

Аналитическая модель формирования флуоресцентного отклика для оценки локализации флуорофора в биоткани с помощью двухволнового флуоресцентного имиджинга

А.В.Хилов, Е.А.Сергеева, Д.А.Куракина, И.В.Турчин, М.Ю.Кириллин

В рамках диффузионного приближения уравнения переноса излучения получено аналитическое выражение для флуоресцентного отклика от равномерно распределённого в приповерхностном слое биоткани фотосенсибилизатора и предложен метод оценки толщины флуоресцирующего слоя на основе двухволновой регистрации флуоресценции. Показано, что погрешность определения толщины флуоресцирующего слоя с использованием отношения величин флуоресцентных откликов, полученных для разных длин волн возбуждения флуоресценции, не превышает 30% в пределах диапазона толщин 0.1–2 мм при погрешности определения оптических свойств биоткани не более 30%.

Ключевые слова: теория переноса излучения, моделирование методом Монте-Карло, флуоресцентный имиджинг, фотодинамическая терапия, фотосенсибилизаторы хлоринового ряда.

1. Введение

Одним из наиболее активно развивающихся направлений неинвазивной диагностики биологических тканей является флуоресцентный имиджинг (ФИ), в настоящее время активно применяемый в различных биомедицинских приложениях [1–3]. Флуоресцентный имиджинг охватывает широкий спектр инструментальных методов визуализации и в общем виде представляет собой регистрацию пространственного распределения интенсивности выходящей из биоткани флуоресценции, возбуждаемой зондирующим излучением. Важной задачей количественного ФИ является оценка локализации флуорофоров в биоткани. В частности, определение толщины и глубины залегания меченого флуоресцентным маркером слоя биоткани играет важную роль в детектировании экспериментальных опухолей и метастазов, сигнальных лимфоузлов [4], а также в задачах оптимизации протоколов фотодинамической терапии (ФДТ) [5]. Такую возможность предоставляет метод диффузионной флуоресцентной томографии (ДФТ) [6], использующий итерационные алгоритмы реконструкции пространственного распределения концентрации флуорофора. Исходными данными для таких алгоритмов являются флуоресцентные изображения, полученные при разных положениях источника излучения относительно объекта и детектора, в качестве которого могут быть использованы ПЗС-матрицы, фотоэлектронные умножители и др. [7–10]. Существенным недостатком ДФТ является плохая обусловленность обратной задачи [11, 12], в особенности при невозможности проведения измерений «на просвет», а также большая техническая сложность ее реализации, что существенно ограничивает широкое распространение дан-

ного метода в предклинических исследованиях и особенно в клинической практике. В связи с этим в настоящее время ДФТ в основном применяется в экспериментальной медицине, где объектами исследования являются преимущественно мелкие лабораторные животные, а круг клинических приложений существенно ограничен сложностью проведения измерений «на просвет». Таким образом, задача количественной оценки локализации флуорофоров в биоткани продолжает оставаться актуальной. Более простыми и удобными в использовании являются методы ФИ, получившие широкое распространение в клинической практике. Они основаны на регистрации пространственного распределения интенсивности флуоресценции на поверхности биоткани с помощью ПЗС-камеры при облучении ткани широкоапертурным пучком, возбуждающим флуоресценцию [4, 13]. Однако такой подход не позволяет в явном виде оценить глубину залегания флуорофора.

Для оценки распределения флуорофора в биоткани по глубине целесообразно использование радиометрического подхода, который подразумевает регистрацию флуоресцентных сигналов, соответствующих двум или более различным длинам волн возбуждения или флуоресценции, на которых оптические свойства биоткани существенно различаются. В работах [14–17] в рамках Монте-Карло (МК) моделирования и в модельных экспериментах по регистрации флуоресценции заглуплённого в фантом биоткани флуоресцирующего слоя было показано, что отношение флуоресцентных сигналов, соответствующих различным длинам волн флуоресценции и общей длине волны излучения накачки, может использоваться для оценки глубины залегания флуорофора в биоткани. Теоретическое описание детектирования на двух длинах волн флуоресценции, возбуждаемой на одной и той же длине волны, приведено в работе [18] в рамках диффузионного приближения уравнения переноса излучения (УПИ). Для реализации такого подхода осуществляется одновременная регистрация флуоресцентных откликов на разных длинах волн, например с помощью спектрометра. Однако для большого числа флуорофоров спект-

А.В.Хилов, Е.А.Сергеева, Д.А.Куракина, И.В.Турчин, М.Ю.Кириллин. Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики РАН, 603950 Н.Новгород, ул. Ульянова, 46; e-mail: alhil@inbox.ru

Поступила в редакцию 7 декабря 2020 г.

ры флуоресценции, в пределах которых необходимо выбрать две рабочие линии, достаточно узкие (например, рассчитанная по полувысоте ширина спектра флуоресценции белка mKate составляет 90 нм), что ограничивает возможности данного метода.

Для применения радиометрического подхода в рамках двухволнового ФИ целесообразно использовать флуорофоры с широким спектром поглощения (или имеющие несколько пиков поглощения, далеко отстоящих друг от друга по спектру) и проводить анализ флуоресцентных сигналов, соответствующих различным длинам волн возбуждения и общей длине волны флуоресценции. Примером таких флуорофоров могут служить, например, фотосенсибилизаторы (ФС) хлоринового ряда [19, 20] с двумя ярко выраженными пиками в спектре поглощения, соответствующими длинам волн 402 и 662 нм (рис. 1); протопорфирин IX (PPIX) [21, 22], характеризующийся ярко выраженным пиком в спектре поглощения на длине волны 405 нм и несколькими менее выраженными пиками на длинах волн в диапазоне 450–650 нм; пегилированные наночастицы хитозана со встроенным сульфидом висмута BSA-Bi₂S₃-CG-PEG с широким спектром поглощения [23]. В работе [24] приведены результаты клинических исследований с использованием радиометрических эндоскопических измерений флуоресценции PPIX в нормальной ткани мочевого пузыря, а также в доброкачественных и злокачественных опухолях той же локализации. Сравнение отношений амплитуд флуоресцентных сигналов, соответствующих возбуждению в красном и синем

диапазонах длин волн, для нормальной и опухолевой тканей показало различие соответствующих величин при воспалении, дисплазии, неинвазивной папиллярной карциноме и карциноме *in situ*. Результаты флуоресцентных измерений подтверждались результатами гистологических исследований. Возможность оценки глубины залегания флуорофора в биоткани на основе радиометрических флуоресцентных измерений при двухволновом возбуждении и двухволновой регистрации флуоресценции показана для синтезированного с использованием изотиоцианата флуоресцеина маркера LS903 в работе [25]. Следует отметить, что наряду с глубиной залегания флуоресцирующего слоя в биоткани важным параметром является и его толщина, которая в упомянутых выше работах не оценивалась. Авторами настоящей статьи ранее была продемонстрирована возможность оценки локализации ФС хлоринового ряда в биоткани на основе радиометрического имиджинга [26, 27] при двухволновом возбуждении и одноволновой регистрации флуоресценции. Задача ФИ фотосенсибилизаторов является актуальной с точки зрения контроля как их накопления перед процедурой ФДТ, так и выгорания в процессе облучения [28–30].

В настоящей работе развит ранее предложенный подход к локализации ФС хлоринового ряда в биоткани на основе двухволнового ФИ, при котором длины волн зондирования выбираются в соответствии с пиками в спектре поглощения ФС, расположенными в разных полосах оптического диапазона, в которых поглощение света в тканях существенно различно. Предложен метод оценки толщины приповерхностного флуоресцирующего слоя биоткани в рамках двухволнового ФИ. Метод основан на аналитической модели расчёта интенсивности флуоресценции с использованием диффузионного приближения УПИ. Результаты аналитического исследования для биоткани дермы подтверждаются результатами МК-моделирования, что открывает возможность применения разработанной модели для оценки параметров накопления ФС в приповерхностном слое биоткани на основании данных ФИ в рамках процедуры ФДТ.

2. Материалы и методы

2.1. Аналитическая модель сигнала флуоресценции от слоя флуорофора, распределенного в биоткани

Расчёт флуоресцентного отклика от распределённого в приповерхностном слое биоткани флуорофора представлен в виде суперпозиции двух задач, а именно расчёта пространственного распределения интенсивности возбуждающего излучения, поглощаемого флуорофором, и последующего расчёта интенсивности флуоресценции этого флуорофора, регистрируемой с поверхности биоткани. Биоткань рассматривается как полубесконечная двухслойная среда, в приповерхностном тонком слое которой толщиной d содержится флуорофор с однородно распределённой концентрацией C и квантовым выходом флуоресценции η . Облучение проводится широким возбуждающим пучком с равномерным распределением интенсивности I_0 на границе среды $z = 0$ (рис.2). Биоткань характеризуется коэффициентами поглощения ($\mu_{a\text{ tiss}}(\lambda)$) и рассеяния ($\mu_s(\lambda)$) и фактором анизотропии g . В слое с флуорофором коэффициент поглощения представляется суммой коэффициентов собственного поглощения биоткани и поглощения флуорофора μ_{aF} : $\mu_a(\lambda) = \mu_{a\text{ tiss}}(\lambda) +$

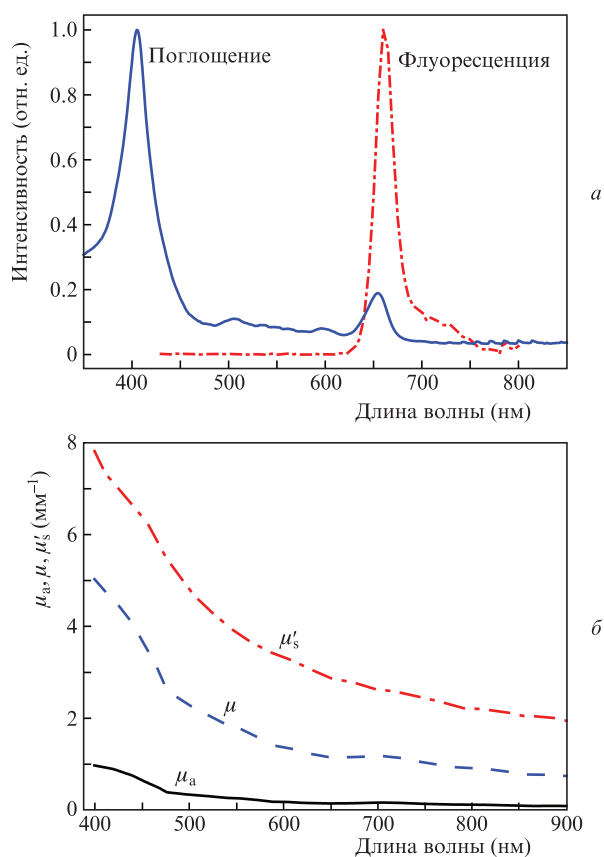


Рис. 1. Нормированные спектры поглощения и флуоресценции ФС хлоринового ряда (а) и типичные спектры коэффициентов поглощения μ_a , транспортного рассеяния μ'_s и коэффициента диффузного ослабления μ , вычисленного по формуле (5), для дермы человека в видимом спектральном диапазоне по данным работы [31] (б).

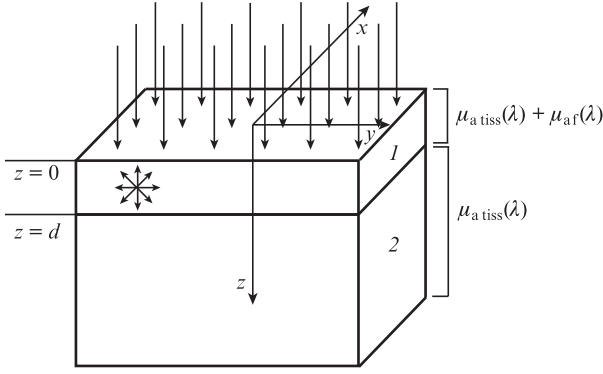


Рис.2. Геометрия среды, используемая в аналитических и численных моделях (1 – слой биоткани, содержащей флуорофор, 2 – биоткань).

$\mu_{af}(\lambda)$, причём коэффициент поглощения флуорофора пропорционален его концентрации. При расчёте распространения излучения предполагается, что на всех длинах волн возбуждения дополнительное поглощение, вносимое флуорофором, мало по сравнению с собственным поглощением биоткани: $\mu_{af}(\lambda) \ll \mu_{atiss}(\lambda)$; вкладом флуорофора в поглощение биоткани на длине волны флуоресценции можно пренебречь.

Интенсивность выходящей из среды флуоресценции на длине волны λ_{em} , регистрируемая в точке r_0 границы среды (в плоскости $z = 0$) при облучении приповерхностного слоя, содержащего флуорофор, записывается в виде интеграла по объёму верхнего слоя V :

$$I_{em}(r_0, \lambda_{ex}, \lambda_{em}) = \gamma \int_V \eta \Phi_{em}(r_0, r, \lambda_{em}) dP_{abs}(r, \lambda_{ex}), \quad (1)$$

где $dP_{abs}(r, \lambda_{ex})$ – мощность возбуждающего излучения на длине волны λ_{ex} , поглощённая элементарным объёмом dV флуорофора в точке r среды; γ – фактор, связанный со скачком показателя преломления на границе биоткани; $\Phi_{em}(r_0, r, \lambda_{ex})$ – облучённость (fluence rate), создаваемая в точке r_0 излучателем с единичной мощностью, находящимся в точке r . Мощность $dP_{abs}(r, \lambda_{ex})$ выражается через локальные значения облучённости в среде $\Phi_{ex}(r, \lambda_{ex})$ и коэффициента поглощения флуорофора в виде

$$dP_{abs}(r, \lambda_{ex}) = \mu_{af}(r, \lambda_{ex}) \Phi_{ex}(r, \lambda_{ex}) dV. \quad (2)$$

Решение задачи о распространении поглощенного флуорофорами возбуждающего излучения (нахождение функции $\Phi_{ex}(r, \lambda_{ex})$) может быть получено в рамках аналитической полуэмпирической модели, приведённой в работе [32]. В ней показано, что при облучении полубесконечного слоя биоткани плоской волной с длиной волны λ и интенсивностью I_0 облучённость на глубине z , рассчитанная с помощью численного МК-моделирования в широком диапазоне оптических параметров среды, может быть аппроксимирована экспоненциальной функцией

$$\Phi(z) = I_0 k \exp(-\mu z), \quad (3)$$

где k – фактор обратного рассеяния; μ – коэффициент диффузного ослабления, характеризующий ослабление излучения на длине волны λ в среде. Для данных параметров приводятся следующие эмпирические выражения, полученные путём согласования результатов МК-моделирования с асимптотическими решениями УПИ:

$$k = 3 + 5.4R_d - 2 \exp(-17R_d), \quad (4)$$

$$\mu = \tilde{\mu} \left[1 - \frac{\exp(-20R_d)}{\sqrt{3}} \right], \quad (5)$$

$$R_d \approx \exp\left(-8 \frac{\mu_a}{\tilde{\mu}}\right), \quad (6)$$

где R_d – характеристика полного диффузного отражения; $\tilde{\mu} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)}$ – эффективный коэффициент ослабления диффузного света; $\mu'_s = \mu_s(1 - g)$ – транспортный коэффициент рассеяния в среде. Величины R_d и k рассчитаны в [32] в предположении, что на поверхности биоткани имеет место относительный скачок показателя преломления $n = n_{medium}/n_{out} = 1.37$ (n_{medium} – показатель преломления биоткани, n_{out} – показатель преломления окружающей среды). Характерный спектр коэффициента ослабления μ для дермы человека, рассчитанный по формуле (5) на основе спектров поглощения и рассеяния [31], приведен на рис.1,б.

В настоящей работе для описания облучённости Φ_{ex} , создаваемой широким пучком в среде на глубине z , используется формула (3):

$$\Phi_{ex}(z, \lambda_{ex}) = I_0 k_{ex} \exp(-\mu_{ex} z), \quad (7)$$

где $k_{ex} = k(\lambda_{ex})$; $\mu_{ex} = \mu(\lambda_{ex})$.

В предположении, что элементарный объём среды с флуорофором, находящийся в точке $r(x, y, z)$, является точечным изотропным источником с мощностью $\eta dP_{abs}(r, \lambda_{ex})$, интенсивность его флуоресценции, регистрируемая на внешней границе среды в точке $r_0(x_0, y_0, 0)$, с использованием (2) представляется в виде

$$dI_{em}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, r, r_0) = \gamma \eta dP_{abs}(r, \lambda_{ex}) \Phi_{em}(r, r_0, \lambda_{em}). \quad (8)$$

Здесь

$$\Phi_{em}(r, r_0, \lambda_{em}) = \frac{1}{4\pi D_{em}} \times \left\{ \frac{\exp[-\tilde{\mu}_{em} \sqrt{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2 + z^2}]}{\sqrt{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2 + z^2}} - \frac{\exp[-\tilde{\mu}_{em} \sqrt{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2 + (z+2z_{em}^*)^2}]}{\sqrt{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2 + (z+2z_{em}^*)^2}} \right\} \quad (9)$$

– облучённость, создаваемая точечным изотропным источником в полубесконечной среде и рассчитанная в диффузионном приближении УПИ [33];

$$D_{em} = \frac{1}{3[\mu_a(\lambda_{em}) + \mu'_s(\lambda_{em})]} = \frac{\mu_a(\lambda_{em})}{\tilde{\mu}_{em}^2}$$

– коэффициент диффузии на длине волны λ_{em} ; $\tilde{\mu}_{em} = \tilde{\mu}(\lambda_{em})$; $z_{em}^* = m \frac{2}{3} l_{tr}$ – экстраполированная длина в проблеме Милна ($\frac{2}{3} l_{tr} = 2D_{em}$), домноженная на фактор m , который учитывает относительный скачок показателя преломления n [33]. Мультипликативный фактор m определяется в соответствии с формулой (2.4.1) работы [33] через интегральные преобразования энергетического коэффициента отражения Френеля для заданного относительного показателя

теля преломления n . Заметим, что входящий в выражения (1), (8) и (9) множитель γ связан с m как $\gamma = 1/(2m)$.

Для равномерного по поперечным координатам x, y и произвольного по глубине z распределения флуорофора в предположении малости вносимого им возмущения полей возбуждающего излучения и флуоресценции интенсивность флуоресценции, зарегистрированная в любой точке на внешней границе среды, в соответствии с формулами (7)–(9) после интегрирования по поперечным координатам имеет вид одномерного интеграла:

$$I_{em}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = \gamma \frac{\eta I_0 k(\lambda_{ex})}{2\tilde{\mu}_{em} D_{em}} \int_{z=0}^{\infty} \mu_{af}(z, \lambda_{ex}) \exp(-\mu_{ex} z) \times \{ \exp(-\tilde{\mu}_{em} z) - \exp[-\tilde{\mu}_{em}(z + 2z_{em}^*)] \} dz. \quad (10)$$

В случае равномерного распределения флуорофора по глубине в пределах слоя толщиной d интенсивность регистрируемой флуоресценции выражается формулой

$$I_{em}(\lambda_{ex}, \lambda, d) = I_0 \eta \mu_{af}(\lambda_{ex}) K(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) \times \{ 1 - \exp[-(\mu_{ex} + \tilde{\mu}_{em})d] \}, \quad (11)$$

где

$$K(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = \gamma \frac{k_{ex}(\lambda_{ex}) \sinh(\tilde{\mu}_{em} z_{em}^*) \exp(-\tilde{\mu}_{em} z_{em}^*)}{\tilde{\mu}_{em} D_{em} (\mu_{ex} + \tilde{\mu}_{em})}.$$

Из формулы (11) следует, что величина флуоресцентного сигнала монотонно возрастает с увеличением толщины флуоресцентного слоя, асимптотически стремясь к константе $I_{em}^{(\infty)} = I_0 \eta \mu_{af}(\lambda_{ex}) K(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$. Такая зависимость флуоресцентного сигнала связана с ограниченной глубиной проникновения возбуждающего излучения внутрь биоткани. Для тонких флуоресцентных слоев, толщина которых удовлетворяет соотношению $(\mu_{ex} + \tilde{\mu}_{em})d \ll 1$, регистрируемый сигнал флуоресценции линейно зависит от толщины слоя: $I_{em}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, d) \approx I_0 \eta \mu_{af} K(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) \times (\mu_{ex} + \tilde{\mu}_{em})d$. Область чувствительности флуоресцентного сигнала к наличию флуорофора, определяемая по уровню 95% от максимального значения $I_{em}^{(\infty)}$, ограничена диапазоном глубин $z \leq 3/(\mu_{ex} + \tilde{\mu}_{em})$, и наличие флуорофора за её пределами практически не сказывается на изменении сигнала флуоресценции. Как следует из рис.1,б, биоткань дермы человека характеризуется большими значениями эффективного коэффициента μ_{ex} в диапазоне «синего» пика поглощения ФС хлоринового ряда (λ_{ex1} находится в окрестности 405 нм) по сравнению с диапазоном «красного» пика (λ_{ex2} находится в окрестности 660 нм): $\mu_{ex}(405)/\mu_{ex}(660) \approx 3.8$. Отсюда следует, что насыщение сигнала флуоресценции, возбуждаемой в синем диапазоне, происходит на значительно меньших глубинах, поскольку приповерхностная область сильнопоглощающей и рассеивающей биоткани экранирует проникновение зондирующего излучения в более глубокие слои, содержащие ФС.

2.2. Двухволновое соотношение сигналов флуоресценции и его связь с толщиной слоя ФС

Для флуорофоров с широким спектром поглощения или с несколькими пиками в спектре поглощения, в частности для ФС хлоринового ряда, можно ввести отношение сигналов для двух длин волн возбуждения флуорес-

ценции, нормированных на интенсивность падающего излучения:

$$R_\lambda = \frac{I_{em}(\lambda_{ex2}, \lambda_{em}, d)/I_0(\lambda_{ex2})}{I_{em}(\lambda_{ex1}, \lambda_{em}, d)/I_0(\lambda_{ex1})}. \quad (12)$$

Соотношение (12) построено таким образом, чтобы рост толщины слоя d соответствовал росту R_λ , при этом в знаменателе должен находиться сигнал, соответствующий большим значениям коэффициента ослабления на длине волны зондирования и поэтому достигающий насыщения при меньших d .

Учитывая соотношение (11), выражение для R_λ можно представить в следующем виде:

$$R_\lambda = \frac{\eta_2 \mu_{af}(\lambda_{ex2}) k_{ex}(\lambda_{ex2})}{\eta_1 \mu_{af}(\lambda_{ex1}) k_{ex}(\lambda_{ex1})} \frac{\mu_{ex1} + \tilde{\mu}_{em}}{\mu_{ex2} + \tilde{\mu}_{em}} \times \frac{1 - \exp[-(\mu_{ex2} + \tilde{\mu}_{em})d]}{1 - \exp[-(\mu_{ex1} + \tilde{\mu}_{em})d]}, \quad (13)$$

где η_1 и η_2 – квантовые выходы флуоресценции при возбуждении на длинах волн λ_{ex1} и λ_{ex2} соответственно. Соотношение R_λ , зависящее только от параметров среды и флуорофора, может быть получено из экспериментальных измерений сигналов флуоресценции, возбуждаемых на двух длинах волн, при условии, что характеристики регистрирующей аппаратуры на этих длинах волн не различаются, либо после нормировки на соответствующие параметры детектирования.

Анализ формулы (13) позволяет определить асимптотическое поведение R_λ при малых и больших толщинах флуоресцирующего слоя d . При $d \rightarrow 0$ сигналы флуоресценции, возбуждаемой на обеих длинах волн, линейно зависят от толщины, вследствие чего R_λ стремится к постоянному значению

$$R_\lambda(d \rightarrow 0) \approx R_\lambda^{(0)} = \frac{\eta_2 \mu_{af}(\lambda_{ex2}) k_{ex}(\lambda_{ex2})}{\eta_1 \mu_{af}(\lambda_{ex1}) k_{ex}(\lambda_{ex1})}. \quad (14)$$

Заметим, что $R_\lambda^{(0)}$ выражается через произведение двух величин: отношения приведенных показателей поглощения ФС $\eta \mu_a$ на двух длинах волн возбуждения и отношения нормированных интенсивностей зондирующего излучения на поверхности среды $k_{ex}(\lambda_{ex2})/k_{ex}(\lambda_{ex1})$, которое может быть напрямую получено из измерений диффузно отраженных биотканью сигналов. При малых значениях d зависимость $R_\lambda(d)$ близка к линейной, угол наклона которой определяется разностью коэффициентов ослабления возбуждающего излучения на двух длинах волн:

$$R_\lambda(d) \approx R_\lambda^{(lin)}(d) = R_\lambda^{(0)} [1 + d(\mu_{ex1} - \mu_{ex2})/2]. \quad (15)$$

Данная асимптотика хорошо описывает поведение $R_\lambda(d)$ в интервале значений $0 < d < 2/(\mu_{ex1} - \mu_{ex2})$; при выходе толщины слоя ФС за пределы этого интервала рост $R_\lambda(d)$ замедляется, и для больших толщин отношение стремится к постоянной величине

$$R_\lambda(d \gg 2/(\mu_{ex1} - \mu_{ex2})) \approx R_\lambda^{(\infty)} = R_\lambda^{(0)} \frac{\mu_{ex1} + \tilde{\mu}_{em}}{\mu_{ex2} + \tilde{\mu}_{em}}. \quad (16)$$

Эта предельная величина зависит от коэффициента ослабления излучения на длине волны флуоресценции, в

отличие от характеристик (14), (15) для малых d , определяемых параметрами ослабления только зондирующего излучения и приведёнными коэффициентами поглощения ФС. Исходя из условия $R_\lambda \lesssim 0.95R_\lambda^{(\infty)}$, отношение R_λ чувствительно к толщине слоя ФС в интервале значений $0 < d < 3/(\mu_{\text{ex}2} + \tilde{\mu}_{\text{em}})$ и может использоваться для оценки толщины флуоресцентного слоя, если известны спектры приведенного коэффициента поглощения ФС $\eta\mu_{\text{af}}$ и коэффициента ослабления μ (как общего случая $\tilde{\mu}$).

3. Моделирование методом Монте-Карло

Для численного подтверждения разработанной теоретической модели и, в частности, зависимости $R_\lambda(d)$ было проведено МК-моделирование флуоресцентного отклика от флуорофора, распределённого в приповерхностном слое биоткани. Алгоритм моделирования был адаптирован для среды MATLAB. Поскольку среда MATLAB оптимизирована для работы с массивами большого размера, одновременные операции над массивами характеристик фотонов обеспечивают выигрыш во времени расчётов по сравнению с традиционным последовательным вычислением случайных траекторий [26, 34].

В соответствии со схемой на рис.2 биоткань задавалась как двухслойная среда, в верхнем слое которой был равномерно распределён ФС хлоринового ряда с объёмной концентрацией $C = 0.5\%$. Выбранная величина концентрации флуорофора соответствует типичным значениям накопления ФС после поверхностного нанесения перед процедурой ФДТ [35]. Толщина флуоресцентного слоя варьировалась от 0.01 до 3 мм, полная толщина образца биоткани равнялась 6 мм. Поперечные размеры биоткани составляли 20×20 мм. Возбуждение флуоресценции осуществлялось широким пространственно-однородным коллимированным пучком на длине волны 405 или 660 нм; эти длины волн отвечали пикам поглощения ФС. Базовые оптические параметры биоткани для МК-моделирования соответствовали параметрам биоткани дермы человека [31] (табл.1). Показатель преломления биоткани был равен 1.37. Для демонстрации чувствительности характеристик флуоресцентного сигнала к оптическим свойствам биоткани было дополнительно выполнено моделирование с варьированием коэффициентов поглощения и рассеяния на 30% относительно базовых значений как в большую, так и в меньшую сторону.

Моделирование флуоресцентного отклика от слоя ФС было реализовано в два этапа, по аналогии с построением аналитической модели (АМ). На первом этапе проводился расчёт трёхмерных карт плотности поглощённой флуорофором световой дозы возбуждающего излучения $P_{\text{abs}}(\lambda_{\text{ex}}, x_i, y_i, z_i)$ на длине волны возбуждения флуоресценции λ_{ex} с учётом заданной геометрии среды, распределения флуорофора в ней, а также оптических свойств среды и флуорофора на длине волны λ_{ex} . При чис-

ленном моделировании учитывалось добавочное поглощение в слое, содержащем ФС. Рассчитанная карта поглощённой флуорофором световой дозы на втором этапе выступала в качестве распределённого источника флуоресценции. Общий вес фотонов, испущенных из центра каждого вокселя карты при моделировании сигнала флуоресценции, соответствовал $\eta P_{\text{abs}}(\lambda_{\text{ex}}, x_i, y_i, z_i)\Delta x\Delta y\Delta z$, где $\Delta x, \Delta y, \Delta z$ – размеры вокселей по трем координатам. При моделировании размеры вокселей $\Delta x, \Delta y$ и Δz были равны 0.25, 0.25 и 0.01 мм соответственно. Большая дискретизация по z обусловлена тем, что фотоны флуоресценции испускаются из центра вокселя, а потому необходимо более точно учитывать глубину локализации источников, тогда как поперечное положение источника не столь критично, поскольку решается задача зондирования плоской волной. Считалось, что эмиссия флуоресцентных фотонов изотропна по направлению, а зависимость квантового выхода флуоресценции от длины волны возбуждения не учитывалась и для упрощения расчётов полагалось, что $\eta_1 = \eta_2 = 1$.

На втором этапе проводилось моделирование распространения фотонов флуоресценции в среде с оптическими характеристиками, соответствующими длине волны λ_{em} , и на внешней стороне границы среды $z = 0$ рассчитывалось поверхностное распределение веса фотонов, вылетающих из биоткани в соответствии с законами преломления. Из каждой точки, соответствующей центру вокселя карты поглощения, испускались фотоны флуоресценции с суммарным весом $P_{\text{abs}}(\lambda_{\text{ex}}, x_i, y_i, z_i)\Delta x\Delta y\Delta z$.

Интенсивность флуоресценции вычислялась путём усреднения суммарного веса фотонов, покинувших биоткань, по поперечной площадке 5×5 мм, по аналогии с обработкой сигнала в эксперименте [36]. Отношение $R_\lambda(d)$ сигналов флуоресценции, возбуждаемой на двух длинах волн, вычислялось по результатам моделирования в соответствии с выражением (12).

4. Результаты и их обсуждение

Результаты аналитического расчёта характеристик двухволновой флуоресценции слоя ФС толщиной d , распределённого в биоткани, и результаты МК-моделирования представлены на рис.3 для базовых оптических параметров биоткани [31], приведённых в табл.1. Флуоресцентные сигналы на длине волны 760 нм при возбуждении излучением на длинах волн 405 и 660 нм представлены на рис.3,а и б соответственно. При аналитических расчётах по аналогии с МК-моделированием предполагалось, что квантовый выход флуоресценции не зависит от длины волны и равен единице. Поскольку в задаче рассматривается двухслойная среда, в верхнем слое которой содержится флуорофор, а аналитические решения получены в рамках распространения излучения в однородной среде, аналитические кривые приведены для

Табл.1. Базовые оптические параметры биоткани дермы для МК-моделирования и аналитического исследования на основе данных работы [31].

Длина волны	μ_a (мм ⁻¹)		μ_s (мм ⁻¹)	g	μ (мм ⁻¹)	
	Биоткань	Слой с ФС			Биоткань	Слой с ФС
$\lambda_{\text{ex}1} = 405$ нм	0.89	1.01	37	0.80	4.67	4.99
$\lambda_{\text{ex}2} = 660$ нм	0.15	0.19	14	0.80	1.15	1.31
$\lambda_{\text{em}} = 760$ нм	0.13	0.13	12	0.80	0.96	0.96

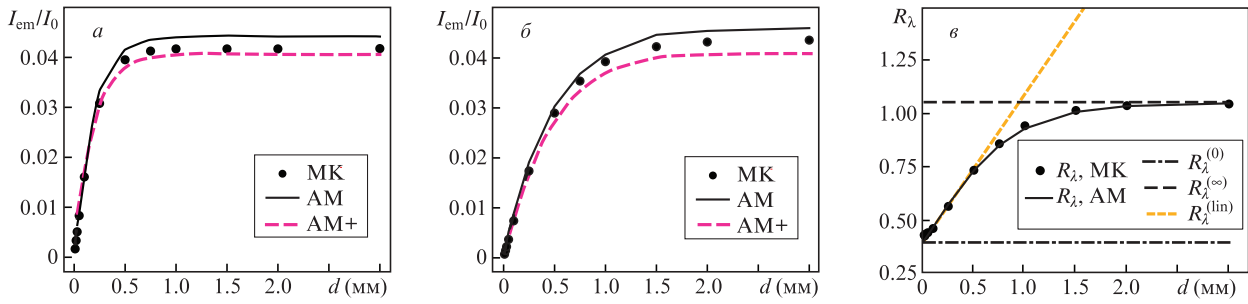


Рис.3. Интенсивности флуоресценции I_{em}/I_0 , нормированные на интенсивность возбуждающего излучения, в зависимости от толщины приповерхностного слоя ФС d при возбуждении флуоресценции на длинах волн 405 (а) и 660 нм (б), а также их отношения R_λ для всего рассмотренного диапазона d (в), вычисленные в рамках МК-моделирования и аналитической модели для базовых оптических параметров биоткани дермы (АМ) и для случая учёта вклада ФС в коэффициент поглощения $\mu_a(\lambda) = \mu_{a,tiss}(\lambda) + \mu_{a,f}(\lambda)$ (АМ+). На рис.в также показаны асимптоты зависимости $R_\lambda(d)$.

двух случаев: при расчёте карты поглощения возбуждающего излучения коэффициент поглощения среды считается равным $\mu_{a,tiss}(\lambda)$ или $\mu_{a,tiss}(\lambda) + \mu_{a,f}(\lambda)$ с учётом вклада ФС в коэффициент поглощения среды.

Как видно из рис.3,а,б, величина флуоресцентного сигнала быстрее выходит на предельное значение $I_{em}^{(\infty)}$ при возбуждении на длине волны 405 нм, что связано с более сильным ослаблением зондирующего излучения на этой длине волны по сравнению с длиной волны 660 нм. В то же время интенсивность флуоресценции, рассчитанная с помощью МК-моделирования, выходит на более низкий асимптотический уровень при больших толщинах слоя ФС. Это расхождение предположительно связано с упрощением, сделанным при построении АМ, в рамках которой при распространении возбуждающего и флуоресцентного излучений влияние добавочного поглощения в слое ФС не учитывается, а среда считается однородной. Для подтверждения этого предположения на рис.3 и на следующих рисунках (см. ниже) приведены аналитические кривые, рассчитанные по формуле (11) для однородной среды с коэффициентом поглощения $\mu_a(\lambda) = \mu_{a,tiss}(\lambda) + \mu_{a,f}(\lambda)$, что соответствует равномерному распределению ФС с заданной концентрацией по всему объёму биоткани. Из рис.3,а,б видно, что асимптотика зависимости от d сигнала флуоресценции, рассчитанного с помощью МК-моделирования, располагается между асимптотиками, рассчитанными с помощью АМ для сред с базовым поглощением и с учётом дополнительного поглощения ФС. Отношение $R_\lambda(d)$, рассчитанное с помощью соотношения (12) на основе данных АМ и МК-моделирования, а также асимптотики (14)–(16) представлены на рис.3,в. Аналитическая модель хорошо согласуется с результатами численного моделирования. Вместе с тем необходимо отметить, что при малых d ($d < 0.1$ мм) результаты МК-моделирования отличаются от линейной асимптотики, обеспечиваемой АМ, поскольку для малых значений d условия применимости диффузионного приближения, лежащего в основе АМ, не выполняются. Представленная зависимость демонстрирует наличие линейного участка на интервале $d = 0.1 - 0.5$ мм, за которым следует выход на постоянную асимптоту. Величина $R_\lambda(d)$ в меньшей степени чувствительна к неоднородному распределению поглощения (как к эффекту более высокого порядка).

Таким образом, радиометрический параметр R_λ , рассчитываемый с использованием аналитического соотношения (12), позволит получить адекватную оценку толщины d слоя ФС хлороинового ряда даже при описанных упрощениях модели флуоресцентного сигнала. Аналити-

ческий расчет R_λ с учётом дополнительного поглощения ФС не представляется целесообразным, поскольку ввиду существенного вклада обратнорассеянной вторым слоем диффузной компоненты при возбуждении флуоресцентного отклика на длине волны 660 нм такой подход будет заключать в себе систематическую погрешность.

Для оценки устойчивости разработанной АМ к вариациям оптических свойств биоткани было проведено сравнение результатов МК-моделирования и аналитического исследования при изменении оптических свойств базовой биоткани дермы в пределах $\pm 30\%$. Результаты вариации коэффициентов поглощения в пределах $\pm 30\%$ относительно базовых представлены на рис.4.

Следует отметить, что флуоресцентный сигнал от среды формируется не только фотонами, вышедшими из верхнего слоя среды, содержащего ФС, но и фотонами излучения, диффузно обратнорассеянного нижним слоем, не содержащим ФС. Из результатов, представленных на рис.3 и 4, можно видеть, что для $\lambda_{ex} = 405$ нм зависимость сигнала флуоресценции от d , рассчитанная методом МК, находится ближе к аналитической кривой для среды с повышенным поглощением ($\mu_a = \mu_{a,tiss} + \mu_{a,f}$). Это объясняется тем фактом, что сигнал флуоресценции при «синем» возбуждении формируется преимущественно приповерхностными слоями среды и для больших толщин слоя, содержащего ФС, слабо чувствителен к параметрам нижнего слоя без ФС. При возбуждении в «красном» диапазоне ($\lambda_{ex} = 660$ нм) фотоны, обратнорассеянные из объёма среды, не содержащего ФС, вносят значительный вклад в мощность излучения, поглощаемого флуорофором, поэтому кривая интенсивности флуоресценции, рассчитанная методом Монте-Карло, располагается между двумя аналитическими кривыми, рассчитанными для среды с базовым поглощением и с учётом дополнительного поглощения ФС. Этот вывод подтверждается результатами расчётов для вариации коэффициента рассеяния в пределах $\pm 30\%$ от базовых значений (результаты не показаны в силу их сходства с результатами для вариации коэффициента поглощения). При одновременной вариации коэффициентов поглощения и рассеяния на $\pm 30\%$ коэффициент диффузного ослабления μ изменяется на аналогичную величину. Такое изменение μ более существенно, чем в случае вариации только коэффициента рассеяния или поглощения, что ведёт к более значительному изменению характера зависимости $R_\lambda(d)$. Соответствующие зависимости показаны на рис.5. Поскольку наклон зависимости $R_\lambda(d)$ на линейном участке пропорционален разности $\mu_{ex1} - \mu_{ex2}$ (15), наблюдаются соответ-

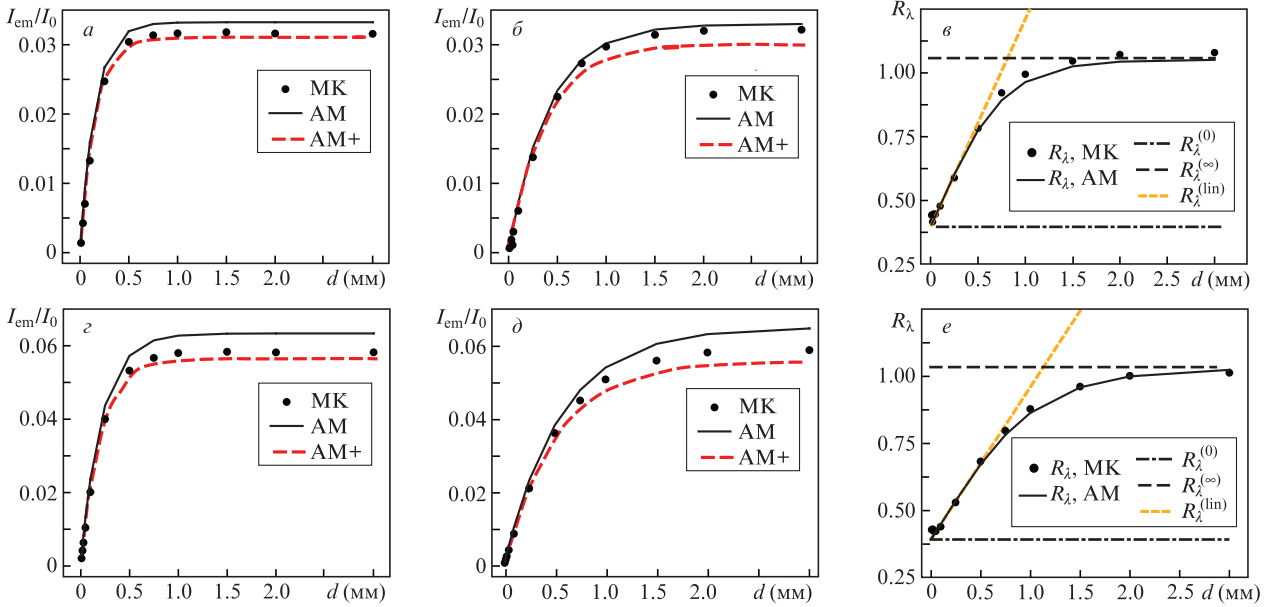


Рис.4. Интенсивности флуоресценции I_{em}/I_0 , нормированные на интенсивность падающего излучения, в зависимости от толщины приповерхностного слоя ФС d при возбуждении флуоресценции на длинах волн 405 (а, з) и 660 нм (б, д), а также их отношения R_λ (е, е), вычисленные в рамках МК-моделирования (МК) и аналитической модели без учета (АМ) с учетом (АМ+) вклада ФС в коэффициент поглощения среды для вариаций коэффициентов поглощения среды относительно базовых +30% (а-в) и -30% (з-е) (табл.1).

ствующие отклонения зависимостей от случая базовых параметров. Следует отметить хорошее совпадение результатов АМ и МК-моделирования для всех рассмотренных случаев.

Анализ зависимостей $R_\lambda(d)$ на рис.3–5 показывает, что при пропорциональном изменении параметров фоновой среды на обеих длинах волн возбуждения с одновременным сохранением спектра поглощения ФС интервал значений $R_\lambda[R_\lambda^{(0)}, R_\lambda^{(\infty)}]$ остается практически неизменным, поскольку определяется отношением характеристик среды на длинах волн $\lambda_{ex1}, \lambda_{ex2}$ и λ_{em} (13). Скорость изменения $R_\lambda(d)$ на линейном участке, наоборот, чувствительна к изменению абсолютных значений коэффициентов ослабления μ , поскольку пропорциональна разности $\mu_{ex1} - \mu_{ex2}$ (15), однако одинаковые по величине и знаку относительные изменения коэффициентов либо поглощения,

либо рассеяния приводят к практически одинаковой скорости изменения $R_\lambda(d)$.

Очевидно, что для оценки толщины флуоресцирующего слоя d на основании данных двухволнового ФИ необходимо использовать функцию $d(R_\lambda)$, обратную рассмотренной выше зависимости $R_\lambda(d)$, причём, поскольку величина R_λ зависит от оптических свойств среды, априорная неизвестность оптических параметров среды может служить источником погрешности в определении d . Для оценки этой погрешности были построены зависимости $d(R_\lambda)$ как для базовых оптических свойств, так и для случая их вариаций в пределах $\pm 30\%$. Оценка ширины области значений (выделена на рис.6 серым цветом) для фиксированных значений R_λ позволяет оценить погрешность определения толщины флуоресцирующего слоя в 25%–30% при погрешности определения оптических свойств биоткани в 30% в диапазоне значений $R_\lambda[0.4, 1]$, что соответствует интервалу толщин флуоресцирующего слоя $d \approx 0.1-2$ мм. Для малых значений d ($d \ll l_{tr} = 3D$) описанная АМ не может быть использована, поскольку для них нарушаются условия применимости диффузионного приближения.

Применимость предложенного метода оценки локализации флуорофора также ограничена выполнением условия $\mu_a \ll \mu'_s$ между коэффициентом поглощения и транспортным коэффициентом рассеяния в биоткани (условие применимости диффузионного приближения). При нарушении указанного условия формула (12) становится некорректной, и для оценки локализации флуорофора целесообразно применять МК-моделирование. Как было показано нами ранее [26, 27], величина R_λ может использоваться для оценки локализации ФС хлороинового ряда в биоткани в том случае, если величины μ_{ex1} и μ_{ex2} существенно различны.

Заметим, что предложенная модель оценки толщины слоя ФС построена на упрощающем предположении относительно равномерности распределения ФС по глубине. В реальных условиях концентрация нанесённого на

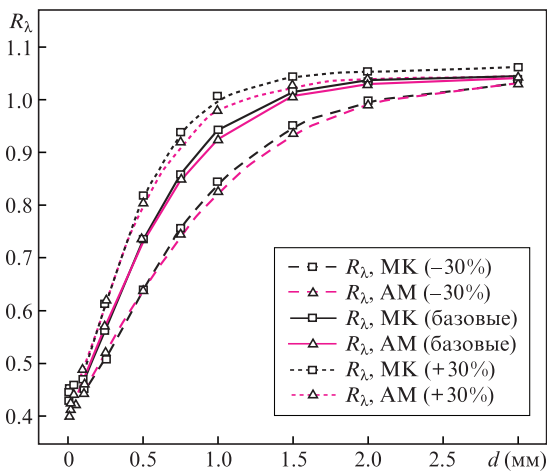


Рис.5. Отношения флуоресцентных откликов R_λ на длинах волн 660 и 405 нм, вычисленные в рамках МК-моделирования и АМ для базовых параметров среды и для случаев одновременной вариации коэффициентов поглощения и рассеяния среды на $\pm 30\%$ относительно базовых.

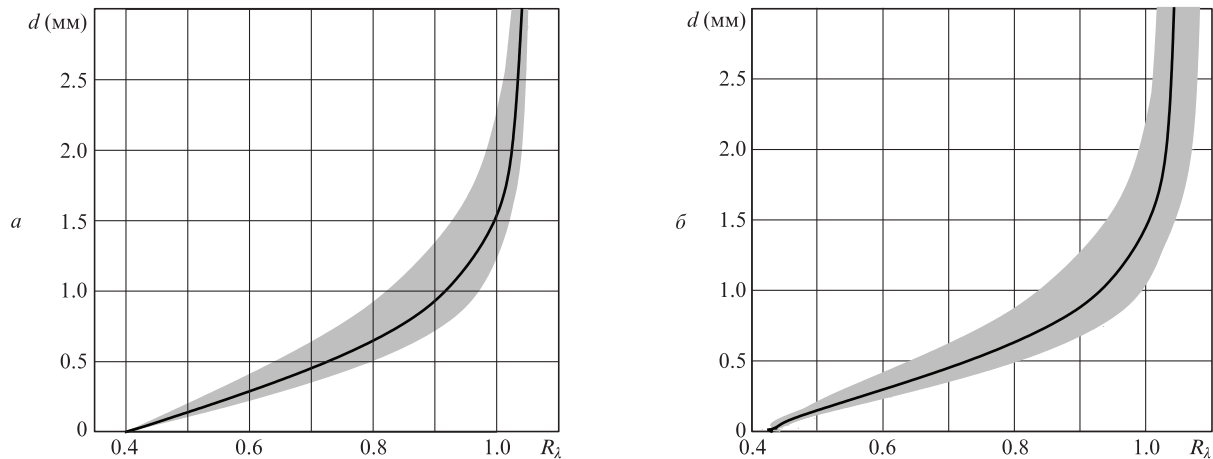


Рис.6. Оценки толщины флуоресцирующего слоя d по величине отношения сигналов флуоресценции R_d , полученные в рамках АМ (а) и МК-метода (б), для базовых значений оптических свойств дермы (сплошная кривая) и для случаев их различных вариаций (включая одновременные) в пределах $\pm 30\%$ (интервал указан серым цветом).

поверхность биоткани вещества уменьшается с глубиной, причём характерная глубина проникновения ФС зависит как от пространственных характеристик диффузии, так и от времени проникновения. Задача нахождения пространственно-временного распределения концентрации ФС в биоткани в результате его диффузии решалась, например, в работе [37]. Для использования разработанной упрощённой модели в реальной ситуации неравномерного распределения ФС можно аппроксимировать сложную зависимость концентрации ФС от глубины в каждый момент времени ступенчатой функцией, параметры которой – толщина слоя, содержащего ФС, и уровень поглощения ФС – выражены через характерный масштаб уменьшения концентрации ФС с глубиной и значение концентрации на поверхности. Тогда оценка толщины слоя ФС по радиометрическим измерениям флуоресценции позволит отслеживать динамику проникновения ФС в глубь биоткани и определять её характерные временные параметры, что имеет практическую ценность в задачах изучения накопления ФС различными типами биотканей.

Традиционно исследования проникновения флуорофоров в глубь биоткани в основном связаны не с измерением распределения препаратов по глубине, а с оценкой их усреднённой концентрации. Среди неинвазивных *in vivo* методов исследования накопления флуорофоров при поверхностном нанесении можно выделить методы прямой и косвенной визуализации. К первой группе относятся конфокальная и многофотонная флуоресцентная микроскопия [38, 39] – методы с клеточным уровнем детализации и существенно ограниченной из-за рассеяния глубиной детектирования, составляющей в биоткани менее 500 мкм. Ко второй группе относятся спектроскопические методы [40] и ДФТ [6–11, 41], обладающие глубокой чувствительностью вплоть до десятков миллиметров. Существующие спектроскопические методы не предполагают оценки глубины слоя красителя, а точность их оценки концентрации красителя определяется точностью аналитических моделей, используемых при обработке измеренных спектров обратного рассеяния. ДФТ, успешно реализуемая в последние годы с помощью гиперспектральных технологий [41], обладает субмиллиметровым пространственным разрешением и позволяет восстанавливать

трёхмерное пространственное распределение флуорофора на глубинах до десятков миллиметров, но является крайне дорогостоящим [41] и времязатратным [10, 11] методом, возможности которого для применения в клинической практике существенно ограничены. Предлагаемый нами метод оценки толщины флуоресцирующего слоя обладает такими преимуществами, как простота технической реализации, экономическая эффективность и высокий потенциал применения в биомедицинских исследованиях и клинической практике.

5. Заключение

В рамках полуэмпирической модели с использованием диффузионного приближения теории переноса излучения получено аналитическое выражение для флуоресцентного отклика от распределённого в приповерхностном слое биоткани флуорофора. На основе предложенной модели разработан метод оценки толщины флуоресцентного слоя в рамках двухволнового радиометрического ФИ. Показано хорошее согласие результатов аналитического моделирования регистрируемых флуоресцентных откликов с результатами МК-моделирования для параметров задачи, соответствующих поверхностному нанесению ФС на кожу человека в терапевтической концентрации. Показано, что отношение величин флуоресцентных откликов, полученных при возбуждении на двух длинах волн, позволяет оценить толщину приповерхностного слоя кожи, содержащей равномерно распределённый ФС, в диапазоне 0.1–2 мм с точностью не хуже 30% при погрешности определения оптических свойств биоткани не более 30%.

Для количественной оценки глубины проникновения ФС на основе описанной модели необходима информация об оптических свойствах конкретного участка биоткани, содержащей флуорофор, на всех рабочих длинах волн. Одновременные опорные измерения оптических свойств биоткани при осуществлении двухволнового ФИ являются перспективным направлением повышения информативности предложенного диагностического метода, предшествующего процедуре ФДТ.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 17-15-01264).

1. Frangioni J.V. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7** (5), 626 (2003).
2. Rao J., Dragulescu-Andrasi A., Yao H. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **18** (1), 17 (2007).
3. Leblond F., Davis S.C., Valdés P.A., Pogue B.W. *J. Photochem. Photobiol. B*, **98** (1), 77 (2010).
4. Troyan S.L., Kianzad V., Gibbs-Strauss S.L., Gioux S., Matsui A., Oketokoun R., Ngo L., Khamene A., Azar F., Frangioni J.V. *Ann. Surg. Oncol.*, **16** (10), 2943 (2009).
5. Johansson T., Thompson M.S., Stenberg M., af Klinteberg C., Andersson-Engels S., Svanberg S., Svanberg K. *Appl. Opt.*, **41** (7), 1462 (2002).
6. Yang X., Gong H., Quan G., Deng Y., Luo Q. *Rev. Sci. Instrum.*, **81** (5), 054304 (2010).
7. Eppstein M.J., Hawrysz D.J., Godavarty A., Sevick-Muraca E.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99** (15), 9619 (2002).
8. Milstein A.B., Oh S., Webb K.J., Bouman C.A., Zhang Q., Boas D.A., Millane R. *Appl. Opt.*, **42** (16), 3081 (2003).
9. Klose A.D., Hielscher A.H. *Opt. Lett.*, **28** (12), 1019 (2003).
10. Kleshnin M., Turchin I. *Laser Phys. Lett.*, **10** (7), 075601 (2013).
11. Fiks I., Kirillin M., Sergeeva E., Turchin I. *Radiophys. Quantum Electron.*, **54** (3), 197 (2011).
12. Shcherbo D., Merzlyak E.M., Chepurnykh T.V., Fradkov A.F., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Lukyanov K.A., Bogdanova E.A., Zarskiy A.G., Lukyanov S. *Nat. Methods*, **4** (9), 741 (2007).
13. Vahrmeyer A.L., Hutteman M., Van Der Vorst J.R., van De Velde C.J., Frangioni J.V. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **10** (9), 507 (2013).
14. Svensson J., Andersson-Engels S. *Opt. Express*, **13** (11), 4263 (2005).
15. Swartling J., Svensson J., Bengtsson D., Terike K., Andersson-Engels S. *Appl. Opt.*, **44** (10), 1934 (2005).
16. Jermyn M., Kolste K.K., Pichette J., Sheehy G., Angulo-Rodríguez L.M., Paulsen K.D., Roberts D.W., Wilson B.C., Petrecca K., Leblond F. *J. Biomed. Opt.*, **20** (3), 036014 (2015).
17. Wirth D., Kolste K., Kanick S., Roberts D. W., Leblond F., Paulsen K.D. *Biomed. Opt. Express*, **8** (8), 3656 (2017).
18. Leblond F., Ovanesyan Z., Davis S., Valdés P., Kim A., Hartov A., Wilson B., Pogue B., Paulsen K., Roberts D. *Phys. Med. Biol.*, **56** (21), 6823 (2011).
19. Spikes J. D. *J. Photochem. Photobiol. B*, **6** (3), 259 (1990).
20. Ol'shevskaya V.A., Nikitina R.G., Savchenko A.N., Malshakova M.V., Vinogradov A.M., Golovina G.V., Belykh D.V., Kutchin A.V., Kaplan M.A., Kalinin V.N. *Bioorg. Med. Chem.*, **17** (3), 1297 (2009).
21. Sternberg E.D., Dolphin D., Brückner C. *Tetrahedron*, **54** (17), 4151 (1998).
22. Kelty C.J., Brown N.J., Reed M.W., Ackroyd R. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **1** (3), 158 (2002).
23. Wang K., Zhuang J., Liu Y., Xu M., Zhuang J., Chen Z., Wei Y., Zhang Y. *Carbohydr. Polym.*, **184**, 445 (2018).
24. Zaak D., Frimberger D., Stepp H., Wagner S., Baumgartner R., Schneede P., Siebels M., Knichel R., Kriegmair M., Hofstetter A. *J. Urol.*, **166** (5), 1665 (2001).
25. Miller J.P., Maji D., Lam J., Tromberg B.J., Achilefu S. *Biomed. Opt. Express*, **8** (6), 3095 (2017).
26. Khilov A., Kirillin M., Loginova D., Turchin I. *Laser Phys. Lett.*, **15** (12), 126202 (2018).
27. Хиллов А.В., Куракина Д.А., Турчин И.В., Кириллин М.Ю. *Квантовая электроника*, **49** (1), 63 (2019) [*Quantum Electron.*, **49** (1), 63 (2019)].
28. Gamayunov S., Turchin I., Fiks I., Korchagina K., Kleshnin M., Shakhova N. *Photon. Laser Med.*, **5** (2), 101 (2016).
29. Kurakina D., Khilov A., Shakhova M., Orlinskaya N., Sergeeva E., Meller A., Turchin I., Kirillin M. *J. Biomed. Opt.*, **25** (6), 063804 (2019).
30. Shakhova M., Loginova D., Meller A., Sapunov D., Orlinskaya N., Shakhov A., Khilov A., Kirillin M. *J. Biomed. Opt.*, **23** (9), 091412 (2018).
31. Salomatina E.V., Jiang B., Novak J., Yaroslavsky A.N. *J. Biomed. Opt.*, **11** (6), 064026 (2006).
32. Jacques S.L. *J. Biomed. Opt.*, **15** (5), 051608 (2010).
33. Haskell R.C., Svaasand L.O., Tsay T.-T., Feng T.-C., McAdams M.S., Tromberg B.J. *J. Opt. Soc. Am.*, **11** (10), 2727 (1994).
34. Кириллин М.Ю., Куракина Д.А., Перекатова В.В., Орлова А.Г., Сергеева Е.А., Хиллов А.В., Субочев П.В., Турчин И.В., Маллиди Ш., Хасан Т. *Квантовая электроника*, **49** (1), 43 (2019) [*Quantum Electron.*, **49** (1), 43 (2019)].
35. Хиллов А.В., Логинова Д.А., Сергеева Е.А., Шахова М.А., Меллер А.Е., Турчин И.В., Кириллин М.Ю. *Современные технологии в медицине*, **9** (4), 96 (2017).
36. Kleshnin M., Fiks I., Plekhanov V., Gamayunov S., Turchin I. *Laser Phys. Lett.*, **12** (11), 115602 (2015).
37. Svaasand L.O., Wyss P., Wyss M.-T., Tadir Y., Tromberg B.J., Berns M.W. *Lasers Surg. Med.*, **18**, 139 (1996).
38. Huang A.Y., Myers J.T., Barkauskas D., Howell S.J., Oleinick N.L., McCormick T.S., Cooper K.D., Baron E.D., Lam M. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **9** (3), 225 (2012).
39. Lademann J., Meinke M., Schanzer S., Richter H., Darwin M., Haag S.F., Fluhr J., Weigmann H.-J., Sterry, W., Patzelt, A. *Int. J. Cosmet. Sci.*, **34** (6), 551 (2012).
40. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Тучин В.В. *Квантовая электроника*, **44** (7), 689 (2014) [*Quantum Electron.*, **44** (7), 689 (2014)].
41. Dang X., Bardhan N.M., Qi J., Gu L., Eze N.A., Lin C.-W., Kataria S., Hammond P.T., Belcher A.M. *Sci. Rep.*, **9** 3873 (2019).