

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

На правах рукописи



Генин Вадим Дмитриевич

**Особенности оптического просветления биологических тканей в задачах
плазмонно-резонансной фототермической терапии опухолей**

Специальность 1.5.2. - Биофизика

Диссертация на соискании ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научные руководители:

к.ф.-м.н., доцент А.Н. Башкатов

д.ф.-м.н., профессор В.В. Тучин

Саратов

2022

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. Обзор литературы	13
1.1. Плазмонно-резонансная фототермическая терапия опухолей	13
1.1.1. История развития метода гипертермии опухолей	13
1.1.2. Лазерная гипертермия и плазмонно-резонансная фототермическая терапия опухолей	15
1.1.3. Оценка оптических параметров биотканей	20
1.1.4. Строение и оптические параметры тканей опухоли печени	22
1.1.5. Оптические параметры биотканей при нагревании	24
1.2. Иммерсионное оптическое просветление биотканей	28
1.2.1. Техника иммерсионного оптического просветления биотканей	28
1.2.2. Строение и оптические параметры тканей кожи	30
1.2.3. Иммерсионное оптическое просветление как метод управления оптическими параметрами биотканей	31
1.2.4. Глицерин как иммерсионный просветляющий агент	34
1.3. Применение техники оптического просветления в задачах фототермической терапии опухолей	38
ГЛАВА 2. Развитие метода плазмонно-резонансной фототермической терапии	41
2.1. Исследование зависимости температурной кинетики нагрева опухолей от степени их васкуляризации и дозировки ЗНС	41
2.1.1. Методика исследования зависимости температуры нагрева опухолей от дозировки и способа введения ЗНС	41
2.1.2. Анализ зависимости температуры нагрева опухолей от степени их васкуляризации, дозировки ЗНС и способа их введения	44
2.2. Исследование зависимости оптических свойств опухолей от температуры нагрева	50
2.2.1. Методика определения оптических параметров (полного пропускания и диффузного отражения) слоев опухоли	50
2.2.2. Алгоритм вычисления оптических параметров (коэффициента поглощения и транспортного коэффициента рассеяния) слоев опухоли	53
2.2.3. Анализ оптических свойств слоев опухолей	54
2.2.4. Анализ изменения оптических свойств слоев опухолей при различной температуре нагрева поверхности при ПФТТ	58

ГЛАВА 3. Иммерсионное оптическое просветление тканей кожи	68
3.1. Исследование изменения структурных и оптических параметров тканей кожи под действием гиперосмотических иммерсионных агентов	68
3.1.1. Методика исследования изменения структурных и оптических параметров тканей кожи под действием гиперосмотических иммерсионных агентов	68
3.1.2. Анализ изменения структурных и оптических параметров тканей кожи под действием водных растворов глицерина	72
3.2. Определение эффективных коэффициентов диффузии водных растворов глицерина в тканях кожи	80
ГЛАВА 4. Оптическое просветление при фототермической терапии опухолей	86
4.1. Методика оптического просветления кожи при плазмонно-резонансной фототермической терапии опухолей	86
4.2. Анализ изменения оптических свойств слоев опухолей при ПФТТ и иммерсионном оптическом просветлении	89
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100
БЛАГОДАРНОСТИ	102
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	103

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

EDV – конечная диастолическая скорость,
EPR – повышенная проницаемость и задержание,
Hb – гемоглобин,
HbO₂ – оксигемоглобин,
HbH – дезоксигемоглобин,
metHb – метгемоглобин,
PSV – максимальная систолическая скорость,
RI – индекс сопротивления кровеносных сосудов,
БИК – ближний инфракрасный,
ДМСО – диметилсульфоксид,
ЗНО – золотые наноболочки,
ЗНС – золотые наностержни,
ИДУ – инверсный метод добавления-удвоения,
ИК – инфракрасный,
КР – комбинационное рассеяние,
ЛСКВ – лазерная спекл-контрастная визуализация,
МРТ – магнитно-резонансная томография,
ОКТ – оптическая когерентная томография,
ОПА – оптический просветляющий агент,
ППР – поверхностный плазмонный резонанс,
ПФТТ – плазмонно-резонансная фототермическая терапия,
ПЭГ – полиэтиленгликоль,
ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия,
ФТТ – фототермическая терапия,
ХК – холангиокарцинома.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и современное состояние проблемы.

Среди многочисленных задач, стоящих перед современной медициной в XXI веке, особое место занимает борьба с онкологическими заболеваниями. Так, по данным ВОЗ, ежегодная смертность от онкологических заболеваний составляет более 9 млн человек [1]. В настоящее время, наряду со многими, уже ставшими традиционными, методами лечения, такими как: хирургия, химиотерапия, фотодинамическая терапия, лучевая терапия и т. д., все более широкое применение находят методы, основанные на использовании современных нанотехнологий и, в частности, лазерной плазмонно-резонансной фототермической терапии (ПФТТ) [2-6]. Действие ПФТТ основано на накоплении плазмонно-резонансных наночастиц в тканях опухоли. Такие наночастицы, поглощая излучение с соответствующей длиной волны, способны генерировать тепловую энергию в локальном объеме [7], что позволяет снизить дозу лазерного излучения и уменьшить ущерб, причиняемый окружающим опухоль здоровым тканям. В настоящее время для ПФТТ применяются наносферы, нанокубики, нанозвезды, нанокомпозиты, наноконтейнеры и т. д. [8]. Недавно в целом ряде работ [6, 9-11] была продемонстрирована высокая эффективность для ПФТТ золотых наностержней (ЗНС) благодаря их продолжительному времени жизни в кровотоке, коллоидной стабильности, легкой настройке плазмонного резонанса путем изменения соотношения размеров наностержней [12] и эффективному преобразованию светового излучения в тепловую энергию [10]. Экспериментальные исследования, выполненные в работах [4, 6, 11], демонстрируют эффективность использования наночастиц с длиной волны возбуждения плазмонного резонанса равной приблизительно 800 нм, поскольку оно достаточно глубоко проникает вглубь ткани и обеспечивает эффективную фототермическую терапию.

Успешная фототерапия опухолей, сенсibilизированных наночастицами, требует решения целого ряда задач, связанных с выбором протокола однократного или многократного введения наночастиц, вводимой дозы и распределением частиц опухоли, а также дозы облучения [13]. Совершенно очевидно, что знание оптических параметров тканей опухоли является ключевым моментом как для оценки дозы облучения (т.е. поглощенной энергии), так и для оценки освещенности тканей опухоли в курсе фототермической или фотодинамической терапии, что в свою очередь позволяет корректно оценить количество лазерного излучения, доставленного внутрь опухоли, и обеспечить достаточный нагрев тканей, расположенных на различных глубинах, поскольку в ряде случаев отмечается повторный рост опухоли после фотодинамического и фототермического

подавления ее роста за счёт сохранения даже небольшого количества живых раковых клеток на периферии опухоли, не подвергнутой обработке [13- 17].

Известны многочисленные исследования оптических параметров различных опухолевых тканей, достаточно широкий обзор работ представлен в [18]. Большой интерес также представляют оптические параметры онкологических моделей (перевитых животным опухолей, полученных из клеточных линий или опухолей) [19- 28]. В первом приближении структурно развитая трансплантированная опухоль достаточно большого размера может быть представлена в виде слоистой сферы, основными слоями которой являются: капсула опухоли; периферическая часть опухоли, содержащая основные кровеносные сосуды; и некротическое ядро. Однако исследования оптических параметров проводились на цельной ткани опухоли, без ее дифференциации по слоям. Для решения задачи оптимизации лазерного воздействия на опухолевые ткани необходима информация о степени нагрева её внутренних слоёв *in vivo* при различных способах введения суспензии наночастиц. Эффективность теплового воздействия на опухолевые ткани на разной глубине можно оценить путем сравнения оптических параметров облученной и необлученной ткани.

Для снижения повреждения здоровых тканей над поверхностью опухоли во время ПФТТ возможно использование техники иммерсионного оптического просветления биотканей, заключающейся в выравнивании показателей преломления компонентов ткани путем частичного замещения внутритканевой жидкости биосовместимым оптическим просветляющим агентом [29- 32].

Целью исследования является разработка биофизических основ метода лазерной плазмонно-резонансной фототермической терапии модельных опухолей в комбинации с иммерсионным оптическим просветлением кожи.

Достижение указанной цели основывалось на решении следующих **задач**:

1. Определение температурной зависимости ПФТТ от дозировки и способа введения в модельные опухоли суспензии золотых наностержней.
2. Определение оптических параметров слоёв модельной опухоли в интактном состоянии и при различной температуре нагрева биотканей под действием ИК лазерного излучения при проведении ПФТТ.
3. Выявление механизмов и определение эффективных коэффициентов диффузии и эффективности оптического просветления кожи с помощью растворов глицерина различных концентраций.
4. Повышение эффективности оптического просветления кожи в процессе ПФТТ.
5. Исследование влияния оптического просветления кожи на оптические параметры биотканей, подвергшихся гипертермии в результате ПФТТ.

Научная новизна

В работе впервые выполнена оценка оптических параметров различных слоёв модельной перевитой опухоли альвеолярного рака печени – холангиокарциномы. Впервые измерены оптические параметры слоёв опухолевой ткани, кожи и подкожной соединительной ткани после применения различных способов введения и доз ЗНС и проведения ПФТТ. Впервые проведено комплексное исследование изменения оптических, геометрических и весовых характеристик образцов кожи *ex vivo*, в результате которого выявлены механизмы диффузии и выполнена оценка эффективности оптического просветления кожи под действием растворов глицерина с концентрацией 20-100%. Предложена методика ПФТТ с использованием ЗНС и лазерного излучения (808 нм) в комбинации с иммерсионным оптическим просветлением кожи раствором глицерина.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы обусловлена важностью полученных результатов для уточнения существующих и развития новых моделей распространения лазерного излучения и тепла при проведении ПФТТ. Полученные результаты имеют практическую значимость, поскольку способствуют развитию направления в медицине, связанного с повышением эффективности и безопасности лечения онкологических заболеваний.

Результаты и положения, выносимые на защиту

1. Иммерсионное оптическое просветление кожи в процессе лазерной плазмонной фототермической терапии способствует уменьшению повреждения кожи за счёт снижения рассеяния верхних слоёв биоткани и, соответственно, снижения поглощения энергии в этих слоях.
2. Методика проведения ПФТТ подкожной перевитой модельной опухоли с применением техники оптического просветления биоткани включает два этапа: 1) нанесение оптического просветляющего агента на поверхность кожи и облучение её низкоинтенсивным ИК лазерным излучением с длиной волны, лежащей в области плазмонного резонанса используемых наночастиц, до достижения температуры нагрева ткани $41 \pm 1^\circ\text{C}$ с целью повышения скорости диффузии агента; 2) увеличение интенсивности лазерного излучения для реализации фототермолиза опухоли.
3. Кинетика изменения оптических, геометрических и весовых характеристик кожи крыс *ex vivo* под действием водных растворов глицерина с концентрациями 20-100% является в основном двухскоростным процессом. Скорости и направление изменения значений параметров определяются комбинацией процессов дегидратации и набухания биоткани под действием глицерина.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность описанных в диссертационном исследовании результатов, сделанных выводов, обсуждений и заключения подтверждается:

1. Использованием современного научно-исследовательского оборудования и применением апробированных методик расчёта и моделирования.
2. Объёмом использованного в работе материала: 67 белых лабораторных крыс, 1 штамм перевиваемых опухолей в экспериментах *in vivo*, 330 образцов кожи белых лабораторных крыс в экспериментах *ex vivo* и применением традиционных статистических методов обработки результатов.
3. Воспроизводимостью экспериментальных и расчетных данных, а также их соответствием результатам, полученным другими авторами.
4. Опубликованием результатов в рецензируемых российских и международных научных журналах.

Работы, изложенные в диссертации, осуществлялись в соответствие с программами научно-исследовательских работ, поддерживаемых грантами: РФФИ №№ 18-52-16025 НЦНИЛ_а, 19-32-90224 Аспиранты, 20-52-56005 Иран_г, Фонда содействия инновациям УМНИК-19 (г) / Хелснет-НТИ – 2019 № 15929ГУ/2020 от 07.23.2020 (код 0059878, заявка У-65096), Правительства Российской Федерации № 220 от 09 апреля 2010 года (Соглашение № 075-15-2021-615 от 04 июня 2021 года).

Основные результаты и положения диссертации были представлены, доложены и обсуждены на международных и всероссийских конференциях:

1. International Annual Conference «Saratov Fall Meeting», Saratov, Russia, 2013-2021;
2. XXXII Международная научная конференция «Математические методы в технике и технологиях – ММТТ-32», Саратовская школа молодых ученых – Конкурс УМНИК Саратовской области, Саратов, Россия, 20-22 ноября 2019;
3. Fundamentals of Laser Assisted Micro- & Nanotechnologies (FLAMN-19), International Symposium, St. Petersburg, Russia, June 30 - July 4, 2019;
4. 3rd School on Advanced Fluorescence Imaging Methods, ADFLIM, Saratov, Russia, September 24-28, 2018;
5. SPIE-OSA European Conference on Biomedical Optics, 21-25 June, Munich, Germany, 2015;
6. V International Symposium: Topical Problems of Biophotonics 2015, 20-24 July, Nizhny Novgorod, Russia, 2015;
7. 5th International Scientific Conference «New Operational Technologies», Tomsk, Russia, September 29-30, 2015;

8. Всероссийский молодежный Самарский конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике, 2014, 2015, 2017-2021;
9. IX Съезд Российского фотобиологического общества. Всероссийская конференция «Современные проблемы фотобиологии», пос. Шепси, Россия, 12-19 сентября 2021;
10. Пятая всероссийская научная школа-семинар «Взаимодействие сверхвысокочастотного, терагерцового и оптического излучения с полупроводниковыми микро- и наноструктурами, метаматериалами и биообъектами», Саратов, Россия, 16-17 мая 2018;
11. Всероссийская молодежная научная школа-конференция «Практическая биофизика - 2015», Саратов, Россия, 20-21 ноября 2015;
12. Ежегодная всероссийская Школа-семинар «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине – 2014», Саратов, Россия, 5-7 ноября 2014.

Личный вклад автора

В рамках выполнения диссертационного исследования автор принимал непосредственное участие во всех этапах проведенных исследований: от реализации поставленных научным руководителем задач до обсуждения результатов и написания статей.

Автор лично принимал участие в проведении экспериментов по облучению опухолей *in vivo* и оптическому просветлению *ex vivo*; измерении оптических, геометрических и весовых параметров образцов; аналитической и статистической обработке полученных результатов; интерпретации результатов исследования; изложении полученных фактических данных в материалах диссертационной работы, статьях и главе монографии; подготовке докладов на научно-практических конференциях.

Публикация результатов исследований

По теме диссертации опубликовано 16 научных работ в том числе 11 работ в изданиях, рекомендованных ВАК, и зарубежных изданиях, индексируемых *Scopus* и *Web of Science*. Опубликовано глава в зарубежной монографии издательства *CRC Press*.

Список публикаций по теме диссертации:

Статьи в журналах и сборниках трудов ВАК, *Scopus* и *Web of Science*:

1. **Genin V.D.**, Bucharskaya A.B., Terentyuk G.S., Khlebtsov N.G., Navolokin N.A., Tuchin V.V., Genina E.A. Changes in Optical Properties of Model Cholangiocarcinoma after Plasmon-Resonant Photothermal Treatment // *Photonics*. - Vol. 9. – No. 3. - P. 199. - 2022; DOI: 10.3390/ photonics9030199 (Scopus, WoS)
2. Bucharskaya A., Khlebtsov N., Khlebtsov B., Maslyakova G., Navolokin N., **Genin V.**, Genina E., Tuchin V. Photothermal and photodynamic therapy of tumors with plasmonic

- nanoparticles: challenges and prospects // *Materials*, - Vol. 15. – No. 4. – P. 1606. - 2022; DOI: 10.3390/MA15041606 (Scopus, WoS)
3. **Genin V.D.**, Genina E.A., Tuchin V.V., Bashkatov A.N. Glycerol effects on optical, weight and geometrical properties of skin tissue // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. - Vol. 14. - No. 5. – P. 2142006. - 2021; DOI: 10.1142/S17935458214200622142006-1 (Scopus, WoS)
 4. Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н., Чехонацкая М.Л., Захарова Н.Б., Терентюк Г.С., Наволокин Н.А., Хлебцов Б.Н., Хлебцов Н.Г., **Генин В.Д.**, Башкатов А.Н., Генина Э.А., Тучин В.В. К вопросу об эффективности плазмонной фототермической терапии экспериментальных опухолей // *Оптика и спектроскопия*. - Т. 128. - № 6. - С. 846-851, 2020; DOI: 10.21883/OS.2020.06.49419.34-20 (БАК, Scopus, WoS)
 5. **Genin V.D.**, Genina E.A., Bucharskaya A.B., Chekhonatskaya M.L., Terentyuk G., Tuchina D.K., Khlebtsov N.G., Tuchin V.V., Bashkatov A.N. Study of Tumour and Surrounding Tissue Heating with Near-Infrared Radiation after the Injection of Gold Nanoparticles into the Tissue // *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. - Vol. 4. – No. 1. – P. 010505. - 2018; DOI: 10.18287/JBPE18.04.010505 (БАК)
 6. Bashkatov A.N., Berezin K.V., Dvoretzkiy K.N., Chernavina M.L., Genina E.A., **Genin V.D.**, Kochubey V.I., Lazareva E.N., Pravdin A.B., Shvachkina M.E., Timoshina P.A., Tuchina D.K., Yakovlev D.D., Yakovlev D.A., Yanina I.Yu., Zhernovaya O.S., Tuchin V.V. Measurement of tissue optical properties in the context of tissue optical clearing // *Journal of Biomedical Optics*. - Vol. 23. – No. 9. – P. 091416. - 2018; DOI: 10.1117/1.JBO.23.9.091416 (Scopus, WoS)
 7. **Genin V.D.**, Bucharskaya A.B., Genina E.A., Terentyuk G.S., Khlebtsov N.G., Tuchin V.V., Bashkatov A.N. Optical properties of model cholangiocarcinoma tissues in the spectral range of 350-2250 nm in laser photothermolysis treatment // *Proc. SPIE*. - Vol. 11845. – P. 118450Z. - 2021; DOI: 10.1117/12.2590422 (Scopus, WoS)
 8. Bucharskaya A., Maslyakova G., Chekhonatskaya M., Pakhomy S., Mudrak D., Navolokin N., Terentyuk G., Borisova E., Mantareva V., Angelov I., Khlebtsov B., Khlebtsov N., **Genin V.**, Bashkatov A., Genina E., Tuchin V. The assessment of tumor vascularization degree for predicting the effectiveness of plasmonic photothermal and photodynamic therapy // *Proc. SPIE*. - Vol. 11845. – P. 1184508. - 2021; DOI: 10.1117/12.2590411 (Scopus, WoS)
 9. Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N., Chekhonatskaya M.L., Zakharova N.B., Terentyuk G.S., Navolokin N.A., Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G., **Genin V.D.**, Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V. The evaluation of tumor vascularization as a prognostic factor of

- plasmonic photothermal therapy efficiency // 2020 International Conference Laser Optics (ICLO), St. Petersburg, Russia, 2020, p. 1; DOI: 10.1109/ICLO48556.2020.9285670 (Scopus)
10. **Genin V.D.**, Rakotomanga P., Zaytsev S.M., Genina E.A., Lazareva E.N., Khairallah G., Amouroux M., Soussen C., Chen H., Feng W., Zhu D., Bashkatov A.N., Blondel W., Tuchin V.V. Research and development of effective optical technologies for diagnostics in dermatology // Proc. SPIE. - Vol. 11065. - P. 1106505. - 2019; DOI: 10.1117/12.2528700 (Scopus, WoS)
 11. **Genin V.D.**, Genina E.A., Bucharskaya A.B., Tuchin V.V., Khlebtsov N.G., Terentyuk G.S., Bashkatov A.N. Investigation of change of tumor optical properties after laser-induced plasmon-resonant photothermal treatment of transplanted tumors in rats // Proc. SPIE. - Vol. 10716. - P. 107160Z. - 2018; DOI: 10.1117/12.2315213 (Scopus, WoS)

Статьи в журналах и сборниках РИНЦ

1. **Genin V.D.**, Teslina N.V., Tuchina D.K., Genina E.A., Tuchin V.V., Bashkatov A.N. Ex vivo study of the skin geometrical parameters kinetics at the optical clearing by glycerol solutions // Представляем научные достижения миру. Естественные науки. Материалы IX научной конференции молодых ученых (Саратов, 10-11 апреля 2018 г.). – Саратов: Издательство «Саратовский источник», С. 37-41, 2018. (ISBN: 978-5-91879-917-8)
2. **Генин В.Д.**, Башкатов А.Н., Генина Э.А., Бучарская А.Б., Тучина Д.К., Хлебцов Н.Г., Тучин В.В. Исследование кинетики нагрева опухолей и окружающих тканей излучением ближнего ИК спектрального диапазона при введении в ткань золотых наночастиц // XV Всероссийский молодежный Самарский конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике: сборник трудов конференции, (Самара, 14–18 ноября 2017 г.). – Москва: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук, С. 85-91, 2017 (ISBN 978-5-902622-37-6).
3. **Генин В.Д.**, Генина Э.А., Бучарская А.Б., Тучина Д.К., Хлебцов Н.Г., Тучин В.В., Башкатов А.Н. Анализ кинетики нагрева раковых опухолей крыс излучением ближнего ИК спектрального диапазона при внутривенном введении золотых наностержней // Проблемы оптической физики и биофотоники SFM- 2017. Материалы 5-го Международного симпозиума и 21-ой Международной молодежной научной школы Saratov Fall Meeting 2017. (Под редакцией Г. В. Симоненко, В. В. Тучина). Саратов, Изд-во "Новый ветер", С. 39-43, 2017. (ISBN 978-5-98116-224-4)
4. **Genin V.D.**, Tuchina D.K., Sadeq A.J., Genina E.A., Tuchin V.V., Bashkatov A.N. Ex vivo investigation of glycerol diffusion in skin tissue // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. - Vol. 2. – No. 1. - P. 010303. - 2016; DOI: 10.18287/JBPE16.02.010303.

5. **Генин В.Д.**, Тучина Д.К., Генина Э.А., Башкатов А.Н. Исследование диффузии глицерина в тканях кожи *ex vivo* // XIII Всероссийский молодежный Самарский конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике: сборник конкурсных докладов (Самара, 11–14 ноября 2015 г.). Москва: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук, С. 451-457, 2015 (ISBN 978-5-902622-28-4).

Глава в монографии:

1. Genina E., **Genin V.D.**, Zhu J., Bashkatov A., Zhu D., Tuchin V. Traditional and innovative optical clearing agents / Chapter 3 in Handbook of Tissue Optical Clearing. New Prospects in Optical Imaging. Edited by V. Tuchin, D. Zhu, and E. A. Genina. Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group LLC, 2022, pp. 67-91; DOI: 10.1201/9781003025252 (ISBN 9780367895099 (hardback), ISBN 9781032118697 (paperback), ISBN 9781003025252 (ebook))

Структура и объем диссертации

Диссертация включает введение, обзорную главу, 3 главы с изложением полученных результатов, заключение, в котором обсуждаются результаты, подводятся итоги выполненной работы и даны перспективы развития. Материал изложен на 127 страницах печатного текста, содержит 10 таблиц и иллюстрирован 27 рисунками. Список литературы содержит 304 источника.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1. Плазмонно-резонансная фототермическая терапия опухолей

1.1.1. История развития метода гипертермии опухолей

История онкологической гипертермии восходит к случаям лечения рака сопутствующими лихорадочными заболеваниями, описанным в XVIII-XIX веках. Впервые, по всей видимости, подавление роста опухоли при помощи высокой температуры, вызванной малярией, было описано *de Kizowitz* (Франция) в 1779 году [33]. В 1866 году *Busch* [34] (Германия) описал полную ремиссию гистологически подтвержденной саркомы лица после двух рожистых воспалений с последующей 2-летней выживаемостью без рецидивов. Данный метод получил название фебрильной (лихорадочной) терапии, а гипертермия сама по себе была лишь одним из компонентов сложной реакции организма и не рассматривалась как отдельный метод лечения [33].

Систематическое развитие фебрильный метод лечения рака получает в последнее десятилетие XIX века. В 1893 году американский хирург *William B. Coley*, изучавший рожистое воспаление, создает так называемый «токсин Коули» («вакцина Коули»), первый специализированный бактериальный противоопухолевый пироген со стандартизованным составом, производившийся впоследствии в промышленных масштабах. Однако изучение механизмов действия фебрильной терапии и термотерапии вообще началось только в конце 1940-х гг., когда были опубликованы фундаментальные работы *Moritz* и др. [35-37] по термическому повреждению, а также началось создание научного фонда иммунологии.

Экспериментальное изучение гипертермии началось сразу после получения первых клинических результатов. *Jensen* получил аналогичные результаты, подвергая опухоли мышей нагреву до 47°C в течение 5 минут и, по всей видимости, стал первым, кто задумался о повышенной тепловой чувствительности опухолевых клеток по сравнению с нормальными клетками [33]. В 1921 г. *Prime* и *Rohdenburg* [38] сообщили о первом систематическом исследовании термочувствительности опухолей, проведенном на 2000 мышах, с привитыми саркомами Крокера. Стопроцентное ингибирование роста опухолей наблюдалось после обработки при 42°C в течение 180 мин. и при 44°C в течение 90 мин. В 1927 году *Westermarck* [39] начал экспериментальное изучение гипертермии на крысах.

В 1950-е гг. начался новый период развития гипертермии как самостоятельного метода лечения. В период с 1950 по 1965 год интерес к данному методу неуклонно рос. В 1950 году *Gessler* и др. [40] сообщили об успешном разрушении опухолей молочной железы у мышей с помощью микроволновой гипертермии (2450 МГц) без значительного ущерба для животных.

В 1957 г. *Gilchrist* и др. [41] использовали радиочастотную индуктотермию для разрушения метастазов в лимфатических узлах *in vivo* у собак.

Selawry и др. [42] в 1957 г. выявил основные закономерности гипертермического воздействия на линии клеток, нагретых на водяной бане *in vitro*: ускорение роста клеток при температуре ниже 39°C с максимумом при 38°C, прерывание митотического цикла в метафазе в диапазоне 39-40°C и необратимое повреждения клеток при температуре выше 40°C; смерть клеток при 42-46°C; развитие термотолерантности в условиях выше 39°C и длительной (до 3 месяцев) терморезистентности в клетках, выживших после гипертермии. Эти данные лежат в основе современной гипертермии, но, к сожалению, в основном они интерпретируются неверно. В частности, распространенность мнения об опасности низкотемпературного ($\leq 39^\circ\text{C}$) нагрева, поскольку он способен усилить рост опухоли, и рассмотрение температур выше 40°C как безопасных в этом отношении, не обосновано, поскольку не учитывает фактор времени. По данным *Selawry*, указанные выше температурные диапазоны актуальны только при длительном нагреве (несколько дней), но не в случае кратковременной (порядка нескольких минут) процедуры гипертермии. Как показал *Selawry*, рост митотического индекса (процента делящихся клеток от общего числа проанализированных клеток) за 12 часов был намного выше при 41°C, чем при 38°C (10.4% против 4.2%), и упал до нуля при 41°C только через 24 часа. Через 6 часов митотическая стимуляция была почти одинаковой при значениях температуры в диапазоне 38-41°C (3.7-4.1% против 2.3-2.8% при 36°C), и только значения температуры выше 42°C прервали вступление новых клеток в митотический цикл. Следовательно, весь диапазон гипертермии ($\leq 42^\circ\text{C}$) потенциально стимулирует рост опухоли, и более высокие температуры могут быть еще более опасными в этом отношении. Слабый нагрев становится более опасным для роста опухоли только при условии, что он длится более 24 часов.

По-настоящему основы современной онкологической гипертермии были заложены *Crile* в его значимой серии экспериментов *in vivo* на мышах в начале 1960-х гг. [43-45]. Именно он уже в 1962 г. сообщил обо всех известных паттернах гипертермии *in vivo*: способности опухолей накапливать тепло из-за снижения перфузии, повреждении опухоли при температуре 42°C и выше, уменьшении летального времени теплового воздействия в два раза с каждым градусом выше 42°C, повышенной радиочувствительности и пониженной термочувствительности малых опухолей и обратном соотношении для больших опухолей, развитии термотолерантности после сублетального воздействия, повышении термочувствительности инъекциями серотонина, аддитивном или синергетическом эффекте комбинации тепла и облучения. Эти результаты были получены на опухолях, имплантированных в лапы мышей и нагретых на водяной бане. В результатах данных

исследований важно отметить два момента. Во-первых, серьезную токсичность эффективной гипертермии: повышение температуры выше 42°C приводило к повреждению как опухоли, так и здоровых тканей. Во-вторых, хотя *Crile* показал, что гипертермия при 44°C в течение 30 минут приводит к половинному уменьшению изодозы облучения, радиочувствительность здоровых тканей возрастает в той же степени, что и радиочувствительность опухоли. Поэтому *Crile* резюмировал, что терморадיותרпия имеет сомнительное преимущество перед радиотерапией как таковой и показана только при радиорезистентных опухолях. Таким образом, именно в начале развития онкологической гипертермии как отдельного метода четко проявилась проблема ограничений, обусловленных токсичностью.

С 1965 по 1975 гг. гипертермия достигла значительного прогресса. Были разработаны технологии гипертермии всего тела и регионарной гипертермической перфузии, продолжено изучение локальной гипертермии. Была создана прочная научная база гипертермии, и была четко сформулирована концепция экстремальной гипертермии, основанная на использовании температур выше 42.5°C.

Одновременно с тем накапливались и отрицательные результаты. К 1975 г. ограничения гипертермии всего тела стали очевидными ввиду невозможности повысить температуру системы выше 42°C, избегнув высокого уровня токсичности, сложности и трудоемкости [46, 47]. Многочисленные работы показали, что невозможно равномерно нагреть опухоль выше 42°C. Менее чем в половине исследований, опухоли нагревались в среднем более чем на 42°C при разнице температур внутри опухоли более чем на 2°C, но причина в таком ограничении не была технической. Не было никаких препятствий для доведения тканей существовавшими на тот момент методами даже до состояния испарения. Главным ограничивающим фактором являлась токсичность. Терапевтический диапазон гипертермии весьма мал, в связи с чем термическое поражение опухолей влекло повреждение здоровых тканей и необходимость снижения температуры нагрева.

В 2005 г. была опубликована работа [48], заключающая, что концепция экстремальной гипертермии невозможна. Вместо нее была предложена концепция умеренной гипертермии (при 40-42°C), основанная на влиянии гипертермии на кровоток и оксигенацию опухоли, которое на данный момент изучается *Song* и др. [49].

1.1.2. Лазерная гипертермия и плазмонно-резонансная фототермическая терапия опухолей

В отличие от общей гипертермии тела, при локальной гипертермии опухолей могут быть достигнуты более высокие температуры без отрицательного влияния на весь организм. Однако использование локальной гипертермии для лечения опухолей было ограничено

трудностью доставки и контроля дозировки тепла. Работы конца 1980-х гг. показали, что подходящим источником излучения для проведения локальной гипертермии может служить лазер [50-52].

Первое сообщение об использовании лазера в хирургии, в частности в офтальмологии, было опубликовано в 1963 году [53], а в 1965 г. лазерное излучение впервые использовалось для удаления опухоли [54]. К концу 1960-х гг. применение лазеров в хирургии значительно расширилось [55].

Глубина проникновения видимого и ближнего ИК лазерного излучения составляет 0.2-8 мм, что значительно меньше, чем у радио- или микроволн. Данное ограничение исключает использование лазеров при лечении крупных поражений, однако может оказаться преимуществом при лечении небольших хорошо локализованных опухолей [52].

Лазерный луч, как правило, неодим-иттрий-алюминиевого граната (Nd-YAG, 1.06 мкм) и CO₂ лазера (10.6 мкм) может доставляться либо путем прямого облучения поверхности опухоли через оптическое волокно, конец которого расположен на некотором расстоянии от поверхности опухоли, либо при помещении оголенного конца волокна в центр опухоли. Последний метод называют интерстициальной лазерной гипертермией. Лазерное излучение, применяемое для облучения опухоли, характеризуется монохроматичностью, когерентностью и коллимированностью. Данные свойства обеспечивают формирование узкого пучка высокой интенсивности, который передает энергию в глубину ткани-мишени с минимальными потерями и высокой степенью точности [3].

Требуемая плотность мощности лазера при прямом облучении поверхности опухоли зависит от оптических свойств опухоли и факторов, влияющих на ее охлаждение. Требуемая для воздействия на очаги размером в несколько сантиметров плотность мощности находится в диапазоне от 100 мВт/см² до 200-300 мВт/см² и зависит от перфузии крови. Требуемая плотность мощности будет выше в том случае, если диаметр лазерного пятна будет составлять несколько миллиметров. В случае пятна диаметром 6 мм требуемая плотность мощности находится в диапазоне 1000-1500 мВт/см², что соответствует мощности луча в диапазоне 300-450 мВт. Распределение температуры внутри ткани, зависящее от оптических и термических свойств самой ткани, соответствует падению температуры от 10 до 7°C на расстоянии 2-7 мм вглубь от поверхности ткани [56]. Радиус терапевтически полезной области составляет 5-10 мм. Излучаемая оптическим волокном мощность не должна превышать 1-2 Вт [52].

Большим недостатком лазерной гипертермии является ее неселективность. На пути лазерного пучка повреждаются как здоровые, так и опухолевые ткани [57]. Повысить селективность лазерной гипертермии возможно путем применения техники

фототермической терапии (ФТТ), подразумевающей использование фотосенсибилизаторов с высокой оптической плотностью в красной или ближней инфракрасной спектральных областях, которые имеют возможность эффективно конвертировать фотоэнергию в тепло, вызывая гипертермию в опухолевых тканях, не повреждая при этом соседние здоровые ткани [58-60].

Фототерапия, в том числе ФТТ различных видов рака, привлекает большое внимание вследствие многих преимуществ, помимо высокой селективности, таких как относительно низкая стоимость, малое количество побочных эффектов по сравнению с лучевой терапией и химиотерапией, возможность амбулаторного лечения и минимальное травмирование здоровых тканей. При данном типе терапии применяются лазеры с генерацией на длинах волн 633 и 808 нм.

Одной из разновидностей ФТТ, активно применяющей современные нанотехнологии, является лазерная плазмонно-резонансная фототермическая терапия (ПФТТ) [3-45, 61, 62]. Действие ПФТТ основано на пассивном накоплении плазмонно-резонансных наночастиц в тканях опухоли. Такие наночастицы (наносферы, нанокубики, нанозвезды, наноконтейнеры и т. д.) поглощают излучение с соответствующей длиной волны и способны генерировать тепловую энергию в локальном объеме, что позволяет снизить дозу лазерного излучения и уменьшить повреждение здоровых тканей, окружающих опухоль [63].

В последнее десятилетие наночастицы широко используются в различных биомедицинских приложениях, включая детектирование и фототермолиз раковых клеток и опухолей [64, 65]. Из всех наноматериалов, применяемых в задачах фотомедицины, благодаря своим уникальным свойствам особенно выделяются наночастицы золота [64-66]. Уникальность золотых наночастиц обусловлена оптическими и электрохимическими свойствами коллоидного золота, в частности, характерным для него явлением поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Величина и положение максимума ППР зависит от размера и формы частицы, показателя преломления среды, а также температуры [3]. К тому же ППР взаимодействующих частиц смещён в более длинноволновую область по сравнению с изолированными частицами [67].

В ряде работ [6, 9, 10, 11] продемонстрирована высокая эффективность золотых наностержней (ЗНС) для ПФТТ, благодаря их длительному времени жизни в кровотоке, коллоидной стабильности, легкой настройке плазмонного резонанса за счет изменения соотношения размеров [12] и эффективному преобразованию светового излучения в тепловую энергию [9]. Наиболее часто спектральная настройка плазмонного резонанса золотых наночастиц происходит с расчетом на так называемое «терапевтическое окно прозрачности» тканей (750-1100 нм), для которого характерна наибольшая глубина

проникновения лазерного излучения в биоткань [68-70]. Экспериментальные исследования [4, 6] демонстрируют эффективность использования ЗНС с длиной волны возбуждения плазмонного резонанса около 800 нм, поскольку лазерное излучение, обладающее близкой к 800 нм длиной волны, проникает достаточно глубоко в ткань и обеспечивает эффективную фототермическую терапию.

Особенностью золотых наностержней является наличие двух полос поглощения, появляющихся за счет осцилляций ППП в двух направлениях вдоль и поперек стержня [71]. Золотые наноклетки также демонстрируют свойства, полезные для использования в оптическом биоимиджинге и терапии. Полые и пористые золотые наноклетки являются биоинертными и обеспечивают повышенное пространственное и временное разрешение оптической визуализации [72].

Золотые наноболочки на ядрах из двуокиси кремния [73] и золотые нанозвезды (*nanostars* [74], называемые также наноморскими ежами – *nano-sea-urchins* [75-77]), сочетают свойства интенсивного поглощения и рассеяния света в области плазмонного резонанса. Причем, в отличие от золотых наноболочек, интенсивное рассеяние нанозвезд обусловлено усилением локального электромагнитного поля около острых выступов частиц, а не сравнительно большим общим размером, как в случае наноболочек. Подобные свойства делают нанозвезды перспективными для применения в задачах комбинированного фототермолиза, оптической когерентной томографии и биоимиджинга [77].

Композитный состав микро- и наночастиц способствует повышению их многофункциональности [78]. В качестве примера можно привести композитные наночастицы, представляющие собой золото-серебряные наноклетки, покрытые мезопористой оболочкой из двуокиси кремния и функционализированные фотосенсибилизатором, в роли которого выступает дикалиевая соль *Yb-2,4*-диметоксигематопорфирина IX [78]. Помимо плазмонного резонанса в области 750-800 нм, данные частицы имеют дополнительный пик поглощения на длине волны около 400 нм, соответствующий свободному *Yb-HP*, а также полосы видимой флуоресценции вблизи 580 и 630 нм.

Применение техник пассивной и активной доставки способствует накоплению наночастиц в опухолевой ткани, что обеспечивает высокую селективность лазерного нагрева. Пассивная доставка наночастиц связана с так называемым *EPR*-эффектом (*enhanced permeability and retention*) – эффектом повышенной проницаемости и задержания [79-82]. Для сосудистой сети опухоли характерна неупорядоченность структуры, присутствие артериовенозных шунтов, расширенность и извилистость сосудов, нарушения формы и структурной организации клеток эндотелия, расширенность пор, создающих в сосудах

«дыры» [83-86]. Размер пор между эндотелиальными клетками здоровых тканей составляет 2-6 нм, однако в случае опухолевых тканей размер данных пор колеблется в диапазоне 100-2000 нм [80, 87, 88]. С этим связана повышенная проницаемость тканей опухоли для лекарственных препаратов и белков плазмы. Одновременно с этим скорость выведения из опухоли наночастиц снижена, что обуславливается наличием малого количества функциональных лимфатических сосудов в опухоли.

Регулированием таких параметров наночастиц, как размер, форма и характер покрытия, можно добиться повышения эффективности их накопления в опухолевой ткани [89]. К примеру, оболочка из полиэтиленгликоля (ПЭГ) препятствует агрегации золотых наночастиц и повышает время их циркуляции в кровотоке [90].

Техника активной доставки наночастиц в опухолевые ткани подразумевает применение опухолевых биомаркеров для модификации поверхности наночастиц. Данные биомаркеры способны образовывать специфические связи с определенными антигенами, расположенными на мембранах опухолевых клеток [91, 92].

Успешное применение ПФТТ с применением наночастиц при лечении опухолей требует решения ряда проблем, связанных с биораспределением наночастиц и их потенциальной токсичностью, определением наиболее эффективного метода доставки наночастиц в опухолевые ткани, поиском способов неинвазивного мониторинга накопления наночастиц в опухоли, а также с оптимизацией терапевтического протокола [93-96].

В исследовании *Dickerson* и др. [97] было проведено сравнение эффективности внутриопухолевого и внутривенного введения золотых наностержней на примере мышинной модели плоскоклеточной карциномы кожи. Результаты показали, что в случае внутриопухолевого введения наностержней на 13 день после фототермического воздействия объем опухоли снизился на 57% по сравнению с изначальным, тогда как в случае внутривенного введения наблюдалось снижение на 23%.

В *in vitro* исследовании *Maltzahn* и др. [98] было продемонстрировано, что провоцируемый облучением нагрев золотых наностержней, покрытых ПЭГ, происходит в 6 раз быстрее, нежели нагрев золотых нанооболочек (ЗНО), применяемых в тех же концентрациях. Эти же авторы также установили в *in vivo* исследовании, что в условиях внутривенного введения ЗНС дольше циркулируют в кровотоке, чем ЗНО (17 ч. и 4 ч. соответственно). При внутривенном введении мышам золотых наностержней, покрытых ПЭГ, в высокой дозировке (20 мг/кг) и последующем фототермолизе предварительно привитой человеческой меланомы *MDA-MB-435* было достигнуто полное разрушение опухоли. Данные результаты могут быть объяснены малым размером опухоли (объем порядка 0.5 см³) и высокой вводимой дозой золотых наночастиц.

В исследовании *Mostafa* и др. [99] мышам с перевитой карциномой Эрлиха внутриопухолево и внутривенно была введена суспензия ЗНС, покрытых ПЭГ (размеры ЗНС: 60 ± 5 ; соотношение сторон: 4.6; максимум поглощения на 800 нм; дозировка: 1.5 мг/кг каждые три недели). Максимальное накопление ЗНС в опухолях наблюдалось через 3 суток после внутривенного введения. Период полувыведения ЗНС из организма составил 11.6 дней.

1.1.3. Оценка оптических параметров биотканей

Коэффициент поглощения μ_a и коэффициент рассеяния μ_s – основные оптические свойства мутных сред. В исследованиях также могут представлять интерес производные параметры, среди которых средний косинус угла рассеяния g и транспортный коэффициент рассеяния $\mu'_s = \mu_s(1 - g)$. В случае многослойных сред при проведении вычислений также важно знание показателя преломления слоев, составляющих изучаемую среду. Усредненный показатель преломления биоткани в широком диапазоне длин волн в большинстве случаев принимают за константу 1.4 [100].

В исследованиях, подразумевающих прохождение света через рассеивающий образец, как правило регистрируются отражение R (диффузное и френелевское), пропускание T (полное, диффузное и коллимированное), а также внутреннее распределение света Φ . Важным параметром является также угловое распределение интенсивности рассеянной компоненты оптического или электромагнитного излучения – индикатриса рассеяния. Геометрические параметры образца также способны влиять на прохождение света сквозь образец и на процесс регистрации излучения [101].

Для определения значений оптических параметров биотканей на раннем этапе развития метода применялось приближение Кубелки-Мунка. Данное приближение основано на представлении поля излучения внутри образца в качестве суммы двух противоположно направленных световых потоков. В случае многослойных сред, где расположение плоскопараллельных слоев перпендикулярно по отношению к направлению распространения света, существует возможность рассчитать распределение интенсивности в каждом слое, применяя простую трехпотоковую модель, значение толщины d , коэффициентов поглощения μ_a и рассеяния μ_s , параметра анизотропии g и показателя преломления n каждого из слоев. В роли многослойных объектов могут выступать биологические образцы. К примеру, применительно к модели кожи, включающей четыре слоя (эпидермис, верхняя дерма, кровеносные сосуды, нижняя дерма), расчеты демонстрируют, что интенсивность света на длине волны 577 нм в эпидермисе приблизительно в два раза выше интенсивности светового

пучка, падающего на поверхность кожи. В слое, соответствующем верхней дерме, она снижается с 1.75 до 0.3 от интенсивности падающего пучка, а в области кровеносных сосудов быстро падает до нулевого значения [101].

Дальнейшие исследования выявили ряд недостатков приближения Кубелки-Мунка, в частности: отсутствие возможности применения к средам, обладающим высокой анизотропией рассеяния; трудность пересчета параметров Кубелки-Мунка в стандартные параметры теории переноса излучения; сложность учета преломляющих границ. Применение метода Кубелки-Мунка может оказаться оправданным лишь в случаях, когда не требуется достижения результатами высокой точности. В основном данный подход применяется на первом этапе алгоритма обратной задачи для оценки оптических свойств биотканей и крови. Полученные таким образом значения оптических параметров далее применяются для вычисления отраженной и прошедшей сквозь биоткань интенсивности пучка света, но уже с применением более детализированных моделей распространения света в биоткани [29].

Возможность быстрого и точного решения обратной задачи рассеяния дает инверсный метод добавления-удвоения (ИДУ). Он основан на предложенном *van de Hulst* [102] методе решения уравнения переноса в случае плоскопараллельных слоев и был введен *Prahl* [103] в оптику биотканей. Важное преимущество ИДУ применительно к оптике биотканей – это возможность быстрого получения итерационных решений при помощи компьютеров. К тому же он достаточно гибок для учета внутреннего отражения от границ образца, а также анизотропии рассеяния [29].

Метод включает следующие шаги:

- 1) выбор оптических параметров, подлежащих определению;
- 2) вычисление значений отражения и пропускания;
- 3) сравнение вычисленных и измеренных величин отражения и пропускания;
- 4) повторение процедуры до тех пор, пока вычисленные и измеренные значения не будут совпадать с заданной точностью.

Данный метод позволяет достичь любой точности в случае любых измеряемых параметров, при условии наличия необходимого для компьютерных вычислений времени [29].

Термин "удвоение" в названии данного метода означает, что предполагаемые известными (для всех углов, при которых происходит падение и выход лучей из слоя) коэффициенты отражения и пропускания одного слоя могут быть применимы для аналогичных параметров слоя, имеющего вдвое большую толщину. В данном случае следует произвести наложение двух идентичных слоев друг на друга и сложить вклады в отражение и пропускание каждого из них. Отражение и пропускание слоя произвольной толщины

рассчитывается последовательно, сначала для тонкого слоя с теми же оптическими характеристиками (однократное рассеяние), после чего путем последовательного удвоения толщины рассчитываются характеристики слоя требуемой толщины.

Термин "добавление" в названии метода означает применение методики "удвоения" в случае образцов с разнородными слоями, что дает возможность создавать модели многослойных биотканей с учетом внутреннего отражения, обусловленного изменениями показателей преломления на границах слоев [29, 101].

Основные недостатки данного метода связаны с невозможностью расчета распределения излучения внутри исследуемой среды, а также с одномерностью метода ИДУ, по причине которой потери света на краях образца не учитываются, и неизбежно происходит завышение коэффициента поглощения исследуемого образца. При этом последнее ограничение становится существенным только в том случае, когда для исследования используются сравнительно небольшие, по сравнению с размерами падающего на образец луча, образцы биоткани [101].

Несмотря на ограничения, которые метод ИДУ накладывает на геометрию образца, он весьма пригоден для итеративных вычислений, поскольку обеспечивает точное вычисление коэффициентов диффузного отражения и полного пропускания образца, затрачивая при этом сравнительно малое компьютерного времени. Кроме того, соотношение коэффициентов поглощения и рассеяния исследуемой среды может быть практически любым, что позволяет выполнять расчеты не только для сильно, но и для слабо рассеивающих сред, обладающих сильным поглощением [101].

1.1.4. Строение и оптические параметры тканей опухоли печени

Глобальный уровень заболеваемости раком печени в 2018 году составил 841 080 случаев (4.7% от общего числа случаев заболевания раком), а смертность составила 781 631 человек (8.2% от общего числа случаев смерти от рака) [104]. В качестве основного метода лечения рака печени, выявленного на ранних стадиях, часто указывается хирургическое вмешательство.

Холангиокарцинома (ХК) - это группа злокачественных опухолей, образующихся из клеток эпителия желчных протоков. Согласно классификации ВОЗ [105] термин холангиокарцинома описывает карциномы, возникающие в желчных протоках печени. Данное злокачественное новообразование опасно трудностью ранней диагностики и ограниченным количеством терапевтических подходов. ХК – наиболее распространенная злокачественная опухоль, обнаруживаемая в эпителиальных клетках желчных протоков, и вторая по частоте случаев опухоль печени [106]. Для пациентов ХК крайне опасна:

пациенты, которые не могут подвергнуться хирургической резекции, в течение 5 лет имеют выживаемость менее 10%. Более того, результат после резекции печени также не оптимистичен: 5-летняя выживаемость составляет 30-35% [107]. Основная причина неудовлетворительного исхода хирургического лечения – высокая частота послеоперационных рецидивов ХК: после операции рецидив наблюдается более чем у 60% пациентов [108].

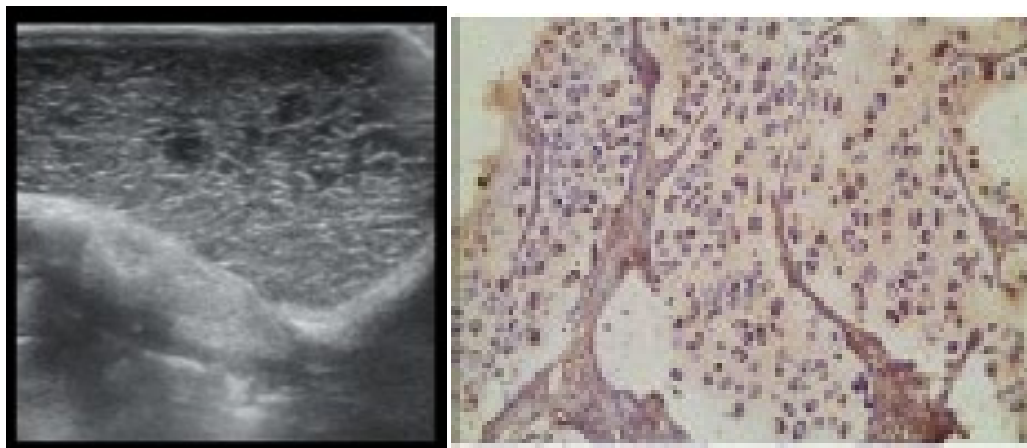
Самое раннее описание ХК желчных протоков без пальпируемого поверхностного образования печени при лапаротомии было описано *Sanford* в 1952 г. [109]. *Tsushimi* и др. [110] предположили, что ХК желчных протоков происходит из эктопической ткани печени (редкая аномалия, при которой ткань печени расположена за пределами печени и не связана с печенью).

Несмотря на актуальность вопроса, оптические свойства опухолей печени изучены недостаточно. В работе *van Hillegersberg* [111] представлено сравнение оптических параметров здоровых тканей печени крысы с тканями подкожно привитой аденокарциномы ободочной кишки. Образцы тканей печени и опухоли были взяты после двух месяцев, отведенных на созревание опухолей. Оптические параметры снимались на двух длинах волн: коэффициент поглощения (μ_a) – на 632.8 нм; коэффициент рассеяния (μ_s') – на 1064 нм. В итоге на 632.8 нм значение коэффициента поглощения оказалось больше у тканей печени (3.8 см^{-1}), чем у тканей опухоли (1.4 см^{-1}), тогда как на 1064 нм значение коэффициента рассеяния было больше в опухоли (180 см^{-1}), чем в печени (151 см^{-1}).

В работе *Carneiro* и др. [112] сравнение здоровых и патологических тканей печени (метастазирующая карцинома) человека в широком диапазоне показало меньшее содержание крови в патологических тканях. Авторы отмечают, что возможное объяснение состоит в том, что раковые клетки разрушают сосудистую сеть и внутреннюю архитектуру печени, обеспечивая тем самым снижение содержания крови в опухоли. Для малых длин волн было обнаружено сходство между значениями коэффициента рассеяния и приведенного коэффициента рассеяния, что означает почти нулевую анизотропию в этом диапазоне. С увеличением длины волны излучения коэффициент рассеяния уменьшается с почти 140 см^{-1} (при 200 нм) до 80 см^{-1} (при 1000 нм) в случае здоровой ткани и с почти 140 см^{-1} (при 200 нм) до 95 см^{-1} (при 1000 нм) в случае патологической ткани.

Модельная опухоль холангиокарциномы выращивается из клеточной линии *PC-1* и перевивается путём подкожной трансплантации клеточной суспензии. Зрелая опухоль включает капсулу и строму. Капсула, окружающая опухоль, представлена соединительной тканью. При гистологическом анализе холангиокарциномы выявляются опухолевые клетки овальной формы с эксцентрично расположенными ядрами. Значительная часть цитоплазмы

занята крупными вакуолями, содержащими слизь. Во внутриклеточном пространстве также наблюдаются скопления слизи. В строме опухоли, ее капсуле и вокруг нее располагаются новообразованные кровеносные сосуды капиллярного типа [113] (рис. 1.1).



а

б

Рисунок 1.1. Ультразвуковое изображение зрелой опухоли *PC-1* (а) [14], гистологическое изображение стромы опухоли *PC-1* (б) [114]

1.1.5. Оптические параметры биотканей при нагревании

Одних лишь измерений оптических свойств тканей при постоянной температуре недостаточно для понимания механизмов действия диагностических и терапевтических биофотонных процедур. На процесс взаимодействия света и ткани может влиять ряд нелинейных механизмов, сильно зависящих от динамики температуры. Во время фототермической терапии могут происходить значительные изменения оптических свойств, вызванные обратимыми или необратимыми биохимическими реакциями, обусловленными термическим воздействием. Исследование термически индуцированных изменений оптических свойств тканей важно по ряду причин, включая важность разработки математических моделей, которые надежно предсказывают результаты процедуры в самых разных условиях [114].

К обратимым изменениям, вызванным температурным воздействием, относятся сдвиги в резонансах поглощения и показателя преломления. К необратимым – биохимические изменения гемоглобина, денатурация нагретых белков [114].

Важные тканевые хромофоры, такие как вода, оксигемоглобин (HbO_2) и дезоксигемоглобин (HbH), имеют пики резонанса поглощения. Выбирая длину волны лазера на уровне или вблизи этих пиков, можно регулировать глубину проникновения света в

биоткань и, таким образом, контролировать фототермические или фотомеханические эффекты для достижения избирательной коагуляции или абляции ткани.

Давно известно, что спектры μ_a воды [115-117], HbH и HbO_2 [118, 119] с повышением температуры претерпевают изменения. Эффект тепловых изменений в спектрах μ_a воды наблюдался при прямых измерениях образцов воды и исследованиях лазерной терапии. *Schomacker* и др. [120] отметили, что глубина лазерно-индуцированного повреждения роговицы была меньше ожидаемой для длин волн короче 1.94 мкм, тогда как для более длинных волн глубина повреждения была больше, чем ожидалось. Впоследствии *Jansen* и др. [121] объяснили этот эффект, показав, что пик μ_a около 1.94 мкм смещается в сторону более коротких длин волн с повышением температуры, и разработали оптико-тепловую модель, учитывающую это динамическое изменение. *Lange* и др. [122] измерили μ_a воды при 2.01 и 2.09 мкм и обнаружили, что при 100°C значения μ_a составили лишь около двух третей значения, измеренного при 20°C.

Исследование *Barton* и др. [114] показали, что предварительный нагрев альбумина (яичный белок) изменяет длину волны, при которой для образования повреждений требуется самый низкий уровень освещенности. Это согласуется с результатами *Jansen* и др. [121] которые показали, что пик μ_a воды смещается до 1.92 мкм при 49°C. Динамические оптические свойства воды также были смоделированы с помощью численного моделирования лазерно-индуцированной коагуляции белка при облучении импульсным лазером *Ho:YAG* ($\lambda = 2.1$ мкм, длительность импульса 0.25 мс) [123].

Обратимые изменения в спектрах μ_a HbH и HbO_2 в зависимости от температуры также обуславливаются определенными механизмами. В HbH снижение μ_a с ростом температуры может быть связано с изменением населенности различных спиновых состояний атома железа [124]. В HbO_2 батохромный (красный или более длинноволновый) сдвиг пиков μ_a Q -полосы вблизи 500-600 нм может быть связан с перекрытием колебательно-возбужденных уровней основного и первого электронно-возбужденных состояний при повышенных температурах, что приводит к переходам с более низкой энергией [125].

Эффекты батохромного сдвига наблюдались в хорошо насыщенной кислородом крови. *Verkruysse* и др. [126] показали, что пропускание и отражение крови уменьшаются при докоагуляционном нагреве с применением лазерных импульсов 0.5 мс на 586 нм. *Black* и др. [127] продемонстрировали, что во время индуцированного лазером докоагуляционного нагрева пропускание света с длиной волны 532 нм увеличилось на ~20%, при длине волны 594 нм оно уменьшилось на ~25%, при длине волны 633 нм оно уменьшилось незначительно, а при длине волны 675 нм оно не изменилось. Спектроскопические данные убедительно подтверждают батохроматический сдвиг; анализ поглощающей способности HbO_2 при

комнатной температуре говорит о том, что данное изменение уменьшает поглощающую способность HbO_2 в синей зоне кривой μ_a с двумя пиками, увеличивает поглощающую способность в красной зоне и не оказывает никакого эффекта в БИК диапазоне (~700-1000 нм).

Другой эффект термически индуцированных изменений оптических свойств крови был описан в исследовании *Halldorsson* [128], который наблюдал более высокое оптическое поглощение в термически денатурированной крови, нежели в нативной оксигенированной крови при 633 и 1064 нм. Изначально причинами данного эффекта были названы термическая дезоксигенация и повышенное рассеяние денатурированной крови, однако *Barton* и др. [129] спектрофотометрически идентифицировали во время лазерной фотокоагуляции образование метгемоглобина (*metHb*) – окисленной формы гемоглобина. В данной работе также было показано, что *metHb* образуется при облучении, значительно меньшем, чем необходимо для разрушения кровеносных сосудов. Дальнейшие исследования продемонстрировали, что образование *metHb* происходит примерно при 76°C с использованием лазерного импульса 10 мс на 532 нм [130]. В отличие от батохромного сдвига, который происходит до любого необратимого изменения HbO_2 , преобразование в *metHb* происходит одновременно с термической денатурацией HbO_2 и, возможно, из-за нее, и, таким образом, является необратимым. Смоделировав отражение, *Randeberg* и др. [131] предположили, что в коже, обработанной лазером, концентрация *metHb* составляет приблизительно 21% всего гемоглобина. Поскольку было показано, что образование *metHb* происходит в видимой [129, 130] и БИК-области [125], это явление, по-видимому, относится к тепловым процессам.

В красном и ближнем ИК спектральном диапазоне поглощающая способность у *metHb* выше, чем у HbO_2 , примерно в 30 раз на 632 нм и в три раза на 1064 нм [127]. Для терапии глубоких и крупных кровеносных сосудов применялся *Nd:YAG*-лазер (1064 нм), что связано со способностью его излучения глубоко проникать в ткани. *Barton* и др. [129] показали, что парные импульсы света на 532 нм и 1064 нм при облучении, которые находятся на субтерапевтических уровнях энергии, могут использоваться для обеспечения эффективной коагуляции кровеносных сосудов. В этой процедуре выделяется достаточно света с длиной волны 532 нм, чтобы вызвать частичный тепловой переход гемоглобина в *metHb*, что, в свою очередь, вызывает сильное поглощение лазерного света с длиной волны 1064 нм. Результатом является более равномерная и полная коагуляция сосудов, чем в случаях применения лазерных импульсов 532 нм или 1064 нм по-отдельности, и снижение риска непреднамеренного повреждения, благодаря возможности снижения мощности излучения.

Комбинированный эффект батохромного сдвига и образования *metHb* может вызвать резкие изменения в абсорбции крови во время фотокоагуляции. *Black* и др. [125] изучали μ_a крови на 633 нм при облучении лазером 10 мс, 100 Дж/см², 1064 нм и наблюдали умеренный эффект из-за батохромного сдвига, за которым следовало более резкий рост из-за образования *metHb*, а так же некоторое медленное изменение по мере охлаждения крови после лазерного импульса.

Хорошо известный процесс, применяемый в медицине, – увеличение рассеяния путем термической денатурации белка лазерным излучением высокой мощности. Опубликованы многочисленные исследования, описывающие влияние термической денатурации на самые разные ткани. Некоторые из ранних работ были сосредоточены на коллагене из-за его преобладания в биологических тканях. Исследование *Pettit* и др. [132] влияния импульсного излучения эксимерного *ArF*-лазера на длине волны 193 нм обнаружило изменения в рассеянии при облучении мишеней из коллагенового геля. *Cilesiz* и др. [133] продемонстрировали, что после 300 с на водяной бане с постоянной температурой (100°C) транспортный коэффициент рассеяния (μ_s') аорты (которая в основном состоит из коллагена) увеличивается на 10-45% в видимом спектральном диапазоне, а также более, чем на 150%, в ближнем ИК-диапазоне. Исследование *Pickering* и др. [134] миокарда собак показали, что нагрев (1000 с при 75°C) приводит к четырехкратному увеличению μ_s' на длине волны 633 нм, в основном за счет уменьшения фактора анизотропии рассеяния и примерно двукратного увеличения μ_a . *Nilsson* и др. [135] измерили оптические свойства печени до и после 20-минутного воздействия температуры 58°C, индуцированного *Nd:YAG*-лазером, и обнаружили изменения, аналогичные *Pickering* [134], включая уменьшение фактора анизотропии рассеяния с 0.9 до 0.7 и увеличение μ_s' в два раза. *Germer* и др. [136] измерили оптические свойства в нормальной и метастатической печени на 850, 980 и 1064 нм до и после нагревания на водяной бане при 80°C в течение 10 минут. Результаты показали почти трехкратное увеличение μ_s' для нормальной печени и рост μ_s' на 70% в случае печени с метастазами. Увеличение светорассеяния при денатурации было изучено *Jerath* и др. [137] при фотокоагуляции сетчатки с использованием численного моделирования и фантомов ткани сетчатки. *Yaroslavsky* и др. [138] обнаружили, что нагревание различных тканей мозга в солевой ванне при 80°C в течение 2 часов вызывает увеличение коэффициентов поглощения и рассеяния. Например, было показано, что коэффициенты поглощения и рассеяния белого и серого вещества увеличиваются в 2-3 раза. В то время как эти исследования установили, что термически индуцированные динамические изменения в оптических свойствах ткани являются значительными и зависят от ткани, исследования для

выяснения последствий фототермической нелинейности в количественном отношении часто требуют использования численных моделей и/или суррогатных биологических материалов.

В работе *Nagarajan* и др. [139] усредненные по длине волны (435-630 нм) значения μ_a и μ_s' ткани печени свиньи *ex vivo* быстро возрастали при 45°C и выходили на плато при 67°C. Средние значения μ_a и μ_s' при 37°C составили 8.5 ± 3.7 и 2.8 ± 1.1 см⁻¹ соответственно.

Оптические свойства биологических тканей являются важным знанием для понимания механизмов воздействия света на биоткани как в случае клинических процедур, так и в случае биомедицинских исследований. Таким образом, точное знание количественных значений – особенно коэффициентов поглощения и рассеяния – и их спектральных вариаций имеет первостепенное значение. Измерение оптических свойств тканей может быть выполнено с использованием различных подходов, но метод инверсного добавления-удвоения (ИДУ) обычно считается стандартным методом для исследований *ex vivo*. Сильное влияние на оптические свойства биотканей могут оказывать температура и термическое повреждение. Во время лазерной терапии и диагностических процедур следует учитывать возможность изменения оптических свойств биотканей. По мере того, как оптико-тепловые модели становятся более сложными, а данные о зависящих от температуры оптических свойствах биотканей – более доступными, данные динамические эффекты будут предсказываться с все большей точностью. Такой прогресс приведет к лучшему пониманию биологических процессов, повышению эффективности клинических биофотонных устройств и ускорению развития медицинских технологий [114].

1.2. Иммерсионное оптическое просветление биотканей

1.2.1. Техника иммерсионного оптического просветления биотканей

Оптические методы диагностики и лечения различных заболеваний сегодня активно используются в медицине, что обусловлено их относительно низкой себестоимостью и безопасностью для здоровья пациентов [108, 140-142]. При этом одной из важнейших задач современной лазерной медицины остается доставка зондирующего излучения на необходимую глубину. Сложность решения данной задачи связана с ограничениями, накладываемыми сильным рассеянием биотканей излучения видимого и БИК спектральных диапазонов [29]. Один из вариантов решения данной проблемы – снижение светорассеяния биотканей путем замещения их внутритканевой жидкости иммерсионным агентом, т.е. применение так называемой техники «оптического просветления биотканей» [30-32].

Главной причиной рассеяния оптического излучения в биотканях, как известно, является различие показателей преломления их структурных компонентов и внутритканевой жидкости, либо внутриклеточных органелл и клеточной цитоплазмы [29].

В настоящее время техника оптического просветления включает несколько подходов, зависящих от конкретных научных задач: 1) простая иммерсия с использованием гиперосмотических или липофильных ОПА в виде однокомпонентных или многокомпонентных растворов с различными химическими и/или физическими усилителями; 2) иммерсия с предварительной дегидратацией и обезжириванием с использованием органических растворителей; 3) гипергидратация с использованием обезжиривания и частичной денатурации тканевых белков; и 4) заливка гидрогеля с использованием фиксации и сшивок [143]. Первый подход полезен для оптического просветления биотканей *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*, в то время как остальные подходы применяются только для микроскопического изучения изолированных образцов тканей и мелких животных *in vitro*. В свою очередь, простая иммерсия под влиянием гиперосмотических ОПА сопровождается тремя процессами: 1) дегидратацией биоткани под действием осмотических сил; 2) заменой внутритканевой жидкости просветляющим агентом; 3) диссоциацией или структурной модификацией коллагена биоткани. Первые два процесса часто проявляются одновременно. Степень вклада каждого из них в эффект оптического просветления биоткани определяется типом ОПА и свойствами просветляемой биоткани. Следствием данных процессов является относительно быстрый и довольно значительный эффект просветления, поскольку, во-первых, имеет место рост концентрации растворенных солей и белков во внутритканевой жидкости и как следствие, сближение значений показателей преломления внутритканевой жидкости и рассеивающих волокон, а во-вторых, снижение веса и толщины биоткани, ее уплотнение, т. е. упорядочение рассеивающих компонентов. Влияние третьего процесса становится очевидным лишь при длительном воздействии ОПА на биоткань [144-147].

В литературе [148] описано влияние оптического просветления кожи на эффективность диагностики злокачественных новообразований, однако возможность повышения эффективности ПФТТ модельных опухолей при оптическом просветлении кожи исследована недостаточно [13, 149, 150].

Для снижения светорассеяния при применении ПФТТ к модельным подкожно привитым опухолям необходим детальный анализ изменения оптических и структурных параметров кожи под действием тех или иных иммерсионных просветляющих агентов, а также выявление наиболее эффективного среди них.

1.2.2. Строение и оптические параметры тканей кожи

Кожа – сложный многокомпонентный орган. Толщина и особенности кожи значительно варьируются в зависимости от анатомического расположения, а также подвержены возрастным изменениям [151, 152].

Кожа включает два основных слоя: эпидермис и дерму. Внешний слой – эпидермис – представляет собой многослойный плоский эпителий. Толщина эпидермиса на всей поверхности тела человека приблизительно одинакова и равна ~100 мкм. В эпидермисе различают два слоя:

1) поверхностный роговой слой, состоящий из безъядерных сухих чешуек и содержащий 15-20 клеточных слоев. Толщина рогового слоя составляет примерно 20 мкм, на ладони и подошве – до 1 мм;

2) живой эпидермис, содержащий 10-20 слоев кератинизированных эпителиальных клеток, обеспечивающих образование рогового слоя. Толщина эпидермиса определяется развитостью его рогового слоя. Основным типом клеток эпидермиса (эпидермоцитов) являются кераноциты, производящие кератин и составляющие 85% всех клеток эпидермиса [152].

Под эпидермисом находится дерма – плотная волокноно-эластичная ткань. Она составляет основную массу кожи. Дерма отделена от эпидермиса базальной мембраной и без резких границ переходит в подкожную жировую клетчатку. Дерма делится на две анатомические области. Сосковидная дерма является наружной частью соединительной ткани дермы, примыкающей к эпидермису. Сосковидная дерма содержит кровеносные сосуды и лимфатические сплетения. Толщина ее равна приблизительно 100 мкм. Вторым слоем дермы, составляющим её основную часть и лежащим под сосковидной дермой, является ретикулярная дерма. Это достаточно плотная относительно бесклеточная соединительная ткань толщиной 1-2 мм [152].

По своей структуре дерма кожи относится к фиброзным тканям. В ее состав входят коллагеновые волокна (примерно 70% сухого веса кожи), упакованные в плоские параллельные пучки (фибриллы, диаметр 40-150 нм, в среднем 60 нм [153]), которые погружены в аморфное внутритканевое вещество, содержащее протеогликаны, протеины, протеин-полисахаридные комплексы и воду. Эластин – второй по весу компонент дермы, обеспечивающий эластичность ткани, а также связь с волосяными фолликулами и кровеносными сплетениями сосудов [152].

Под слоем дермы располагается жировой слой, состоящий из белых жировых клеток – адипоцитов, характеризующихся крупным размером (до 120 мкм в диаметре). Жировые клетки окружены клеточными мембранами, которые снаружи соединяются со структурой

рыхлой межклеточной субстанции, содержащей агрофильные волокна, фиброциты, лимфоидные элементы и тучные клетки. Белый жир составляет основу жировой ткани и распределяется по всему телу [152].

С точки зрения оптики, кожа – это поглощающая среда с ярко выраженными рассеивающими свойствами. Меланин, входящие в состав эпидермиса липиды и содержащийся в сосудистом сплетении гемоглобин крови – это основные компоненты кожи, определяющие ее поглощающие свойства в видимом и БИК спектральных диапазонах. Поглощающая способность жировой ткани связана с наличием в ней воды, липидов, а также пигмента β -каротина. Рассеяние обусловлено главным образом фиброзной структурой дермы кожи, хотя определенный вклад вносит и эпидермис, основными рассеивателями в котором являются митохондрии клеток. В дерме рассеяние света происходит на коллагеновых волокнах, а также на узлах, образованных сплетением отдельных волокон [152].

1.2.3. Иммерсионное оптическое просветление как метод управления оптическими параметрами биотканей

Известно, что значения коэффициента рассеяния (μ_s) и фактора анизотропии рассеяния (g) зависят главным образом от рассогласованности показателей преломления компонентов клеток, из которых состоит ткань. К таким компонентам относятся клеточная плазматическая мембрана, ядро, митохондрии и другие органеллы, а также клеточная цитоплазма и внеклеточная жидкость. В случае фиброзных тканей (например, дермы, соединительной ткани стенки сосудов, волокнистых компонентов мышечной ткани и молочной железы, сухожилий, хрящей и др.) рассеяние обуславливается различием показателей преломления внутритканевой жидкости (или цитоплазмы) и протяжённых цепочек склеропротеинов (коллагеновых, эластиновых и ретикулиновых волокон) [154, 155]. Органеллы животных клеток содержат приблизительно равное количество нуклеиновых кислот и протеинов, поэтому значения их показателей преломления расположены в относительно узком интервале от 1.38 до 1.41 [156]. К примеру, показатель преломления ядра составляет 1.39 [157], а цитоплазмы – 1.35-1.37 [155]. По сравнению с базовым веществом цитоплазмы плотность протеинов и липидов в рассеивающих частицах (протеиновых фибриллах, глобулах и мембранах) более высока и как следствие, данные частицы имеют более высокий показатель преломления: 1.39-1.47 [158]. Значения показателя преломления волокон соединительной ткани зависят от степени гидратации коллагена (основного их компонента) и находятся в диапазоне 1.41-1.53 [159]. Показатели преломления внутритканевой жидкости и плазмы крови в зависимости от длины волны равны приблизительно 1.33-1.35 [155, 160]. В крови основными рассеивателями являются эритроциты – безъядерные клетки, содержащие

70% воды, 25% гемоглобина, а также 5% липидов, солей, сахаров, протеинов и энзимов [161]. У обезвоженных эритроцитов значение показателя преломления на длине волны 550 нм лежит в диапазоне 1.61-1.66 [162]. Показатель преломления раствора гемоглобина с концентрацией 32 г/л, являющейся типичной концентрацией гемоглобина в эритроците, равно примерно 1.42 [163]. В случае крови человека в зависимости от длины волны это значение составляет 1.36-1.40 [155].

Одним из достаточно простых и эффективных методов увеличения качества изображений внутритканевых структур и повышения точности спектроскопической информации, получаемой от глубоко расположенных слоёв биоткани, является временное снижение светорассеяния в биоткани [154].

В литературе предлагаются различные физические и химические способы воздействия на биоткани, дающие возможность управлять их рассеивающими свойствами. Наиболее распространёнными являются: надавливание (или компрессия) [164], растягивание [165], дегидратация [166], нагрев [167], иммерсия с помощью биологически совместимых веществ [168-170], а также фотохимическое [171, 172] и фототермическое [172] воздействие.

Иммерсионное оптическое просветление является одним из наиболее простых и достаточно безопасных методов снижения рассеяния соединительной биоткани. Результаты недавних исследований, полученные путем комбинирования техники оптического просветления биотканей с другими распространёнными оптическими методами визуализации (лазерной спекл-контрастной визуализацией [168], ОКТ [169], микроскопической визуализацией [173], ультрамикроскопией [174] и другими), продемонстрировали перспективность их совместного применения не только с целью структурной и функциональной визуализации биотканей *in vitro* [174-176] в высоком пространственном разрешении, но и в задачах оптической визуализации и диагностики *in vivo* [168, 177].

Исследование кинетики изменения рассеивающих свойств биотканей, испытывающих воздействие иммерсионных агентов, сделало возможным разработку методики оценки коэффициентов диффузии агента в биотканях, а также коэффициентов проницаемости биотканей [169, 178, 179]. С помощью данных методик были определены скоростные характеристики процесса диффузии глюкозы и других агентов в тканях глаза [178, 179], кожи [180], твёрдой мозговой оболочки [181] и других биотканях [182]. Мониторинг диффузии ОПА с высоким разрешением по времени и глубине позволяет дифференцировать здоровые и патологически изменённые биоткани [183].

Оптическое иммерсионное просветление, как уже описывалось выше, основывается на пропитывании (иммерсировании) ткани биосовместимым химическим агентом, обладающим

достаточно высоким показателем преломления, чтобы, проникая во внутритканевую жидкость биоткани, иметь возможность согласовать показатели преломления рассеивателей и окружающей их среды. Обычно оптический просветляющий агент (ОПА) обладает гиперосмотическими свойствами [184]. Данным условиям удовлетворяют многие химические вещества, применяющиеся в косметологии в составе различных препаратов.

Применяемые при оптическом просветлении иммерсионные агенты можно условно разделить на многоатомные спирты (глицерин, этиленгликоль, полиэтиленгликоли (ПЭГ), пропиленгликоль, полипропиленгликоль, комбинированные смеси на основе полипропиленгликолей и полиэтиленгликолей, маннит, сорбит, ксилит и др.) [146, 181, 185-194], растворы сахаров (глюкозы, фруктозы, рибозы, сахарозы и др.) [178, 181, 195-197], органические кислоты (олеиновая, линолевая, салициловая кислоты) [186, 198-202], масла [203], органические растворители (диметилсульфоксид (ДМСО) [186, 202, 204, 205] и рентгеноконтрастные вещества (*Verografin*TM, *Trasograf*TM, *Hyraque*TM, *Omnipaque*TM и др.) [32, 206-208]. Все эти ОПА используются по отдельности или в различных комбинациях для повышения проницаемости биоткани. В случае исследования *in vivo* и *ex vivo*, биологически безопасные растворители, такие как этанол, азон, тиазон, ДМСО, и пропиленгликоль в небольшой концентрации также включаются в состав ОПА [200, 202, 204, 209, 210]. После удаления ОПА путем диффузии физиологического раствора (*ex vivo*) или естественной диффузии воды из окружающих тканей (*in vivo*) структура, функции и оптические свойства биоткани полностью восстанавливаются [146, 198, 211-213].

Процесс оптического просветления фиброзных биотканей может включать изменения в молекулярной структуре основных компонентов этих биотканей – коллагеновых волокон, в том числе обратимую растворимость коллагена в сахарах и многоатомных спиртах. Индуцированная ОПА дестабилизация коллагеновой структуры может приводить к дополнительному снижению оптического рассеяния в биотканях благодаря уменьшению размеров основных рассеивателей [177, 214].

Коллагеновые волокна имеют сложную самоорганизующуюся структуру и являются основными рассеивающими центрами в биотканях [145]. Их можно обнаружить в различных биотканях, особенно в фиброзных, таких как дерма кожи и склера глаза. Установлено, что водородная связь является основной связывающей силой между тройными спиралями коллагена. ОПА с множественными гидроксильными группами обладают большим отрицательным зарядом, который дестабилизирует высокоупорядоченную структуру коллагена вплоть до ее диссоциации. Поскольку водородные связи в тройных спиралях коллагена относятся к нековалентному взаимодействию, то эффект, оказываемый ОПА на диссоциацию коллагена, может быть легко обратим [177].

Оптическое просветление биотканей *in vivo* представляет более сложный процесс, поскольку в данном случае значительную роль начинают играть дополнительные факторы. К этим факторам относится, с одной стороны, физиологическая температура, способствующая ускорению диффузии ОПА, а с другой стороны, метаболическая реакция живой ткани, направленная на вымывание ОПА [154] и транспорт воды в область воздействия. Эти факторы могут существенно изменять кинетические характеристики и значительно влиять на эффект просветления [168, 177, 180, 215]. В живых тканях относительный показатель преломления является функцией физиологического или патологического состояния биоткани. В зависимости от особенностей состояния биоткани значения показателей преломления рассеивателей и базового вещества могут увеличиваться или уменьшаться, что в свою очередь будет способствовать увеличению или уменьшению рассеяния света в биоткани [154, 155]. Кроме того, введение некоторых ОПА в биоткань, в частности глицерина и глюкозы, оказывает ощутимое влияние на микроциркуляцию в ткани, вызывая временный стаз микрососудов [211].

1.2.4. Глицерин как иммерсионный просветляющий агент

При исследовании оптического просветления биотканей актуальным остается вопрос выбора наиболее эффективного ОПА. Важное место в списке наиболее эффективных ОПА занимают растворы глицерина разных концентраций, благодаря их эффективности, доступности и биосовместимости [31, 32, 144, 145, 155, 211]. Глицерин был открыт *Scheele* в конце XVIII века в результате смешивания оливкового масла с окисью свинца и нагревания [216]. С тех пор области использования глицерина постоянно расширяются, и в настоящее время он широко применяется в различных сферах от криобиологии [217] до химического производства [218]. Глицерин также широко используется в фармацевтической, косметической и пищевой промышленности, а в последнее время интерес к нему возрос в связи с его потенциальным использованием как растворителя в зелёной химии [219]. Несмотря на достаточно длинную историю применения глицерина, изучение физико-химических свойств как чистого глицерина, так и его водных растворов продолжается до сих пор [220, 221-223].

Глицерин является трехосновным спиртом. В нормальных условиях он представляет собой нетоксичную, вязкую, сладкую, бесцветную жидкость без запаха. Химическая формула глицерина $C_3H_8O_3$. Молекулярная масса составляет 92.1 [224].

В таблице 1.1 и на рисунке 1.2 представлены концентрационные зависимости показателя преломления и вязкости водных растворов глицерина. Концентрационная зависимость показателя преломления построена по экспериментальным данным,

представленным в работе [225] и интерполирована с помощью линейной функции. Концентрационная зависимость вязкости построена по энциклопедическим данным [226] и интерполирована с помощью экспоненциальной функции.

Таблица 1.1. Показатели преломления использованных в качестве ОПА водных растворов глицерина

ОПА	Показатель преломления на длине волны 589 нм при 20°C	Вязкость водных растворов глицерина при 20°C, мПа·сек
Глицерин 20%	1.363	1.76
Глицерин 30%	1.376	2.50
Глицерин 40%	1.391	3.72
Глицерин 50%	1.403	6.0
Глицерин 60%	1.420	10.8
Глицерин 70%	1.431	22.5
Глицерин 80%	1.443	60.1
Глицерин 85%	1.452	109
Глицерин 90%	1.459	219
Глицерин 100%	1.472	1410

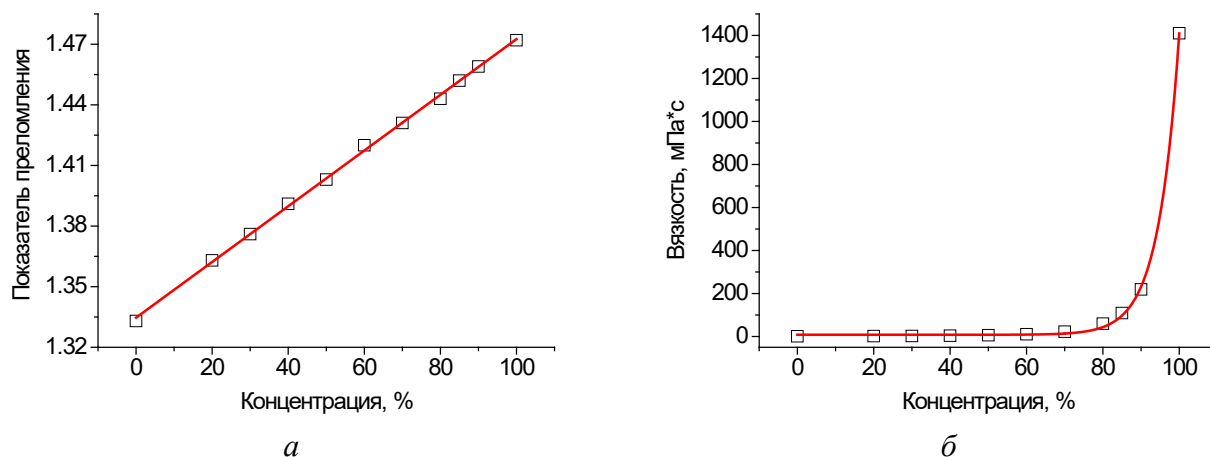


Рисунок 1.2. Концентрационная зависимость показателя преломления (а) и вязкости (б) водных растворов глицерина на длине волны 589 нм при температуре 20°C

Большое внимание исследователи уделяют взаимодействию глицерина и его водных растворов с кожей [227-230]. Установлено, что глицерин может быть использован для увлажнения кожи, поскольку является гигроскопичным веществом, способным удерживать воду в роговом слое эпидермиса. Компьютерное моделирование и экспериментальные исследования взаимодействия молекул воды и глицерина показали наличие трёх слоёв молекул воды с различной степенью водородной связи, окружающих молекулу глицерина [231]. В коже молекулы воды удерживаются сильной водородной связью между атомами *H* воды и атомами *O* в *ОН*-группах глицерина [222].

Многие работы посвящены изучению влияния глицерина и его водных растворов на оптические свойства кожи [225, 232-234]. Показано, что глицерин способствует снижению рассеивающих свойств кожи за счёт осмотической дегидратации и замены раствором глицерина внутритканевой жидкости, приводящих к выравниванию показателей преломления компонентов кожи. Глицерин может вызывать также диссоциацию коллагена биоткани, однако данный эффект наблюдается при длительном (порядка 24 часов) воздействии глицерина на ткань [145].

Применение глицерина в качестве ОПА открывает путь для терапии тканей, скрытых под костями, хрящами, сухожилиями и т.д. [154, 206]. Нанесение глицерина на поверхность кожи человека обеспечивает возможность мониторинга *in vitro* и *in vivo* при помощи ОКТ субэпидермальной полости, диагностики злокачественных образований и управления рассеивающими свойствами кожи [235]. *Cicchi* и др. [173] представили первые работы по увеличению глубины зондирования при использовании техники двухфотонной микроскопии с помощью применения ОПА. Дерму человека подвергали воздействию гиперосмотических агентов (глюкозы, глицерина и полипропиленгликоля) в течение нескольких минут, и глицерин показал лучший, но наиболее медленный результат просветления (относительный контраст 16.3 на глубине 20 мкм). *Huang* и др. [236] исследовали влияние глицерина на кожную ткань свиней *in vitro* методом микроспектроскопии комбинационного рассеяния (КР) во временном интервале от 0 до 75 мин. Было обнаружено, что применение глицерина значительно улучшило глубину зондирования. Поскольку было показано, что растворы глицерина с более высокими концентрациями лучше обеспечивают просветление тканей, интенсивность полосы 1003 см^{-1} может быть увеличена для более эффективного обнаружения рака [237].

Schulmerich и др. [238] впервые продемонстрировали спектроскопическую диффузную томографию КР при оптическом просветлении и получили КР изображения *in vivo* костной ткани собаки, обработанной глицерином. Также изучалось оптическое просветление с помощью глицерина применительно к костной ткани мыши [239]. Было показано, что глицерин уменьшает шум в необработанных спектрах.

В работе [240] изучалось оптическое иммерсионное просветление кости черепа под действием безводного глицерина. Показано, что транспортный коэффициент рассеяния поверхностных слоев ткани образца кости черепа снижается примерно на 25% в диапазоне длин волн 1400-2000 нм после 1 часа воздействия глицерина. Лазерную спекл-контрастную визуализацию (ЛСКВ) использовали для визуализации мозгового кровотока в мозге новорожденных мышей при местном применении ОПА в области родничка. Эти результаты

продемонстрировали эффективность водного 60% раствора глицерина для исследования мозгового кровотока у новорожденных мышей без удаления скальпа и костей черепа [241].

Зависимость эффективности оптического просветления тканей от концентрации глицерина была исследована в работах [242-244]. *Carneiro* и др. изучали свободную/связанную воду в тканях с использованием 20-60% растворов глицерина [242] и оценивали кинетику оптических свойств колоректальной мышцы под действием 40% глицерина, чтобы описать механизмы дегидратации и согласования показателей преломления [245]. *Son* и др. [243] обнаружили, что оптимальная концентрация глицерина для максимизации оптического просветления составляет 70%. Эффективность глицерина была количественно оценена для концентраций от 50 до 90% с использованием ОКТ для оценки рассеяния света и ультразвуковой визуализации для оценки степени диссоциации коллагена. *Yoon* и др. [244] определили, что 70% является оптимальной концентрацией раствора глицерина для комбинированного метода, в котором используются как микроиглы, так и сонофорез для дальнейшего улучшения чрескожной доставки ОПА.

Скорость диффузии глицерина в тканях может служить биомаркером для дифференциации нормальных и патологических тканей, что было продемонстрировано в работе [246], содержащей сравнительное исследование (в случае здоровых тканей и в случае аллоксанового диабета) диффузии 70%-глицерина в кожу и миокард крыс *ex vivo*.

Хотя глицерин в целом нетоксичен, длительное воздействие высококонцентрированного раствора глицерина на биоткань может оказать негативное влияние, проявляющееся в местном гемостазе, сжатии и даже некрозе тканей. Местное нанесение или инъекции глицерина в кожу также влияют на микроциркуляцию крови в дерме. Применяемый в качестве ОПА глицерин диффундирует в область сосудистой сети, частично проникает в стенки сосудов, взаимодействует с эндотелием и клетками крови, приводя к локальному осмотическому стрессу и последующей дегидратации тканей и клеток [247]. Было обнаружено, что глицерин оказывает обезвоживающее действие на сосудистую сеть кожи, но данные изменения обратимы путем гидратации [248]. Также экспериментально исследован переход от оксигенированной формы гемоглобина к дезоксигенированной, связанный с локальным гемостазом при воздействии на кожу крысы *in vivo* 84.4%-го раствора глицерина [211]. Кроме того, было обнаружено, что местное нанесение 75%-го раствора глицерина на микрососуды брыжейки крысы *in vivo* в течение 1-3 с приводит к снижению скорости кровотока во всех микрососудах, а в течение 20 с – к остановке кровотока. Результаты показали, что после воздействия глицерина скорость кровотока в сосудах восстанавливалась, а новые сосуды развивались спустя 2 дня [247]. *Zhu* и др. [249] использовали метод ЛСКВ для исследования долгосрочных и краткосрочных эффектов

глицерина и продемонстрировали, что прямое местное воздействие глицерина на кровеносные сосуды в хориоаллантаоисной мембране цыплят способно снизить скорость кровотока. Также наблюдалась закупорка кровеносных сосудов. Многолетние наблюдения показывают, что глицерин замедляет развитие кровеносных сосудов. Восстановление кровотока в той или иной степени возможно, но только в том случае, если кровеносный сосуд не был закупорен полностью. *Мао* и др. [250] исследовали влияние 30%-го раствора глицерина на дермальные кровеносные сосуды лоскута кожи крысы также с помощью ЛСКВ. Было установлено, что скорость кровотока изначально снижалась и начинала восстанавливаться спустя 16 мин.

Было обнаружено, что глицерин способен вызывать изменение морфологии тканей кожи за счет диссоциации коллагеновых волокон [214, 251]. Механизм действия глицерина на молекулярном уровне приводит к нарушению порядка в организации фибрилл, что впервые было исследовано *Yeh* и др. [214] с помощью многофотонной микроскопии. Изменение организации и размера волокон коллагена может привести к значительному снижению рассеяния света тканями. Также было показано, что 75% раствор глицерина не вызывает потерю организации волокнами коллагена [146]. Влияние чистого глицерина на кожу мыши на спине животного было исследовано с помощью конфокальной сканирующей лазерной микроскопии [252]. Отражение, измеренное на длине волны 488 нм, продемонстрировало, что глицерин значительно увеличивает анизотропию рассеяния дермы (с 0.7 до 0.99) при небольшом изменении коэффициента рассеяния. Было высказано предположение, что эффект просветления, обусловленный влиянием глицерина, связан со снижением углового отклонения рассеяния. Более того, увеличение анизотропии рассеяния при незначительном изменении коэффициента рассеяния должно вызывать увеличение размера рассеивающих частиц, что означает набухание коллагеновых волокон в дерме. В работе [241] авторы сообщили, что нанесение 85% водного раствора глицерина на пучок сухожилий хвоста крысы существенно изменяет не только рассеивающие свойства ткани, но и ее двойное лучепреломление. Данные изменения структуры коллагена могут быть необратимыми [214].

1.3. Применение техники оптического просветления в задачах фототермической терапии опухолей

Ранее исследования оптического просветления при комбинации использовании ОПА и лазерного излучения различных длин волн (CO_2 -лазер и *Nd:YAG*-лазер, работающий на длинах волн 532 и 1064 нм, диодный лазер, работающий на длине волны 980 нм и источники широкополосного интенсивного импульсного света, работающие в диапазонах 650–1200,

525–1200 и 470–1400 нм) и интенсивности были представлены в работах [253, 254], в которых нагрев поверхности кожи *in vivo* применялся до нанесения ОПА. Результаты исследования кожи на облученных участках с помощью оптической когерентной томографии (ОКТ) показали увеличение глубины проникновения света до 42% [253]. На основе измерения спектров отражения до и после облучения показано улучшение трансэпидермального проникновения ОПА в 8-9 раз по сравнению с необлученной кожей [254]. Впервые комбинированное применение ПФТТ подкожных опухолей и оптического просветления кожи было предложено в работе [13]. Однако сравнительного исследования влияния ОПА на результат ПФТТ не проводилось. Генерация и распределение тепла в трехслойной модели: кожа, жировая ткань и мышца, облученной диодным лазером ближнего инфракрасного диапазона с длиной волны 1064 нм до и после нанесения глицерина, были смоделированы *Youn* [255]. В работе было установлено, что применение ОПА во время лазерного воздействия может уменьшить тепловыделение на поверхности кожи и стимулировать глубокое нагревание тканей. Моделирование было подтверждено экспериментальными результатами на образцах ткани *ex vivo* и животных *in vivo* [255, 256].

Исследование термически индуцированных изменений оптических свойств опухолевых тканей при ПФТТ и при оптическом просветлении поверхностных тканей важно как для оценки необходимой дозы вводимых наночастиц и лазерного облучения, так и для разработки математических моделей, которые могут надежно предсказать результаты процедуры ПФТТ в различных условиях. Несмотря на многочисленные исследования оптических параметров кожи, крови и опухолей при их нагреве [257-260], исследования изменения оптических параметров *in vivo* в процессе нагрева в присутствии ОПА, а также при ПФТТ с оптическим просветлением практически не проводились.

Выводы:

Анализ литературы показал, что, во-первых, оптические параметры опухолевой ткани могут значительно изменяться под действием температур, что может быть маркером при оценке эффективности гипертермии опухоли в результате проведения ПФТТ и способствовать корректировке вводимой дозы наночастиц и лазерного облучения. Однако такие данные в настоящее время практически отсутствуют для модельных опухолей, в частности, моделей холангиокарциномы, используемых при разработке методик ПФТТ.

Во-вторых, показано, что оптическое просветление кожи при ПФТТ может увеличить глубину проникновения света в опухоль и тем самым повысить эффективность процедуры. Однако данный подход также недостаточно разработан. При этом важным является

исследование влияния иммерсионных агентов на оптические, геометрические и весовые параметры кожи и разработка методики увеличения их проникновения в ткань.

Результаты, представленные в главе, частично опубликованы в следующих обзорных работах:

1. Genina E., **Genin V.D.**, Zhu J., Bashkatov A., Zhu D., Tuchin V. Traditional and innovative optical clearing agents / Chapter 3 in Handbook of Tissue Optical Clearing. New Prospects in Optical Imaging. Edited by V. Tuchin, D. Zhu, and E. A. Genina. Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group LLC, 2022, pp. 67-91.
2. Bashkatov A.N., Berezin K.V., Dvoretzkiy K.N., Chernavina M.L., Genina E.A., **Genin V.D.**, Kochubey V.I., Lazareva E.N., Pravdin A.B., Shvachkina M.E., Timoshina P.A., Tuchina D.K., Yakovlev D.D., Yakovlev D.A., Yanina I.Yu., Zhernovaya O.S., Tuchin V.V. Measurement of tissue optical properties in the context of tissue optical clearing // Journal of Biomedical Optics. - Vol. 23. – No. 9. – P. 091416. – 2018.
3. Bucharskaya A., Khlebtsov N., Khlebtsov B., Maslyakova G., Navolokin N., **Genin V.**, Genina E., Tuchin V. Photothermal and photodynamic therapy of tumors with plasmonic nanoparticles: challenges and prospects // Materials. - Vol. 15. – No. 4. – P. 1606. – 2022.

ГЛАВА 2. Развитие метода плазмонно-резонансной фототермической терапии

2.1. Исследование зависимости температурной кинетики нагрева опухолей от степени их васкуляризации и дозировки ЗНС

2.1.1. Методика исследования зависимости температуры нагрева опухолей от дозировки и способа введения ЗНС

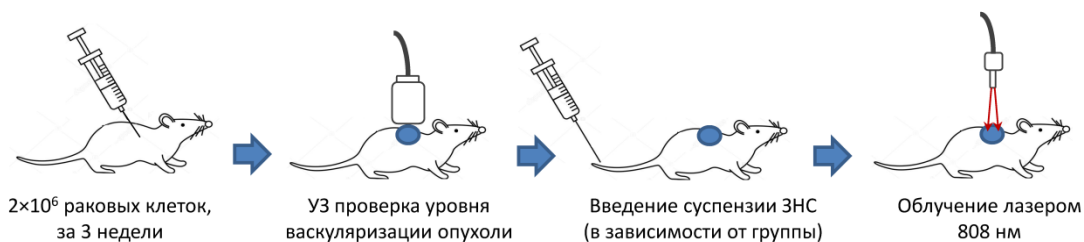
Объектом исследования стали 40 лабораторных беспородных крыс-самцов с массой тела в среднем 200 г, полученных из вивария Центра коллективного пользования СГМУ им. В.И. Разумовского. Животные содержались в стандартных условиях вивария при фиксированном световом режиме. Работу с животными проводили в соответствии с правилами Европейской конвенции о защите позвоночных животных для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986), «*International guiding principles for biomedical research involving animals*» [261] и с рекомендациями комитета по этике ФГБОУ ВО Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава РФ (протокол № 6 от 06.02.2018 г.).

Экспериментальная модель холангиокарциномы крысы линии *PC-1* была получена методом подкожной инъекции в область лопатки раковых клеток (2×10^6 клеток/0.5 мл раствора Хэнкса), полученных из банка опухолевых штаммов ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России. Спустя 3 недели, когда объем опухолей достигал приблизительно 3 см³, опухоли подвергались проверке уровня васкуляризации при помощи ультразвуковой системы *Voluson E8 Expert (GE Healthcare, США)*, работающей в доплеровском режиме (частота 7.2 МГц).

Оценка степени васкуляризации опухоли была проведена стандартным методом [262], основанным на анализе индекса сопротивления (*RI*) кровеносных сосудов опухоли, определяемого как разница между максимальной систолической скоростью (*PSV*) и конечной диастолической скоростью (*EDV*), деленной на максимальную систолическую скорость: $RI = (PSV - EDV) / PSV$. Значения *PSV* и *EDV* определялись при доплерографии. Выявлено, что на определенной стадии роста ($RI \leq 0.3$) в опухоли появляются развитые афферентные сосуды с повышенной скоростью кровотока.

По степени развития опухоли животные были разделены на две партии: 1) со слабой васкуляризацией опухолей (24 животных с $RI > 0.3$); 2) с достаточной васкуляризацией (16 животных с $RI \leq 0.3$). Внутри этих партий животные были случайным образом разделены на шесть и четыре группы соответственно (всего 10 групп, по 4 крысы в каждой группе). Перед облучением шерсть с поверхности кожи над опухолью удалялась, и крысам восьми групп внутривенно вводилась суспензия ЗНС.

Схема подготовки животных к процедуре ПФТТ приведена на рисунке 2.1а.



а

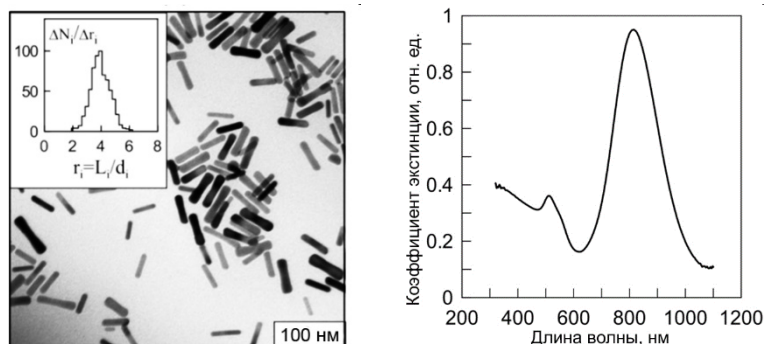


б

в

Рисунок 2.1. Схема подготовки животных к процедуре ПФТТ (а), фотографии экспериментальной установки во время ПФТТ (б), сразу после ПФТТ (в)

Золотые наностержни (ЗНС), задействованные в экспериментах, был синтезированы и функционализированы тиолированным полиэтиленгликолем (молекулярный вес 5000, *Nektar*, США) с применением метода, описанного в работах [7, 263]. Геометрические параметры ЗНС были определены методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ, *Libra-120*, *Carl Zeiss*, Германия) и составили 41 ± 8 нм в длину и 10 ± 2 нм в диаметре (рис. 2.2).



а

б

Рисунок 2.2. ТЭМ-изображение ЗНС и их распределение по размерам (а) и спектр экстинкции суспензии ЗНС с оптической плотностью 2 (б). На вставке показана гистограмма числового распределения частиц $\Delta N_i/\Delta r_i$ по осевым отношениям $r_i=L_i/d_i$, где L – длина частицы, d – диаметр частицы, со средним значением $r_i=4.03 \pm 0.7$.

Для исследования были приготовлены суспензии ЗНС с концентрациями 800 и 400 мкг/мл, что соответствует оптической плотности 40 и 20 соответственно на длине волны 810 нм. Для повышения температуры нагрева, животным из групп 5 и 6 была однократная введена двойная доза суспензии ЗНС (1 мл, 800 мкг/мл) за 48 и 24 часа до облучения, соответственно. Группы животных и введенные им дозы ЗНС описаны в таблице 2.1.

Таблица 2.1. Описание групп животных, участвовавших в экспериментах (по 4 крысы в каждой группе).

Номер группы	Режим введения суспензии ЗНС	Полная доза суспензии ЗНС, мкг
<u>Партия 1. Слабая васкуляризация опухолей</u>		
1	Облучение без введения ЗНС	-
2	Однократное введение (1 мл, 400 мкг/мл) за 24 часа до облучения	400
3	Двукратное введение (по 1 мл, 400 мкг/мл) за 48 и 24 часа до облучения	800
4	Трехкратное введение (по 1 мл, 400 мкг/мл) за 72, 48 и 24 часа до облучения	1200
5	Однократное введение (1 мл, 800 мкг/мл) за 48 часов до облучения	800
6	Однократное введение (1 мл, 800 мкг/мл) за 24 часа до облучения	800
<u>Партия 2. Достаточная васкуляризация опухолей</u>		
7	Облучение без введения ЗНС	-
8	Однократное введение (1 мл, 400 мкг/мл) за 24 часа до облучения	400
9	Двукратное введение (по 1 мл, 400 мкг/мл) за 48 и 24 часа до облучения	800
10	Трехкратное введение (по 1 мл, 400 мкг/мл) за 72, 48 и 24 часа до облучения	1200

Для облучения опухоли использовали диодный лазер *LS-2-N-808-10000 (Laser Systems Ltd., Россия)* с длиной волны излучения 808 нм. Облучение проводили в течение 15 мин при мощности 2 Вт. Плотность мощности составляла около 2.3 Вт/см². Температурный контроль нагрева опухоли проводился с помощью ИК-тепловизора *IRI4010 (IRYSYS, Великобритания)* с интервалом 30 с. Влияние рассеянного лазерного излучения на результаты измерения температуры исключалось, так как инфракрасный формирователь изображений чувствителен в спектральном диапазоне от 8 до 14 мкм. Изображения экспериментальной установки и опухолей животных из контрольной и экспериментальной групп представлены на рис. 2.1б-е. Перед всеми процедурами крысы подвергались анестезии препаратом *Zoletil 50 (Virbac, Франция)* в дозе 0.05 мг/кг.

Гистологические исследования образцов тканей опухоли проводились в Центре коллективного пользования СГМУ им. В.И. Разумовского в контрольной группе и через 72 ч. после проведения процедуры ПФТТ. Образцы фиксировали в 10% растворе формалина, подвергали стандартной спиртовой проводке и окрашивали гематоксилином и эозином. Для морфометрического исследования микрососудистой плотности в ткани опухоли использовали систему анализа цифровых изображений Микровизора медицинского *μVizo-103 ЛОМО*. Для определения микрососудистой плотности в опухоли вычисляли суммарную площадь сосудов в поле зрения гистологического препарата, подсчет проводился в 10 полях зрения при увеличении 246.4. Иммуногистохимическое окрашивание ткани опухоли проводили с антителами к васкулоэндотелиальному фактору роста *VEGFA* (*Abcam*, Великобритания) с использованием безбиотиновой системы детекции *REVEAL Polyvalent HRP-DAB Detection System* (*Spring Bioscience*, США), к маркерам пролиферации *Ki-67* и апоптоза *BAX* (*Abcam*, Великобритания).

2.1.2. Анализ зависимости температуры нагрева опухолей от степени их васкуляризации, дозировки ЗНС и способа их введения

На рисунке 2.3 представлены типичные гистологические изображения тела опухоли с различной степенью васкуляризации.

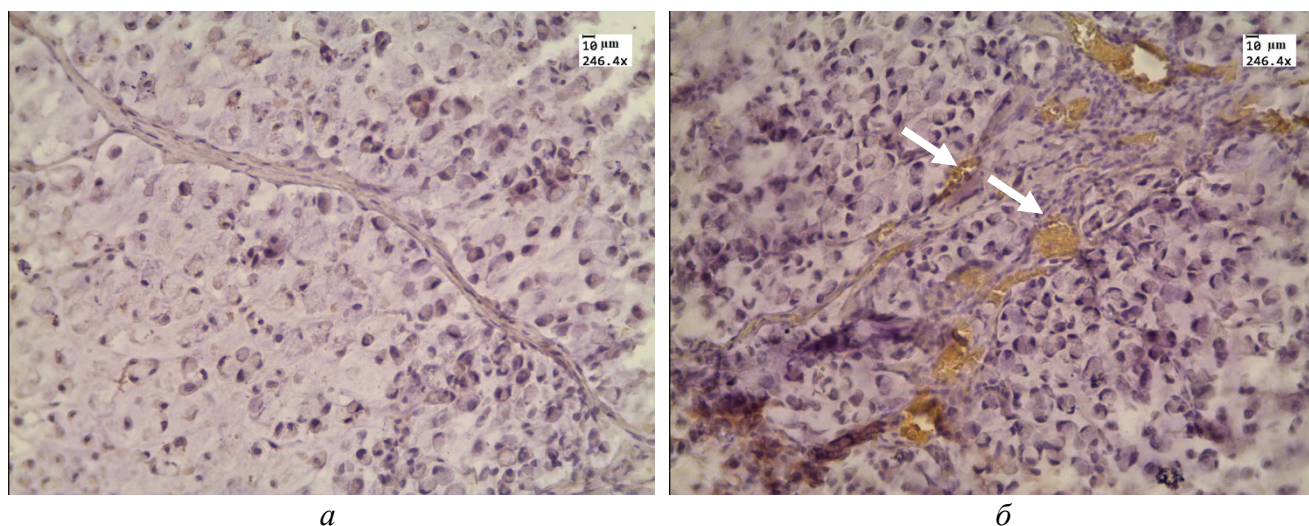


Рисунок 2.3. Примеры гистологических изображений холангиокарциномы печени: опухоль с низкой степенью васкуляризации (а) и высокой степенью васкуляризации (б). Иммуногистохимическое окрашивание с антителом к *VEGFA*. Стрелками показаны микрососуды.

Кинетика нагрева экспериментальных опухолей и граничащих с ними тканей представлена на рисунке 2.4. Как видно из рисунка, лазерное облучение опухолей без

предварительного введения ЗНС в группах 1 и 7 вызывало незначительное увеличение температуры поверхности опухоли приблизительно до 40°C вне зависимости от степени васкуляризации опухоли. Однократное внутривенное введение суспензии ЗНС при слаборазвитом сосудистом кровотоке также не вызывало роста температуры выше 40°C при лазерном облучении (группа 2). На наш взгляд, это связано с тем, что накопление достаточного количества частиц в опухолях не происходит в связи с низкой васкуляризацией опухолевых тканей. Данное предположение подтверждается тем, что средняя температура поверхности кожи над опухолью в группе 8 (с хорошо развитым сосудистым кровотоком) при такой же дозе, как и в группе 2 (со слабо развитым сосудистым кровотоком), достигла значения $49\pm 4^\circ\text{C}$, что объясняется большим накоплением частиц в ткани опухоли.

Помимо этого, хорошо видно, что удвоение и утроение дозы (группы 3-6) практически не влияет на рост температуры. В этих группах максимальная температура достигла в среднем значений от 47°C до 52°C, что позволяет заключить, что в данных группах накопление достаточного количества частиц в опухолях не происходило в связи с низкой васкуляризацией опухолевых тканей.

Заметим, что в группе 9 наблюдалось увеличение температуры до $59\pm 10^\circ\text{C}$ при той же введенной дозе суспензии ЗНС, что и в группах 3, 5 и 6. Данная группа отличалась от групп 3, 5 и 6 более высокой васкуляризацией опухолевых тканей, поэтому в группе 9 произошло достаточное накопление частиц для значительного нагрева опухолей.

Группа 10 продемонстрировала увеличение температуры в области опухоли в среднем до 68°C, что, по нашему мнению, связано с максимальным накоплением ЗНС как в связи с высокой суммарной дозой введенной суспензии, так и с высокой васкуляризацией опухолевых тканей. Это предположение подтверждается данными работы [264], в которой показано, что максимальное накопление наностержней в опухоли наблюдается при трехкратном введении наночастиц.

В работе [265] было показано, что прямое внутриопухолевое введение суспензии ЗНС с концентрацией 400 мкг/мл и последующее облучение опухолей лазерным излучением на длине волны 808 нм привело к увеличению температуры в зоне нагрева до $65\pm 5^\circ\text{C}$. При данном способе введения в опухолях аккумулировалось максимальное количество частиц. Поскольку в наших экспериментах (группы 2-6, 8-10) введение суспензии ЗНС проводилось внутривенно, максимальная концентрация могла быть достигнута только при развитой сосудистой системе опухоли.

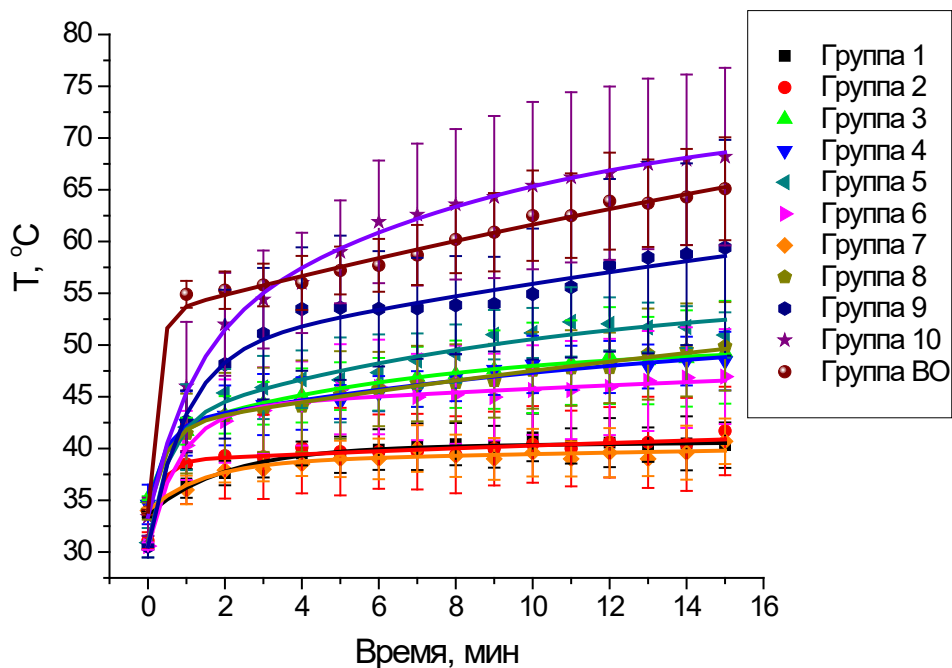
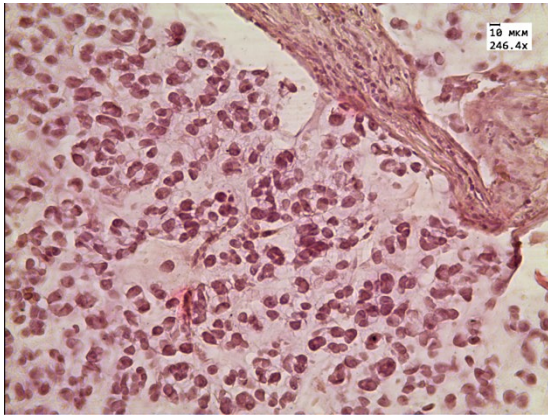


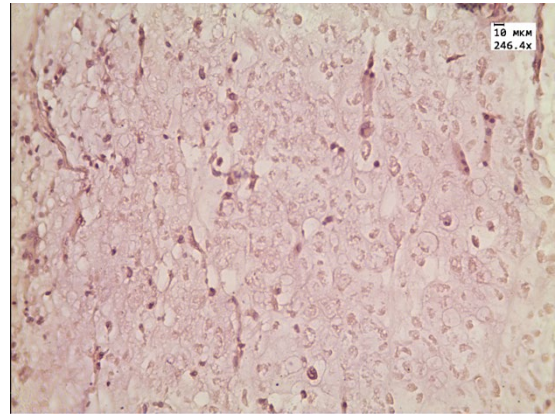
Рисунок 2.4. Кинетика нагрева экспериментальных опухолей и граничащих с ними тканей излучением ближнего ИК спектрального диапазона (группа ВО соответствует группе крыс с однократным внутриопухолевым введением суспензии ЗНС с концентрацией 400 мкг/мл [265])

На рисунке 2.5 представлены гистологические изображения тела опухоли крысы из группы 10 и 4 (3-х кратное введение ЗНС) до и через 72 ч после ПФТТ, окрашенные гематоксилином и эозином и иммуногистохимически с антителами к маркерам пролиферации *Ki-67* и апоптоза ВАХ. В результате процедуры в группе 10 (высокая степень васкуляризации) температура на поверхности достигла $\sim 68^{\circ}\text{C}$. Процедура ПФТТ вызвала заметные некротические изменения ткани на 90% площади образца (рис. 2.5а,б).

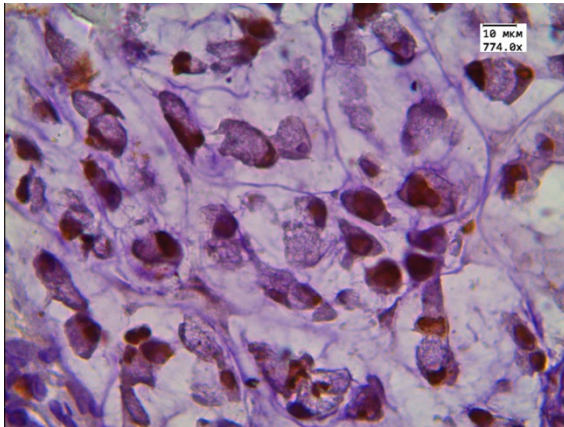
В опухоли с низкой степенью васкуляризации при таких же дозах ЗНС и облучения (крыса из группы 4) после ПФТТ с максимальной температурой нагрева $\sim 45^{\circ}\text{C}$ наблюдалось снижение экспрессии маркера пролиферации *Ki-67* (рис. 2.5в,г) и увеличение экспрессии маркера апоптоза ВАХ (рис. 2.5д,е) по сравнению с контролем, что говорит о сохранении в опухоли живых клеток.



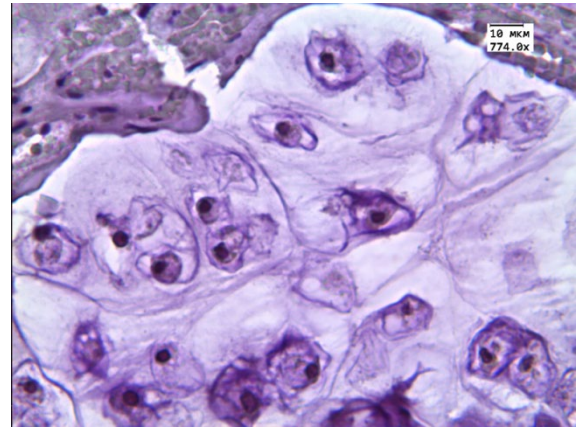
а



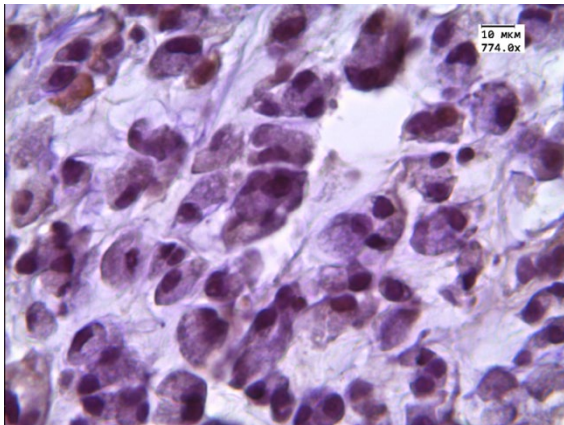
б



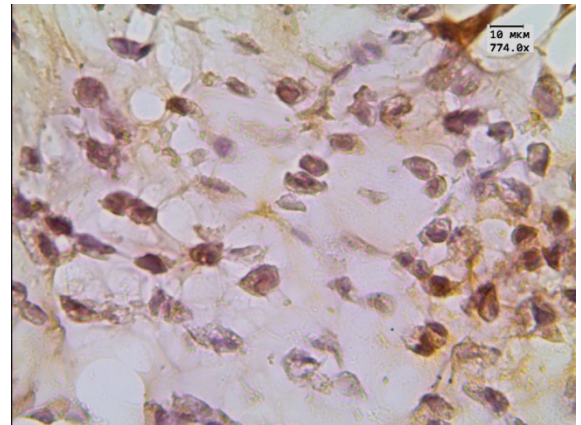
в



з



д



е

Рисунок 2.5. Микрофотографии гистологических срезов холангиокарциномы до и после ПФТТ из группы 10 (а, б), окрашивание гематоксилином и эозином, увеличение 246.4, и из группы 4 (в-е), иммуногистохимическое окрашивание антителами *Ki-67* (в, з) и *VAX* (д, е), увеличение 774.

Для анализа кинетики нагрева, представленной на рисунке 2.3, было использовано эмпирическое уравнение [266]:

$$T(t) = A_1 \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) \right) + A_2 \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \right) + T_0, \quad (2.1)$$

где T_0 - температура в начальный момент времени (до нагрева), среднее значение - 32.9 ± 1.7 °С, A_1 и A_2 - эмпирические константы, а τ_1 и τ_2 - константы, характеризующие скорость нагрева кожи и опухоли. Предполагалось, что первый член уравнения описывает кинетику нагрева самой опухоли, а второй член описывает кинетику нагрева тканей, окружающих опухоль.

Параметры аппроксимации приведены в таблице 2.2.

Таблица 2.2. Параметры аппроксимации кинетики нагрева.

Номер группы	Параметры аппроксимации				
	T_0 , °С	A_1	A_2	τ_1 , мин	τ_2 , мин
1	33.7±0.3	4.6±0.9	3.0±0.2	1.4±0.96	30±12
2	31.1±0.8	7.7±3.1	5.7±0.9	0.3±0.003	32±6
3	35.2±0.2	6.2±4.1	8.7±2.5	0.5±0.35	6±1
4	34.6±1.9	7.6±1.6	10±4	0.4±0.03	14±12
5	30.9±1.4	11±1	13±3	0.5±0.03	10±4
6	30.6±0.4	13±3	7.1±2.1	0.8±0.18	28±2
7	34.0±0.3	6.3±1.9	1.4±0.4	1.9±0.06	28±0.5
8	33.9±0.8	8.1±3.5	19±5	0.5±0.03	30±11
9	30.5±1.1	18±5	25±17	0.9±0.05	32±18
10	33.4±1.9	15±4	23±8	1.1±0.8	8±3
ВО	33.9±0.2	19±1	40±13	0.2±0.01	41±6

Анализ параметров аппроксимации показывает, что при внутриопухолевом введении суспензии ЗНС характеристическое время нагрева опухоли минимально. При этом не имеет значения васкуляризация опухоли, поскольку в данном случае частицы вводятся во внутритканевую жидкость. Характеристическое время нагрева окружающих опухоль тканей, напротив, максимально, что может быть связано с тем, что частицы локализованы в местах инъекций, т.е. не распределены равномерно по объёму опухоли. Таким образом, происходит достаточно быстрый и сильный нагрев областей локализации частиц в опухоли и достаточно медленное распространение тепла в окружающие ткани, что хорошо коррелирует с данными работы [267].

В первой и седьмой группах животных (облучение без введения частиц) значение τ_1 относительно велико, причём при слабо развитой сосудистой системе опухоли (группа 1) время, необходимое для нагрева опухоли, меньше, чем при хорошо развитой сосудистой системе (группа 7), поскольку теплоперенос, осуществляемый кровотоком из области

нагрева, в группе 1 слабее. Значение τ_2 , наоборот, меньше в группе 7, что подтверждает большую скорость нагрева окружающих опухоль тканей за счёт переноса тепла с кровотоком из области нагрева в окружающую ткань.

Большой разброс параметров аппроксимации относительно среднего значения связан, на наш взгляд, с большим разнообразием структурных особенностей опухолей конкретных животных и расположения сосудов относительно области облучения. Это имеет наибольшее значение при внутривенном введении ЗНС.

Данные, представленные в таблице 2.2, позволяют оценить парциальные вклады ΔT_1 и ΔT_2 , вносимые в экспериментально регистрируемый прирост температуры от опухоли и от окружающих тканей соответственно в интервале времени от 0 до 15 мин с начала облучения.

Здесь $\Delta T_1 = \frac{A_1 \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) \right)}{N}$, $\Delta T_2 = \frac{A_2 \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \right)}{N}$ и $N = 31$ – число временных точек, в

которых производились измерения температуры. На рисунке 2.6а попарно представлены группы с одинаковым объемом вводимой суспензии ЗНС, различающиеся степенью васкуляризации опухоли.

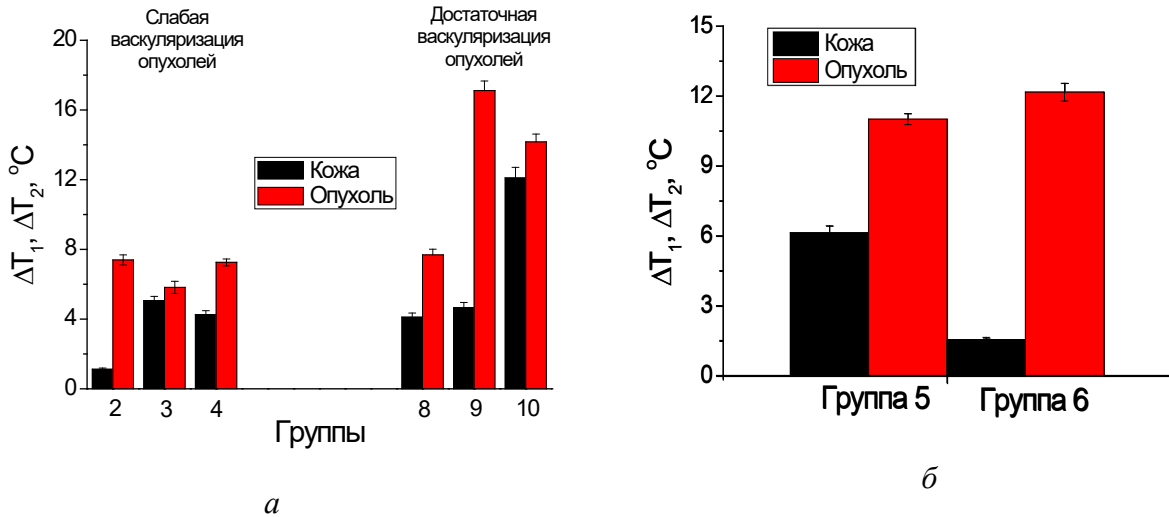


Рисунок 2.6. Парциальные вклады ΔT_1 и ΔT_2 , вносимые в экспериментально регистрируемый прирост температуры от опухоли и от окружающих тканей соответственно в группах животных с одинаковым объемом вводимой суспензии ЗНС.

На рисунке 2.6а хорошо видно, что при слабой васкуляризации нагрев опухоли, обусловленный ЗНС, не обеспечивает температуры порядка 45°C , необходимой для поражения раковых клеток (группы 2-4) при том, что средняя начальная регистрируемая

температура для всех групп составляла $32.9 \pm 1.7^\circ\text{C}$ (см. табл. 2.2). Аналогичная картина наблюдается и для животных с хорошо развитой васкуляризацией опухоли при однократном введении (группа 8). При двукратном и трехкратном увеличении дозы ЗНС (группы 9 и 10) температура, необходимая для поражения раковых клеток достигается. Однако для группы 10 мы видим неприемлемый рост температуры в окружающих опухоль тканях, что на наш взгляд связано с выходом ЗНС из сосудов и накоплением их не только в опухоли, но и в окружающих тканях. Данный вывод подтверждается данными, представленными на рисунке 2.6б. Хорошо видно, что при введении ЗНС за двое суток до облучения наблюдается больший нагрев окружающих тканей по сравнению с ситуацией, когда та же доза ЗНС вводилась за сутки до облучения. Рост температуры в окружающих тканях при этом существенно ниже.

2.2. Исследование зависимости оптических свойств опухолей от температуры нагрева

2.2.1. Методика определения оптических параметров (полного пропускания и диффузного отражения) слоев опухоли

Объектом исследования стали 16 лабораторных беспородных крыс-самцов, аналогичные описанным в разделе 2.1.1, с аналогичной подкожно привитой экспериментальной моделью холангиокарциномы линии *PC-1*.

Когда опухоли достигли объема около 3 см^3 , животные были разделены случайным образом на две партии. В контрольной партии 6 крыс не подвергались введению суспензии ЗНС и лазерному нагреву, а одной крысе была проведена прямая внутриопухолевая инъекция суспензии ЗНС (общая доза 1200 мкг ЗНС) за 3 часа до измерений оптических параметров слоев опухоли, однако лазерного нагрева не проводилось. Остальные 9 крыс были включены в экспериментальную партию и были подвергнуты ПФТТ с введением суспензии ЗНС в различных режимах и последующему нагреву лазерным излучением. Схема подготовки животных, вошедших в экспериментальную партию, к процедуре ПФТТ продемонстрирована на рисунке 2.7. Облучение опухолей и температурный контроль происходили описанными в разделе 2.1.1 способами.

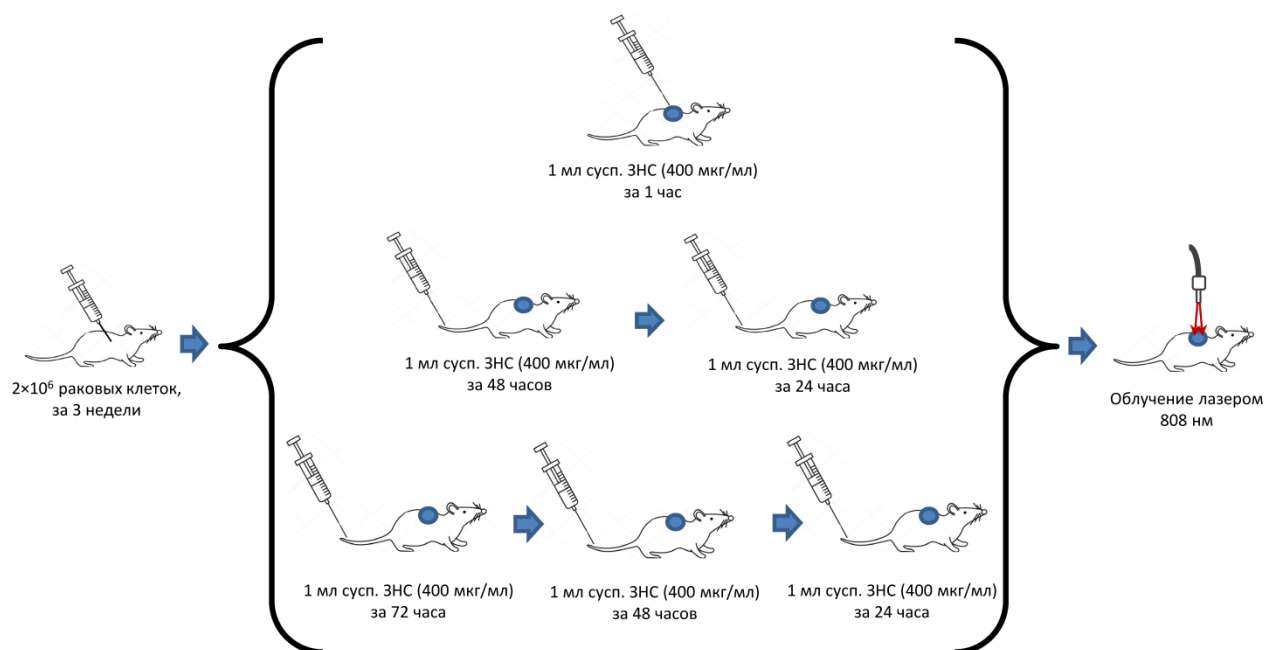


Рисунок 2.7. Схема подготовки животных, вошедших в экспериментальную партию, к процедуре ПФТТ

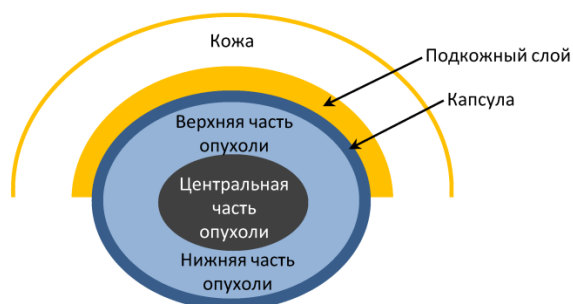
Спектры отражения измеряли *in vivo* до и сразу после ПФТТ с использованием спектрометров *USB4000-Vis-NIR* (*Ocean Optics*, США) в спектральном диапазоне 350-1000 нм и *NIRQuest* (*Ocean Optics*, США) в спектральном диапазоне 1000-2150 нм. В качестве источника света использовалась галогенная лампа *HL-2000* (*Ocean Optics*, США). Для измерения использовали оптический зонд *QR400-7-VIS/NIR* (*Ocean Optics*, США), оснащенный шестью освещающими волокнами вокруг одного приёмного волокна с диаметром сердцевины 400 мкм и числовой апертурой 0.22 ± 0.02 . Зонд закреплялся в цилиндрическом держателе с диаметром отверстия, соответствующим диаметру зонда, чтобы обеспечить расстояние 2 мм между поверхностью кожи и зондом. Таким образом, рассеянное обратно диффузное излучение собиралось с площади кожи около 8 мм^2 . Спектрометр калибровался с использованием эталона диффузного отражения *WS-1-SL* (*Labsphere*, США), изготовленным из запатентованного материала с рассеянным отражением *Spectralon* (*Labsphere*, США), который обладает высокой точностью и воспроизводимостью данных и отражательной способностью 99% (400-1500 нм) и >96% (1500-2000 нм).

После проведения ПФТТ животные выводились из эксперимента для проведения забора тканей самой опухоли (капсула, верхняя, центральная и нижняя части опухоли) и тканей над опухолью (кожа и подкожный слой) (рис. 2.8а). Образцы, соответствующие слоям опухоли, помещались между двумя предметными стеклами (рис. 2.8б).

В случае каждого из образцов в диапазоне длин волн 350-2250 нм регистрировались спектры полного пропускания и диффузного отражения при помощи спектрофотометра *UV-3600* с интегрирующей сферой *LISR-3100* (*Shimadzu*, Япония) с внутренним диаметром 150 мм, размером входного отверстия 20×20 мм² и диаметром выходного отверстия 13 мм. В качестве источника света применялась галогенная лампа с фильтрацией излучения в исследуемом спектральном диапазоне. Диаметр пучка света, падающего на образец ткани, составлял 4×4 мм². Скорость сканирования составляла 2 нм/сек. Спектрофотометр калибровался с использованием эталона *BaSO₄* (коэффициент диффузного отражения во всем измеряемом диапазоне близок к 100 %).

Толщина каждого образца ткани измерялась в пяти точках при помощи электронного микрометра. Результаты усреднялись. Точность измерений составляла ±1 мкм.

Поскольку изменение оптических свойств биотканей при термолизе связано в первую очередь с максимальной достигнутой температурой нагрева, экспериментальные данные были объединены в статистические группы по этому критерию и усреднены. В таблице 2.3. приведены данные о параметрах экспериментальных и контрольной группах.



a



b

Рисунок 2.8. Схема модельной опухоли и окружающих опухоль тканей (*a*) и фотография образцов этих тканей (*b*)

Таблица 2.3. Описание групп животных, участвовавших в экспериментах.

Номер группы	Режим инъектирования суспензией ЗНС и облучения	Полная доза ЗНС, мкг	Макс. температура нагрева, °С	Кол-во животных в группе
<i>Контрольная партия</i>				
1	Без введения ЗНС и облучения	-	-	6
2	Внутриопухолевое однократное введение за 3 часа до измерений. Без облучения	1200	-	1
<i>Экспериментальная партия</i>				
3	Внутривенное двукратное введение (по 1 мл, 400 мкг/мл) за 48 и 24 часа до облучения	800	~49	2
4	Внутривенное двукратное введение (по 1 мл, 400 мкг/мл) за 48 и 24 часа до облучения	800	53-56	2
	Внутривенное трехкратное введение (по 1 мл, 400 мкг/мл) за 72, 48 и 24 часа до облучения	1200		2
5	Внутривенное двукратное введение (по 1 мл, 400 мкг/мл) за 48 и 24 часа до облучения	800	~61	1
6	Внутриопухолевое однократное введение за 1 час до облучения	400	~60	2

2.2.2. Алгоритм вычисления оптических параметров (коэффициента поглощения и транспортного коэффициента рассеяния) слоев опухоли

Вычисление оптических параметров выполнялось отдельно для каждой спектральной точки. Используемый алгоритм включал следующие шаги [268, 269]:

1) Задание начальных значений μ_a и μ'_s с помощью следующих выражений (аналитические выражения получены с помощью метода Кубелки-Мунка):

$$\frac{\mu'_s}{\mu_a + \mu'_s} = \begin{cases} 1 - \left(\frac{1 - 4R_d - T_t}{1 - T_t} \right)^2, & \text{если } \frac{R_d}{1 - T_t} < 0.1 \\ 1 - \frac{4}{9} \left(\frac{1 - R_d - T_t}{1 - T_t} \right)^2, & \text{если } \frac{R_d}{1 - T_t} \geq 0.1 \end{cases}, \quad (2.2)$$

$$(\mu_a + \mu'_s) \times l = \begin{cases} -\frac{\ln T_t \ln(0.05)}{\ln R_d}, & \text{если } R_d \leq 0.1, \\ 2^{1+5(R_d+T_t)}, & \text{если } R_d > 0.1 \end{cases},$$

где R_d и T_t – экспериментально измеренные значения коэффициентов диффузного отражения и полного пропускания, l – толщина образца биоткани.

2) Расчет коэффициентов диффузного отражения и полного пропускания на основе начальных значений μ_a и μ'_s методом ИДУ [270].

3) Сравнение рассчитанных значений с экспериментально измеренными величинами.

4) Выполнение итерационной процедуры до согласования расчетных и измеренных данных с заданной точностью.

В качестве итерационной процедуры использовался Симплекс-метод, подробно описанный в работе Банди [271]. В качестве критерия завершения итерационной процедуры использовалось условие [269]:

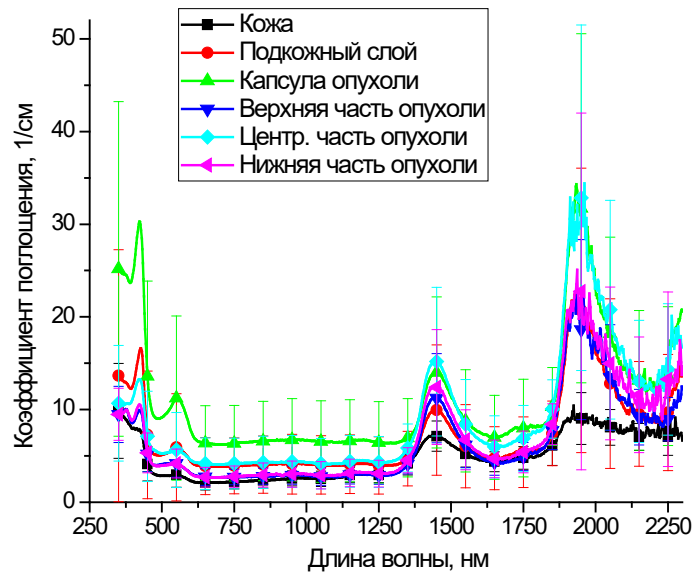
$$\frac{|R_d^{exp} - R_d^{calc}|}{R_d^{exp}} + \frac{|T_t^{exp} - T_t^{calc}|}{T_t^{exp}} < 0.001, \quad (2.3)$$

где R_d^{exp} , R_d^{calc} , T_t^{exp} и T_t^{calc} – соответственно экспериментально измеренные и теоретически рассчитанные значения коэффициентов диффузного отражения и полного пропускания.

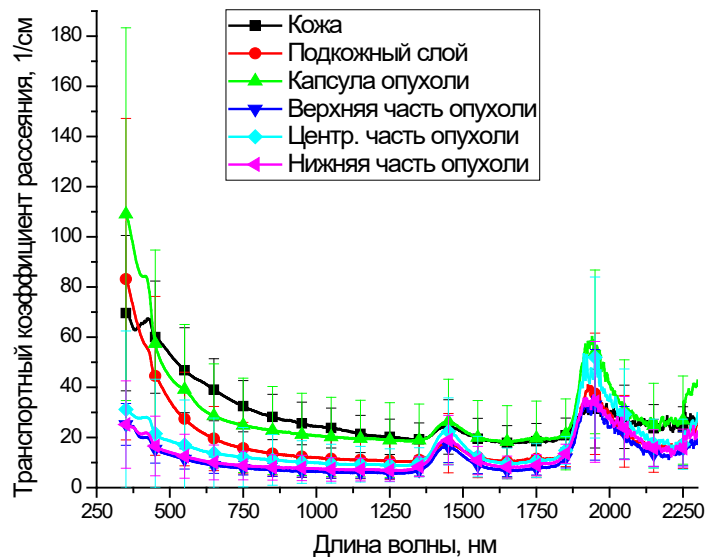
2.2.3. Анализ оптических свойств слоев опухоли

Спектры коэффициента поглощения и транспортного коэффициента рассеяния окружающих опухоль тканей (кожа, подкожный слой), а также различных слоев самой опухоли (капсула, верхняя, центральная и нижняя части опухоли), усредненные по контрольной группе (6 крыс, не подвергнутых введению ЗНС и лазерному облучению), представлены на рисунке 2.9.

На рисунке хорошо видно полосу Соре, проявляющуюся в виде пика на 420-424 нм, который можно найти на спектрах коэффициента поглощения и транспортного коэффициента рассеяния всех слоев опухоли и окружающих опухоль тканей. На спектрах коэффициента поглощения присутствуют пики поглощения как оксигенированного гемоглобина (тело опухоли – 546-548, 572-576 нм), так и дезоксигенированного (кожа, подкожный слой, капсула – 554 нм). Характерные пики около 1190, 1442 и 1936 нм обусловлены полосами поглощения воды. В спектре также наблюдается увеличение поглощения в области свыше 2200 нм, что является коротковолновым плечом полосы поглощения воды с максимумом на 2950 нм [272]. Увеличение стандартного отклонения коэффициента поглощения в области полос поглощения, указывает на разницу в содержании воды и гемоглобина в различных образцах исследуемых тканей.



a



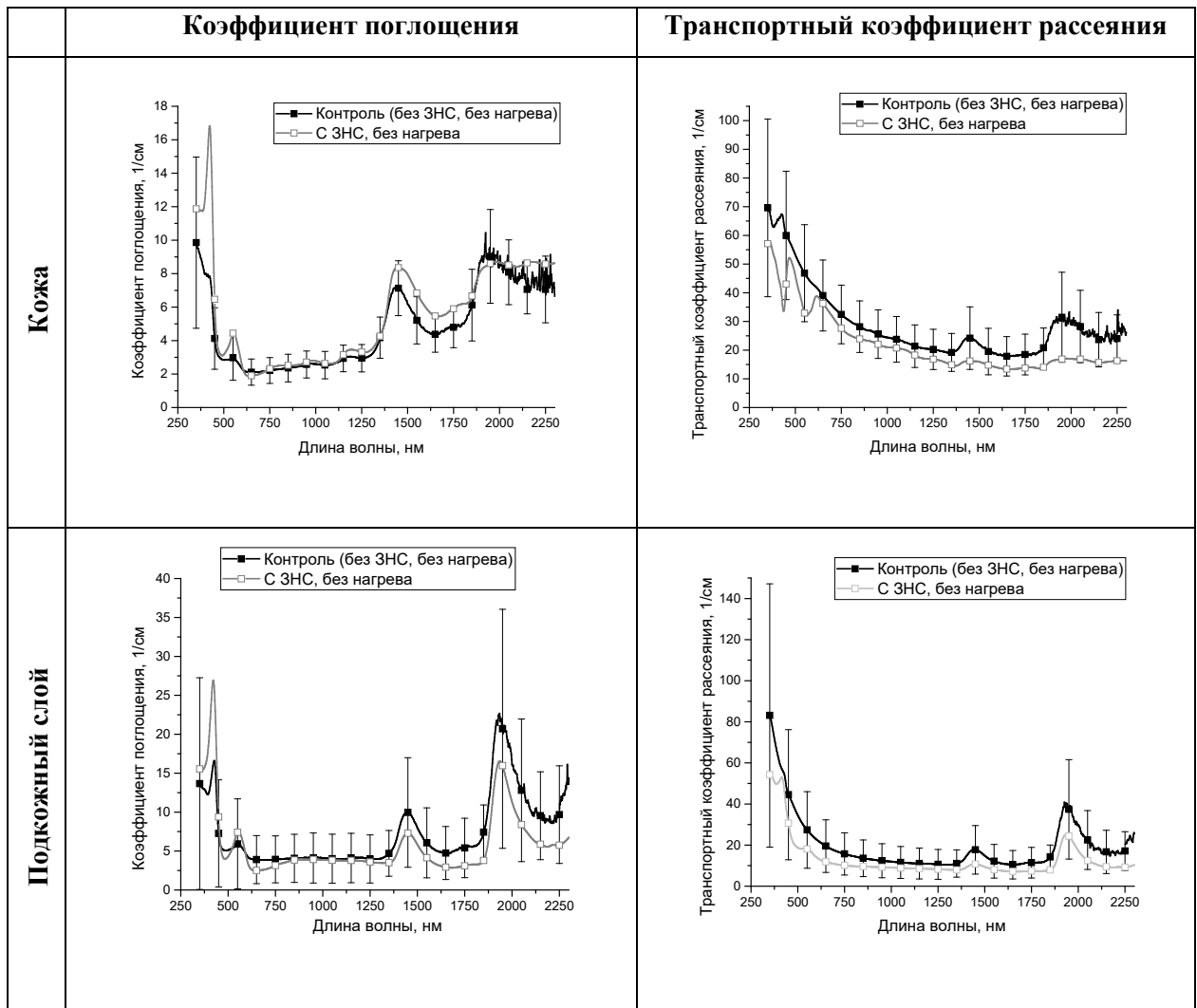
б

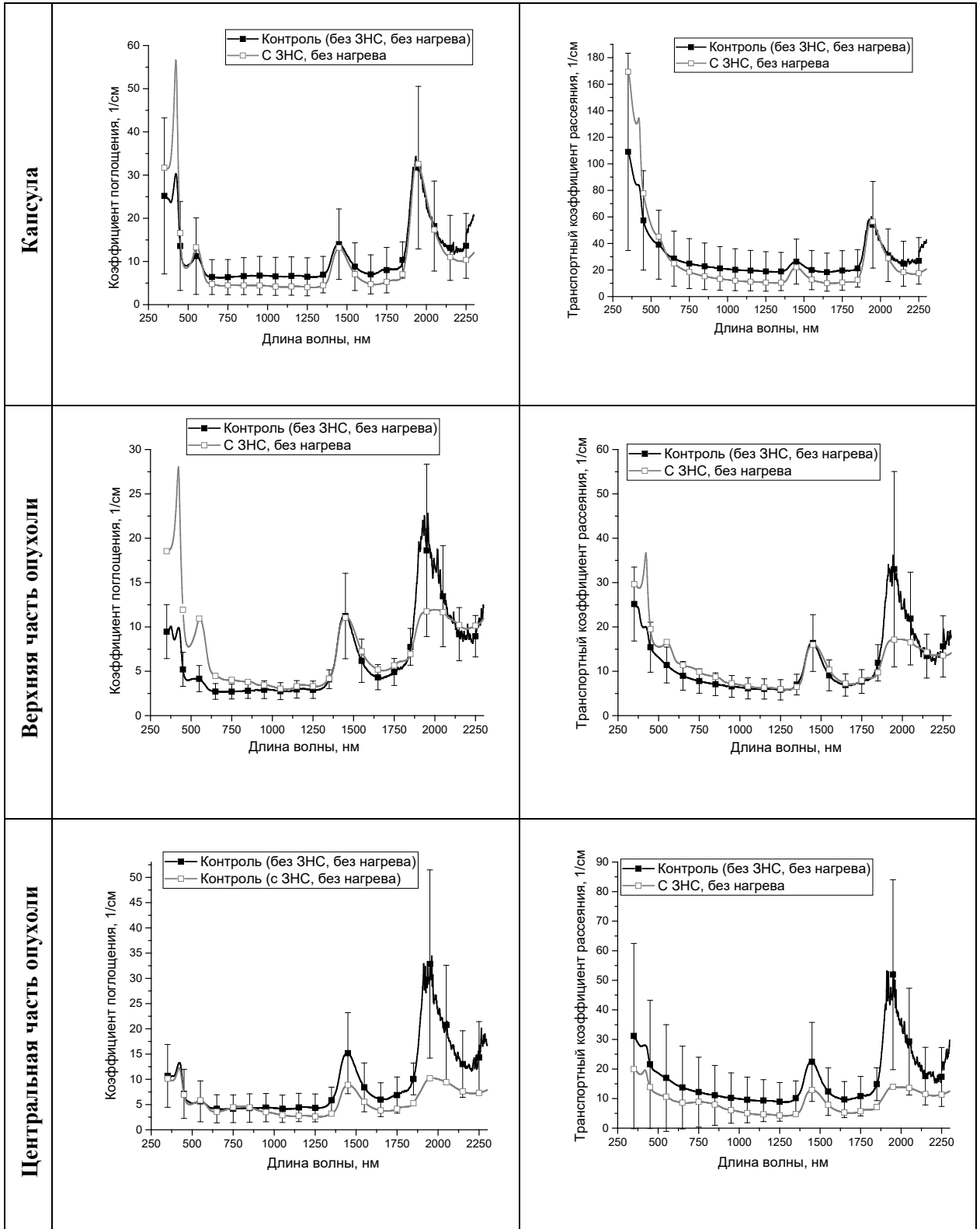
Рисунок 2.9. Спектры коэффициента поглощения (а) и транспортного коэффициента рассеяния (б) окружающих опухоль тканей и различных слоев самой опухоли, усредненные по контрольной группе

Отклонение спектральной зависимости транспортного коэффициента рассеяния от монотонной объясняется увеличением влияния мнимой части комплексного показателя преломления центров рассеяния (гидратированных коллагеновых волокон) в области полос поглощения воды и эритроцитов в области поглощения гемоглобина [273, 274]. Увеличение мнимой части комплексного показателя преломления рассеивателей и окружающего

вещества приводит к значительному уменьшению коэффициента анизотропии рассеяния g , который вместе с коэффициентом рассеяния ткани μ_s формирует спектр транспортного коэффициента рассеяния.

На рисунке 2.10 представлены усредненные спектры коэффициента поглощения и транспортного коэффициента рассеяния различных слоев опухоли и окружающих опухоль тканей, а также аналогичные спектры, принадлежащие животному, испытавшему однократное внутриопухолевое введение суспензии ЗНС (всего 1200 мкг ЗНС) за 3 часа до измерения оптических параметров.





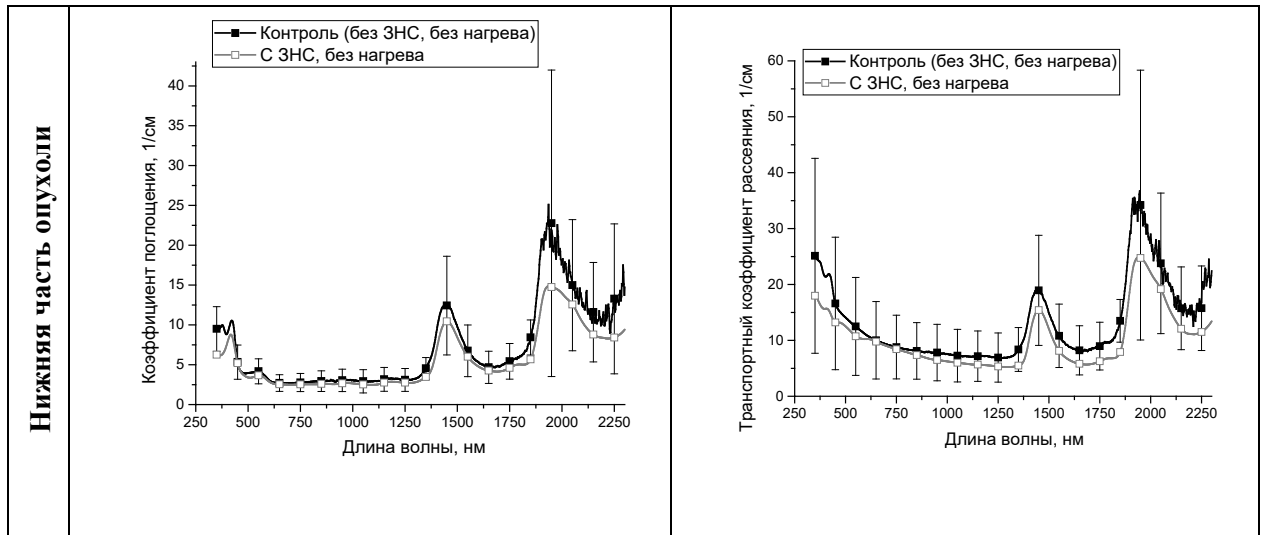


Рисунок 2.10. Спектры коэффициента поглощения и транспортного коэффициента рассеяния различных слоев опухоли и окружающих тканей контрольной группы животных и животного после внутриопухолевого введения суспензией ЗНС.

На рисунке 2.10 на спектрах поглощения верхней и центральной части опухоли можно увидеть увеличение поглощения в области 760-800 нм. Это свидетельствует о присутствии ЗНС в теле опухоли. Наибольшее накопление частиц наблюдается в центральной части опухоли. Увеличение ширины пика и смещение максимума поглощения относительно максимума оптической плотности суспензии ЗНС (800 нм) объясняется, по-видимому, влиянием рассеяния ткани.

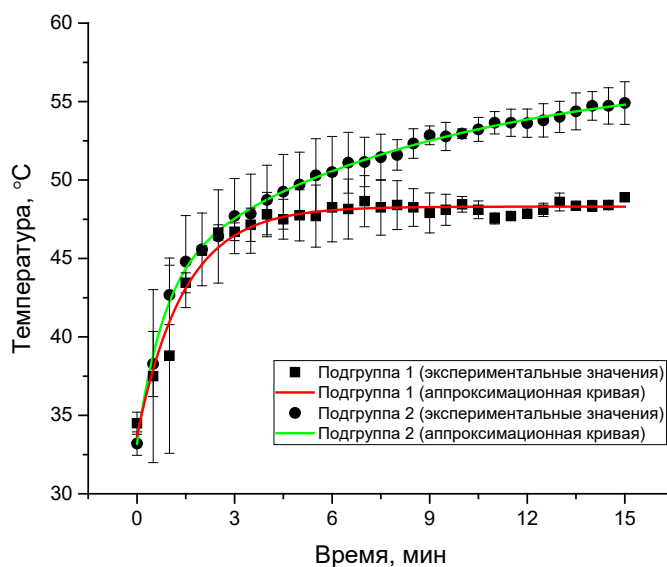
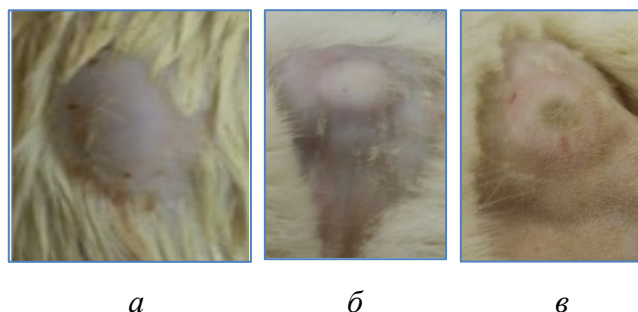
2.2.4. Анализ изменения оптических свойств слоев опухолей при различной температуре нагрева поверхности при ПФТТ

Кинетика нагрева опухолей экспериментальной группы представлена на рисунке 2.11г. Животные из экспериментальной группы были объединены в 2 подгруппы по степени нагрева кожи над опухолью. Как видно из рисунка 2.11г, в случае подгруппы 1 (2 крысы) усредненная максимальная температура кожи над опухолью составила $48.9 \pm 0^\circ\text{C}$, в случае подгруппы 2 (4 крысы) – $54.9 \pm 1.4^\circ\text{C}$.

Для аппроксимации кинетики нагрева, представленной на рисунке 2.11г, использовалось эмпирическое уравнение (2.1). Параметры аппроксимации экспериментальных данных приведены в таблице 2.4. Кинетика нагрева ткани в первой подгруппе аппроксимировалась одноэкспоненциальной зависимостью, а во второй – двухэкспоненциальной с разными скоростными характеристиками.

Рисунок 2.11а-в демонстрирует фотографии, иллюстрирующие разницу между реакцией кожи над опухолью в контрольной и экспериментальной (две подгруппы с

различной температурой нагрева) группах сразу после проведения ПФТТ. В 1 подгруппе наблюдается значительный отёк на облучённом участке, во 2 подгруппе на месте облучения наблюдается потемнение, соответствующее области геморрагии (кровоизлияния) за счёт теплового повреждения микрососудов кожи и коагуляции гемоглобина под кожей.



2

Рисунок 2.11. Фотографии опухолей крыс из контрольной группы (а) и из экспериментальной группы сразу после ПФТТ: подгруппа 1 (б), подгруппа 2 (в), и кинетика нагрева поверхности кожи над опухолями животных из экспериментальной группы (г)

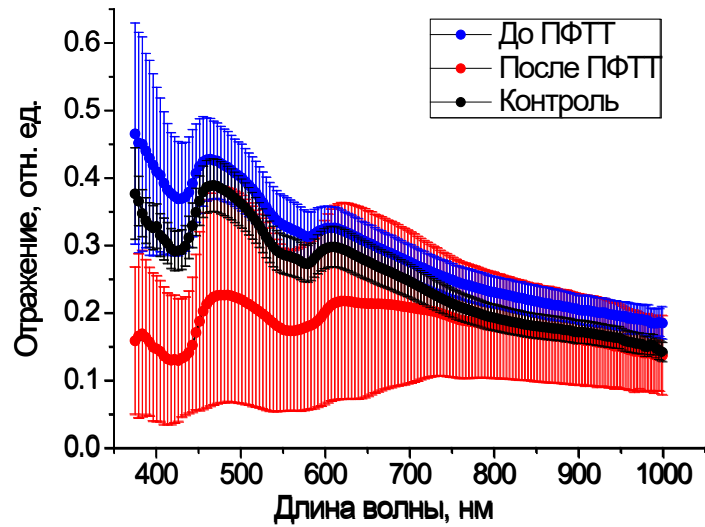
Таблица 2.4. Параметры аппроксимации кинетики нагрева.

	$T_0, ^\circ\text{C}$	A_1	A_2	$\tau_1, \text{мин}$	$\tau_2, \text{мин}$
Подгруппа 1	33.7 ± 0.5	14.6 ± 0.5	-	1.4 ± 0.1	-
Подгруппа 2	33.2 ± 0.1	10.6 ± 0.8	13.2 ± 0.5	0.8 ± 0.1	8.4 ± 1.2

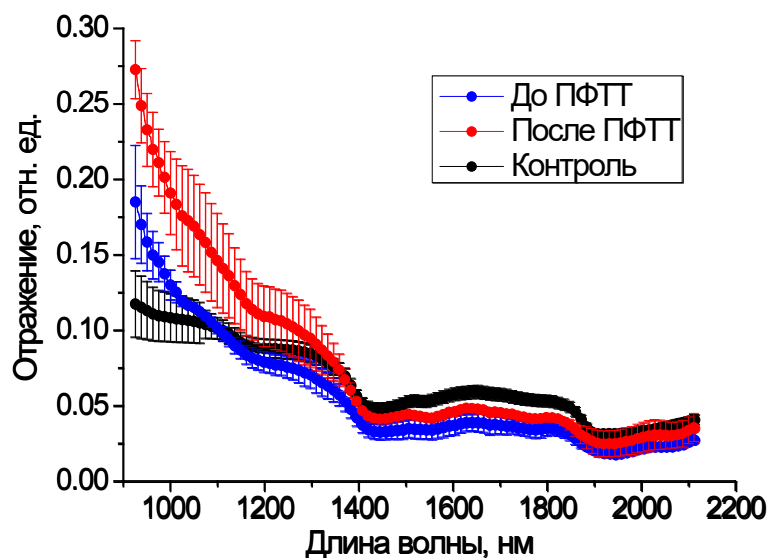
Рисунок 2.11г и значения параметров аппроксимации в таблице 2.4 демонстрируют двухэкспоненциальный рост температуры с разными скоростями. Это может быть обусловлено как геометрией используемого метода регистрации температуры, так и перфузией крови в коже. Моделирование температурных полей в опухолях с внедренными наночастицами золота при лазерной фототермической терапии и модельные эксперименты с внутриопухолевым введением наночастиц показали, что нагрев наночастиц и окружающих тканей является достаточно быстрым процессом. Например, при длительности лазерного импульса 2 нс и интенсивности 5 мВт/см² на плазмонно-резонансной длине волны приращение температуры наночастицы золота достигало приблизительно 100°C [275]. В работе [276] наночастицы вводили подкожно на глубину 1 мм, а максимальная температура в центре лазерного пятна после непрерывного лазерного воздействия интенсивностью 10 Вт/см² в течение 30 с достигала 65°C. В связи с этим можно утверждать, что температура ЗНС существенно возросла за достаточно короткое время лазерного воздействия.

В наших исследованиях источники нагрева располагались под кожей и подкожным слоем на глубине около 2 мм от поверхности. Однако максимальная глубина ИК-детектирования температуры при излучении $\lambda > 5$ мкм в случае кожи составляет менее 0.2 мм [277]. Таким образом, мы измерили сложную тепловую реакцию живой системы на нагрев наночастиц, локализованных в сосудах и окружающем пространстве. Важную роль в этом процессе играла перфузия крови. При скоростях перфузии, характерных для кожного покрова, перфузия начинает влиять на тепловой режим только после 60 с нагревания [277] и замедляет рост температуры при более длительном облучении [278]. Следовательно, быстрый процесс нагрева в течение 0.8 мин (подгруппа 2) может быть связан с сильным нагревом ЗНС в области их локализации в сосудах и межтканевом пространстве вокруг сосудов в капсуле и верхней части опухоли. В течение этого времени перфузия не имела существенного влияния на нагрев тканей. Таким образом, снижение скорости роста температуры на втором этапе нагрева может быть связано с эффектом перфузии.

На рисунке 2.12 продемонстрированы спектры отражения, измеренные *in vivo* от поверхности кожи над опухолями в контрольной группе и в экспериментальной группе до и сразу после ПФТТ. Спектры, полученные в контрольной группе, существенно не отличались от спектров, полученных в экспериментальной группе до облучения. Как было оценено ранее в работе [14], концентрация ЗНС, локализованных в опухоли преимущественно в сосудах, после двукратного внутривенного введения по 0.4 мг составила около 1.24±0.01 мг/г ткани. Такая концентрация не оказала влияния на вид спектров. Различия в спектрах были обусловлены особенностями строения тканей и их кровоснабжения у разных животных.



a



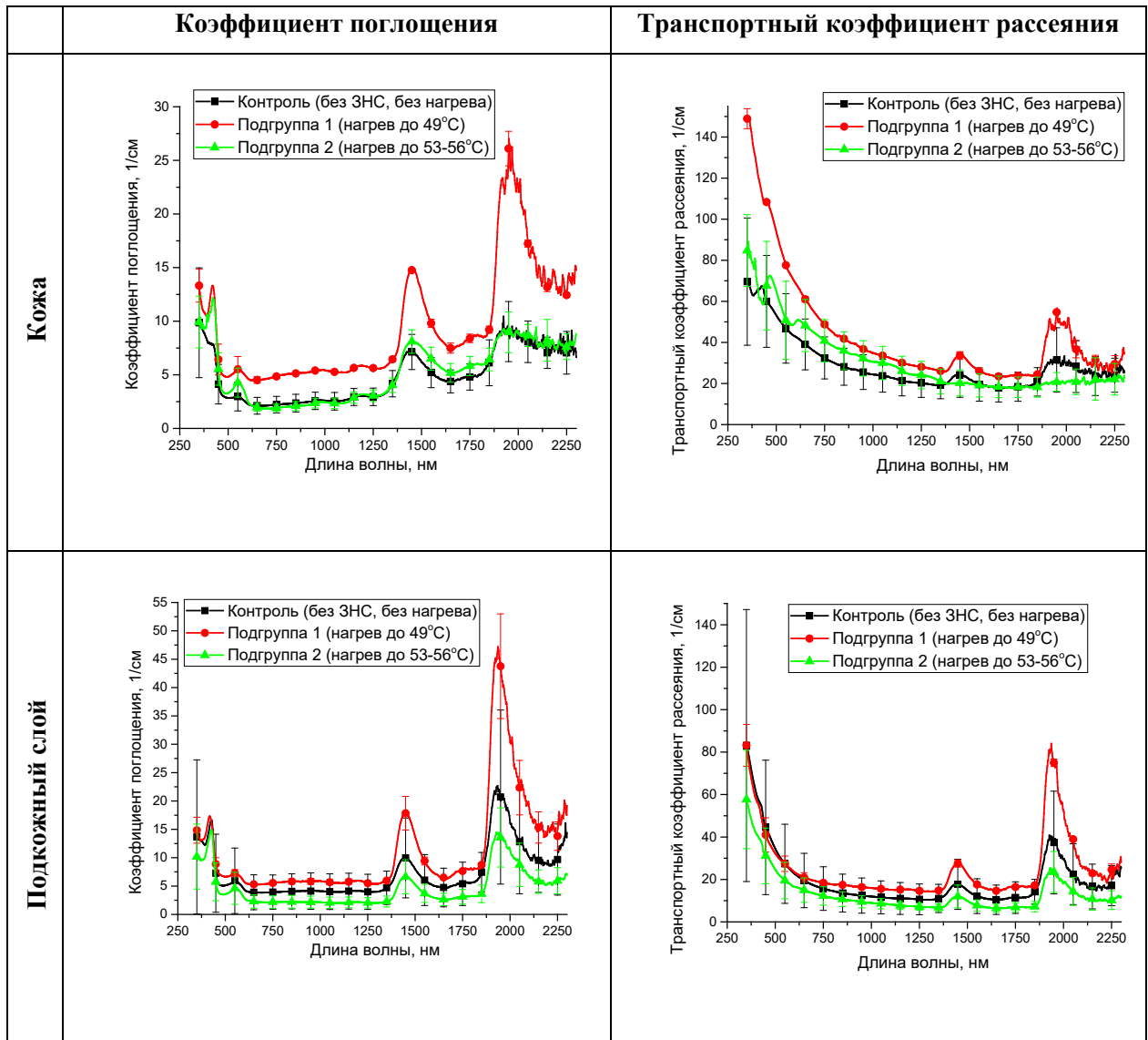
б

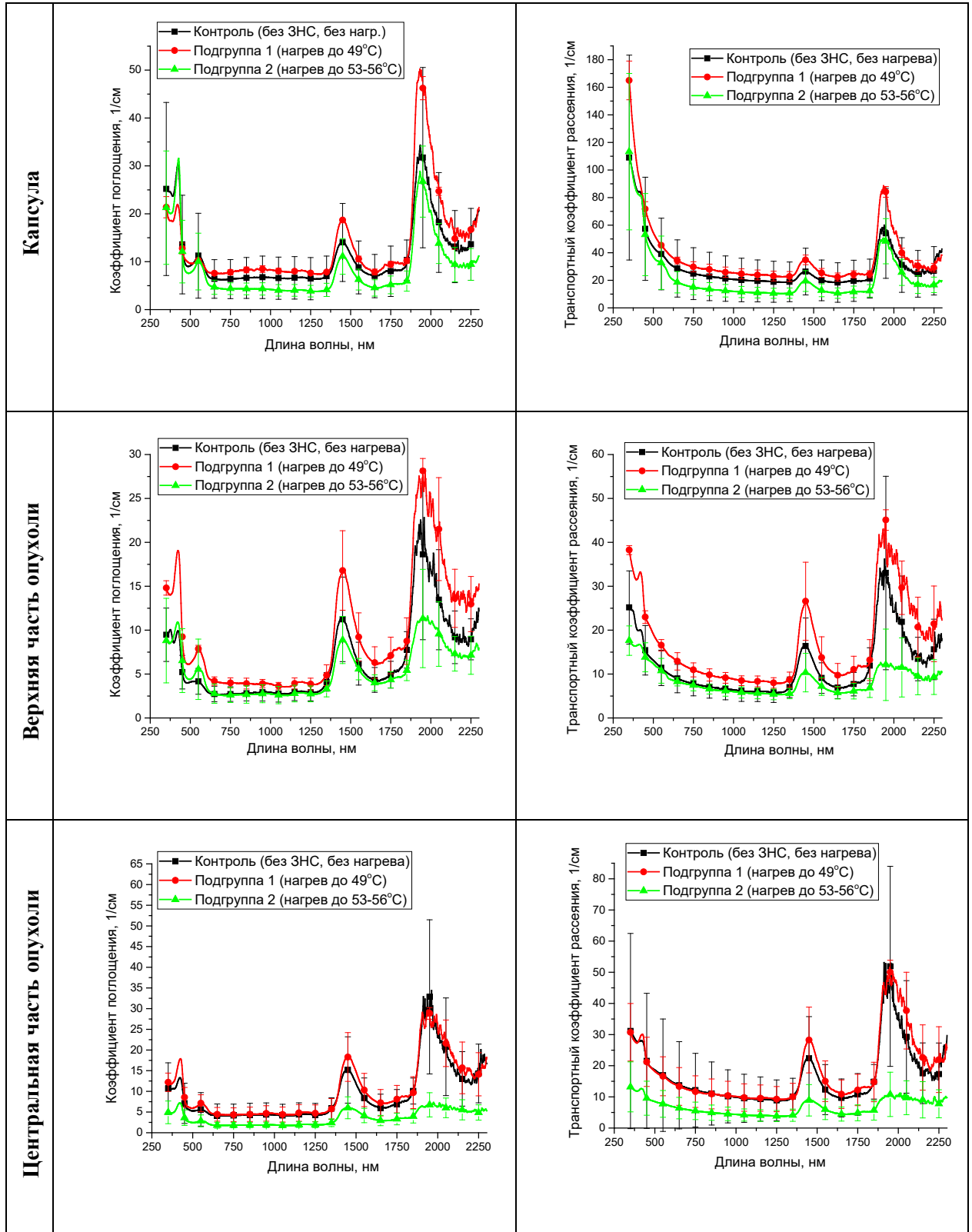
Рисунок 2.12. Спектры диффузного отражения поверхности кожи над опухолью до и после ПФТТ в разных диапазонах спектра: видимый-БИК (*a*) и БИК (*б*).

На рисунке 2.12*a* хорошо видна полоса Сорэ на 427 нм и двойной пик поглощения оксигемоглобина на 547 и 580 нм до ПФТТ. После нагревания вместо него обнаруживается одиночный пик поглощения дезоксигемоглобина примерно на 560 нм. Кроме того, наблюдается снижение коэффициента диффузного отражения в коротковолновом диапазоне из-за увеличения поглощения гемоглобина, обусловленного увеличением объёма крови при разрушении микрососудов и кровоизлиянии при перегревании. Это хорошо видно на

рисунке 2.11б: темное пятно соответствует области кровоизлияния. Характерные полосы, наблюдаемые на рисунке 2.12б на длинах волн около 1205, 1444 и 1944 нм, обусловлены поглощением воды. После ПФТТ наблюдается значительно более крутой наклон спектра диффузного отражения подвергнутой нагреву ткани по сравнению с интактной, что может быть вызвано разрушением крупных рассеивателей, таких как эритроциты. Результаты хорошо согласуются с данными из работы [258], полученными при нагревании уха мыши до 60°C *in vivo*.

На рисунке 2.13 представлены спектры коэффициента поглощения и транспортного коэффициента рассеяния опухоли и окружающих тканей контрольной группы и экспериментальных подгрупп.





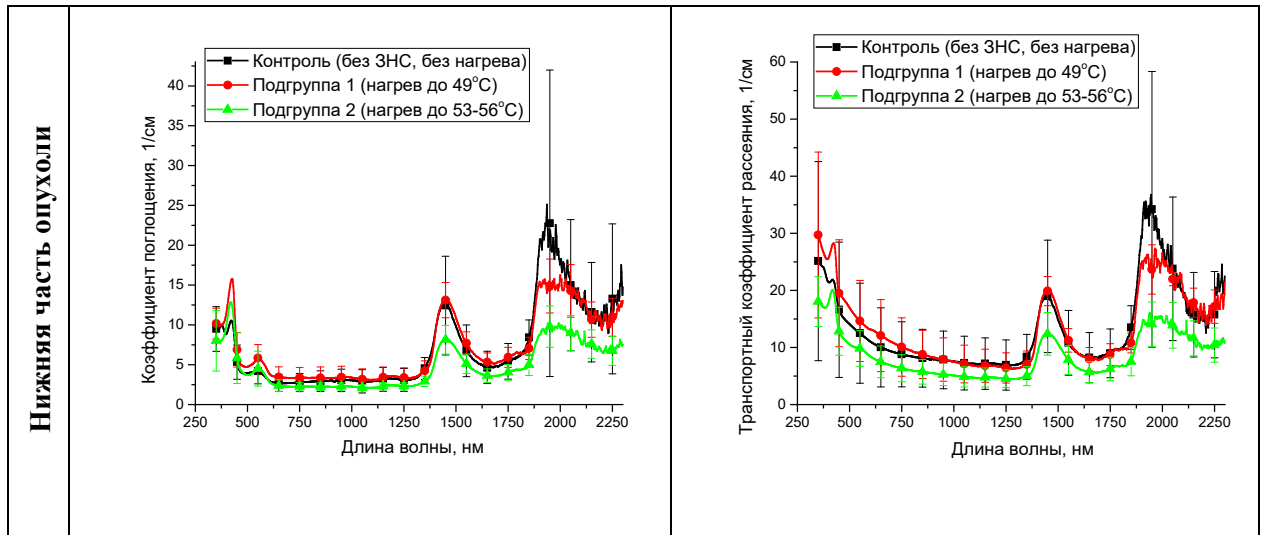


Рисунок 2.13. Спектры коэффициента поглощения и транспортного коэффициента рассеяния различных слоев опухоли и окружающих тканей контрольной и экспериментальных групп.

Спектры коэффициента поглощения на рисунке 2.13 демонстрируют относительное содержание крови и воды в разных слоях исследуемых объектов. На спектрах кожи хорошо видно увеличение полос поглощения гемоглобина после нагрева, что хорошо согласуется с результатами температурных изменений коэффициента поглощения кожи, представленными в работе [258]. Также в коже за счет развившегося отека наблюдается значительное увеличение амплитуды полос поглощения воды.

Снижение коэффициента поглощения опухолевых слоев в полосах поглощения воды может быть вызвано дегидратацией тканей при ПФТТ, которое наблюдается преимущественно в центральной и нижней частях опухоли во 2 подгруппе. По-видимому, данный эффект связан с большей васкуляризацией опухоли в этой подгруппе, повлекшей большее накопление ЗНС в теле опухоли и, соответственно, больший нагрев ткани.

На спектрах транспортного коэффициента рассеяния на рисунке 2.13 можно увидеть изменения наклона графиков спектров в видимом спектральном диапазоне. Более крутой наклон наблюдается в 1 подгруппе для кожи после нагрева до 49°C, т.к. наблюдается разрушение эритроцитов. Более пологий наклон спектров транспортного коэффициента рассеяния особенно ярко наблюдается в случае образцов центральной части опухоли из подгруппы 2. Этот эффект сопровождается значительным уменьшением полос поглощения воды, что может соответствовать снижению рассеяния из-за дегидратации ткани. Отражательная конфокальная микроскопия подтвердила сжатие ткани при нагревании *in vivo* от 25 до 60°C [258].

Для оценки размеров рассеивателей исследуемых тканей использовался спектротурбидиметрический метод, описанный в работе [279]. Зависимость приведенного

коэффициента рассеяния от длины волны можно аппроксимировать в соответствие со степенным законом:

$$\mu_s'(\lambda) = \frac{a}{\lambda^{w_1}} + \frac{b}{\lambda^{w_2}}, \quad (2.4)$$

где параметры a и b определяются концентрацией частиц в среде. Параметр a характеризует мелкие рассеиватели, так называемые рассеиватели Рэля-Ганса, т.е. коллагеновые и эластиновые фибриллы, а параметр b характеризует более крупные рассеиватели Ми, т.е. пучки коллагена. Показатели длины волны w_1 и w_2 не зависят от концентрации частиц и характеризуют средний размер соответствующих частиц, а также определяют спектральное поведение коэффициента рассеяния [279]. Комбинация зависимостей рассеяния Рэля-Ганса и Ми от длины волны хорошо описывает измеренные зависимости транспортного коэффициента рассеяния от длины волны в диапазоне 350-1800 нм. В таблице 2.5 приведены зависимости транспортного коэффициента рассеяния от длины волны для образцов из контрольной группы и экспериментальной подгруппы 2 (нагрев до 53-56 °С).

Таблица 2.5. Зависимости транспортного коэффициента рассеяния от длины волны

Образец	Контрольная группа	Экспериментальная подгруппа 2
Кожа	$\mu_s'(\lambda) = \frac{7.939 \times 10^8}{\lambda^{2.737}} + \frac{358.049}{\lambda^{0.448}}$	$\mu_s'(\lambda) = \frac{5.31 \times 10^5}{\lambda^{1.57}} + \frac{299.459}{\lambda^{0.414}}$
Подкожный слой	$\mu_s'(\lambda) = \frac{1.827 \times 10^8}{\lambda^{2.515}} + \frac{269.412}{\lambda^{0.588}}$	$\mu_s'(\lambda) = \frac{1.08 \times 10^8}{\lambda^{2.537}} + \frac{236.455}{\lambda^{0.542}}$
Капсула	$\mu_s'(\lambda) = \frac{1.204 \times 10^{11}}{\lambda^{3.496}} + \frac{78.613}{\lambda^{0.162}}$	$\mu_s'(\lambda) = \frac{8.412 \times 10^{10}}{\lambda^{3.57}} + \frac{42.82}{\lambda^{0.216}}$
Верхняя часть опухоли	$\mu_s'(\lambda) = \frac{5.682 \times 10^8}{\lambda^{2.925}} + \frac{293.737}{\lambda^{0.562}}$	$\mu_s'(\lambda) = \frac{2.368 \times 10^8}{\lambda^{2.958}} + \frac{362.02}{\lambda^{0.627}}$
Центральная часть опухоли	$\mu_s'(\lambda) = \frac{1.932 \times 10^9}{\lambda^{3.159}} + \frac{7.899}{\lambda^{0.027}}$	$\mu_s'(\lambda) = \frac{4.45 \times 10^6}{\lambda^{2.441}} + \frac{64.703}{\lambda^{0.446}}$
Нижняя часть опухоли	$\mu_s'(\lambda) = \frac{7.356 \times 10^8}{\lambda^{3.018}} + \frac{54.337}{\lambda^{0.327}}$	$\mu_s'(\lambda) = \frac{6.038 \times 10^8}{\lambda^{3.017}} + \frac{56.83}{\lambda^{0.424}}$

Изменение параметров a , b и w в сравнении с контрольными является следствием структурных изменений тканей после нагревания. Снижение степенного показателя длины волны после нагрева соответствует увеличению размеров рассеивателей, по-видимому, за счет коагуляции ткани вблизи ЗНС. При этом концентрация рассеивателей уменьшается. Хорошо видно, что существенные изменения наблюдаются для капсулы, верхней и центральной частей опухоли, где локализована основная часть ЗНС. Снижение концентрации

рассеивателей в коже может быть связано с отеком, а увеличение – с кровоизлиянием, вызванным перегревом сосудов и коагуляцией крови.

Выводы:

Исследовано влияние дозы и способа введения ЗНС на нагрев тканей. Получено, что максимальная температура нагрева достигается при трёхкратном внутривенном введении суспензии ЗНС с общей дозой 1200 мкг при достаточной васкуляризации опухоли, однако при этом наблюдается значительное повреждение кожи над опухолью. Более щадящим по отношению к окружающим тканям режимом является двухкратное внутривенное введение суспензии ЗНС с общей дозой 800 мкг. Проведены исследования скоростных характеристик нагрева тканей при проведении ПФТТ.

Впервые получены спектры оптических параметров (коэффициента поглощения и транспортного коэффициента рассеяния) отдельных слоев модельной холангиокарциномы в интактном состоянии и после внедрения ЗНС и проведения ПФТТ в диапазоне 350-3250 нм. Спектральные исследования температурных изменений в различных слоях опухоли и прилегающих тканях в результате проведения ПФТТ показали, что различия между интактной и нагретой тканью проявляются в изменении амплитуды пиков поглощения гемоглобина и воды. Результаты позволяют оценить эффективность нагрева опухолевой ткани на различных глубинах и могут быть полезны для точной дозиметрии фототермической терапии.

Результаты, представленные в главе, опубликованы в следующих работах:

1. **Genin V.D.**, Bucharskaya A.B., Terentyuk G.S., Khlebtsov N.G., Navolokin N.A., Tuchin V.V., Genina E.A. Changes in Optical Properties of Model Cholangiocarcinoma after Plasmon-Resonant Photothermal Treatment // *Photonics*. - 2022. - Vol. 9. - P. 199.
2. Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н., Чехонацкая М.Л., Захарова Н.Б., Терентюк Г.С., Наволокин Н.А., Хлебцов Б.Н., Хлебцов Н.Г., **Генин В.Д.**, Башкатов А.Н., Генина Э.А., Тучин В.В. К вопросу об эффективности плазмонной фототермической терапии экспериментальных опухолей // *Оптика и спектроскопия*. – 2020. - Т. 128(6). - С. 846-851.
3. **Genin V.D.**, Genina E.A., Bucharskaya A.B., Chekhonatskaya M.L., Terentyuk G., Tuchina D.K., Khlebtsov N.G., Tuchin V.V., Bashkatov A.N. Study of Tumour and Surrounding Tissue Heating with Near-Infrared Radiation after the Injection of Gold Nanoparticles into the Tissue // *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. – 2018. - Vol. 4(1). - P. 010505.

4. **Vadim D. Genin**, Alla B. Bucharskaya, Elina A. Genina, Georgy S. Terentyuk, Nikolai G. Khlebtsov, Valery V. Tuchin, Alexey N. Bashkatov. Optical properties of model cholangiocarcinoma tissues in the spectral range of 350-2250 nm in laser photothermolysis treatment // Proc. SPIE. – 2021. - Vol. 11845. – P. 118450Z.
5. Alla Bucharskaya, Galina Maslyakova, Marina Chekhonatskaya, Svetlana Pakhomy, Dmitry Mudrak, Nikita Navolokin, Georgy Terentyuk, Ekaterina Borisova, Vanya Mantareva, Ivan Angelov, Boris Khlebtsov, Nikolai Khlebtsov, **Vadim Genin**, Alexey Bashkatov, Elina Genina, Valery Tuchin. The assessment of tumor vascularization degree for predicting the effectiveness of plasmonic photothermal and photodynamic therapy // Proc. SPIE 11845, Saratov Fall Meeting 2020: Optical and Nanotechnologies for Biology and Medicine. – 2021. - Vol. 11845. – P. 1184508.
6. Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N., Chekhonatskaya M.L., Zakharova N.B., Terentyuk G.S., Navolokin N.A., Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G., **Genin V.D.**, Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V. The evaluation of tumor vascularization as a prognostic factor of plasmonic photothermal therapy efficiency // 2020 International Conference Laser Optics (ICLO), St. Petersburg, Russia, 2020, pp. 1-1.
7. **Genin V.D.**, Genina E.A., Bucharskaya A.B., Tuchin V.V., Khlebtsov N.G., Terentyuk G.S., Bashkatov A.N. Investigation of change of tumor optical properties after laser-induced plasmon-resonant photothermal treatment of transplanted tumors in rats // Proc. SPIE. – 2018. - Vol. 10716. - P. 107160Z.
8. **Генин В.Д.**, Башкатов А.Н., Генина Э.А., Бучарская А.Б., Тучина Д.К., Хлебцов Н.Г., Тучин В.В.. Исследование кинетики нагрева опухолей и окружающих тканей излучением ближнего ИК спектрального диапазона при введении в ткань золотых наночастиц // XV Всероссийский молодежный Самарский конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике: сборник трудов конференции, (Самара, 14–18 ноября 2017 г.). – Москва: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук, С. 85-91, 2017.
9. **Генин В.Д.**, Генина Э.А., Бучарская А.Б., Тучина Д.К., Хлебцов Н.Г., Тучин В.В., Башкатов А.Н. Анализ кинетики нагрева раковых опухолей крыс излучением ближнего ИК спектрального диапазона при внутривенном введении золотых наностержней // Проблемы оптической физики и биофотоники SFM- 2017. Материалы 5-го Международного симпозиума и 21-ой Международной молодежной научной школы Saratov Fall Meeting 2017. (Под редакцией Г. В. Симоненко, В. В. Тучина). Саратов, Изд-во "Новый ветер", С. 39-43, 2017.

ГЛАВА 3. Иммерсионное оптическое просветление тканей кожи

Для разработки и оптимизации методов оптического просветления кожи при проведении процедуры ПФТТ необходимо знание механизмов взаимодействия исследуемых иммерсионных агентов с кожей и значений эффективных коэффициентов диффузии.

3.1. Исследование изменения структурных и оптических параметров тканей кожи под действием гиперосмотических иммерсионных агентов

3.1.1. Методика исследования изменения структурных и оптических параметров тканей кожи под действием гиперосмотических иммерсионных агентов

Для исследования кинетики изменения каждого из оптических (коллимированное пропускание) и структурных (веса, толщины и площади) параметров в качестве экспериментальных объектов использовалось по 10 образцов кожи белых лабораторных крыс *ex vivo*, всего 270 образцов (вес и толщина измерялись последовательно у одних и тех же образцов). Предварительно с поверхности тела крыс с помощью крема-депилятора «*Veet*» (*Reckitt Benckiser*, Франция) тщательно удалялся волосяной покров. При помощи хирургических ножниц вырезались участки кожи размером приблизительно 10×15 мм². Подкожный жировой слой, являющийся препятствием для проникновения гидрофильных веществ в дерму, тщательным образом удалялся. Толщина образцов измерялась микрометром с точностью ± 10 мкм: каждый образец помещался между предметными стеклами, после чего толщина измерялась в пяти точках; результаты усреднялись.

В связи с тем, что образцы кожи имели неправильную форму, для точного определения площади они помещались на тест-объект со шкалой и фотографировались с помощью цифровой камеры. Определение площади образцов происходило по следующему алгоритму:

1. При помощи масштабной линейки вычислялся коэффициент перехода от линейных размеров в пикселях к линейным размерам в мм, и вычислялся размер всего изображения в мм² (само изображение линейки при этом удалялось с изображения).

2. Полноцветное изображение (см. рисунок 3.1a) раскладывалось на три компоненты: красную, зеленую и синюю.

3. Поскольку яркость пикселей фона (при анализе синей компоненты изображения) выше, чем яркость пикселей образца кожи, то всем пикселям с определенной пороговой яркостью (в нашем случае лежащей в диапазоне 190-200 ед.) присваивалось значение 255.

4. Подсчитывалось число пикселей со значениями отличными от 255 и с помощью коэффициентов перехода вычислялась площадь образца кожи.

Изображение образца биоткани на тест-объекте и результат цифровой обработки этого изображения представлены на рисунке 3.1.

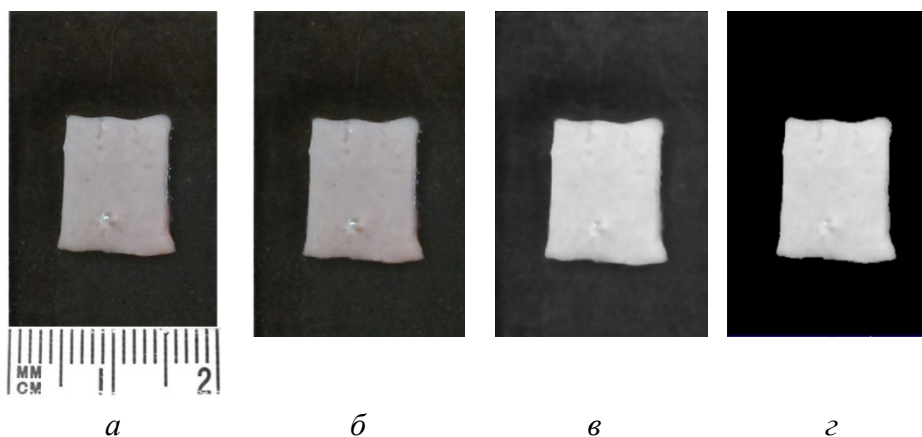


Рисунок 3.1. Типичное цифровое изображение образца кожи на тест-объекте с масштабной шкалой (а), синяя компонента цифрового изображения образца кожи (б), обработанная медианным фильтром синяя компонента изображения (в), результат цифровой обработки изображения (г)

Весовые измерения проводились на электронных весах (*SCIENTECH, SA210*, США) с точностью ± 1 мг.

Толщина, площадь и вес образцов измерялись до помещения образцов в ОПА и через каждые 5-10 мин после помещения их в чашку Петри, заполненную ОПА, в течение 1.5-3 часов. Для этого образцы вынимались из чашки Петри, излишки агента аккуратно удалялись с поверхности фильтровальной бумагой, после чего происходило измерение одного из параметров.

Полученные в процессе действия иммерсионных агентов временные зависимости толщины, веса и площади образцов кожи нормировались на значения, измеренные в начальный момент времени (т.е. до помещения кожи в раствор) и усреднялись по всем образцам.

Затем экспериментальные данные аппроксимировались двухэкспоненциальным уравнением, первая часть которого описывает кинетику дегидратации ткани, а вторая - кинетику ее набухания [280]:

$$B_{norm}(t) = \frac{B(t)}{B(t=0)} = A_D \exp\left(-\frac{t}{\tau_w}\right) + B_S \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_g}\right)\right) + y_0, \quad (3.1)$$

где $B(t)$ и $B(t=0)$ – значение измеренной величины в момент времени t и $t=0$, соответственно; A_D и B_S – максимальная степень дегидратации/сжатия и набухания образца, соответственно; τ_w – характеристическое время дегидратации; τ_g – характеристическое время набухания ткани; y_0 – наименьшее значение величины, которое может быть достигнуто.

Для оптических измерений использовалось 90 образцов кожи крысы *ex vivo*. В качестве ОПА использовались водные растворы глицерина («Реахим», Россия) с объемными концентрациями 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 и 100%. Показатели преломления исследуемых ОПА, измеренных с помощью рефрактометра Аббе (*Atago DR-M2/1550*, Япония) на длинах волн: 450, 480, 486, 546, 589, 644, 656, 680 и 930 нм. Погрешность измерений составила ± 0.0001 . Измерения проводились при комнатной температуре ($\sim 20^\circ\text{C}$).

При расчётах использовалось следующее представление зависимости от длины волны, температуры и плотности функции Лоренца-Лоренца для водных растворов глицерина [281]:

$$\frac{n^2 - 1}{n^2 + 1} \frac{1}{\rho^*} = a_0 + a_1 \rho^* + a_2 T^* + a_3 \lambda^{*2} T^* + \frac{a_4}{\lambda^{*2}} + \frac{a_5}{\lambda^{*2} - \lambda_{UV}^{*2}} + \frac{a_6}{\lambda^{*2} - \lambda_{IR}^{*2}} + a_7 \rho^{*2}, \quad (3.2)$$

где n – это показатель преломления растворов глицерина, $\rho^* = \rho/\rho_0$ – относительная плотность растворов глицерина, $\rho_0 = 1$ г/мл, $\lambda^* = \lambda/\lambda_0$ – относительная длина волны, $\lambda_0 = 589$ нм, $\lambda_{UV} = 229.202$ нм, $\lambda_{IR} = 5432.937$ нм, λ – длина волны (нм), $T^* = T/T_0$ относительная температура растворов глицерина, $T_0 = 273.15$ К. Плотность растворов глицерина ρ представлена в [282].

Аппроксимация дисперсионных зависимостей измеренных показателей преломления получена при условии, что функция стандартного отклонения (sd) равна:

$$sd = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^N (n_{calc\ i} - n_{exp\ i})^2}{N \cdot (N - 1)}} < 0.001,$$

где n_{calc} – расчётное значение, а n_{exp} – измеренное значение показателя преломления, N – количество точек. Коэффициенты $a_0 \dots a_7$ использовались для получения дисперсионной зависимости расчетного значения показателя преломления.

При исследовании взаимодействия ОПА с образцами кожи предполагалось, что в результате этого взаимодействия изменяется только показатель преломления внутритканевой жидкости образца, вследствие диффузии в биоткань иммерсионной жидкости и осмотического оттока воды из биоткани. При диффузии внутрь биоткани вещества с показателем преломления большим, чем у внутритканевой жидкости, и оттока воды из биоткани происходит согласование показателей преломления рассеивателей и внутритканевой жидкости, что приводит к уменьшению коэффициента рассеяния биоткани. Исследование кинетики данного процесса позволяет оценить коэффициент диффузии как меру средней скорости обменного потока осмотической жидкости в биоткань и воды из биоткани.

Для измерения коллимированного пропускания использовалась установка, состоящая из источника излучения – галогенной лампы *HL-2000* (*Ocean Optics*, США), оптических волокон *P400-1-UV-VIS* (*Ocean Optics*, США), подводящих излучение к образцу биоткани и собирающих излучение, прошедшее через образец, кюветы с образцом, спектрометра *USB4000-Vis-NIR* (*Ocean Optics*, США) и компьютера. Схема установки представлена на рисунке 3.2. Для измерения коллимированного пропускания образцы биоткани закреплялись на пластиковом держателе размером 38×17 мм² с отверстием 8×8 мм² и помещались в стеклянную кювету объемом 5 мл между двумя волоконно-оптическими кабелями с внутренним диаметром 400 мкм. Одно волокно служило для доставки излучения к образцу, а другое – для сбора прямо прошедшего излучения. Для обеспечения коллимированности пучка на торцах волокон с помощью стандартных разъемов *SMA-905* закреплялись коллиматоры *74-ACR* (*Ocean Optics*, США).

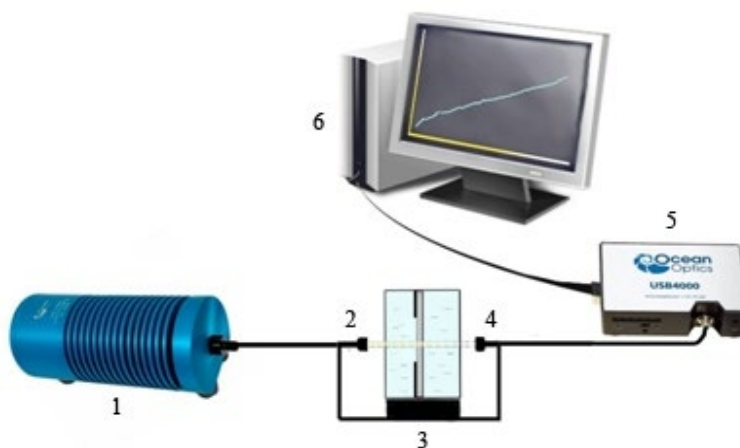


Рисунок 3.2. Схема экспериментальной установки для измерения коллимированного пропускания образца кожи: 1 - источник света *HL-2000*; 2, 4 - оптическое волокно с коллиматором; 3 - кювета с зафиксированным в держателе образцом; 5 - спектрометр *USB-4000-Vis-NIR*; 6 - персональный компьютер.

Кинетика изменения коллимированного пропускания регистрировалась путем последовательной записи спектров коллимированного пропускания в диапазоне 500-900 нм каждые 5-10 минут в течение 1.5-3 часов. Для нормировки перед началом измерений регистрировался сигнал сравнения от кюветы, заполненной ОПА, с держателем без образца кожи. Все измерения проводились при комнатной температуре ($\sim 20^\circ\text{C}$).

3.1.2. Анализ изменения структурных и оптических параметров тканей кожи под действием водных растворов глицерина

На рисунке 3.3 показаны спектральные зависимости показателя преломления для различных растворов глицерина. В таблице 3.1 приведены коэффициенты аппроксимации. Желтая звездочка на рисунке 3.3 соответствует показателю преломления гидратированных коллагеновых волокон стромы бычьего глаза [155] на длине волны 589 нм, который можно считать близким к показателю преломления кожных дермальных гидратированных коллагеновых волокон. Хорошо видно, что значения показателя преломления 60%-ного раствора глицерина и гидратированных коллагеновых волокон, которые являются основными рассеивателями кожи, близки.

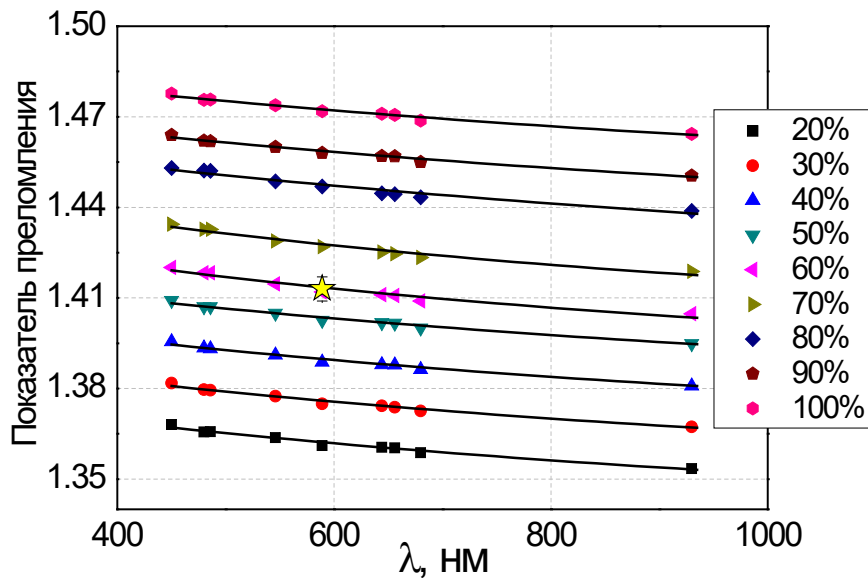


Рисунок 3.3. Спектральные зависимости показателя преломления водных растворов глицерина с объемными концентрациями 20-100%. Символами обозначены измеренные значения, сплошными кривыми - результаты аппроксимации. Желтая звездочка соответствует показателю преломления гидратированных коллагеновых волокон [155]

На рисунке 3.4 представлена типичная кинетика коллимированного пропускания образцов кожи в спектральном диапазоне 500–900 нм в течение часа. Для демонстрации типичной кинетики коллимированного пропускания были взяты образцы примерно одинаковой начальной толщины: 0.48 ± 0.06 мм. Различия в начальном значении T_c связаны с отклонениями начальной толщины образцов.

Таблица 3.1. Коэффициенты аппроксимации спектральных зависимостей показателя преломления растворов глицерина.

Объемные концентрации растворов глицерина, %	a_0	a_1	a_2	a_3	a_4	a_5	a_6	a_7
20	0.23304	0.02259	-7.44072×10^{-3}	-1.02323×10^{-3}	3.97165×10^{-3}	204.91333	1.15585×10^5	-0.02928
30	0.23347	0.02308	-7.03981×10^{-3}	-9.60732×10^{-4}	3.90605×10^{-3}	180.25039	1.02105×10^5	-0.02874
40	0.23495	0.02449	-5.66769×10^{-3}	-9.28124×10^{-4}	3.76466×10^{-3}	102.57688	5.7761×10^4	-0.03263
50	0.2351	0.02467	-5.52392×10^{-3}	-9.04449×10^{-4}	3.56885×10^{-3}	93.84297	5.32739×10^4	-0.031
60	0.23478	0.02444	-5.82156×10^{-3}	-8.90412×10^{-4}	4.22806×10^{-3}	112.00016	6.48547×10^4	-0.02978
70	0.23461	0.02434	-5.97733×10^{-3}	-8.82573×10^{-4}	4.14344×10^{-3}	118.85235	6.63277×10^4	-0.0274
80	0.23608	0.02559	-4.61197×10^{-3}	-9.48082×10^{-4}	3.42699×10^{-3}	43.46239	2.48359×10^4	-0.02859
90	0.23654	0.02598	-4.18337×10^{-3}	-8.01167×10^{-4}	2.9191×10^{-3}	19.30733	1.08464×10^4	-0.02916
100	0.23634	0.02583	-4.36646×10^{-3}	-7.86929×10^{-4}	2.76153×10^{-3}	29.66142	1.69687×10^4	-0.02703

Эффект согласования показателей преломления, вызванный проникновением глицерина в внутритканевую жидкость и одновременным осмотическим обезвоживанием кожи, влечет увеличение коллимированного пропускания образцов. Хорошо видно, что степень оптического просветления увеличивается с увеличением концентрации глицерина, за исключением высококонцентрированных растворов (80-100% растворы глицерина вызывают примерно одинаковую степень оптического просветления). При этом кинетика оптического просветления в случае используемых растворов сложная. Как видно на рисунке 3а-в, при концентрациях глицерина от 20 до 40% T_c достигает максимального значения, а затем уменьшается. С увеличением концентрации время достижения максимальной прозрачности сокращается, но степень уменьшения значения T_c увеличивается.

Кинетика коллимированного пропускания хорошо согласуется с кинетикой толщины образца, представленной на рисунке 3.5а. Хорошо видно, что уменьшение средней толщины образцов сменяется увеличением при использовании растворов 20-40%. Этот эффект усиливается с концентрацией и максимален при выдержке образцов в 40% растворе глицерина: при такой концентрации раствора увеличение толщины образцов происходит примерно на 9%. Это может быть связано с вязкостью данного раствора глицерина, которая экспоненциально увеличивается с ростом концентрации. При концентрации 20-40% динамическая вязкость увеличивается незначительно (с 1.76 до 3.72 мПа·с при 20°C, см. рис. 1.2б), а глицерин беспрепятственно проникает в внутритканевую жидкость кожи.

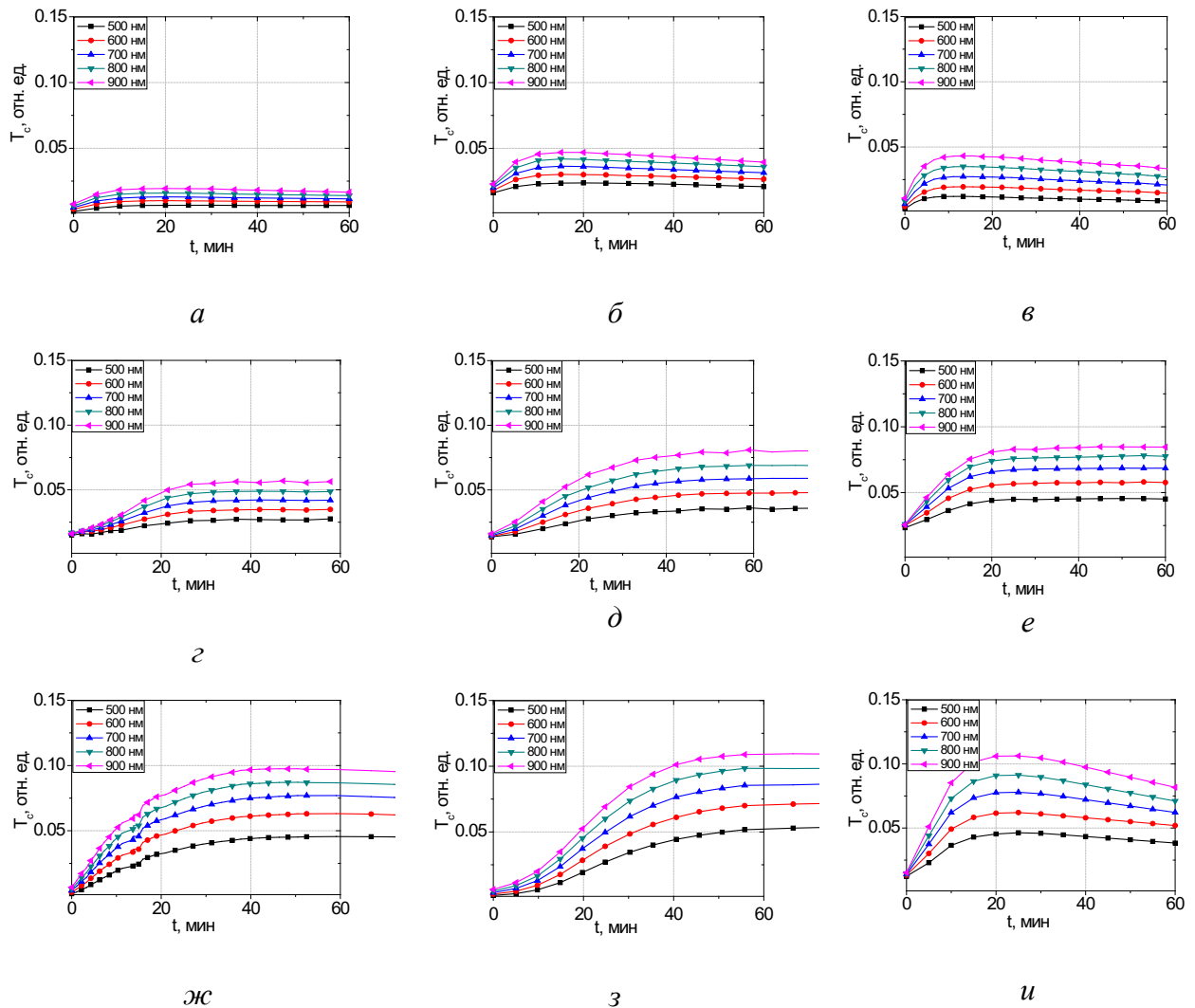
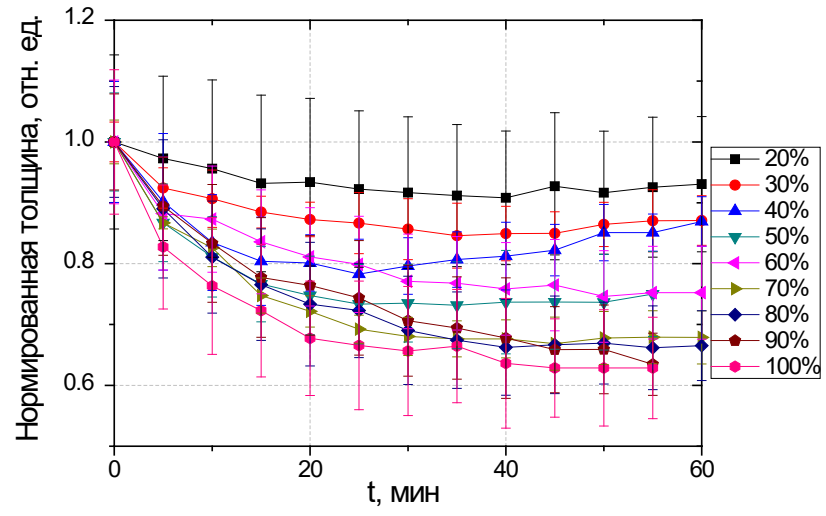
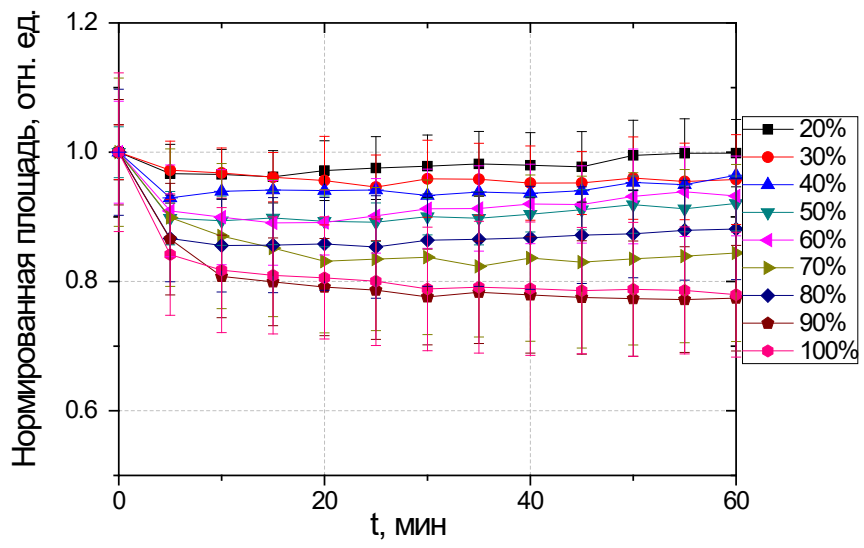


Рисунок 3.4. Типичные временные зависимости коллимированного пропускания кожи крысы *ex vivo* под действием водных растворов глицерина с различными объемными концентрациями а) 20%, б) 30%, в) 40%, г) 50%, д) 60%, е) 70%, ж) 80%, з) 90%, и) 100%

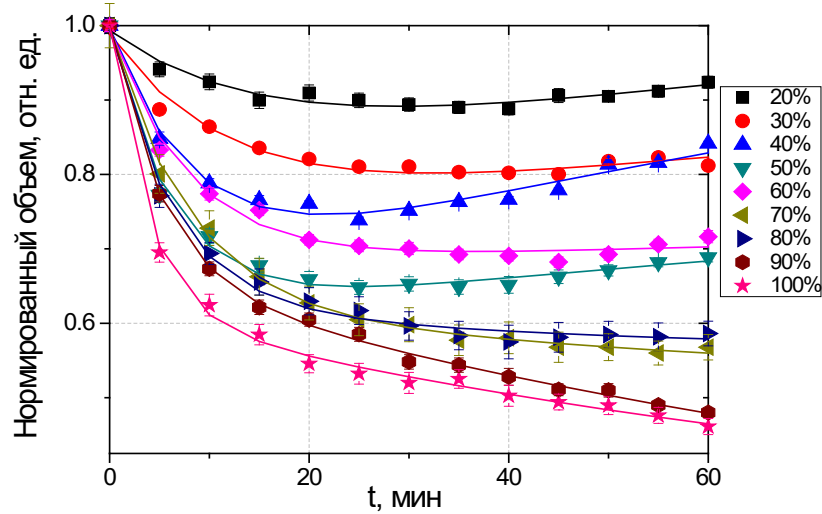
Как видно из рисунка 3.5г, характерное время обезвоживания τ_w уменьшается с увеличением концентрации, а геометрические и весовые параметры образцов имеют тенденцию к восстановлению после обезвоживания в течение часа (рисунок 3.5, 3.6 и таблицы 3.2, 3.3). Такое восстановление может быть вызвано также гигроскопичностью глицерина. Растворы глицерина при любой концентрации поглощают или отдают влагу до тех пор, пока концентрация раствора не будет уравновешена с влажностью окружающей среды. Известно, что каждая молекула глицерина может связывать шесть молекул воды [283]. Таким образом, глицерин, диффундирующий внутри ткани, удерживает воду и вызывает набухание.



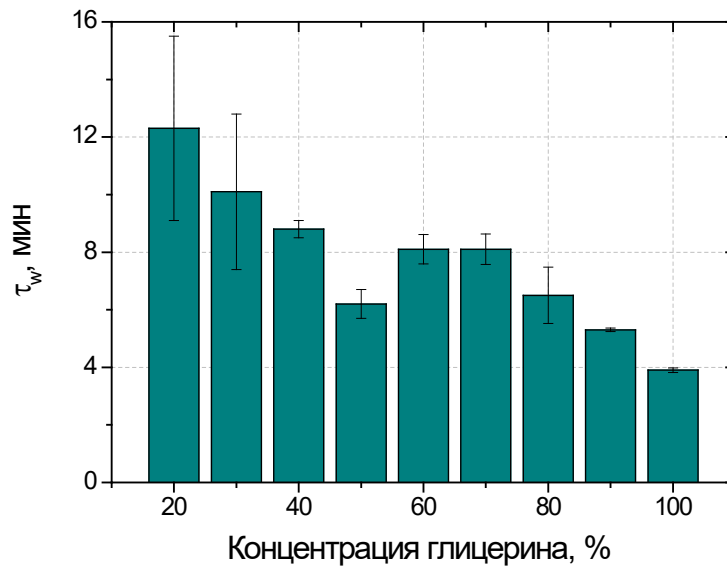
a



б



в



г

Рисунок 3.5. Нормированная усредненная кинетика геометрических параметров кожи крысы *ex vivo* под действием водных растворов глицерина с объемными концентрациями 20-100% (а-в) и концентрационная зависимость характеристического времени дегидратации образцов, рассчитанная из аппроксимационных зависимостей нормализованного объема (г). Параметры усредняли по десяти образцам для каждой концентрации

Растворы с концентрацией глицерина 50 и 60% характеризуются динамической вязкостью 6.0 и 10.8 мПа·с (см. рис. 1.2б) соответственно и демонстрируют переход от процесса обмена к преимущественному обезвоживанию (рис. 3.5 и табл. 3.2). Набухание

образцов кожи после воздействия 50 и 60%-ных растворов глицерина составляет всего лишь 5% и 3% соответственно (рис. 3.5в), что не оказывает влияния на кинетику коллимированного пропускания (рис. 3.4г, д).

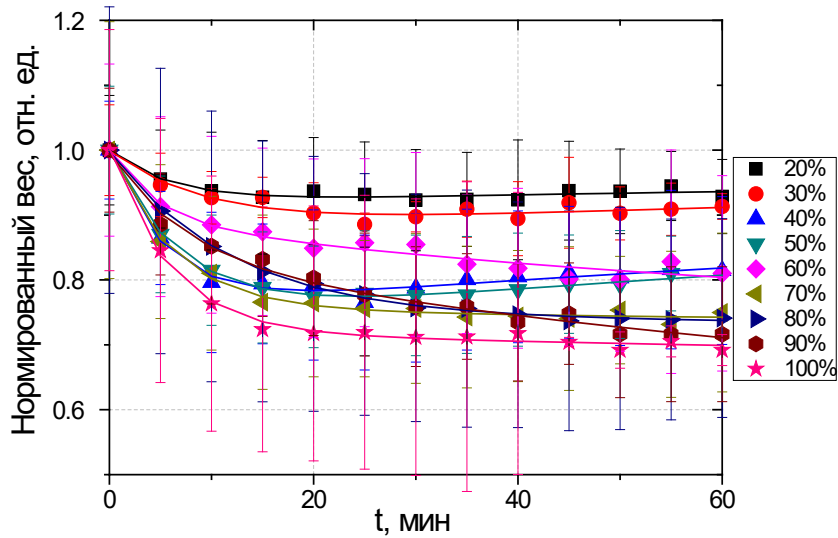
Группа растворов с концентрацией глицерина 70-90% показывает уменьшение продолжительности процесса дегидратации (рис. 3.4е-з и 3.5з). Вязкость растворов высокая (от 22.5 до 219 мПа·с, см. рис. 1.2б), поэтому диффузия глицерина в кожу затруднена, но скорость диффузии воды увеличивается под действием осмотического давления. В работе [223] показано, что при температуре 300°К отношение коэффициента диффузии воды к коэффициенту диффузии глицерина в смесях глицерин-вода увеличивается с 2.5 до 5 при увеличении мольной доли глицерина с 0.14 до 50% (50% соответствует массовой доле глицерина, равной 0.84). Коэффициент взаимной диффузии смесей глицерин-вода экспоненциально уменьшается с 1.025×10^{-9} до 0.014×10^{-9} м²/с с увеличением значения мольной доли глицерина в смесях от 0 до 1 [284]. Подвижность молекул воды значительно выше, чем у молекул глицерина, поэтому дегидратация становится преобладающим процессом во время наблюдения. Набухания ткани не наблюдается (рис. 3.5 и табл. 3.2). В таблице 3.2 коэффициент B_s становится отрицательным, что соответствует дальнейшей дегидратации образцов. Характерное время этого процесса τ_s увеличивается с увеличением концентрации глицерина из-за увеличения сжатия ткани и, как следствие, плотности ткани, а также извилистости путей движения молекул воды в ткани.

Таблица 3.2. Параметры аппроксимации кинетики усредненных значений объема образцов кожи крысы *ex vivo* под действием водных растворов глицерина с объемными концентрациями 20-100%.

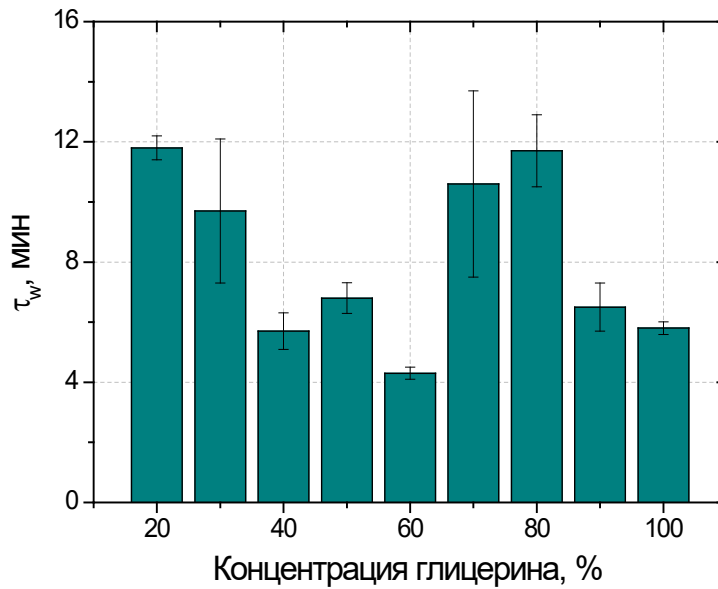
Конц., %	A_D	sd (A_D)	τ_w , мин	sd (τ_w)	B_s	sd (B_s)	τ_g , мин	sd (τ_g)	y_0	sd(y_0)
20	0.15	0.01	12.3	3.2	0.19	0.07	120.2	19.3	0.85	0.01
30	0.23	0.04	10.1	2.7	0.20	0.10	123.5	9.2	0.76	0.04
40	0.36	0.01	8.8	0.3	0.51	0.02	123.4	0.9	0.63	0.01
50	0.38	0.01	6.2	0.52	0.18	0.01	120.0	8.5	0.61	0.001
60	0.32	0.01	8.1	0.51	0.07	0.02	101.0	10.0	0.64	0.04
70	0.38	0.002	8.1	0.53	-0.13	0.004	96.7	5.8	0.62	0.001
80	0.37	0.01	6.5	0.98	-0.13	0.004	95.0	7.1	0.63	0.01
90	0.34	0.003	5.3	0.06	-0.46	0.05	120.1	19.8	0.66	0.003
100	0.39	0.01	3.9	0.08	-0.39	0.02	132.5	6.4	0.61	0.01

Особое место занимает группа образцов, погруженных в чистый глицерин (100%). Глицерин имеет колоссальную динамическую вязкость (1410 мПа·с, см. рис. 1.2б), в связи с чем можно считать, что в течение часа он практически не проникает в ткани и основной причиной оптического просветления является обезвоживание. Однако кинетика T_c (рис. 3.4и)

демонстрирует значительное увеличение в течение 10-20 мин. для разных образцов, а затем значительное уменьшение. При этом толщина и объем образцов монотонно уменьшаются до $39\pm 8\%$ и $54\pm 1\%$ соответственно от исходных значений (рис. 3.5а,в).



a



б

Рисунок 3.6. Нормированная усредненная кинетика веса образцов кожи крысы *ex vivo* под действием водных растворов глицерина с объемными концентрациями 20-100% (а) и концентрационная зависимость характеристического времени обезвоживания образца, рассчитанная путем аппроксимации нормированных весовых зависимостей (б). Вес усреднялся по десяти образцам для каждого значения концентрации

В этом случае уменьшение коллимированного пропускания может быть связано с увеличением объемной доли рассеивателей в зоне детектирования, вызванной сильным обезвоживанием. Слабая иммерсия глицерина в ткань не позволяет компенсировать этот эффект.

Уменьшение площади образцов наблюдается сразу после погружения образца в раствор любой концентрации (рис. 3.5б) и обусловлено процессом дегидратации. Усадка образцов делает ткань более жесткой и шероховатой. Диффузия глицерина в ткань восстанавливает ее мягкость и вызывает разглаживание, поэтому площадь образцов увеличивается. В растворах с 90 и 100% глицерина жесткость и шероховатость образцов сохраняются в течение часа.

Рисунок 3.6 и Таблица 3.3 показывают, что кинетика веса образцов кожи хорошо согласуется с другими результатами. Уменьшение веса на первом этапе, вызванное дегидратацией, и частичное восстановление параметра наблюдается только в случае образцов, погруженных в 20-50%-ные растворы глицерина. Начиная с 60%-ного раствора, обезвоживание становится преобладающим процессом. Концентрационные зависимости характерного времени дегидратации τ_w , рассчитанные путем аппроксимирования нормированных зависимостей объема и веса, хорошо согласуются (рис. 3.5б и 3.6б).

Таблица 3.3. Параметры аппроксимации кинетики усредненных значений веса образцов кожи крысы *ex vivo* под действием водных растворов глицерина с объемными концентрациями 20-100%.

Конц., %	A_D	sd (A_D)	τ_w , мин	sd (τ_w)	B_S	sd (B_S)	τ_g , мин	sd (τ_g)	y_0	sd(y_0)
20	0.09	0.01	11.8	0.4	0.07	0.004	138.1	15.3	0.91	0.001
30	0.13	0.01	9.7	2.4	0.09	0.05	103.8	22.1	0.87	0.01
40	0.26	0.003	5.7	0.51	0.15	0.02	88.3	19.5	0.75	0.004
50	0.30	0.001	6.8	0.61	0.13	0.01	113.7	6.9	0.73	0.001
60	0.11	0.003	4.3	0.2	-0.15	0.01	68.5	6.9	0.89	0.01
70	0.17	0.01	10.6	3.1	-0.08	0.05	108.6	18.3	0.83	0.01
80	0.25	0.004	11.7	1.2	-0.09	0.01	95.3	14.8	0.76	0.04
90	0.15	0.01	6.5	0.8	-0.31	0.02	106.2	20.4	0.84	0.01
100	0.82	0.001	5.8	0.21	-0.07	0.02	160.4	44.6	0.72	0.001

В работе [290] был предложен следующий механизм набухания коллагеновых волокон: молекулы глицерина выталкивают воду, связанную с коллагеном. Нарушение сети водородных связей происходит из-за того, что у молекул глицерина, связанных с коллагеном гидроксильными группами, выступают гидрофобные части (CH_2 -группы), что препятствует образованию новых водородных связей. Это приводит к набуханию фибриллярного белка [241, 290]. Было также показано, что относительное увеличение объема коллагенового пептида является максимальным при использовании 40%-ного раствора глицерина [290];

эффективность оптического просветления [225] и глубина проникновения света, измеренная с помощью ОКТ [285], были максимальными в случае 60 и 70%-ных растворов глицерина соответственно. Эти данные хорошо согласуются с результатами данной работы. Замена молекул воды в гидратной оболочке на глицерин, по-видимому, увеличивает показатель преломления коллагеновых волокон. Однако, поскольку поверхность коллагена имеет конечное количество мест, подходящих для эффективного прикрепления молекул глицерина [290], коллимированное пропускание не увеличивается при использовании растворов с концентрацией 60-70%. Увеличение коллимированного пропускания при концентрациях выше 70% может быть вызвано уменьшением толщины ткани из-за высокой степени обезвоживания (рис. 3.5a), что не способствует повышению эффективности оптического просветления ткани.

3.2. Определение эффективных коэффициентов диффузии водных растворов глицерина в тканях кожи

Процесс транспорта иммерсионных жидкостей в фиброзных тканях может быть описан в рамках модели свободной диффузии со следующими допущениями [286]:

1) имеет место только концентрационная диффузия, т.е. обменный поток иммерсионной жидкости в биоткань и воды из биоткани в данной точке пропорционален градиенту концентрации просветляющего агента в этой точке;

2) коэффициент диффузии постоянен во всех точках внутри исследуемого образца биоткани.

Объектом исследования стали 60 образцов кожи белых лабораторных крыс *ex vivo* (по 10 образцов для исследования свойств каждого из шести растворов глицерина). Подготовка образцов происходила аналогичным описанному в разделе 3.1.1 способом.

В качестве ОПА использовались водные растворы глицерина («Реахим», Россия) с объемными концентрациями 30, 50, 60, 70, 85 и 100%.

Для измерения коллимированного пропускания использовалась установка, описанная в разделе 3.1.1 (рис. 3.2).

На рисунке 3.7a представлена диаграмма зависимости эффективного коэффициента диффузии глицерина в коже от концентрации растворов глицерина. Хорошо видно, что коэффициент диффузии сначала спадает (до 70%-ой концентрации), а затем наблюдается рост коэффициента диффузии. Подобное поведение хорошо коррелирует с концентрационной зависимостью коэффициента диффузии глицерина в воде [287] и объясняется как повышением вязкости диффундирующего раствора, так и особенностями формирования гидродинамического радиуса диффундирующих молекул. Как было показано

в работе [287], гидродинамический радиус молекул глицерина для концентраций от 0 до 70% слабо зависит от концентрации глицерина и спадает для более высоких концентраций, что подтверждается данными работы [288].

Таким образом, при оптическом просветлении кожи водными растворами глицерина с концентрацией 30-70% снижение скорости диффузии глицерина связано с ростом вязкости диффундирующего раствора. Для высококонцентрированных (85-100%) растворов глицерина имеют место два конкурирующих процесса: резкое увеличение вязкости диффундирующего раствора и уменьшение гидродинамического радиуса молекул глицерина. Как видно из рисунка 3.7а, вклад второго процесса оказывается доминирующим, и мы наблюдаем рост эффективного коэффициента диффузии. Помимо этого, необходимо отметить, что, как было указано выше, эффективный коэффициент диффузии, измеренный в данном исследовании, является мерой средней скорости обменного потока гиперосмотической жидкости (раствора глицерина) в биоткань и воды из биоткани.

Максимальная эффективность оптического просветления кожи (коэффициент эффективности) вычислялась по формуле:

$$OC_{eff} = \frac{\mu_t(t=0) - \mu_t^{min}}{\mu_t(t=0)}, \quad (3.3)$$

где μ_t - коэффициент ослабления, вычисляемый при помощи закона Бугера-Ламберта из измеренной зависимости коллимированного пропускания от времени; μ_t^{min} - минимальное значение коэффициента ослабления.

В таблице 3.4 представлены вычисленные в ходе работы эффективные коэффициенты диффузии каждого из растворов глицерина, а также коэффициенты эффективности оптического просветления кожи, сгруппированные по трем спектральным диапазонам.

Таблица 3.4. Значения эффективных коэффициентов диффузии глицерина в коже и коэффициентов эффективности оптического просветления кожи.

Концентрация раствора глицерина	Толщина образцов кожи, мм	Эффективность оптического просветления в области 500-600 нм	Эффективность оптического просветления в области 600-700 нм	Эффективность оптического просветления в области 700-900 нм	Коэффициент диффузии, см ² /сек
30%	0.60±0.08	0.06±0.04	0.07±0.05	0.09±0.05	(2.8±1.1) × 10 ⁻⁶
50%	0.38±0.11	0.16±0.07	0.19±0.07	0.24±0.07	(1.04±0.5) × 10 ⁻⁶
60%	0.32±0.10	0.31±0.13	0.33±0.12	0.36±0.11	(1.1±0.6) × 10 ⁻⁶
70%	0.48±0.07	0.22±0.09	0.27±0.10	0.31±0.10	(0.9±0.7) × 10 ⁻⁶
85%	0.57±0.16	0.24±0.06	0.25±0.05	0.25±0.05	(1.8±1.1) × 10 ⁻⁶
100%	0.46±0.13	0.33±0.12	0.38±0.14	0.42±0.12	(3.2±2.2) × 10 ⁻⁶

Достаточно большие значения среднеквадратичного отклонения при определении значений коэффициентов диффузии связаны с естественным разбросом оптических и структурно-морфологических параметров образцов кожи.

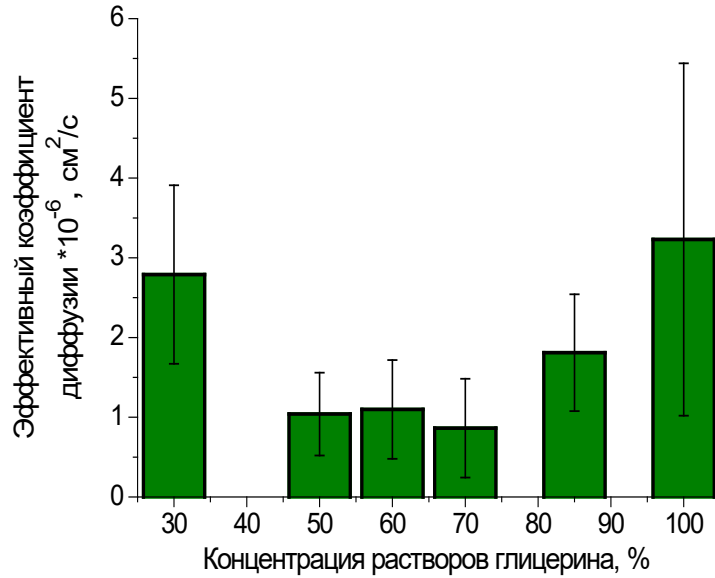
Нелинейная концентрационная зависимость эффективного коэффициента диффузии связана с переходом процесса преимущественной иммерсии при малых концентрациях глицерина в растворе к дегидратации образцов (100%), что подтверждает выводы раздела 3.1.

На рисунке 3.7б показана зависимость эффективности оптического просветления кожи от концентрации растворов глицерина. Из рисунка 3.7б следует, что большее значение эффективного коэффициента диффузии ОПА не является гарантией более эффективного оптического просветления биоткани. Среди исследуемых ОПА, несмотря на высокую скорость проникновения в биоткань, наименьшая эффективность оптического просветления наблюдается для 30%-го раствора глицерина. Это связано с тем, что хотя 30%-ый раствор глицерина является наименее вязкой жидкостью из исследуемых, в то же время он обладает и наименьшим значением показателя преломления.

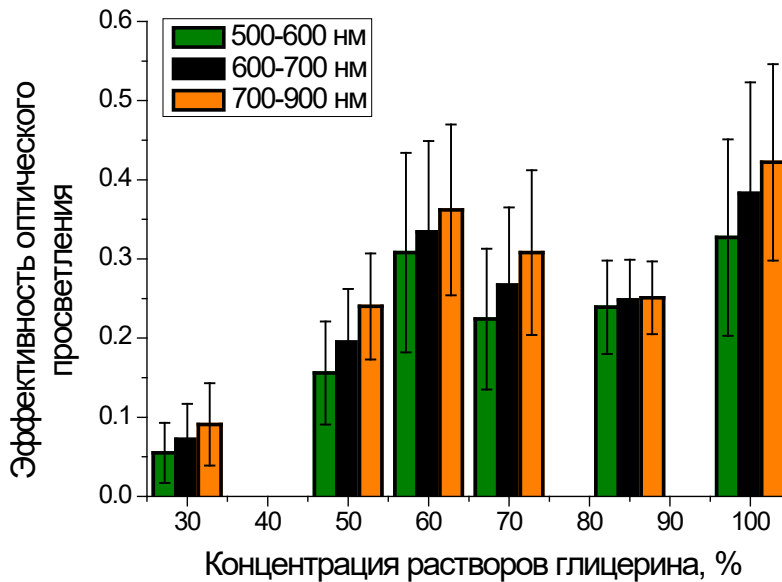
Рост коэффициента эффективности оптического просветления кожи при использовании в качестве ОПА растворов глицерина с концентрациями 30-60% объясняется всё большим (при переходе от 30% к 60%-раствору) увеличением эффективности взаимодействия молекул глицерина с молекулами коллагена являющихся основными рассеивателями кожи. Затем эффективность оптического просветления снижается. На основе проведенного молекулярного моделирования взаимодействие белковых молекул с растворами глицерина [289, 290], было показано, что для концентрации глицерина в объеме менее 50% сольватные оболочки белка имеют примерно такой же состав, как и окружающий раствор [289]. Таким образом, большинство молекул глицерина находится в прямом контакте с белком. Дальнейшее увеличение концентрации глицерина в растворе не приводит к увеличению взаимодействия молекул, т.к. все вакантные участки возможного взаимодействия молекул глицерина с молекулой коллагена заняты. Эти результаты хорошо коррелируют с данными, представленными в работах [236, 243, 285, 291, 292, 293, 294], где оптическое пропускание кожи возрастало с ростом концентрации раствора глицерина в диапазонах 30-80% [291], 40-80% [236], 50-80% [292], 20-55% [293], 40-80% [294].

Подобные результаты демонстрируются и в работах [285, 243], где использовались концентрации растворов глицерина от 50 до 90% и было показано, что наибольшая эффективность просветления принадлежит 70% раствору глицерина, в то время как при повышении и понижении концентрации эффективность просветления значительно снижается. Различие в значениях максимальной эффективности оптического просветления в

различных источниках, по-видимому, связана с тем, что при концентрации глицерина во внешнем растворе 60-70%, его концентрация во внутритканевой жидкости меньше (возможно, близка к 50%).



a



б

Рисунок 3.7. Значения эффективного коэффициента диффузии (*a*) и коэффициенты эффективности оптического просветления кожи крысы *ex vivo* в трех различных спектральных диапазонах (*б*) в зависимости от концентрации раствора глицерина. Вертикальные линии соответствуют среднеквадратичному отклонению

При значениях концентрации раствора глицерина от 85 до 100%, значение эффективности оптического просветления снова увеличивается. По-видимому, этот эффект связан с преобладанием дегидратационного механизма оптического просветления, при котором наблюдается уменьшение толщины образца кожи, вследствие его дегидратации, а следовательно, и увеличение его коллимированного пропускания.

Выводы:

В ходе исследования изменения оптических, весовых и геометрических параметров кожи крысы *ex vivo* под действием растворов глицерина с концентрацией 20-100% установлено, что для концентраций 20-40% кинетика коллимированного пропускания образцов кожи подразделяется на две стадии: на первой стадии наблюдается быстрое увеличение, а на второй - медленное снижение, а масса и объем образцов уменьшаются на первом этапе и увеличивается на втором. При более высоких концентрациях растворов двунаправленный процесс в период наблюдения сменяется однонаправленным: увеличением коллимированного пропускания и снижением значений остальных исследуемых параметров, что связано с преобладанием дегидратации ткани. Однако однонаправленный процесс дегидратации также является двухстадийным, характеризующимся разными скоростями; снижение скорости обусловлено увеличением извилистости водных путей при постепенном увеличении обезвоживания тканей. Таким образом, наблюдаемые в течение часа эффекты можно разделить на четыре группы: преимущественная иммерсия (20-40%), переход от преимущественной иммерсии к преимущественной дегидратации (50-60%), преимущественная дегидратация (70-90%) и дегидратация (100%).

Получены эффективные коэффициенты диффузии растворов глицерина в коже и значения эффективности оптического просветления. Исследования продемонстрировали, что наибольшая эффективность оптического просветления принадлежит 60-70% растворам глицерина, в то время как при повышении и понижении концентрации эффективность просветления значительно снижается.

Результаты, представленные в главе, опубликованы в следующих работах:

1. **Vadim D. Genin**, Elina A. Genina, Valery V. Tuchin and Alexey N. Bashkatov. Glycerol effects on optical, weight and geometrical properties of skin tissue // Journal of Innovative Optical Health Sciences, 2142006 (11 pages), 2021. DOI: 10.1142/S17935458214200622142006-1

2. **Genin V.D.**, Tuchina D.K., Sadeq A.J., Genina E.A., Tuchin V.V., Bashkatov A.N. *Ex vivo* investigation of glycerol diffusion in skin tissue // Journal of Biomedical Photonics & Engineering, Vol. 2(1), P. 010303-1/010303-5, 2016. DOI: 0.18287/JBPE16.02.010303
3. **Genin V.D.**, Rakotomanga P., Zaytsev S.M., Genina E.A., Lazareva E.N., Khairallah G., Amouroux M., Soussen C., Chen H., Feng W., Zhu D., Bashkatov A.N., Blondel W., Tuchin V.V. Research and development of effective optical technologies for diagnostics in dermatology // Proc. of SPIE, Vol. 11065, P. 1106505-1 – 1106505-8, 2019. DOI: 10.1117/12.2528700
4. **Genin V.D.**, Teslina N.V., Tuchina D.K., Genina E.A., Tuchin V.V., Bashkatov A.N. *Ex vivo* study of the skin geometrical parameters kinetics at the optical clearing by glycerol solutions // Представляем научные достижения миру. Естественные науки. Материалы IX научной конференции молодых ученых (Саратов, 10-11 апреля 2018 г.). – Саратов: Издательство «Саратовский источник», С. 37-41, 2018. ISBN: 978-5-91879-917-8
5. **Генин В.Д.**, Тучина Д.К., Генина Э.А., Башкатов А.Н. Исследование диффузии глицерина в тканях кожи *ex vivo* // XIII Всероссийский молодежный Самарский конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике: сборник конкурсных докладов (Самара, 11–14 ноября 2015 г.). Москва: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук, С. 451-457, 2015. ISBN 978-5-902622-28-4

ГЛАВА 4. Оптическое просветление при фототермической терапии опухолей

4.1. Методика оптического просветления кожи при плазмонно-резонансной фототермической терапии опухолей

В экспериментах использовались 11 белых лабораторных беспородных крыс-самцов весом 160-200 г с подкожно привитыми экспериментальными моделями холангиокарциномы крысы линии *PC-1* (режим содержания животных и способ работы с ними аналогичны описанным в разделе 2.1.1).

В качестве ОПА использовались 70%-ный водный раствор глицерина (G1) и смесь 70% глицерина, 10% ДМСО и 20% воды (G1@DMSO). Показатели преломления, измеренные на рефрактометре Аббе ИРФ 454Б2М (ЛОМО, Россия) составили 1.4245 и 1.4400 на длине волны 589 нм для G1 и G1@DMSO, соответственно.

ЗНС имели те же характеристики, что описаны в разделе 2.1.1.

Перед началом экспериментов животных анестезировали с помощью 0.5 мг/кг препарата «Золетил 50» (*Virbac*, Франция). На исследуемых участках кожи шерсть удалялась с помощью одноразовой безопасной бритвы.

В первой серии экспериментов исследовалось влияние различных стимулов по отдельности и в сочетании (однокомпонентный ОПА – G1 и его комбинация с лазерным облучением G1@laser, двухкомпонентный ОПА – G1@DMSO и его комбинация с лазерным облучением G1@DMSO@laser, а также лазерное облучение без ОПА – «Лазерный нагрев») на оптические параметры кожи. В первой серии экспериментов участвовало 8 здоровых крыс. У каждого животного исследовалось по 2 участка кожи размером $1.5 \times 1.5 \text{ см}^2$, расположенные по бокам симметрично относительно позвоночника, которые случайным образом разделялись на 5 групп. Перед началом экспериментов во всех группах регистрировалось ОКТ-изображение интактных участков. Контрольные исследования включали I группу: на поверхность кожи наносился G1, II группу: на поверхность кожи наносился G1@DMSO и III группу: кожа подвергалась лазерному облучению на длине волны 808 нм, мощностью $1 \pm 0.25 \text{ Вт}$ с помощью лазера *LS-2-N-808-10000* (*Laser Systems, Ltd.*, Россия). В IV и V группах на поверхность кожи наносился G1 или G1@DMSO, соответственно, и проводилось облучение. Объём наносимого ОПА составлял 1 мл. Мощность излучения в группах, подвергнутых лазерному воздействию (III-V), регулировалась оператором таким образом, чтобы поддерживать приблизительно одинаковую температуру на поверхности кожи животных в диапазоне 40-41°C. Средняя мощность составляла $0.9 \pm 0.2 \text{ Вт}$, при этом средняя температура на поверхности кожи достигала $40.7 \pm 0.4^\circ\text{C}$. Для каждого животного мощность облучения в течение всего

эксперимента оставалась постоянной. Мониторинг температуры проводился непрерывно с помощью ИК-визуализатора *IRI4010 (IRYSYS, Великобритания)*. Для мониторинга состояния кожи использовался спектральный оптический когерентный томограф *OCP930SR (Thorlabs, США)* с центральной длиной волны излучения 930 ± 5 нм; спектральной шириной 100 нм; продольным и поперечным разрешением 6.2 и 9.6 мкм (на воздухе), соответственно; и длиной сканирования 2 мм. Сканирование проводилось каждые 2 мин. Общее время мониторинга составило 15 мин. При использовании только ОПА (I и II группы) животное находилось на предметном столе ОКТ всё время эксперимента. В группах с использованием лазерного облучения (III-V группы) предметный стол с животным смещался для поочерёдного облучения и ОКТ-сканирования, при этом лазерное облучение прерывалось на время ОКТ-сканирования (10-20 с).

Во второй серии экспериментов участвовало три крысы с модельными опухолями. При достижении опухолями объема ≥ 3 см³ двум крысам за час до эксперимента в трех точках опухоли вводилась суспензия ЗНС со скоростью введения 0.1 мл/мин. Общий объём введённой суспензии составил 1 мл с концентрацией ЗНС 400 мкг/мл. Этот метод введения приводит к накоплению и удержанию наночастиц в опухоли [295]. Таким образом, концентрация ЗНС из расчета на объём опухоли (около 3 см³) составила около 133 мкг/см³.

Перед процедурой ПФТТ на поверхность кожи над опухолью одной из крыс наносился ОПА Gl@DMSO объёмом 1 мл и проводилось лазерное облучение мощностью 1 Вт в течение 10 мин, при этом плотность мощности на поверхности составляла 1.15 Вт/см². Затем мощность лазерного излучения увеличивалась до 2 Вт, и облучение продолжалось в течение ещё 15 мин, при этом плотность мощности на поверхности кожи составляла 2.3 Вт/см². Температура поверхности кожи регистрировалась каждые 0.5 мин. У второй крысы опухоль облучалась без предварительного просветления кожи в течение 15 мин также при плотности мощности 2.3 Вт/см². Третьей крысе лазерного облучения не проводилось.

До облучения и сразу после него регистрировались спектры диффузного отражения кожи над опухолью с помощью спектрометров *USB4000-Vis-NIR (Ocean Optics, США)* в спектральном диапазоне 420-1000 нм и *NIRQuest (Ocean Optics, США)* в спектральном диапазоне 930-2125 нм аналогично способу, описанному в разделе 2.2.1.

Затем все три крысы выводились из эксперимента. Опухоли удалялись и разрезались на следующие слои: кожа над опухолью, подкожный слой соединительной ткани, верхняя часть опухоли и нижняя часть опухоли.

Спектры полного пропускания и диффузного отражения образцов измерялись в диапазоне длин волн 350-2200 нм. Для спектральных измерений использовался спектрофотометр *UV-3600 (Shimadzu, Япония)* с интегрирующей сферой *LISR-3100 (Shimadzu,*

Япония). Подготовка образцов и измерение спектров проводились аналогично способу, описанному в разделе 2.2.1.

Оптический коэффициент ослабления света под действием различных стимулов оценивался на основе результатов ОКТ-сканирования в соответствии с моделью однократного рассеяния [296]:

$$R(z) = A \exp(-\mu_t z) + B, \quad (4.1)$$

где $R(z)$ – ОКТ-сигнал; A – коэффициент пропорциональности, равный $P_0 \alpha(z)$; P_0 – оптическая мощность пучка, падающего на поверхность ткани; $\alpha(z)$ – отражательная способность биоткани на заданной глубине, определяемая локальным показателем преломления и локальной способностью биоткани рассеивать свет назад; $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ – коэффициент ослабления света; μ_a – коэффициент поглощения света; μ_s – коэффициент рассеяния света в биоткани; B – фоновый сигнал.

На рисунке 4.1 представлены методики оценки коэффициента ослабления в случае, когда ОКТ А-скан аппроксимировался одной экспоненциальной зависимостью, и когда двумя. Прямоугольником отмечена область усреднения ОКТ-сигнала (51 А-скан), который выбирался в области интереса. На рисунке 4.1а представлено типичное изображение интактной кожи, однако данный подход можно было применить как к участкам, подвергнутым воздействию ОПА и лазерного излучения по отдельности, так и к комбинации Gl@laser. В результате воздействия Gl@DMSO@laser в верхней и средней частях дермы происходили такие изменения ОКТ-сигнала, что его невозможно было аппроксимировать одноэкспоненциальной зависимостью, таким образом, возникла необходимость использовать для аппроксимации сигнала две экспоненты (рис. 4.1б).

Для оценки значения μ_t в качестве экспоненциального параметра, который наилучшим образом соответствует кривой, использовался нелинейный метод наименьших квадратов [297, 298]. Значения μ_t определялись для каждого животного, усреднялись по группам и нормировались на начальное значение. Для каждого среднего значения рассчитывалось стандартное отклонение.

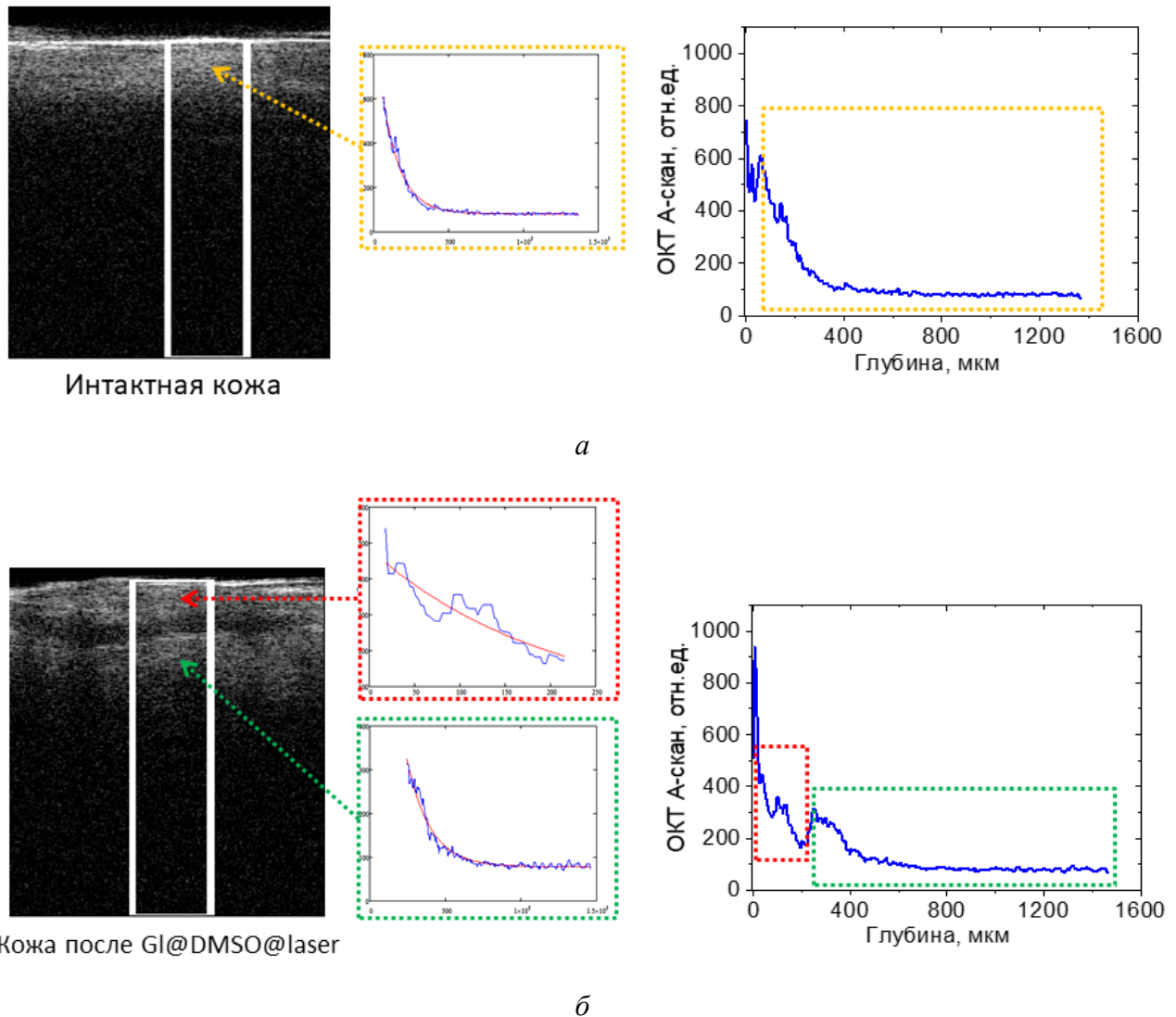


Рисунок 4.1. Типичные ОКТ-изображения участка дермы крысы *in vivo* (В-скан), усредненный А-скан ОКТ-сигнала и аппроксимирующие кривые, построенные с использованием модели однократного рассеяния (а) перед началом воздействия (Интактная кожа) и (б) после нанесения ОПА и ИК лазерного облучения (Gl@DMSO@laser).

На основе измеренных спектров полного пропускания и диффузного отражения в сферу рассчитывались коэффициент поглощения (μ_a) и транспортный коэффициент рассеяния (μ_s') образцов исследуемых тканей (см. раздел 2.2.2).

4.2. Анализ изменения оптических свойств слоев опухолей при ПФТТ и иммерсионном оптическом просветлении

Результаты ОКТ-исследования кожи крыс *in vivo* под действием различных стимулов представлены на рисунках 4.2 и 4.3. На рисунках 4.2а,б хорошо видно, что под действием Gl и Gl@DMSO в первую очередь просветляется эпидермис, граница раздела эпидермиса и

дермы становится заметна. Эффективность оптического просветления кожи выше при использовании раствора GI@DMSO, чем GI, о чём свидетельствует большее увеличение глубины зондирования в первом случае.

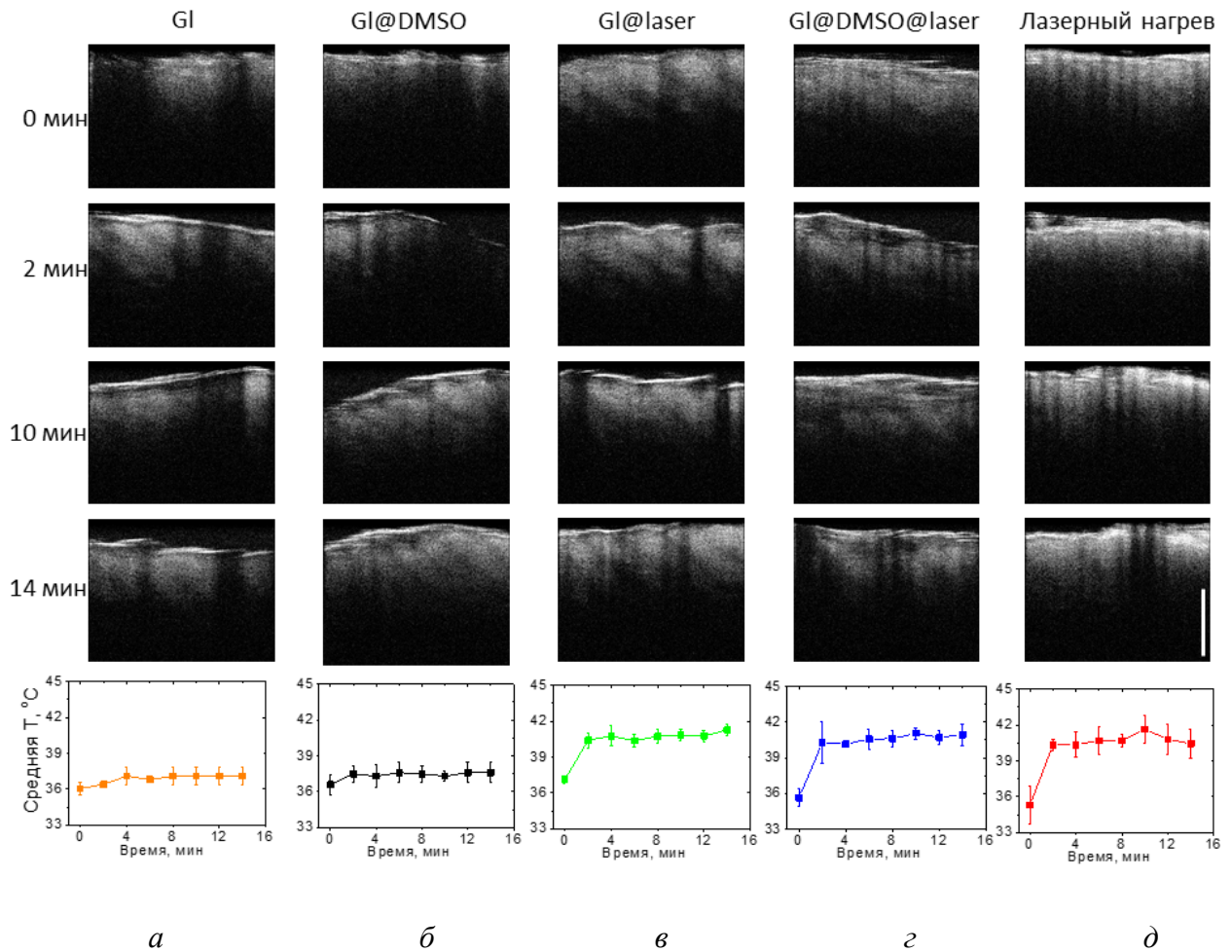


Рисунок 4.2. ОКТ-изображения участков кожи крыс *in vivo*, подвергнутых воздействию (а) водного раствора глицерина (GI) и (б) смеси 70%-ного раствора глицерина с 10% ДМСО (GI@DMSO) при температуре тела, (в) 70%-ного раствора глицерина (GI@laser) и (г) смеси 70%-ного раствора глицерина с 10% ДМСО (GI@DMSO@laser) при лазерном нагреве, и (д) лазерного нагрева. Масштабная метка (на правом нижнем ОКТ-изображении) соответствует 500 мкм. Тёмные вертикальные полосы на изображениях являются артефактами, возникающими при дыхании животных. Временные колебания среднего значения температуры кожи в месте воздействия в различных группах показаны под соответствующими ОКТ-изображениями.

Данные результаты согласуются с результатами, представленными в работах [202, 299, 300], которые показывают увеличение проницаемости эпидермиса при добавлении в раствор просветляющего агента ДМСО. Рисунок 4.3а показывает снижение коэффициента ослабления света в коже в процессе оптического просветления на 23 ± 9 и $29\pm 3\%$ в течение 14

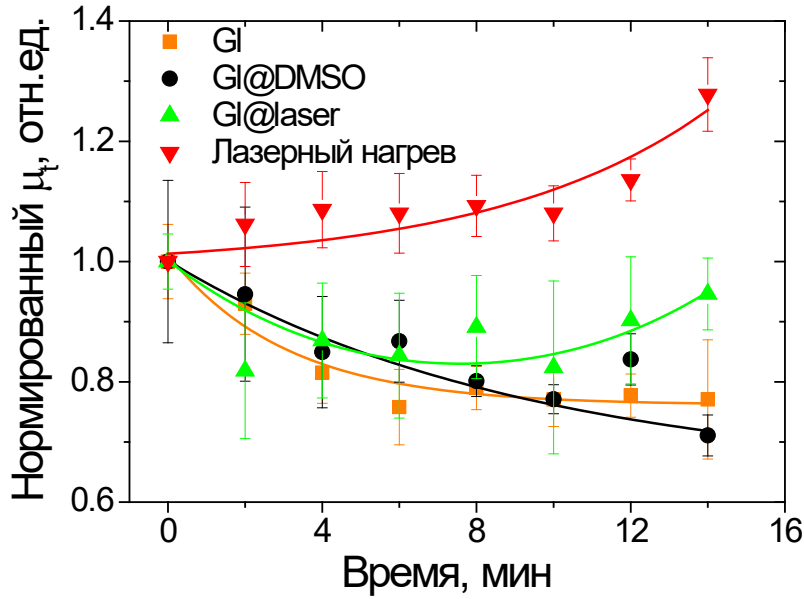
мин для Gl и Gl@DMSO, соответственно. При этом видно, что для Gl@DMSO наблюдается тенденция к дальнейшему снижению коэффициента ослабления.

Из результатов, представленных на рисунках 4.2*в* и 4.3*а*, следует, что при комбинации воздействия Gl с нагревом процесс диффузии глицерина в кожу сопровождается уплотнением ткани, по-видимому, за счёт дегидратации ткани, как под действием гиперосмотического раствора глицерина, так и при повышении температуры. За время наблюдения значение μ_t сначала снижается на $18 \pm 10\%$ в течение 10 мин, а затем возрастает практически до начального значения.

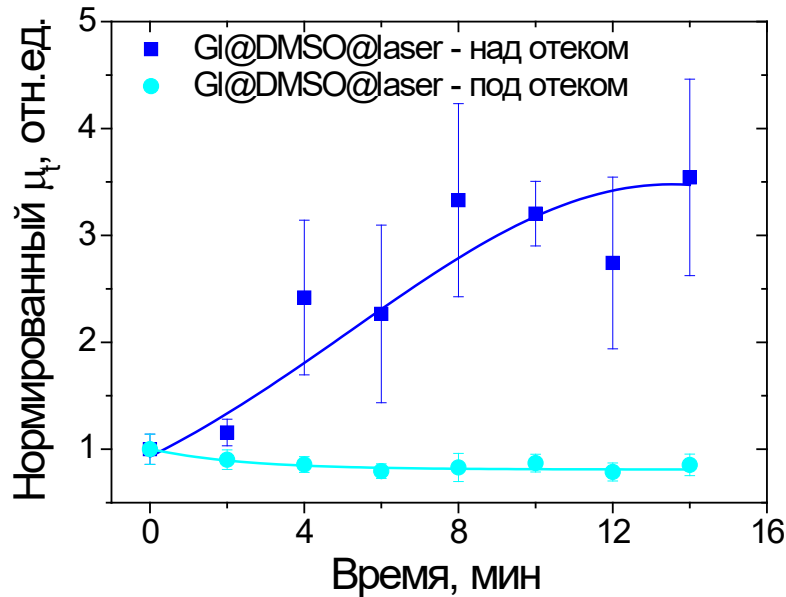
Существенные изменения по сравнению с другими группами наблюдались в процессе нагрева кожи, обработанной Gl@DMSO (рис. 4.2*з*). Хорошо видно, что при той же температуре, что и в других группах, происходит расслоение ткани с образованием области отёка. При этом верхняя часть в процессе нагрева уплотняется, о чём свидетельствует рост значения μ_t в среднем в 3.5 ± 1.3 раз, а область под отёком продолжает просветляться, значение μ_t уменьшается в среднем на $20 \pm 8\%$ (рис. 4.3*б*). Данный эффект, по-видимому, связан с действием ДМСО. Известно, что при высоких концентрациях ДМСО может вызывать раздражение кожи, сопровождаемое эпидермальным межклеточным отёком [301]. В данном случае возникновение отёка стимулируется повышением температуры до 41°C , в то время как при температуре 38°C отёка не возникало.

На рисунке 4.2*д* видно значительное увеличение яркости изображения поверхности ткани, что говорит о её уплотнении, по-видимому, за счёт дегидратации под действием лазерного нагрева. На рисунке 4.3*а* также видно увеличение коэффициента ослабления со временем, в среднем оно составило $28 \pm 6\%$.

Для дальнейших исследований в качестве ОПА был выбран Gl@DMSO, поскольку, несмотря на возникновение отёка, он вызывает наибольшее снижение коэффициента ослабления света.



a



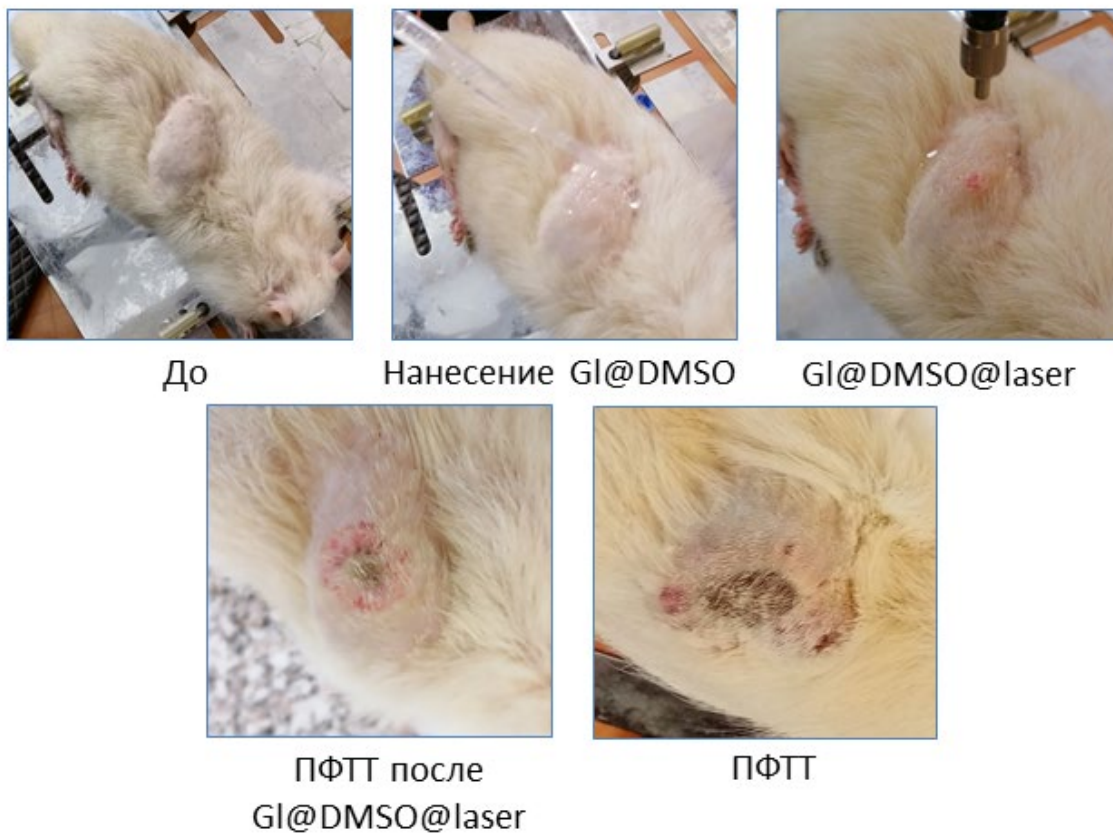
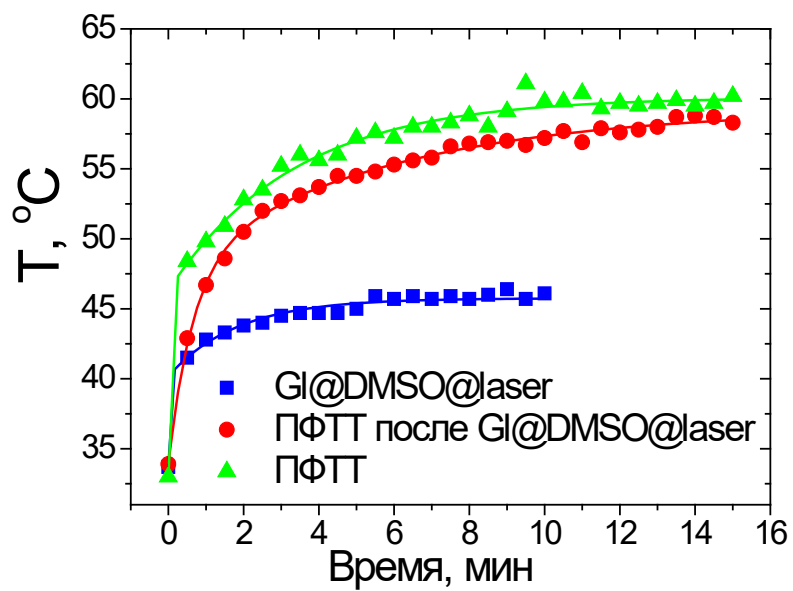
б

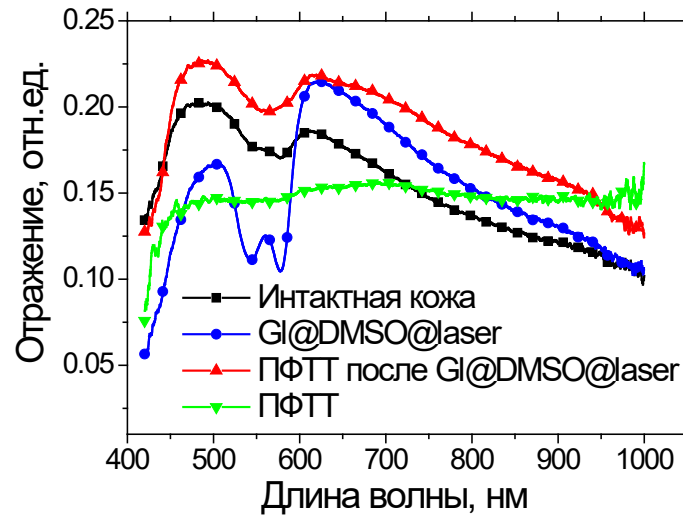
Рисунок 4.3. Временные зависимости усреднённого и нормированного коэффициента ослабления света в исследуемых группах: (а) I (GI), II (GI@DMSO), III (GI@laser) и V (Лазерный нагрев) и (б) IV (GI@DMSO@laser).

На рисунке 4.4 представлены этапы пилотного эксперимента с ПФТТ модельной опухоли холангиокарциномы *PC-1* при предварительном просветлении кожи, временные зависимости температуры нагрева кожи и спектры диффузного отражения кожи над опухолью, допированной ЗНС, до воздействия, после 10 мин воздействия GI@DMSO@laser

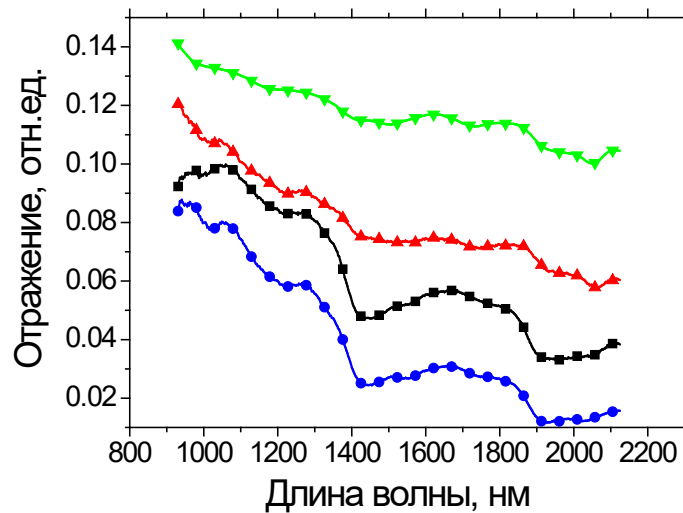
и после 15 мин ПФТТ. На рисунке 4.4а хорошо видно, что после Gl@DMSO@laser наблюдается эритема и отёк кожи в месте облучения, что вызывает изменение в спектрах диффузного отражения: снижение коэффициента отражения в полосах поглощения гемоглобина (543 и 577 нм) и воды (1434 и 1958 нм) (рис. 4.4в,г). Рисунок 4.4б показывает, что при аналогичном режиме Gl@DMSO@laser, в отличие от крыс без опухоли (рис. 4.2г), у крысы с опухолью, допированной ЗНС, наблюдается рост температуры от 41.5°C через 30 с после начала облучения до 46.5°C через 10 мин, что, по-видимому, связано с дополнительным влиянием нагрева наночастиц в теле опухоли. Различия между зависимостями температуры нагрева от времени при ПФТТ с предварительным воздействием просветления и без него незначительны и могут быть связаны с различным локальным содержанием наночастиц в области облучения. При этом наблюдаются значительные изменения в спектре диффузного отражения в полосах поглощения гемоглобина (переход из оксигенированной HbO_2 в дезоксигенированную форму HbH и частичное разрушение гемоглобина) и воды. Так, для полос поглощения гемоглобина (рис. 4.4в) наблюдается переход Q -полос с 543 и 577 нм в одну полосу на 561 нм при ПФТТ после Gl@DMSO@laser, что характерно при дезоксигенации гемоглобина [302]. При ПФТТ без предварительного воздействия наблюдается исчезновение характерных полос поглощения гемоглобина HbH и HbO_2 в данной спектральной области, что может быть связано с коагуляцией белка, которое происходит при нагреве гемоглобина крови [129]. На рисунке 4.4а видно значительное потемнение и увеличение области поражения на участке, подвергнутом ПФТТ. Амплитуда полос поглощения воды на 1434 и 1958 нм для интактной кожи значительно уменьшается, что выражается в уменьшении провалов в спектре диффузного отражения. (рис. 4.4г).

Помимо изменения поглощающих свойств кожи, на спектры отражения оказали влияние изменение её рассеивающих характеристик. Так, под действием Gl@DMSO@laser наблюдался отёк кожи, что привело к снижению коэффициента отражения. При ПФТТ более интенсивное лазерное излучение привело к дегидратации ткани, её уплотнению и, таким образом, к увеличению коэффициента отражения. Обращает на себя внимание тот факт, что предварительное нанесение ОПА снизило степень повреждения кожи и предотвратило необратимые последствия воздействия высокой температуры на ткани, что выражается в менее существенных изменениях спектра отражения при ПФТТ с просветлением, чем при ПФТТ (рис. 4в,г).

*a**б*



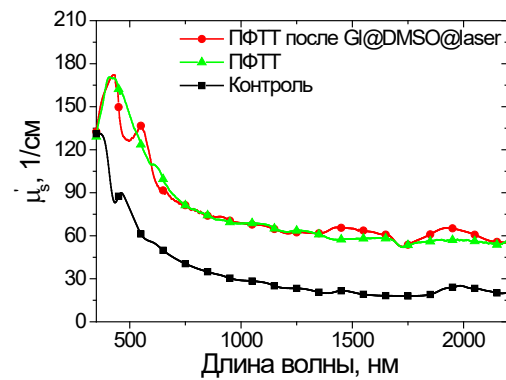
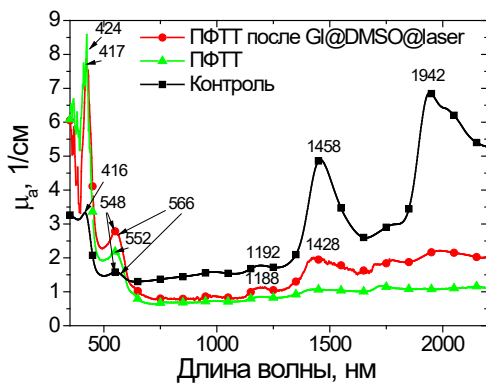
6



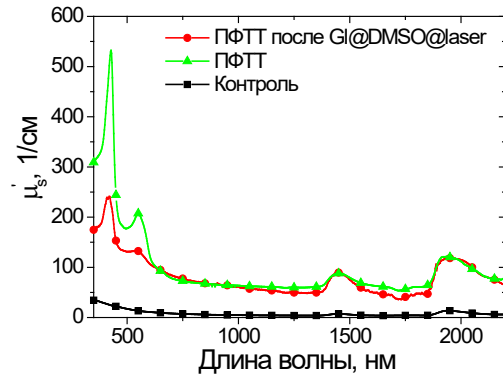
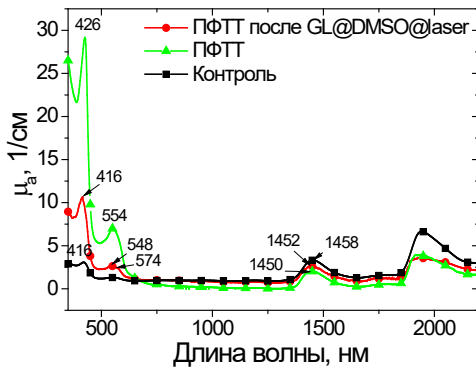
2

Рисунок 4.4. Фотографии крысы *in vivo* с перевитой опухолью *PC-1*, допированной ЗНС, демонстрирующие последовательность действий и результат ПФТТ с предварительным просветлением кожи (а): до процедуры (До), процесс нанесения ОПА (Нанесение $Gl@DMSO$), результат низкоинтенсивного лазерного облучения в течение 10 мин ($Gl@DMSO@laser$) и с повышением интенсивности в течение 15 мин (ПФТТ после $Gl@DMSO@laser$), и дополнительное изображение опухоли после ПФТТ без предварительного просветления кожи (ПФТТ). Временные зависимости температуры поверхности кожи крысы при проведении данных процедур: предварительного воздействия ОПА и низкоинтенсивного лазерного облучения ($Gl@DMSO@laser$) с последующим повышением интенсивности (ПФТТ после $Gl@DMSO@laser$) и ПФТТ без дополнительных воздействий (ПФТТ) (б). Спектры диффузного отражения, измеренные до воздействий и сразу после них в спектральных диапазонах (в) 420-1000 нм и (г) 930-2125 нм.

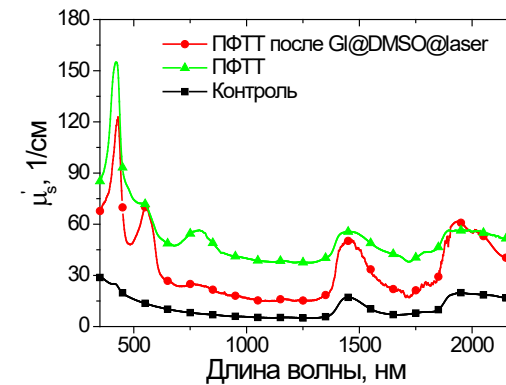
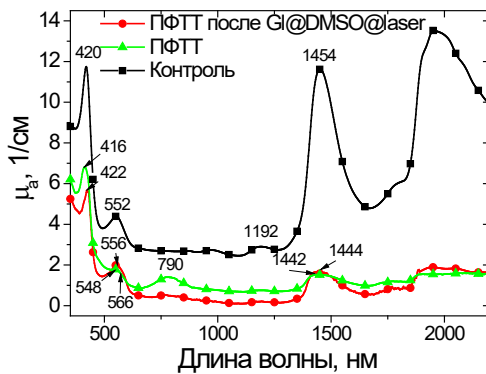
На рисунке 4.5 представлены спектральные зависимости оптических параметров исследуемых тканей опухоли у контрольного животного (без введения ЗНС и облучения), при ПФТТ с предварительным нанесением ОПА и нагревом и при ПФТТ без дополнительных воздействий. На спектрах поглощения исследуемых тканей контрольного животного видны характерные полосы HbO_2 (416-417, 544-548 и 566-574 нм) (рис. 4.5а,б,с) и воды (1192, 1458 и 1942 нм). В спектре верхней части опухоли наблюдаются полосы поглощения Hb (420 и 552 нм) (рис. 4.5в), что может быть связано с дезоксигенацией и началом некротических изменений ткани.



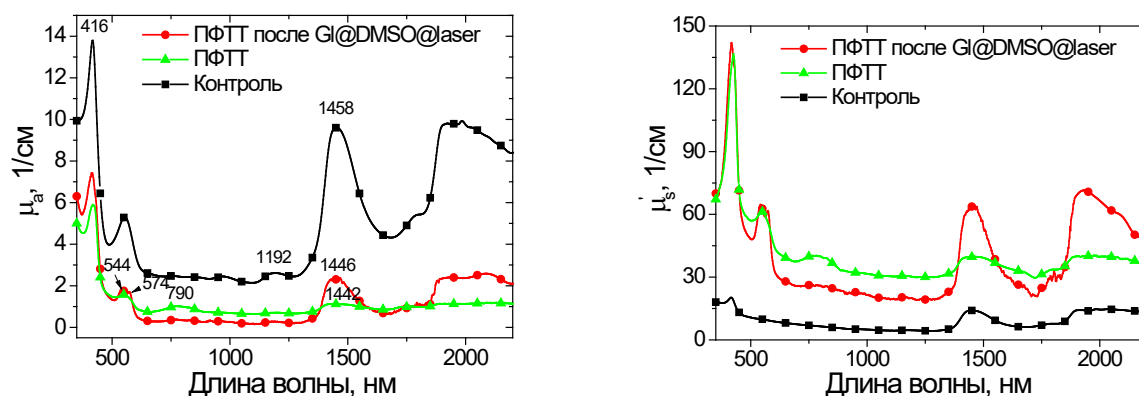
а



б



в



2

Рисунок 4.5. Коэффициент поглощения (μ_a) и транспортный коэффициент рассеяния (μ_s) тканей контрольной опухоли, не подвергавшейся процедуре ПФТТ (Контроль), опухоли после ПФТТ с предварительным просветлением (ПФТТ после Gl@DMSO@laser) и ПФТТ без предварительного просветления (ПФТТ): (а) кожи над опухолью, (б) подкожной соединительной ткани, (в) верхней части опухоли и (г) нижней части опухоли.

В спектре поглощения кожи после процедуры ПФТТ на рисунке 4.5а хорошо видно увеличение полос поглощения гемоглобина и переход HbO_2 в Hb , что свидетельствует о повреждении сосудов при ПФТТ. Кроме того, в спектре ПФТТ практически отсутствуют полосы поглощения воды, что говорит о значительной дегидратации кожи в месте облучения.

Повреждение подкожной соединительной ткани после ПФТТ с просветлением также менее выражено, чем при ПФТТ, т.к. в спектре поглощения присутствуют характерные полосы оксигемоглобина (416 и 548 и 574 нм).

На спектрах поглощения и рассеяния опухоли (рис. 4.5в,г) хорошо виден пик поглощения суспензии ЗНС (790 нм). Поскольку поглощение в области 790 нм выше для животного, подвергнутого ПФТТ, то, следовательно, локальная концентрация наночастиц у него выше. Это может объяснить тот факт, то в результате нагрева ЗНС в теле опухоли при ПФТТ происходит более сильная дегидратация ткани, что проявляется в более существенном уменьшении значения μ_a в полосах поглощения воды и смещении максимума поглощения в область более коротких длин волн.

Транспортный коэффициент рассеяния снижается с увеличением длины волны, при этом более крутой наклон спектра соответствует большим значениям температуры в каждом слое. Увеличение значений μ_s в образцах кожи и подкожной ткани после ПФТТ объясняется коагуляцией тканей, которая вызывает разрушение более крупных

рассеивателей, таких как эритроциты, а также стенок кровеносных сосудов и коллагеновых пучков в дерме и соединительной ткани. В теле опухоли также происходит коагуляция белка, особенно в области контакта с ЗНС.

Полученные результаты хорошо согласуются с данными литературы. *Halldorsson* [128] наблюдал более высокое оптическое поглощение в термически денатурированной крови, по сравнению с нативной оксигенированной кровью при 633 и 1064 нм. Трансформация между HbO_2 , и Hb была количественно проанализирована *Jia* и др. [259]. Непрерывный нагрев на водяной бане до температуры 60°C приводил к превращению HbO_2 в Hb . Эффект тепловых изменений в спектрах поглощения воды наблюдался при прямых измерениях образцов воды и исследованиях лазерной терапии. *Jansen* и др. [121] показали, что пик поглощения воды около 1.94 мкм смещается в сторону более коротких длин волн с повышением температуры и достигает 1.92 мкм при 49°C. Синий сдвиг пиков поглощения воды при повышении температуры был показан в работах [122, 303, 304]. Точное измерение сдвига максимумов поглощения воды в исследуемых биотканях достаточно затруднительно, т.к. нагрев происходил биотканей локально, а регистрация спектров полного пропускания и диффузного отражения проводилась интегрально. Однако полученные результаты хорошо согласуются с данными работ [128, 258], в которых сообщалось об изменениях оптических параметров кожи при нагревании. Небольшие различия в значениях, указанных в литературе, скорее всего, обусловлены различиями в экспериментальных условиях, теоретических моделях и методах обработки тканей, используемых в исследованиях.

Исходя из данных, представленных на рисунке 4.5*в,г*, можно предположить, что нагрев тела опухоли при ПФТТ, по-видимому, был более существенным, чем при ПФТТ с просветлением кожи за счёт большей локальной концентрации частиц в месте облучения. Однако, по-видимому, за счёт оптического просветления поверхности, температура нагрева опухоли при обеих процедурах была сравнима, что позволило достичь близких результатов. Компьютерное моделирование распространения света в опухоли при предварительном оптическом просветлении кожи подтверждает данное предположение [150].

Выводы:

Впервые представлены изменения оптических параметров (коэффициента поглощения и транспортного коэффициента рассеяния в спектральном диапазоне от 350 до 2200 нм) верхней и нижней частей модельной опухоли у крыс (холангиокарцинома *PC-1*), кожи и подкожной соединительной ткани, расположенных над опухолью, вызванные повышением температуры при проведении процедуры ПФТТ с предварительным оптическим просветлением кожи. Результаты показывают, что основные различия в поглощении

вызваны дезоксигенацией крови, нагревом внутритканевой воды и дегидратацией тканей в области облучения, в то время как различия в рассеянии вызваны разрушением микрососудов с последующей коагуляцией белков. Отмечено снижение термического повреждения кожи в результате проведения ПФТТ при предварительном оптическом просветлении с использованием иммерсионного агента и низкоинтенсивного лазерного облучения.

Результаты, представленные в главе, частично опубликованы в работе:

1. Bucharskaya A., Khlebtsov N., Khlebtsov B., Maslyakova G., Navolokin N., **Genin V.**, Genina E., Tuchin V. Photothermal and photodynamic therapy of tumors with plasmonic nanoparticles: challenges and prospects // *Materials*, - Vol. 15. – No. 4. – P. 1606. – 2022. DOI: 10.3390/MA15041606

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные результаты, представленные в работе, заключаются в следующем:

1. Исследована температурная зависимость ПФТТ от дозировки и способа введения в модельные опухоли суспензии золотых наностержней. Получено, что максимальная температура нагрева достигается при трёхкратном внутривенном введении суспензии ЗНС с общей дозой 1200 мкг при достаточной васкуляризации опухоли, однако при этом наблюдается значительное повреждение кожи над опухолью. Более щадящим режимом по отношению к окружающим тканям является двухкратное внутривенное введение суспензии ЗНС с общей дозой 800 мкг, обеспечивающее достаточный нагрев биоткани.
2. Получены значения оптических параметров слоёв модельной опухоли в интактном состоянии и при различной температуре нагрева под действием ИК лазерного излучения при проведении ПФТТ в спектральном диапазоне от 350 до 2200 нм. Различия между интактной и нагретой тканью проявляются в изменении амплитуды пиков поглощения гемоглобина и воды в тканях.
3. Исследованы механизмы оптического просветления кожи с помощью растворов глицерина различных концентраций в диапазоне 20-100%. Получено, что наблюдаемые в эффекты в коже можно разделить на четыре группы: преимущественная иммерсия (20-40%), переход от преимущественной иммерсии к преимущественной дегидратации (50-60%), преимущественная дегидратация (70-90%) и дегидратация (100%). Получены эффективные коэффициенты диффузии растворов глицерина в коже и значения эффективности оптического просветления. Максимальная эффективность оптического просветления кожи наблюдается при использовании 60-70% растворов глицерина.
4. Исследован процесс оптического просветления кожи под действием 70% водного раствора глицерина с добавлением 10% ДМСО для увеличения проницаемости эпидермиса в процессе нагрева низкоинтенсивным ИК лазерным излучением до ~41°C.
5. Исследованы изменения оптических параметров верхней и нижней частей модельной опухоли, кожи и подкожной соединительной ткани, расположенных над опухолью, вызванные повышением температуры при проведении процедуры ПФТТ с предварительным оптическим просветлением кожи, в спектральном диапазоне от 350 до 2200 нм. Отмечено снижение термического повреждения кожи в результате проведения ПФТТ при предварительном оптическом просветлении с использованием иммерсионного агента и низкоинтенсивного лазерного облучения.

6. Разработана щадящая двухэтапная методика ПФТТ подкожной перевитой модельной опухоли состоящая из двух последовательных этапов: 1) нанесение оптического просветляющего агента на поверхность кожи и облучении её низкоинтенсивным ИК лазерным излучением до достижения температуры нагрева ткани $41\pm 1^\circ\text{C}$ с целью повышения скорости диффузии агента; 2) увеличение интенсивности лазерного излучения для реализации фототермолиза опухоли.

Полученные результаты способствуют развитию метода ПФТТ в направлении уточнения существующих и развития новых моделей распространения лазерного излучения и тепла при проведении ПФТТ, что, в свою очередь, будет способствовать повышению эффективности и безопасности лечения онкологических заболеваний.

Уточнение механизмов оптического просветления с помощью растворов глицерина различных концентраций способствует развитию метода оптического просветления кожи *in vivo*, которое может быть востребовано при выборе эффективных и безопасных иммерсионных агентов для использования их как в диагностических, так и терапевтических приложениях современной медицины, в частности, ПФТТ.

БЛАГОДАРНОСТИ

За помощь в исследованиях и обсуждении результатов выражается благодарность руководителю коллективного центра НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии СГМУ им. В.И. Разумовского д.б.н. А.Б. Бучарской, младшему научному сотруднику образовательно-научного института наноструктур и биосистем СГУ имени Н.Г. Чернышевского к.б.н. Н.А. Наволокину, главному врачу «Первой ветеринарной клиники» (г. Саратов) д.б.н. Г.С. Терентюку, зав. лабораторией нанобиотехнологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук д.ф.-м.н., профессору Н.Г. Хлебцову, профессору кафедры оптики и биофотоники СГУ имени Н.Г. Чернышевского д.ф.-м.н. Э.А. Гениной, а также сотрудникам кафедры оптики и биофотоники, высказавшим полезные советы и замечания.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. World Health Organization / URL: <https://www.who.int/health-topics/cancer> (дата обращения: 29.08.2019, 13:00 Мск.).
2. Habash R.W., Bansal R., Krewski D., Alhafid H.T. Thermal therapy. part 3: Ablation techniques // *Critical Reviews in Biomedical Engineering*. – 2007. – Vol. 35. – P. 37-121.
3. Huang X., Jain P.K., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles // *Lasers Med Sci*. – 2008. – Vol. 23. – P. 217-228.
4. Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N., Afanasyeva G.A., Terentyuk G.S., Navolokin N.A., Zlobina O.V., Chumakov D.S., Bashkatov A.N., Genina E.A., Khlebtsov N.G., Khlebtsov B.N., Tuchin V.V. The morpho-functional assessment of plasmonic photothermal therapy effects on transplanted liver tumor // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. – 2015. – Vol. 8. – P. 1541004.
5. Abadeer N.S., Murphy C.J. Recent progress in cancer thermal therapy using gold nanoparticles // *J. Phys.Chem*. – 2016. – Vol. 120. – P. 4691-4716.
6. Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N., Dikht N.I., Navolokin N.A., Terentyuk G.S., Bashkatov A.N., Genina E.A., Khlebtsov N.G., Khlebtsov B.N., Tuchin V.V. Plasmonic photothermal therapy of transplanted tumors in rats at multiple intravenous injection of gold nanorods // *BioNanoSci*. – 2017. – Vol. 7. – P. 216-221.
7. Alekseeva A.V., Bogatyrev V.A., Khlebtsov B.N., Melnikov A.G., Dykman L.A., Khlebtsov N.G. Gold nanorods: Synthesis and optical properties // *Colloid. J*. – 2006. – Vol. 68. – P. 661-678.
8. Khlebtsov N., Bogatyrev V., Dykman L., Khlebtsov B., Staroverov S., Shirokov A., Matora L., Khanadeev V., Pylaev T., Tsyganova N., Terentyuk G. Analytical and theranostic application of gold nanoparticles and multifunctional nanocomposites // *Theranostics*. – 2013. – Vol. 3. – P. 167-180.
9. Pattani V.P., Tunnell J.W. Nanoparticle-mediated photothermal therapy: a comparative study of heating for different particle types // *Lasers Surg Med*. – 2012. – Vol. 44. – P. 675-684.
10. Ungureanu C., Kroes R., Petersen W., Groothuis T.A., Ungureanu F., Janssen H., van Leeuwen F.W., Kooyman R.P., Manohar S., van Leeuwen T.G. Light interactions with gold nanorods and cells: implications for photothermal nanotherapeutics // *Nano Lett*. – 2011. – Vol. 11. – P. 1887-1894.
11. Maestro L.M., Camarillo E., Sanchez-Gil J.A., Rodriguez-Oliveros R., Ramiro-Bargueno J., Caamano A.J., Jaque F., Solea J.G., Jaque D. Gold nanorods for optimized photothermal

-
- therapy: the influence of irradiating in the first and second biological windows // RSC Adv. – 2014. – Vol. 4. – P. 54122-54129.
12. Khlebtsov B.N., Khanadeev V.A., Burov A.M., Le Ru E.C., Khlebtsov N.G. Reexamination of surface-enhanced raman scattering from gold nanorods as a function of aspect ratio and shape // J. Phys. Chem. C. – 2020. - Vol. 124. - P. 10647–10658.
 13. Terentyuk G., Panfilova E., Khanadeev V., Chumakov D., Genina E., Bashkatov A., Tuchin V., Khlebtsov N., Khlebtsov B. Gold nanorods with hematoporphyrin-loaded silica shell for dual-modality photodynamic and photothermal treatment of tumors in vivo // Nano Research. – 2014. – Vol. 7. – P. 325-337.
 14. Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N., Chekhonatskaya M.L., Terentyuk G.S., Navolokin N.A., Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G., Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V. Plasmonic photothermal therapy: approaches to advanced strategy // Lasers in Surgery and Medicine. – 2018. – Vol. 50. – P. 1025-1033.
 15. Sroka R., Stepp H., Hennig G., Brittenham G.M., Ruhm A., Lilge L. Medical laser application: translation into the clinics // J. Biomed. Opt. – 2015. – Vol. 20. – P. 061110.
 16. Missios S., Schroeder J., Barnett G., Mohammadi A.M. Prognostic factors of overall survival after laser interstitial thermal therapy in patients with glioblastoma // Photonics Lasers Med. – 2014. – Vol. 3. – P. 143-150.
 17. Johansson A., Faber F., Kniebühler G., Stepp H., Sroka R., Egensperger R., Beyer W., Kreth F.W. Protoporphyrin IX fluorescence and photobleaching during interstitial photodynamic therapy of malignant gliomas for early treatment prognosis // Lasers Surg. Med. – 2013. – Vol. 45. – P. 225-234.
 18. Bashkatov A.N., Zakharov V.P., Bucharskaya A.B., Borisova E.G., Khristoforova Yu.A., Genina E.A., Tuchin V.V. Malignant Tissue Optical Properties / Chapter 1 in Tuchin V.V., Popp J., Zakharov V. (Eds.) (2020). Multimodal Optical Diagnostics of Cancer / Cham: Springer Nature Switzerland AG, 2020. – P. 3-106.
 19. Arnfield M.R., Chapman J.D., Tulip J., Fenning M.C., McPhee M.S. Optical properties of experimental prostate tumors in vivo // Photochemistry and Photobiology. – 1993. – Vol. 57. – P. 306-311.
 20. Marks F.A. Optical spectroscopy of breast biopsies and human breast cancer xenografts in nude mice // Frontiers in Bioscience. – 1998. - Vol. 2. – P. 1-10.
 21. Lilge L., Molpus K., Hasan T., Wilson B.C. Light dosimetry for intraperitoneal photodynamic therapy in a murine xenograft model of human epithelial ovarian carcinoma // Photochemistry and Photobiology. – 1998. – Vol. 68. – P. 281-288.

-
22. Oldham M., Sakhalkar H., Oliver T., Wang Y.M., Kirpatrick J., Cao Y., Badea C., Johnson G.A., Dewhurst M. Three-dimensional imaging of xenograft tumors using optical computed and emission tomography // *Med. Phys.* – 2006. – Vol. 33. – P. 3193-3202.
 23. Kah J.C.Y., Olivo M., Chow T.H., Song K.S., Koh K.Z.Y., Mhaisalkar S., Sheppard C.J.R. Control of optical contrast using gold nanoshells for optical coherence tomography imaging of mouse xenograft tumor model in vivo // *J. Biomed. Opt.* – 2009. – Vol. 14. – P. 054015.
 24. Rehman A., Firdous S., Nawaz M., Ahmad M. Optical parameters measurement for diagnostic and photodynamic therapy of human cervical adenocarcinoma (HeLa) cell line // *Laser Physics.* – 2012. – Vol. 22. – P. 322-326.
 25. Cugmas B., Plavec T., Bregar M., Naglic P., Pernus F., Likar B., Burmen M. Detection of canine skin and subcutaneous tumors by visible and near-infrared diffuse reflectance spectroscopy // *J. Biomed. Opt.* – 2015. – Vol. 20. – P. 037003.
 26. Hong N., Kariyama Y., Hazama H., Ishii T., Kitajima Y., Inoue K., Ishizuka M., Tanaka T., Awazu K. Optical properties of tumor tissues grown on the chorioallantonic membrane of chicken eggs: tumor model to assay of tumor response to photodynamic therapy // *J. Biomed. Opt.* – 2015. – Vol. 20. – P. 125001.
 27. Zhang Y., Liu H., Tang J., Li Z., Zhou X., Zhang R., Chen L., Mao Y., Li C. Non-invasively imaging subcutaneous tumor xenograft by handheld Raman detector, with assistance of optical clearing agent // *ACS Applied Materials & Interfaces.* – 2017. – Vol. 9. – P. 17769-17776.
 28. Greening G., Mundo A., Rajaram N., Muldoon T.J. Sampling depth of a diffuse reflectance spectroscopy probe for in-vivo physiological quantification of murine subcutaneous tumor allografts // *J. Biomed. Opt.* – 2018. – Vol. 23. – P. 085006.
 29. Тучин В.В. Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике. - М.: Физматлит, 2012. – 812 с.
 30. Tuchin V.V. Optical immersion as a new tool for controlling the optical properties of tissues and blood // *Laser Physics.* – 2005. – Vol. 15. – P. 1109-1136.
 31. Genina E.A. Bashkatov A.N., Tuchin V.V. Tissue optical immersion clearing // *Expert Review of Medical Devices.* – 2010. – Vol. 7. – P. 825-842.
 32. Zhu D., Larin K., Luo Q., Tuchin V.V. Recent progress in tissue optical clearing // *Laser & Photonics Reviews.* – 2013. – Vol. 7. – P. 732-757.
 33. Roussakow S. Where, when and why hyperthermia went wrong way? // *Oncothermia Journal.* 2013. – Vol. 7. – P. 190-231.

-
34. Busch W. Uber den Einfluss welche heftigere Erysipeln zuweilig auf organisierte Neubildungenausuben // *Vrh. Naturhist. Preuss Rhein Westphal.* – 1866. – Vol. 23. – P. 28-30.
 35. Henriques F.C, Moritz A.R. Studies of Thermal Injury: I. The Conduction of Heat to and through Skin and the Temperatures Attained Therein. A Theoretical and an Experimental Investigation // *Am J Pathol.* – 1947. – Vol. 23. – P. 30-49.
 36. Moritz A.R, Henriques F.C. Studies of Thermal Injury: II. The Relative Importance of Time and Surface Temperature in the Causation of Cutaneous Burns // *Am J Pathol.* – 1947. – Vol. 23. – P. 695-720.
 37. Moritz A.R. Studies of Thermal Injury: III. The Pathology and Pathogenesis of Cutaneous Burns. An Experimental Study // *Am J Pathol.* – 1947. – Vol. 23. – P. 915-41.
 38. Prime F., Rohdenburg G.L. Effect of Combined Radiation and Heat on Neoplasms // *Arch. Surg.* – 1921. – Vol. 2. – P. 116.
 39. Westermark N. Effect of Heat Upon Rat-Tumors // *Skandin. Arch. F. Physiol.* – 1927. – Vol. 52. – P. 257.
 40. Gessler A.E., McCarty K.S., Parkinson M.C. Eradication of spontaneous mouse tumors by high frequency radiation. I. Biological part // *Exp Med Surg.* – 1950. – Vol. 8. – P. 143-67.
 41. Gilchrist R.K., Medal R., Shorey W.D., Hanselman R.C., Parrott J.C., Taylor C.B. Selective inductive heating of lymph nodes // *Ann Surg.* – 1957. – Vol. 146. – P. 596-606.
 42. Selawry O.S., Goldstein M.N., McCormick T. Hyperthermia in tissue-cultured cells of malignant origin // *Cancer Res.* – 1957. – Vol. 17. – P. 785-91.
 43. Crile G.Jr. Heat as an adjunct to the treatment of cancer; experimental studies // *Cleve Clin Q.* – 1961. – Vol. 28. – P. 75-89.
 44. Crile G.Jr. Selective destruction of cancers after exposure to heat // *Ann Surg.* – 1962. – Vol. 156. – P. 404-7.
 45. Crile G.Jr. The effects of heat and radiation on cancers implanted on the feet of mice // *Cancer Res.* – 1963. – Vol. 23. – P. 372-80.
 46. Henderson M.A., Pettigrew R.T. Induction of controlled hyperthermia in treatment of cancer // *Lancet.* – 1971. – Vol. 1. – P. 1275-7.
 47. Pettigrew R.T, Galt J.M., Ludgate C.M., Smith A.N. Clinical effects of whole-body hyperthermia in advanced malignancy // *Br Med J.* – 1974. – Vol. 4. – P. 679-682.
 48. Dewhirst M.W., Vujaskovic Z., Jones E., Thrall D. Re-setting the biologic rationale for thermal therapy // *Int J Hyperthermia.* – 2005. – Vol. 21. – P. 779-90.

-
49. Iwata K., Shakil A., Hur W.J., Makepeace C.M., Griffin R.J., Song C.W. Tumour pO₂ can be increased markedly by mild hyperthermia // *Br J Cancer Suppl.* – 1996. – Vol. 27. – P. S217-S221.
 50. Tajiri H. Study Of Laser Hyperthermia, Photodynamic Therapy And The Combined Therapy For Human Pancreatic Cancer Cell Line // *Proc. SPIE, Laser Surgery: Characterization and Therapeutics.* – 1988. – Vol. 0907.
 51. Steger A.C., Lees W.R., Walmsley K., Bown S.G. Interstitial laser hyperthermia: a new approach to local destruction of tumours // *BMJ.* – 1989. – Vol. 299. – P. 362-5.
 52. Svaasand L.O., Gomer C.J., Morinelli E. On the physical rationale of laser induced hyperthermia // *Laser Med Sci.* – 1990. – Vol. 5. – P. 121-128.
 53. Kapany N.S., Peppers N.A., Zweng H.C., Flocks M. Retinal photocoagulation by Lasers // *Nature.* – 1963. – Vol. 199. – P. 146-149.
 54. Minton J.P., Carlton D.M., Dearman J.R., McKnight W.B., Ketcham A.S. An evaluation of the physical response of malignant tumor implants to pulsed laser radiation // *Surg Gynaecol Obstet.* – 1965. – Vol. 121. – P. 538-544.
 55. Goldman L., Rockwell R.J.Jr. Laser Systems and their applications in medicine and biology // *Adv Biomed Eng Med Phys.* – 1968. – Vol. 1. – P. 317-382.
 56. Svaasand L.O., Gomer C.J., Profio A.E. Laser-induced hyperthermia of ocular tumors // *Appl Optics.* – 1989. – Vol. 28. – P. 2280-2287.
 57. Sultan R.A. Tumour ablation by laser in general surgery // *Lasers Med Sci.* – 1990. – Vol. 5. – P. 185-193.
 58. Anderson R.R., Parrish J.A. Selective photothermolysis: precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation // *Science.* – 1983. – Vol. 220. – P. 524-527.
 59. Welch A.J. The thermal response of laser-irradiated tissue // *IEEE J Quantum Electron.* – 1984. – Vol. 12. – P. 1471-1475.
 60. Jori G., Spikes J.D. Photothermal sensitizers: possible use in tumor therapy // *J Photochem Photobiol B Biol.* – 1990. – Vol. 6. – P. 93-101.
 61. Afifi M.M., El Sheikh S.M., Abdelsalam M.M., Ramadan H., Omar T.A., El Tantawi M., Abdel-Razek K.M., Mohamed M. Therapeutic efficacy of plasmonic photothermal nanoparticles in hamster buccal pouch carcinoma // *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology.* – 2013. – Vol. 115. – P. 743-751.
 62. Zhang Y., Zhan X., Xiong J., Peng S., Huang W., Joshi R., Cai Y., Liu Y., Li R., Yuan K., Zhou N., Min W. Temperature-dependent cell death patterns induced by functionalized gold

-
- nanoparticle photothermal therapy in melanoma cells // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8. – P. 8720.
63. Dykman L.A., Khlebtsov N.G. *Gold nanoparticles in biomedical applications*. – New York.: Taylor & Francis Group, LLC, 2018. – 68 p.
64. Dykman L.A., Khlebtsov N.G. *Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives* // *Chem Soc Rev*. – 2012. – Vol. 41. – P. 2256-82.
65. Dreaden E.C., Alkilany A.M., Huang X., Murphy C.J., El-Sayed M.A. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine // *Chem Soc Rev*. – 2012. – Vol. 41. – P. 2740-79.
66. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щёголев С.Ю., Хлебцов Н.Г. *Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение*. – М.: Наука, 2008. – 318 с.
67. Su K.-H., Wei Q.-H., Zhang X., Mock J.J., Smith D.R., Schultz S. Interparticle coupling effects on Plasmon resonance of nanogold particles // *Nano Lett*. – 2003. – Vol. 3. – P. 1087-1090.
68. Oldenburg S.J., Averitt R.D., Westcott S.L., Halas N. Nanoengineering of optical resonances // *Chem. Phys. Lett*. – 1998. – Vol. 288. – P. 243-247.
69. Harris N. et al. Optimization of plasmonic heating by gold nanospheres and nanoshells // *J. Phys. Chem. B*. – 2006. – Vol. 110. – P. 10701-10707.
70. Hainfeld J.F., O'Connor, Lin P., Qian L., Slatkin D.N., Smilow H.M. Infrared-Transparent Gold Nanoparticles Converted by Tumors to Infrared Absorbers Cure Tumors in Mice by Photothermal Therapy // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. – P. e88414.
71. Menon J.U., Jadeja P., Tambe P., Vu K., Yuan B., Nguyen K.T. Nanomaterials for photo-based diagnostic and therapeutic applications // *Theranostics*. – 2013. – Vol. 3. – P. 152-166.
72. Skrabalak S.E., Chen J., Sun Y., Lu X., Au L., Copley C.M., Xia Y. Gold nanocages: synthesis, properties, and applications // *Acc Chem Res*. – 2008. – Vol. 41. – P. 1587-95.
73. Bardhan R., Lal S., Joshi A., Halas N.J. // *Acc. Chem. Res*. – 2011. – Vol. 44. – P. 936-946.
74. Guerrero-Martinez A., Barbosa S., Pastoriza-Santos I., Liz-Marzan L.M. Nanostars shine bright for you Colloidal synthesis, properties and applications of branched metallic nanoparticles // *Curr. Opin. Colloid. In*. – 2011. – Vol. 16. – P. 118-127.
75. Bakr O.M., Wunsch B.H., Stellacci F. High-Yield Synthesis of Multi-Branched Urchin-Like Gold Nanoparticles // *Chem. Mater*. – 2006. – Vol. 18. – P. 3297–3301.
76. Lu L., Ai K., Ozaki Y. Environmentally Friendly Synthesis of Highly Monodisperse Biocompatible Gold Nanoparticles with Urchin-like Shape // *Langmuir*. – 2008. – Vol. 24. – P. 1058–1063.

-
77. Хлебцов Б.Н., Ханадеев В.А, Панфилова Е.В., Пылаев Т.Е., Бибикова О.А., Староверов С.А., Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г. Новые типы наноматериалов: порошки золотых наносфер, наностержней, нанозвезд и золото-серебряных наноклеток // *Российские нанотехнологии*. – 2012. – Т. 7. – С. 73-80.
 78. Хлебцов Б.Н., Панфилова Е.В., Ханадеев В.А, Маркин А.В., Терентюк Г.С., Румянцева В.Д., Иванов А.В., Шилов И.П., Хлебцов Н.Г. Композитные многофункциональные наночастицы на основе золото-серебряных наноклеток, покрытых двуокисью кремния и гематопорфирином иттербия // *Российские нанотехнологии*. – 2011. – Т. 6. – С. 64-69.
 79. Matsumura Y, Maeda H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs // *Cancer Research*. – 1986. – Vol. 46. – P. 6387-6392.
 80. Greisch K. Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: a royal gate for targeted anticancer nanomedicines // *J. Drug. Target*. – 2007. – Vol. 15. – P. 457-464.
 81. Andronova N.V., Bannykh L.N., Dement'eva O.V., Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G., Kogan B.Ya., Rudoy V.M., Sedykh E.M. Pharmacokinetic study of PEGylated plasmon resonant gold nanoparticles in tumor-bearing mice // *TechConnect Briefs*. – 2008. – Vol. 2. – P. 65-68.
 82. Maeda H. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2015. – Vol. 91. – P. 3-6.
 83. Modi S., Jain J.P., Domb A.J., Kumar N. Exploiting EPR in Polymer Drug Conjugate Delivery for Tumor Targeting // *Current Pharmaceutical Design*. – 2006. – Vol. 12. – P. 4785-4796.
 84. Dreher M.R., Liu W., Michelich C.R., Dewhirst M.W., Yuan F., Chilkoti A. Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers // *J Natl Cancer Inst*. – 2006. – Vol. 98. – P. 335-344.
 85. Fang J., Nakamura H., Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2011. – Vol. 63. – P. 136-151.
 86. Sriraman S.K., Aryasomayajul B., Torchili V.P. Barriers to drug delivery in solid tumors // *Tissue Barriers*. – 2014. – Vol. 2. – P. e29528.
 87. Hashizume H., Baluk P., Morikawa S., McLean J.W., Thurston G., Roberge S., Jain R.K., McDonald D.M. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness // *Am J Pathol*. – 2000. – Vol. 156. – P. 1363-1380.

-
88. Nagy J.A., Chang S.H., Dvorak A.M., Dvorak H.F. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know // *Br J Cancer*. – 2009. – Vol. 100. – P. 865-869.
 89. Durymanov M.O., Rosenkranz A.A., Sobolev A.S. Current Approaches for Improving Intratumoral Accumulation and Distribution of Nanomedicines // *Theranostics*. – 2015. – Vol. 5. – P. 1007-20.
 90. Glomm W.R. Functionalized gold nanoparticles for application in biotechnology // *J. Dispers. Sci. Technol.* – 2005. – Vol. 26. – P. 389-414.
 91. Diagaradjane P., Shetty A., Wang J.C., Elliott A.M., Schwartz J., Shentu S., Park H.C., Deorukhkar A., Stafford R. J., Cho S.H., Tunnell J.W., Hazle J.D., Krishnan S. Modulation of in vivo tumor radiation response via gold nanoshell-mediated vascular-focused hyperthermia: characterizing an integrated antihypoxic and localized vascular disrupting targeting strategy // *Nano Lett.* – 2008. – Vol. 8. – P. 1492-1500.
 92. Pérez-Herrero E., Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy // *Eur J Pharm Biopharm.* – 2015. – Vol. 93. – P. 52-79.
 93. Anwar A., Zahid A.A., Scheidegger K.J., Brink M., Delafontaine P. Tumor necrosis factor- α regulates insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 expression in vascular smooth muscle // *Circulation*. – 2002. – Vol. 105. – P. 1220-5.
 94. Lal S., Clare S.E., Halas N.J. Nanoshell-enabled photothermal cancer therapy: impending clinical impact // *Accounts of chemical research*. – 2008. – Vol. 41. – P. 1842-1851.
 95. Khlebtsov N.G., Dykman L.A. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: A review of in vitro and in vivo studies // *Chem. Soc. Rev.* – 2011. – Vol. 40. – P. 1647-1671.
 96. Zhang B., Hu Y., Pang Z. Modulating the Tumor Microenvironment to Enhance Tumor Nanomedicine Delivery // *Front Pharmacol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 952.
 97. Dickerson E.B., Dreaden E.C, Huang X., El-Sayed I.H, Chu H., Pushpanketh S., McDonald J.F., El-Sayed M.A. Gold nanorod assisted near-infrared plasmonic photothermal therapy (PPTT) of squamous cell carcinoma in mice // *Cancer Lett.* – 2008. – Vol. 269. – P. 57-66.
 98. von Maltzahn G., Park J.H., Agrawal A., Bandaru N.K., Das S.K., Sailor M.J., Bhatia S.N. Computationally guided photothermal tumor therapy using long-circulating gold nanorod antennas // *Cancer Res.* – 2009. – Vol. 69. – P. 3892-900.
 99. El-Sayed M.A., Shabaka A.A., El-Shabrawy O.A., Yassin N.A., Mahmoud S.S., El-Shenawy S.M., Al-Ashqar E., Eisa W.H., Farag N.M., El-Shaer M.A., Salah N., Al-Abd A.M. Tissue distribution and efficacy of gold nanorods coupled with laser induced photoplasmonic therapy in Ehrlich carcinoma solid tumor model // *PLOS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – P. e76207

-
100. Bolin F.P., Preuss L.E., Taylor R.C., Ference J. Refractive index of some mammalian tissues using a fiber optic cladding method // *Appl. Opt.* – 1989. – Vol. 28. – P. 2297-2305.
 101. Кочубей В.И., Башкатов А.Н. Спектроскопия рассеивающих сред. - Саратов: «Новый ветер», 2014. – 93 с.
 102. van de Hulst H.C. Multiple Light Scattering. Tables, Formulas and Applications. – New York: Academic Press, 1980. – 332 p.
 103. Prahl S.A. The inverse adding-doubling program / URL: <http://omlc.ogi.edu/software/iad/index.html> (дата обращения: 25.02.2022, 18:30 Мск.)
 104. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA Cancer J. Clin.* – 2018. – Vol. 68. – P. 394-424.
 105. Hamilton S.R., Aaltonen L.A. (eds.). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. - Lyon: IARC Press, 2000. – 173 p.
 106. Blechacz B., Gores G.J. Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment // *Hepatology.* – 2008. – Vol. 48. – P. 308-321.
 107. de Jong M.C., Nathan H., Sotiropoulos G.C., Paul A., Alexandrescu S., Marques H., Pulitano C., Barroso E., Clary B.M., Aldrighetti L., Ferrone C.R., Zhu A.X., Bauer T.W., Walters D.M., Gamblin T.C., Nguyen K.T., Turley R., Popescu I., Hubert C., Meyer S., Schulick R.D., Choti M.A., Gigot J.F., Mentha G., Pawlik T.M. Intrahepatic cholangiocarcinoma: an international multi-institutional analysis of prognostic factors and lymph node assessment // *J Clin Oncol.* – 2011. – Vol. 29. – P. 3140-5.
 108. Tuchin V.V., Popp J., Zakharov V. (Eds.) Multimodal Optical Diagnostics of Cancer. – Cham: Springer Nature Switzerland AG, 2020. – 597 p.
 109. Sanford C.H. Primary malignant disease of the liver // *Ann. Intern. Med.* – 1952. – Vol. 37. – P. 304-312.
 110. Tsushimi T., Enoki T., Harada E., Orita M., Noshima S., Masuda M., Hamano K. Ectopic hepatocellular carcinoma arising in the bile duct // *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* – 2005. – Vol. 12. – P. 266-8.
 111. van Hillegersberg R., Pickering J.W., Aalders M., Beek J.F. Optical properties of rat liver and tumor at 633 nm and 1064 nm: photofrin enhances scattering // *Lasers Surg Med.* – 1993. – Vol. 13. – P. 31-9.

-
112. Carneiro I., Carvalho S., Henrique R., Oliveira L., Tuchin V.V. Measurement of optical properties of normal and pathological human liver tissue from deep-UV to NIR // Proc. SPIE, Tissue Optics and Photonics. – 2020. – Vol. 11363. – P. 113630G.
 113. Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N., Dikht N.I., Navolokin N.A., Terentyuk G.S., Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V., Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G. Cancer cell damage pathways at laser induced plasmon-resonant photothermal therapeutics of transplanted liver tumor // BioNanoScience. – 2016. – Vol. 6. – P. 256-260.
 114. Vogt W.C., Barton J.K., Agrawal A., Pfefer T.J. Measurement and Thermal Dependence of Biological Tissue Optical Properties / Chapter 18 in Theory and Applications of Heat Transfer in Humans, Shrivastava D. (Ed.) / John Wiley & Sons Ltd., 2018, pp. 355-378.
 115. Collins J.R. Change in the infra-red absorption spectrum of water with temperature // Phys Rev. – 1925. – Vol. 26. – P. 771-779.
 116. Hale G.M., Query M.R., Rusk A.N., Williams D. Influence of Temperature on the Spectrum of Water // J. Opt. Soc. Am. – 1972. – Vol. 62. – P. 1103-1108.
 117. Walsh J.T., Cummings J.P. Effect of the dynamic optical-properties of water on midinfrared laser-ablation // Laser Surg Med. – 1994. – Vol. 15. – P. 295-305.
 118. Cordone L., Cupane A., Leone M., Vitrano E. Optical absorption spectra of deoxy- and oxyhemoglobin in the temperature range 300-20 K. Relation with protein dynamics // Biophys Chem. – 1986. – Vol. 24. – P. 259-75.
 119. Steinke J.M., Shepherd A.P. Effects of temperature on optical absorbance spectra of oxy-, carboxy-, and deoxyhemoglobin // Clin Chem. – 1992. – Vol. 38. – P. 1360-1364.
 120. Schomacker K.T., Domankevitz Y., Flotte T.J., Deutsch T.F. Co:MgF₂ laser ablation of tissue: effect of wavelength on ablation threshold and thermal damage // Lasers Surg Med. – 1991. – Vol. 11. – P. 141-51.
 121. Jansen E.D., van Leeuwen T.G., Motamedi M., Borst C., Welch A.J. Temperature-dependence of the absorption-coefficient of water for midinfrared laser-radiation // Laser Surg Med. – 1994. – Vol. 14. – P. 258-268.
 122. Lange B.I., Brendel T., Huttmann G. Temperature dependence of light absorption in water at holmium and thulium laser wavelengths // Appl Optics. – 2002. – Vol. 41. – P. 5797-5803.
 123. Pfefer T.J., Chan K.F., Hammer D.X., Welch A.J. Dynamics of pulsed holmium:YAG laser photocoagulation of albumen // Phys Med Biol. – 2000. – Vol. 45. – P. 1099-1114.
 124. Sfäreni R., Boffi A., Quaresima V., Ferrari M. Near infrared absorption spectra of human deoxy- and oxyhaemoglobin in the temperature range 20–40 degrees C // Biochim Biophys Acta. – 1997. – Vol. 1340. – P. 165-169.

-
125. Black J.F., Wade N., Barton J.K. Mechanistic comparison of blood undergoing laser photocoagulation at 532 and 1,064 nm // *Laser Surg Med.* – 2005. – Vol. 36. – P. 155-165.
 126. Verkruysse W., Nilsson A.M., Milner T.E., Beek J.F., Lucassen G.W., van Gemert M.J. Optical absorption of blood depends on temperature during a 0.5 ms laser pulse at 586 nm // *Photochem Photobiol.* – 1998. – Vol. 67. – P. 276-281.
 127. Black J.F., Barton J.K. Chemical and structural changes in blood undergoing laser photocoagulation // *Photochem Photobiol.* – 2004. – Vol. 80. – P. 89-97.
 128. Halldorsson T. Alteration of Optical and Thermal Properties of Blood by Nd:YAG Laser Irradiation // *Proceedings of the 4th Congress of the International Society for Laser Surgery.* – 1981.
 129. Barton J.K., Frangineas G., Pummer H., Black J.F. Cooperative phenomena in two-pulse, two-color laser photocoagulation of cutaneous blood vessels // *Photochem Photobiol.* – 2001. – Vol. 73. – P. 642-650.
 130. Barton J.K., Popok D.P., Black J.F. Thermal analysis of blood undergoing laser photocoagulation // *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics.* – 2001. – Vol. 7. – P. 936-943.
 131. Randeberg L.L., Bonesrønning J.H., Dalaker M., Nelson J.S., Svaasand L.O. Methemoglobin formation during laser induced photothermolysis of vascular skin lesions // *Laser Surg Med.* – 2004. – Vol. 34. – P. 414-419.
 132. Pettit G.H., Ediger M.N., Weiblinger R.P. Dynamic optical-properties of collagen-based tissue during ArF excimer laser ablation // *Appl Optics.* – 1993. – Vol. 32. – P. 488-493.
 133. Cilesiz I.F., Welch A.J. Light dosimetry: Effects of dehydration and thermal-damage on the optical-properties of the human aorta // *Appl Optics.* 1993. – Vol. 32. – P. 477-487.
 134. Pickering J.W., Bosman S., Posthumus P., Blokland P., Beek J.F., van Gemert M.J.C. Changes in the optical-properties (at 632.8 Nm) of slowly heated myocardium // *Appl Optics.* – 1993. – Vol. 32. – P. 367-371.
 135. Nilsson A.M., Lucassen G.W., Verkruysse W., Andersson-Engels S., van Gemert M.J. Changes in optical properties of human whole blood in vitro due to slow heating // *Photochem Photobiol.* – 1997. – Vol. 65. – P. 366-373.
 136. Germer C.T., Roggan A., Ritz J.P., Isbert C., Albrecht D., Müller G., Buhr H.J. Optical properties of native and coagulated human liver tissue and liver metastases in the near infrared range // *Laser Surg Med.* – 1998. – Vol. 23. – P. 194-203.

-
137. Jerath M.R., Gardner C.M., Rylander III H.G., Welch A.J. Dynamic optical property changes: Implications for reflectance feedback-control of photocoagulation // *J Photoch Photobio B.* – 1992. – Vol. 16. – P. 113-126.
 138. Yaroslavsky A.N., Schulze P.C., Yaroslavsky I.V., Schober R., Ulrich F., Schwarzmaier H.J. Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues in vitro in the visible and near infrared spectral range // *Phys Med Biol.* – 2002. – Vol. 47. – P. 2059-2073.
 139. Nagarajan V.K., Gogineni V.R., White S.B., Yu B. Real time evaluation of tissue optical properties during thermal ablation of ex vivo liver tissues // *Int J Hyperthermia.* – 2019. – Vol. 35. – P. 176-182.
 140. Зимняков Д.А., Тучин В.В. Оптическая томография тканей // *Квант. Электр.* – 2002. – Т. 32. – С. 849-867.
 141. Оптическая биомедицинская диагностика : в 2 т. / под ред.: В.В. Тучина. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2007. – 560 с.
 142. Тучин В.В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2010. – 488 с.
 143. Richardson D.S., Lichtman J.W. Clarifying tissue clearing // *Cell.* – 2015. – Vol. 162. – P. 246–57.
 144. Rylander C.G., Stumpp O.F., Milner T.E., Kemp N.J., Mendenhall J.M., Diller K.R., Welch A.J. Dehydration mechanism of optical clearing in tissue // *J. Biomed. Opt.* – 2006. – Vol. 11. – P. 041117.
 145. Yeh A.T., Hirshburg J. Molecular interactions of exogenous chemical agents with collagen-implications for tissue optical clearing // *J. Biomed. Opt.* – 2006. – Vol. 11. – P. 014003.
 146. Wen X., Mao Z., Han Z., Tuchin V.V., Zhu D. In vivo skin optical clearing by glycerol solutions: mechanism // *J. Biophotonics.* – 2010. – Vol. 3. – P. 44-52.
 147. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Синичкин Ю.П., Тучин В.В. Оптическое просветление кожи под действием глицерина: исследования ex vivo и in vivo // *Оптика и спектроскопия.* – 2010. – Т. 109. – С. 1312-1319.
 148. Genina E.A., Oliveira L.M.C., Bashkatov A.N., Tuchin V.V. Optical Clearing of Biological Tissues: Prospects of Application for Multimodal Malignancy Diagnostics // Chapter 2 in Tuchin V.V., Popp J., Zakharov V. (Eds.) *Multimodal Optical Diagnostics of Cancer.* – Cham: Springer Nature Switzerland AG, 2020. – pp. 107-132.
 149. Chu Y., Liao S., Liao H., Lu Y., Geng X., Wu D., Pei J., Wang Y. Second Near-Infrared Photothermal Therapy with Superior Penetrability through Skin Tissues // *CCS Chem.* – 2021. – Vol. 3. – P. 3289-3300.

-
150. Youn J.-I. The Effect of an Optical Clearing Agent on Tissue Prior to 1064-nm Laser Therapy // *Med Laser*. – 2021. – Vol. 10. – P. 146-152
 151. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия: учебник / под ред. акад. АМН СССР С.С. Дебова. 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 1990. – 528 с.
 152. Башкатов А.Н., Генина Э.А., Долотов Л.Е., Правдин А.Б., Тучин В.В. Общий физический практикум. Биопотоника : учебно-методическое пособие / под ред. проф. В.В. Тучина. – Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 2011. – 144 с.
 153. Linares H.A., Kischer C.W., Dobrkovsky M., Larson D.L. The histiotypic organization of the hypertrophic scar in humans // *J. Invest. Dermatol.* – 1972. – Vol. 59. – P. 323-331.
 154. Genina E.A., Bashkatov A.N., Sinichkin Yu.P., Yanina I.Yu., Tuchin V.V. Optical clearing of biological tissues: prospects of application in medical diagnostics and phototherapy // *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. – 2015. – Vol. 1. – P. 22-58.
 155. Tuchin V.V. *Tissue optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis*. Third edition. – Washington, Bellingham: SPIE Tutorial Text in Optical Engineering, SPIE Press, 2015. – 934 p.
 156. Drezek R., Dunn A., Richards-Kortum R. Light scattering from cells: finite-difference time-domain simulations and goniometric measurements // *Appl. Opt.* – 1999. – Vol. 38. – P. 3651-3661.
 157. Sokolov K., Drezek R., Gossagee K., Richards-Kortum R. Reflectance spectroscopy with polarized light: is it sensitive to cellular and nuclear morphology // *Opt. Express*. – 1999. – Vol. 5. – P. 302–317.
 158. Tuchin V.V., Wang L.V., Zimnyakov D.A. *Optical Polarization in Biomedical Applications*. – New York: Springer-Verlag, 2006. – 281 p.
 159. Leonard D.W., Meek K.M. Refractive indices of the collagen fibrils and extrafibrillar material of the corneal stroma // *Biophysical J.* – 1997. – Vol. 72. – P. 1382–1387.
 160. Borovoi A.G., Naats E.I., Oppel U.G. Scattering of light by a red blood cell // *J. Biomed. Opt.* – 1998. – Vol. 3. – P. 364-372.
 161. Yaroslavsky A.N., Priezzhev A.V., Rodriguez J., Yaroslavsky I.V., Battarbee H. Optics of blood / Chap. 2 in *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics*. V.V. Tuchin (Ed.). – Bellingham: SPIE Press, 2002. – P. 169-216.
 162. Mazarevica G., Freivalds T., Jurka A. Properties of erythrocyte light refraction in diabetic patients // *J. Biomed. Opt.* – 2002. – Vol. 7. – P. 244-247.

-
163. Friebel M., Meinke M. Model function to calculate the refractive index of native hemoglobin in the wavelength range of 250–1100 nm dependent on concentration // *Appl. Opt.* – 2006. – Vol. 45. – P. 2838-2842.
 164. Agrba P.D., Kirillin M.Yu., Abelevich A.I., Zagaynova E.V., Kamensky V.A. Compression as a method for increasing the informativity of optical coherence tomography of biotissue // *Optics and Spectroscopy.* – 2009. – Vol. 107. – P. 853-858.
 165. Guzelsu N., Federici J.F., Lim H.C., Chaudhry H.R., Ritter A.B., Findley T. Measurement of skin stretch via light reflection // *J. Biomed. Opt.* – 2003. – Vol. 8. – P. 80-86.
 166. Rylander C.G., Stumpp O.F., Milner T.E., Kemp N.J., Mendenhall J.M., Diller K.R., Welch A.J. Dehydration mechanism of optical clearing in tissue // *J. Biomed. Opt.* – 2006. – Vol. 11. – P. 041117.
 167. Lin W.-C., Motamedi M., Welch A.J. Dynamics of tissue optics during laser heating of turbid media // *Appl. Opt.* – 1996. – Vol. 35. – P. 3413-3420.
 168. Zhu D., Wang J., Zhi Z., Wen X., Luo Q. Imaging dermal blood flow through the intact rat skin with an optical clearing method // *J. Biomed. Opt.* – 2010. – Vol. 15. – P. 026008.
 169. Larin K.V., Ghosn M.G., Bashkatov A.N., Genina E.A., Trunina N.A., Tuchin V.V. Optical clearing for OCT image enhancement and in-depth monitoring of molecular diffusion // *IEEE J. Select. Tops. Quantum Electron.* – 2012. – Vol. 18. – P. 1244-1259.
 170. Zhu D., Larin K., Luo Q., Tuchin V.V. Recent progress in tissue optical clearing // *Laser & Photonics Reviews.* – 2013. – Vol. 7. – P. 732-757.
 171. Doubrovskii V.A., Yanina I.Yu., Tuchin V.V. Kinetics of changes in the coefficient of transmission of the adipose tissue in vitro as a result of photodynamic action // *Biophysics.* – 2012. – Vol. 57. – P. 94-98.
 172. Yanina I.Yu., Trunina N.A., Tuchin V.V. Optical coherence tomography of adipose tissue at photodynamic/photothermal treatment in vitro // *Journal of Innovative Optical Health Sciences.* – 2013. – Vol. 6. – P. 1350010.
 173. Cicchi R., Pavone F.S., Massi D., Sampson D.D. Contrast and depth enhancement in two-photon microscopy of human skin ex vivo by use of optical clearing agents // *Opt. Exp.* – 2005. – Vol. 13. – P. 2337-2344.
 174. Hama H., Kurokawa H., Kawano H., Ando R., Shimogori T., Noda H., Fukami K., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain // *Nature Neurosci.* – 2011. – Vol. 14. – P. 1481-1488.

-
175. Dodt H.U., Leischner U., Schierloh A., Jährling N., Mauch C.P., Deininger K., Deussing J.M., Eder M., Zieglgnsberger W., Becker K. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain // *Nature Methods*. – 2007. – Vol. 4. – P. 331-336.
 176. Ertürk A., Mauch C.P., Hellal F., Förstner F., Keck T., Becker K., Jährling N., Steffens H., Richter M., Hübener M., Kramer E., Kirchhoff F., Dodt H.U., Bradke F. Three-dimensional imaging of the unsectioned adult spinal cord to assess axon regeneration and glial responses after injury // *Nature Med*. – 2012. – Vol. 18. – P. 166-171.
 177. Genina E.A., Bashkatov A.N., Sinichkin Yu.P., Tuchin V.V. Optical clearing of the eye sclera in vivo caused by glucose // *Quantum Electronics*. – 2006. – Vol. 36. – P. 1119-1124.
 178. Bashkatov A.N., Genina E.A., Sinichkin Yu.P., Kochubei V.I., Lakodina N.A., Tuchin V.V. Estimation of the glucose diffusion coefficient in human eye sclera // *Biophysics*. – 2003. – Vol. 48. – P. 292-296.
 179. Genina E.A., Bashkatov A.N., Zubkova E.A., Kamenskikh T.G., Tuchin V.V. Measurements of Retinalamin diffusion coefficient in human sclera by optical spectroscopy // *Optics and Lasers in Engineering*. – 2008. – Vol. 46. – P. 915-920.
 180. Tuchin V.V., Bashkatov A.N., Genina E.A., Sinichkin Yu.P., Lakodina N.A. In vivo investigation of the immersion-liquid-induced human skin clearing dynamics // *Technical Physics Letters*. – 2001. – Vol. 27. – P. 489-490.
 181. Bashkatov A.N., Genina E.A., Sinichkin Yu.P., Kochubey V.I., Lakodina N.A., Tuchin V.V. Glucose and mannitol diffusion in human dura mater // *Biophys. J*. – 2003. – Vol. 85. – P. 3310-3318.
 182. Larin K.V., Ghosn M.G., Ivers S.N., Tellez A., Granada J.F. Quantification of glucose diffusion in arterial tissues by using optical coherence tomography // *Laser Physics Letters*. 2007. – Vol. 4. – P. 312-317.
 183. Tanev S., Tuchin V.V., Paddon P. Cell membrane and gold nanoparticles effects on optical immersion experiments with noncancerous and cancerous cells: finite-difference time-domain modeling // *J. Biomed. Opt.* – 2006. – Vol. 11. – P. 064037.
 184. Tuchin V.V. A clear vision for laser diagnostics (Review) // *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron*. – 2007. – Vol. 13. – P. 1621-1628.
 185. Genina E.A., Bashkatov A.N., Korobko A.A., Zubkova E.A., Tuchin V.V., Yaroslavsky I.V., Altshuler G.B. Optical clearing of human skin: comparative study of permeability and dehydration of intact and photothermally perforated skin // *J. Biomed. Opt.* – 2008. – Vol. 13. – P. 021102.

-
186. Zhu Z., Wu G., Wei H., Yang H., He Y., Xie S., Zhao Q., Guo X. Investigation of the permeability and optical clearing ability of different analytes in human normal and cancerous breast tissues by spectral domain OCT // *J. Biophoton.* – 2012. – Vol. 5. – P. 1-8.
 187. Genina E.A., Bashkatov A.N., Terentyuk G.S., Tuchin V.V. Integrated effects of fractional laser microablation and sonophoresis on skin immersion optical clearing in vivo // *J Biophotonics.* – 2020. – Vol. 13. – P. e202000101.
 188. Zhong H., Guo Z., Wei H., Zeng C., Xiong H., He Y., Liu S. Quantification of glycerol diffusion in human normal and cancer breast tissues in vitro with optical coherence tomography // *Laser Physics Letters.* – 2010. – Vol. 7. – P. 315-320.
 189. Mao Z., Zhu D., Hu Y., Wen X., Han Z. Influence of alcohols on the optical clearing effect of skin in vitro // *J Biomed Opt.* – 2008. – Vol. 13. – P. 021104.
 190. Oliveira L.M., Carvalho M.I., Nogueira E.M., Tuchin V.V. Diffusion characteristics of ethylene glycol in skeletal muscle // *J Biomed Opt.* – 2015. – Vol. 20. – P. 051019.
 191. Tuchina D.K., Genin V.D., Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V. Optical clearing of skin tissue ex vivo with polyethylene glycol // *Opt Spectrosc.* – 2016. – Vol. 120. – P. 28-37.
 192. Tuchina D.K., Genin V.D., Bashkatova A.N., Genina E.A., Tuchin V.V. Optical Clearing of Skin Tissue ex vivo with Polyethylene Glycol // *Optics and Spectroscopy.* – 2016. – Vol. 120. – P. 28-37.
 193. Genin V.D., Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V. Measurement of diffusion coefficient of propylene glycol in skin tissue // in *Saratov Fall Meeting 2014: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVI, Laser Physics and Photonics XVI, and Computational Biophysics* edited by Elina A. Genina, Vladimir L. Derbov, Kirill V. Larin, Dmitry E. Postnov, and Valery V. Tuchin, *Proc. SPIE.* – 2015. – Vol. 9448. –P. 9448 0E.
 194. Genin V.D., Tuchina D.K., Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V. Polyethylene Glycol Diffusion in Ex Vivo Skin Tissue // *AIP Conference Proceedings.* – 2015. – Vol. 1688. – P. 030028.
 195. Feng W., Shi R., Ma N., Tuchina D.K., Tuchin V.V., Zhu D. Skin optical clearing potential of disaccharides // *J Biomed Opt.* – 2016. – Vol. 21. – P. 081207.
 196. Tuchina D.K., Timoshina P.A., Tuchin V.V., Bashkatov A.N., Genina E.A. Kinetics of rat skin optical clearing at topical application of 40% glucose: Ex vivo and in vivo studies // *IEEE J Sel Top Quantum Electron.* – 2019. – Vol. 25. – P. 7200508.
 197. Hirshburg J., Choi B., Nelson J.S., Yeh A.T. Correlation between collagen solubility and skin optical clearing using sugars // *Lasers Surg Med.* – 2007. – Vol. 39. – P. 140-4.

-
198. Tuchin V.V., Maksimova I.L., Zimnyakov D.A., Kon I.L., Mavlutov A.H., Mishin A.A. Light propagation in tissues with controlled optical properties // Proc. SPIE. – 1996. – Vol. 2925. – P. 118-142.
 199. Ding Y., Wang J., Fan Z., Wei D., Shi R., Luo Q., Zhu D., Wei X. Signal and depth enhancement for in vivo flow cytometer measurement of ear skin by optical clearing agents // Biomed Opt Express. 2013. – Vol. 4. – P. 2518-26.
 200. Zhao Q., Dai C., Fan S., Lv J., Nie L. Synergistic efficacy of salicylic acid with a penetration enhancer on human skin monitored by OCT and diffuse reflectance spectroscopy // Sci Rep. – 2016. – Vol. 6. – P. 34954.
 201. Genina E.A., Surkov Yu.I., Serebryakova I.A., Bashkatov A.N., Tuchin V.V., Zharov V.P. Rapid ultrasound optical clearing of human light and dark skin. IEEE Trans Med Imaging. – 2020. – Vol. 39. – P. 3198-206.
 202. Jiang J., Wang R.K. Comparing the synergistic effects of oleic acid and dimethyl sulfoxide as vehicles for optical clearing of skin tissue in vitro // Phys Med Biol. – 2004. – Vol. 49. – P. 5283-94.
 203. Choe C., Lademann J., Darvin M E. Confocal Raman microscopy for investigating the penetration of various oils into the human skin in vivo // J Dermatol Sci. – 2015. – Vol. 79. – P. 171-8.
 204. Xu X., Wang R.K. Synergistic effect of hyperosmotic agents of dimethyl sulfoxide and glycerol on optical clearing of gastric tissue studied with near infrared spectroscopy // Phys Med Biol. – 2004. – Vol. 49. – P. 457-68.
 205. Masoumi Sh., Ansari M.A., Mohajerani E., Genina E.A., Tuchin V.V. Combination of analytical and experimental optical clearing of rodent specimen for detecting beta-carotene: Phantom study // J Biomed Opt. – 2018. – Vol. 23. – P. 095002.
 206. Sdobnov A.Yu., Darvin M.E., Genina E.A., Bashkatov A.N., Lademann J., Tuchin V.V. Recent progress in tissue optical clearing for spectroscopic application // Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. – 2018. – Vol. 197. – P. 216-29.
 207. Bashkatov A.N., Genina E.A., Kochubey V.I., Tuchin V.V., Sinichkin Yu.P. The influence of osmotically active chemical agents on the transport of light in the scleral tissue // Proc SPIE. – 1998. – Vol. 3726. – P. 403-9.
 208. Sdobnov A.Y., Darvin M.E., Schleusener J., Lademan J., Tuchin V.V. Hydrogen bound water profiles in the skin influenced by optical clearing molecular agents: Quantitative analysis using confocal Raman microscopy // J Biophotonics. – 2019. – Vol. 12. – P. e201800283.

-
209. Wen X., Jacques S.L., Tuchin V.V., Zhu D. Enhanced optical clearing of skin in vivo and optical coherence tomography in-depth imaging // *J Biomed Opt.* – 2012. – Vol. 17. – P. 066022.
 210. Feng W., Zhang C., Yu T., Semyachkina-Glushkovskaya O., Zhu D. In vivo monitoring blood–barrier permeability using spectral imaging through optical clearing skull window // *J Biophotonics.* – 2019. – Vol. 12. – P. e201800330.
 211. Genina E.A., Bashkatov A.N., Sinichkin Yu.P., Tuchin V.V. Optical clearing of skin under action of glycerol: ex vivo and in vivo investigations // *Optics and Spectroscopy.* – 2010. – Vol. 109. – P. 225-231.
 212. Costantini I., Cicchi R., Silvestri L., Vanzi F., Pavone F.S. In-vivo and ex-vivo optical clearing methods for biological tissues: Review // *Biomed Opt Express.* – 2019. – Vol. 10. – P. 5251-67.
 213. Deng Z, Jing L, Wu N, Lv P, Jiang X, Ren Q, Li C. Viscous optical clearing agent for in vivo optical imaging // *J Biomed Opt.* – 2014. – Vol. 19. – P. 076019.
 214. Yeh A.T., Choi B., Nelson J.S., Tromberg B.J. Reversible dissociation of collagen in tissues // *J. Invest. Dermatol.* – 2003. – Vol. 121. – P. 1332-1335.
 215. Larina I.V., Carbajal E.F., Tuchin V.V., Dickinson M.E., Larin K.V. Enhanced OCT imaging of embryonic tissue with optical clearing // *Laser Phys. Lett.* – 2008. – Vol. 5. – P. 476-479.
 216. Scheele K.W. Findings Concerning a Particular Sweet Substance in Expressed Oils and Fatty Substances // *K. Sven. Vetenskapsakad. Hand.* – 1783. – Vol. 4. – P. 324-329.
 217. Choi J., Bischof J.C. Review of biomaterial thermal property measurements in the cryogenic regime and their use for prediction of equilibrium and non-equilibrium freezing applications in cryobiology // *Cryobiology.* – 2010. – Vol. 60. – P. 52-70.
 218. Pagliaro M., Rossi M. *The Future of Glycerol.* – UK: The Royal Society of Chemistry, 2010. – 170 p.
 219. Gu Y., Jérôme F. Glycerol as a Sustainable Solvent for Green Chemistry // *Green Chem.* – 2010. – Vol. 12. – P. 1127-1138.
 220. Chenlo F., Moreira R., Pereira G., Bello B. Kinematic viscosity and water activity of aqueous solutions of glycerol and sodium chloride // *European Food Research and Technology.* – 2004. – Vol. 219. – P. 403-408.
 221. Moreira R., Chenlo F., LeGall D. Kinematic viscosity and refractive index of aqueous solutions of ethanol and glycerol // *Ind. Eng. Chem. Res.* – 2009. – Vol. 48. – P. 2157-2161.

-
222. Kataoka Y., Kitadai N., Hisatomi O., Nakashima S. Nature of hydrogen bonding of water molecules in aqueous solutions of glycerol by attenuated total reflection (ATR) infrared spectroscopy // *Appl. Spectroscopy*. – 2011. – Vol. 65. – P. 436-441.
223. Akinkunmi F.O., Jahn D.A., Giovambattista N. Effects of temperature on the thermodynamic and dynamical properties of glycerol-water mixtures: a computer simulation study of three different force fields // *J. Chem. Phys.* – 2015. – Vol. 119. – P. 6250-6261.
224. Christoph R., Schmidt B., Steinberner U., Dilla W., Karinen R. Glycerol. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. – Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012. – P. 67–81.
225. Genin V.D., Tuchina D.K., Sadeq A.J., Genina E.A., Tuchin V.V., Bashkatov A.N. Ex vivo investigation of glycerol diffusion in skin tissue // *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. – 2016. – Vol. 2. – P. 010303.
226. Segur J.B., Oberstar H.E. Viscosity of glycerol and its aqueous solutions // *Ind. and Eng. Chem.* – 1951. – Vol. 43. – P. 2117-2120.
227. Walling P.L., Dabney J.M. Moisture in skin by near-infrared reflectance spectroscopy // *J. Soc. Cosmet. Chem.* – 1989. – Vol. 40. – P. 151-171.
228. Fluhr J.W., Mao-Qiang M., Brown B.E., Wertz P.W., Crumrine D., Sundberg J.P., Feingold K.R., Elias P.M. Glycerol regulates stratum corneum hydration in sebaceous gland deficient (asebia) mice // *J. Invest. Dermatol.* – 2003. – Vol. 120. – P. 728-737.
229. Verdier-Sevrain S., Bonte F. Skin hydration: a review on its molecular mechanisms // *J. Cosmetic Dermatology*. – 2007. – Vol. 6. – P. 75-82.
230. Bouwstra J.A., Nahmoed N., Groenink H.W.W., Ponc M. Human skin equivalents are an excellent tool to study the effect of moisturizers on the water distribution in the stratum corneum // *Int. J. Cosmetic Science*. – 2012. – Vol. 34. – P. 560-566.
231. Sethu Raman M., Ponnuswamy V., Kolandaivel P., Perumal K. Ultrasonic and DFT study of intermolecular association through hydrogen bonding in aqueous solutions of glycerol // *Journal of Molecular Liquids*. – 2008. – Vol. 142. – P. 10-16.
232. Vargas G., Chan E.K., Barton J.K., Rylander III H.G., Welch A.J. Use of an agent to reduce scattering in skin // *Lasers Surg. Med.* – 1999. – Vol. 24. – P. 133-141.
233. Fox M.A., Diven D.G., Sra K., Boretsky A., Poonawalla T., Readinger A., Motamedi M., McNichols R.J. Dermal scatter reduction in human skin: a method using controlled application of glycerol // *Lasers Surg. Med.* – 2009. – Vol. 41. – P. 251-255.

-
234. Wang J., Liang Y., Zhang S., Zhou Y., Ni H., Li Y. Evaluation of optical clearing with the combined liquid paraffin and glycerol mixture // *Biomedical Optics Express*. – 2011. – Vol. 2. – P. 2329-2338.
 235. Genina E., Genin V.D., Zhu J., Bashkatov A., Zhu D., Tuchin V. Traditional and innovative optical clearing agents / Chapter 3 in *Handbook of Tissue Optical Clearing. New Prospects in Optical Imaging*. Edited by Tuchin V., Zhu D., Genina E.A. – Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group LLC, 2022. – P. 67-91.
 236. Huang D., Zhang W., Zhong H., Xiong H., Guo X., Guo Z. Optical clearing of porcine skin tissue in vitro studied by Raman microspectroscopy // *J. Biomed. Opt.* – 2012. – Vol. 17. – P. 015004.
 237. Nijssen A., Bakker Schut T.C., Heule F., Caspers P.J., Hayes D.P., Neumann M.H., Puppels G.J. Discriminating basal cell carcinoma from its surrounding tissue by Raman spectroscopy // *J Invest Dermatol.* – 2002. – Vol. 119. – P. 64-9.
 238. Schulmerich M.V., Dooley K.A., Vanasse T.M., Goldstein S.A., Morris M.D. Subsurface and transcutaneous Raman spectroscopy and mapping using concentric illumination rings and collection with a circular fiber optic array // *Appl Spectrosc.* – 2007. – Vol. 61. – P. 671-8.
 239. Schulmerich M.V., Cole J.H., Dooley K.A., Morris M.D., Kreider J.M., Goldstein S.A. Optical clearing in transcutaneous Raman spectroscopy of murine cortical bone tissue // *J Biomed Opt.* – 2008. – Vol. 13. – P. 021108.
 240. Genina E.A., Bashkatov A.N., Tuchin V.V. Optical clearing of cranial bone // *Adv Opt Technol.* – 2008. – Vol. 2008. – P. 267867.
 241. Bashkatov A.N., Berezin K.V., Dvoretzkiy K.N., Chernavina M L., Genina E.A., Genin V.D., Kochubey V.I., Lazareva E.N., Pravdin A.B., Shvachkina M.E., Timoshina P.A., Tuchina D.K., Yakovlev D.D., Yakovlev D.A., Yanina I.Yu., Zhernovaya O.S., Tuchin V.V. Measurement of tissue optical properties in the context of tissue optical clearing // *J. Biomed. Opt.* – 2018. – Vol. 23. – P. 091416.
 242. Carneiro I., Carvalho S., Henrique R., Oliveira R., Tuchin V.V. Simple multimodal optical technique for evaluation of free/bound water and dispersion of human liver tissue // *J Biomed Opt.* – 2017. – Vol. 22. – P. 125002.
 243. Son T., Jung B. Cross-evaluation of optimal glycerol concentration to enhance optical clearing efficacy // *Skin Research and Technology*. – 2015. – Vol. 21. – P. 327-332.
 244. Yoon J., Park D., Son T., Seo J., Nelson J.S., Jung B. A physical method to enhance transdermal delivery of a tissue optical clearing agent: Combination of microneedling and sonophoresis // *Lasers Surg Med.* – 2010. – Vol. 42. – P. 412-7.

-
245. Carneiro I., Carvalho S., Henrique R., Oliveira R., Tuchin V.V. Kinetics of optical properties of colorectal muscle during optical clearing // *IEEE J Sel Top Quantum Electron.* – 2019. – Vol. 25. – P. 7200608.
 246. Tuchina D.K., Bashkatov A.N., Bucharskaya A.B., Genina E.A., Tuchin V.V. Study of glycerol diffusion in skin and myocardium ex vivo under the conditions of developing alloxan-induced diabetes // *J Biomed Photon Eng.* – 2017. – Vol. 3. – P. 020302.
 247. Galanzha E.I., Tuchin V.V., Solovieva A.V., Stepanova T.V., Luo Q., Cheng H. Skin backreflectance and microvascular system functioning at the action of osmotic agents // *J Phys D Appl Phys.* – 2003. – Vol. 36. – P. 1739-46.
 248. Vargas G., Readinger A., Dosier S.S., Welch A.J. Morphological changes in blood vessels produced by hyperosmotic agents and measured by optical coherence tomography // *Photochem Photobiol.* – 2003. – Vol. 77. – P. 541-9.
 249. Zhu D., Zhang J., Cui H., Mao Z., Li P., Luo Q. Short-term and long-term effects of optical clearing agents on blood vessels in chick chorioallantoic membrane // *J Biomed Opt.* – 2008. – Vol. 13. – P. 021106.
 250. Mao Z., Wen X., Wang J., Zhu D. The biocompatibility of the dermal injection of glycerol in vivo to achieve optical clearing // *Proc SPIE.* – 2009. – Vol. 7519. – P. 75191.
 251. Hirshburg J.M., Ravikumar K.M., Hwang W., Yeh A.T. Molecular basis for optical clearing of collagenous tissues // *J Biomed Opt.* – 2010. – Vol. 15. – P. 055002.
 252. Samatham R., Phillips K.G., Jacques S.L. Assessment of optical clearing agents using reflectance mode confocal scanning laser microscopy // *J Innov Opt Health Sci.* – 2010. – Vol. 3. – P. 183-8.
 253. Stumpp O., Welch A.J., Neev J. Enhancement of transdermal skin clearing agent delivery using a 980 nm diode laser // *Lasers Surg. Med.* – 2005. – Vol. 37. – P. 278-285.
 254. Liu C., Zhi Z., Tuchin V.V., Luo Q., Zhu D. Enhancement of skin optical clearing efficacy using photo-irradiation // *Lasers Surg. Med.* – 2010. – Vol. 42. – P. 132-140.
 255. Youn J.-I. The effect of an optical clearing agent on tissue prior to 1064-nm laser therapy // *Med. Laser.* – 2021. – Vol. 10. – P. 146-152.
 256. Chu Y., Liao Sh., Liao H., Lu Y., Geng X., Wu D., Pei J., Wang Y. Second near-infrared photothermal therapy with superior penetrability through skin tissues // *CCS Chem.* – 2021. – Vol. 3. – P. 3289-3300.
 257. Laufer J., Simpson R., Kohl M., Essenpreis M., Cope M. Effect of temperature on the optical properties of ex vivo human dermis and subdermis // *Phys. Med. Biol.* – 1998. – Vol. 43. – P. 2479-2489.

-
258. Iorizzo T.W., Jermain P.R., Salomatina E., Muzikansky A., Yaroslavsky A.N. Temperature induced changes in the optical properties of skin in vivo // *Sci. Rep.* – 2021. – Vol. 11. – P. 754.
259. Jia H., Chen B., Li D. Dynamic optical absorption characteristics of blood after slow and fast heating // *Lasers Med. Sci.* – 2017. – Vol. 32. – P. 513-525.
260. Manuchehrabadi N., Chen Y., LeBrun A., Ma R., Zhu L. Computational simulation of temperature elevations in tumors using Monte Carlo method and comparison to experimental measurements in laser photothermal therapy // *J. Biomech. Eng.* – 2013. – Vol. 135. – P. 121007.
261. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals / CIOMS-ICLAS (2012). URL: https://grants.nih.gov/grants/olaw/guiding_principles_2012.pdf (дата обращения: 24.11.2021, 14:00 Мск.)
262. Yang W.T., Tse G.M.K., Lam P.K.W., Metreweli C., Chang J. Correlation between color power Doppler sonographic measurement of breast tumor vasculature and immunohistochemical analysis of microvessel density for the quantitation of angiogenesis // *Journal of Ultrasound in Medicine.* – 2002. – Vol. 21. – P. 1227-1235.
263. Khlebtsov B.N., Tuchina E.S., Khanadeev V.A., Panfilova E.V., Petrov P.O., Tuchin V.V., Khlebtsov N.G. Enhanced photoinactivation of *Staphylococcus aureus* with nanocomposites containing plasmonic particles and hematoporphyrin // *Journal of Biophotonics.* – 2013. – Vol. 6. – P. 338-351.
264. Puvanakrishnan P., Park J., Chatterjee D., Krishnan S., Tunnell J.W. In vivo tumor targeting of gold nanoparticles: effect of particle type and dosing strategy // *International Journal of Nanomedicine.* – 2012. – Vol. 7. – P. 1251-1258.
265. Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N., Dikht N.I., Navolokin N.A., Terentyuk G.S., Bashkatov A.N., Genina E.A., Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G., Tuchin V.V. Plasmonic photothermal therapy of transplanted tumors in rats at multiple intravenous injection of gold nanorods // *BioNanoScience.* – 2017. – Vol. 7. – P. 216-221.
266. Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N., Navolokin N.A., Terentyuk G.S., Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G., Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V. The assessment of effectiveness of plasmonic resonance photothermal therapy in tumor-bearing rats after multiple intravenous administration of gold nanorods // *Proc. SPIE.* – 2017. – Vol. 10336. – P. 10336 0Q.
267. Hirsch L.R., Stafford R.J., Bankson J.A., Sershen S.R., Rivera B., Price R.E., Hazle J.D., Halas N.J., West J.L. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under

-
- magnetic resonance guidance // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – Vol. 100. – P. 13549-13554.
268. Prahl S.A., van Gemert M.J.C., Welch A.J. Determining the optical properties of turbid media by using the adding-doubling method // *Appl. Opt.* – 1993. – Vol. 32. – P. 559-568.
269. Башкатов А.Н., Генина Э.А., Кочубей В.И., Тучин В.В., Чикина Е.Э., Князев А.Б., Мареев О.В. Оптические свойства слизистой оболочки в спектральном диапазоне 350-2000 нм // *Оптика и Спектроскопия*. – 2004. – Т. 97. – С. 1037-1042.
270. Prahl S.A. Optical-thermal response of laser-irradiated tissue / Eds. Welch A.J., van Gemert M.J.C. – New York: Plenum Press, 1995. – 101 p.
271. Банди Б. Методы оптимизации. – М.: Радио и связь, 1988. – 128 с.
272. Palmer K.F., Williams D. Optical properties of water in the near infrared // *J. Opt. Soc. Am.* – 1974. – Vol. 64. – P. 1107-1110.
273. Bohren C.F., Huffman D.R. Absorption and scattering of light by small particles. – New York: John Wiley & Sons Inc., 1983. – 530 p.
274. Friebel M., Helfmann J., Netz U., Meinke M. Influence of oxygen saturation on the optical scattering properties of human red blood cells in the spectral range 250 to 2000 nm, // *J. Biomed. Opt.* – 2009. – Vol. 14. – P. 034001.
275. Avetisyan Yu.A., Yakunin A.N., Tuchin V.V. On the problem of local tissue hyperthermia control: multiscale modelling of pulsed laser radiation action on a medium with embedded nanoparticles // *Quantum Electronics*. – 2010. – Vol. 40. – P. 1081-1088.
276. Maksimova I.L., Akchurin G.G., Terentyuk G.S., Khlebtsov B.N., Akchurin G.G., Ermolaev I.A., Skaptsov A.A., Revzina E.M., Tuchin V.V., Khlebtsov N.G. Laser photothermolysis of biological tissues by using plasmon-resonance particles // *Quantum Electronics*. – 2008. – Vol. 38. – P. 536-542.
277. Ivanov A.P. Correction of the temperature of biological objects in thermographic methods // *Journal of Applied Spectroscopy*. – 2019. – Vol. 86. – P. 136-145.
278. Welch A.J., Wissler E.H., Priebe L.A. Significance of blood flow in calculations of temperature in laser irradiated tissue // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. – 1980. – Vol. 27. – P. 164-166.
279. Shchyogolev S.Yu. Inverse problems of spectroturbidimetry of biological disperse systems: an overview // *J. Biomed. Opt.* – 1999. – Vol. 4. – P. 490-503.
280. Тучина Д.К., Башкатов А.Н., Генина Э.А., Тучин В.В. Исследование воздействия иммерсионных агентов на весовые и геометрические параметры ткани миокарда *in vitro* // *Биофизика*. – 2018. – Т. 63. – С. 989-996.

-
281. Schiebener P., Straub J. Refractive index of water and steam as function of wavelength, temperature and density // *J. Phys. Chem. Ref. Data.* – 1990. – Vol. 19. – P. 677-717.
 282. Noble M.V., Garrett A.B. A thermodynamic study of lead chloride in dioxane-water by means of electromotive force and solubility data at 25°; the acetone-, ethanol-, dioxane-, glycerol-water-lead chloride systems // *J. Am. Chem. Soc.* – 1944. – Vol. 66. – P. 231-235.
 283. Wiechers J.W., Dederen J.C., Rawlings A.V. Moisturization mechanisms: internal occlusion by orthorhombic lipid phase stabilizers – a novel mechanism of skin moisturization / Chap. 19 in *Skin Moisturization*, Rawlings A.V., Leyden J.J. (Eds.). – London: Taylor and Francis, 2009. – P. 309-321.
 284. D’Errico G., Ortona O., Capuano F., Vitagliano V. Diffusion coefficients for the binary system glycerol + water at 25 °C. A velocity correlation study // *J. Chem. Eng. Data.* – 2004. – Vol. 49. – P. 1665-1670.
 285. Youn E., Son T., Kim H.-S., Jung B. Determination of optimal glycerol concentration for optical tissue clearing // *Proc. SPIE.* – 2012. – Vol. 8207. – P. 82070J.
 286. Bashkatov A.N., Genina E.A., Kochubey V.I., Tuchin V.V. Estimation of wavelength dependence of refractive index of collagen fibers of scleral tissue // *Proc. SPIE.* – 2000. – Vol. 4162. – P. 265-268.
 287. Nishijima Y., Oster G.. Diffusion of glycerol-water mixture // *Bulletin of the Chemical Society of Japan.* – 1960. – Vol. 33. – P. 1649-1651.
 288. Chen B., Sigmund E.E., Halperin W.P. Stokes-Einstein relation in supercooled aqueous solutions of glycerol // *Phys. Rev. Lett.* – 2006. – Vol. 96. – P. 145502.
 289. Naepels C.M., Pluhařová E., Laage D. Protein preferential solvation in water:glycerol mixtures // *J. Phys. Chem. B.* – 2020. – Vol. 124. – P. 1424-1437.
 290. Berezin K.V., Dvoretzkiy K.N., Chernavina M.L., Likhter A.M., Smirnov V.V., Shagautdinova I.T., Antonova E.M., Stepanovich E.Yu., Dzhalnambetova E.A., Tuchin V.V. Molecular modeling of immersion optical clearing of biological tissues // *J. Mol. Model.* – 2018. – Vol. 24. – P. 45.
 291. Chen W., Jiang J., Zhang W., Wang R.K., Xu K. Typical application of skin diffusion optical model to quantitative description of tissue optical properties // *Proc. SPIE.* – 2009. – Vol. 7176. – P. 71760L.
 292. Jiang J., Zhang L., Wang R.K. Synergistic effect of hyperosmotic agents under topical application on optical clearing of skin tissue in vitro // *Proc. SPIE.* – 2005. – Vol. 5696. – P. 80-90.

-
293. Mao Z., Han Z., Wen X., Luo Q., Zhu D. Influence of glycerol with different concentration on skin optical clearing and morphological changes in vivo // Proc. SPIE. – 2009. – Vol. 7278. – P. 72781T.
294. Xu X., Zhu Q. Feasibility of sonophoretic delivery for effective skin optical clearing // IEEE Transactions on Biomedical Engineering. – 2008. – Vol. 55. – P. 1432-1437.
295. Xie H., Goins B., Bao A., Wang Z.J., Philips W.T. Effect of intratumoral administration on biodistribution of ⁶⁴Cu-labeled nanoshells // Int. J. Nanomed. – 2012. – Vol. 7. – P. 2227-2238.
296. Wang R.K., Tuchin V.V. Optical coherence tomography. Light scattering and imaging enhancement / V.V. Tuchin (Ed.). – New York, Heidelberg, Dordrecht, London: Springer, 2013. – P. 665-742.
297. Faber D.J., van der Meer F.J., Aalders M.C.G., van Leeuwen T.G. Quantitative measurement of attenuation coefficients of weakly scattering media using optical coherence tomography // Opt. Express. – 2004. – Vol. 12. – P. 4353-4365.
298. Генина Э.А., Ксенофонтова Н.С., Башкатов А.Н., Терентюк Г.С., Тучин В.В. Исследование влияния абляции эпидермиса на эффективность оптического просветления кожи in vivo // Квантовая электроника. – 2017. – Т. 47. – С. 561-566.
299. Jiang J., Boese M., Turner P., Wang R.K. Penetration kinetics of dimethyl sulphoxide and glycerol in dynamic optical clearing of porcine skin tissue in vitro studied by Fourier transform infrared spectroscopic imaging // J. Biomed. Opt. – 2008. – Vol. 13. – P. 021105.
300. Genina E.A., Bashkatov A.N., Kolesnikova E.A., Basco M.V., Terentyuk G.S., Tuchin V.V. Optical coherence tomography monitoring of enhanced skin optical clearing in rats in vivo // J. Biomed. Opt. – 2014. – Vol. 19. – P. 021109.
301. Pagnoni A., Knuettel A., Welker P., Rist M., Stoudemayer T., Kolbe L., Sadiq I., Kligman A.M. Optical coherence tomography in dermatology – Skin Res. Technol. – 1999. – Vol. 5. – P. 83-87.
302. Prah S.A. Optical absorption of haemoglobin / URL: <http://www.omlc.ogi.edu/spectra/> (дата обращения: 04.01.2022, 12:00 Мск.)
303. Langford V.S., McKinley A.J., Quickenden T.I. Temperature dependence of the visible-near-infrared absorption spectrum of liquid water // J. Phys. Chem. A. – 2001. – Vol. 105. – P. 8916-8921.
304. Otal E.H., Icy F.A., Andrade F.J. Monitoring the temperature of dilute aqueous solutions using near-infrared water absorption // Appl. Spectrosc. – 2003. – Vol. 57. – P. 661-666.