в нехирургической обстановке с использованием местной анестезии. Пребывание в больнице минимально, и после операции пациент испытывает меньше боли и дискомфорта.

Непрерывными лазерами выполняют такие медицинские процедуры как фотодинамическая терапия и гипертермия.

ФДТ - это способ лечения раковых заболеваний, при котором пациенту вводится специальное вещество – ФС. Он избирательно накапливается в опухоли и способен поглощать лазерное излучение определенной длины волны. При поглощении лазерного излучения образуется синглетный кислород, разрушающий раковые клетки [58]. Для успешного проведения ФДТ необходимо доставить определенное количество дозы лазерного излучения, при этом раковые клетки будут умирать по пути апоптоза[59]. Это является максимально благоприятным исходом для организма.

Гипертермия – это вид терапии рака, при которой за счет поглощения тканью лазерного излучения создается локальное повышение температуры в области в диапазоне от 42.5 °C до 44.0-45.0 °C. В результате происходит разрушение мембран клеток [60, 61, 62]

Даже несмотря на то, что эффекты, оказываемые повышенной температурой на клетки тканей человека, все еще изучаются, было обнаружено [63, 64], что выживаемость клеток снижается уже при нагревании до 39.0-42.0 ° С, а при нагревании свыше 42.5 °C в течение 1 часа это снижение резко усиливается. Тем не менее, большинство видов рака, включая первичные участки, а также рецидивирующие или метастатические участки, расположены глубоко внутри тела. Это делает гипертермию менее эффективной, поскольку довольно трудно нагревать только раковые ткани до температуры выше 42 °C с использованием доступных в настоящее время нагревательных приборов.

1.5 Теоретическое описание процессов нагревания биологических тканей

В общем случае моделирование тепловых процессов в биоткани требует решения трехмерного уравнения вида [65]:

$$\frac{\partial}{\partial t}T(\vec{r},t) = \left(\nabla, D\nabla T(\vec{r},t)\right) + f(\vec{r},t)$$
(18)

где $T(\vec{r},t)$ - функция распределения температуры,

D – коэффициент диффузии;

∇ – оператор набла;

(,) – скалярное произведение;

f(*r*,*t*) – распределение плотности мощности тепловых нагрузок в биологической ткани, обусловленных поглощением.

Рассматривая одномерный случай полубесконечной среды, при котором не теряется точность результатов и характерных особенностей распределения тепловых полей в биологической среде, распределение температуры будет функцией двух переменных *T*(*x*,*t*), где *x* – расстояние от поверхности среды в миллиметрах, а *t* – время в секундах. Уравнение теплопроводности запишется в виде:

$$\frac{\partial T}{\partial t} = a^2 \frac{\partial^2 T}{\partial x^2} + f(x,t) \tag{19}$$

Одномерное уравнение теплопроводности для случая полубесконечной гомогенной среды используется для описания распределения тепла в процессе облучения биологической ткани точечным источником света [66]:

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \frac{\gamma}{\rho_t c_t} \frac{\partial^2 T}{\partial x^2} - \frac{\rho_b c_b}{c_t} m \left(T - T_b \right) + \frac{I_0}{\rho_t c_t L} exp\left(-\frac{x}{L} \right)$$
(20)

где x – координата, t - время, T(x,t) – функция распределения температуры, T_b – температура крови, γ – коэффициент теплопроводности ткани, ρ_t и ρ_b – плотности биоткани и крови, c_t и c_b – теплоемкости биоткани и крови, m – скорость потока крови на единицу

массы ткани, I₀ – плотность мощности лазерного излучения на облучаемой поверхности, L – глубина, на которой мощность лазерного излучения падает в е-раз. Последние два слагаемых в правой части уравнения описывают изменение теплового потока. Первое из них учитывает изменение температуры за счет кровообращения, второе – приход тепла за счет поглощения лазерного излучения.

Граничное условие, описывающие контактное охлаждение поверхности:

$$\frac{\partial T}{\partial x}\Big|_{x=0} = -\frac{k}{\gamma}(T_c - T(0, t)) \tag{21}$$

где k – коэффициент теплопроводности между окружающей средой и верхним слоем ткани, T_c – температура охлаждающей поверхности.

Стационарным решением данного уравнения является равенство [67]:

$$T(x,\infty) = \frac{I_0}{\gamma L (b - L^{-2})} \left[\exp\left(-\frac{x}{L}\right) - \frac{\frac{\gamma}{L} + k}{\gamma \sqrt{b} + k} \exp\left(-\sqrt{b}x\right) \right] + \left(T_c + T_b\right) \frac{k}{\gamma \sqrt{b} + k} \exp\left(-\sqrt{b}x\right) + T_b, \quad b = \frac{\rho_b \rho_t c_t m}{\gamma}$$
(22)

Данная формула будет использоваться для теоретических расчетов распределения температуры внутри биологических тканей при лазерном облучении.

Одним из новых подходов к математическому описанию распространения тепловых полей в биологических средах является описание биологической ткани как пористой среды [68]. Пористая среда представляет собой объем материала, состоящий из сплошной матрицы и связанный пустотой. Ее основная характеристика - пористость, отношение пустого пространства к общему объему среды. Поток в пористой среде описывается законом Дарси, который линейно связывает скорость потока с градиентом давления в пористой среде [69]. Пористая среда также характеризуется своей проницаемостью, которая является мерой проводимости потока в пористой среде. Важной характеристикой в комбинации жидкости и пористой среды является извилистость, которая представляет собой препятствие для диффузии потока, обусловленное локальными границами или локальной вязкостью. Извилистость особенно важна в связи с медицинским применением. Более поздние разработки в пористых средах привели к расширению усовершенствованных моделей для закона Дарси, таких как уравнение Форхгеймера [70] и уравнение Бринкманса [71], где первое применимо для больших скоростей потока, а второе учитывает граничные эффекты. Эти эффекты не учитываются в уравнении Дарси.

Теплопередача в тканях человека включает сложные процессы, такие как теплопроводность в тканях, теплопередача из-за перфузии артериально-венозной крови через поры ткани (конвекция крови), метаболическое тепловыделение и внешние взаимодействия [72]:

$$(\rho C)_{eff}\frac{\partial T}{\partial t} - \nabla \cdot (k_{eff}\nabla T) = -(\rho C)_b u \cdot \nabla T + Q_{met} + Qext$$
(23)

при

$$(\rho C)_{eff} = (1 - \varepsilon_p)(\rho C)_S + \varepsilon_p (\rho C)_b$$

$$k_{eff} = (1 - \varepsilon_p)k_s + \varepsilon_p k_b$$
(24)

где ρ - плотность, C - теплоемкость, k - теплопроводность, T - температура, u – скорость крови, Q_{met} - метаболический источник тепла и Q_{ext} - внешний источник тепла , ε_p – пористость, индексы *eff*, *b*, *s* – означают эффективное значение, кровь и твердая фаза.

Уравнение для потока при этом рассчитывается согласно:

$$\left(\frac{\rho}{\varepsilon_p}\right)\frac{\partial u}{\partial t} + \left(\frac{\mu}{k}\right)u = -\nabla p + \nabla \cdot \left[\left(\frac{1}{\varepsilon_p}\right)\left(\mu(\nabla u + (\nabla u)^T)\right)\right] + \rho g\beta(T - T_{ref}) \quad (25)$$

где ρ - плотность ткани, β - коэффициент объемного расширения, u - скорость, p - давление, μ - динамическая вязкость, t - время, T - температура ткани, T_{ref} - рассматриваемая здесь контрольная температура, которая составляет 37 °C, k - проницаемость пористой ткани.

Данная модель позволяет учитывать смещение температурного поля вследствие направленного движения крови в области облучения. Размеры области при этом не превышают 1x1 мм. Однако в работе подразумевается облучение области биологических тканей размер, которых превышает 20x20 мм. При таких размерах пятна облучения вклад смещения теплового поля нивелируется за счет усреднения капиллярных потоков крови во всех направлениях.

Следует отметить, что данный подход, как и традиционный, не учитывает изменение скорости кровотока в процессе облучения и глубины, на которой мощность лазерного излучения падает в е-раз в процессе облучения. Изменение скорости кровотока происходит из-за регуляции организма при локальном нагреве, а изменение глубины – из-за изменения оптических свойств биологических тканей при их нагреве.

Хотя и ведутся разработки теоретических моделей, учитывающих изменения кровотока в процессе лазерно-индуцированного нагрева биологических тканей [73], но на модель накладываются дополнительные ограничения, такие как наличие крупных сосудов, наличие обильного капиллярного кровоснабжения, не позволяющие применять ее в реальной практике.

1.6 Зависимость оптических свойств биологических тканей от температурного воздействия

При увеличении температуры биологических тканей меняются их оптические параметры. Как было показано в п.1.1 на рассеяние влияет форма и размеры рассеивающих объектов. Известно, что органеллы клетки и составляющие их белки при температурном воздействии изменяют свою форму. Так при нагреве в диапазоне температур 60-70°*C* происходит денатурация белков, в результате чего их пространственная структура изменяется. Происходит их разворачивание. Длина свободного пробега фотона уменьшается, увеличивается коэффициент рассеивания [74, 75].

Дальнейший нагрев приводит к обезвоживанию ткани, коагуляции белков и жиров. Рассеивающие объекты становятся ближе друг к другу, а их размеры уменьшаются. Биологическая ткань становится более оптически плотной. Этот эффект приводит к увеличению коэффициентов поглощения и рассеяния и уменьшению фактора анизотропии [76, 77].

Дальнейшее нагревание приводит к полному обезвоживанию и коагуляции, и, как следствие, к уплотнению тканей. Показатель преломления биологической ткани при этом увеличивается [78]. Дальнейшее нагревание биологической ткани приводит к тому, что сложные белки разлагаются на более простые, и коэффициент поглощения начинает резко возрастать [79]. При ее дальнейшем нагреве происходит обугливание ткани и ее карбонизация.

Заключение к главе 1

Наибольшее влияние на взаимодействие лазерного излучения и биологических тканей оказывают их оптические и термические свойства. Поэтому их изучению и табулированию посвящено большое количество работ.

Для описания распространения света в биологических тканях существует множество подходов. Основные два - это решение уравнений Максвелла и решение уравнения теории переноса излучения. Решение уравнений Максвелла в общем виде является крайне затруднительным, поэтому пользуются различными приближениями и упрощениями. Наиболее известным и распространенным является приближение диффузии. Уравнение теории переноса является интегро-дифференциальным. Наиболее известными способом решения является метод Монте Карло. В нем рассматривается ход группы фотонов, задаваемый коэффициентами поглощения, рассеяния и фактором анизотропии. В результате расчета получается картина рассеяния и поглощения в модели биологической среды. Для достоверной и быстрой оценки распространения излучения в гетерогенных рассеивающих средах требуется оптимизация и расширение возможностей существующих алгоритмов методов расчета Монте Карло.

Для обобщенного описания оптических свойств биологических тканей и их зависимости от длины волны используют аппроксимацию экспериментальных данных модельной зависимостью. В этом случае описывают модель рассеяния излучения биологической тканью, клетками, органеллами клеток и молекулами.

Для описания тепловых полей применяется уравнение теплопроводности. Однако оно не учитывает перенос тепла вследствие кровотока. Новым методом описания нагревания биологических тканей является описание биологической ткани как пористой среды и задание кровотока в гетерогенной среде при помощи уравнения Дарси. Варьируя параметры облучения и граничные условия, накладываемые на облучаемую сторону, можно достигать существенные изменения в характере распространения тепловых полей.

Важным следствием реакции биологических тканей на нагревание является изменение их оптических свойств. Эти изменения происходят из-за трансформации пространственной структуры рассеивателей в ткани, например, белков. Для корректного описания распространения световых полей в биологических тканях при их нагревании требуется разработка методов регистрации изменения оптических свойств, во время контактного облучения.

ГЛАВА 2. ИСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ, ПРИБОРЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Данная глава посвящена методам экспериментального и теоретического моделирования, использованным в работе. В первом параграфе приведены оптические свойства моделей и биологических тканей, использованных в работе. Приведена статистика пациентов, принимающих участие в клинических исследованиях. Во втором параграфе описан разработанный алгоритм для моделирования распространения фотонов в многослойной гетерогенной среде. Описаны методики определения глубины зондирования при моделировании Монте Карло, экспериментально и теоретически.

В параграфе четыре описана разработанная программа для расчета распространения излучения в изогнутом оптическом волокне при нарушении полного внутреннего отражения. В параграфах с пятого по девятый описаны методики регистрации, спектров флуоресценции и флуоресцентных изображений. В параграфах с девятого по двенадцатый описана математическая модель лазерно-индуцированного нагревания биологической ткани, способ контролирования теплового пятна нагрева, а также предложено устройство, реализующее данный способ. В параграфе двенадцать описано разработанное устройство для регистрации излучения, рассеянного назад на изгибе волокна. В параграфе тринадцать и четырнадцать приведены методики для расчета концентрации фотосенсибилизатора в биологических тканях по интенсивности флуоресцентного сигнала, и способ измерения фактора анизотропии рассеивающих сред при помощи гониометрической установки.

В параграфе пятнадцать описан принцип работы и составные части разработанной системы флуоресцентной визуализации в ближнем инфракрасном диапазоне. А также описан алгоритм обработки флуоресцентных изображений и видеофайлов.

2.1 Объекты исследования

2.1.1 Моделирование оптических параметров биологической такни

При проведении лабораторных исследований распространения лазерного излучения в биологических тканях для моделирования рассеивающих свойств, как правило, используют растворы жировых эмульсий, например, интралипида. Коэффициент поглощения в данных растворах при длинах волн больших 550 нм достаточно мал. Коэффициент рассеяния при этом зависит от концентрации жировой эмульсии [80, 81. 82].

В данной работе для моделирования рассеивающих свойств мозговой ткани был использован раствор жировой эмульсии (Lipofundin MCT/LCT 20%[™], B. Braun Melsungen AG,

Германия). В таблице 3 представлены оптические параметры получаемых растворов жировой эмульсии.

Таблица 3. Значения коэффициента рассеяния и фактора анизтропии для приготовленных растворов Интралипида в сравнении с белым веществом головного мозга человека. Коэффициент поглощения для разных концентраций отличался не боле, чем на 3% и составлял 0.008 ± 0.002 и 0.003 ± 0.001 для длин волн 532 нм и 632.8 нм.

Концентрация	Длина волны, нм	μ _s , см ⁻¹	g
ж.эм. (%)			
0.5	550	25	0.8
0.5	632	19	0.75
1	550	50	0.81
T	632	37	0.77
2	550	100	0.81
2	632	74	0.79
A	550	200	0.83
Т	632	149	0.79
8	550	400	0.83
0	632	297	0.81
10	550	514	0.85
10	632	341	0.83
Белое вещество	550	410	0.87
Белос вещество	632	409	0.84

Для исследования распространения флуоресцентного излучения в моделях тканей головного мозга в приготовленные растворы жировой эмульсии был добавлен флуорофор ПпIX (Frontier Scientific) в различных концентрациях от 0 до 20 мг/л. Данный флуорофор был использован в силу того, что его преимущественно используют для интраоперационной флуоресцентной навигации при операциях на головном и спинном мозге.

2.1.2 Типы биологической ткани и их параметры

Для исследования изменения оптических параметров биологической ткани таких как, коэффициент поглощения и коэффициент рассеяния, при их нагреве были взяты
образцы бычьей печени, мышечной ткани свиньи и мозговой ткани крысы.

Для исследования управляемых лазерно-индуцированных тепловых полей в биологических тканях при охлаждении поверхности были использованы говяжья печень и мышечная ткань. Параметры моделирования распространения тепловых полей, а также параметры самих тканей представлены в таблице 4 [83, 84, 85, 86].

Параметр		Значение		
температура крови, °С	Tb	37.35		
плотность крови, 10 ⁻³ кг/м ³	ρь	1.057		
теплоемкость крови, кДж/(кг*К)	Cb	3.9		
скорость потока крови, см/с	m	2		
тип ткани		печень	мышечная ткань	
теплопроводность ткани, Вт/(м*К)	γ	0.57	0.53	
плотность ткани, 10 ⁻³ кг/м ³	ρt	1.05	1.01	
теплоёмкость ткани, кДж/(кг*К)	Ct	3.6	3.7	
глубина ослабления в е-раз, см	L	0.058	0.094	
коэффициент теплопроводности	k	2600		
ткань/сапфир, Вт/(м²*К)				
длина волны, нм	λ	810		

Таблица 4. Параметры биологических тканей и моделирования распространения лазерноиндуцированных тепловых полей.

2.1.3 Подготовка образцов для исследования лазерно-индуцированного теплового воздействия на биологические ткани

Образцы биологических тканей при комнатной температуре помещались в чашки Петри. На поверхности образца располагали устройство контактного облучения внутрикожных опухолей и метастазов, в которое с помощью оптических волокон типа SMA-SMA доставлялось лазерное излучение с длиной волны 810 нм и мощностью от 1 Вт/см² до 3 Вт/см². Образцы подвергали лазерному облучению в течение 3 минут.

После облучения образец разрезался в плоскости перпендикулярной поверхности биологической ткани проходящей через середину зоны облучения для проведения гистологических исследований.

2.1.4 Клинические исследования

Исследования распространения флуоресцентного излучения в тканях стопы у пациентов с диабетом проводились на базе ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России. После одобрения этического комитета на использование разработанного устройства для флуоресцентной ангиографии, и письменного согласия пациентов (90 пациентов)

Исследование тепловых полей и тепловых эффектов, образующихся в процессе фотодинамической терапии, были проведены у 5 пациентов на базе Государственного научного центра лазерной медицины Минздрава России, у 25 пациентов на базе Онкологического клинического диспансера № 1 г. Москва, у 8 пациентов на базе МНИОИ им. П.А. Герцена.

2.2 Математическое моделирование гетерогенной структуры биологической ткани, содержащей фотосенсибилизатор

Для моделирования распространения лазерного излучения в мутных средах был модифицированный метод Монте Карло. В основу был взят алгоритм, предложенный авторами Scott Prahl, Steven Jacques, Lihong Wang в 87, 88. Данный алгоритм применяется для расчета распространения фотонов в многослойной среде. Каждый слой задается следующими параметрами: координата верха слоя, координата низа слоя, коэффициент поглощения, коэффициент рассеяния, фактор анизотропии g. Слои расположены перпендикулярно начальному направлению распространения фотонов. Данный алгоритм выполняется для пачки фотонов. Размер каждой пачки задавался равным миллиону фотонов.

Для исследования гетерогенной структуры в силу начальных ограничений алгоритм, предложенный в [86], не подходит. Была проведена модернизация данного алгоритма. Алгоритм функционально был расширен. Была добавлена возможность задания слоя, ограниченного не только координатой *z*, но и *x*. Данная функциональность позволила моделировать биологическую ткань, в которой проходит кровеносный сосуд с резко отличающимися оптическими параметрами. На рисунке 5 изображена модель для расчета распространения лазерного излучения в гетерогенной многослойной среде.



Рисунок 5. Модельный объект для расчета рассеяния фотонов в многослойной гетерогенной среде.

В силу того, что метод Монте Карло выполняется для числа фотонов превосходящего миллион, то на расчет всех фотонов требуется большое количество машинного времени. Для больших объемов модели может потребоваться до 40 часов. Для оптимизации расчетов было предложено проводить вычисления не на процессоре компьютера CPU, а на графических процессорах GPU. Для графических процессоров компании Nvidia реализация данной технологии носит название CUDA.

Рассмотрим основные различия между архитектурами СРU и GPU. Ядра СРU созданы одного потока последовательных инструкций с максимальной для исполнения производительностью, а GPU проектируются для быстрого исполнения большого числа потоков инструкций. Универсальные параллельно выполняемых процессоры оптимизированы для достижения высокой производительности единственного потока команд, обрабатывающего и целые числа, и числа с плавающей точкой. Ядра GPU изначально были созданы для параллельной работы. **GPU** используется большое количество исполнительных блоков до 12 000, которые легко загрузить, в отличие от последовательного потока инструкций для СРU.

Другой особенностью модернизированного алгоритма является то, что можно задавать различные источники лазерного излучения. Источником излучения в модели служит оптическое волокно. Можно задать различное количество волокон, их положение и угол наклона при вводе в среду [89].

На рисунке 6 представлена блок-схема алгоритма Монте Карло выполняемого на GPU и позволяющего моделировать распространение света в гетерогенных объектах.



Рисунок 6. Блок-схема разработанного метода Монте Карло для параллельного выполнения на GPU для многослойной гетерогенной модели.

Результатом выполнения алгоритма является матрица HxWxD, в каждом элементе

которой содержится количество актов рассеяния фотонов. Делая срезы по данной матрице, можно построить одно, двумерное распределение фотонов, тем самым получить картину рассеяния в гетерогенной среде.

2.3 Метод определения глубины зондирования биологических тканей

Если расположить источник лазерного излучения и приёмник рассеянного излучения на некотором расстоянии друг от друга, то испущенные фотоны от одного волокна будут проходить к другому в области, имеющей форму «банана» в полубесконечной среде (рисунок 7а). Данная форма получается при помощи аналитического решения уравнения диффузии [90, 91], а так же моделированием с помощью метода Монте Карло [86].

2.3.1 Диффузионное приближение

Из уравнения диффузии в случае однородной среды выражение для функции распределения излучения в веществе в точке $\vec{r_1} = (x, y, z)$ имеет вид:

$$P(x, y, z) = \frac{z^2 \left(k\sqrt{(r-x)^2 + y^2 + z^2} + 1\right) \left(k\sqrt{x^2 + y^2 + z^2} + 1\right)}{((r-x)^2 + y^2 + z^2)^{3/2} (x^2 + y^2 + z^2)^{3/2}} e^{-k\left(\sqrt{(r-x)^2 + y^2 + z^2} + \sqrt{x^2 + y^2 + z^2}\right)}$$
(26)

где r – расстояние между излучающим и принимающим фотоны волокнами, k = $\frac{1}{L_a}$, L_a = $\sqrt{\frac{D}{\mu_a}}$, L_a – длина поглощения, D – коэффициент диффузии, D = $\frac{1}{3\mu_a[\mu_a+(1-g)\mu_s]}$, μ_a – коэффициент поглощения, см⁻¹; μ_s – коэффициент рассеяния, см⁻¹; g – средний косинус угла рассеяния. Глубина максимума функции распределения фотонов *P*(x, y, z) в поперечном сечении y-z при y=0 (из симметрии) и при условии слабого поглощения kr«1:

$$z(r) = \sqrt{\frac{1}{8} \left[\sqrt{(x^2 + (r - x)^2)^2 + 32x^2(r - x)^2} - x^2 - (r - x)^2 \right]}$$
(27)

За глубину зондирования принимается максимальное расстояние от поверхности облучаемого объекта между волокном-источником и волокном-приёмником до средней части области наиболее вероятного прохождения фотонов (рисунок 7а). Выражение (27) определяет глубину зондирования при фиксированном расстоянии между источниками.



Рисунок 7. а) Распределение фотонов в мутной среде, вылетающих из волокна-источника и попадающих в волокно-приемник. Область наиболее вероятного прохождения фотонов ограничена границами «банана» (пунктирные линии), г - расстояние между волокнами. б) Область наиболее вероятного прохождения фотонов, вылетающих из двух волоконисточников.

2.3.2 Метод Монте Карло

Как уже было сказано испущенные фотоны от одного волокна проходят к другому в области имеющей форму «банана». Если поменять местами излучатель и приемник, то в силу симметрии и изотропности рассеивающей среды эта форма останется такой же. Заменим волокно-приёмник на волокно-источник. Это не повлияет на распределение диффузных фотонов вылетевших из волокон так, как поля от волокон-источников не взаимодействуют. Области наиболее вероятного прохождения фотонов от волокна 1 к волокну 2 и от волокна 2 к волокну 1 будут совпадать, а интенсивности полей будут накладываться друг на друга (рисунок 76) [92, 93]. Таким образом, получив изображение распространения фотонов между волокнами-источникам, можно найти область наиболее вероятного прохождения зондирования рассеянным излучением.

При помощи метода Монте Карло, предложенного в п.2.2, можно смоделировать распространение лазерного излучения в многослойной среде таким образом, что источниками излучения будут являться два волокна, расположенных на расстоянии друг от друга. Используя полученные результаты, будет найдена траектория наиболее вероятного прохождения фотонов и глубина зондирования.

2.3.3 Экспериментально на рассеивающей среде

Для получения изображения светового поля рассеянного лазерного излучения между

волокнами была собрана установка, состоящая из специальной кюветы, оптических волокон и фотокамеры (рисунок 8). Размер кюветы 50 мм х 60 мм х 30 мм. Стенки кюветы оптически прозрачные, одна из них имеет толщину 0.08 мм. В качестве источников лазерного излучения были использованы лазеры с длинами волн 632.8 нм мощностью 150 мВт (Не-Ne лазер, Биоспек) и 532 нм мощностью 150 мВт (непрерывный диодный лазер, Биоспек). Для доставки лазерного излучения использовались два кварц/полимерных оптоволокна (диаметр 600 мкм, числовая апертура 0.48). Они погружались в кювету на глубину 10 мм и максимально приближались к тонкой стенке. С помощью черно-белой камеры «Видеоскан-415» (ЗАО "НПК ВИДЕОСКАН") с глубиной цвета 24 бита, устанавливаемой параллельно тонкой стенке, были получены снимки светового поля между волокнами. Искажения в получаемом изображении распределения интенсивностей минимальны. Эффекты переотражения внутри тонкой стенки несущественны, так как длина пробега фотонов сопоставима с толщиной стенки, а показатель преломления пленки отличается от показателя преломления раствора менее чем на 10%. А распределение интенсивности светового поля симметрично относительно плоскости проходящей через середины волокон и параллельной стенке кюветы.



Рисунок 8. Схема эксперимента по определению глубины зондирования.

Алгоритм поиска глубины зондирования для изображений, полученных с помощью метода Монте Карло и в эксперименте, заключается в следующем. Область наиболее вероятной траектории распространения фотонов, наиболее яркая. Поэтому, если искать точки на изображении распространения фотонов между двумя волокнами-источниками, в которых яркость максимальная, то можно получить область, в которой плотность потока фотонов максимальна. Найденная область выделяется цветом, а результаты обработки можно сохранить в графическом файле. Измерив расстояние от поверхности облучаемого

объекта до средней части формы «банана», определяется глубина зондирования.

2.4 Моделирование прохождения лазерного излучения в изогнутом оптическом волокне

При контактном облучении биологической ткани процессы налипания биологической ткани, повреждения облучающего торца волокна влияют на диффузно отраженное излучение, которое обратно входит в облучающее волокно, и на излучение от источника, которое отражается от границы раздела сред оптоволокно/биоткань. Анализируя обратное излучение можно судить о качестве проведения процедуры облучения, о состоянии торца волокна.

Законы распространения света в веществе хорошо изучены и применяются для создания новых типов оптоволокон [94]. Уравнение для описания прохождения света через различные среды называется законом Снеллиуса и записывается в виде [95]:

$$\frac{\sin\vartheta_i}{\sin\vartheta_t} = \frac{n_2}{n_1},\tag{28}$$

где n_1 -показатель преломления среды, из которой свет падает на границу раздела, n_2 -показатель преломления среды, в которую свет попадает, пройдя границу раздела, ϑ_i - угол падения света — угол между падающим на поверхность лучом и нормалью к поверхности, ϑ_t - угол преломления света — угол между прошедшим через поверхность лучом и нормалью к поверхности. При прохождении света из среды с высокой оптической плотностью в среду с меньшей плотностью угол падения меньше, чем угол преломления. Если $n_1 sin \vartheta_i > n_2$, то имеет место полное внутреннее отражение – преломленный луч отсутствует, а падающий луч полностью отражается от раздела сред. Угол падения, при котором угол преломления равен 90°, называется критическим углом:

$$\vartheta_{cr} = \arcsin\binom{n_2}{n_1} \tag{29}$$

Эффект полного внутреннего отражения используется в оптических волокнах. Сердцевина волокна может быть составлен из нескольких слоев с разными показателями преломления. Чтобы имело место полное внутренне отражение, показатель преломления сердцевины должен быть больше чем показатель преломления оболочки. Тогда свет, вошедший в волокно и отражающийся под углами больше критического, будет распространяться по сердцевине. Любой луч, падающий на оболочку под углом меньше критического, проникает в оболочку, а дальше в окружающую среду. Лучи, попадающие в волокно, образуют конус. Этот конус называется «конусом приема». Лучи, попадающие в сердечник и лежащие в пределах этого конуса, распространяются по волокну (рисунок 9). Угол приема – половина угла при вершине конуса приема. Числовая апертура – синус угла приема, выражается через показатель преломления сердцевины волокна и оболочки: A₀ =



Рисунок 9. Ход лучей в волокне на границе раздела сред. Сплошная линия - выходящее из волокна излучение. Штриховая линия – отраженное излучение от раздела сред. Штрихпунктирная линия – входящее рассеянное излучение.

На изгибах волокна некоторые лучи падают под углами меньше, чем критический угол, поэтому они проходят через границу раздела сред, попадают в оболочку и далее выходят из волокна. Существуют два типа изгибов: макроизгиб и микроизгиб. Микроизгиб имеет форму резкого изгиба, радиус которого меньше, чем диаметр сердцевины. Характерный радиус макроизгиба много больше, чем диаметр сердцевины оптоволокна.

На границе раздела сред имеет место отражение Френеля. Формулы Френеля определяют интенсивности отраженного и проходящего излучения. Интенсивности для sполяризованного и p-поляризованного света:

для s-поляризованных волн:

 $\sqrt{n_2^2 - n_1^2}$.

$$R_{s} = \frac{|Q|^{2}}{|P|^{2}} = \frac{\sin^{2}(\vartheta_{i} - \vartheta_{t})}{\sin^{2}(\vartheta_{i} + \vartheta_{t})},$$

$$T_{s} = \frac{|S|^{2}}{|P|^{2}} = \frac{\sin 2\vartheta_{i} \sin 2\vartheta_{t}}{\sin^{2}(\vartheta_{i} + \vartheta_{t})},$$
(30)

для р-поляризованных волн:

$$R_{p} = \frac{tg^{2}(\vartheta_{i} - \vartheta_{t})}{tg^{2}(\vartheta_{i} + \vartheta_{t})},$$

$$T_{p} = \frac{\sin 2\vartheta_{i} \sin 2\vartheta_{t}}{\sin^{2}(\vartheta_{i} + \vartheta_{t})\cos^{2}(\vartheta_{i} - \vartheta_{t})},$$
(31)

где Р — амплитуда волны, которая падает на границу раздела, Q — амплитуда отражённой волны, S — амплитуда преломлённой волны, R_{s,p} - коэффициенты отражения, T_{s,p} - коэффициенты прохождения, θ_i- угол падения света, θ_t - угол преломления света.

К моделированию процесса распространения лазерного излучения внутри оптического волокна, в том числе и изогнутого, можно рассмотреть следующие подходы [96]:

- рассмотрение уравнений Максвелла;
- использование методов статистического моделирования, например метод Монте-Карло, для расчета множества траекторий, опираясь на решение чисто геометрических задач, с использованием уравнений(28)-(31)при отражении на разделе границ двух сред;
- рассмотрение теории интегральных операторов свертки и представить задачу в виде преобразования входной мощности излучения в выходную мощность через искривленный световод.

Первый подход является наиболее точным и физически полным. Однако получение аналитического решения уравнений Максвелла трудоемкий процесс. А решения существуют для крайне ограниченного числа случаев простейших геометрий.

Третий подход рассматривает волокно как некий преобразователь, воздействующий на входное распределение излучения $F(\bar{\beta'}, \bar{l'})$ и преобразующий в новое распределение излучения $\tilde{F}(\bar{\beta}, \bar{l})$ с помощью некоторой функции влияния $K(\bar{\beta'}, \bar{l'}, \bar{\beta}, \bar{l})$. Функция влияния получается при использовании статистических методов моделирования:

$$\tilde{F}(\bar{\beta},\bar{l}) = \int_{\bar{l}_{1}'}^{\bar{l}_{2}'} \int_{\bar{\beta}_{1}'}^{\bar{\beta}_{2}'} F(\bar{\beta}',\bar{l}')K(\bar{\beta}',\bar{l}',\bar{\beta},\bar{l})d(\bar{\beta}',\bar{l}')$$
(32)

Второй подход является наиболее быстрым для реализации и наглядным. Он

алгоритмизуем и может выполняться на ПК [97]. При реализации алгоритма задается начальное распределение излучения. Излучение представляется как набор лучей (более миллиона) с одинаковой интенсивностью. На каждом шаге алгоритма, рассчитывается точка пересечения луча с границей сред, вычисляется интенсивность и направление отраженного луча. Информация о каждом шаге сохраняется. Алгоритм завершается, когда луч выходит за пределы световода. Сохраненные данные обрабатываются, в результате чего получается картина распределения излучения выходящего на изгибе волокна, на сердцевине волокна в любом его месте.

Ход лучей в оптоволокне при нарушении полного внутреннего отражения показан на рисунке 10А.



Рисунок 10. Ход лучей в изогнутом волокне. А) Распространение лучей на изгибе волокна. Точками обозначены места, в которых нарушается полное внутреннее отражение. Синий луч (1) выходит из волокна, зеленый (2) - попадает в оболочку, красный (3) – остается в сердцевине. Б) Изогнутое волокно на 180°. С разных концов волокна подается излучение – пунктирные и сплошные линии. Часть излучения выходит из изгиба волокна, а часть остается в сердцевине волокна.

На изгибе волокна часть излучения падает на границу сердцевина/оболочка под углами меньшими, чем критический угол (линии 2, 3 на рисунке 10А), в результате оно попадает в оболочку. В ней часть излучения отражается от границы раздела сред оболочка/воздух (линия 2), а часть излучения выходит из оболочки в воздух (линия 3). Представим оптоволокна изогнутое на 180°. Пусть с обоих концов волокна вводится одинаковое излучение. Пусть изгиб будет такой, что для некоторой части излучения не будет выполняться условие полного внутреннего отражения (29). Тогда излучение, поступающее с разных концов волокна, будет покидать волокно на разных сторонах изгиба (рисунок 10Б). Этот эффект положен в основу предлагаемого метода для измерения мощности лазерного излучения, выходящего из оптоволокна и мощности диффузно отраженного излучения, попадающего обратно в облучающее волокно. Так как лазерное излучение, выходящее из волокна, и диффузное излучение, попадающее обратно в волокно, распространяются в сердцевине волокна навстречу друг другу, то на макроизгибе эти излучения будут выходить с разных сторон изгиба. Поставив приемники излучения можно регистрировать мощность излучения, выходящего из волокна и излучение попадающего обратно в волокно.

Назовем излучение от источника – прямым излучением, а излучение, распространяющееся в сторону обратную к прямому излучению, – обратным излучением. Из рисунка 10Б видно, что прямое излучение и обратное излучение частично выходят на разных сторонах изгиба волокна. Интенсивность обратного излучения \bar{l}_b – это сумма интенсивности прямого излучения отраженного от торца волокна \bar{l}_d и интенсивности излучения рассеянного от биологического объекта и попавшего обратно в волокно \bar{l}_s .

$$\bar{I}_b = \bar{I}_d + \bar{I}_s \tag{33}$$

Для расчета мощности излучения, выходящего на углах изгиба оптического волокна, будем использовать математическую модель, описанную выше. Полученные данные в результате прогонки алгоритма обрабатываются следующим образом. Выполняется поиск лучей, которые вышли за пределы волокна на его изгибе. Суммарная мощность прямо пропорционально связана с суммарной интенсивностью по определению. Поэтому мощность излучения, вышедшего на изгибе волокна, равна сумме интенсивностей лучей, вышедших за пределы волокна на его изгибе:

$$I_{\Sigma}^{out} = \sum_{n=1}^{N} I_n^{out}, \qquad (34)$$

где N количество лучей, вышедших из волокна в области изгиба.

При этом если учитывать половину изгиба, в которой выходит луч, то можно разделить суммарную мощность на два слагаемых: мощность, вышедшая на изгибе волокна в прямом направлении \vec{l}_n^{out} , мощность, вышедшая на изгибе волокна в обратном направлении \vec{l}_n^{out} :

$$I_{\Sigma}^{out} = \sum_{n=1}^{N_1} \vec{I}_n^{out} + \sum_{n=1}^{N_2} \vec{I}_n^{out}$$
(35)

В силу уравнения (33)

$$I_{\Sigma}^{out} = \sum_{n=1}^{N_1} \vec{I}_n^{out} + \sum_{n=1}^{N'_2} \tilde{I}_n^{out} + \sum_{n=1}^{N'_3} \tilde{I}_n^{out}, \qquad (36)$$

где N_1 – количество лучей вышедших в прямом направлении, N_2 -количество лучей вышедших в обратном направлении, N'_2 - количество лучей вышедших в обратном направлении и отраженных от торца волокна, N'_3 - количество лучей вышедших в обратном направлении и попавших обратно в волокно от рассеивающей ткани, причем

$$N_2 = N_2' + N_3'$$

2.5 Разработка программного обеспечения для моделирования распространения лазерного излучения в изогнутом оптическом волокне

Для оценки мощности потерь лазерного излучения на сторонах изгиба волокна, а также для подбора оптимальных параметров: радиуса изгиба волокна, положения приемников излучения на сторонах изгиба волокна, - коллективом исполнителей проекта было разработано программное обеспечение FiberBend [95]. Математической моделью для данного програмнного обеспечения служит модель, описанная в п.2.4.

Разработка программы проводилась в среде MicrosoftVisualStudio 2010. Язык разработки С#. Вспомогательная платформа .NetFramework 3.5. Операционная система Windows 7.

Интерфейс программы представлен на рисунке 11.



Рисунок 11. Общий вид программы для расчета излучения выходящего из волокна. Темные линии - лазерное излучение, светлые - отраженное излучение, попавшее в волокно. Точками обозначены места, в которых нарушается полное внутреннее отражение.

В левой, большей части, происходит отрисовка оптического волокна, в котором распространяется оптическое излучение. Распространение излучения отображается линиями двух цветов: синий цвет – излучение, распространяющееся от источника, красный цвет – излучение, распространяющееся обратно к источнику.

Правая часть состоит из областей отображения рассчитанной информации и настройки параметров эксперимента.

Программа позволяет рассчитывать интенсивность излучения, которое выходит на сторонах изогнутого волокна. Определяет мощность излучения, выходящего на внутреннем и внешнем радиусах изгиба. Позволяет задавать параметры оптического волокна: коэффициенты преломления оболочки и сердцевины и их толщину, изменять радиус изгиба оптического волокна и показатель преломления окружающей среды. Рассчитывает критические углы для раздела сред оболочка/окружающая среда и оболочка/сердцевина. Позволяет изменять интенсивность света, вводимого в волокно. А также рассматривать ход заданного числа лучей и устанавливать место и угол ввода излучения в оптоволокно.

2.6 Обработка изображений с большой глубиной цвета

Как было описано в главе 2.2 результатом выполнения моделирования прохождения лазерного изучения в многослойной гетерогенной среде является трехмерная матрица, каждый элемент которой содержит информацию о количестве актов рассеяния в данной точке модельного пространства. Для наглядного представления рассеяния в модели делается двумерный срез полученной матрицы, количество актов кодируется цветом, данный срез сохраняется в виде изображения.

Необходимо учесть, что отношение количества актов рассеяния вблизи излучателей к количеству актов рассеяния в отдаленных участках более 10³. Для сохранения такого динамического диапазона, изображения сохраняются с высокой глубиной цвета до 32 бит в формате tif. Это позволяет видеть малые изменения яркости в световом поле.

Для обработки полученных изображений было разработано программное обеспечение TiffReader [90, 91]. Необходимость данной разработки была обусловлена тем, что известные графические редакторы, такие как Adobe Photoshop, CorelDraw, Gimp, при обработке изображений с высокой глубиной цвета, автоматически понижают глубину цвета до 8 бит на канал цвета. Из дополнительных возможностей разработанная программа позволяет измерять расстояния между заданными точками на изображении, строить профили яркости и рассчитывать гистограммы яркости, как на прямой, так и в выделенной области. Используя простые медианные сглаживающие маски, а также маски Собела и Превитта, в данном программном обеспечении можно подавлять шума в изображениях [98]. Позволяет строить эквипотенциальные поверхности (поверхности с одинаковой яркостью). В программу входят алгоритмы поиска максимума яркости на изображении и поиска глубины зондирования.

2.7 Спектроскопические исследования биологической ткани

Для проведения спектроскопических исследований была использована лазерная спектральная система ЛЭСА-01-БИОСПЕК (рисунок 12).



Рисунок 12. Состав лазерной спектральной системы ЛЭСА-01-БИОСПЕК.

Основными компонентами данного устройства являются: лазер с оптоволоконным вводом SMA, USB-спектрометр с оптоволоконным входом SMA, компьютер со специальным программным обеспечением, оптоволоконный зонд.

При использовании лазерных источников возбуждения данная система позволяет измерять спектры флуоресценции в диапазоне длин волн 400-1000 нм. Если заменить лазерный источник на источник белого света и перевести режим измерений в программном обеспечении, то данная система позволит измерять спектры поглощения. Устройство работает следующим образом.

Излучение от лазерного источника, либо источника белого света вводится во входной конец Y-образного волоконно-оптического зонда, по которому оно доставляется к исследуемому объекту. В случае флуоресцентных исследований флуоресцентное излучение и рассеянное назад лазерное излучение, а в случае измерения спектров поглощения рассеянный назад свет, поступает в приемные волокна Y-образного волоконно-оптического зонда. Дистальный конец волоконно-оптического зонда сформирован шестью приемными волокнами, которые окружают изучающее волокно. За счет такой геометрии изменение расстояния между дистальным концом зонда и исследуемым объектом от 0 до 2 мм и угла наклона от 0 до 30° не приводит к ошибке измерений. Приемные волокна Y-образного волокона Ha конець от лака и исследуемым объектом от 0 до 2 мм и угла наклона от 0 до 30° не приводит к ошибке измерений. Приемные волокна Y-образного волоконно-оптического зонда подсоединяются к спектрометру с помощью порта SMA. На входе в спектрометр установлен светофильтр, снижающий интенсивность рассеянного назад лазерного излучения и

флуоресценции отличаются на более чем три порядка, то использование такого фильтра позволяет их регистрировать в одном динамическом диапазоне. В случае измерения спектров поглощения входной фильтр использовать нет необходимости.

Как было показано в пп. 1.1 оптические характеристики биологических тканей такие, как: коэффициент рассеяния, коэффициент поглощения и фактор анизотропии, влияют на глубину прохождения лазерного излучения в биологической ткани, скорость ее нагрева, и, следовательно, на форму и объем биологической ткани подверженной воздействию излучения. А также они изменяются при тепловом воздействии на биологическую ткань (п.1.6). Отслеживая интенсивность и спектральные характеристики рассеянного назад лазерное излучения, попадающего в облучающее волокно, можно получать информацию о состоянии ткани в процессе облучения.

Для регистрации рассеянного назад излучения существуют два способа: с разрывом оптического волокна, доставляющего лазерное излучение, и без разрыва оптического волокна.

В первом случае доставляющее волокно разделяется на две части, так что в разрыве устанавливается оптическая система, состоящая из трех коллиматоров и зеркала отражающего малую часть излучения, менее 1% (рисунок 13). Основными недостатками данного способа являются следующее: сложность изготовления оптической схемы, большое количество оптических элементов, вносящих ослабление лазерного излучения от источника.



Рисунок 13. Способ измерения рассеянного назад излучения при внутритканевом облучении.

Во втором случае (без разрыва оптического волокна, доставляющего лазерное излучение) регистрируют излучение, выходящее на изгибе облучающего волокна в следствии НПВО п.п.2.4 [99, 100, 101].

Для измерения изменения оптических параметров биологической ткани при внутритканевом облучении использовались:

- Полупроводниковый лазер ЛФТ-630/675-01-БИОСПЕК мощностью 100 мВт – 2200 мВт с непрерывным излучением на длине волны 675 нм. Этот лазер является одним из источников излучения, использующихся для ФДТ и гипертермии.
- Торцевое оптическое волокно кварц/полимер диаметром 600 мкм и апертурой 0.48 для доставки излучения. Плотность мощности излучения находилась в диапазоне от 35 Вт/см² до 620 Вт/см².
- Инфракрасная камера CEDIP Jade MWIR для регистрации температуры. Спектральная область 3-5.2 мкм. Точность измерений не хуже 0.08 °C.
- Измеритель мощности оптического излучения РМ-3-БИОСПЕК.

 Разработанная система для мониторинга интенсивности рассеянного назад лазерного излучения во время проведения внутритканевых процедур гипертермии и ФДТ (п.2.12).

При выборе способа измерения температуры учитывались следующие особенности. Температура поверхности ткани отличается от температуры непосредственно рядом с торцом излучающего оптического волокна. Использование контактных измерителей температуры, таких как термопары, имело бы сильные неточности в регистрации динамики нагрева из-за их инерционности, сильной неоднородности теплового поля в области нагрева и их влияния на измеряемый объект [102]. В свою очередь измерения температуры при помощи тепловой камеры лишены влияния инерционности. Но следует учитывать, что глубина проникновения в биологическую ткань излучения с длинами волн 3-6 мкм не велика и составляет 20-30 мкм из-за сильного поглощения водой в данном диапазоне [103]. При измерении температуры таким образом необходимо, чтобы толщина слоя биологической ткани от торца облучающего волокна до ее поверхности не превышала 1 мм. Ошибка измерений динамики температуры, связанная с инерционностью в следствии теплопроводности, в этом случае будет невелика из-за относительно высокого коэффициента теплопроводности тканей.

Образцы тканей были помещены в пластиковый цилиндрический контейнер (рисунок 14Б). Оптическое волокно, с помощью которого лазерное излучение передается на объект, входит в основание цилиндра с одной стороны. Пересекая всю толщу образца, волокно приближается к дальнему основанию цилиндра изнутри на расстояние не более 1 мм и облучает оставшуюся часть исследуемого образца. ИК-камера измеряет температуру облучаемой поверхности. Для регистрации проходящего излучения снаружи дальнего основания цилиндра находится датчик мощности излучения. Облучающее волокно проходит через систему мониторинга интенсивности рассеянного назад лазерного излучения (рисунок 14А).



Рисунок 14. А) Схема эксперимента по регистрации изменения оптических параметров биологической ткани при внутритканевом облучении. Б) Увеличенная фотография контейнера с образцом биологической ткани. Показано расположение волокна в нем.

2.8 Микроскопические исследования при помощи лазерного сканирующего микроскопа

Для оценки лазерно-индуцированных тепловых воздействий на биологические ткани были взяты образцы облученной ткани для гистологического анализа. Данные образцы были заморожены до температуры -30 °C. С помощью крио-микротома Microm HM560 были приготовлены тонкие срезы взятых образов ткани. Полученные срезы были окрашены гематоксилином и эозином. Окрашенные срезы были изучены при помощи лазерного сканирующего микроскопа LSM-710-NLO (Carl Zeiss, Германия).

2.9 Моделирование лазерно-индуцированных тепловых полей при охлаждении поверхности облучения

Для исследования лазерно-индуцированных тепловых полей при охлаждении поверхности облучения пользовались уравнениями, приведенными в п.1.5 формулы (18)-(22).

Решение проводилось с использованием метода конечных элементов [104]

программным пакетом FlexPDE [105]. Программа FlexPDE предназначена для построения моделей для решения дифференциальных уравнений методом конечных элементов. По сценарию, написанному пользователем, FlexPDE производит операции, необходимые для того, чтобы преобразовать описание системы дифференциальных уравнений в частных производных в модель для расчета методом конечных элементов, находит решение этой системы уравнений и представляет результаты в графической форме.

В процессе работы исследовалась зависимость глубины максимального нагрева от температуры охлаждения облучаемой поверхности и мощности лазерного излучения. В качестве модельных сред рассматривались печень и мышечная ткань. Тепловые параметры сред представлены в таблице 4. Плотность мощности лазерного излучения изменялась от 1 до 5 Вт/см². Температура охлаждающей поверхности от 0 до 35 °C.

2.10 Метод управления лазерно-индуцированными тепловыми полями в биологических тканях

В соответствии с формулами (18) (22) внешними параметрами, влияющими на распространение теплового поля внутри биологической ткани, являются интенсивность лазерного излучения I и температура охлаждающей поверхности T_c в области облучения.

Существует два основных типа охлаждения поверхности: с помощью распыления криогенного спрея и с помощью охлаждаемого сапфирового окна. Было показано, что контактное охлаждение сапфира значительно эффективнее, чем криогенное распыление, для защиты эпидермиса от нежелательных тепловых повреждений во время лазерных процедур. Аналитические расчеты показывают, что система с использованием сапфирового охлаждения примерно в два раза эффективнее защищает эпидермис, чем криогенное охлаждение при лазерно-индуцированном нагреве [106].

Дополнительным положительным эффектом при контактом охлаждении является то, что при сжатии кожи из ее капилляров и мелких сосудов вытесняется кровь, которая является одним из основных поглотителей в красном и инфракрасном диапазоне. Тем самым увеличивается глубина проникновения лазерного излучения в ткань.

Для управления тепловым полем было разработано устройство для контактного облучения внутрикожных опухолей и метастазов с электронной системой охлаждения, оснащенная охлаждаемым сапфировым окном. На рисунке 15 представлена обобщенная функциональная схема макета системы охлаждения, который состоит из двух основных

частей – исполнительного устройства и электронного блока. Исполнительное устройство представляет собой единую конструкцию, в корпусе которой скомпонованы сапфировое окно, модуль Пельтье, термодатчик, радиатор и разъем типа SMA для подсоединения волоконно-оптической системы доставки света от лазерного источника. Для доставки лазерного излучения использовались кварц-полимерные волокна диаметром 600 µм и апертурой 0.31. Во избежание потерь оптического излучения, в исполнительном устройстве не используется дополнительная оптическая система. Излучение, выходящее из торца оптического волокна, образует конус с плоским углом расхождения, зависящим от числовой апертуры волокна.



Рисунок 15. Функциональная схема макета системы для контактного облучения внутрикожных опухолей и метастазов с электронной системой охлаждения.

Так как нагревание биологических тканей осуществляется с помощью лазерного излучения с длиной волны из диапазона 670, 810 нм, то контактирующая поверхность устройства должна быть выполнена из оптически прозрачного материала с высокой удельной теплопроводностью и имеющего высокую температуру плавления. Таким материалом является сапфир. Данный материал не плавится при температуре ниже 2050 °C. Сохраняет чистоту в высокотемпературных средах. Он устойчив к царапинам и к высокому

давлению. Легко отмывается и имеет длительный срок службы. Коэффициент пропускания в области 400-1000 нм ~85%. Высокая теплопроводность - 46.06 Вт/(м*°С) при 26 °С является основным его преимуществом перед другими материалам.

Охлаждение сапфирового окна происходит с помощью электронного элемента Пельтье, преобразующего протекающий через него электрический ток в разность температур между "горячей" и "холодной" сторонами модуля [107].

Электронный блок разработанного устройства служит для поддержания температуры в заданном диапазоне и индикации температурного диапазона нагреваемого объекта. Для поддержания температуры используется система с обратной связью по температуре. На сапфировом стекле установлен термодатчик, который передает соответствующий сигнал на вход пропорционально-интегрально-дифференциальный (ПИД) регулятор и на вход блока индикации. ПИД регулятор сравнивает сигнал от датчика температуры с заданным значением температуры и управляющий сигнал. Управляющий сигнал представляет собой сумму трех слагаемых, первое из которых пропорционально входному сигналу, второе — интеграл входного сигнала, третье — производная входного сигнала. Применение ПИД регулятора позволяет компенсировать большую задержку в распространении сигнала по петле обратной связи и стабилизировать температуру. Далее сгенерированный сигнал с учетом необходимой поправки поступает по шине на вход драйвера, который на выходе устанавливает требуемую величину тока для модуля Пельтье. Блок индикации, основываясь на сигнале от термодатчика, информирует о том, в каком температурном диапазоне находится температура облучаемой поверхности. Рабочий интервал температур условно разбит на 3 диапазона: ниже 26 °C, от 26 °C до 40 °C, выше 40 ⁰С. Разработанное устройство показано на рисунке 16.

В качестве источника лазерного излучения использовался непрерывный диодный лазер ЛФТ-02-"Биоспек" с длиной волны лазерного излучения 810 нм и регулируемой мощностью до 9 Вт.



Рисунок 16. Система для контактного облучения внутрикожных опухолей и метастазов с электронной системой охлаждения.

2.11 Методика измерения лазерно-индуцированных тепловых полей

Схема экспериментальной установки для измерения лазерно-индуцированных тепловых полей показана на рисунке 17 [108]. Блок контактного охлаждения устройства для облучения опухолевых локализаций с контактным охлаждением помещался на исследуемом объекте. Для гипертермии использовался непрерывный диодный лазер ЛФТ-02-"Биоспек" с длиной волны лазерного излучения 810 нм, плотность мощности достигала 2 Вт/см². Излучение от лазера доставлялось к исполнительной части устройства для контактного облучения внутрикожных опухолей и метастазов с электронной системой охлаждения при помощи оптического кварц/полимерного волокна с диаметром сердцевины 400 мкм.



Рисунок 17. Схема эксперимента по измерению лазерно-индуцированных тепловых полей. Образцы биологических тканей при комнатной температуре помещались в чашки

Петри. Перед этапом облучения необходимо, чтобы температура исследуемого образца биологической ткани была равна 37-38°С, так как данная температура соответствует внутренней температуре печени, мышечной ткани человека.

В процессе облучения контроль температуры на поверхности моделей осуществлялся при помощи инфракрасной камеры CEDIP Jade MWIR(CEDIP, Франция), спектральная область 3-5.2 мкм. Точность измерений не хуже 0.08°С. Образцы подвергали лазерному облучению в течение 3 минут.

Изменяя положение ИК-камеры, получали распределение температур не только на поверхности биологической ткани, но и вдоль направления лазерного излучения, то есть распределение температуры в глубине ткани. При этом облучение происходило на краю среза биологической ткани.

2.12 Методика измерения рассеянного назад лазерного излучения на изгибе волокна

Теоретические подходы к определению мощности рассеянного назад лазерного излучения, распространяющегося в волокне от биологической ткани к источнику при внутритканевом облучении были описаны в пункте 2.4. Основываясь на данных принципах была изготовлен блок регистрации излучения для определения мощности лазерного излучения выходящего на изгибе волокна. Так же был проведен эксперимент для определения мощности рассеянного назад лазерного излучения, схема которого приведена на рисунке 18.



Рисунок 18. Схема эксперимента по определению мощности лазерного излучения, выходящего со сторон изгиба волокна.

Лазерное излучение с длиной волны 632.8 нм от He-Ne источника доставляется с помощью кварц/полимерного оптического волокна с толщиной сердцевины 400 мкм, 600 мкм к образцу биологической ткани. Облучающее волокно проходит через блок регистрации излучения, в котором оно изгибается на 180°. Увеличенная фотография блока регистрации показана на рисунке 19А. Он состоит из двух элементов: внешнего кольца и внутреннего, так что внутреннее кольцо вкручивается во внешнее.

Во внешнем кольце на боковых стенках имеются два паза для крепления волокна. Диаметр изгиба задается диаметром столба внутреннего кольца. Материал, из которого изготовлены кольца, пластик. Между кольцами проложен плотный полимер для надежной фиксации волокна между ними без опасности повреждения волокна.

Детектирующие волокна подходят к краям изгиба волокна и крепятся при помощи клея. Один торец волокна подходит к изгибу, на котором выходит рассеянное назад излучение. Второй торец волокна подходит к изгибу, на котором выходит лазерное излучение, идущее от источника к облучаемому объекту. На обратной стороне регистрирующие волокна объединены в модифицированный оптический порт SMA905, торец которого представлен на. рисунке 19Б.

Излучение, попавшее в регистрирующие волокна, проецируется на ПЗС линейку. Так что на линейке образуются два пятна. Сигналы ПЗС линейки обрабатываются в специальном программном обеспечении на ПК. В результате получаются временные зависимости интенсивности лазерного излучения.



Рисунок 19. А) Фотография увеличенного макета блока регистрации излучения Б) Модифицированный порт SMA 905 объединяющий два регистрирующих волокна. Красные точки – светящиеся торцы регистрирующих волокон.

2.13 Метод определения концентрации фотосенсибилизатора ПпIX в биологических тканях по спектрам флуоресценции

На рисунке 20А изображены эталонные спектры флуоресценции ПпIX в различных концентрациях. Для определения концентрации по его спектру необходимо:

- 1. Нормировать на максимум в диапазоне 625-640 нм.
- Рассчитать индекс флуоресценции. Индексом флуоресценции kf в данном случае называется отношение площади под графиком флуоресценции Sf (690-720 нм) к площади под графиком лазерного излучения Sr (625-640 нм) зеленый и красные диапазоны на рисунке 20А соответственно:

$$k_f = \frac{\sum_{n=690}^{720} I_n}{\sum_{n=625}^{640} I_n} \tag{37}$$

- Построить калибровочную кривую на основе индексов флуоресценции, полученных на эталонных концентрациях (рисунок 20Б). Для этого эталонные индексы флуоресценции аппроксимировать степенной функцией у(х)=ax^c+b.
- 4. Используя коэффициенты a,b,c, рассчитать неизвестную концентрацию по индексу флуоресценции k'_{f} : c' = log_c $\frac{(y-b)}{2}$



Рисунок 20. А) Спектры флуоресценции ПпIX в различных концентрациях (мг/мл) при возбуждении лазером 623.8 нм нормированные на максимум в диапазоне 625-640 нм. Б) Индексы флуоресценции концентраций ПпIX.

2.14 Метод определения фактора анизотропии рассеивающей среды

Как уже было упомянуто в п.2.1.1 в качестве моделей биологических тканей было выбрано вещество «Липофундин» в различных концентрациях. Оптические характеристики данного раствора сильно различаются у различных партий товара и у производителей [109] [110], поэтому было необходимо определить оптические параметры используемого раствора. Главным параметром, влияющим на характер распространения фотонов в мутной среде, является фактор анизотропии g. Коэффициенты рассеяния и поглощения μ_s , μ_a являются масштабными и влияют только на длину свободного пробега фотона. Для определения фактора анизотропии применялась гониофотометрическая методика (рисунок 21). В специальную кювету с толщиной стенок 150 мкм помещался слой «Липофундина» толщиной 70 мкм. С помощью счетчика фотонов измерялась индикатриса рассеяния. Используя метод наименьших квадратов полученная зависимость аппроксимировалась функцией Хени-Гринштейна. Длина свободного пробега фотонов определяется как обратная величина суммы коэффициентов преломления и поглощения.



Рисунок 21. Схема измерения индикатрисы рассеяния рассеивающей среды при условии однократного рассеяния.

2.15 Система флуоресцентной визуализации в БИК диапазоне

На рынке присутствуют коммерчески доступные системы визуализации при использовании красителя индоцианина зеленого [111]. Они различаются по источникам возбуждения индоцианина зеленого, типам используемых матриц для регистрации флуоресцентного излучения, разрешению матриц, битности АЦП. Некоторые авторы предлагают использовать длинноволновый хвост флуоресценции индоцианина зеленого в коротковолновом инфракрасном диапазоне [112].

Главным недостатком данных систем является то, что для оценки кровоснабжения

используется флуоресцентное изображение из видеофайла, записанного в процессе процедуры. Но так как в различные участки исследуемой области кровоток приходит в разное время, то вероятны ложные выводы о качестве кровоснабжения в различных зонах исследуемой области. Данные системы не предназначен для исследования лимфотока.

К другим недостаткам можно отнести ограничения, накладываемые на процесс регистрации флуоресцентных изображений, такие как время экспозиции, время записи файла, размер области регистрации, а также ограниченность операций обработки флуоресцентных видеофайлов. Приведенные недостатки стали причиной разработки собственной системы видео флуоресцентной системы в БИК диапазоне.

Индоцианин зеленый – это цианиновый краситель, используемый в медицинской диагностике. Химическая формула C₄₃H₄₇N₂NaO₆S₂, молярная масса 774.96 г/моль. Для возбуждения индоцианина зеленого использовался диодный лазер с длиной волны 785 нм и мощностью до 1.3 Вт. Для фильтрации лазерного излучения использовался интерференционный фильтр LD 01-785/10. Для приема флуоресцентного излучения в области 806-860 нм. Зависимость оптической плотности от длины волны для используемых фильтров показана на рисунке 22. На данном рисунке так же представлены спектры поглощения и флуоресценции индоцианина в воде.

Система для визуализации флуоресценции работает следующим образом (рисунок 23). Излучение от диодного лазера 785 нм, проходя интерференционный фильтр 1 и оптический блок, поступает в биологические ткани. В кровеносных сосудах тканей индоцианин зеленый поглощает лазерное излучение, в результате чего образуется флуоресцентное излучение. Рассеянное лазерное и флуоресцентное излучение попадают обратно в оптический блок, в котором проходят через светоделительное устройство и систему интерференционных фильтров. В результате происходит регистрация флуоресцентного излучения ЧБ камерой, а рассеянного света - цветной камерой. В режиме реального времени на экране монитора выводится изображение цветной камеры, дополненное флуоресцентным изображением. Специальное программное обеспечение позволяет записывать дополненный видеосигнал и впоследствии обрабатывать с целью получения значений параметров флуоресцентной ангиографии. Подобная система для получения и представления дополненного видеосигнала уже была опробована и показала положительные результаты. В качестве фотосенсибилизатора использовался алаиндуцированный ПпІХ, а в качестве объекта исследований были опухоли головного и

спинного мозга [22].



Рисунок 22. Нормированные спектры поглощения (красный цвет) и флуоресценции (фиолетовый цвет) индоцианина зеленого при возбуждении лазером с длиной волны 785 нм (бордовая линия). Спектры пропускания фильтров для лазера (синий цвет) и для флуоресценции (зеленый цвет).



Рисунок 23. Принцип работы видеофлуоресцентной системы для БИК диапазона.

Заключение к главе 2

В данной главе были описаны все методики, которые использовались в работе для анализа тех или иных свойств биологических тканей. Проведен многосторонний анализ процессов, происходящих в биологической ткани при лазерно-индуцированном нагреве.

Описаны новые подходы, применяемые для регистрации рассеянного излучения, распространяющегося в оптическом волокне. Предложен новый алгоритм, позволяющий моделировать распространение фотонов в многослойной гетерогенной среде, содержащей фотосенсибилизатор, и задавать различное положение и конфигурацию источников излучения, в том числе и ввод в биологическую ткань под углом. Внимание было уделено описанию используемых в работе флуорофоров, моделей биологической ткани, а также самим биологическим тканям, используемым в экспериментальных работах.

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛАЗЕРНО-ИНДУЦИРОВАННЫХ ТЕПЛОВЫХ И СВЕТОВЫХ ПОЛЕЙ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЯХ

В данной главе приведены результаты математического моделирования, экспериментальных исследований по распространению лазерно-индуцированных тепловых и световых полей в биологических тканях, содержащих фотосенсибилизаторы.

В первом параграфе приведены результаты моделирования методом Монте Карло. Приведены примеры распространения света в многослойных гетерогенных средах, при различном положении и конфигурации источников лазерного излучения. Во втором параграфе приведены экспериментальные результаты измерения фактора анизотропии интралипида, использовавшегося для моделей головного мозга человека. В третьем параграфе приведены результаты и дано их аналитическое сравнение по измерению глубины зондирования рассеянными и флуоресцентными фотонами экспериментально, методом Монте Карло и диффузионным приближением. В параграфах пять, шесть и семь приведены результаты математического моделирования и экспериментальные данные тепловых полей в биологических тканях, и их аналитическое сравнение. Показаны результаты измерения изменения оптических характеристик биологических тканей. В восьмом параграфе приведены результаты измерений флуоресценции индоцианина зеленого в различных растворителях в моделях биологических тканей.

3.1 Результаты математического моделирования методом Монте Карло многослойных гетерогенных тканей.

В результате применения технологии CUDA скорость расчетов прохождения фотонов в многослойных гетерогенных моделях увеличилась более чем в 100 раз при увеличении количества фотонов более чем в 1000 раз.

На рисунке 24 приведены примеры распространения лазерного излучения от двух источников, наклоненных под углами 0° и 45° к нормали А и Б соответственно. В качестве модели выступала пятислойная модель кожи человека. Параметры модели приведены в таблице 5 [113, 114, 115, 116].



Рисунок 24. Распространение лазерного излучения от двух волокон в пятислойной модели кожи человека, полученное с помощью метода Монте-Карло. А) излучающие волокна параллельны Б) излучающие волокна наклонены под углом 45° к поверхности кожи. Изображения представлены в псевдоцвете.

Nº	Слой	µа, см ⁻¹	µs, см ⁻¹	g	d, мкм
1.	Эпидермис	4.3	107	0.79	100
2.	Дерма	2.7	187	0.82	200
3.	Дерма с поверхностным сплетением сосудов	3.3	192	0.82	200
4.	Дерма	2.7	187	0.82	900
5.	Дерма с глубинным сплетением сосудов	3.4	194	0.82	600

Таблица 5. Параметры пятислойной модели кожи человека.

Α

Проведен расчет методом Монте Карло гетерогенной модели белого вещества человеческого мозга, в центре которой проходит крупный кровеносный сосуд. Кровеносный сосуд содержит фотосенсибилизатор ПпIX в концентрации 10 мг/мл. Облучение осуществляется с помощью волокна неконтактным способом. Диаметр пятна 30мм. Оптические параметры представлены в таблице 1. Была проведена серия экспериментов, в которых изменялась глубина залегания кровеносного сосуда от 0 мм до 30 мм с шагом 2 мм. В частности, на рисунке 25А, Б, В, Г представлены результаты моделирования рассеянного лазерного излучения на поверхности объекта, рассеянного флуоресцентного излучения на поверхности объекта, рассеянного флуоресцентного излучения в сечении перпендикулярном оси сосуда, рассеянного флуоресцентного излучения в сечении перпендикулярном оси сосуда, рассеянного флуоресцентного излучения в сечении перпендикулярном оси сосуда соответственно. Глубина залегания сосуда составляла 2 мм. Ширина сосуда – 2 мм.



Рисунок 25. Результаты моделирования распространения лазерного излучения с длиной волны 632.8 нм в белом веществе человеческого мозга, в центре которого проходит крупный кровеносный сосуд, содержащий ПпІХ в концентрации 10 мг/мл. Диаметр пятна облучения 30 мм. Глубина залегания сосуда 2 мм. Ширина сосуда 2 мм. А) Рассеянное лазерное излучение на поверхности объекта Б) Рассеянное флуоресцентное излучение на поверхности объекта В) Рассеянное лазерное излучение в сечении перпендикулярном оси сосуда Г) Рассеянное флуоресцентное излучение в сечении перпендикулярном оси сосуда.

3.2 Результаты измерения индикатрисы рассеяния Липофундина

В результате измерения индикатрисы рассеяния было получено, что фактор анизотропии для длины волны лазерного излучения 632.8 нм равен 0.83 ± 0.03 , длина свободного пробега 27 ± 2 мкм, а для длины волны 532 нм 0.85 ± 0.03 , длина свободного пробега 20 ± 3 мкм. Данные значения являются удовлетворительными, и могут быть использованы для создания фантомов тканей головного мозга, а также для входных параметров в моделировании методом Монте Карло.



Рисунок 26. График зависимости числа фотонов регистрируемых счетчиком фотонов от угла *θ. Маркерами отмечены экспериментальные результаты, линия – аппроксимация экспериментальных данных функцией Хени-Гринштейна g= 0.83.*

3.3 Сопоставление глубины зондирования полученной методом Монте Карло и экспериментально.

На 27 приведены изображения, полученные в результате эксперимента А) и с помощью метода Монте Карло Б). Два белых пятна – это рассеяние фотонов в исходящих от облучающего волокна. На рисунке 5 показан обработанный снимок распределения светового поля рассеянного лазерного излучения от двух волокон, помещенных в модель ткани головного мозга. Каждому цвету соответствует свой интервал яркости. Самая яркая часть окрашена в белый цвет. Обработка производилась в программе TiffReader.

Можно выделить две особенности:

- Удаляясь от торцов излучающих волокон, вклад в световое поле от соседнего волокна становится более заметным. Форма светового пятна от вытянутого вперед, начинает вытягиваться по направлению к соседнему волокну.
- Максимальная яркость находится на 300 мкм ниже, чем торцы волокон, так как суммарная яркость складывается из интенсивностей выходящего из волокна лазерного излучения еще не рассеявшегося на частицах среды и диффузионного лазерного излучения.

Обрабатывая изображения, предложенным в п.2.3, получим область наиболее вероятного распространения фотонов между облучающими волокнами. Проведем сравнение областей наиболее вероятного распространения фотонов, полученные с помощью теории диффузии, методом Монте Карло и экспериментально.



Рисунок 27. А) Изображение рассеянного лазерного излучения 632.8 нм в модели белого вещества Б) Обработанное в программе TiffReader экспериментально полученное изображение светового поля рассеянного лазерного излучения от двух волокон, помещенных в водный раствор «Липофундин». Каждому цвету соответствует интервал яркости.

На рисунке 28 представлены области наиболее вероятного прохождения фотонов между двумя источниками лазерного излучения, расположенных на расстоянии 1.7 мм, для длин волн лазерного возбуждения 532 нм и 632.8 нм, А и Б на рисунке соответственно. Область 1 - экспериментально полученная область (голубой цвет), область 2 - полученная с помощью метода Монте Карло (красный цвет), белые линии с черным контуром 3 – границы и медиана формы «банана», полученные из уравнения диффузии. Черные прямоугольники - торцы излучающих волокон. Черная область –перекрытие областей 1 и 3. Как видно из рисунка, вблизи торцов волокон результаты, полученные из уравнения диффузии, не совпадают с экспериментальными данными, так как в этом уравнении рассматривается точечный излучатель. Глубина зондирования при длине волны лазерного излучения 632.8 нм выше на 20-30%, чем при длине волны лазерного излучения 532 нм. Это объясняется тем, что среда для длины волны 632.8 нм является более оптически прозрачной. Приведенные результаты получены без учета поглощения излучения гемоглобином. В экспериментах на модели и реальной мозговой ткани будет появляться ошибка, которая будет более значима для зеленого света, чем для красного, потому что коэффициент поглощения кровью для длины волны 532 нм больше в 50 раз, чем для 632.8 нм.

Аналогичным образом были получены области наиболее вероятного прохождения флуоресцентных фотонов, излучающихся при возбуждении фантомов белого вещества,


Рисунок 28. Области наиболее вероятного прохождения фотонов между двумя источниками лазерного излучения: А - 532 нм, Б – 632.8 нм. Расстояние между волокнами 1.7 мм. Области: 1 - экспериментально полученная область (голубой цвет), 2 - область, полученная с помощью метода Монте Карло (красный цвет), 3- белые линии с черным контуром – границы формы «банана» полученные из уравнения диффузии. Черные прямоугольники – торцы излучающих волокон. Черная область – перекрытие траекторий наиболее вероятного прохождения фотонов, полученных с помощью метода Монте Карло и экспериментально.

Были проведены эксперименты и моделирование по определению глубины зондирования с помощью лазерного излучения и с помощью флуоресцентного излучения, возбуждаемого лазером при прохождении им через рассеивающую среду содержащую фотосенсибилизатор Себ. Расстояние между волокнами варьировались от 0.7 до 7 мм. На рисунке 29 представлены фотографии рассеянного лазерного излучения для лазеров 632.8 нм и 532 нм, А и Б соответственно. На фотографии нанесены области наиболее вероятного прохождения фотонов лазерного излучения (красный цвет) и флуоресцентного излучения (голубой цвет), полученные с помощью программы TiffReader.

Наблюдается существенная разница между глубиной зондирования для лазерного 632 нм и флуоресцентного 675 нм излучения. Области наиболее вероятного прохождения практически не перекрываются (рисунок 29А). Глубина зондирования лазерными фотонами больше на 0.5 мм.

Для случая лазерного излучения 532 нм и флуоресцентного излучения 675 нм такой существенной разницы не наблюдается. Области наиболее вероятного прохождения



Рисунок 29. А) Фотография рассеяния лазерного излучения 632.8 нм. Б) Фотография рассеяния лазерного излучения 532 нм. Голубым выделена область наиболее вероятного прохождения фотонов флуоресцентного излучения 675 нм при возбуждении 632.8 нм А и 532 нм Б. Красным выделена область наиболее вероятного прохождения фотонов лазерного излучения (632.8 нм А и 532 нм Б).

Получена зависимость глубины зондирования от расстояния между волокнами в модели ткани головного мозга флуоресцентным и лазерным излучением (рисунок 30).



Рисунок 30. График зависимости глубины зондирования от расстояния между волокнами. Длина волн лазерного излучения 532 нм, 632.8 нм:

- – логарифмическая аппроксимация, 532 нм;
- рассеянное лазерное излучение, 532 нм, эксперимент;
- 🔺 флуоресцентное излучение при возбуждении 532 нм, эксперимент;

— – логарифмическая аппроксимация, 632.8 нм;

- рассеянное лазерное излучение, 632.8 нм, эксперимент;
- 🔺 флуоресцентное излучение при возбуждении 632.8 нм, эксперимент.

Зависимость глубины зондирования флуоресцентным излучением аппроксимируется функцией вида у(r)=a·ln(r)+b, где r – расстояние между волокнами, а и b – коэффициенты пропорциональности, с достоверностью $R^2 = 0.95$ и $R^2 = 0.98$ для длин волн 632.8 нм и 532 нм соответственно. Из приведенного графика зависимости глубины зондирования от расстояния между оптическими волокнами видно, что глубина

зондирования при использовании рассеянного лазерного излучения больше на 60-70%, чем при использовании флуоресцентного излучения. Это можно объяснить следующим образом. Начальный угол вылета фотонов лазерного излучения определяется апертурой волокна. Дальнейшее изменение направления движения фотонов определяется фактором анизотропии среды, который определяет средний косинус угла рассеяния. Чем его значение ближе к единице, тем отклонение направления движения фотонов после рассеяния будет меньше. На своем пути лазерные фотоны могут поглотиться фотосенсибилизатором. Который в свою очередь может излучить флуоресцентный фотон, обладающий большей длиной волны. Основным отличием фотонов флуоресцентного от лазерного излучения является отсутствие выделенного направления движения в начале распространения в следствии того, что излучение флуоресцентных фотонов возбужденными атомами и молекулами происходит равновероятно во все стороны. Дальнейшее распространение флуоресцентного фотона по своим принципам не отличается от распространения диффузионного фотона. Из-за отсутствия выделенного направления в начале движения у флуоресцентных фотонов отклонение от начального направления пути будет меньше. Значит, глубина максимума функции распределения фотонов между волокнами будет так же меньше.

3.4 Результаты математического моделирования распространения лазерного излучения в изогнутом оптическом волокне. Сопоставления с экспериментальными данными

С помощью разработанного программного продукта FiberBend в п. 2.5 было проведено теоретическое исследование по компьютерному моделированию влияния на мощность лазерного излучения выходящего на сторонах изгиба волокна параметров: радиуса изгиба волокна, отношение радиуса изгиба волокна к толщине волокна.

На рисунке 31А представлена зависимость мощности лазерного излучения выходящего на изгибе волокна в процентах от начальной мощности от радиуса изгиба волокна. Диаметр сердцевины волокна 400 мкм. При достаточно больших радиусах изгиба более 3 см, мощность выходящего излучения равна нулю. Это означает, что нарушения полного внутреннего отражение внутри сердцевины волокна не происходит. При постепенном уменьшении радиуса изгиба увеличивается мощность выходящего излучения. При радиусе изгиба 2 мм практически все излучение выходит на изгибе волокна. Дальнейшее уменьшение радиуса изгиба ведет к слому волокна.



Рисунок 31. А) Зависимость лазерного излучения, выходящего на сторонах изгиба волокна, от радиуса изгиба волокна. Диаметр оптического волокна 200мкм. Б) Зависимость мощности лазерного излучения, выходящего на изгибе волокна, от отношения радиуса изгиба волокна к толщине волокна.

На рисунке 31Б приведены результаты по компьютерному моделированию влияния на мощность лазерного излучения, выходящего на сторонах изгиба волокна, от отношения радиуса изгиба волокна к толщине волокна. В данном исследовании максимальная мощность излучения 40 условных единиц. Видно, что при уменьшении радиуса изгиба волокна, мощность излучения, выходящего из волокна на сторонах изгиба, резко стремится к 40. Это объясняется тем, что на границе сердцевина волокна/ оболочка все больше лучей падает под углами меньшими, чем угол полного внутреннего отражения. При отношении радиус изгиба к диаметру сердцевины волокна равном 2, все излучение будет выходить на изгибе волокна.

Используя полученные зависимости можно выбрать оптимальный радиус изгиба при конструировании устройства для мониторинга интенсивности лазерного излучения во время проведения внутритканевых процедур гипертермии и фотодинамической терапии.

Если мысленно разделить изгиб волокна на 180° на две половины: верхнюю и нижнюю, то выходящее излучение на изгибе волокна можно разделить на сумму излучения выходящего в верхней половине и нижней. На рисунке 32 показана гистограмма мощности излучения, выходящего в верхней и нижней половине изгиба волокна. Для излучения, распространяющегося в прямом направлении от источника лазерного излучения, большая часть выходит в верхней половине. Для излучения, распространяющегося в обратном направлении, большая часть выходит в нижней половине. Проведенное теоретическое исследование показывает, что при изгибе волокна с несколькими витками, основная часть излучения выходит на первом же витке. Это означает, что для увеличения чувствительности устройства не требуется создания большого числа оборотов волокна, достаточного только одного, важно расположение принимающих датчиков.



Рисунок 32. Гистограмма мощности излучения, выходящего на верхней и нижней половине изгиба волокна.

Для определения мощности лазерного излучения использовалась схема эксперимента, представленная в п.2.12. Лазерное излучение с длиной волны 632.8 нм от He-Ne источника вводится в кварц/полимерное оптическое волокно с толщиной сердцевины 400 мкм. Облучающее волокно проходит через блок регистрации излучения.

Проводили два эксперимента. В перовом свободный конец облучающего волокна располагали в рассеивающих средах с разными коэффициентами рассеяния. А во втором изменяли радиус изгиба облучающего волокна в блоке регистрации излучения и регистрировали мощность излучения, выходящего на изгибах облучающего волокна.

Результаты проведенных работ по первому эксперименту отражены на рисунке 33. Левому пику соответствует интенсивность излучения, обратно попадающего в волокно, правому – интенсивность излучения, выходящего из лазера (рисунок 33А). При увеличении угла изгиба на конце облучающего волокна все меньше излучения будет доходить до свободного конца облучающего волокна. Поэтому меньше излучения будет поступать назад. Что подтверждается экспериментальными данными.

На рисунке ЗЗпредставлена гистограмма, показывающая изменения интенсивности лазерного излучения от угла изгиба на свободном конце волокна.



Рисунок 33. А) Изменения в интенсивностях излучения обратно распространяющегося по волокну (левый пик) и излучения от лазера (правый пик) при различных коэффициентах рассеяния рассеивающей среды. Б) Гистограмма интенсивности обратного и прямого излучения от коэффициента рассеяния среды.

На рисунке 34 представлена сравнительная гистограмма данных полученных в эксперименте и с помощью моделирования. Была произведена оценка корреляции экспериментальных данных с расчётными:

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

Коэффициент корреляции составил $r^2 = 0.97$.



Рисунок 34. Гистограмма сравнения мощности излучения, выходящего из волокна, при различных соотношениях радиус изгиба к диаметру сердцевины волокна, полученной в эксперименте и с помощью моделирования. Коэффициент корреляции 0.97.

Таким образом, было проведено сопоставление результатов компьютерного моделирования с экспериментальными данными. Коэффициент корреляции составил 0.97.

3.5 Результаты математического моделирования лазерно-индуцированных тепловых полей в биологических тканях. Сопоставление с экспериментальными данными.

На рисунке 35 представлено решение двумерного уравнения (20) с граничными условиями:

$$\begin{cases} T(0, x, y) = T_b, \\ \frac{\partial T}{\partial x}\Big|_{x=0} = -\frac{k_t}{\gamma(T_c - T(t, 0, y))}, \\ T(t, W, y) = -\frac{k_t}{\gamma(T_b - T(t, W, y))}, \\ \frac{\partial T}{\partial y}\Big|_{y=0} = -(T_b - T(t, x, 0)), \\ \frac{\partial T}{\partial y}\Big|_{y=H} = -(T_b - T(t, x, H)) \end{cases}$$

где T_b - внутренняя температура равная 37 °С, W, H – ширина и высота модели соответственно, γ - коэффициент теплопроводности, k_t – коэффциент теплопередачи, T_c – температура охлаждающей поверхности(прикладывалась к левой границе). Ее температура равнялась 15 °С. Плотность мощности лазерного излучения составляла



Рисунок 35. Двумерное распределение температуры в модели биологической ткани при нагреве лазерным излучением, направленным слева на право, с охлаждением поверхности. Плотность мощности лазерного излучения 4 Вт/см². Температура охлаждающей поверхности 15 °C.

Отчетливо виден приграничный слой ткани, не подвергшиеся тепловому перегреву. В свою очередь удалось достичь температур выше 40 °С под поверхностью биологической ткани.

Используя уравнение (22), были получены серии распределения температуры в биологической ткани при различных плотностях мощности лазерного излучения и при различных температурах охлаждающей поверхности (рисунок 36). В качестве моделей биологической ткани служили: кожа и мышечная ткань. Расчетные данные показывают возможность создания температур, необходимых для гипертермии в глубине ткани, оставляя неповрежденными поверхностные слои ткани.



Рисунок 36. Расчетные зависимости температуры биологической ткани от глубины. I₀ – плотность мощности лазерного излучения, T_c - температура охлаждающей поверхности. Мышечная ткань: А, Б. Кожа: В, Г. А, В изменение положения диапазона температур достаточных для гипертермии при постоянной температуре охлаждающей поверхности и различных мощностях лазерного излучения. Б, Г изменение положения температурного диапазона при постоянной одинаковой мощности лазерного излучения и различных температурах охлаждающей поверхности.

Диапазон температур для гипертермии смещается по глубине при различных значениях плотности мощности лазерного излучения и температуры сапфирового окна. Глубина терапевтического эффекта может достигать 4 мм, при этом температура поверхностных слоев остается ниже 40 °C. При увеличении плотности мощности лазерного излучения диапазон температур для гипертермии приближается к поверхности, при понижении температуры охлаждающей поверхности он отдаляется от поверхности биологической ткани.

На рисунке 37 показан разрез печени сразу после облучения лазером 810 нм и плотностью мощности 2 Вт/см² в течение 3 минут с использованием устройства для контактного облучения внутрикожных опухолей и метастазов с электронной системой

охлаждения. Светлое пятно – это область коагуляции, образовавшаяся в процессе гипертермии. Верхняя граница области коагуляции расположена на расстоянии 0.5 мм от поверхности, нижняя - на расстоянии 2.5 мм. Ширина зоны коагуляции зависит от облучаемой площади поверхности. В данном эксперименте облучаемая площадь равнялась 1.8 см², при этом ширина зоны коагуляции составила 5 мм, а высота зоны коагуляции – 3 мм. Данный срез отражает не только область коагуляции, но и демонстрирует, как лазерное излучение распространяется в биологической ткани на примере печени.





Рисунок 37. Разрез печени сразу после облучения 810 нм мощностью 3 Вт в течение 3 минут с использованием электронной системы охлаждения. Светлое пятно – это область коагуляции, образовавшаяся в процессе гипертермии. Площадь облучения 1.8 см².

Используя методику, описанную в 2.11, было проведено измерение распределения температур в глубине ткани при облучении поверхности печени лазерным излучением с длиной волны 810 нм с использованием устройства с электронной системой охлаждения.



Рисунок 38. ИК-изображение образца печени, полученное с помощью камеры JADE MWIR. Облучение 810 нм лазером с плотностью мощности 2 Вт/см².

Используемые мощности лазерного излучения 2 Вт/см² и 2.6 Вт/см². Температура сапфирового окна равнялась 27 °C. На рисунке 39 показано распределение температуры ткани по глубине, полученное экспериментально и теоретически, во время облучения 810 нм лазером с мощностями 3 Вт и 4 Вт. Согласно теоретическим расчетам, максимум температуры достигается на расстоянии 0.9 мм и 1 мм при мощности лазерного излучения 4 Вт и 3 Вт соответственно. Максимумы, экспериментально измеренных распределений температуры, сдвинуты в область меньших расстояний от поверхности на 7%. Значения максимумов температур, измеренных экспериментально и полученных теоретически, отличаются не более чем на 5% для соответствующих мощностей лазерного излучения и составляют 47 °С и 43 °С. Более низкие значения температуры у теоретической кривой по сравнению с экспериментальными данными могут быть объяснены тем, что теоретическая модель учитывает наличие кровотока, за счет которого происходит отвод температуры. В процессе облучения температура поверхности ткани оставалась постоянной и ниже 43 °С. Это означает, что при проведении процедуры гипертермии с волоконно-оптическим устройством с электронной системой охлаждения пациент не будет испытывать болевых ощущений, а поверхностные слои облучаемой биологической ткани будут оставаться неповрежденными. При изменении параметров облучения, таких как температура поверхности сапфирового окна и плотность мощности лазерного излучения, появится возможность лечения опухоли изнутри, что повысит эффективность проведения процедур гипертермии.



Рисунок 39. Распределение температуры печени по глубине, полученной экспериментально и теоретически для различных мощностей лазерного излучения. Длина волны 810 нм. Площадь облучения 1.8 см².

3.6 Результаты исследования лазерно-индуцированного теплового воздействия на биологические ткани.

Для оценки эффективности процедуры гипертермии с применением устройства для контактного облучения внутрикожных опухолей и метастазов с электронной системой охлаждения из приграничной зоны коагуляции были взяты образцы ткани для гистологического анализа по методике, описанной в 2.8.

На рисунке 40 показаны изображения мышечной ткани, взятой из пограничной области коагуляции, полученные с помощью микроскопа с увеличением x10. Видно, что поверхностные слои имеют четко направленную волокнистую структуру. В то время как более глубокие слои не имеют характерной волокнистой структуры, присутствуют множественные большие и маленькие искажения в сохранившихся волокнах, большие пустые области.



Рисунок 40. А) Срез мышечной ткани, взятой из приграничной зоны коагуляции. Мощность лазерного излучения 4 Вт. Длина волны 810 нм. Б) Срез мышечной ткани, взятой из приграничной зоны коагуляции. Мощность лазерного излучения 5 Вт. Длина волны 810 нм. Температура охлаждения 15 °C.

Это говорит о том, что в приповерхностной области температура не превышала 42.5°С и в ней не происходила коагуляция. Однако при увеличении глубины все чаще появляются отклонения волокнистой структуры и появление искаженных структур, что говорит о происходящих процессах денатурации и коагуляции.

На рисунке 41 показаны изображения, полученные с помощью микроскопа с увеличением x63, ткани печени, взятой из приграничной области коагуляции. Видно, что число ядер (синие пятна) уменьшается сверху вниз. Это направление совпадает с направлением лазерного воздействия. Уменьшение числа ядер при увеличении глубины говорит о произошедшей при повышении температуры коагуляции, в результате которой структура ДНК перестала быть способной окрашиваться осно́вным красителем гематоксилином. Таким образом, использование устройства для контактного облучения внутрикожных опухолей и метастазов с электронной системой охлаждения показывает возможность облучения подкожных новообразований и опухолевых локализаций при сохранении поверхностных здоровых слоев биологической ткани.



Рисунок 41. Срез ткани печени, взятой из приграничной зоны коагуляции, после облучения 810 нм лазером мощностью 4 Вт в течении 3 минут с применением электронной системы охлаждения. Площадь облучения 1.8 см². Синие пятна – окрашенные гематоксилином ядра. Наблюдается уменьшение плотности ядер сверху вниз по направлению лазерного излучения.

3.7 Результаты измерения изменения оптических параметров биологических тканей при лазерно-индуцированном нагреве

Измерение изменения оптических характеристик в процессе лазерноиндуцированного нагрева проводилось по методике, описанной в 2.7.

В результате эксперимента были получены зависимости интенсивности проходящего излучения, обратно отраженного излучения, распространяющегося в облучающем волокне, и температуры поверхности ткани в области облучения от времени облучения при использовании оптоволокна с плоским торцом. Данные зависимости представлены на рисунке 42.



Рисунок 42. Зависимости мощности обратно отраженного излучения (черная линия), проходящего излучения через объект (красная линия), температуры (фиолетовая линия) поверхности объекта в области облучения от времени. Длина волны 675 нм. А) Плотность мощности лазерного излучения I=300 Bt/cm². Объект – печень. Б) Плотность мощности лазерного излучения I=360 Bt/cm². Объект – нервная ткань. В) Плотность мощности лазерного излучения I=620 Bt/cm². Объект – мышечная ткань.

При увеличении температуры биологических тканей меняются их оптические параметры. Это влияет на интенсивности проходящего излучения и рассеянного назад излучения, попадающего в волокно. Начальной стадии нагрева соответствует повышение интенсивности рассеянного излучения - это связано с денатурацией белков, так как при денатурации белков увеличивается коэффициент рассеяния ткани (72). Дальнейший нагрев приводит к обезвоживанию ткани. Этот эффект приводит к увеличению коэффициентов поглощения и рассеяния и уменьшению коэффициента анизотропии (74). Из формул (30), (31) следует, что при переходе через границу раздела сред, интенсивность отраженного излучения тем ниже, чем значения показателей преломления сред ближе друг к другу. Нагревание приводит к уплотнению тканей и увеличению показателя преломления (76). Дальнейшее нагревание биологической ткани приводит к тому, что сложные белки разлагаются на более простые, и коэффициент рассеяния уменьшается. Поэтому интенсивность обратного излучения падает. Характерный скачок в динамике рассеянного назад излучения соответствует вскипанию воды в ткани. Вокруг торца облучающего волокна образуются насыщенные пары, имеющие высокий коэффициент рассеяния. Процесс происходит быстро, менее 0.3 сек, и сопровождается звуковым «щелчком». В результате этого происходит деформация ткани в зоне облучения. Пары воды выходят за пределы контейнера из образовавшихся щелей. При контакте с окружающим воздухом происходит резкое охлаждение поверхности ткани в зоне облучения. После щелчка на облучающий торец налипает биологическая ткань и при ее дальнейшем нагреве за счет локального увеличения плотности мощности лазерного излучения происходит обугливание ткани. В результате все излучение, выходящее из торца волокна, эффективно поглощается обугленным слоем биологической ткани, что приводит к высокой скорости нагрева торца волокна и близлежащей ткани.

В таблице 6 приведены характерные времена для описанных процессов. Следует заметить, что обезвоживание сильно влияет на оптические свойства биологической ткани. Поэтому времена процессов могут сильно меняться для разных образцов одной и той же ткани.

Тип ткани	Характерные времена процессов, с			
	денатурация	обезвоживание +	закипание воды	карбонизация
	белка	коагуляция		
печень	0-25	25-200	200	200 и далее
нервная ткань	0-120	120-440	440	440 и далее
мышечная ткань	0-120	120-225	225	225 и далее

Таблица 6. Характерные времена процессов денатурации, коагуляции, обезвоживания, карбонизации для различных типов ткани.

На рисунке 43 показаны зависимости интенсивности обратно отраженного излучения (левая ось) и температуры (правая ось) в области излучающего торца оптоволокна от времени. Для расчета этой температуры была использована измеренная зависимость температуры поверхности образца и две характерные точки: начальная комнатная температура и температура кипения воды. Нагрев биологических тканей лазерным излучением можно разбить на этапы по диапазонам температур. Этапы показаны на рисунке 43. К первому этапу можно отнести фотодинамическую терапию, для которой предельная температура равна 42.5°C. Второму этапу – гипертермию. При данной процедуре

предполагается нагрев биологической ткани от 43 до 49 °C. Третий этап - коагуляция. При температурах от 50 до 60°C происходит денатурация ферментов и разрушение мембран клеток с последующим отеком.



Рисунок 43. Зависимость интенсивности обратно отраженного излучения (левая ось, черный график) и температуры Т (правая ось, красный график) в области излучающего торца оптоволокна от времени. Римскими цифрами отмечены этапы: I - фотодинамическая терапия, II - гипертермия, III - коагуляция. А – печень, Б – нервная ткань, В – мышечная ткань.

3.8 Исследование распределения индоцианина зеленого в моделях нервных тканей головного и спинного мозга

Индоцианин зеленый применяется в диагностических целях для определения наличия кровотока, измерения минутного сердечного выброса и ударного объема, измерения объема циркулирующей крови. Перед применением препарат растворяют в воде для инъекций и вводят внутривенно в дозировке 5 мг/кг массы тела.

В эксперименте для возбуждения индоцианина зеленого использовался диодный лазер с длиной волны 785 нм и мощностью до 1.3 Вт.

В качестве моделей головного мозга был подготовлен раствор интралипида 10% по методике, показанной ранее в 2.1.1. Особенностью индоцианина зеленого является изменение пиков поглощения и флуоресценции при изменении его концентрации и растворителя [117, 118]. Для исследования этой зависимости в качестве растворителя также была использована плазма крови. Были подготовлены следующие концентрации индоцианина зеленого: 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 мг/л.

В результате были получены следующие спектральные зависимости.

На рисунке 44 показаны спектры флуоресценции индоцианина зеленого в указанных концентрациях в растворе интралипида. На рисунке 45 показаны значения максимума интенсивности в зависимости от концентрации индоцианина зеленого. Полученную концентрационную зависимость можно объяснить следующим образом. На поглощение и интенсивность флуоресценции индоцианина зеленого оказывают влияние его концентрация в растворе, растворитель, температура и кислотность раствора [116 -122]. Попадая в раствор интралипида, часть молекул индоцианина связывается с находящимися там липосомами [119, 120]. Поэтому в полученном растворе будут присутствовать в основном количестве молекулы индоцианина зеленого и в небольшом количестве Н-агрегаты индоцианина зеленого и молекулы индоцианина зеленого, связанные с липосомами. Начальный рост интенсивности флуоресценции связан с увеличением концентрации индоцианина зеленого вплоть до 0.5 мг/л. При дальнейшем увеличении концентрации индоцианина зеленого все больше образовываются Н-агрегаты. Это приводит к уменьшению пика поглощения в области 785 нм и увеличению пика поглощения в области 700 нм [121]. Вследствие чего интенсивность флуоресценции уменьшается в диапазоне концентрации от 1 мг/л до 5 мг/л. Дальнейшее увеличение концентрации индоцианина приводит к увеличению поглощения как в диапазоне 700 нм так и в диапазоне

785 нм. Увеличение поглощения приводит к увеличению интенсивности флуоресценции в диапазоне концентрации от 5 мг/л до 50 мг/л.

Важно отметить, что спектры поглощения и флуоресценции молекулярного индоцианина зеленого и его H-агрегатов отличаются. Рост интенсивности флуоресценции за счет увеличения концентрации (0.01 – 1 мг/л) молекулярного индоцианина зеленого в растворе приводит к увеличению пика и его сдвига в красную области в диапазоне 830-840 нм. Характерный сдвиг так же был показан в работах 122, 123. Спектр флуоресценции смеси молекулярного и H-агрегатов индоцианина зеленого отличается по форме от спектра флуоресценции молекулярного индоцианина зеленого. Его пик смещен в область 822 нм, а рост при увеличения концентрации индоцианина зеленого от 5 – 50 мг/л сопровождается не значительным смещением в красную область на 2 нм.

На рисунке 46 показаны спектры флуоресценции индоцианина зеленого в концентрациях 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 мг/л в растворе плазмы крови. На рисунке 47 показаны значения максимума интенсивности в зависимости от концентрации индоцианина зеленого. Зарегистрирован сдвиг пика флуоресценции индоцианина зеленого в плазме крови на 10 нм. Сдвиг обусловлен взаимодействием этого красителя с альбумином [124]. Показано, что увеличение концентрации ведет к увеличению интенсивности флуоресцентного излучения. При дальнейшем увеличении концентрации происходит превышение максимума диапазона измерения используемого спектрометра.



Рисунок 44. Спектры флуоресценции индоцианина зеленого в различных концентрациях (мг/л) в растворе интралипида.



Рисунок 45. Значения максимума интенсивности в зависимости от концентрации индоцианина зеленого в растворе интралипида.



Рисунок 46. Спектры флуоресценции индоцианина зеленого в различных концентрациях в растворе плазмы крови.



Рисунок 47. Значения максимума интенсивности в зависимости от концентрации индоцианина зеленого в плазме крови.

Заключение к главе 3

Представлены результаты моделирования разработанным на основе метода Монте Карло алгоритмом многослойных гетерогенных тканей, содержащих ФС. Рассмотрено распространение световых полей при различных конфигурациях источников излучения.

Была получена формула расчета глубины зондирования флуоресцентным излучением тканей головного мозга $y(r)=a\cdot \ln(r)+b$, где r – расстояние между волокнами, а и b – коэффициенты пропорциональности, с достоверностью $R^2 = 0.95$ и $R^2 = 0.98$ для длин волн 632.8 нм и 532 нм соответственно.

Используя результаты моделирования, полученные экспериментально и с помощью уравнений диффузии, было показано, что глубина зондирования рассеянным лазерным излучением и индуцированной этим излучением флуоресцентным излучением может отличаться в зависимости от длины лазерного излучения и расстояния между оптическими волокнами. В частности, разница может достигать 50% при расстоянии между волокнами от 2 мм при возбуждении флуоресценции ПпIX лазером с длиной волны 632.8 нм.

Показаны результаты математического моделирования тепловых полей в биологической ткани при охлаждении поверхности. Показано, что можно осуществлять локальную гипертермию внутренних тканей, оставляя при этом здоровыми поверхностные слои. Теоретические зависимости распределения температуры были сравнены с экспериментальными. В результате сравнения было получено, что расхождения в зависимостях были незначительными.

Экспериментально были получены зоны коагуляции при облучении тканей печени лазером с длиной волны 810 нм, площадью поверхности облучения 1.8 см². Форма области коагуляции была овальной, с осями 5 и 3 мм в ширину и высоту соответственно. Области коагуляции при этом не затрагивали приповерхностные слои. Толщина некоагулированного слоя составила 2 мм.

Получены характерные времена и динамика изменения оптических параметров различных биологических тканей в процессе лазерно-индуцированного нагревания с длиной волны 810 нм путем регистрации рассеянного назад лазерного излучения в облучающем волокне. Рассмотрены термические процессы, возникающие при лазерноиндуцированном нагреве биологических тканей. Рассмотрены факторы, оказывающие влияние на оптические параметры при нагревании биологических тканей.

Были получены концентрационные спектры флуоресценции индоцианина зеленого

в различных растворителях (жировая эмульсия, плазма крови) в моделях биологических тканей. Показана и объяснена нелинейная концентрационная динамика максимума интенсивности флуоресценции при возбуждении лазерным излучением 785 нм.

ГЛАВА 4. ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛАЗЕРНО-ИНДУЦИРОВАННЫХ СВЕТОВЫХ И ТЕПЛОВЫХ ПОЛЕЙ, РАЗРАБОТАННЫХ СИСТЕМ В ПРАКТИКУ. ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ.

Данная глава посвящена описанию применения полученных математических моделей, разработанных алгоритмов, способов и устройств, реализующих эти способы, на практике.

В первом параграфе приведена статистика пациентов, участвовавших в клиническом исследовании, и результаты использования разработанного устройства для контактного облучения внутрикожных опухолей и метастазов с электронной системой охлаждения. Во втором параграфе приведены рекомендации по использованию системы для внутритканевого облучения, заданы диапазоны, описывающие различные процессы в биологической ткани при нагревании. В третьем и четвертом параграфе описано применение системы для флуоресцентной визуализации в ближнем инфракрасном диапазоне. Описаны процедуры для регистрации кровотока и лимфотока, приведены параметры, по которым оценивают характер кровоснабжения. Показан вариант применения разработанной флуоресцентной системы для регистрации гетерогенности опухоли в БИК диапазоне.

4.1 Результаты клинических исследований с применением устройства для контактного облучения внутрикожных опухолей и метастазов с электронной системой охлаждения

Традиционно проведение дистанционной ФДТ сопровождается умеренным и выраженным болевым синдромом при плотности мощности 150-200 мВт/см2. Использование ненаркотических анальгетиков незначительно снижает болевой синдром.

Было проведено техническое сопровождение клинических исследований с использованием макета устройства для контактного облучения внутрикожных опухолей и метастазов с электронной системой охлаждения на базе Онкологического клинического диспансера № 1, МНИОИ им. П.А. Герцена, Государственного научного центра лазерной медицины Минздрава России г. Москва.

Для проведения исследований был применен охлаждающий блок с сапфировым окном диаметром 30 мм. На момент исследования проводилась апробация устройства для проведения ФДТ в сочетании с гипертермией больным с поверхностными опухолями с целью уменьшения болевого синдрома.

Процедура гипертермии с местным охлаждением проведена более чем сорока больным с разнообразными патологиями (Таблица 7).

Размер патологий составлял от 1х1 см до 5х6 см. Для терапии больших локализаций применялось пошаговое облучение с несколькими позициями.

Тип патологии	Количество пациентов
меланома	1
рак молочной железы	10
внутритканевые метастазы молочной	1
железы	
базалиома кожи	2
рак вульвы 2/3 стадии	5
рак кожи спины 3 стадии	1
рак вульвы 2 стадии	2
рак кожи лица 1/2/3 стадии	8
метастаз	5
рецидив рака кожи	3

Таблица 7. Список патологий пациентов.

Клинический случай. Пациент К с плоскоклеточным раком на спине поступил в Государственный научный центр лазерной медицины на отделение онкологии (рисунок 48). Для проведения терапии и диагностики использовали ФС хлоринового ряда Фотодитазин[®], который вводили внутривенно в дозе 1.2 мг/кг массы тела. Облучение проводилось контактно с использованием устройства с электронной системой охлаждения. Лазерным источником служила лазерная система «ЛФТ-02-БИОСПЕК» с длиной волны 662 нм. Сообщаемая доза излучения 270 Дж/см². Анализ спектра флуоресценции фотосенсибилизатора проводился с помощью лазерной электронно-спектральной системы «ЛЭСА-01-БИОСПЕК» при возбуждении HeNe лазером 632.8 нм. Визуальную оценку накопления фотосенсибилизатора в тканях кожи и опухоли проводили с помощью двухканальной лапароскопической флуоресцентной видеосистемы с возбуждением флуоресценции на длине волны 635 нм.

На рисунках 49А и 50А приведены спектры флуоресценции ФС в тканях и опухоли и флуоресцентное изображение опухоли до процедуры сочетанной ФДТ и гипертермии с

применением контактного устройства электронной системой охлаждения.

Процедуру проводили для трех позиций системы с контактным охлаждения. На рисунке 51 представлена фотография процедуры сочетанной гипертермии С использованием устройства с электронной системой охлаждения. Длительность облучения составляла 10 минут на каждую позицию. После сообщения необходимой дозы, проводились флуоресценции флуоресцентного изображения. Результаты замеры индекса И исследования представлены на рисунках 49Б, 50Б. Видно резкое уменьшение индекса флуоресценции в опухоли с 20 единиц до 3. Это свидетельствует об успешном проведении терапии в данной области. По флуоресцентным изображениям видны зоны, в которых присутствует фотосенсибилизатор. Пациенту было рекомендовано повторное проведения сеанса сочетанной ФДТ и гипертермии после заживления ткани после резорбции разрушенных областей новообразования во время первого сеанса.

В результате применения устройства для контактного охлаждения был достигнут положительный эффект. У более, чем 30 пациентов произошла частичная резорбция до 50%. У пяти пациентов достигнута полная резорбция. Использование охлаждающей системы позволило сохранить неповрежденными покровные ткани. Отрицательных эффектов не наблюдалось. Наилучший терапевтический эффект достигается при мощности облучения 6-8 Вт при площади облучения 1.8 см².

Применение устройства для контактного облучения внутрикожных опухолей и метастазов с электронной системой охлаждения позволило проводить сеансы ФДТ, совмещенные с гипертермией, в полном объеме в зонах, богатых нервными окончаниями и, соответственно, высокоболезненных.

Применение данного устройства при проведении контактной ФДТ расширяет возможности метода, позволяет проводить лазерное облучение без применения дополнительных методов аналгезии, в том числе и общего обезболивания.



Рисунок 48. Базалиома 4х6 см. До применения сочетанной ФДТ и гипертермии.



Рисунок 49. А) Спектры флуоресценции до процедуры сочетанной гипертермии и ФДТ с использование устройства с электронной системой охлаждения и Б) после процедуры. Черный цвет – индекс и спектр флуоресценции нормальной кожи. Красный цвет - индекс и спектр флуоресценции опухоли. Синий цвет - индекс и спектр флуоресценции опухоли.



Рисунок 50. А) Флуоресцентное изображение опухоли до сочетанной ФДТ и гипертермии. Б) Флуоресцентное изображение опухоли после терапии.



Рисунок 51. Применение устройства для контактного облучения внутрикожных опухолей и метастазов с электронной системой охлаждения при процедуре контактной гипертермии. Базалиома 4x6 см.

4.2 Рекомендации к применению устройства для внутритканевого облучения

В результате лабораторных исследований по изменению оптических свойств биологических тканей во время лазерно-индуцированного нагрева п.3.7 были получены зависимости интенсивности обратного и проходящего излучения и температуры в области излучающего торца оптоволокна от времени облучения. Также были получены характерные времена для процессов денатурации, обезвоживания и коагуляции, закипания воды и карбонизации.

На основе полученных результатов были разработаны рекомендации по применению устройства контроля состояния биологической ткани во время внутритканевого облучения. Данные рекомендации применимы при проведении фотодинамической терапии и гипертермии паренхиматозных органов, когда опухолевой очаг располагается на глубине более чем 3 мм от поверхности органа.

В случае проведения ФДТ пациенту за 2 часа до облучения перорально вводят раствор фотосенсибилизатора хлоринового ряда. Далее определяется объем *V* очага, который необходимо облучить. Необходимая плотность энергии излучения *j*, требуемая для достижения терапевтического эффекта, из описания к препарату составляет 100-200 Дж/см² или 1-2 кДж/см³. В соответствии с этим рассчитывается доза энергии *J*, которую необходимо доставить в патологическую область по формуле:

$$J = j \cdot V \tag{38}$$

Необходимая плотность энергии *j* связана с мощностью лазерного излучения формулой:

$$j = l \cdot t, \tag{39}$$

где *I* – плотность мощности лазерного излучения Вт/см², t – время облучения в секундах. Рекомендуемая плотность мощности излучения 675 нм *I* составляет 100-300 мВт/см².

Облучающее кварц/полимерное волокно с прозрачной оболочкой пропускают через систему для мониторинга интенсивности лазерного излучения во время проведения внутритканевых процедур гипертермии и ФДТ, а облучающий торец располагают внутри ткани в зону с патологией. Время облучения рассчитывается из формул, представленных выше:

$$t = j \cdot V/W. \tag{40}$$

Систему для мониторинга интенсивности лазерного излучения подготавливают к работе. Расставляют маркеры в программном обеспечении на пики выходящего излучения и рассеянного назад излучения.

Во время подготовки системы регистрации излучения, выходящего на сторонах изгиба волокна, необходимо убедиться в том, что пики излучения на ПЗС линейке разделены между собой и не перекрываются. Если наблюдается перекрытие пиков, то необходимо повернуть модифицированный порт SMA в адаптере (рисунок 19Б). Во время вращения будет изменяться положение пиков излучения. Необходимо достичь максимальной дальности между пиками излучения. Далее необходимо определить какой пик соответствует излучению, выходящему из волокна, а какой обратному излучению. Для этого необходимо вплотную поднести к облучающему торцу волокна рассеивающую поверхность. При этом один из пиков резко возрастет. Соответствующий пик отвечает за обратное излучение. Именно его значение необходимо регистрировать в процессе внутритканевого облучения.

Далее засекают время и начинают процесс облучения.

При облучении во время проведения ФДТ необходимо соблюдать температурный диапазон, такой чтобы температура в области облучения не превышала 42.5 °C. Из полученных зависимостей интенсивности рассеянного назад излучения от времени облучения для различных типов тканей (рисунок 43), регистрируемых системой мониторинга интенсивности лазерного излучения во время проведения внутритканевых процедур гипертермии и ФДТ, видно, что для нервной и мышечной ткани начало увеличения интенсивности рассеянного назад излучения свидетельствует о повышении температуры в области облучения. Для предотвращения этого процесса оператору, выполняющему фотодинамическую терапию, следует снизить мощность лазерного излучения, так чтобы рост интенсивности обратного излучения прекратился. При этом необходимо пересчитать время облучения для достижения рассчитанной дозы облучения. В случае проведения ФДТ печени (рисунок 43А) свидетельством об увеличении температуры в области облучения является спад интенсивности после ее небольшого увеличения.

При проведении процедуры гипертермии пациенту не требуется введения какихлибо веществ. Оптимальной длиной волны облучения для проведения гипертермии

является длина волны в диапазоне 700-1000 нм. Для достижения терапевтического эффекта необходимо доставить количество энергии 10-20 кДж/см² [125]. Возможно разбиение терапии на несколько сеансов. Время для облучения рассчитывается аналогичным способом по уравнению (40).

Для процесса гипертермии в области облучения необходимо поддержание температуры в диапазоне 42.5-60 °С.

В процессе гипертермии нервной и мышечной ткани (рисунок 43Б,В) приближение температуры к верхней границе диапазона 60 °С сопровождается замедлением роста интенсивности обратного излучения. Алгоритм действий оператора, выполняющего процедуру гипертермии, остается прежним: снижение интенсивности лазерного излучения, пересчет времени облучения.

При облучении очагов, глубоко залегающих в органе, с использованием больших мощностей лазерного излучения рекомендуется использовать сапфировые иглы, внутрь которых вставляют облучающий конец волокна. Сапфир имеет высокую теплопроводность и устойчивость к пригоранию. Сапфир оптически прозрачен в диапазоне волн 400-1200 нм.

4.3 Применение системы для флуоресцентной визуализации в БИК диапазоне.

4.3.1 Определение параметров кровотока с помощью флуоресцентной ангиографии

Медицинское обследование сосудистой системы, при котором пациенту вводится краситель, флуоресцирующий в БИК диапазоне, называется флуоресцентной ангиографией (ФАГ). Краситель, распространяющийся в кровеносных сосудах пациента, возбуждается в диапазоне от 700-800 нм и флуоресцирует в диапазоне 820-870 нм. Как правило таковым красителем является индоцианин зеленый.

ФАГ с использованием индоцианина зеленого с конца шестидесятых годов прошлого столетия используется в различных областях медицины [126]. В недавние годы появились работы по оценке ишемии нижних конечностей у пациентов с заболеваниями артерий нижних конечностей (ЗАНК), где показаны обнадеживающие результаты применения ФАГ в данной области [127, 128, 129, 130].

Ввиду специфического течения ЗАНК у пациентов с сахарным диабетом (СД) и

наличия трофических поражений тканей стопы проведение стандартных методов диагностики может быть ограничено, а интерпретация результатов исследований затруднительна. Проведение стандартных диагностических процедур невозможно при наличии таких факторов, как раневого дефекта в области наложения манжетки, отсутствии пальца стопы.. Применение чрескожного метода измерения насыщения гемоглобина кислородом в тканях, являющимся золотым стандартом оценки тканевой перфузии, дает ложные результаты исследования при наличии отека и инфекционного воспаления мягких тканей стопы [131, 132, 133].

В процессе ФАГ пациенту вводят внутривенно раствор препарата индоцианин зеленый и производят запись флуоресцентного сигнала из интересующей области. После видеозапись обрабатывают. Выделяют в видеофайле интересующую область, далее рассчитывают динамику средней интенсивности по формуле:

$$\overline{I}(t) = \frac{1}{(x_j - x_i)(y_l - y_k)} \sum_{x=x_i}^{x_j} \sum_{y=y_k}^{y_l} I(x, y, t)$$
(41)

где Ī(t) – средняя интенсивность в момент времени t, x_j, x_i – границы зоны интереса по ширине, y_l,y_k – границы зоны интереса по высоте, I(x,y,t) – значение яркости в точке с координатами (x,y) в момент времени t.

На рисунке 52 приведена характерная зависимость средней интенсивности регистрируемого флуоресцентного излучения в выбранной зоне интереса от времени[131]. С целью оценки перфузии в исследуемой области проводился анализ следующих параметров ФАГ: Т_{0m} – время достижения максимальной интенсивности с момента внутривенного введения Т₀ индоцианина зеленого; Т_{Im}- время наступления максимальной интенсивности с момента появления индоцианина зеленого в зоне интереса Т_I; I_{max} – уровень максимальной интенсивности, Ibase – начальный уровень сигнала.



Рисунок 52. Характерная динамика интенсивности флуоресценции при проведении ФАГ.

Зная параметры рассчитывается параметр скорости снабжения кровотока:

$$F_{fluo} = \frac{I_{max} - I_{base}}{T_{Im} - T_{I}}$$
(42)

На рисунке 53 представлено: А) флуоресцентное изображение стопы пациента в процессе ФАГ и Б) рассчитанные динамики интенсивности флуоресценции в зонах интереса.



Рисунок 53. А) Флуоресцентное изображение в БИК диапазоне стопы пациента Б) Динамика интенсивности флуоресценции для выбранной области интереса. Красная область (0) - это «нормальная» область без отеков и предположительно хорошего кровоснабжения. Синяя область (1) является «подозрительной» областью. Он имеет самую низкую интенсивность флуоресценции. Зеленая область (2) - это область, в которой наблюдалась наибольшая интенсивность флуоресценции и ее наиболее быстрый рост.

Для оценки наиболее отличающихся областей, а также для более полного анализа, рассчитывают карту времени наступления максимума интенсивности флуоресценции. Для каждого пикселя изображения рассчитывается время наступления максимума интенсивности флуоресценции. Полученная матрица кодируется цветом.

$$\mathbb{T}(x,y) = \underset{t \in [0,T_{max}]}{\arg \max I(x,y,t)}$$
(43)

$$C(x,y) = \mathbb{H}\left(\frac{\mathbb{I}(x,y) - \mathbb{I}_{min}}{\mathbb{T}_{max} - \mathbb{T}_{min}}\right)$$

где Т- функция времени достижения максимума интенсивности флуоресценции в точке (x, y), Н - функция цвета, зависящая от интенсивности, I – интенсивность флуоресценции в точке (x, y) и момент времени t, T_{max} - общая продолжительность видеофайла.

В результате получается карта времени наступления максимума интенсивности флуоресценции (рисунок 54). Желтому соответствует наиболее ранее наступление

максимума, а темно-синему наиболее позднее. Таким образом можно наиболее просто определить участки риска, в которых максимум флуоресценции наступает позднее, относительно соседних участков.



Рисунок 54. Карта времени наступления максимума флуоресценции, получаемая с использованием разработанной системы для ФАГ в БИК диапазоне.

В отделении диабетической стопы ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России проведена серия работ с включением 90 пациентов с СД и ЗАНК на стадии критической ишемии нижних конечностей.

Был проведен статистический анализ значимости рассчитываемых параметров кровотока. Удалось получить их статистически-значимую разницу у пациентов до и после операционный период. Так, по данным временных параметров (T_{0m}, T_I, T_{Im}), после баллонной ангиоплатстики отмечено сокращение сроков достижения пика максимальной интенсивности вдвое, что коррелировало с положительным исходом процедуры – восстановлением кровотока по берцовым артериям, а также увеличением уровня чрескожного напряжения кислорода в околораневой зоне (52 мм рт. ст.) (критерий Вилкоксона p<0.05) [134].

Разработан протокол проведения ФАГ с индоцианином зеленым у пациентов с СД, ЗАНК и наличием раневых дефектов нижних конечностей. Метод ФАГ для оценки кровотока
нижних конечностей у пациентов с СД, осуществляемый разработанной системой, рекомендован Экспертному Совету Министерства Здравоохранения Российской Федерации для включения в клинические рекомендации для диагностики ишемической и нейроишемической формы синдрома диабетической стоп у пациентов с сахарным диабетом.

4.3.2 Флуоресцентная диагностика лимфатической системы

При подкожном введении индоцианина в зоны Юрьева за счет лимфатической системы, введенный раствор попадает в лимфатическое русло. Такое введение препарата называется лимфотропным Были проведены эксперименты с лабораторными мышами. Было зарегистрировано увеличение интенсивности флуоресценции с момента введения индоцианина зеленого. Были обнаружены лимфатические узлы.





Рисунок 55. Распределение индоцианина зеленого при лимфотропном подкожном введении в задние лапы мыши. А) 10 мин после введения Б) 60 мин после введения. Концентрация индоцианина зеленого 10 мг/кг.

Использование данного метода позволяет определять возможные пути метастазирования[135, 136].

Другим направлением развития лимфотропного введения индоцианина зеленого является исследование лимфоэдемы [137, 138]. Лимфедема является хроническим и прогрессирующим заболеванием, главным образом вызванным раком и его лечением. Лимфография при помощи индоцианина зеленого является минимально инвазивным методом визуализации, который полезен для предоперационного обнаружения лимфатических сосудов путем картирования линейных структур на конечности пациента.

4.4 БИК визуализация и гетерогенность опухоли

Общепринятые способы исследования раковых заболеваний такие, как секвенирование ДНК, экспрессия генов и белков и метаболомика, основаны на исследовании небольших кусочков биоптатов и предположении о гомогенной популяции клеток в опухоли. Однако, опухоли прогрессивно накапливают генетические мутации и эпигенетические изменения [139, 140]. Генетические мутации раковых клеток приводят к разнообразию и гетерогенности, что может способствовать росту [141] и метастазированию [142].

Учитывая это, существует значительный научный интерес к исследованию и измерению общей степени пространственной гетерогенности опухоли, а также определению чувствительных и резистентных к терапии субпопуляций клеток в опухолях[143, 144, 145].

Пространственную неоднородность опухолей можно обнаружить при помощи визуализации. МРТ является одним из ведущих методов визуализации для количественной оценки гетерогенности опухоли из-за наличия множества разрешенных контрастеров [146]. Помимо МРТ также существуют следующие методы получения изображений: компьютерная томография, позитронно-эмиссионная томография.

В настоящее время большинство основанных на изображениях аналитических исследований фокусируются на анатомических, микрососудистых [147, 148] и микроструктурных неоднородностях[149, 150]. Чтобы оценить эффективность параметров MRI / MRS для оценки метаболической гетерогенности опухолей, другие методы MR, которые собирают функциональную или метаболическую информацию, должны быть изучены с использованием аналитических методов. Кроме того, следует проводить комплексные исследования между параметрическими картами на основе MP и геномными / гистопатологическими данными.

Учитывая особенности распространения излучения в БИК диапазоне, такие как меньший коэффициент рассеяния и поглощения по сравнению с видимым диапазоном, применение флуоресцентной визуализации в БИК диапазоне приведет к повышению качества видеофлуоресцентной диагностики, позволит с большей точностью и на большей глубине определять неоднородность структуры опухоли, что поможет своевременно

110

выбирать пути лечения злокачественных заболеваний.

Для описания параметров гетерогенности определяется коэффициент резкости, рассчитываемый как [33]:

$$S = D^{max} - D^{min},$$

$$D = (\underbrace{\frac{1}{n}, \cdots, \frac{1}{n}}_{n}) \cdot I * (-\frac{1}{2}, 0, \frac{1}{2})$$
(44)

D - продифференцированный усредненный профиль изображения I, I – матрица интенсивностей изображения m x n, * - матричное умножение.

Граница между областью слабого и сильного накопления фотосенсибилизатора характеризуется скачкообразным изменением яркости, поэтому анализ контрастности можно свести к анализу градиентного поля изображения (векторное поле, характеризующее скорость роста яркости в заданном направлении).

Используя полученную зависимость коэффициента резкости от координат, оценивается частота резких отклонений от среднего значения. Высокая частота означает высокую гетерогенность исследуемой области.

Используя методы обратной свертки [151, 152], восстанавливаются истинные контуры флуоресцирующих локализаций на глубине более 1 см у изображений в БИК диапазоне. Для этого определяется ядро свертки, определяемое оптическими параметрами биологической ткани [153]

Заключение к главе 4

Методы управления тепловыми полями и устройство контактного облучения внутрикожных опухолей и метастазов с электронной системой охлаждения были апробированы в клинике. На базе Онкологического клинического диспансера № 1, МНИОИ им. П.А. Герцена, Государственного научного центра лазерной медицины Минздрава России г. Москва были проведены клинические исследования. Набрана статистика из 40 пациентов с различным типом заболеваний. Было показано, что применение разработанного устройства позволило проводить сеансы ФДТ совмещенное с гипертермией в полном объеме в зонах, богатых нервными окончаниями и, соответственно, высокоболезненных без

111

применения дополнительных методов аналгезии, в том числе и общего обезболивания.

На основе полученных результатов были разработаны рекомендации по применению устройства для контроля состояния биологической ткани во время внутритканевого облучения. Данные рекомендации применимы при проведении ФДТ и гипертермии паренхиматозных органов, когда опухолевый очаг располагается в глубине более чем 3 мм от поверхности органа. Определены характерные времена и динамика зависимости обратно отраженного лазерного излучения, характеризирующая процессы, происходящие на торце облучающего волокна во время внутритканевой процедуры гипертермии и ФДТ.

Был проведен статистический анализ значимости рассчитываемых параметров кровотока, получаемых при проведении ФАГ с применением разработанной системы флуоресцентной визуализации в БИК диапазоне. Удалось получить их статистическизначимую разницу у пациентов в до и после операционный период.

Разработан протокол проведения ФАГ с индоцианином зеленым у пациентов с СД, ЗАНК и наличием раневых дефектов нижних конечностей. Метод ФАГ, осуществляемый разработанной системой, рекомендован Экспертному Совету Министерства Здравоохранения Российской Федерации для включения в клинические рекомендации для диагностики ишемической и нейро-ишемической формы синдрома диабетической стоп у пациентов с СД.

Дано описание применения системы для флуоресцентной визуализации в БИК диапазоне для визуализации лимфотока, оценки заболеваний, связанных с лимфатической системой.

Дано описание подходов для регистрации гетерогенности опухоли в БИК диапазоне. Учитывая особенности распространения излучения в БИК диапазоне, такие как меньший коэффициент рассеяния и поглощения по сравнению с видимым диапазоном, применение флуоресцентной визуализации в БИК диапазоне приведет к повышению качества видеофлуоресцентной диагностики, позволит с большей точностью и на большей глубине определять неоднородность структуры опухоли, что поможет своевременно выбирать пути лечения злокачественных заболеваний.

112

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

- Разработана математическая модель, описывающая распространение света в многослойных гетерогенных биологических средах, содержащих ФС, позволяющая увеличить скорость расчета и количество фотонов, участвующих в моделировании, в 10³ раз по сравнению со стандартным алгоритмом моделирования.
- 2. Проведено сравнение глубины зондирования лазерным и флуоресцентным излучением по результатам полученным экспериментально и теоретически, методом Монте Карло и диффузионным приближением. Глубина зондирования лазерным излучением (632.8 нм) на 50% больше, чем флуоресцентным, при спектроскопическом исследовании модели головного мозга человека, содержащего ПпIX, для расстояния между излучающим и принимающим оптическими волокнами более 2 мм
- 3. Разработан способ измерения интенсивности лазерного излучения, рассеиваемого и поглощаемого биологической тканью непосредственно во время облучения ткани, по НПВО оптического волокна. Проведено математическое моделирование распространения лазерного излучения в оптическом волокне при условии НПВО. Результаты математического моделирования были сравнены с экспериментальным, и показали хорошее соответствие.
- 4. Разработана экспериментальная установка для исследования процессов взаимодействия лазерного излучения с биологическими тканями при облучении внутрикожных опухолей и новообразований. Получены характерные времена и динамика изменения оптических параметров облучаемых тканей.
- 5. Зафиксировано изменение коэффициента рассеяния до 10% для печени, до 40% для мозговой ткани и до 35% для мышечной ткани при помощи разработанной методики и устройства, измеряющего рассеянное назад излучение по НПВО в волокне, во время облучения лазерным излучением с длиной волны 675 нм и плотностью мощности 300, 360 и 620 Вт/см² соответственно.
- 6. Разработана методика и устройство для подкожного лазерного локального нагрева с автоматической регистрацией температурных полей облучаемой зоны. Применение данной методики позволяет создавать внутреннюю локальную гипертермию при сохранении неповрежденных поверхностных слоев толщиной более 2 мм.
- 7. Разработан алгоритм и методика регистрации и оценки флуоресцентных 113

изображений в БИК диапазоне, получаемых у пациентов с сосудистыми нарушениями. Определены статистически важные параметры динамики изменения яркости флуоресценции в исследуемой области такие, как время разгорания флуоресценции, максимум интенсивности флуоресценции, скорость разгорания флуоресценции.

8. Исследованы оптические параметры биологических тканей, актуальных для практического применения и содержащих флуоресцентный краситель, в БИК диапазоне. Показано, что визуализация в БИК диапазоне глубокозалегающих кровеносных и лимфатических сосудов в биологических тканях обладает контрастом выше, чем визуализация в видимом диапазоне.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- Kholodtsova M. N., Grachev P. V., Savelieva T. A., Kalyagina N. A., Blondel W., Loschenov V. B. Scattered and fluorescent photon track reconstruction in a biological tissue //International Journal of Photoenergy. – 2014. – T. 2014. Q2
- Orlovskii Yu.V., Popov A.V., Orlovskaya E.O., Vanetsev A.S., Vagapova E.A., Rähn M., Sammelselg V., Sildos I., Baranchikov A.E., Grachev P.V., Loschenov V.B. Comparison of concentration dependence of relative fluorescence quantum yield and brightness in first biological window of wavelengths for aqueous colloidal solutions of Nd3+: LaF3 and Nd3+: KY3F10 nanocrystals synthesized by microwave-hydrothermal treatment //Journal of Alloys and Compounds. – 2018. – T. 756. – C. 182-192. Q1
- Джемилова З.Н., Ситкин И.И., Сергеева С.В., Грачев П.В., Линьков К.Г., Лощенов В.Б., Галстян Г.Р. Применение метода флуоресцентной ангиографии в ближнем инфракрасном диапазоне у пациента с сахарным диабетом и критической ишемией нижней конечности // Сахарный диабет. - 2018. - Т. 21. – №. 4. - С.319-324 Q3
- Romanishkin I.D., Pominova D.V., Grachev P.V., Makarov V.I., Vanetsev A.S., Orlovskaya E.O., Baranchikov A.E., Sildos I., Loschenov V.B., Orlovskii Y.V., Ryabova A.V. Noninvasive estimation of the local temperature of biotissues heating under the action of laser irradiation from the luminescence spectra of ND3+ IONS // Biomedical Photonics. – 2018. – T. 2. - №. 7. – C. 25-36 Q3
- Ryabova A.V., Keevend K., Tsolaki E., Bertazzo S., Pominova D.V., Romanishkin I.D., Grachev P.V., Makarov V.I., Burmistrov I.A., Vanetsev A.S., Orlovskaya E.O., Baranchikov A.E., Rähn M., Sildos I., Sammelselg V., Loschenov V.B., Orlovskii Y.V. Visualization of Nd3+-doped LaF3 nanoparticles for near infrared bioimaging via upconversion luminescence at multiphoton excitation microscopy // Biomedical Photonics. – 2018. – T. 1. - №. 7. – C. 4-12 Q3
- Pominova D.V., Romanishkin I.D., Grachev P.V., Borodkin A.V., Vanetsev A.S., Orlovskaya E.O., Orlovskii Yu.V., Sildos I., Loschenov V.B., Ryabova A.V. Theoretical and experimental modeling of interstitial laser hyperthermia with surface cooling device using Nd 3+-doped nanoparticles //Lasers in medical science. – 2019. – C. 1-11. Q2
- Grachev P. V., Lin'kov K. G., Loschenov V. B. A method of controlled skin surface cooling during photodynamic therapy and hyperthermia treatment //Russian Journal of General Chemistry. – 2015. – T. 85. – №. 1. – C. 346-350. Q3

- Холодцова, М. Н., Грачев, П. В., Блондель, В. С., Зеленков, П. В., Потапов, А. А., Щербаков,
 И. А., Лощенов, В. Б. ПРИМЕНЕНИЕ УСТРОЙСТВ ДЛЯ ПРОСТРАНСТВЕННО-РАЗРЕШЕННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ НА ПРИМЕРЕ ДВУХСЛОЙНЫХ ФАНТОМОВ,
 СОДЕРЖАЩИХ МЕТАЛЛИЧЕСКИЕ НАНОЧАСТИЦЫ //Biomedical Photonics. – 2018. – Т. 7. – №. 2. – С. 4-12. Q3
- Шабунин А.В., Долидзе Д.Д., Подвязников С.О., Мельник К.В., Мумладзе Р.Б., Варданян А.В., Лебединский И.Н., Грачев П.В. Усовершенствованный способ тиреоидэктомии с футлярно-фасциальным иссечением клетчатки шеи // Современная онкология. – 2016. - №. 02. – С. 72-77
- 10. Grachev P., Loschenov V. Technique for measuring laser radiation intensity in biological tissues //Photonics & Lasers in Medicine. 2013. T. 2. №. 3. C. 217-224. Q3
- 11. Абдульвапова З.Н., Грачев П.В., Артемова Е.В., Галстян Г.Р., Бондаренко О.Н., Горбачева А.М., Линьков К.Г., Лощенов В.Б. Оценка состояния кровотока нижних конечностей у пациентов с сахарным диабетом методом флуоресцентной ангиографии в ближнем инфракрасном диапазоне // Biomedical Photonics. – 2017. – Т.6. - №. 1. – С. 4-11 Q3
- 12. Pominova D.V., Ryabova A.V., Grachev P.V., Romanishkin I.D., Kuznetsov S.V., Rozhnova J.A., Yasyrkina D.S., Fedorov P.P., Loschenov V.B. Upconversion microparticles as time-resolved luminescent probes for multiphoton microscopy: desired signal extraction from the streaking effect //Journal of biomedical optics. – 2016. – T. 21. – №. 9. – C. 096002. Q1
- Potapov A. A., Goryaynov S.A., Okhlopkov V.A., Jukov V.U., Loschenov V.B., Savelieva T.A., Grachev P.V., Holodtsova M.N., Kuzmin S.G., Spallone A.S. 5-ALA fluorescence navigation and laser spectroscopy in brain tumor resection // Visualization of the Brain and its Pathologies. Technical and Neurosurgical Aspects. - Amir Samii, Arya Nabavi, Rudolf Fahlbusch, Der Andere Verlag (2016), p. 294 pages, ISBN: 978-3-86247-577-3. – 2017.

СПИСОК РАБОТ В ТРУДАХ КОНФЕРЕНЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Фаррахова Д.С., Макаров В.И., Грачев П.В., Рябова А.В, Лощенов В.Б. Оценка приживления кожных трансплантатов с использованием наночастиц фталоцианина алюминия и индоцианина зеленого методами лазерной спектроскопии // Сборник научных трудов VI Международная конференция по фотонике и информационной оптике. - 2017 г. Москва, 01-03 февраля 2017г. - С. 536-537. 2. Abdulvapova Z.N., Grachev P.V., Galstyan G.R., Bondarenko O.N. Near-infrared imaging for angiography in diabetic foot // Photon Lasers Med. – 2016. – T.4. - №5. –C.305-306

3. Mukhin A.E., Borodkin A.V., Grachev P.V., Stranadko E.F. Joint application of fluorescence imaging and local fluorescence spectroscopy for photodynamic diagnostics and photodynamic therapy of skin cancer // Photon Lasers Med. – 2016. – T.4. - №5. – C.293-295.

4. Borodkin A.V., Linkov K.G., Grachev P.V., Loshchenov M.V. Development of intraoperative videosystem for fluorescence diagnostics and photodynamic therapy monitoring of malignant tumors // Журнал прикладной спектроскопии. – 2016. – Т. 83, № 6-16. –С. 694

5. Savelieva T., Kustov D., Grachev P., Makarov V., Osipova E., Loschenov V. Combined Video Analysis of ICG and 5-ALA Induced Protoporphyrin IX and Hemoglobin Oxygen Saturation in near Infrared // Proceedings of the 7th International Conference on Photonics, Optics and Laser Technology. – 2019. – T. 1. – C. 320-324

6. Pominova D.V., Proydakova V.Yu., Romanishkin I.D., Ryabova A.V., Grachev P.V., Kuznetsov S.V., Voronov V.V., Fedorov P.P. Strategies to enhance the sensitivity of NaGdF4:Yb-Tm based nanothermometers // Proc. SPIE 11067, Saratov Fall Meeting. – 2019. – №. 110671B

7. Loschenov V.B., Savelieva T.A., Grachev P.V., Linkov K.G., Maklygina u.S., Romanishkin I.D., Ryabova A., Kustov D.M., Goryajnov S.A., Potapov A.A. Possible approaches to fluorescence diagnosis and photodynamic therapy for deep-seated tumors // Proc. SPIE 11070. – 2019. - №. 110706B

8. Pominova D.V., Ryabova A.V., Romanishkin I.D., Grachev P.V., Burmistrov I.A., Kuznetsov S.V. Multifunctional upconversion nanoparticles based on NaYGdF4 for laser induced heating, non-contact temperature sensing and controlled hyperthermia with use of pulsed periodic laser excitation // Proc. SPIE 10716, Saratov Fall Meeting – 2018. - Nº. 107161B

9. Romanishkin I.D., Grachev P.V., Pominova D.V., Burmistrov I.A., Sildos I., Vanetsev A.S., Orlovskaya E.O., Orlovskii Yu.V., Loschenov V.B., Ryabova A.V. Experimental modeling of local laser hyperthermia using thermosensitive nanoparticles absorbing in NIR // Proc. SPIE 10716, Saratov Fall Meetingю – 2019. - №. 107161C

10. Pominova D.V., Ryabova A.V., Romanishkin I.D., Makarov V.I., Grachev P.V. Bioimaging with controlled depth using upconversion nanoparticles // SPIE Proceedings 10677. – 2018. – T. 10677. - №. 1067700

11. Grachev P.V., Abdulvapova Z.N., Linkov K.G., Galstyan G.R., Loschenov V.B. Near-

infrared fluorescence imaging methods to evaluate blood flow state in the skin lesions // SPIE Proceedings 10677. – 2018. – T. 10677. - № 106771K

12. Pominova D.V., Ryabova A.V., Grachev P.V., Romanishkin I.D., Proydakova V.Yu., Kuznetsov S.V., Voronov V.V., Fedorov P.P., Loschenov V.B. Optimization of upconversion nanoparticles excitation regimes for selective heating and effective thermometry in biological tissues // 18th International Conference on Laser Optics ICLO 2018 St.Petersburg, Russia

13. Orlovskii Yu.V., Popov A.V., Orlovskaya E.O., Vanetsev A.S., Sildos I., Grachev P.V., Ryabova A.V. A crystal host selection for aqueous colloidal luminescent nanocrystals doped by Nd3+ used for bioimaging in first biological window // 18th International Conference on Laser Optics ICLO 2018 St.Petersburg, Russia

14. Loschenov V.B, Ryabova A.V., Vasilchenko S.Yu., Grachev P.V. Methods of silicon nanoparticles visualizations for in-vivo application // AIP Conference Proceedings. – 2010. – T. 1275. – C. 150-153.

15. Ryabova A.V., Vasilchenko S.Yu., Grachev P.V., Loschenov V.B, Ermakov A.E. Biocompatible Carbon-coated 3-d Metal Nanocomposites for Therapy of Oncological Diseases // AIP Conference Proceedings. – 2010. – T. 1275. – C. 128-133

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1 Keiser G. Light-Tissue Interactions //Biophotonics. – Springer, Singapore, 2016. – C. 147-196.

2 Бугер П. Оптический трактат о градации света. – Изд-во АН СССР, 1950.

З Сивухин Д. В. § 89. Поглощение света и уширение спектральных линий // Общий курс физики. — М., 2005. — Т. IV. Оптика. — С. 582—583

4 Sandell J. L., Zhu T. C. A review of in-vivo optical properties of human tissues and its impact on PDT //Journal of biophotonics. – 2011. – T. 4. – №. 11-12. – C. 773-787.

5 Bashkatov A. N., Genina E. A., Tuchin V. V. Optical properties of skin, subcutaneous, and muscle tissues: a review //Journal of Innovative Optical Health Sciences. – 2011. – T. 4. – №. 01. – C. 9-38.

6 Wang L. et al. True scattering coefficients of turbid matter measured by early-time gating //Optics letters. – 1995. – T. 20. – №. 8. – C. 913-915.

7 Vacas-Jacques P. et al. Non-linear grating-based angular filter for ballistic transillumination //European Conference on Biomedical Optics. – Optical Society of America, 2009. – C. 7371_0J.

8 Prahl S. A., van Gemert M. J. C., Welch A. J. Determining the optical properties of turbid media by using the adding–doubling method //Applied optics. – 1993. – T. 32. – №. 4. – C. 559-568.

9 Jacques S. L. Optical properties of biological tissues: a review //Physics in Medicine & Biology. – 2013. – T. 58. – №. 11. – C. R37.

10 Sandell J. L., Zhu T. C. A review of in-vivo optical properties of human tissues and its impact on PDT //Journal of biophotonics. – 2011. – T. 4. – №. 11-12. – C. 773-787.

11 Yao J., Wang L. V. Sensitivity of photoacoustic microscopy //Photoacoustics. – 2014. – T. 2. – №. 2. – C. 87-101.

12 Barer R., Joseph S. Refractometry of living cells: Part I. Basic principles //Journal of Cell Science. – 1954. – T. 3. – №. 32. – C. 399-423.

13 Beuthan J. et al. The spatial variation of the refractive index in biological cells //Physics in Medicine & Biology. – 1996. – T. 41. – N $^{\circ}$. 3. – C. 369.

14 Wang L. et al. Self-assembled supramolecular films derived from marine deoxyribonucleic acid (DNA)— cationic surfactant complexes: large-scale preparation and optical and thermal properties //Chemistry of Materials. – 2001. – T. 13. – Nº. 4. – C. 1273-1281.

15 Stryer, L., Biochemistry, 3rd ed. // W.H. Freeman, New York, 1988, p. 760.

16 Milo R., Phillips R. Cell Biology by the Numbers, 1st ed. // Garland Science, New York , 2015

17 Lodish H., Baltimore D., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Darnell J. Molecular Cell Biology, 3rd ed. // Scientific American Books, New York, 1995

18 Борен К., Хафмен Д. Рассеяние и поглощение света малыми частицами. – 1986. Мир, Москва

19 Cross D. A., Latimer P. Angular dependence of scattering from Escherichia coli cells //Applied optics. – 1972. – T. 11. – №. 5. – C. 1225-1228.

20 Jemal A. et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2014, featuring survival //JNCI: Journal of the National Cancer Institute. – 2017. – T. 109. – №. 9. – C. djx030.

21 Tuchin V. V., Tissue optics: light scattering methods and instruments for medical diagnosis. – 2007.

22 Loshchenov M. et al. Endoscopic fluorescence visualization of 5-ALA photosensitized central nervous system tumors in the neural tissue transparency spectral range //Photonics & Lasers in Medicine. – 2014. – T. 3. – N o . 2. – C. 159-170.

23 Zhang H. et al. Penetration depth of photons in biological tissues from hyperspectral imaging in shortwave infrared in transmission and reflection geometries //Journal of biomedical optics. – 2016. – T. 21. – N o . 12. – C. 126006.

24 Zako T. et al. Development of near infrared-fluorescent nanophosphors and applications for cancer diagnosis and therapy //Journal of Nanomaterials. – 2010. – T. 2010. – C. 10.

25 Shi L, Sordillo LA, Rodríguez-Contreras A, Alfano R. Transmission in near-infrared optical windows for deep brain imaging //Journal of biophotonics. – 2016. – T. 9. – №. 1-2. – C. 38-43.

26 Hong G., Diao S., Chang J., Antaris A.L., Chen C., Zhang B., Zhao S., Atochin D.N., Huang P.L., Andreasson K.I., Kuo C.J., Dai H. Through-skull fluorescence imaging of the brain in a new near-infrared window //Nature Photonics. – 2014. – T. 8. – №. 9. – C. 723.

27 Landsman M.L., Kwant G., Mook G.A., Zijlstra W.G. Light-absorbing properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green //Journal of applied physiology. – 1976. – T. 40. – N° . 4. – C. 575-583.

28 Gerega A, Milej D, Botwicz M, Zolek N, Kacprzak M, Toczylowska B, Maniewski R, Liebert A, Weigl W, Mayzner-Zawadzka E, Wierzejski W. Multiwavelength time-resolved detection of fluorescence during the inflow of indocyanine green into the adult's brain. Journal of biomedical optics. 2012 Aug;17(8):087001.

29 Smith A. M., Mancini M. C., Nie S. Bioimaging: second window for in vivo imaging //Nature nanotechnology. – 2009. – T. 4. – №. 11. – C. 710.

30 Thimsen E., Sadtler B., Berezin M. Y. Shortwave-infrared (SWIR) emitters for biological imaging: a review of challenges and opportunities //Nanophotonics. – 2017. – T. 6. – №. 5. – C. 1043-1054.

31 Carr J.A., Franke D., Caram J.R., Perkinson C.F., Askoxylakis V., Datta M., Fukumura D., Jain R.K., Bawendi M.G., Bruns O.T. Shortwave infrared fluorescence imaging with the clinically approved near-infrared dye indocyanine green //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2018. – T. 115. – №. 17. – C. 4465-4470.

32 Tolstik E., Osminkina L., Akimov D., Gongalsky M., Kudryavtsev A., Timoshenko V., Heintzmann R., Sivakov V., Popp J. Linear and non-linear optical imaging of cancer cells with silicon nanoparticles //International journal of molecular sciences. – 2016. – T. 17. – №. 9. – C. 1536.

33 Osminkina L., Tamarov K., Sviridov A., Galkin R., Gongalsky M., Solovyev V., Kudryavtsev A., Timoshenko V. Photoluminescent biocompatible silicon nanoparticles for cancer theranostic applications //Journal of biophotonics. – 2012. – T. 5. – №. 7. – C. 529-535.

34 Филоненко Е. В. Флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия– обоснование применения и возможности в онкологии //Biomedical photonics. – 2014. – Т. 3. – № 1. – С. 3-7. 35 Москалев А.С., Грачев П.В., Макаров В.И., Козликина Е.И., Лощенов В.Б. Повышение резкости границ изображений биологических объектов с применением лазерноиндуцированной флуоресценции в ближнем инфракрасном диапазоне // Прохоровские недели Москва, Россия. - 2019.

36 Carr J. A. et al. Absorption by water increases fluorescence image contrast of biological tissue in the shortwave infrared //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2018. – T. 115. – N $_{2}$. 37. – C. 9080-9085.

37 Horvath H. Gustav Mie and the scattering and absorption of light by particles: Historic developments and basics //Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer. – 2009. – T. 110. – №. 11. – C. 787-799.

38 Brunsting A., Mullaney P. F. Light scattering from coated spheres: model for biological cells //Applied Optics. – 1972. – T. 11. – №. 3. – C. 675-680.

39 де Хюлст Г. В. Рассеяние света малыми частицами. – 1961.

40 Борен К., Хафмен Д. Рассеяние и поглощение света малыми частицами. – 1986.

41 Priezzhev A. V., Kirillin M. Y., Lopatin V. V. Effect of model parameters on Monte-Carlo simulated light scattering indicatrice of RBC suspension layer at physiological hematocrit //Optical Diagnostics and Sensing of Biological Fluids and Glucose and Cholesterol Monitoring II. – International Society for Optics and Photonics, 2002. – T. 4624. – C. 165-172.

42 González-Rodríguez P., Kim A. D. Light propagation in tissues with forward-peaked and large-angle scattering //Applied optics. – 2008. – T. 47. – №. 14. – C. 2599-2609.

43 Kim A. D. Transport theory for light propagation in biological tissue //JOSA A. – 2004. – T. 21. – №. 5. – C. 820-827.

44 Profio A. E. Light transport in tissue //Applied optics. – 1989. – T. 28. – №. 12. – C. 2216-2222.

45 Prahl S. A. A Monte Carlo model of light propagation in tissue //Dosimetry of laser radiation in medicine and biology. – International Society for Optics and Photonics, 1989. – T. 10305. – C. 1030509.

46 Atkins P. W., De Paula J., Keeler J. Atkins' physical chemistry. – Oxford university press, 2018. – C.494

47 Cheong W. F., Prahl S. A., Welch A. J. A review of the optical properties of biological tissues //IEEE journal of quantum electronics. – 1990. – T. 26. – №. 12. – C. 2166-2185.

48 Bashkatov A. N. et al. Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm //Journal of Physics D: Applied Physics. – 2005. – T. 38. – №. 15. – C. 2543.

49 Аскарьян Г. А. Увеличение прохождения лазерного и другого излучения через мягкие мутные физические и биологические среды //Квантовая электроника. – 1982. – Т. 9. – №. 7. – С. 1379-1383.

50 Waigh T. A. Applied biophysics: a molecular approach for physical scientists. – John Wiley & Sons, 2007.

51 Helfmann J., Brodzinski T. Thermische Wirkungen //Angewandte Lasermedizin, Lehrund Handbuch für Praxis und Klinik, ecomed Verlagsgesellschaft. – 1989. 52 Müller G. J., Sliney D. H., Potter R. F. Dosimetry of laser radiation in medicine and

biology //Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) Conference Series. – 1989. – T. 10305.

53 Sliney D. H., Trokel S. L. Medical lasers and their safe use. – Springer Science & Business Media, 2012.

54 Fried N. M. Recent advances in infrared laser lithotripsy //Biomedical optics express. – 2018. – T. 9. – №. 9. – C. 4552-4568.

55 Scales C.D., Lai J.C., Dick A.W., Hanley J.M., van J., Setodji C.M., Saigal C.S., Urologic Diseases in America Project. Comparative effectiveness of shock wave lithotripsy and ureteroscopy for treating patients with kidney stones //JAMA surgery. – 2014. – T. 149. – №. 7. – C. 648-653.

56 Pašta J. Laser therapy in ophthalmology //Lasers for Medical Applications. – Woodhead Publishing, 2013. – C. 395-458.

57 Серебряков В. А. Лазерные технологии в медицине/В. А. Серебряков //СПб.: ИТМО. – 2009.

58 Loschenov V. B., Konov V. I., Prokhorov A. M. Photodynamic therapy and fluorescence diagnostics //LASER PHYSICS-LAWRENCE-. – 2000. – T. 10. – №. 6. – C. 1188-1207.

59 Kessel D., Luo Y. Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis //Cell death and differentiation. – 1999. – T. 6. – N o . 1. – C. 28.

60 Steger A. C., Lees W. R., Walmsley K., Bown S. G.. Interstitial laser hyperthermia: a new approach to local destruction of tumours //Bmj. – 1989. – T. 299. – №. 6695. – C. 362-365.

61 Yagawa Y., Tanigawa K., Kobayashi Y., Yamamoto M. Cancer immunity and therapy using hyperthermia with immunotherapy, radiotherapy, chemotherapy, and surgery //J. Cancer Metastasis Treat. – 2017. – T. 3. – C. 219.

62 Nomura S., Arake M., Morimoto Y. Thermal Sensor Circuit Using Thermography for Temperature-Controlled Laser Hyperthermia //Journal of Sensors. – 2017. – T. 2017.

63 Roti Roti J. L. Cellular responses to hyperthermia (40–46 C): Cell killing and molecular events //International Journal of hyperthermia. – 2008. – T. 24. – №. 1. – C. 3-15.

64 Lim C. U., Zhang Y., Fox M. H. Cell cycle dependent apoptosis and cell cycle blocks induced by hyperthermia in HL-60 cells //International journal of hyperthermia. – 2006. – T. 22. – Nº. 1. – C. 77-91.

65 Tung M.M., Trujillo M., López J.A., Rivera M.J., Berjano E.J. Modeling the heating of biological tissue based on the hyperbolic heat transfer equation //Mathematical and Computer Modelling. – 2009. – T. 50. – N o . 5-6. – C. 665-672.

66 Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М. Теоретическая физика. Том 8. Электродинамика сплошных сред //книга. – 1982. – С.147

67 Knudsen M. SYSTEM MODELLING AND OPTIMIZATION // 1984. - T. 59. - C. 709-716

68 Khaled A. R. A., Vafai K. The role of porous media in modeling flow and heat transfer in biological tissues //International Journal of Heat and Mass Transfer. – 2003. – T. 46. – №. 26. – C. 4989-5003.

69 H.R.P.G. Darcy, Les Fontaines Publiques de la volle de Dijon, Vector Dalmont, Paris, 1856

70 Joseph D. D., Nield D. A., Papanicolaou G. Nonlinear equation governing flow in a saturated porous medium //Water Resources Research. – 1982. – T. 18. – №. 4. – C. 1049-1052.

71 Brinkman H. C. A calculation of the viscous force exerted by a flowing fluid on a dense swarm of particles //Flow, Turbulence and Combustion. – 1949. – T. 1. – №. 1. – C. 27.

72 Wessapan T., Rattanadecho P. Flow and heat transfer in biological tissue due to electromagnetic near-field exposure effects //International Journal of Heat and Mass Transfer. – 2016. – T. 97. – C. 174-184.

73 Shevchik S. A., Zhukov G. V., Golovanov I. N., Linkov K. G., Barun V. V., Loschenov V. B. Temperature control technique for laser hyperthermia //Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic Systems VI. – International Society for Optics and Photonics, 2008. – T. 6848. – C. 684819.

74 Chin L.C.L., Whelan W.M., Sherar M.D., Vitkin I.A. Changes in relative light fluence measured during laser heating: implications for optical monitoring and modelling of interstitial laser photocoagulation //Physics in Medicine & Biology. – 2001. – T. 46. – №. 9. – C. 2407.

75 Yaroslavsky AN, Schulze PC, Yaroslavsky IV, Schober R, Ulrich F, Schwarzmaier HJ. Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues in vitro in the visible and near infrared spectral range //Physics in Medicine & Biology. – 2002. – T. 47. – №. 12. – C. 2059.

76 Zhu, Dan, et al. Dehydration effect on optical properties of porcine liver //Laser-Tissue Interaction XIV. – International Society for Optics and Photonics, 2003. – T. 4961. – C. 174-181.

77 Jaywant, Satish M., et al. Temperature-dependent changes in the optical absorption and scattering spectra of tissues: correlation with ultrastructure //Laser-tissue interaction IV. – International Society for Optics and Photonics, 1993. – T. 1882. – C. 218-229.

78 Li, Hui, et al. Refractive index of biotissue versus temperature condition at 632.8 nm //Biomedical Optics and Lasers: Diagnostics and Treatment. – International Society for Optics and Photonics, 1998. – T. 3548. – C. 119-124.

79 Vogt W. C. et al. Measurement and Thermal Dependence of Biological Tissue Optical Properties //Theory and Applications of Heat Transfer in Humans. – 2018. – T. 1. – C. 355-378.

80 Kalkman J., Bykov A.V., Faber D.J., van Leeuwen T.G. Multiple and dependent scattering effects in Doppler optical coherence tomography //Optics express. – 2010. – T. 18. – Nº. 4. – C. 3883-3892.

81 Martelli F., Zaccanti G. Calibration of scattering and absorption properties of a liquid diffusive medium at NIR wavelengths. CW method //Optics express. – 2007. – T. 15. – №. 2. – C. 486-500.

82 Di Ninni P., Martelli F., Zaccanti G. Effect of dependent scattering on the optical properties of Intralipid tissue phantoms //Biomedical optics express. – 2011. – T. 2. – №. 8. – C. 2265-2278.

83 Leonard J. B., Foster K. R., Athley T. W. Thermal properties of tissue equivalent phantom materials //IEEE Transactions on Biomedical Engineering. – 1984. – №. 7. – C. 533-536.

84 Torres J.H., Nelson J.S., Tanenbaum B.S., Anvari B. Skin thermal response to sapphire contact and cryogen spray cooling: A comparative study based on measurements in a skin phantom //Lasers in Surgery: Advanced Characterization, Therapeutics, and Systems X. – International Society for Optics and Photonics, 2000. – T. 3907. – C. 29-36.

85 Guyton A.C., Hall J.E.. Textbook of Medical Physiology // Saunders. – 2000.

86 Valvano J. W., Cochran J. R., Diller K. R. Thermal conductivity and diffusivity of biomaterials measured with self-heated thermistors //International Journal of Thermophysics. – 1985. – T. 6. – N o . 3. – C. 301-311.

87 Кандидов В.П., Милицин В.О., Быков А.В., Приезжев А.В. Использование корпускулярного и волнового методов Монте-Карло в оптике дисперсных сред //Квантовая электроника. – 2006. – Т. 36. – №. 11. – С. 1003-1008.

88 Wang L., Jacques S. L., Zheng L. MCML—Monte Carlo modeling of light transport in multilayered tissues //Computer methods and programs in biomedicine. – 1995. – T. 47. – №. 2. – C. 131-146.

89 Pominova, D. V., Romanishkin, I. D., Grachev, P. V., Borodkin, A. V., Vanetsev, A. S., Orlovskaya, E. O., Orlovskii Y.V., Sildos I., Loschenov V.B., Ryabova, A. V. Theoretical and experimental modeling of interstitial laser hyperthermia with surface cooling device using Nd 3+- doped nanoparticles //Lasers in medical science. – 2019. – C. 1-11.

90 Cui W., Kumar C., Chance B. Experimental study of migration depth for the photons measured at sample surface //Time-Resolved Spectroscopy and Imaging of Tissues. – International Society for Optics and Photonics, 1991. – T. 1431. – C. 180-191.

91 Feng S., Zeng F. A., Chance B. Photon migration in the presence of a single defect: a perturbation analysis //Applied optics. – 1995. – T. 34. – №. 19. – C. 3826-3837.

92 Kholodtsova M.N., Grachev P.V., Savelieva T.A., Kalyagina N.A., Blondel W., Loschenov V.B. Scattered and fluorescent photon track reconstruction in a biological tissue //International Journal of Photoenergy. – 2014. – T. 2014.

93 Холодцова, М. Н., Грачев, П. В., Блондель, В. С., Зеленков, П. В., Потапов, А. А., Щербаков, И. А., Лощенов, В. Б. ПРИМЕНЕНИЕ УСТРОЙСТВ ДЛЯ ПРОСТРАНСТВЕННО-РАЗРЕШЕННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ НА ПРИМЕРЕ ДВУХСЛОЙНЫХ ФАНТОМОВ, СОДЕРЖАЩИХ МЕТАЛЛИЧЕСКИЕ НАНОЧАСТИЦЫ //Biomedical Photonics. – 2018. – Т. 7. – №. 2. – С. 4-12.

94 Bailey D., Wright E. Practical fiber optics. – Elsevier, 2003.

95 Snell's Law [Электронный pecypc]. https://eng.libretexts.org/Bookshelves/Materials_Science/Supplemental_Modules_(Materials_Sci ence)/Optical_Properties/Snell's_Law

96 Бростилов С. А., Торгашин С. И., Юрков Н. К. Распространение света в искривленном многомодовом оптическом волноводе //Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Технические науки. – 2012. – №. 1.

97 Grachev P., Loschenov V. Technique for measuring laser radiation intensity in biological tissues //Photonics & Lasers in Medicine. – 2013. – T. 2. – №. 3. – C. 217-224.

98 Гонсалес Р., Вудс Р. Цифровая обработка изображений. – Litres, 2019. – С. 130

99 US Patent 4996420, 26.02.1991

100 US Patent 6389187B1 14.05.2002

101 US Patent 6640028B1 28.10.2003

102 Тучин В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. – Litres, 2018.

103 Water Absorption [Электронный ресурс]. http://www1.lsbu.ac.uk/water/water_vibrational_spectrum.html

104 Галлагер Р. Метод конечных элементов. Основы. – 1984.

105 FlexPDE [Электронный pecypc]. - <u>https://www.pdesolutions.com/</u>

106 Klavuhn K. Epidermal Protection: A Comparative Analysis of Sapphire Contact and Cryogen Spray Cooling. – 2000.

107 Leonard J. B., Foster K. R., Athley T. W. Thermal properties of tissue equivalent phantom materials //IEEE Transactions on Biomedical Engineering. – 1984. – №. 7. – C. 533-536.

108 Grachev P. V., Lin'kov K. G., Loschenov V. B. A method of controlled skin surface cooling during photodynamic therapy and hyperthermia treatment //Russian Journal of General Chemistry. – 2015. – T. 85. – N o . 1. – C. 346-350. Q3

109 Michels R., Foschum F., Kienle A. Optical properties of fat emulsions //Optics Express. – 2008. – T. 16. – №. 8. – C. 5907-5925.

110 Flock S.T., Jacques S.L., Wilson B.C., Star W.M., van Gemert M.J.C. Optical properties of Intralipid: a phantom medium for light propagation studies //Lasers in surgery and medicine. – 1992. – T. 12. – №. 5. – C. 510-519.

111 Garcia M, Edmiston C, York T, Marinov R, Mondal S, Zhu N, Sudlow GP, Akers WJ, Margenthaler J, Achilefu S, Liang R. Bio-inspired imager improves sensitivity in near-infrared fluorescence image-guided surgery //Optica. – 2018. – T. 5. – №. 4. – C. 413-422.

112 Carr JA, Franke D, Caram JR, Perkinson CF, Saif M, Askoxylakis V, Datta M, Fukumura D, Jain RK, Bawendi MG, Bruns OT. Shortwave infrared fluorescence imaging with the clinically approved near-infrared dye indocyanine green //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2018. – T. 115. – №. 17. – C. 4465-4470.

113 Meglinski I. V., Matcher S. J. Quantitative assessment of skin layers absorption and skin reflectance spectra simulation in the visible and near-infrared spectral regions //Physiological measurement. – 2002. – T. 23. – N o . 4. – C. 741.

114 Lister T., Wright P. A., Chappell P. H. Optical properties of human skin //Journal of biomedical optics. – 2012. – T. 17. – №. 9. – C. 090901.

115 Mignon C, Tobin DJ, Zeitouny M, Uzunbajakava NE. Shedding light on the variability of optical skin properties: finding a path towards more accurate prediction of light propagation in human cutaneous compartments //Biomedical optics express. – 2018. – T. 9. – N^o. 2. – C. 852-872.

116 Bruls W. A. G., Van Der Leun J. C. Forward scattering properties of human epidermal layers //Photochemistry and photobiology. – 1984. – T. 40. – №. 2. – C. 231-242.

117 Scott Prahl, Optical Absorption of Indocyanine Green (ICG) [Электронный ресурс]. - http://omlc.org/spectra/icg/

118 Yuan B., Chen N. G., Zhu Q. Emission and absorption properties of indocyanine green in Intralipid solution //Journal of biomedical optics. – 2004. – T. 9. – №. 3. – C. 497-504.

119 Kraft J. C., Ho R. J. Y. Interactions of indocyanine green and lipid in enhancing near-infrared fluorescence properties: the basis for near-infrared imaging in vivo //Biochemistry. – 2014. – T. 53. – N o . 8. – C. 1275-1283.

120 Devoisselle J. M. et al. Fluorescence properties of indocyanin green: I. In-vitro study with micelles and liposomes //Advances in fluorescence sensing technology III. – International Society for Optics and Photonics, 1997. – T. 2980. – C. 453-460.

121 Jung B., Vullev V. I., Anvari B. Revisiting indocyanine green: effects of serum and physiological temperature on absorption and fluorescence characteristics //IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics. – 2013. – T. 20. – №. 2. – C. 149-157.

122 Gerega A. et al. Wavelength-resolved measurements of fluorescence lifetime of indocyanine green //Journal of Biomedical Optics. – 2011. – T. 16. – №. 6. – C. 067010.

123 Abugo O. O., Gryczynski Z., Lakowicz J. R. Modulation sensing of fluorophores in tissue: A new approach to drug compliance monitoring //Journal of biomedical optics. – 1999. – T. 4. – №. 4. – C. 429-443.

124 Li X., Fu Y., Ma L. et al. Spectrometric study on the interaction of indocyanine green with human serum albumin //Chemical Research in Chinese Universities. – 2016. – T. 32. – №. 3. – C. 343-347.

125 Гельфонд М. Л., Барчук А. С. Лазерная селективная гипертермия в лечении злокачественных новообразований //Методические рекомендации. СПб. – 2002.

126 Alander J. T. et al. Review of indocyanine green imaging in surgery //Fluorescence Imaging for Surgeons. – Springer, Cham, 2015. – C. 35-53.

127 Sowa M.G., Kuo W., Ko A.T., Armstrong D.G. Review of near-infrared methods for wound assessment //Journal of biomedical optics. – 2016. – T. 21. – №. 9. – C. 091304.

128 Braun J. D. et al. Early quantitative evaluation of indocyanine green angiography in patients with critical limb ischemia //Journal of vascular surgery. – 2013. – T. 57. – N^o. 5. – C. 1213-1218.

129 Igari K. et al. Quantitative evaluation of the outcomes of revascularization procedures for peripheral arterial disease using indocyanine green angiography //European Journal of Vascular and Endovascular Surgery. – 2013. – T. 46. – №. 4. – C. 460-465.

130 Benitez E. et al. Contemporary assessment of foot perfusion in patients with critical limb ischemia //Seminars in vascular surgery. – WB Saunders, 2014. – T. 27. – №. 1. – C. 3-15.

131 Alander J.T., Kaartinen I., Laakso A., Pätilä T., Spillmann T., Tuchin V.V., Venermo M., Välisuo P. A review of indocyanine green fluorescent imaging in surgery //Journal of Biomedical Imaging. – 2012. – T. 2012. – C. 7.

132 Venermo M., Settembre N., Albäck A., Vikatmaa P., Aho P.S., Lepäntalo M., Inoue Y., Terasaki H. Pilot assessment of the repeatability of indocyanine green fluorescence imaging and correlation with traditional foot perfusion assessments //European Journal of Vascular and Endovascular Surgery. – 2016. – T. 52. – №. 4. – C. 527-533.

133 Nakamura M., Igari K., Toyofuku T., Kudo T., Inoue Y., Uetake H. The evaluation of contralateral foot circulation after unilateral revascularization procedures using indocyanine green angiography //Scientific reports. – 2017. – T. 7. – N o . 1. – C. 16171.

134 Джемилова З.Н., Ситкин И.И., Сергеева С.В., Грачев П.В., Линьков К.Г., Лощенов В.Б., Галстян Г.Р. Применение метода флуоресцентной ангиографии в ближнем инфракрасном диапазоне у пациента с сахарным диабетом и критической ишемией нижней конечности // Сахарный диабет. - 2018. - Т. 21. – №. 4. - С.319-324

135 Ma Q., Dieterich L.C., Ikenberg K., Bachmann S.B., Mangana J., Proulx S.T., Amann V.C., Levesque M.P., Dummer R., Baluk P., McDonald D.M. Unexpected contribution of lymphatic vessels to promotion of distant metastatic tumor spread //Science advances. – 2018. – T. 4. – №. 8. – C. eaat4758.

136 Choong-kun L., Seung-hwan J., Cholsoon J., Hosung B., Yoo Hyung K., Intae P., Sang Kyum K., Gou Young K. Tumor metastasis to lymph nodes requires YAP-dependent metabolic adaptation //Science. – 2019. – T. 363. – №. 6427. – C. 644-649.

137 Seki Y., Kajikawa A., Yamamoto T., Takeuchi T., Terashima T., Kurogi N. Real-time Indocyanine Green Videolymphography Navigation for Lymphaticovenular Anastomosis //Plastic and Reconstructive Surgery–Global Open. – 2019. – T. 7. – №. 5. – C. e2253.

138 Farias-Cisneros E., Chilton P.M., Palazzo M.D., Ozyurekoglu T., Hoying J.B., Williams S.K., Baughman C., Jones C.M., Kaufman C.L. Infrared imaging of lymphatic function in the upper extremity of normal controls and hand transplant recipients via subcutaneous indocyanine green injection //SAGE open medicine. – 2019. – T. 7. – C. 2050312119862670.

139 Andor N., Graham T. A., Jansen M., et al. Pan-cancer analysis of the extent and consequences of intratumor heterogeneity //Nature medicine. – 2016. – T. 22. – №. 1. – C. 105.

140 Zhang X., Marjani S. L., Hu Z., Weissman S. M., Pan X., Wu S. Single-cell sequencing for precise cancer research: progress and prospects //Cancer Research. – 2016. – T. 76. – №. 6. – C. 1305-1312.

141 Cleary A. S. Teamwork: the tumor cell edition //Science. – 2015. – T. 350. – №. 6265. – C. 1174-1175.

142 Calbo J., van Montfort E., Proost N., et al. A functional role for tumor cell heterogeneity in a mouse model of small cell lung cancer //Cancer cell. – 2011. – T. 19. – №. 2. – C. 244-256.

143 O'Connor J. P. B., Rose C. J., Waterton J. C., Carano R. A. D., Parker G. J. M., Jackson A. Imaging intratumor heterogeneity: role in therapy response, resistance, and clinical outcome //Clinical Cancer Research. – 2015. – T. 21. – № 2. – C. 249-257.

144 Alizadeh A. A., Aranda V., Bardelli A., et al. Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity //Nature medicine. – 2015. – T. 21. – №. 8. – C. 846.

145 Gillies R. J., Kinahan P. E., Hricak H. Radiomics: images are more than pictures, they are data //Radiology. – 2015. – T. 278. – № 2. – C. 563-577.

146 Alic L., Niessen W. J., Veenland J. F. Quantification of heterogeneity as a biomarker in tumor imaging: a systematic review //PloS one. – 2014. – T. 9. – №. 10. – C. e110300.

147 Mougiakakou S.G., Valavanis I.K., Nikita A., Nikita K.S. Differential diagnosis of CT focal liver lesions using texture features, feature selection and ensemble driven classifiers //Artificial Intelligence in Medicine. – 2007. – T. 41. – N o . 1. – C. 25-37.

148 Rokita E., Taton G., Sierzega M., Kulig J., Urbanik A. Quantitative analysis of 3D US images in the relationship with liver lesion diagnosis //Polish Journal of Radiology. – 2009. – T. 74. – Nº. 2.

149 Rose C.J., Mills S.J., O'Connor J.P., Buonaccorsi G.A., Roberts C., et al. Quantifying spatial heterogeneity in dynamic contrast-enhanced MRI parameter maps //Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine. – 2009. – T. 62. – №. 2. – C. 488-499.

150 Sachdeva J., Kumar V., Gupta I., Khandelwal N., Ahuja C.K. A dual neural network ensemble approach for multiclass brain tumor classification //International journal for numerical methods in biomedical engineering. – 2012. – T. 28. – №. 11. – C. 1107-1120.

151 Minet O., Beuthan J., Zabarylo U. Deconvolution techniques for experimental optical imaging in medicine //Medical Laser Application. – 2008. – T. 23. – №. 4. – C. 216-225.

152 Najafzadeh EB, Hejazi M, Reza HM, Rudin M, Stuker F, Shirkavand A. Development of an algorithm for reducing scatter distribution in fluorescence reflectance images using Wiener filter in Wavelet domain //World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, September 7-12, 2009, Munich, Germany. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. – C. 1869-1872.

153 Shimizu K., Tochio K., Kato Y. Improvement of transcutaneous fluorescent images with a depth-dependent point-spread function //Applied optics. – 2005. – T. 44. – №. 11. – C. 2154-2161.