

# Использование спектроскопии обратного диффузного отражения света для мониторинга состояния тканей при фотодинамической терапии

А.А.Стратонников, Г.А.Меерович, А.В.Рябова, Т.А.Савельева, В.Б.Лощенов

*Продемонстрирована методика спектроскопии обратного диффузного отражения (ОДО) света для контроля степени оксигенации гемоглобина и концентрации фотосенсибилизаторов в тканях in vivo при фотодинамической терапии. Для измерения спектров диффузного отражения предложена простая экспериментальная методика. Измерения проводились в стационарном режиме с использованием волоконно-оптического зонда с одним передающим и одним собирающим волокном с фиксированным расстоянием между волокнами. Хотя такой подход не позволяет разделить вклад рассеяния и поглощения в измеряемые спектры, он может быть использован для оценки степени оксигенации гемоглобина и концентрации фотосенсибилизаторов в тканях. Приведены простые выражения для оценки концентрации фотосенсибилизаторов из спектров ОДО и проанализирована точность используемого подхода. Приведены результаты использования спектроскопии ОДО света при контроле различных фотосенсибилизаторов.*

**Ключевые слова:** оптическая диагностика, спектроскопия диффузного отражения, многократное рассеяние, фотодинамическая терапия, фотосенсибилизаторы.

## 1. Введение

Спектроскопия обратного диффузного отражения (ОДО) света находит широкое применение в диагностике и контроле различных физиологических процессов в тканях. За 30 лет, прошедших с момента публикации работы Джобсиса [1], демонстрирующей возможность использования спектроскопии ОДО света в ИК диапазоне для неинвазивного мониторинга оксигенации, эта методика усовершенствовалась, а сфера ее применения существенно расширилась (см. обзор [2] и цитируемую там литературу). В настоящее время методика спектроскопии ОДО, помимо контроля оксигенации гемоглобина и ферментов дыхательной цепи (цитохромов), используется для диагностики рака кожи [3], мочевого пузыря [4], прямой кишки [5], желудочно-кишечного тракта [6], в гинекологии [7], а также для диагностики онкологических заболеваний других локализаций. Данная методика нашла также применение для контроля экзогенных фотосенсибилизаторов (ФС), используемых в фотодинамической терапии (ФДТ) [8–14], и различных химиотерапевтических агентов [15]. При использовании спектроскопии ОДО в онкологической диагностике исследователи обычно пытаются выявить характерные черты непосредственно в спектрах, которые различаются для опухолевых и нормальных тканей (tumor signature); при использовании же этой методики для контроля оксигенации и экзогенных ФС возникает необходимость выделить вклад поглощения в чистом виде, а затем, анализируя зависимость

коэффициента поглощения от длины волны, определить концентрации хромофоров в тканях, как это делается в спектроскопии поглощения нерассеивающих сред.

Чтобы разделить вклады поглощения и рассеяния в спектр диффузного отражения, необходимо использовать методику с временным разрешением [11, 16] либо проводить измерения диффузного отражения одновременно на нескольких расстояниях между передающим и приемным волокнами [12, 13, 17]. Оба подхода, особенно первый, требуют использования сложного дорогостоящего оборудования и громоздкого анализа экспериментальных данных, что затрудняет использование данных подходов для рутинных каждодневных исследований. Использование второй методики, в которой приемное волокно сканируется относительно передающего, существенно увеличивает время измерения и практически неудобно при измерениях in vivo. В данной работе описана простая методика, в которой измерения спектров ОДО проводятся в стационарном режиме при одном фиксированном расстоянии между передающим и приемным волокнами. Такой подход нашел применение в ФДТ как для мониторинга степени оксигенации гемоглобина, так и для оценки концентрации ФС в тканях (для получения количественных данных о концентрации ФС в тканях используется методом стандартных образцов).

## 2. Спектроскопия обратного диффузного отражения света in vivo

Схема экспериментальной установки для измерения спектров ОДО in vivo представлена на рис.1. Свет от галогеновой лампы  $I$  в спектральном диапазоне 400–1100 нм фокусировался на торец передающего оптического волокна 2. В качестве передающих волокон использовались кварцевые моноволокна диаметрами от 600 до 1000 мкм с числовой апертурой  $NA = 0.22$  или стеклян-

А.А.Стратонников, Г.А.Меерович, А.В.Рябова, Т.А.Савельева, В.Б.Лощенов. Центр естественно-научных исследований Института общей физики им. А.М.Прохорова РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 38; e-mail: alstrat77@mail.ru

Поступила в редакцию 7 июля 2006 г., после доработки – 7 августа 2006 г.

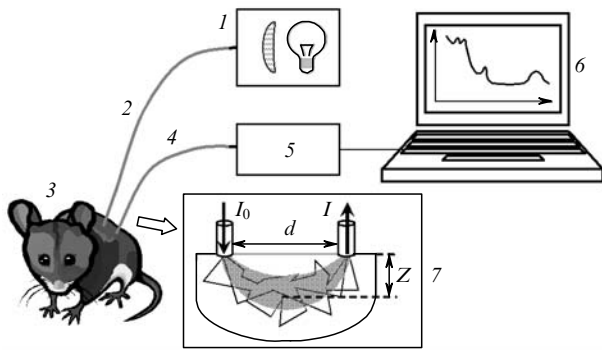


Рис. 1. Схема экспериментальной установки для измерения спектров ОДО тканей *in vivo*:

1 – галогеновая лампа; 2 – передающее волокно; 3 – исследуемая ткань; 4 – приемное волокно; 5 – спектрометр; 6 – ПК. На вставке 7 показано рассеяние и поглощение света в ткани.

ные волоконные жгуты диаметром 3–5 мм с числовой апертурой  $NA = 0.45$ . Жгуты использовались при больших расстояниях между передающим и приемным волокнами, когда было необходимо обеспечить большую мощность (вплоть до 100 мВт) подводимого света. Передающее волокно доставляло свет к ткани 3. Далее свет проходил через ткань (см. вставку 7), испытывая рассеяние и поглощение, и поступал в приемное волокно 4. В качестве последнего использовались кварцевые моноволокна диаметром 200 мкм либо же волоконные жгуты, состоящие из семи таких волокон, гексагонально уложенных со стороны ткани для обеспечения пространственной локальности детектирования света на поверхности ткани, а со стороны спектрометра – уложенных в линию для сохранения спектрального разрешения. Такая конструкция жгута позволила в семь раз увеличить количество собираемого от ткани рассеянного света и сохранить требуемое спектральное разрешение.

Приемное и передающее волокна обычно находились в непосредственном контакте с тестируемой тканью или на небольшом расстоянии (до 1 мм) от ее поверхности с тем, чтобы избежать влияния на ее оптические свойства надавливания. При этом, поскольку расстояния  $d$  между волокнами были более 3 мм, френелевское отражение от ткани не регистрировалось. С приемного волокна свет поступал в спектрометр 5, который управлялся через USB-интерфейс персональным компьютером 6 с помощью специального программного обеспечения. В качестве спектрометра использовался волоконно-оптический спектрометр ЛЭСА-5 (ЗАО «Биоспек»). Для исключения влияния спектральной чувствительности детектора, спектра пропускания волокон, а также спектральной излучательной характеристики источника света на детектируемый сигнал измерения проводились относительно стандартного образца ( $BaSO_4$ ) с коэффициентом отражения, близким к единице в интересующем нас спектральном диапазоне.

Полученные данные обычно приводят в виде спектральной зависимости коэффициента отражения  $R(\lambda) = I/I_0$  либо логарифма его обратной величины  $A = \ln(1/R)$ . Поскольку величина  $A$  зависит также от коэффициента рассеяния ткани, то будем называть ее ослаблением. Записанные выше величины  $I$  и  $I_0$  – это измеряемые сигналы отражения от ткани и от стандартного образца ( $BaSO_4$ ) соответственно. Так как зависимость  $I_0$  от длины

волны  $\lambda$  можно измерить с точностью до некоторого постоянного множителя, то измеряемый коэффициент отражения  $R(\lambda)$  также определяется с точностью до некоторого постоянного множителя, а ослабление  $A(\lambda)$  – с точностью до некоторой аддитивной постоянной, не зависящей от длины волны. При анализе экспериментальных данных значение этой константы для нас не существенно.

Следует отметить, что, говоря о коэффициенте диффузного отражения, обычно подразумевают другую геометрию измерений, в которой диффузно отраженный от ткани свет собирают в ближней окрестности зоны подвода света либо с помощью интегрирующей сферы, либо с помощью приемного волокна, расположенного на некотором расстоянии от поверхности ткани так, что апертура сбора фотонов охватывает всю площадь ткани, из которой выходит диффузно отраженный свет. При этом большая часть собранных фотонов проходит по ткани относительно небольшой путь – порядка нескольких глубин проникновения света в ткань, которая для кожи в видимом и ближнем ИК диапазонах составляет 1–2 мм. Далее будем называть измеренное таким образом отражение локальным коэффициентом отражения. При этой геометрии измерений в детектор попадают фотоны, которые прошли в ткани как большой, так и малый путь. Если же для доставки и сбора света используются оптические волокна, расположенные на некотором расстоянии  $d$  друг от друга, то, варьируя это расстояние, можно изменять среднюю длину пути фотона в ткани  $\langle L \rangle$  и глубину зондирования  $Z$  (см. вставку 7 на рис. 1).

Коэффициент диффузного отражения  $R$  зависит прежде всего от коэффициента поглощения и редуцированного коэффициента рассеяния, а также от пространственного распределения этих коэффициентов в ткани (слоистость ткани [18], эффект «пакетирования» пигмента [19, 20, 21] и т. д.). Особенно сильно слоистость ткани сказывается при локальном измерении коэффициента отражения, поскольку при этом часть света может испытать диффузное отражение, даже не достигнув более глубоких слоев, где располагаются кровеносные сосуды. Вклад верхних слоев ткани, в частности эпидермиса, в котором отсутствуют капилляры и, следовательно, гемоглобин, при измерении отражения по схеме с разнесенными волокнами можно оценить, сравнивая относительные длины пути фотона в эпидермисе и в более глубоких слоях ткани. В используемой геометрии измерений длина пути фотона на траектории между приемным и передающим волокнами в более глубоких слоях ткани почти на два порядка превышает длину пути в эпидермисе.

Для пространственно однородной среды коэффициент диффузного отражения можно представить в виде следующего интеграла:

$$R = \frac{I}{I_0} = \int_0^{\infty} P(\mu'_s, l) \exp(-\mu_a l) dl, \quad (1)$$

где  $\mu_a$  и  $\mu'_s$  – коэффициент поглощения и редуцированный коэффициент рассеяния света;  $l$  – длина пути фотона в ткани;  $P$  – функция распределения фотонов по длинам пути. Безразмерная величина  $P(\mu'_s, l) dl$  имеет смысл вероятности того, что длина пути фотона по ткани между передающими и приемным волокнами будет лежать в интервале  $[l, l + dl]$ . Функция распределения фотонов по путям определяется геометрией измерений (расстоянием

между волокнами  $d$ , их числовой апертурой, расстоянием волокон от поверхности ткани и др.) и зависит от рассеивающих свойств среды – редуцированного коэффициента рассеяния  $\mu'_s$ . Вообще говоря, нужно учитывать зависимость  $P$  одновременно как от коэффициента рассеяния  $\mu_s$ , так и от фактора анизотропии рассеяния  $g$ , которые связаны с редуцированным коэффициентом рассеяния соотношением  $\mu'_s = \mu_s(1 - g)$ . Однако в дальнейшем для простоты будем считать, что  $P$  определяется величиной  $\mu'_s$ .

Очевидно, что при измерении спектров поглощения в нерассеивающей среде с длиной пути фотонов  $L$  функция распределения по путям есть  $\delta$ -функция Дирака  $P(l) = \delta(l - L)$ . Подстановка этой функции в выражение (1) естественно дает закон Ламберта – Бэра, описывающий ослабление света в поглощающей нерассеивающей среде,

$$\frac{I}{I_0} = \int_0^\infty \delta(l - L) \exp(-\mu_a l) dl = \exp(-\mu_a L). \quad (2)$$

При наличии рассеяния траектории фотонов, достигших детектора, имеют разные длины, что приводит к размытию функции распределения  $P$ . Точные аналитические выражения для функции распределения по путям и для коэффициента отражения даже в случае простейшей геометрии полубесконечной однородной среды отсутствуют, но имеются различные приближенные подходы к решению этой задачи. Один из подходов, называемый модифицированным законом Ламберта – Бэра, используется при исследовании изменений в спектрах диффузного отражения, вызванных относительно небольшими вариациями в коэффициенте поглощения среды:

$$A = \ln R^{-1} = A_0 + \langle L \rangle \mu_a, \quad (3)$$

где  $A_0$  – ослабление сигнала в среде в отсутствие поглощения, а  $\langle L \rangle$  – длина пути фотонов в ткани, усредненная некоторым определенным образом. В зависимости от того, как определяется величина  $\langle L \rangle$ , модифицированный закон Ламберта – Бэра в виде (3) может соответствовать, вообще говоря, совершенно различным подходам, описывающим разные приближения. Обычно под  $\langle L \rangle$  понимают среднюю длину пути фотона в ткани, которая выражается через функцию распределения фотонов по путям следующим образом:

$$\langle L \rangle = \frac{\partial A}{\partial \mu_a} = \int_0^\infty l P(l) \exp(-\mu_a l) dl / \int_0^\infty P(l) \exp(-\mu_a l) dl. \quad (4)$$

Однако в таком представлении  $\langle L \rangle$  модифицированный закон Ламберта – Бэра справедлив только при небольших вариациях  $\mu_a$ . В общем случае, когда изменения  $\mu_a$  велики, выражение (3) верно, если используется следующая формула для  $\langle L \rangle$  [22]:

$$\langle L \rangle_{\text{int}} = \frac{1}{\mu_a} \int_0^{\mu_a} \langle L \rangle \mu_a^* d\mu_a^* = \frac{1}{\mu_a} \times \int_0^{\mu_a} \left[ \int_0^\infty l P(l) \exp(-\mu_a^* l) dl / \int_0^\infty P(l) \exp(-\mu_a^* l) dl \right] d\mu_a^*. \quad (5)$$

В отличие от выражения (4) здесь используется интегральное среднее значение длины пути в интервале  $0 - \mu_a$ .

Модифицированный закон Ламберта – Бэра с использованием выражения (5) для средней длины пути верен в общем случае, в чем легко убедиться: подставив (5) в (3) и проинтегрировав обе части уравнения по  $\mu_a$ , мы получим верное тождество. Однако с точки зрения практических применений модифицированного закона Ламберта – Бэра для интерпретации спектров диффузного отражения запись средней длины пути в виде (5) и даже в виде (4) фактически ничего не дает, поскольку в этом случае величина  $\langle L \rangle$  сама является сложной функцией от  $\mu_a$  и  $\mu'_s$ . Для практических применений этого закона необходимо аппроксимировать среднюю длину пути фотонов более простым выражением.

При анализе спектров диффузного отражения, вызванных небольшими вариациями  $\mu_a$  и  $\mu'_s$ , модифицированный закон Ламберта – Бэра можно записать в дифференциальной форме:

$$\Delta A = \langle L \rangle |_{\mu_a = \mu_a^0} \Delta \mu_a, \quad \mu_a = \mu_a^0 + \Delta \mu_a, \quad (6)$$

где  $\mu_a^0$  – коэффициент поглощения ткани в отсутствие ФС, а  $\langle L \rangle$  определяется выражением (4). Заметим, что в этой записи  $\langle L \rangle$  не зависит от  $\Delta \mu_a$ , а в случае, когда изменения  $\mu'_s$  в рассматриваемом спектральном диапазоне также малы, величину  $\langle L \rangle$  приближенно можно считать не зависящей и от длины волны. Несмотря на то что выражение (6) обосновано только для небольших вариаций  $\mu_a$ , данное приближение, как это часто бывает, может довольно хорошо работать и за пределами своей формальной области применимости. Применимость этого приближения в случае относительно больших вариаций коэффициента поглощения была детально рассмотрена в работе [23], где было показано, что модифицированный закон Ламберта – Бэра может использоваться и при  $\Delta \mu_a \sim \mu_a^0$ .

Еще один подход, который может быть использован при интерпретации спектров отражения, – это диффузионное приближение. В нем функция распределения фотонов по длинам пути для полубесконечной однородной среды с передаточным и приемным волокнами, разнесенными на расстояние  $d$ , определяется как [24]

$$P(l) = z_0 (4\pi D)^{-3/2} l^{-5/2} \exp\left(-\frac{d^2 + z_0^2}{4Dl}\right), \quad (7)$$

где  $z_0 = 1/\mu'_s$ ,  $D = 1/3\mu'_s$ . Напомним, что диффузионное приближение применимо, если  $d \gg 1/z_0$  и  $\mu_a \ll \mu'_s$ . Подставляя (7) в (1) и вычисляя интеграл, получаем для ослабления  $A$  следующее выражение:

$$A = \frac{d}{\delta} + \ln \mu'_s - \ln \left(1 + \frac{d}{\delta}\right) + \text{const} \approx \frac{d}{\delta} + \text{const} = A_0 + \mu_a \left(\frac{3\mu'_s}{\mu_a}\right)^{1/2} d, \quad (8)$$

где  $\delta = [3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)]^{-1/2} \approx (3\mu_a\mu'_s)^{-1/2}$  – глубина проникновения света в ткань. Последнее равенство в (8) записано так, чтобы его вид соответствовал модифицированному закону Ламберта – Бэра (3), в котором

$$\langle L \rangle_{\text{int}} = \left(\frac{3\mu'_s}{\mu_a}\right)^{1/2} d. \quad (9)$$

Нашей задачей было экспериментально измерить коэффициент отражения ткани в зависимости от длины волны, используя оптические волокна, разнесенные на расстояние  $d$  (см. рис.1). Для интерпретации экспериментальных данных использованы модельные формулы, в которых коэффициент диффузного отражения или логарифм его обратной величины зависит от коэффициента поглощения ткани  $\mu_a$  и редуцированного коэффициента рассеяния  $\mu_s'$ . Величина  $\mu_a$  определяется суммой вкладов присутствующих в ней хромофоров,

$$\mu_a(\lambda) = \ln 10 \sum_i c_i \varepsilon_i(\lambda), \quad (10)$$

где  $c_i$  и  $\varepsilon_i$  – молярные концентрации и коэффициенты экстинкции хромофоров (под коэффициентом экстинкции здесь понимается ослабление света, связанное только с поглощением). В качестве хромофоров учитываются гемоглобин в оксигенированной и деоксигенированной формах, вода, жир и, в некоторых случаях, экзогенные ФС. Зависимость  $\mu_s'$  от длины волны можно с хорошей степенью точности описать плавной степенной функцией

$$\mu_s'(\lambda) = \mu_s'(\lambda_0) \left( \frac{\lambda}{\lambda_0} \right)^{-n}, \quad (11)$$

где показатель степени  $n$  для исследуемого спектрального диапазона (500–1000 нм) согласно экспериментальным данным [25, 26] для различных тканей находится в пределах 0.3–1.8. Подставляя формулы (10) и (11) в (8), получим в диффузионном приближении модельную зависимость ослабления  $A$  как функцию длины волны и подгоночных параметров  $c_i$ ,  $\mu_s'(\lambda_0)$ ,  $n$ ,  $A_0$ . Далее с помощью метода наименьших квадратов вычисляются значения этих параметров так, чтобы разница между экспериментальной и модельной кривыми была минимальной. Наибольший интерес для нас представляют концентрации окси- и дезоксигемоглобина  $c_{\text{HbO}_2}$  и  $c_{\text{Hb}}$ , степень оксигенации гемоглобина

$$S_{\text{O}_2} = \frac{c_{\text{HbO}_2}}{c_{\text{HbO}_2} + c_{\text{Hb}}}, \quad (12)$$

а также возможность оценки концентрации экзогенных ФС в ткани. Как будет показано ниже, в ряде случаев спектр поглощения ФС в биологических тканях трансформируется. В этом случае спектроскопия ОДО позволяет лишь качественно оценить микроокружение ФС и характер взаимодействия ФС с биологическими тканями. Для качественной оценки поглощения тканей при моделировании спектра ОДО можно воспользоваться модифицированным законом Ламберта – Бэра (3), в котором величина ( $L$ ) не зависит от длины волны и является подгоночным параметром, а величина  $A_0$  описывается линейной функцией длины волны:  $A_0 = \text{const} + A_1 \lambda$ , где константа и линейный коэффициент  $A_1$  также являются подгоночными параметрами.

### 3. Результаты и обсуждение

На рис.2 представлены спектры диффузного отражения для опухоли экспериментального животного до введения ФС, через 2 ч после введения ФС (непосредственно перед лазерным облучением) и сразу после облучения опухоли лазером. В качестве экспериментальных живот-

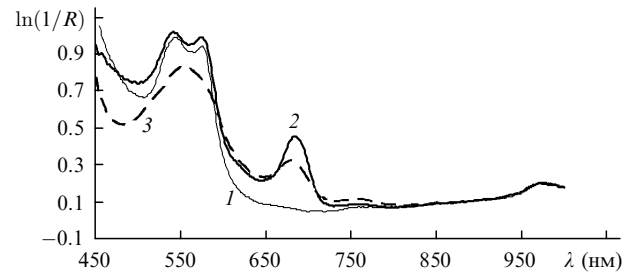


Рис.2. Спектры ОДО опухоли мыши до введения Фотосенса (1), через 2 ч после инъекции (доза 4 мг/кг) (2) и сразу после облучения лазером с длиной волны 675 нм, световой дозой 30 Дж/см<sup>2</sup> при плотности мощности 100 мВт/см<sup>2</sup> (3).

ных здесь и далее использовались мыши породы F1 из вивария Онкологического научного центра РАМН с внутримышечно привитой карциномой Эрлиха в области бедра задней правой лапы. Шерсть в месте опухоли была удалена с помощью специального крема для эпиляции Ориса. В качестве ФС в данном случае использовался Фотосенс производства ГНЦ «НИОПИК». Данный ФС представляет собой оптимальную смесь фракций фталоцианина алюминия с различной степенью сульфирования. Рис.2 наглядно демонстрирует возможности спектроскопии ОДО применительно к ФДТ. Так, сравнивая спектры до и после введения ФС, мы обнаруживаем появление дополнительного пика в области 675 нм, обусловленного вкладом ФС в поглощение. Следовательно, можно контролировать динамику концентрации ФС в различных тканях *in vivo*. Далее, сравнивая спектры до и после облучения, мы видим явные изменения в полосе поглощения гемоглобина (500–600 нм), связанные с его переходом из оксигенированной в деоксигенированную форму в результате ФДТ. Это обусловлено, с одной стороны, увеличением утилизации кислорода в фотохимических реакциях и, с другой стороны, разрушением капилляров в результате ФДТ. И наконец, мы видим, что поглощение ФС уменьшается после лазерного облучения; это явление называется фотобликинг и позволяет контролировать трансформацию самого ФС в ходе фотохимических реакций.

Отметим, что при регистрации спектров, представленных на рис.2, было выбрано расстояние между приемным и передающим волокнами  $d = 3$  мм, чтобы иметь возможность получить спектр в широком диапазоне длин волн (450–1000 нм). При необходимости анализировать видимый диапазон (400–600 нм) расстояние между волокнами составляло от 2 до 4 мм. Однако при таком малом расстоянии между волокнами глубина зондирования оказывается менее миллиметра [27]. С ростом  $d$  интенсивность диффузно отраженного света в диапазоне 400–600 нм резко падает из-за сильного поглощения, обусловленного гемоглобином, и сигнал в этой области становится сравнимым с шумом. Увеличение расстояния между волокнами увеличивает глубину зондирования и позволяет более точно зарегистрировать небольшие изменения в поглощении ткани в ближнем ИК диапазоне (650–1000 нм) в результате увеличения длины пути фотонов. В случае, когда исследуется только ближний ИК диапазон, расстояние между волокнами составляет, как правило, 4–8 мм. При дальнейшем росте  $d$ , позволявшем увеличить глубину зондирования, необходимо существенно поднимать мощность подводимого света к ткани (вплоть до 100 мВт), что в данной работе не делалось.

Контроль оксигенации гемоглобина в тканях во время ФДТ был подробно рассмотрен в [23, 27]. Было показано, что для определения степени оксигенации в этом случае можно использовать видимый диапазон спектра (500–600 нм), а для количественного расчета использовать модифицированный закон Ламберта – Бэра (3). В настоящей работе основное внимание мы уделили использованию спектроскопии ОДО для контроля экзогенных ФС при ФДТ.

На рис.3 приведены спектры ОДО опухоли и нормальной ткани мыши (мышца бедра левой лапы) через 10 мин после внутривенного введения ФС Фотосенс (доза 4 мг/кг), показан также спектр нормальной ткани до введения ФС. Отметим, что в опухоли пик поглощения ФС сдвинут на 7 нм в красную область по отношению к пику поглощения в нормальной ткани. Это связано с отличающимся биохимическим составом опухоли и, прежде всего, с ее pH. Смещение пика поглощения важно также при выборе оптимальной длины волны лазерного облучения для ФДТ, т.к. она должна соответствовать максимуму поглощения ФС именно в тканях, а не в модельном растворе. Заметим, что интенсивность пика поглощения в опухоли выше, чем в нормальной ткани, хотя кровенаполненность данной опухоли ниже, чем у нормальной ткани. Последнее можно оценить, сопоставив полосы поглощения гемоглобина (500–600 нм) в опухоли и нормальной ткани. Таким образом, уже через 10 мин после введения Фотосенса наблюдается избирательность его накопления.

Измеряя интенсивность пика поглощения в опухоли и нормальной ткани через различные промежутки времени после введения, можно оценить динамику и контрастность накопления ФС *in vivo*. Поскольку в опухоли имеет место существенный сдвиг пика поглощения, а возможно, и модификация формы линии, то попытка интерпретировать общий спектр диффузного отражения на основе эталонного спектра ФС с помощью описанных выше моделей неправомерна. Довольно хорошую приближенную оценку абсолютной концентрации ФС в ткани можно получить из отношения поглощения, обусловленного ФС, к поглощению воды на 975 нм [28]. Это отношение можно получить, используя (3) для вклада поглощения ФС  $A_{ps}$  и вклада поглощения воды  $A_w$  (рис.3). Если предположить, что средние длины пути фотона ( $L$ ) на длине волны поглощения ФС (675 нм) и на длине волны максимальной

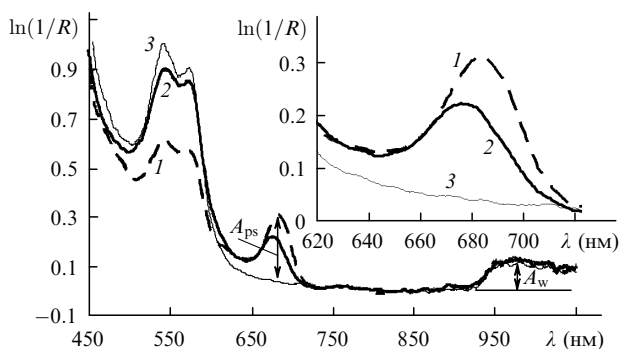


Рис.3. Спектры ОДО опухоли (1) и нормальной ткани (2) мыши через 10 мин после внутривенной инъекции Фотосенса (доза 4 мг/кг), а также спектр нормальной ткани до введения ФС (3). На вставке – сдвиг пика поглощения ФС по отношению к пику поглощения в нормальной ткани.

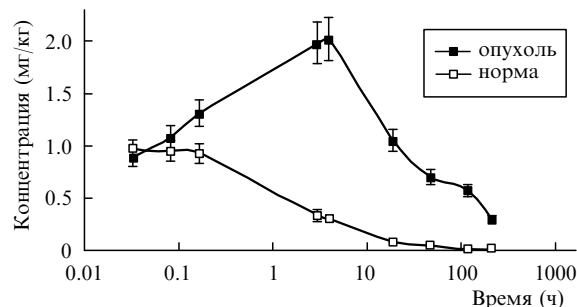


Рис.4. Динамика концентрации Фотосенса после системных инъекций (доза 4 мг/кг) в опухоли и нормальной ткани мыши по данным спектров диффузного отражения.

ного поглощения воды (975 нм) совпадают, то концентрация ФС в ткани

$$C_{ps} = \frac{OD_w C_w A_{ps}}{\epsilon_{ps} A_w}, \quad (13)$$

где  $OD_w$  – оптическая плотность воды (на 975 нм  $OD_w = 0.22 \text{ см}^{-1}$ );  $C_w$  – относительная концентрация воды в ткани (для большинства тканей лежит в интервале 0.6–0.9);  $\epsilon_{ps}$  – молярный коэффициент экстинкции ФС. Для случая, показанного на рис.3, отношение  $A_{ps}/A_w \approx 2.3$ ; предполагаем, что в опухоли  $C_w = 0.8$ , и учитывая, что для Фотосенса  $\epsilon_{ps} = 2.5 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ , из (13) получим, что концентрация ФС в опухоли составляет 1.6 мкМ, или 1.3 мг/кг.

Динамика концентрации Фотосенса в опухоли и в нормальной ткани мыши, определенная из спектров ОДО, приведена на рис.4. Эти результаты были получены путем усреднения показателей по трем экспериментальным животным, причем разброс данных между разными животными и различными зонами измерений на одном животном составлял менее 10%. Напомним, что в данном подходе мы предположили, что концентрация воды в различных тканях постоянно и равна некоторому фиксированному значению. Таким образом, ошибка в определении концентрации ФС будет равна ошибке в выбранной нами концентрации воды в тканях, которая может составлять до 30%. Кроме того, мы считали, что значения  $\langle L \rangle$  на  $\lambda = 675$  и 975 нм совпадают. Однако это не так, поскольку средняя длина пути фотона через ткань определяется коэффициентами поглощения и рассеяния, зависящими от длины волны. Если воспользоваться выражением (9), полученным в диффузионном приближении для средней длины пути, и выражением (11) для оценки зависимости  $\mu'_s(\lambda)$ , то можно получить следующее отношение для длин пути фотона на разных длинах волн, обусловленное изменением коэффициента рассеяния:

$$\frac{\langle L_w \rangle}{\langle L_{ps} \rangle} = \left( \frac{\lambda_{ps}}{\lambda_w} \right)^{n/2}. \quad (14)$$

Полагая для оценки  $n \approx 1$ , получаем из (14), что  $\langle L_w \rangle \times \langle L_{ps} \rangle^{-1} = (675/975)^{1/2} = 0.83$ . Таким образом, из-за спектральной зависимости коэффициента рассеяния длина пути фотона на длине волны поглощения ФС на 17% больше, чем на длине волны поглощения воды, что приводит к такому же завышению в оценке концентрации ФС по формуле (13). Это можно учесть, внося поправочный множитель (14) в правую часть уравнения (13).

Соотношение (13) перестает быть справедливым также при достаточно больших концентрациях ФС в ткани, когда вклад ФС в поглощение существенно превышает вклад воды в поглощение. Действительно, как было отмечено выше, модифицированный закон Ламберта – Бэра в дифференциальной форме (6), следствием которого является выражение (13), справедлив для описания лишь небольших вариаций коэффициента поглощения. При увеличении коэффициента поглощения средняя длина пути фотонов, определяемая выражением (4), будет уменьшаться, поскольку траектории с малыми длинами пути будут давать больший вклад в  $\langle L \rangle$ . Этот эффект приведет к сглаживанию пиков поглощения. При этом возникает отклонение от линейной зависимости (13) между  $C_{ps}$  и  $A_{ps}$ .

Использование диффузионного приближения (8) для описания связи между этими величинами дает выражение, в котором вклад в поглощение при больших концентрациях ФС описывается приближенно корневой зависимостью от концентрации:

$$A_{ps} = (3\mu'_s)^{1/2} d \left[ (\mu_a^0 + \ln 10 \epsilon_{ps} C_{ps})^{1/2} - (\mu_a^0)^{1/2} \right]. \quad (15)$$

Для проверки этого эффекта был проведен эксперимент с модельными образцами, в состав которых входил интралипид, цельная кровь и ФС. Интралипид состоит из воды, липидов и стабилизатора и используется в медицине для внутривенных инъекций. В биофотонике он широко применяется как фантом для моделирования рассеивающих свойств ткани. Поскольку разбавление интралипида до нужной концентрации проводилось с использованием физиологического раствора, есть основания считать, что при добавлении к нему эритроцитарной массы или цельной крови гемолиза или существенной агрегации эритроцитов не происходит. Исходный раствор содержал 1.6 % интралипида и 1 % цельной крови для моделирования рассеивающих и поглощающих свойств ткани, характеризуемой, по нашей оценке, значениями  $\mu'_s = 15 \pm 5 \text{ см}^{-1}$  и  $\mu_a = 0.04 \text{ см}^{-1}$ . Расчет коэффициента рассеяния проведен по данным [29]. Если же необходимо более точно знать коэффициент рассеяния раствора интралипида, то следует провести независимые измерения, например измерить смещение максимума интенсивности при наклонном падении. Однако в данном эксперименте этого не требовалось, главное, чтобы значение коэффициента рассеяния было в пределах его вариации в тканях. Коэффициент поглощения определялся из предположения, что доминирующий вклад в поглощение вносит гемоглобин при степени оксигенации 75 % для длины волны 675 нм.

Далее к этому раствору добавлялся Фотосенс и измерялись спектры диффузного отражения при его различных концентрациях в диапазоне 0–2 мг/л. Передающее и приемное оптические волокна находились на расстоянии 8 мм друг от друга в контакте с поверхностью раствора. Полученные спектры представлены на рис.5. Резкий рост ослабления со стороны коротких длин волн обусловлен поглощением гемоглобина, а пик в области 975 нм – поглощением воды. Вклад поглощения ФС на 675 нм легко выделить на плавном фоне поглощения раствора. Зависимость вклада поглощения ФС от его концентрации, полученная из спектров диффузного отражения, показана на рис.6. Как и ожидалось, при больших концентрациях происходит отклонение зависимо-

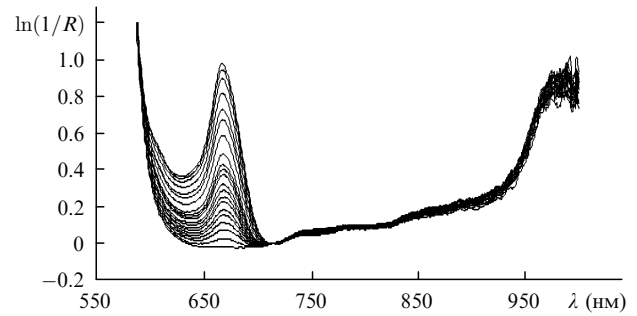


Рис.5. Спектры ОДО раствора интралипида (1.6 %), крови (1 %) и Фотосенса в интервале 0–2 мг/л. Интервал между первыми 12 спектрами 0.04 мг/л, далее 0.2 мг/л.

сти  $A_{ps}(C_{ps})$  от линейной. Здесь же приведена расчетная кривая, соответствующая диффузионному приближению (15), причем значения  $\mu_a^0$  и  $\mu'_s$  подбирались такими, чтобы разность квадратичных отклонений между расчетной кривой и экспериментальными данными была минимальной. Как видно из рис.6, диффузионное приближение довольно хорошо описывает эффект сглаживания пиков поглощения.

Экспериментальная зависимость между  $A_{ps}$  и  $C_{ps}$ , представленная на рис.6, может в дальнейшем использоваться как калибровочная для определения абсолютной концентрации ФС в тканях. Данный метод мы будем называть далее методом стандартных образцов. Аналогичные кривые были построены нами и для других значений концентрации интралипида (1.2 % – 2.2 %) и крови (0–5 %) в модельном растворе с тем, чтобы оценить, насколько вариации коэффициентов рассеяния и поглощения ткани влияют на точность определения концентрации ФС в тканях, полученной с помощью метода стандартных образцов. Отклонения в результатах при вариациях коэффициентов поглощения и рассеяния в столь широких пределах составили менее 50 %. Таким образом, если концентрации ФС в тканях настолько малы, что вклад поглощения ФС меньше вклада поглощения воды на  $\lambda = 975 \text{ нм}$ , для оценки концентрации ФС можно воспользоваться выражением (13). В случае, когда вклад поглощения ФС превышает вклад поглощения воды, необходимо учесть эффект сглаживания поглощения и воспользоваться методом стандартных образцов. Последний, естественно, хорошо работает и при малых концентрациях, при этом концентрацию ФС можно оценить независимо от вклада поглощения воды. Следует также отметить, что метод стандартных образцов не учитывает

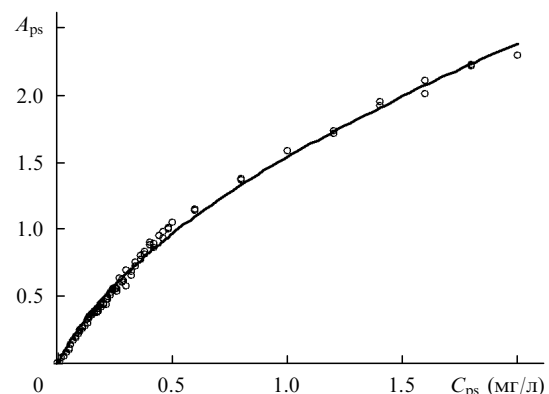


Рис.6. Вклад в поглощение Фотосенса ( $A_{ps}$ ) в растворе интралипида (1.6 %) и крови (1 %) в зависимости от его концентрации.

возможное изменение коэффициента экстинкции ФС при его связывании с биомолекулами в тканях. Это обстоятельство частично можно учесть, используя при приготовлении стандартных образцов плазму крови вместо физиологического раствора, которая более близка по свойствам к тканям.

В заключение приведем некоторые результаты, которые позволяют обнаружить по спектрам поглощения ФС в тканях качественные изменения в последних. На рис.7 представлены спектры поглощения опухоли мышцы после внутривенного введения препарата Терафтала в дозе 20 мг/кг. Данный препарат представляет собой фталоцианин кобальта и разрабатывается ГНЦ «НИОПИК» для темновой терапии опухолей в комбинации с аскорбиновой кислотой. Через 10 мин после введения форма спектра соответствует спектру поглощения Терафтала в растворе (за исключением небольшого сдвига пика поглощения в ИК область). Однако через двое суток происходит существенное уширение пика поглощения в опухоли, что связано с образованием агрегатов и наночастиц молекул Терафтала в более кислой среде опухоли. Возможно, существенную роль в агрегации играет также баланс ионов кальция, поскольку кальциевая соль Терафтала водонерастворима. Этот результат интересен тем, что наночастицы Терафтала в комбинации с ультразвуком или импульсным лазерным облучением могут приводить к разрушению опухоли. Спектроскопия диффузного отражения является здесь единственным методом контроля образования наночастиц в тканях *in vivo*, поскольку это вещество не флуоресцирует.

Последний результат касается широко используемого в медицине ФС – индоцианина зеленого, который имеет интенсивный пик поглощения в ближней ИК области (800 нм). В последнее время появились сообщения, что этот ФС эффективен при фототерапии опухолей [30]. Терапевтический эффект обеспечивается, скорее всего, комбинацией теплового и фотохимического действия. В связи с этим данные по его спектрам поглощения в тканях представляют значительный интерес. В литературе имеются данные, полученные с помощью спектроскопии диффузного отражения, по накоплению индоцианина зеленого в коже при аппликации [31], однако, насколько нам известно, отсутствуют результаты по селективности накопления в опухолях после внутривенного введения.

На рис.8 приведены спектры диффузного отражения опухоли и нормальной ткани мышцы через 90 мин после внутривенного введения индоцианина зеленого (доза 40 мг/кг). Несмотря на малый промежуток времени после инъекции, кривые, соответствующие опухоли и нормальной ткани существенно различаются. Поскольку зависимость концентрации ФС от его вклада в поглощение

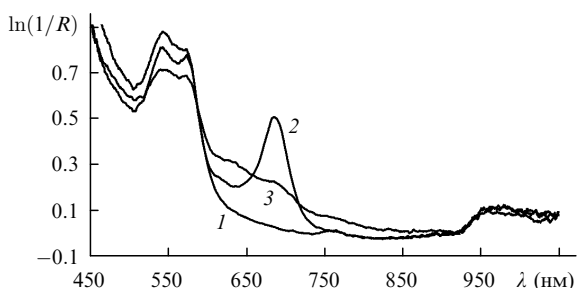


Рис.7. Спектры ОДО опухоли до (1), через 10 мин (2) и через 2 суток (3) после инъекции Терафтала (доза 20 мг/кг).

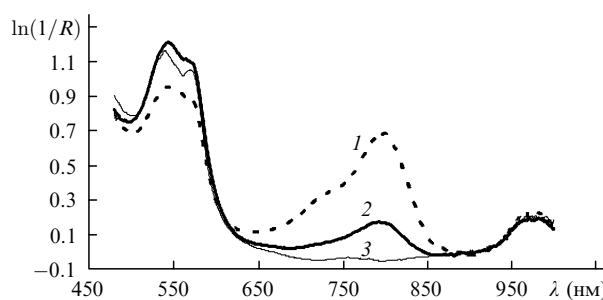


Рис.8. Спектры ОДО опухоли (1) и нормальной ткани (2) мышцы через 90 мин после инъекции индоцианина зеленого (доза 40 мг/кг), а также спектр нормальной ткани до инъекции красителя (3).

описывается приближенно квадратичной функцией, то при отношении поглощений в опухоли и нормальной ткани на  $\lambda = 770$  нм, равном трем, отношение концентраций ФС составит девять. Трансформация спектра поглощения в ткани по отношению к спектру поглощения в плазме крови для этого красителя не наблюдалась. Однако при облучении ткани лазером с  $\lambda = 805$  нм происходит интенсивное выгорание данного ФС и превращение его в обесцвеченную форму. Этот эффект может играть в фототерапии положительную роль, поскольку из-за столь высокого вклада в поглощение красителя при облучении ткани свет сильно экранируется ее верхними слоями. По мере облучения происходит выгорание красителя и, следовательно, растет глубина проникновения света в ткань. При этом нет опасности в передозировке света в нормальных тканях, поскольку селективность воздействия в этом случае определяется прежде всего селективностью накопления красителя.

#### 4. Выводы

Результаты, представленные в настоящей работе, демонстрируют эффективность использования спектроскопии диффузного отражения света для контроля за состоянием тканей при ФДТ. Простая экспериментальная методика регистрации спектров ОДО тканей в стационарном режиме с помощью волоконно-оптического зонда с фиксированным расстоянием между передающим и приемным волокнами обеспечивает необходимую точность контроля степени оксигенации гемоглобина в тканях во время ФДТ, позволяет оценить динамику концентрации ФС в опухоли и нормальных тканях после внутривенной инъекции, а также фотодеструкцию ФС в процессе лазерного облучения опухоли при ФДТ. В ряде случаев данная методика позволяет определить характер локализации ФС в тканях на субклеточном уровне, а также агрегацию или, наоборот, мономеризацию ФС при его связывании с биомолекулами. Эта информация имеет большое значение при выборе красителей, используемых в качестве эффективных ФС для ФДТ и фототермолиза; она также может быть использована для выработки оптимальной тактики ФДТ (дозы введения ФС, интервала времени между введением ФС и облучением, световых доз и плотности мощности при лазерном облучении).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 06-02-17468) и научно-технической программы «Разработка и практическое освоение в здравоохранении новых методов и средств профилактики, диагностики и лечения онкологических, инфекционных и других опасных заболеваний» на 2003 – 2006 г.

1. Jöbsis F.F. *Science*, **198**, 1264 (1977).
2. Mourant J.R., Bigio I.J., in *Biomedical Photonics Handbook*. Ed. by Tuan Vo-Dinh (Boca Raton, USA: CRC Press, 2003).
3. Wallace V.P., Crawford D.C., Mortimer P.S., Ott R.J., Bamber J.C. *Phys. Med. Biol.*, **45**, 735 (2000).
4. Koenig F., Larne R., Enquist H., McGovern F.J., Schomacker K.T., Kollias N., Deutsch T.F. *Urology*, **51**, 342 (1998).
5. Zonios G., Perelman L.T., Backman V., Manoharan R., Fitzmaurice M., Van Dam J., Feld M.S. *Appl. Opt.*, **38**, 6628 (1999).
6. Mourant J.R., Bigio I.J., Boyer J., Johnson T.M., Lacey J. *Biomed. Opt.*, **1**, 1 (1996).
7. Utzinger U., Brewer M., Silvio E., Gershenson D., Blast R.C., Follen M., Richards-Kortum R. *Lasers Surg. Med.*, **28**, 56 (2001).
8. Strattonnikov A.A., Edinac N.E., Klimov D.V., Linkov K.G., Loschenov V.B., Luckjanets E.A., Meerovich G.A., Vakulovskaya E.G. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **2924**, 49 (1996).
9. Weersink R.A., Hayward J.E., Diamond K.R., Patterson M.S. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **2972**, 136 (1997).
10. Ballangrud A.M., Barajas O., Brown K., Miller G.G., Moore R.B., Tulip J. *Lasers Med. Sci.*, **12**, 237 (1997).
11. Cubeddu R., Canti G., D'Andrea C., Pifferi A., Taroni P., Torricelli A., Valentini G. *J. Photochem. Photobiol. B*, **60**, 73 (2001).
12. Weersink R.A., Wilson B.C., Patterson M.S. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **4613**, 135 (2002).
13. Solonenko M., Cheung R., Busch T.M., Kachur A., Vulcan T., Zhu T.C., Wang H.W., Hahn S.M., Yodh A.G. *Phys. Med. Biol.*, **47**, 857 (2002).
14. Strattonnikov A.A., Ermishova N.V., Meerovich G.A., Kudashev B.V., Vakulovskaya E.G., Loschenov V.B. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **4613**, 162 (2002).
15. Mourant J.R., Johnson T.M., Los G., Bigio I.J. *Phys. Med. Biol.*, **44**, 1397 (1999).
16. Patterson M.S., Chance B., Wilson B.C. *Appl. Opt.*, **28**, 2331 (1989).
17. Doornbos R.M.P., Lang R., Aalders M.C., Cross F.W., Sterenborg H.J. *Phys. Med. Biol.*, **44**, 967 (1999).
18. Meglinski I.V., Matcher S.J. *Physiol. Meas.*, **23**, 741 (2002).
19. Duysens L.N.M. *Biochim. Biophys. Acta*, **19**, 1 (1956).
20. Talsma A., Chance B., Graaf R. *J. Opt. Soc. Am. A*, **18**, 932 (2001).
21. Finlay J.C., Foster T.H. *Opt. Lett.*, **29**, 965 (2004).
22. Sassaroli A., Fantini S. *Phys. Med. Biol.*, **49**, 255 (2004).
23. Strattonnikov A.A., Loschenov V.B. *J. Biomed. Opt.*, **6**, 457 (2001).
24. Kienle A., Patterson M.S. *J. Opt. Soc. Am.*, **14**, 246 (1997).
25. Torricelli A., Pifferi A., Taroni P., Giambattistelli E., Cubeddu R. *Phys. Med. Biol.*, **46**, 2227 (2001).
26. Bashkatov A.N., Genina E.A., Kochubey V.I., Tuchin V.V. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **38**, 2543 (2005).
27. Стратонников А.А., Ермишова Н.В., Лощенов В.Б. *Квантовая электроника*, **32**, 917 (2002).
28. Matcher S.J., Cope M., Delpy D.T. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **1888**, 239 (1993).
29. Jacques S.L. <http://omlc.ogi.edu/spectra/intralipid/index.html>
30. Urbanska K., Romanowska-Dixon B., Matuszak Z., Oszejka J., Nowak-Sliwinska P., Stochel G. *Acta Biochim. Polonica*, **49**, 387 (2002).
31. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Кочубей В.И., Тучин В.В., Альтшулер Г.Б. *Письма в ЖТФ*, **27**, 63 (2001).