

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Саратовский национальный исследовательский государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского»

На правах рукописи



Лазарева Екатерина Николаевна

**Многоволновая рефрактометрия биологических сред и её применение в медицинской
диагностике**

Специальность 1.3.6.- Оптика

Специальность 1.5.2.- Биофизика

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
Тучин Валерий Викторович,
доктор физико-математических наук,
профессор, заслуженный деятель наук РФ,
член-корреспондент РАН

Саратов – 2023

Оглавление

Введение.....	6
Глава 1 Обзор литературы.....	16
1.1 Показатель преломления и методы его измерения в широком диапазоне длин волн	16
1.1.1 Зависимость показателя преломления от длины волны	16
1.1.2 Зависимость показателя преломления от молекулярного состава	19
1.1.3 Зависимость показателя преломления от температуры	21
1.1.4 Основные методы измерения действительной части показателя преломления в широком спектральном диапазоне	22
1.2 Рефрактометрия биологических сред в широком диапазоне длин волн.....	30
1.2.1 Биологические среды и ткани, их физико-химические свойства	30
1.2.2 Рефрактометрия прозрачных биологических сред	35
1.2.2 Рефрактометрия биологических сред с высоким поглощением и рассеянием	35
1.2.3 Рефрактометрия клеток	45
1.3 Роль метода многоволновой рефрактометрии в исследованиях патологических процессов	48
1.3.1 Сахарный диабет и роль исследования процесса гликирования белков крови и их рефрактометрических свойств в его диагностике.....	49
1.3.2 Показатель преломления – как «биологический маркер» онкологических заболеваний	54
Выводы по главе 1	57
Глава 2 Рефрактометрия биологических сред в широком диапазоне длин волн и температур	59
2.1 Конструктивные особенности многоволнового рефрактометра Аббе и его применение для измерения показателя преломления биологических сред	59
2.2 Экспериментальное определение и анализ дисперсионной и температурной зависимости показателя преломления воды в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах (480-1550 нм)	62
2.3 Экспериментальное исследование рефрактометрических свойств мягких тканей в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах (480-1550 нм).....	66
2.3.1. Методы и материалы для измерения показателя преломления мягких тканей в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах	66
2.3.2 Анализ дисперсионной зависимости показателя преломления мягких тканей в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах	67
2.4 Экспериментальное исследование рефрактометрических свойств среза абдоминальной жировой ткани свиньи и вытопленного свиного	71
жира (480-1550 нм).....	71

2.4.1 Методы и материалы для измерения показателя преломления жировой ткани в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах	72
2.4.2 Анализ дисперсионной и температурной зависимостей показателя преломления среза жировой ткани свиньи и вытопленного свиного жира	72
Выводы по главе 2	78
Глава 3 Рефрактометрия крови в широком диапазоне длин волн	80
3.1 Измерение показателя преломления раствора гемоглобина человека в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах (480-1550 нм)	80
3.1.1 Методы и материалы для измерения показателя преломления раствора гемоглобина	81
3.1.2 Анализ дисперсионной зависимости показателя преломления гемоглобина	82
3.2 Измерение показателя преломления раствора сывороточного альбумина человека в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах (480-1550 нм)	88
3.2.1 Методы и материалы измерения показателя преломления растворов сывороточного альбумина человека	88
3.2.2 Анализ дисперсионной зависимости показателя преломления растворов сывороточного альбумина человека	89
3.3 Расчет показателя преломления крови из соотношения содержания гемоглобина и альбумина, как основных составляющих компонентов крови - эритроцитов и плазмы	91
3.3.1 Методика расчета показателя преломления крови в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах	93
3.3.2 Анализ полученных результатов и сравнение с литературными данными	95
Выводы по главе 3	99
Глава 4 Применение метода многоволновой рефрактометрии для исследования белков крови, гемоглобина и альбумина, при сахарном диабете	101
4.1 Экспериментальное исследование растворов гликированного гемоглобина человека методами многоволновой рефрактометрии и флуоресценции	101
4.1.1 Методы и материалы исследования оптических свойств растворов гликированного и негликированного гемоглобина	102
4.1.2 Результаты исследования растворов гликированного и негликированного гемоглобина	103
4.2 Экспериментальное исследование растворов гликированного альбумина человека методами многоволновой рефрактометрии и флуоресценции	111
4.2.1 Методы и материалы исследования растворов гликированного и негликированного альбумина	111
4.2.2 Результаты исследования растворов гликированного и негликированного альбумина	112

4.3 Экспериментальное исследование рефракции гемоглобина, полученного из крови добровольцев с сахарным диабетом I-го типа, методом многоволновой рефрактометрии в диапазоне 480-1500 нм.....	120
4.3.1 Методы и материалы исследования рефракции гемоглобина, полученного из крови добровольцев с сахарным диабетом I-го типа.....	120
4.3.2 Результаты исследования рефракции гемоглобина, полученного из крови добровольцев с сахарным диабетом I-го типа.....	121
Выводы по главе 4.....	129
Глава 5 Применение метода многоволновой рефрактометрии при исследовании биологических тканей и их компонентов при моделировании развития опухолевой ткани альвеолярного рака печени у крыс	131
5.1 Экспериментальное исследование сыворотки крови крыс с модельной перевитой опухолью методом многоволновой рефрактометрии	131
5.1.1 Методы и материалы исследования рефрактометрических свойств сыворотки, полученной из крови крыс с перевитой модельной опухолью.....	132
5.1.2 Результаты исследования рефрактометрических свойств сыворотки, полученной из крови крыс с перевитой модельной опухолью.....	134
5.2 Экспериментальное исследование рефрактометрических свойств ткани модельной опухоли, индуцированной раковыми клетками человека, методом многоволновой рефрактометрии	137
5.2.1 Методы и материалы исследования рефрактометрических свойств ткани модельной опухоли, индуцированной раковыми клетками человека, методом рефрактометрии	138
5.2.2 Результаты исследования ткани модельной опухоли, индуцированной раковыми клетками человека, методом многоволновой рефрактометрии.....	138
5.3 Экспериментальное исследование дегидратации кожи в норме и при развитии патологии методом многоволновой рефрактометрии	142
5.3.1 Описание методики оценки дегидратации кожи при использовании гиперосмотических агентов и рефрактометрического метода	143
5.3.2 Материалы исследования дегидратации кожи при применении гиперосмотических агентов.....	144
5.3.3 Результаты исследования дегидратации кожи при применении гиперосмотических агентов.....	145
Выводы по главе 5.....	150
Заключение	152
Список сокращений и условных обозначений	154
Благодарности.....	155
Список литературы	156

Приложение А. Дополнительные таблицы.....	176
Таблица А1. Показатель преломления биологических сред	176
Таблица А2. Показатель преломления растворов альбумина и плазмы	180
Таблица А3. Показатель преломления растворов гемоглобина.....	181

Введение

Актуальность темы исследования

Показатель преломления биологических сред является одним из основных оптических параметров, который характеризует взаимодействие света с тканью. Различные оптические методы, широко используемые для характеристики тканей, такие как видимая и ближняя инфракрасная (БИК) спектроскопия, оптическая когерентная томография, флуоресцентная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния, нуждаются в точных данных для показателя преломления тканей, крови и их компонентов для количественного описания экспериментальных данных [1]. Величина показателя преломления требует оценки для широкого спектрального диапазона, поскольку информация о дисперсии ткани также может быть использована для характеристики и определения показателей преломления компонентов ткани [2], для количественной оценки рассеяния света на отдельных длинах волн через относительный показатель преломления [3] или для дифференцирования патологических тканей [4]. Не существует экспериментального метода, который можно было бы использовать для оценки дисперсии ткани напрямую или посредством прямого расчета по измеренным спектрам. Наиболее часто показатель преломления биосред измеряют экспериментально на дискретных длинах волн, используя различные методы [2]. Распространенным оборудованием для измерения показателя преломления является рефрактометр Аббе, который позволяет получать показатель преломления твердых и жидких образцов в основном на длине волны 589 нм [5]. Однако, хорошо известно, что величина показателя преломления сильно зависит от длины волны, температуры и молекулярной структуры тканей. В настоящее время оценка показателя преломления на нескольких длинах волн возможна различными методами, что позволяет интерполировать эти дискретные экспериментальные данные в широком спектральном диапазоне [6, 7]. Альтернативный косвенный метод, основанный на соотношениях Крамерса-Кронига, позволяет рассчитывать зависимость показателя преломления биологических материалов от длины волны непосредственно из зависимости коэффициента поглощения, восстановленной из измерений спектральной интенсивности [8]. Во многих оптических исследованиях часто используется приблизительная оценка показателей преломления исследуемой ткани, основанная на том, что основной составляющей ткани являются клетки, заполненные внутриклеточной жидкостью и органеллами, что можно представить, как смесь буферного раствора и белков [9].

Показатель преломления является одной из наиболее важных оптических характеристик биологических сред, а знание дисперсии и температурных зависимостей для различных тканей

и их компонентов, например основных белков крови – альбумина и гемоглобина, важно как для понимания изменений их оптических свойств, так и биологических тканей в целом [10]. В частности, количественная и качественная информация об оптических свойствах крови и о показателе преломления, представляет большой интерес для многих областей биомедицинских исследований и практической медицины, так как неинвазивные или малоинвазивные оптические технологии все чаще используются в диагностике и терапии [11]. Оптические свойства крови определяются такими физиологическими и биологическими параметрами, как гематокрит, температура, осмолярность, насыщение кислородом или другими газами, ригидность мембраны эритроцитов, и при этом сложным образом зависят от длины волны [12, 13, 14]. Видимую и БИК области спектра часто называют «терапевтическим/диагностическим» окном, так как именно в этом диапазоне длин волн малый вклад в поглощение дает вода, которая является основным компонентом многих мягких биологических тканей [15].

В настоящее время возобновился интерес исследователей к проблеме измерения показателя преломления различных биологических тканей и крови в широком диапазоне длин волн, поскольку именно показатель преломления предлагается использовать в качестве одного из эндогенных диагностических маркеров различных заболеваний [4]. Например, Плотникова Л.В. и соавторы показали, что величина показателя преломления сыворотки крови может быть использована в качестве дополнительного критерия для оценки динамики изменений свойств сыворотки крови при прохождении курса противоопухолевой терапии [16]. Поскольку структура и состав тканей и, соответственно, их оптические свойства изменяются в процессе развития патологии, несколько исследовательских групп предложили показатель преломления в качестве маркера дифференциации нормальной и патологической ткани, в том числе экспериментального диабета у животных [15]. Одним из них, часто используемым в качестве маркера при сахарном диабете, является гликированный гемоглобин (HbA1c), образующийся в результате неферментативного гликирования (гликозилирования) гемоглобина, который подвергается воздействию свободной глюкозы в крови и, следовательно, имеет сильную корреляцию со средней концентрацией глюкозы в крови в предшествующий трехмесячный период (продолжительность жизни эритроцитов). Благодаря такой сильной корреляции уровни HbA1c используются для мониторинга долгосрочного контроля глюкозы у установленных диабетиков и сравнительно недавно были одобрены для скрининга на диабет ($HbA1c \geq 6,5\%$) и преддиабет ($5,7\% \leq HbA1c \leq 6,4\%$) [17]. Знание оптических свойств крови, её компонентов и их отличительных особенностей важно для разработки быстрых, простых и неинвазивных методов диагностики этих заболеваний. Например, *in vivo* проточная цитометрия меланомных клеток в потоке крови у пациентов с диабетом может иметь дополнительный фоновый сигнал от эритроцитов, содержащих гликированный гемоглобин [18].

Важная роль для разработки новых диагностических и терапевтических методов в медицине отводится оптическим методам, имеющим высокую чувствительность к определению содержания воды. Применительно к методике оптического просветления биологических тканей и жидкостей иммерсионным методом, где одним из основных механизмов является согласование показателей преломления, также необходима оценка дисперсии оптических просветляющих агентов [19]. Оценка показателя преломления биологических сред и их отдельных компонентов очень важна для реализации различных физических методов воздействия на оптические свойства биологических тканей, особенно для изучения процесса оптического просветления тканей. Для оптического просветления представляет интерес оценка эффективности механизма согласования показателей преломления, а это означает, что если определить кинетику показателя преломления интерстициальной жидкости и образца ткани в целом, то возможна оценка эффективности оптического просветления [20].

Таким образом, знание показателей преломления биологических сред, тканей и их компонентов в широком диапазоне длин волн требуется для описания оптических свойств различных слоев кровенасыщенных тканей, например, методом статистического моделирования Монте-Карло [21]. Также знание оптических свойств тканей и крови позволяет определять оптимальную длину волны воздействия, при которой глубина проникновения лазерного излучения максимальна. Это важно при моделировании взаимодействия лазерного излучения с тканью, например, при планировании таких клинических процедур, как лазерный внутритканевый нагрев или фотодинамическая терапия, а также при выборе рабочих длин волн пульсовых оксиметров, которые широко используются в различных областях медицины для мониторинга насыщения крови кислородом [22, 23]. Дополнительной мотивацией для написания диссертации является множество расхождений между показателями преломлений, о которых сообщается в литературе различными исследовательскими группами.

Цели и задачи диссертационной работы

На основе анализа научной литературы были сформулированы цель и задачи диссертационной работы:

Цель: изучить в широком диапазоне длин волн и температур рефрактометрические свойства биологических тканей и их компонентов в норме и при патологиях, связанных с развитием сахарного диабета и раковых опухолей, а также выявить связь рефрактометрических свойств биотканей с их структурой и основными компонентами.

Для достижения цели работы потребовалось решить следующие основные **задачи:**

1. Разработать методику и провести измерения показателя преломления наиболее значимых биологических сред в широком диапазоне температур и длин волн видимого и БИК диапазонов и проанализировать полученные дисперсионные зависимости.
2. Выявить связи между экспериментальными данными для показателей преломления, полученными рефрактометрическим методом, и составом, а также структурой биологических сред и их компонентов.
3. Разработать метод оценки показателя преломления крови по экспериментальным данным, полученным для гемоглобина и альбумин, как для основных белков крови.
4. Разработать метод оценки степени гликированности белков крови, гемоглобина и альбумина, на основе рефрактометрических данных широкого спектрального диапазона.
5. Разработать метод оценки степени дегидратации ткани при применении гиперосмотических оптических просветляющих агентов.

Научная новизна результатов диссертационной работы определяется следующим:

1. В работе впервые измерены показатели преломления биологических сред, таких как кожа, мышечная ткань, жировая ткань, ткани головного мозга, кровь и её компоненты, на выделенных длинах волн видимой и ближней инфракрасной спектральных областей в широком диапазоне температур в норме и при патологиях, связанных с сахарным диабетом и развитием модельной опухоли рака печени.
2. Предложен метод расчета показателя преломления крови с использованием данных для показателей преломления водных растворов гемоглобина и альбумина, исходя из соотношения их содержания, как основных составляющих эритроцитов и плазмы.
3. Метод многоволновой рефрактометрии применен для оценки степени гликированности основных белков крови, гемоглобина и альбумина.
4. Метод многоволновой рефрактометрии применен для оценки дегидратации ткани при использовании гиперосмотических оптических просветляющих агентов.

Научно-практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы обусловлена важностью полученных результатов для совершенствования и развития оптических методов диагностики и терапии социально-значимых заболеваний, таких как сахарный диабет и онкологические заболевания. Полученные результаты имеют практическую значимость, поскольку способствуют развитию направления в оптике и биофотонике, связанного с повышением эффективности и безопасности диагностики и лечения заболеваний.

Положения и результаты, выносимые на защиту

1. База экспериментальных данных для показателей преломления наиболее значимых биологических сред, таких как кожа, мышечная ткань, жировая ткань, основные белки крови, ткани легких, почки и головного мозга, на выделенных длинах волн в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах (480-1550 нм) при различных температурах, от комнатной до физиологической и далее до 50°C.

2. Показатель преломления крови в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах (480-1550 нм) может быть рассчитан с достаточной точностью с использованием измеренных показателей преломления растворов альбумина и гемоглобина.

3. Установлена связь температурного инкремента показателя преломления растворов гемоглобина и альбумина с содержанием в них гликированных фракций. Измерение температурного инкремента показателя преломления растворов гемоглобина, полученных из цельной крови человека, позволяет оценить уровень гликированности гемоглобина.

4. Новые данные для показателя преломления опухолевой ткани в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах (480-1550 нм) и демонстрация возможности определения степени развития опухолевой ткани по величине изменения показателя преломления.

5. При воздействии гиперосмотического агента ассоциированная с изменением показателя преломления дегидратация участка кожи крыс в области развитой модельной опухоли рака печени в 3 раза ниже по сравнению с удаленными от опухоли участками кожи.

Личный вклад автора

Автор принимал личное участие при выполнении работ на всех этапах исследований, описанных в диссертации: начиная от реализации задач поставленных научным руководителем до обсуждения полученных результатов, их статистической и аналитической обработке, написания текста и иллюстраций статей. Автор самостоятельно проводил эксперименты по измерению показателей преломления биологических тканей, измерению оптических характеристик, а также геометрических и весовых параметров образцов. Соискатель принимал непосредственное участие в изложении полученных теоретических, экспериментальных и вычислительных результатах в материалах диссертационной работы, статьях и монографии; подготовке докладов на научных конференциях.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов, описанных в диссертационном исследовании, обсуждений, выводов и заключения обеспечивается использованием современного научно-исследовательского оборудования, адекватностью используемых теоретических моделей,

применением апробированных методик измерений, объемом использованного в работе материала и применением традиционных статистических методов обработки результатов, воспроизводимостью экспериментальных и расчетных данных, а также их совпадением с результатами и выводами других авторов, полученных с помощью альтернативных методов, опубликованием результатов в рецензируемых российских и международных научных изданиях.

Работы, изложенные в диссертации, осуществлялись в соответствии с программами научно-исследовательских работ, поддерживаемых грантами: РФФИ 20-32-90058; 18-52-16025;17-00-00275 (К) (17-00-00270); РНФ № 21-72-10057; Грант правительства РФ (№ 14.350.31.0044).

Основные научные результаты работы были представлены на следующих конференциях: Международный симпозиум «Saratov Fall Meeting» (Саратов, Россия, 2006-2021), Всероссийский молодежный Самарский конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике (Самара, Россия, 2017 -2022), Международный симпозиум «Основы лазерных микро- и нанотехнологий» (ФЛАМН-22), 29-ая Международная конференция по передовым лазерным технологиям (ALT'22), 28-ая Международная конференция по передовым лазерным технологиям (ALT'21), VII Съезд биохимиков России (Сочи, Россия, 2021), SPIE Photonics Europe Digital Forum 2020 (Conference Tissue Optics and Photonics, Strasbourg, France, 2020), VI Съезд биохимиков России (Сочи, Россия, 2019), Международная молодежная конференция «Физика.СПб» (Санкт-Петербург, Россия, 2019), 15-ая Международная конференция молодых ученых «Разработки в области оптики и связи 2019» (DOC 2019)» (Рига, Латвия, 2019).VI Международный Симпозиум «Актуальные Проблемы Биофотоники» (VI International Symposium TOPICAL PROBLEMS OF BIOPHOTONICS –2017, Нижний Новгород, Россия, 2017), 2-я Международная Конференция «Биофотоника-Рига2017» (2nd International Conference «Biophotonics - Riga 2017», Рига, Латвия, 2017), 2-я Школа ADFLIM для молодых ученых, аспирантов и студентов (Санкт-Петербург, Россия, 2017), 18-я Международная конференция по лазерной оптике (ICLO 2018)» (Санкт-Петербург, Россия, 2017).

Публикации

По материалам исследований, выполненных в рамках диссертационной работы, опубликованы: глава в монографии, индексируемая библиографической базой «Scopus», и 17 статей, из них 5 статей в изданиях, входящих в список ВАК и 12 статей в зарубежных журналах, индексируемых библиографическими базами «Web of Science» и «Scopus».

Статьи в рецензируемых журналах из списка рекомендованных ВАК:

1. **E.N. Lazareva**, P.A. Dyachenko, A.B. Bucharskaya, N.A. Navolokin, V.V. Tuchin, «Estimation of dehydration of skin by refractometric method using optical clearing agents» - // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. 2019. Vol.5 №2. P. 020305 (1-7)
2. **E.N. Lazareva**, V.V. Tuchin, «Blood refractive index modelling in the visible and near infrared spectral regions» - // Journal of Biomedical Photonics & Eng. 2018. Vol.4 №1. P. 010503 (1-8).
3. М.М. Назаров, О.П. Черкасова, **Е.Н. Лазарева**, А.Б. Бучарская, Н.А. Наволокин, В.В. Тучин, А.П. Шкуринов, «Комплексное изучение особенностей поглощения сыворотки крови крыс с экспериментальным раком печени» - // Оптика и спектроскопия. 2019. Т.126. Вып. 6. С. 799-808
4. А.А. Манькова, О.П. Черкасова, **Е.Н. Лазарева**, А.Б. Бучарская, П.А. Дьяченко, Ю.В. Кистенев, Д.А. Вражнов, В.Е. Скиба, В.В. Тучин, А.П. Шкуринов, «Исследование сыворотки крови у крыс с трансплантированной холангиокарциномой с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния света» - // Оптика и спектроскопия. 2020. Т.128. Вып. 7. С. 956-963
5. О.А. Смолянская, **Е.Н. Лазарева**, С.С. Налегаетев, Н.В. Петров, К.И. Зайцев, П.А. Тимошина, Д.К. Тучина, Я. Г.Торопова, О. В. Корнюшин, А.Ю. Бабенко, Ж.-П. Гийе, В.В. Тучин, «Мультимодальная оптическая диагностика гликированных биологических тканей» - // Успехи биологической химии. 2019. Т.59. С. 253–294

Статьи в изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus:

1. I.S. Martins, H.F. Silva, **E.N. Lazareva**, N.V. Chernomyrdin, K.I. Zaytsev, L.M. Oliveira, and V.V. Tuchin, «Measurement of tissue optical properties in a wide spectral range: a review [Invited]» - // Biomed. Opt. Express. 2023. №14. P. 249-298
2. A.B. Bucharskaya, I.Y. Yanina, S.V. Atsigaida, V.D. Genin, **E.N. Lazareva**, N.A. Navolokin, P.A. Dyachenko, D.K. Tuchina, E.S. Tuchina, E.A. Genina, Y.V. Kistenev, V.V. Tuchin, «Optical clearing and testing of lung tissue using inhalation aerosols: prospects for monitoring the action of viral infections» - // Biophys. Rev. 2022. Vol.14 №4 P. 1005-1022
3. **E.N. Lazareva**, A.Y. Zyubin, N.I. Dikht, A.B. Bucharskaya, I.G. Samusev, V.A. Slezhkin, V.I. Kochubey, V.V. Tuchin, «Optical Properties of Glycated and Non-Glycated Hemoglobin–Raman/Fluorescence Spectroscopy and Refractometry» -// J. of Biomedical Photonics & Eng. 2022. Vol.8 №2 P. 020303 (1-9)

4. P.A. Dyachenko (Timoshina), L.E. Dolotov, **E.N. Lazareva**, A.A. Kozlova, O.A. Inozemtseva, R.A. Verkhovskii, G.A. Afanaseva, N.A. Shushunova, V.V. Tuchin, E.I. Galanzha, V.P. Zharov, «Detection of Melanoma Cells in Whole Blood Samples Using Spectral Imaging and Optical Clearing» - // IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics. 2021. Vol.27 №4. P. 9310679 (1-12)
5. T. Ermatov, R.E. Noskov, A.A. Machnev, I. Gnusov, V. Atkin, **E.N. Lazareva**, S.V. German, S.S. Kosolobov, T.S. Zatsepin, O.V. Sergeeva, J.S. Skibina, P.Ginzburg, V.V. Tuchin, P.G. Lagoudakis, D.A. Gorin, «Multispectral sensing of biological liquids with hollow-core microstructured optical fibres» - // Light: Science and Applications. 2020. Vol.9 №173. P. 1-12
6. R.E. Noskov, A.A. Zanishevskaya, A.A. Shuvalov, S.V. German, O.A. Inozemtseva, T.P. Kochergin, **E.N. Lazareva**, V.V. Tuchin, P. Ginzburg, J.S. Skibina, D.A. Gorin, «Enabling magnetic resonance imaging of hollow-core microstructured optical fibers via nanocomposite coating» - // Optics Express. 2019. Vol.27 №7. P. 9868-9878
7. A.N. Bashkatov, K.V. Berezin, K.N. Dvoretzkiy, M.L. Chernavina, E.A. Genina, V.D. Genin, V.I. Kochubey, **E.N. Lazareva**, A.B. Pravdin, M.E. Shvachkina, P.A. Timoshina, D.K. Tuchina, D.D. Yakovlev, D.A. Yakovlev, I.Y. Yanina, O.S. Zhernovaya, V.V. Tuchin, «Measurement of tissue optical properties in the context of tissue optical clearing» - // Journal of Biomedical Optics. 2018. Vol.23 №9. P. 1-31
8. I.Y. Yanina, **E.N. Lazareva**, V.V. Tuchin, «Refractive index of adipose tissue and lipid droplet measured in wide spectral and temperature ranges» - // Applied Optics. 2018. Vol.57 №17, P. 4839-4848
9. **E.N. Lazareva**, V.V. Tuchin, «Measurement of refractive index of hemoglobin in the visible/NIR spectral range» - // Journal of Biomedical Optics. 2018. Vol.23 №3. P. 1-9
10. **E.N. Lazareva**, A.Y. Zyubin, I.G. Samusev, V.A. Slezhkin, V.I. Kochubey, and V.V. Tuchin «Refraction, fluorescence, and Raman spectroscopy of normal and glycated hemoglobin» - // Proc. SPIE. 2018. Vol.10685. P. 1068540
11. **E.N. Lazareva** and V.V. Tuchin, «The temperature dependence of refractive index of hemoglobin at the wavelengths 930 and 1100 nm», Proc. SPIE. 2016. Vol.9917. P. 99170U-1-9
12. **E.N. Lazareva**, V.V. Tuchin, I.V. Meglinski, «Measurements of absorbance of hemoglobin solutions incubated with glucose» - // Proc. SPIE. 2008. Vol.6791. P. 67910-67910O, Bellingham, WA, USA

Глава в монографии:

Refractive index measurements of tissue and blood components and OCAs in a wide spectral range /**E. N. Lazareva**, L. Oliveira, I. Y. Yanina, N. V. Chernomyrdin, G. R. Musina, D. K. Tuchina,

A. N. Bashkatov, K. I. Zaytsev, and V. V. Tuchin // Handbook of Tissue Optical Clearing: New Prospects in Optical Imaging, V. V. Tuchin, D. Zhu, and E. A. Genina, eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 2022. – P. 141-166

Другие публикации:

1. **Е.Н. Лазарева**, А.М. Мыльников, Н.А. Наволокин [и др.] «Исследование оптических свойств модельного рака печени методами рефрактометрии и спектроскопии комбинационного рассеяния» - // Взаимодействие сверхвысокочастотного, терагерцового и оптического излучения с полупроводниковыми микро- и наноструктурами, метаматериалами и биообъектами : Сборник статей девятой Всероссийской научной школы-семинара, Саратов, 24 мая 2022 года / Под редакцией Ал.В. Скрипаля. – Саратов: Издательство “Саратовский источник”, 2022. – С. 269-273

2. **Е.Н. Лазарева**, И.Ю. Янина, Ю.В. Кистенев, В.В. Тучин, «Рефрактометрические свойства альбумина на выделенных длинах волн при стабилизированных температурах», - // Взаимодействие сверхвысокочастотного, терагерцового и оптического излучения с полупроводниковыми микро- и наноструктурами, метаматериалами и биообъектами : Сборник статей восьмой Всероссийской научной школы-семинара, Саратов, 24 мая 2021 года / Под редакцией Ал.В. Скрипаля. – Саратов: Издательство "Саратовский источник", 2021, С. 166-171

3. **Е.N. Lazareva**, A. Y. Zyubin, I.G. Samusev, V.V. Tuchin, «Refractive properties of glycated albumin and hemoglobin in a wide range of wavelengths and temperatures», - // Advanced Laser Technologies ALT`21: Book of abstracts the 28th International Conference, Moscow, 06–10 октября 2021 года. – Moscow: Общество с ограниченной ответственностью «МЕСОЛ», 2021, P. 212

4. **Е.Н. Лазарева**, А.Ю. Зюбин, Н.И. Дихт [и др.], «Исследование оптических свойств белков крови (гемоглобина и альбумина) и их гликированных фракций методами рефрактометрии, флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния», - // XIX Всероссийский молодежный Самарский конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике: Сборник трудов конференции, Самара, 09–13 ноября 2021 года. – Москва: Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук, 2021, С. 235-238

5. **Е.Н. Лазарева**, П.А. Тимошина, А.Б. Бучарская, Н.А. Наволокин, В.В. Тучин, «Оценка степени дегидратации кожи рефрактометрическим методом при применении оптических просветляющих агентов» - // в сборнике статей XVI Всероссийского Самарского Конкурс-конференции научных работ по оптике и лазерной физике, Москва: Федеральное

государственное бюджетное учреждение науки Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук, 2018, С. 124-135

6. **Е.Н. Лазарева**, М.М. Назаров, П.А. Тимошина, А.Б. Бучарская, Н.А. Наволокин, А.П. Шкуринов, В.В. Тучин, «Оценка степени дегидратации кожи при применении оптических просветляющих агентов в видимой, ближней ИК и ТГц областях» - // Тезисы докладов Международной конференции ФизикА.СПб, ФТИ им. А.Ф. Иоффе, Санкт-Петербург, 22-24 октября, 2019, С. 279-280

7. **Е.Н. Лазарева**, Л.И. Малинова, В.В. Тучин, «Рефрактометрические свойства микрочастиц тромбоцитарного происхождения у больных с острым инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST на фоне фармакологической супрессии агрегационной активности тромбоцитов» - // тезисы в сборнике «Научные труды. Том 2», Издательство «Перо», 2019, С. 285

8. **E.N. Lazareva**, P.A. Dyachenko, M.M. Nazarov, A.B. Bucharskaya, V.V. Tuchin, A.P. Shkurinov, «Refractive Properties of Blood Serum of Rats with Experimental Liver Cancer», Сборник тезисов Китайско-российского семинара по биофотонике и биомедицинской оптике-2020, Саратов, 2020. С. 54-55

9. **Е.Н. Лазарева**, П.А. Тимошина, А.Б. Бучарская, Н.А. Наволокин, В.В. Тучин, «Оценка степени дегидратации кожи рефрактометрическим методом при применении оптических просветляющих агентов» - // в сборнике статей XVI Всероссийского Самарского Конкурс-конференции научных работ по оптике и лазерной физике, Москва: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук, 2018, С. 124-163

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, списка цитируемой литературы и приложения, состоящего из 289 наименований. Объем диссертации без приложения составляет 175 страниц, включая 62 рисунка и 34 таблицы.

Глава 1 Обзор литературы

В данной главе рассматривается современное состояние исследований в области рефрактометрии биотканей и возможности её применения в медицине с целью выделения актуальных проблем. Рассматривается фундаментальное понятие показателя преломления и факторы, влияющие на его величину. Перечислены основные методы измерения действительной части показателя преломления. Описывается значимость показателя преломления и рефрактометрии для методов медицинской диагностики, в том числе, что показатель преломления может выступать «биологическим маркером» в исследованиях, связанных с развитием патологических процессов. Формулируются цели и задачи диссертационной работы.

1.1 Показатель преломления и методы его измерения в широком диапазоне длин волн

В настоящее время методы рефрактометрии широко применяются в различных областях оптики, биофотоники, аналитической химии, медицины, кристаллографии и др. Определение рефракции позволяет идентифицировать как неорганические, так и органические вещества. В сочетании с определением других физических свойств рефрактометрия с успехом применяется для изучения сплавов, смесей и их фазовых равновесий. Изучение преломляющих свойств чистых веществ и растворов даёт ценную количественную информацию об их составе, концентрации и чистоте. В области биохимических исследований рефрактометрия может быть использована для анализа различных биологических материалов, изучения ферментативных процессов. Такое широкое применение рефрактометрических методов основано на зависимости преломляющих свойств вещества от его физического и химического строения [24]. Не существует экспериментального метода, который можно было бы использовать для оценки дисперсии ткани напрямую или посредством прямого расчета по измеренным спектрам. Обычно показатели преломления биологических сред измеряют экспериментально на дискретных длинах волн, используя различные методы [25].

1.1.1 Зависимость показателя преломления от длины волны

При переходе света из одной среды в другую меняется его скорость. При этом меняется также его направление (за исключением тех случаев, когда луч света попадает

перпендикулярно к границе раздела между двумя средами). Изменение направления происходят в соответствии с законом преломления и выражаются соответствующими значениями углов, которые луч образует с нормалью, проведенной к границе раздела. В соответствии с принятыми обозначениями показатель преломления равен:

$$n = \frac{\sin\alpha}{\sin\alpha_1}, \quad (1.1)$$

что тождественно выражению

$$n = \frac{v_A}{v_{A1}}, \quad (1.2)$$

где v_A и v_{A1} – скорость света в соответствующих средах.

Таким образом, показатель преломления является безразмерной постоянной, величина которой для света данной длины волны определяется природой и свойствами двух веществ: $A1$ и A . Если колебания величины показателя преломления в зависимости от обычных в лабораторных условиях изменений атмосферного давления и температуры не превышают $1 \cdot 10^{-5}$, то в большинстве случаев ими можно пренебречь [26].

В соответствие с классической теорией дисперсии света показатель преломления света зависит от длины волны света или частоты, и он определяется формулой [26]:

$$\tilde{n}^2 = R(\sqrt{\varepsilon}) = 1 + \frac{4\pi Nq^2}{m((\omega_0^2 - \omega^2) - i\gamma\omega)}, \quad (1.3)$$

где ε – диэлектрическая проницаемость среды, N – число молекул, m – молекулярная масса, q – молекулярный заряд, ω – частота колебаний, ω_0 – частота собственных колебаний, $\gamma = g/m$ – коэффициент затухания.

Так как для малых x , $\sqrt{1+x} = 1 + \frac{1}{2}x$, то можно получить

$$\tilde{n} = 1 + \frac{2\pi Nq^2}{m(\omega_0^2 - \omega^2 - i\gamma\omega)}. \quad (1.4)$$

Полученное выражение комплексное и, положив $\tilde{n} = n + ik$ и выделяя из (1.4) действительную и мнимую части, получим:

$$n = 1 + \frac{2\pi q^2 N(\omega_0^2 - \omega^2)}{m(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2 \omega^2}, \quad (1.5)$$

$$k = \frac{2\pi q^2 N\gamma\omega}{m(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2 \omega^2}. \quad (1.6)$$

Мнимая часть показателя преломления характеризует поглощение. Подставив комплексный показатель преломления в выражение для функции, описывающей плоскую монохроматическую волну, получим

$$f(x,t) = A \exp(-i\omega t + k_0 \tilde{n} x) = A \exp(-i\omega t + k_0 n x - k_0 k x), \quad (1.7)$$

учитывая, что интенсивность волны $I = |f|^2$, а $k_0 = 2\pi/\lambda$ – волновое число, и сопоставив это с известным законом Бугера $I = I_0 \exp(-\mu_a x)$, получим, что коэффициент поглощения

$$\mu_a = 4\pi k / \lambda. \quad (1.8)$$

В использовании вышеприведенных формул (1.5), (1.6) и (1.7) для задач диагностики различают 2 случая:

а) работа вблизи линии поглощения – аномальная дисперсия

При просвечивании объекта излучением на частоте ω , близкой к одной из линий поглощения компонент объекта, имеющей частоту ω_0 , вклад всех других компонент в значения n , k пренебрежимо мал, а выражения (1.5), (1.6) можно преобразовать:

$$n = 1 + \frac{2\pi q^2 N (\omega_0^2 - \omega^2)}{m((\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2 \omega^2)}, \quad (1.9)$$

$$\mu_a = \frac{2\pi q^2 \gamma \omega N}{m((\omega_0^2 - \omega^2) + \gamma^2 \omega^2)}. \quad (1.10)$$

На этих известных формулах, описывающих резонансное поглощение и аномальную дисперсию, основаны методы определения числа поглощающих атомов N .

б) работа вдали от линий поглощения – нормальная дисперсия

Поглощение здесь не учитывается $k=0$ и в знаменателе (1.5) можно пренебречь вторым слагаемым, так как $\omega_0^2 - \omega^2 \gg \gamma^2$, тогда формула (1.5) описывает нормальную дисперсию и примет вид [50]:

$$n = 1 + \frac{2\pi q^2 N}{m(\omega_0^2 - \omega^2)}. \quad (1.11)$$

Для определения показателя преломления, зависящего от длины волны, обычно используют формулу дисперсии Зельмейера [27]. В общем виде формулу можно записать следующим образом:

$$n(\lambda) = \sqrt{1 + \sum_j \frac{A_j * \lambda^2}{\lambda^2 - B_j}}, \quad (1.12)$$

где A_j и B_j - эмпирические константы. Эта форма является относительно простой физической моделью с затухающими осцилляторами, приводимыми в движение световым полем.

Для описания дисперсионной зависимости формула Зельмейера может быть записана в виде:

$$n^2 = 1 + \frac{A1 * \lambda^2}{\lambda^2 - B1} + \frac{A2 * \lambda^2}{\lambda^2 - B2}, \quad (1.13)$$

где $A1$, $A2$, $B1$, $B2$ – эмпирические константы.

Уравнения Зельмейера очень полезны, так как позволяют довольно точно описать оптическую дисперсию с помощью всего нескольких коэффициентов. Формула Зельмейера может быть применена для описания хроматической дисперсии вещества. Это включает в себя частотные производные, которые могут быть определены аналитически даже для формул Зельмейера для высоких порядков дисперсии, тогда как численное дифференцирование на основе табличных данных имеет чувствительность к шумам.

Другим частым применением формулы дисперсии Зельмейера является расчет конфигураций фазового согласования для нелинейного преобразования частоты. Здесь часто важно иметь данные коэффициентов Зельмейера, которые справедливы для широкого диапазона длин волн.

В литературе встречается большое разнообразие модифицированных уравнений Зельмейера, которые также часто называют формулами Зельмейера. Данные формулы помогают расширить спектральный диапазон применимости и дают возможность учитывать температурную зависимость показателя преломления [28, 29]. Это может быть важно, например, для расчета конфигураций согласования фаз для нелинейного преобразования частоты.

Преобразования формулы (1.12) приводят к формуле Коши [30]:

$$n = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4} \dots \quad (1.14)$$

где A , B , C – эмпирические константы.

Например, для воды формула Коши приобретает вид:

$$n(\lambda) = 1.3199 + \frac{6878}{\lambda^2} - \frac{1.132 \cdot 10^9}{\lambda^4} + \frac{1.11 \cdot 10^{14}}{\lambda^6}. \quad (1.15)$$

1.1.2 Зависимость показателя преломления от молекулярного состава

Показатель преломления связан общими соотношениями с плотностью вещества объекта. Изменения плотности всегда сопровождаются изменениями показателя преломления. Проходя через пустоту, луч света не меняет своей предельной скорости. Если же на своём пути луч встречает атомы или молекулы вещества, его скорость замедляется и тем больше, чем больше плотность вещества.

Функциональную связь между плотностью и показателем преломления можно выразить следующим уравнением [24, 30, 31]:

$$f(n) = r\rho, \quad (1.16)$$

где ρ – плотность вещества и r – постоянный коэффициент, характерный для данного вещества и именуемый удельной рефракцией.

Проведенная Гладстоном и Дейлом, а затем Ландольтом экспериментальная проверка показала, что опытным данным больше соответствует уравнение:

$$r = (n - 1) / \rho, \quad (1.17)$$

получившее название формулы Гладстона - Дейла [24, 31].

Интересно отметить, что очень простое обоснование формулы Гладстона – Дейла было дано ещё в 1889г. Оно заключается в следующем: скорость света, проходя единицу длины пути в веществе, испытывает замедление, равное $\Delta t = \frac{1}{v} - \frac{1}{v_0}$, где v_0 – скорость света в вакууме. Это

замедление будет пропорционально плотности вещества

$$\Delta t = k \rho. \quad (1.18).$$

Умножая обе части равенства на скорость света v_0 , получаем

$$\frac{v_0}{v} - 1 = v_0 k \rho \quad \text{или} \quad v_0 k = r, \quad (1.19)$$

$$(n - 1) / \rho = r, \quad (1.20)$$

то есть формулу Гладстона - Дейла [24, 31].

Средние величины показателей преломления для органических веществ лежат в пределах от 1.3 до 2.5 [32, 33, 34].

Для большинства органических жидкостей повышение температуры на 1°C вызывает уменьшение показателя преломления на $4,5 \cdot 10^{-4}$. Обычные колебания давления сопровождаются незначительными изменениями показателя преломления вещества. Так, например, при повышении давления на 1атм показатель преломления увеличивается в среднем на $3 \cdot 10^{-5}$.

Для идеальных систем правило аддитивности показателя преломления может быть выражено следующим уравнением [24, 31]:

$$f(n) = \sum_i f(n_i) V_i, \quad (1.21)$$

где V_i – объемные доли компонентов, а $f(n_i)$ – некоторая функция показателя преломления.

Для двухкомпонентного раствора формулу аддитивности можно записать в следующем виде:

$$f(n) = f(n_1) V_1 + f(n_2) V_2, \quad (1.22)$$

где V_1 и V_2 – объемные доли компонентов 1 и 2, а $f(n)$ – некоторая функция показателя преломления.

В большинстве случаев функция $f(n)$ хорошо аппроксимируется выражением [24, 31]:

$$f(n) = n - 1, \quad (1.23)$$

соответствующем формуле Гладстона – Дейла и тогда уравнение примет следующий вид:

$$nV = n_1V_1 + n_2V_2. \quad (1.24)$$

В этом случае имеется линейная зависимость, и объёмные доли можно заменить любыми пропорциональными им единицами концентрации, например [24, 31]:

$$n = n_2 + \frac{(n_1 - n_2)\rho}{\rho_1}, \quad (1.25)$$

где ρ – плотность растворителя, ρ_1 – плотность растворённого вещества.

В некоторых случаях концентрацию раствора удобнее выразить в молярных единицах, чем в весовых процентах [24, 31]:

$$v_0 = k(n_1 - n_2), \text{ где } k = \frac{1000\rho_1}{M_1(n_1 - n_2)}, \quad (1.26)$$

где n_1 и n_2 – показатель преломления компонентов, ρ_1 – плотность, M_1 – молекулярный вес.

В рефрактометрическом анализе разведенных растворов часто применяют уравнение [24, 31]:

$$C = (n - n_0)/K \text{ или } n(C) = n_0 + C * K, \quad (1.27)$$

где C – концентрация растворенного вещества (г/дл), n – показатель преломления раствора, n_0 – показатель преломления растворителя, K – удельный инкремент показателя преломления вещества, то есть величина прироста показателя преломления при увеличении концентрации раствора на 1% [24].

1.1.3 Зависимость показателя преломления от температуры

Исследование температурной зависимости показателя преломления является одной из фундаментальных задач физической оптики. Долгое время решение данной проблемы было ограничено измерением полной производной показателя преломления по отношению к температуре. Как правило, зависимость показателя преломления для различных термодинамических параметров выражается производной по отношению к этим параметрам. Температурную зависимость можно представить в следующем виде [35]:

$$n(T) - n_0 = \int \left\{ -\alpha(T)\rho \left(\frac{\partial n}{\partial \rho} \right)_T + \left(\frac{\partial n}{\partial T} \right)_\rho \right\} dT, \quad (1.28)$$

где n_0 – показатель преломления при некоторой фиксированной температуре, $\alpha(T)$ – коэффициент теплового расширения, а ρ – плотность вещества.

Сумма под знаком интеграла и есть полная производная dn/dT . Первое слагаемое суммы обусловлено эффектом теплового расширения, а второе является температурной зависимостью молекулярной поляризуемости [35, 36].

В первом приближении зависимость показателя преломления от температуры можно представить формулой:

$$n(T) = n_0 + \frac{dn}{dT}T. \quad (1.29)$$

Однако, знание только полной производной часто недостаточно. Так, например, если одно из слагаемых подынтегрального выражения (1.28) неизвестно, то невозможно установить соотношение между величиной Δn измеренной экспериментально и изменением температуры ΔT в случае, когда ΔT зависит от пространственных координат. В таком случае возникают термоупругие напряжения, но поскольку краевыми эффектами можно пренебречь, то коэффициент теплового расширения α можно заменить на эффективный коэффициент теплового расширения

$$\alpha_{eff} \approx \alpha \frac{1+\nu}{3(1-\nu)}, \quad (1.30)$$

где ν - коэффициент Пуассона. Поэтому невозможно определить ΔT по измеренному значению Δn и известной производной dn/dT .

При прохождении лазерного пучка через конденсированную среду в нем возникает дополнительная рефракция из-за нагрева вещества в результате поглощения энергии света. Это явление было использовано в качестве инструмента исследования в работе [37, 38]. Авторами был предложен метод для измерения малого локального коэффициента поглощения, который основан на высокоскоростных интерферометрических измерениях изменения показателя преломления. С другой стороны, в большинстве случаев явление рефракции приводит к появлению нежелательных нелинейных эффектов, таких как самофокусировка и дефокусировка [38]. В любом случае изменение показателя преломления определяется в соответствии с формулами (1.28) и (1.29), или для кратковременного действия, согласно формуле (1.29) с учетом временной зависимости ρ в случае нестационарного процесса. Очевидно, что для правильного решения описанной выше задачи необходимо знать каждое слагаемое под знаком интеграла в выражении (1.28).

1.1.4 Основные методы измерения действительной части показателя преломления в широком спектральном диапазоне

Существует более 20 методов определения действительной части комплексного показателя преломления в широком диапазоне длин волн. Однако, в настоящее время не существует экспериментального метода, который можно было бы использовать для оценки дисперсии, в том числе биологических сред, напрямую или посредством прямого расчета по измеренным спектрам. Обычно показатель преломления тканей измеряют экспериментально на дискретных длинах волн, используя различные методы [1]. К самым известным из них, применяемым в биофотонике, можно отнести следующие:

1. Методы, позволяющие определять показатель преломления при помощи микроскопа.

а) Метод иммерсионной рефрактометрии, который основан на принципе определения равенства показателей преломления микроскопического объекта и иммерсионной среды [24, 30]. С этой целью исследуемые микроскопические объекты помещают на предметное стекло, заливают жидкостью с известным показателем преломления и покрывают покровным стеклом. Меняя показатель преломления иммерсионной жидкости, добиваются полного равенства показателей преломления объекта и среды. Последнее устанавливается при помощи микроскопа.

Одной из наиболее трудных задач в иммерсионной рефрактометрии является подбор иммерсионных сред. Для обеспечения точности ± 0.001 действительный показатель преломления иммерсионной жидкости должен быть определен с точностью до нескольких единиц четвертого знака. При этом колебания температуры не должны превышать $\pm 1^\circ$.

б) Метод фазовых контрастов – наиболее чувствительный метод сравнения действительных показателей преломления объекта и среды под микроскопом [40]. При наблюдении иммерсионного препарата в фазовом контрасте частиц, показатель преломления которых отличается от показателя преломления иммерсионной жидкости, отклоняют световые лучи и создают дифракционные спектры в фокальной плоскости объектива. Поэтому даже при слабых различиях в показателе преломления среды и частиц последние будут казаться либо светлее ($n_{ч} < n_{ср}$), либо темнее ($n_{ч} > n_{ср}$) фона. При равенстве показателей преломления среды и частиц последние оптически исчезают. Указанная картина характерна для положительного фазового контраста. В случае отрицательного фазового контраста имеют место обратные отношения. Чувствительность метода определяется минимальным сдвигом фаз, который может быть выявлен.

Сдвиг фазы в градусах, как известно, определяется следующей формулой:

$$\Phi = (n_{об.} - n_{ср.}) \frac{360d}{\lambda}, \quad (1.31)$$

где d – толщина объекта, λ – длина световой волны в вакууме, $n_{об}$ и $n_{ср}$ – показатели преломления объекта и среды.

В случае выражения величины сдвига фазы в радианах формула соответственно принимает следующий вид:

$$\Phi = (n_{об} - n_{ср}) \frac{2\pi d}{\lambda}. \quad (1.32)$$

По величине вызываемого сдвига фазы биологические объекты принято делить на вызывающе малый ($\Phi < 45^\circ$), средний (Φ от 45 до 90°) и большой сдвиг фазы ($\Phi > 90^\circ$). Это деление условно, так как оно зависит не только от показателя преломления объекта, но и от его толщины и показателя преломления среды.

Как показал Барэр, наименьшая разность фаз, которая может быть обнаружена при помощи непоглощающей 90° фазовой пластинки, составляет в среднем около $\lambda/100$ [24]. Если принять толщину объекта равной 0.5 мкм, то минимальная разность показателей преломления объекта и среды 0.005 .

в) Метод интерференционной микроскопии преследует ту же цель, что и метод фазового контраста – наблюдение прозрачных сред. В отличие от фазового контраста интерференционный контраст создаётся при помощи интерферометра. Помещаемый в него исследуемый объект вызывает определенное изменение оптического пути лучей, проходящих через занимаемую им область.

Как показывает теоретический анализ, интерференционный контраст подобен фазовому. Однако интерференционный контраст более совершенный, чем обычный фазовый контраст [30]. В отличие от последнего он одинаково хорошо передает как плавные, так и резкие изменения оптической толщины. Поскольку распределение интенсивности в интерференционном изображении зависит от сдвига фазы, вносимого объектом, а не от его размеров, то эффект зоны действия здесь не наблюдается. Изображения прозрачных объектов в интерференционном контрасте свободны от ореолов, свойственных обычному фазовому контрасту. Однако важнейшим преимуществом интерференционной микроскопии является возможность измерения величины сдвига фазы, вызываемого объектом [30].

Сдвиг фазы представляет собой произведение толщины объекта (d) на разность показателей преломления объекта и среды [30]:

$$\Phi = (n_{об.} - n_{ср.})d, \quad (1.33)$$

или выражая сдвиг фазы в градусах [30]:

$$\Phi = (n_{об.} - n_{ср.}) \frac{360d}{\lambda}. \quad (1.34)$$

Таким образом, измерив сдвиг фазы, вызванный объектом, и зная толщину последнего и показатель преломления среды, можно определить показатель преломления объекта [30]:

$$n_{\text{об.}} = n_{\text{ср.}} + \Phi\lambda/360d. \quad (1.35)$$

г) Метод микрорефрактометрии [24]. Оптический принцип метода состоит в применении щелевой конденсорной диафрагмы и поглощающей решетки, помещаемой между объективом и окуляром микроскопа. При параллельном положении щели диафрагмы и линий решетки последние образуют решетчатый фон поля зрения. При исследовании какой-либо оптически неоднородной системы изображение линий искажается. В случае поля зрения, соответствующих нахождению объекта, наблюдается смещение линий. Зная величину этого смещения и показатель преломления среды (последний измеряют на обычном рефрактометре), можно определить показатель преломления объекта [24].

2. Фотометрический метод.

Измеряемыми величинами в данном случае служат мутность или светорассеяние. Для измерения этих величин могут быть использованы различные визуальные и фотоэлектрические приборы. Фотометрические методы позволяют определить среднее значение показателя преломления изучаемого объекта [24, 39, 40].

3. Для определения показателя преломления биологических тканей in vitro и in vivo применяют метод оптической когерентной томографии (ОКТ).

ОКТ является неинвазивным методом визуализации, обеспечивающим микроскопический томографический послойный анализ биологических образцов, путём измерения однократно рассеянного назад света, как функции глубины [41, 42, 43]. Поскольку ОКТ измеряет оптические задержки, все осевые расстояния являются оптическими расстояниями [44]. Глубина определяется с использованием принципа низкокогерентной интерферометрии, образец при этом помещается в предметное плечо интерферометра Майкельсона, а сканирующая оптическая линия задержки – в опорное плечо. Места обратного отражения локализуются с разрешением, соответствующим длине когерентности облучающего источника [45, 46]. Обычно системы ОКТ имеют продольное разрешение 5-20 мкм [43]. Изобретение и внедрение ОКТ типа спектральный радар позволило преодолеть ограничения ОКТ систем, работающих во временной области. Качество изображения и скорость визуализации были значительно улучшены с помощью регистрации спектра сигнала ОКТ с помощью спектрометра без привлечения продольного сканирования зеркала в опорном плече, поскольку в измеренном спектре содержится информация об амплитуде отраженного сигнала с определенной глубины. Точность метода при определении показателя преломления определяется длиной когерентности источника света и, как правило, составляет 0.01 – 0.001 [46, 47].

Следует учитывать, что из-за широкополосного источника света, используемого в ОКТ, он измеряет групповой показатель преломления объекта. Групповые и фазовые показатели преломления связаны между собой; однако в диспергирующих средах они различны. Одновременные измерения как фазового, так и группового показателя преломления и толщины образца возможны с использованием комбинации ОКТ и конфокальной микроскопии [48, 49] или низкокогерентной интерферометрии под разными углами падения, что позволяет измерять распределение показателя преломления по объему [50, 51].

4. Действительная часть комплексного показателя преломления может быть рассчитана с помощью измеренных коэффициентов отражения и пропускания.

Пропускание разбавленного раствора описывается законом Ламберта-Беера:

$$T' = \exp(-\mu_e d), \quad (1.36)$$

где μ_e - коэффициент экстинкции, d – толщина образца.

$$\mu_e = \mu_a + \mu_s, \quad (1.37)$$

где μ_a – коэффициент поглощения, μ_s – коэффициент рассеяния.

Так как рассеяние мало, то коэффициентом рассеяния, как правило, пренебрегают и $\mu_e = \mu_a$. Тогда формула Ламберта-Беера имеет вид:

$$T' = \exp(-\mu_a d). \quad (1.38)$$

Световой пучок частично отражается от поверхности и частично поглощается объектом. Отношение между амплитудами интенсивности отраженного и прошедшего пучка описывается формулой Френеля:

$$\frac{\tilde{E}}{\bar{E}} = \frac{\tilde{n}-1}{\tilde{n}+1} = \frac{n-1-ik}{n+1-ik}, \quad (1.39)$$

где \tilde{n} - комплексный показатель преломления (1.5);

где n – действительная и k – мнимая часть показателя преломления.

$$k = \frac{\mu_a \lambda}{4\pi}, \quad (1.40)$$

где μ_a - коэффициент поглощения и λ – длина волны.

Так как энергия пропорциональна квадрату амплитуды, то отражение может быть представлено как отношение $\frac{\tilde{E}_r^2}{\bar{E}_i^2}$, то есть

$$Rs = \frac{(n-1)^2 + k^2}{(n+1)^2 + k^2}. \quad (1.41)$$

Из формул следует, что действительная часть показателя преломления может быть рассчитана с помощью измеренных коэффициентов пропускания и отражения.

Точность данного метода составляет 0.001 [52].

5. Определение показателя преломления при помощи методов, в которых используется явление полного внутреннего отражения.

Принцип работы данного метода основан на определении критического угла полного внутреннего отражения, когда падающие световые волны полностью отражаются с углом преломления, близким к 90 градусам. Падающие световые волны с углами, превышающими критический угол, испытывают полное отражение на поверхности раздела сред, а преломление не наблюдается.

Образец с измеряемым показателем преломления приводится в оптический контакт с эталонной призмой из материала с высоким и заранее точно измеренным показателем преломления. Свет может направляться как со стороны образца, так и со стороны призмы. В обоих случаях в определённом (очень узком) интервале углов падения пучка лучей на границу раздела образца и призмы в поле зрения наблюдательной зрительной трубы появится чёткая граница, разделяющая тёмный и светлый участки поля. Один из участков (тёмный при освещении со стороны образца, светлый при освещении со стороны призмы) соответствует лучам, претерпевающим полное внутреннее отражение, а граница этого участка — предельному, или критическому, углу падения луча.

Измерение показателя преломления твердых и жидких веществ может быть выполнено на дискретных длинах волн с использованием установки полного внутреннего отражения. В подобной установке, представленной на Рисунке 1.1, можно использовать лазеры с различными длинами волн в широком спектральном диапазоне для вычисления показателя преломления образца на этих длинах волн [10, 15, 53, 54, 55, 56].

В установке на Рисунке 1.1 равносторонняя призма с прикрепленным к ней образцом ткани помещается на вращающийся столик. Лазер направляется на одну из поверхностей призмы, и после отражения от границы раздела призма/образец луч выходит через третью поверхность призмы, где для сбора сигнала размещается детектор, подключенный к электрическому мультиметру. Точность метода полного внутреннего отражения при использовании лазерного источника света достигает от 0.0001 до 0.000001 (в зависимости от разрешаемой способности прибора) [10, 15, 53, 54, 55, 56].

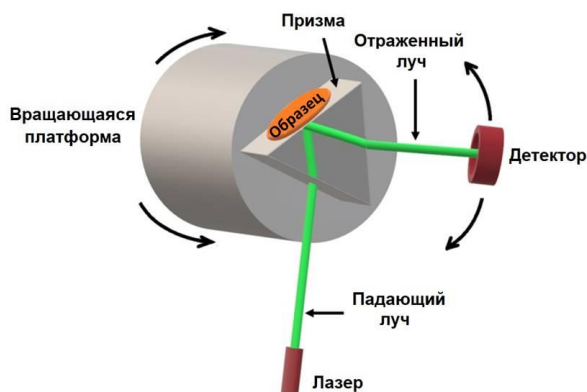


Рисунок 1.1 - Установка для измерений показателя преломления на основе метода полного внутреннего отражения с использованием лазера [25]

6. Также для измерения показателя преломления биологических сред применяется метод внутрирезонаторной лазерной рефрактометрии.

Обычно данный метод выбирается для измерения показателя преломления компонентов крови, гемоглобина и других биологических жидкостей, наиболее часто при экспериментальных исследованиях биологических сред используют двух-частотный лазер, He-Ne лазер ($\lambda = 0.63 \mu\text{м}$), с фазовой анизотропией внутри резонатора. Метод обладает быстротой и высокой точностью, позволяет измерять показатель преломления до 0.00001 [6, 30, 45, 57].

7. Метод измерения показателя преломления прозрачных жидкостей, основанный на законе Снеллиуса и лазерной спекл-корреляции [58].

В недавних работах было продемонстрировано создание доступного устройства, измеряющего небольшие изменения показателя преломления путем измерения изменений спекл-картины объектива, возникающего из-за изменения лазерного излучения, проходящего через жидкий раствор, что вызвано кажущимся сдвигом точечного источника. Важной особенностью этого надежного метода является возможность измерения показателя преломления с достаточной точностью 0.00038 со средней ошибкой менее 4,5% [58].

8. Метод Крамерса-Кронинга, основанный на измерении мнимой части показателя преломления биологических объектов.

Альтернативный метод, основанный на расчете показателя преломления как суммы абсорбционных вкладов воды и других компонентов ткани, являющихся основными

рассеивателями, основан на соотношениях Крамерса-Кронига [8, 59]. Такой метод широко используется в различных твердых, жидких и газообразных веществах для расчета действительной части показателя преломления через его мнимую часть [60]. Соотношения Крамерса-Кронига представляют собой математические преобразования, связывающие действительную ($n(\lambda)$) и мнимую ($\kappa(\lambda)$) части показателя преломления ($\tilde{n}(\lambda)$) [8].

Такие соотношения могут быть выражены как [8]:

$$n(\lambda) - 1 = + \frac{2}{\pi} \int_0^{\infty} \frac{\lambda}{\Lambda} \cdot \frac{\lambda}{\Lambda^2 - \lambda^2} \kappa(\lambda) d\Lambda, \quad (1.42)$$

$$\kappa(\lambda) = + \frac{2}{\pi} \int_0^{\infty} \frac{\lambda}{\Lambda^2 - \lambda^2} n(\lambda) d\Lambda, \quad (1.43)$$

где Λ - интегрирующая переменная в рассматриваемом спектральном диапазоне длин волн, а λ - фиксированная длина волны в этом диапазоне, которую можно настроить для лучшей корректировки расчетной дисперсии. Из уравнений (1.42) и (1.43), мы видим, что $n(\lambda)$ является преобразованием $\kappa(\lambda)$, и наоборот. Независимо от этой трансформирующей связи между действительной и мнимой частями показателя преломления, расчет $n(\lambda)$ для ткани может быть выполнен, если в уравнении (1.42) $\kappa(\lambda)$ заменяется следующим выражением [8]:

$$\kappa(\lambda) = \frac{\mu_a(\lambda)\lambda}{4\pi} \quad (1.44)$$

где $\mu_a(\lambda)$ — зависимость коэффициента поглощения ткани от длины волны, которая может быть рассчитана различными методами. Один из простейших методов получения $\mu_a(\lambda)$ состоит в прямом вычислении из спектральных измерений полного пропускания (T_t) и полного отражения (R_t), полученных для образца толщиной d [61]:

$$\mu_a(\lambda) = [1 - (T_t(\lambda) + R_t(\lambda))]/d. \quad (1.45)$$

В большинстве тканей объемное содержание воды очень велико ($>70\%$), но в диапазоне длин волн от 200 до 1000 нм водопоглощение значительно меньше по сравнению с поглощением других компонентов ткани [8, 59]. Однако, для $\kappa(\lambda)$ можно записать другое выражение, куда добавляются вклады воды и рассеивателей для мнимой части показателя преломления [59]:

$$\kappa(\lambda) = \kappa_{\text{scat}}(\lambda) + \kappa_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda). \quad (1.46)$$

Используя это отношение в уравнении (15) действительную часть показателя преломления можно выразить как [8, 59]:

$$n(\lambda) = 1 + \frac{2}{\pi} \int_0^{\infty} \frac{\lambda}{\Lambda} \cdot \frac{\lambda}{\Lambda^2 - \lambda^2} \kappa_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda) d\Lambda + \frac{2}{\pi} \int_0^{\infty} \frac{\lambda}{\Lambda} \cdot \frac{\lambda}{\Lambda^2 - \lambda^2} \kappa_{\text{scat}}(\lambda) d\Lambda, \quad (1.47)$$

где первые два члена представляют собой показатель преломления воды, а последний член представляет вклад рассеивателей ткани, которые содержат в себе информацию об

основных полосах поглощения в ткани. Следовательно, уравнение (1.47) можно переписать в виде [59]:

$$n(\lambda) = n_{\text{H}_2\text{O}} + \frac{2}{\pi} \int_0^{\infty} \frac{\lambda}{\Lambda} \frac{\lambda}{\Lambda^2 - \lambda^2} \kappa_{\text{scat}}(\lambda) d\Lambda . \quad (1.48)$$

Поскольку в спектральном диапазоне от 200 до 1000 нм основные полосы поглощения тканевых хромофоров идентифицируются в $\mu_a(\lambda)$, мы можем заменить $\kappa_{\text{scat}}(\lambda)$ в уравнении (1.48) выражением в уравнении (1.44) для расчета дисперсии ткани.

Метод расчета дисперсии с помощью соотношений Крамерса-Кронинга достаточно надежен и позволяет получить полную информацию о зависимости показателя преломления ткани от длины волны от глубокого ультрафиолетового до БИК. Однако для применения данного метода необходимы данные о показателе преломления для некоторых дискретных длин волн в пределах желаемого спектрального диапазона, поскольку в процессе расчета по методу Крамерса-Кронинга длину волны в уравнении (1.48) необходимо скорректировать так, чтобы расчетная дисперсия совпадала с экспериментальными данными. Тем не менее, такие измерения всегда возможны с помощью описанного метода, который позволяет оптимизировать и проверить расчет дисперсии с помощью соотношений Крамерса-Кронинга.

1.2 Рефрактометрия биологических сред в широком диапазоне длин волн

Показатель преломления является одной из главных оптических характеристик биологических сред, который требует оценки в широком спектральном диапазоне, поскольку дисперсия ткани также предоставляет важную информацию, которая может быть использована для характеристики показателей преломления компонентов ткани [3], для количественной оценки рассеяния света на отдельных длинах волн через относительный показатель преломления [3, 25], или дифференцировать патологические ткани [62, 63].

1.2.2 Биологические среды и ткани, их физико-химические свойства

Совокупность клеток и межклеточного вещества, сходных по происхождению, строению и выполняемым функциям принято называть биологической тканью. В биологии выделяют 4 основных группы тканей: эпителиальную, соединительную, мышечную, нервную. Однако при проведении научных исследований наиболее уместно использование понятия «биологическая среда» – это совокупность взаимосвязанных, взаимодействующих, взаимовлияющих функциональных систем однородного типа, которую можно описать комплексом статистически стабильных медико-биологических показателей. Примерами таких показателей для

человеческого организма могут быть температура внутренних органов, частота сердечных сокращений, давление крови, концентрация сахара в крови и т. д. [64].

Эпителиальную ткань (эпителий) образует слой клеток, из которых состоят покровы тела и слизистые оболочки всех внутренних органов и полостей организма и некоторые железы. Основной функцией эпителиальной ткани является обмен веществ между организмом и окружающей средой. В эпителиальной ткани клетки очень близко прилегают друг к другу, из-за чего межклеточного вещества имеется малое количество. Различают несколько видов эпителия – кожный, кишечный, дыхательный.

Особенностью соединительной ткани, к которой относятся кровь, лимфа, хрящевая, костная, жировая ткани, является большое содержание межклеточного вещества.

Кровь и лимфа состоят из жидкого межклеточного вещества и плавающих в нем клеток крови – форменных элементов. Эти ткани обеспечивают связь между организмами, перенося различные газы и вещества. С оптической точки зрения цельная кровь представляет собой высококонцентрированную мутную среду и состоит из плазмы (55%-ов объема) и кровяных телец (45%-ов), 99%-ов которых составляют эритроциты и 1% лейкоциты и тромбоциты. Вследствие этого, оптика цельной крови в нормальных физиологических условиях определяется главным образом оптическими свойствами эритроцитов и плазмы, а влиянием на светорассеяние остальных форменных элементов крови можно пренебречь [45]. Так как большинство видов ткани человека содержат кровь, было предпринято много теоретических и экспериментальных исследований с целью предсказания и определения ее оптических свойств. Слэр был первым, кто сообщил (1700 г.) о том, что кровь изменяет свой цвет при контакте с воздухом, а Ангстрем первым (1855 г.) использовал спектрофотометрию для изучения спектральных характеристик крови. Полосы поглощения оксигемоглобина и гемоглобина в видимой спектральной области были исследованы Хопп-Зилером в 1862 г. Сорэ в 1878 г. описал оптические свойства гемоглобина в ультрафиолетовом диапазоне. В 1873 г. Виерордт изобрел способ определения содержания гемоглобина в образцах крови. С того времени оптическим свойствам производных гемоглобина и цельной крови были посвящены многочисленные исследования [45].

Жировая ткань - также разновидность соединительных тканей. Она входит в группу соединительных тканей со специальными свойствами. Принято выделять два вида жировой ткани: белую и бурую, которые различаются по цвету, распределению в организме, метаболической активности, строению образующихся их клеток (адипоцитов) и степени кровоснабжения [65].

Белая жировая ткань состоит из отделенных друг от друга прослойками рыхлой соединительной ткани долек, образованных адипоцитами [66]. Адипоциты - крупные

(диаметром от 25-50 до 150-250 мкм) клетки сферической формы, которые в жировых дольках, плотно прилегая друг к другу, нередко приобретают форму многогранников. Ядро адипоцита уплощено и смещено к краю клетки вместе с тонким ободком окружающей его цитоплазмы. Оно содержит умеренно конденсированный хроматин. Размеры жировых долек в белой жировой ткани гиподермы прямо пропорциональны степени выраженности этой ткани. В соединительнотканых прослойках находятся кровеносные и лимфатические сосуды и нервные волокна, которые проникают вглубь долек. Кроме адипоцитов, в белой жировой ткани встречаются и другие клетки: преадипоциты, фибробласты, макрофаги, лейкоциты, тучные клетки и др. [65, 66].

Распределение жировой ткани в организме неравномерно: она образует скопления, которые подразделяются на поверхностные и глубокие. Поверхностные скопления располагаются преимущественно подкожно и образуют гиподерму (слой подкожной жировой клетчатки - от греч. *huro* - под и *derma* - кожа). Глубокие (висцеральные) скопления белой жировой ткани сосредоточены в области сальника, брызжейки кишки, в забрюшинном пространстве. В ходе развития размер отдельных адипоцитов увеличивается в 7-10 раз, а масса всей жировой ткани - в 300-1000 раз.

Хотя адипоциты занимают основную часть объема жировой ткани, они составляют, по разным оценкам, лишь 20-60%-ов числа ее клеток. Остальная часть приходится на клетки-предшественники адипоцитов, макрофаги, клетки сосудов и лейкоциты крови. Общее число адипоцитов в жировой ткани человека составляет $20-30 \cdot 10^9$ клеток. Химически жировая ткань на 60-80% представлена липидами, на 5-30%-ов - водой и на 2-3%-а белками [66].

Липиды разных классов существенно отличаются по структуре и функциям. Большинство липидов имеют в своём составе жирные кислоты [67]. В Таблице 1.1 выделены основные жирные кислоты в липидах человека.

Температура и теплота плавления химического соединения зависят от того, как упакованы молекулы этого соединения в твердом кристаллическом состоянии. Чем прочнее эта упаковка, тем больше энергии надо затратить, чтобы «расшатать» кристалл, отделить молекулы друг от друга и получить, таким образом, из кристалла жидкость. Прочность упаковки молекул в кристалле зависит как от химического состава вещества, так и от геометрической формы молекул [67].

Жиры, содержащие преимущественно насыщенные кислоты, являются твёрдыми (говяжий, свиной жиры), а содержащие большое количество ненасыщенных кислот - жидкими. Жидкие жиры или масла обычно имеют растительное происхождение [68]. В Таблице 1.2 приведены данные химического состава и температуры плавления свиного, крысиного и человеческого жиров.

Таблица 1.1 - Содержание жирных кислот и их характеристика в жировой ткани человека [69]

Жирная кислота	Химическая формула	Молекулярная масса, Да	Размер молекулы, нм	Показатель преломления	Температура плавления, (°C)	Содержание жирной кислоты в жировой ткани человека, %
Насыщенные жирные кислоты						
Миристиновая	C ₁₃ H ₂₇ COOH	228,36	0,8-1,6	1,4273 (70°C)	58	3
Пальмитиновая	C ₁₅ H ₃₁ COOH	256,42	0,9-1,8	1,4272	63	20
Стеариновая	C ₁₇ H ₃₅ COOH	284,47	1,0-2,0	1,4299	70	5
Ненасыщенные жирные кислоты						
Пальмитино-олеиновая	C ₁₅ H ₂₉ COOH	226,35	0,8-1,6	1,4360 (60°C)	-1	5
Олеиновая	C ₁₇ H ₃₃ COOH	282,45	1,0-2,0	1,4470 (60°C)	16	46
Линолевая	C ₁₇ H ₃₁ COOH	280,44	1,0-2,0	1,4690 (60°C)	-5	10

Низкотемпературные переходы в диапазоне 25–35°C связаны с легкоплавкими свободными жирными кислотами (СЖК), такими как олеиновая кислота. Для средней температуры около 40°C фазовые переходы определяются фосфолипидами клеточных мембран, тогда как для высокотемпературного диапазона (45–55°C) фазовые переходы определяются менее легкоплавкими СЖК капельки жира, такими как пальмитиновая кислота. В Таблице А1 (Приложение А) представлены данные для показателей преломления основных биологических сред, в том числе жировой ткани, измеренные разными методами.

Таблица 1.2 - Температуры плавления жиров свиньи, человека и крысы [70, 71, 72]

Вид жира	Температура плавления, °C	Содержание жирной кислоты, % (температура плавления, °C)				
		Пальмитиновая	Стеариновая	Олеиновая	Линолевая	Линоленовая
Жир свиньи	36-45	27 (63)	14 (70)	45 (16)	5 (-5)	5(-11)
Висцеральный жир человека	30-35	25 (63)	8 (70)	46 (16)	10 (-5)	-
Жир крысы	28-30	23 (63)	6 (70)	35 (16)	19 (-5)	2 (-11)

Большую долю всех тканей составляет мышечная ткань, которая образована мышечными волокнами. В их цитоплазме находятся тончайшие нити, способные к сокращению. Выделяют гладкую и поперечнополосатую мышечную ткань. Поперечнополосатой ткань называется потому, что ее волокна представляют собой чередование светлых и темных участков. Гладкая мышечная ткань входит в состав стенок внутренних органов (желудок, кишки, мочевого пузыря,

кровеносные сосуды). В свою очередь поперечнополосатая мышечная ткань подразделяется на скелетную и сердечную. Скелетная мышечная ткань состоит из волокон вытянутой формы, достигающих в длину 10–12 см. Сердечная мышечная ткань, так же как и скелетная, имеет поперечную исчерченность. Однако, в отличие от скелетной мышцы, здесь есть специальные участки, где мышечные волокна плотно смыкаются [66, 69].

В хрящевой ткани клетки крупные, межклеточное вещество упругое, плотное, содержит эластические и другие волокна. Её много в суставах, между телами позвонков [66, 69].

Костная ткань состоит из костных пластинок, внутри которых лежат клетки. Клетки соединены друг с другом многочисленными тонкими отростками. Костная ткань отличается твердостью [66, 69].

Условно все биологические ткани можно поделить на жидкие (кровь, лимфа, слизистые жидкости, синовиальная жидкость и т.д.), мягкие и твёрдые. Однако следует отметить, что разделение биосред на мягкие и твердые ткани весьма условно. В основу данного деления положен принцип, совмещающий в себе и механические, и биологические аспекты, а именно: к мягким тканям в таком случае относятся те, для которых упругие (обратимые) деформации могут быть велики (десятки и сотни процентов). Они действительно достигают таких значений в определенных естественных ситуациях. С этой точки зрения к мягким тканям, безусловно, относятся кожа, мышечная ткань, ткани легкого и мозга, стенки кровеносных сосудов, дыхательных путей, некоторые другие, а к твёрдым – кость и зуб. Промежуточное положение занимают суставной хрящ и сухожилие. Содержание воды в мягких тканях от 70-80% [66]. В Таблице 1.3 показано содержание воды в различных тканях крысы и человека [73, 74].

Таблица 1.3 - Содержание воды в биологических тканях крысы и человека [73, 74]

Биологическая среда	Объемная доля в тканях крысы (СО)*	Объемная доля воды в тканях человека
Кожа	0.651 (±0.007)	0.586-0.721
Легкие	0.790 (±0.004)	0.806
Мышечная ткань	0.756 (±0.003)	0.700-0.786
Жировая ткань	0.183 (±0.017)	0.114-0.305
Цельная кровь	-	0.790
Эритроциты	-	0.640
Плазма	-	0.919
Мозг	0.788 (±0.002)	
Серое вещество мозга	-	0.826
Белое вещество мозга	-	0.685
Почка	0.771 (±0.004)	0.723-0.805

*СО – стандартное отклонение.

1.2.2 Рефрактометрия прозрачных биологических сред

Особенностью прозрачных сред - тканей и биожидкостей, таких как плазма крови, интерстициальная жидкость, слизистые оболочки, роговица, хрусталик, стекловидное тело и некоторые другие, является высокая, почти полная светопрозрачность. Для измерения их показателя преломления можно использовать все известные методы, такие как методы, основанные на полном внутреннем отражении, отражательную спектроскопию и оптическую когерентную томографию. Следует учесть, что дисперсионная зависимость прозрачных тканей и биожидкостей в видимой и БИК спектральных областях определяется водой, как основным компонентом. Однако большое внимание при исследованиях уделяется точности измерений, так как часто величина показателя преломления для различных объектов отличается в тысячных и десятитысячных разрядах. Например, показатель преломления интерстициальной жидкости составляет 1.3585 для длины волны 589 нм [3]. Показатель преломления наиболее значимого белка плазмы - альбумина человека 35 г/л на длине волны 589 нм составляет 1.3401, 55 г/л – 1.3434 при измерении на многоволновом рефрактометре Аббе [75, 76].

1.2.2 Рефрактометрия биологических сред с высоким поглощением и рассеянием

Показатель преломления биологических сред в видимом спектральном диапазоне, преимущественно на длине волны 589 нм, может принимать значения от 1.332 для прозрачной цереброспинальной жидкости и до 1.75 для твердой зубной ткани, что показано на Рисунке 1.2.

Одной из самых главных тканей с сильным поглощением в видимой области является кровь. Известно, что оптические свойства крови важны не только для диагностического и терапевтического применения в лазерной медицине, но также для медицины в целом. Оптические свойства крови необходимы для численных методов вычисления распределения света в кровенасыщенных тканях, оптическая когерентная томография, флуоресцентная диагностика, диафаноскопия в БИК области спектра, фотодинамическая терапия и лазерная термотерапия. Они могут быть описаны с помощью оптических параметров: коэффициент поглощения μ_a , коэффициент рассеяния μ_s и фактор анизотропии g . В свою очередь данные характеристики определяются размерами эритроцитов, а так же действительной и мнимой частью комплексного показателя преломления ($\tilde{n}=n+ik$) рассеивающих частиц (эритроцитов) и окружающей их среды (плазмы крови) [45, 77].

Поглощающие свойства производных гемоглобина человека широко исследовались на протяжении более чем столетия. Коэффициенты экстинкции (молярные коэффициенты

поглощения) окси- и дезоксигемглобина хорошо известны для широкого спектрального диапазона от 390 до 1000 нм и показаны на Рисунке 1.3. Кюнштер и Норрис исследовали поглощающие свойства производных человеческого гемоглобина от 1000 до 2500 нм. Совершенно очевидно, что, начиная с 1200 нм, коэффициенты экстинкции этих растворов определяются спектром поглощения воды (физиологического раствора) [45].

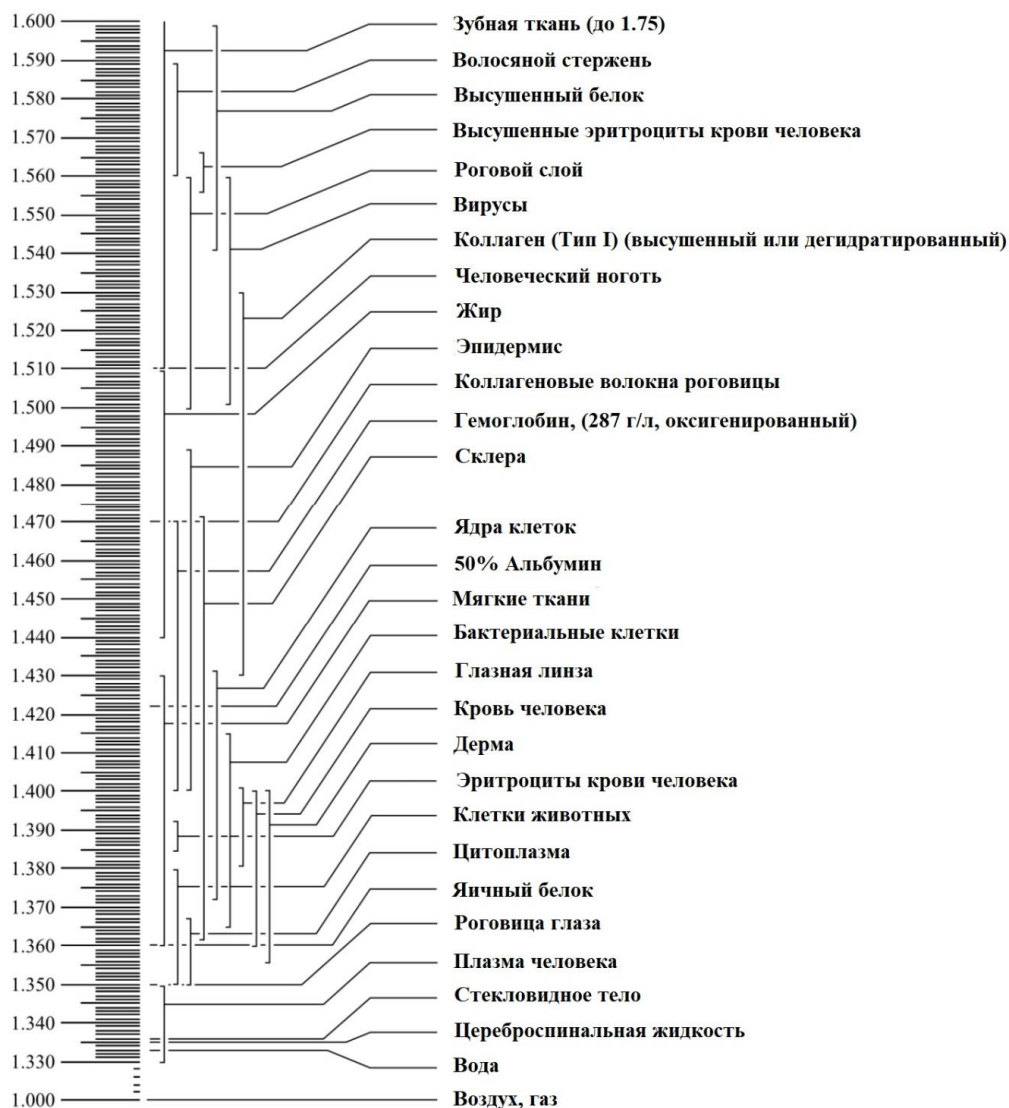


Рисунок 1.2 - Показатель преломления различных тканей и клеточных структур [34]

Две формы гемоглобина имеют хорошо известные различия в спектрах поглощения. Оксигенированная форма гемоглобина показывает два характерных максимума вблизи длин волн 540 нм и 577 нм, в то время как восстановленная форма гемоглобина характеризуется одним максимумом вблизи длины волны 556 нм. Кроме того, в этой спектральной области имеется 5 изобестических точек (502, 529, 545, 570 и 584 нм), где коэффициент не зависит от степени его оксигенации. Изобестические точки могут служить своеобразным репером, свидетельствующим об общей концентрации гемоглобина в крови биоткани: увеличение

поглощения в этих точках свидетельствует об увеличении концентрации гемоглобина и наоборот [78].

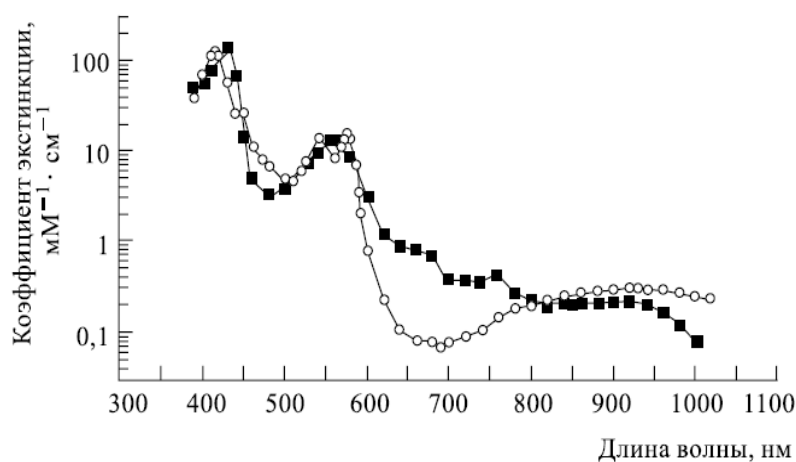


Рисунок 1.3 - Спектры поглощения в диапазоне 390-1000 нм дезокси- (квадраты) и оксигемоглобина (кружочки) [45, 77]

Коллективом Фрайбель и Менке был проведен эксперимент по определению действительной и мнимой части комплексного показателя преломления раствора гемоглобина с концентрацией близкой к физиологическим нормам (ранее уделялось внимание сильно разбавленным растворам). В ходе эксперимента было установлено, что мнимый показатель преломления сильно концентрированного раствора линейно коррелирует с коэффициентом поглощения, вычисленным по закону Ламберта – Беера. Действительная часть комплексного показателя может быть рассчитана с помощью коэффициентов пропускания и отражения и характеризуется наличием аномальной дисперсии в области поглощения. Полученные в ходе этого эксперимента зависимости представлены на Рисунках 1.4 и 1.5 [52].

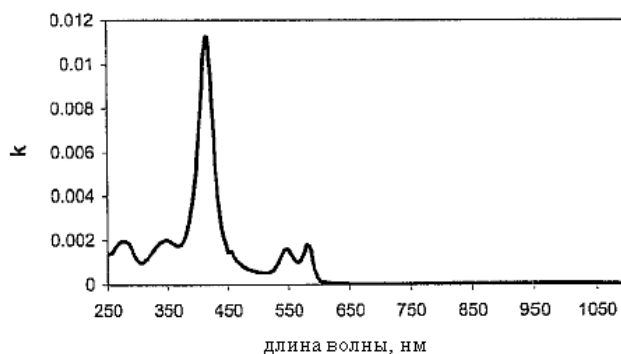


Рисунок 1.4 - Зависимость мнимой части комплексного показателя преломления раствора гемоглобина 287 г/л от длины волны [52]

На оптические свойства крови оказывает воздействие множество анатомических, физиологических и биохимических факторов. Поглощающие свойства крови в видимом и БИК спектральных диапазонах определяются, главным образом, уровнем насыщения гемоглобина кислородом и концентрацией гемоглобина в эритроцитах и плазме. Ее рассеивающие свойства зависят в большой степени от гематокрита, гемолиза и осмолярности. Температура и вязкость крови могут влиять на результаты измерений через изменение ее поглощения и свойств потока [45].

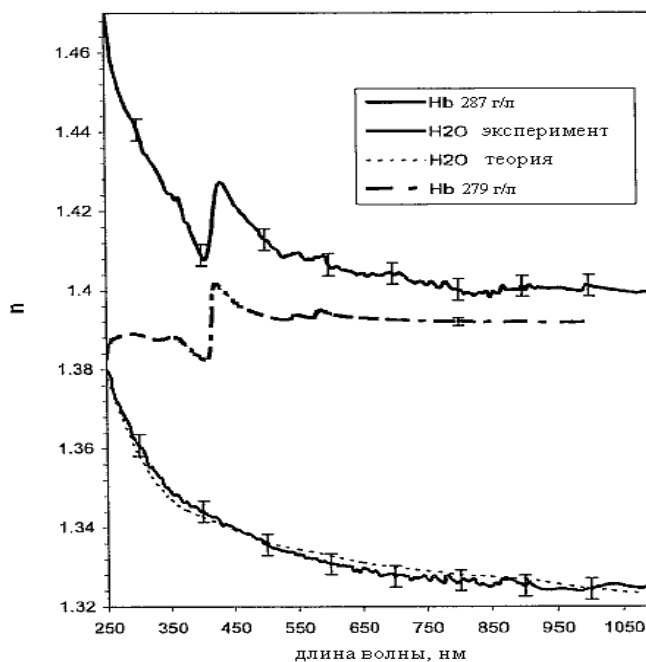


Рисунок 1.5 - Зависимость действительной части комплексного показателя преломления растворов гемоглобина и воды от длины волны [52]

Многие исследования были посвящены влиянию температуры на свойства эритроцитов. Так, Баар в своей работе показал исследование влияния эффектов высокой температуры на осмотические свойства эритроцитов. Было показано, что повышение температуры образцов цельной крови в течение 20 минут до $(+40)^{\circ}\text{C}$, $(+45)^{\circ}\text{C}$, $(+50)^{\circ}\text{C}$ и $(+55)^{\circ}\text{C}$ приводило к изменению осмотической резистентности эритроцитов, которое оценивалось по тесту лизиса. При достижении температуры $+50^{\circ}\text{C}$ были установлены различия в термочувствительности красных клеток. Менее всего были устойчивы к действию высокой температуры клетки «среднего возраста», т.е. те, которым предстояло жить в системе гемоциркуляции, как минимум, 2 месяца [14].

Нильсон и соавторы в своей работе исследовали влияние медленного нагрева на оптические свойства полностью насыщенной кислородом цельной крови на длине волны 633 нм (Рисунок 1.6). Диффузное отражение, полное пропускание и коллимированное пропускание измерялись при различных температурах с использованием метода двойной интегрирующей

сферы. Коэффициенты поглощения и рассеяния, а также фактор анизотропии рассеяния (в предположении фазовой функции Хеньи–Гринштейна) определялись с использованием обратного метода добавления–удвоения [79]. Для измерений цельная кровь собиралась в пробирки, содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA) для предотвращения коагуляции. Гематокрит исследованных образцов был равен $44 \pm 3\%$. Во время измерений кровь прокачивалась со скоростью 10,7 мл/мин. Проточная ячейка (длина 65 мм, высота 34 мм, полная толщина 2.5 мм) помещалась между интегрирующими сферами. Толщина образца крови в проточной ячейке была равна 0.48 ± 0.02 мм. Кровь подогревалась приблизительно от (+25) до (+55) °C со скоростью между 0.2 и 1.1 °C/мин. По мере нагрева крови непрерывно продолжались измерения с помощью интегрирующих сфер. Авторы обнаружили, что изменения в оптических свойствах крови из-за медленного нагрева были обратимыми до температур (+44.6)–(+46.6) °C. Коагуляция крови происходила приблизительно при (+55) °C.

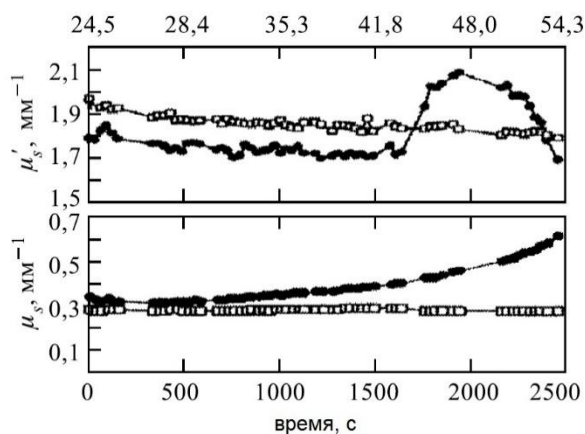


Рисунок 1.6 - Зависимости от температуры и времени коэффициента поглощения и приведенного коэффициента рассеяния не нагретой (белые квадраты) и нагретой (темные круги) цельной крови (гематокрит 44%, степень насыщенности кислородом 100%) [78, 79]

Научным коллективом Ванга показатель преломления раствора гемоглобина 4 ммоль/л при температурах от (+25) до (+80) °C был измерен методом полного отражения на длинах 532 и 632.8 нм. В работе был вычислен температурный инкремент показателя преломления как угол наклона наилучшей линейной аппроксимации. Авторы предположили, что одной из главных причин влияния температуры на показатель преломления биологических образцов является тепловое расширение. Зависимость показателя преломления раствора гемоглобина 4 ммоль/л от температуры показана на Рисунке 1.7 [80].

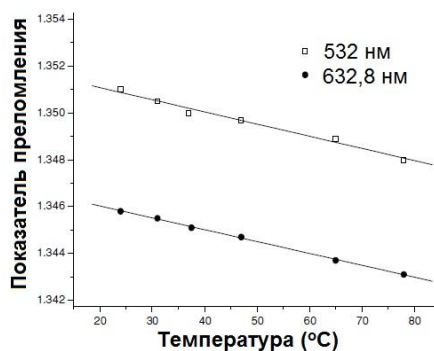


Рисунок 1.7 - Зависимость показателя преломления раствора гемоглобина 4 ммоль/л от температуры [80]

Харуна и соавторы для изучения оптических свойств биологической мембраны, в том числе изменение показателя преломления при повышении температуры, был применен метод низко-когерентной интерферометрии. Авторами было выявлено резкое изменение показателя преломления брыжейки крысы в диапазоне температур $(+38)$ - $(+42)^{\circ}\text{C}$, что хорошо согласуется с диапазоном температур для фазового перехода «гель-жидкость» для искусственной (двуслойной) мембраны, что продемонстрировано на Рисунке 1.8 [81].

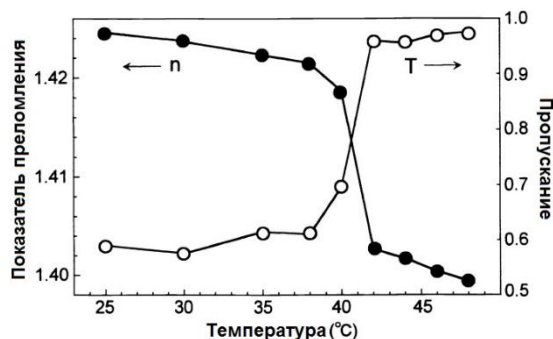


Рисунок 1.8 - Зависимость показателя преломления и пропускания брыжейки крысы от температуры с изображением фазового перехода «гель-жидкость» на интервале температур $(+38)$ - $(+42)^{\circ}\text{C}$ [81]

Особый интерес представляет изучение зависимости оптических параметров жировой ткани от температуры.

В настоящее время усиливается интерес к процессу денатурации гемоглобина и его конформационных изменениях при повышении температуры [82]. При нагревании молекул белка увеличение диссипативных сил происходит быстрее, чем гидрофобных, что вызывает денатурацию. Некоторые исследования показали, что наиболее сложные трансформации при повышении температуры претерпевает НбА [83, 84]. Исследования денатурации гемоглобина

при повышении температуры, с использованием методов дисперсии оптического вращения и двумерной ИК-спектроскопии, позволили выявить два тепловых перехода [85, 86, 87, 88, 89]. Смещение α – спирали при повышении температуры от (+30) до (+44) °С может указывать на то, что спиральные структуры гемоглобина становятся подвержены разрушению при повышении температуры [90].

Нелинейная зависимость кривых, полученных при вискозиметрическом исследовании гемоглобина позволила Глассеру и Клемену предположить, что наблюдаемое явление связано с трансформацией гемоглобина [91, 92]. Очевидно, явление было связано с чрезвычайно высокой энергией активации – 366.6 кДж/моль в интервале температур (+35)-(+38)°С в концентрированных растворах гемоглобина (50 г/дл) по сравнению с энергией 55.1-58.1 кДж/моль выявленной при более высоких и низких температурах, соответственно. Нелинейная зависимость может объясняться фазовыми переходами белка, что показано на Рисунке 1.9 [91].

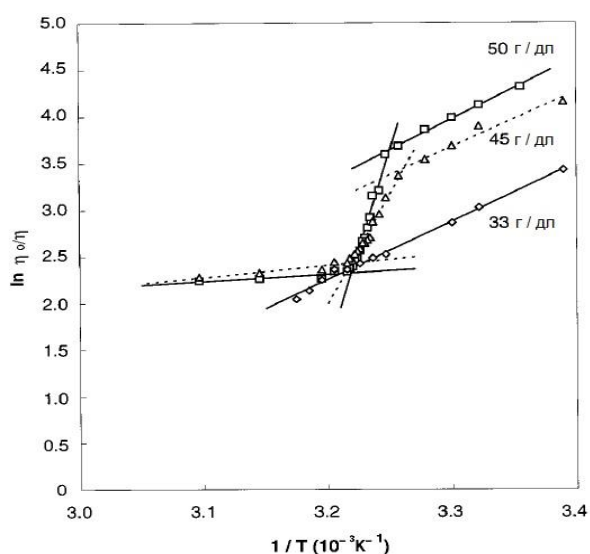


Рисунок 1.9 - Функция Арениуса участков вязкости человеческого гемоглобина, растворенного в физрастворе (концентрация гемоглобина - 33, 45 и 50 г/дл) [91]

Следует также отметить, что изменения вязкости наблюдаются в том же диапазоне температур, что показано научной группой Дигеля при применении метода кругового дихроизма в эксперименте с использованием растворов окси- и дезоксигемоглобина [93].

В нескольких научных работах метод CD-спектроскопии был использован для изучения общей структурной организации гемоглобина [94, 95, 96]. Хотя сигнал CD может показать степень агрегации и размер связанных частиц, но рассеяние света позволяет более точно определить размеры частиц белка. Таким образом, анализируя колебания рассеянного света можно получить информацию о размере гидродинамического радиуса.

В работе для изучения температурной зависимости показателя преломления гемоглобина был применен рефрактометрический метод на длинах волн 930 и 1100 нм. В результате были установлены особые точки вблизи температуры $(+37)^{\circ}\text{C}$, что может соответствовать фазовому переходу [97].

Эти исследования стали предпосылкой для появления вопросов о физиологических и биофизических механизмах, участвующих при фазовых переходах в молекуле гемоглобина во время повышения температуры. Необходимо отметить тот факт, что температура фазового перехода человеческого гемоглобина, наблюдаемая при нормальной температуре тела в работах [91, 93], вероятно, может быть связана с физиологической температурой, что продемонстрировано на Рисунке 1.10.

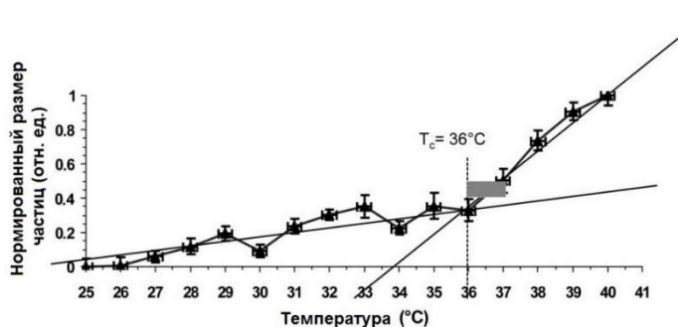


Рисунок 1.10 - Частичное изменение размера частиц при изменении температуры для растворов оксигемоглобина [93]

В литературе имеется информация о том, что структурный переход гемоглобина приводит к частичной гидратации, а физиологический смысл критической температуры может быть связан с изменением водного баланса. Конкретные механизмы подобного температурно-индуцированного обезвоживания не выявлены, однако Камерон и Аросио и соавторы в своих работах предположили, что конформационные изменения молекул гемоглобина приводят к истончению гидратной оболочки [98, 99]. Хорошо известно, что отдельные центры окружены молекулами воды, которые образуют, кроме того и водные мостики между гидратационными областями, принадлежащими отдельным центрам. В результате образуется сплошная гидратационная «кружевоподобная» оболочка, соединяющая отдельные полярные группы. Гидратная оболочка на поверхности глобулы включает молекулы воды, принадлежащие локальным центрам гидратации. Время жизни слабосвязанных молекул воды в такой гидратной оболочке не велико 10^{-11} - 10^{-10} с, но около центра оно намного больше 10^{-6} с. Молекулы воды в первичном прочном слое образуют друг с другом в среднем не менее двух-трех водородных связей. В целом около поверхности белка может удерживаться до двух-трех слоев воды, многослойной «шубы» кристаллизационной воды при этом не образуется. Прочно связанная вода составляет около 10% от массы биополимеров и характеризуется большими временами

жизни 10^{-3} - 10^{-7} с [64]. Согласно другой теории вода необходима для агрегации молекул белка при нагревании.

Несмотря на многочисленные исследования в оптике биотканей, оптические параметры жировой ткани в широком диапазоне длин волн остаются в настоящее время изученными недостаточно. Следует отметить, что в литературе можно найти много информации по значениям показателя преломления прозрачных сред технического происхождения при различных внешних условиях и для различных длин волн, однако абсолютно недостаточно данных для биологических сред, тканей и жидкостей.

Исследование оптических характеристик жировой ткани в широком диапазоне длин волн и температур представляют интерес и для многих областей современной медицины, в частности дерматологии при фотодинамической терапии подкожных новообразований, в том числе злокачественных, и учитывая схожесть структурно-морфологических свойств жировых тканей, в онкологии при диагностике и лечении рака молочной железы [100].

Форма спектра поглощения в видимом диапазоне длин волн определяется полосами поглощения гемоглобина крови, локализованного в кровеносных капиллярах жировой ткани, и спектральной зависимостью коэффициента рассеяния. В инфракрасном диапазоне форма спектра поглощения определяется полосами поглощения воды, липидов и протеинов внутриклеточного матрикса.

На Рисунке 1.11 в спектре хорошо видны полосы поглощения деоксигемоглобина крови (425 и 555 нм), воды (1424 и 1927 нм) и липидов (1724 и 1759 нм).

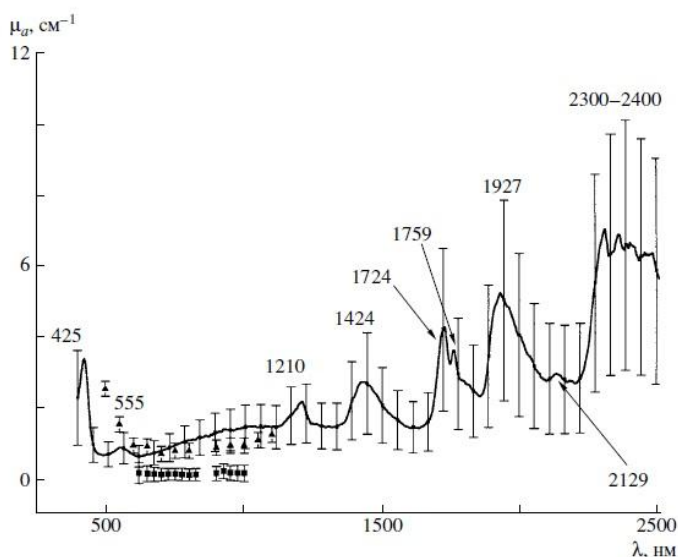


Рисунок 1.11 - Спектральная зависимость коэффициента поглощения подкожной жировой ткани, рассчитанная по экспериментальным данным с помощью инверсного метода «добавления-удвоения» (сплошная линия). Вертикальные линии показывают среднеквадратичное отклонение. Числами и стрелками отмечены максимумы полос поглощения [101]

Полоса поглощения с максимумом на 1210 нм представляет собой комбинацию полос поглощения воды с максимумом поглощения на 1197 нм и липидов с максимумом 1212 нм. В области 2300- 2400 нм наблюдаются многочисленные полосы поглощения протеинов внутритканевого матрикса [101].

Никитиным и соавторами изучена зависимость амплитуды оптоакустического сигнала от температуры для образцов свиной жировой ткани при нагревании и остывании от (+25) до (+80)°С [23]. На Рисунке 1.12 в случае охлаждения образцов от температуры (+36)°С можно отметить, что наклон зависимостей становился более пологим по сравнению с тем, который наблюдался при нагреве. Это может свидетельствовать о модификации жировой ткани, при температурах, превышающих температуру живого организма, и может быть связано с температурно-индуцированным липолизом жировых клеток [23].

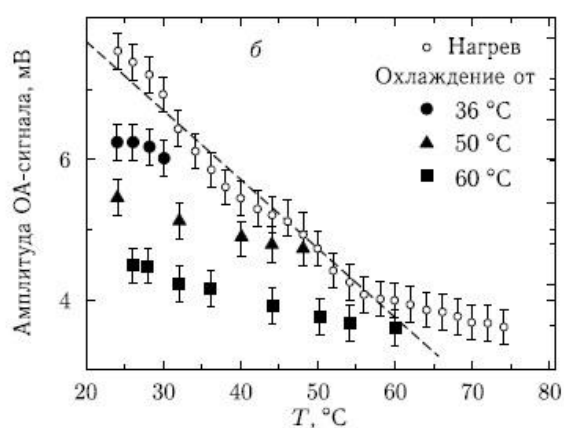


Рисунок 1.12 - Зависимость амплитуды оптоакустического сигнала от температуры для образцов свиной жировой ткани при нагревании и остывании [23]

В работе Яниной и соавторов рефрактометрический метод был применен для исследования изменения показателя преломления жировой ткани свиньи при нагревании от (+22) °С до (+60) °С на длине волны 930 нм [102]. По температурной зависимости показателя преломления были выявлены особые точки при температурах (+25.5), (+34), (+39.5), (+50), (+55.5) °С, которые могут соответствовать фазовым переходам различных компонентов жировых клеток, например, фосфолипидам клеточной мембраны и жирным кислотам, входящих в состав жировых капель. На Рисунке 1.13 показана зависимость показателя преломления от температуры, полученная в работе [102].

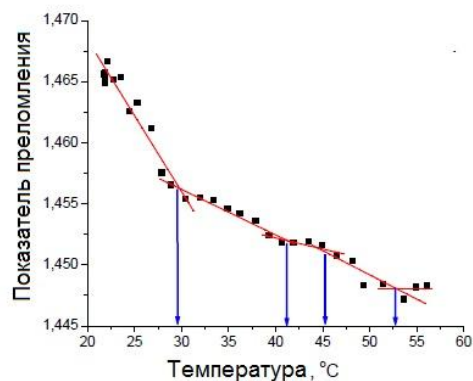


Рисунок 1.13 - Зависимость показателя преломления жировой ткани свиньи от температуры [102]

Показатель преломления на разных длинах волн для наиболее значимых биологических сред приведен в Таблице А1 (Приложение А).

1.2.3 Рефрактометрия клеток

Информация о показателе преломления клеток позволяет более подробно изучить процессы, связанные с клеточным метаболизмом, такие как гидратация, проводимость, окислительный и метаболические процессы и др. [103, 104]. Показатель преломления клеток коррелирует с их составом и, таким образом, играет важную роль в развитии методов, связанных с разработкой различных биологических моделей и оценки оптических свойств тканей в целом.

В настоящее время все известные методы измерения показателя преломления отдельных клеток можно разделить на три группы. К первой группе относятся методы, позволяющие определить среднюю величину показателя преломления клеток. Предполагается, что показатель преломления гомогенной клеточной суспензии соответствует среднему значению показателя преломления клеток в растворе [105, 106]. Ко второй группе относятся методы, позволяющие определить эффективный показатель преломления клеток. Все методы этой группы объединяет предположение о том, что показатель преломления клеток пропорционален концентрации белков в их составе [107]. Третью группу составляют методы, основанные на создании 3D-карты показателя преломления отдельной клетки или клеточного кластера [108, 109, 110].

Величина показателя преломления клеток может варьировать для одного и того же типа клеток в зависимости от наличия и распределения внутриклеточных органелл, экспрессии и накопления определенного белка, размеров и массы клеток. Однако показатель преломления не

определяет ни тип клетки, ни ткани в целом. На показатель преломления клетки влияют толщина клеточной мембраны, размер ядра и органелл. Кроме того, условия эксперимента, такие как температура, химическая обработка, осмотическое давление, образцы живых или фиксированных клеток и т. д., также оказывают заметное влияние на измеренные значения показателя преломления клеток.

В настоящее время 3D-томография с использованием реконструкции показателя преломления стала перспективным методом исследований в области биофотоники. Метод позволяет исследовать оптически толстые образцы неинвазивным способом и без использования химической маркировки. Например, можно визуализировать сосуды и клетки, что важно для трансляционной и клинической медицины, а также для разработки методов диагностики на основе визуализирующей цитометрии [108]. Бачевская и соавторы в своей работе демонстрируют использование трехмерной количественной фазовой визуализации для оценки распределения показателя преломления сухой массы в живых и фиксированных клетках и тканях. Изменения значений показателя преломления после процесса фиксации выявляются в восстановленных фазовых распределениях и составляют порядка 10^{-3} . Значения показателя преломления снижаются, и наиболее значительные потери обнаруживаются в ядрышках клеток [109].

Рефрактометрия клеток имеет большое значение для разработки технологии оптического просветления тканей, обеспечивающего максимальную эффективность многочисленных оптических методов [25].

Температура в целом, и температура тела в частности, играют важную роль в деформации клеток [111]. Структурные переходы в гемоглобине, обусловленные связыванием молекулы кислорода хорошо известны и описаны в литературе [111, 112, 113, 114]. Переходы между состояниями клубка и глобулы - это переходы между разными фазами, что сопровождается изменениями агрегатного состояния макромолекулы. Известно, что фазовые переходы первого рода происходят между двумя состояниями, каждое из которых стабильно по одну сторону от точки перехода и метастабильно по другую. Переход между ними при изменении внешнего параметра (температура) сопровождается тепловым эффектом (например, плавление льда и образование жидкой второй фазы). Фазовые переходы второго рода происходят без тепловых эффектов, причем в области перехода существует лишь один минимум свободной энергии. При переходах первого рода энтропия и внутренняя энергия меняются скачком вследствие затраты конечной теплоты перехода и конечного изменения удельного объема системы. В точке перехода второго рода теплоемкость меняется скачком, энтропия и внутренняя энергия - непрерывно, а удельный объем системы не испытывает скачка. Фазовые переходы определены строго для случая, когда число частиц в системе стремится к

бесконечности. В реальных полимерах, где число частиц большое, но конечное, существует конечная ширина температурного перехода. Конформационный переход является фазовым, если его ширина стремится к нулю [64].

Артманом и соавторами была выявлена критическая температура $T = (+36.4 \pm 0.3) ^\circ\text{C}$ для эритроцитов человека, при которой происходит внезапный фазовый переход и изменяются их механические свойства [12]. В работе представлены результаты эксперимента, в ходе которого применялась микропипетка размером $(1.3 \pm 0.2) \text{ мкм}$, что показано на Рисунках 1.14 и 1.15.

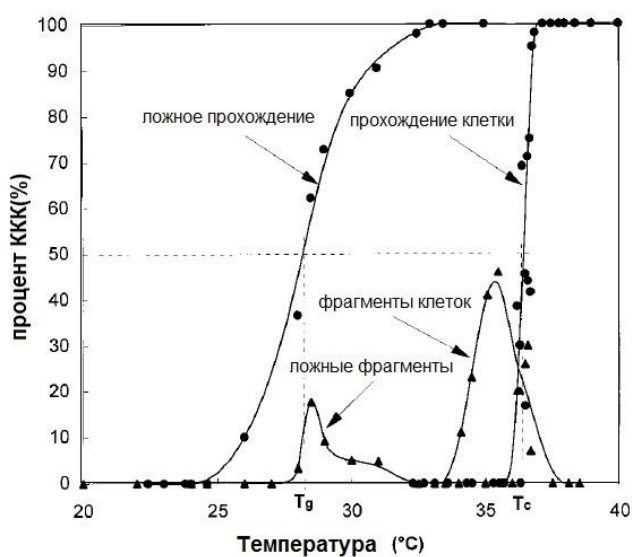


Рисунок 1.14 - Зависимость прохождения эритроцитов через микропипетку 1.3 мкм от температуры [12]

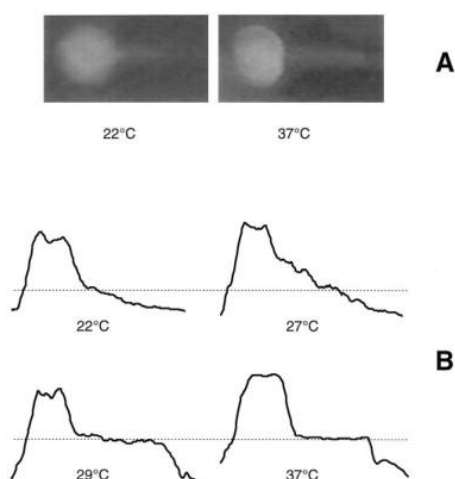


Рисунок 1.15 - А: флуоресцентное изображение деформации эритроцита при прохождении через микропипетку ($1.3 \pm 0.2 \text{ мкм}$, 2.3 кПа) при температуре $(+22)^\circ\text{C}$ и при $(+37)^\circ\text{C}$; В: интенсивность флуоресцеина [12]

В работе Вильямсона было проведено исследование влияния сдвига напряжения на деформируемости эритроцитов в условиях термоиндукции [115]. Установлено, что в диапазоне температур от (+2) до (+50)° С в условиях сдвига напряжения эритроциты приобретали удлиненную форму, что продемонстрировано на Рисунке 1.16.

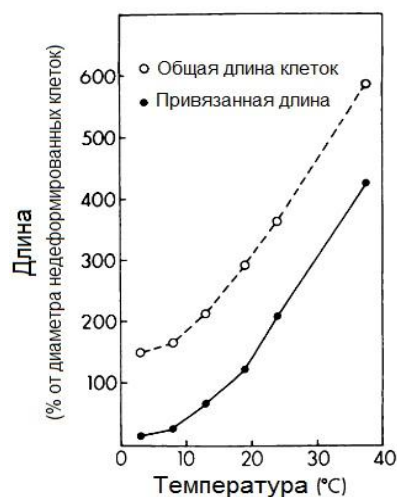


Рисунок 1.16 - Общая длина центральной клетки и длины сдвига клеток как функция температуры [115]

Выяснено, что существенное усиление текучести мембраны эритроцитов имело место при увеличении температуры среды инкубации от (+2)° до (+24)-(37)°С и между (+48)° и (+50)°С [115].

1.3 Роль метода многоволновой рефрактометрии в исследованиях патологических процессов

Показатель преломления играет важную роль при разработке оптических методов, применяемых в медицине с целью диагностики и терапии. Анализ дисперсионных кривых позволяет выполнять дифференцирование здоровых и патологических тканей, что может быть использовано при разработке новых и улучшения качества существующих методов диагностики некоторых заболеваний, например сахарного диабета и онкологических заболеваний [15, 16, 116, 117].

1.3.1 Сахарный диабет и роль исследования процесса гликирования белков крови и их рефрактометрических свойств в его диагностике

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения к 2030 году прогнозируется перемещение сахарного диабета в рейтинге самых распространенных причин смерти во всем мире с восьмого на седьмое место по причине увеличения смертности населения планеты от этого заболевания примерно на 54%-ов по сравнению с 2010 годом 537 миллионов взрослых (20-79 лет) живут с диабетом - 1 из 10. По прогнозам, это число вырастет до 643 миллионов к 2030 году и 783 миллиона к 2045 году [118, 119, 120]. Большинство современных методов по выявлению сахарного диабета и контролю степени его компенсации, связаны с определением содержания глюкозы в крови натощак. Однако в научных исследованиях было установлено, что более достоверная корреляция между наличием сосудистых осложнений при диабете и степенью их прогрессирования наблюдается не с показателями гликемии перед приемом пищи, а с уровнем гликированных белков или конечных продуктов гликирования (КПГ). Двумя основными клиническими параметрами, используемыми для хронического гликемического контроля, являются уровень гликированного гемоглобина (HbA1c) и измерение уровня свободной глюкозы в крови [121]. Если измерение уровня глюкозы в крови, плазме или сыворотке представляет собой краткосрочный показатель и отражает диабетический статус в течение 24-часового периода, то уровень гликированных белков представляет собой долгосрочный гликемический показатель. HbA1c является результатом необратимой неферментативной фиксации глюкозы к бета-цепи молекулы гемоглобина. Тест на содержание HbA1c позволяет измерить средний уровень глюкозы в крови за последние 2-3 месяца в отношении концентрации молекул гемоглобина (Hb), которые имеют молекулу глюкозы, присоединенную к ним [122, 123]. Использование HbA1c для скрининга и диагностики пациентов с диабетом дает преимущества с точки зрения простоты использования по сравнению с другими тестами, так как не требует от пациентов быстрого приема в течение ночи или в течение 2 часов после введения глюкозы перорально. В частности, выявлено, что HbA1c – это не только информативный интегральный диагностический показатель, но и весьма достоверный предиктор ряда микро- и макрососудистых осложнений [124, 125]. Чем лучше скомпенсирован диабет и, соответственно, ниже уровень HbA1c, тем меньше риск развития таких осложнений диабета, как ретинопатия, нефропатия, поражение периферических нервов и сосудов [126]. Существует более 20 методов определения гликированного гемоглобина, такие как катион-обменная хроматография, электрофорез, аффинная хроматография и иммуноанализ, но каждый из них измеряет различные фракции гликированного гемоглобина. Все методы

имеют недостатки, например метод аффинной хроматографии очень чувствителен к изменениям температуры и pH-среды [127, 128, 129, 130]. Тем не менее, в нескольких исследованиях сообщалось о расхождениях в HbA_{1c} в качестве релевантного показателя для контроля гликемии у пациентов с патологией, связанной с диабетом. Так уровень гликированного гемоглобина может быть занижен по отношению к уровню глюкозы в крови у пациентов с гемолитической анемией или гемодиализом [131, 132], и неверно оценены у пациентов с дефицитом железа [133].

Другим преобладающим белком крови, который легко подвергается гликированию, является альбумин. Гликированный альбумин (GA) был предложен в качестве дополнительного маркера для контроля гликемического статуса у людей с диабетом II-го типа [134]. Доля гликированного альбумина у здоровых людей находится в диапазоне от 1% до 10%-ов [135], а в случае сахарного диабета эта доля может увеличиться в два-три раза [136]. Уровень гликированного альбумина может даже достигать более 90%-ов для пациентов с тяжелым диабетом с плохим контролем диабета [137]. Следует отметить, что в более позднем исследовании КПГ были измерены с использованием детектирования флуоресценции, но большинство конечных продуктов гликирования не флуоресцируют [138]. Из-за более короткого периода полураспада (21 день) по сравнению с гемоглобином гликированный альбумин может представлять собой лучший и более быстрый контроль гликемического состояния при некоторых связанных с диабетом патологиях по сравнению с гликированным гемоглобином. Действительно, уровень гликированного альбумина не зависит от аномального метаболизма гемоглобина, встречающегося в некоторых случаях диабета II-го типа [139]. Реакция гликирования альбумина происходит в десять раз быстрее, чем гликирование гемоглобина [140]. Поскольку гликемическая флуктуация может лучше влиять на белок плазмы, по сравнению с гемоглобином, то уровень гликированного альбумина, является хорошим маркером для оценки степени гликемическими при диабете I-го и II-го типа [141]. Многочисленные исследования показали, что гликированный альбумин является альтернативным маркером контроля гликемии. Прежде всего, было показано, что гликированный альбумин активно участвует в развитии основных осложнений диабета, включая нефропатию [142], заболевания сердца [143] и болезнь Альцгеймера [144]. Кроме того, в отличие от HbA_{1c}, уровень гликированного альбумина связан с кальцификацией периферических сосудов [141] и артериальными заболеваниями [145], которые являются двумя наиболее распространенными диабетическими осложнениями. Недавние клинические исследования показали, что гликированный альбумин является идеальным маркером гликемического контроля при многочисленных физиопатологических состояниях, включая пациентов, находящихся на гемодиализе [17], пациентов с гастрэктомией или при гестационном

диабете [141]. Все эти данные подтверждают полезность гликированного альбумина для выявления кратковременных изменений в гликемическом контроле. Однако при некоторых патологиях, которые влияют на метаболизм альбумина, таких как дисфункция щитовидной железы, нефротический синдром или цирроз печени, уровень гликированного альбумина не является подходящим индикатором для уровня глюкозы [146, 147, 148]. Аналогичным образом, похожие исследования показали, что на гликированный альбумин могут влиять другие физиологические или патологические состояния, такие как индекс массы тела [147] или возраст пациентов с диабетом [149]. Однако, помимо гемоглобина и альбумина гликированию подвергаются также долгоживущие белки, такие как коллаген, эластин, миозин, которые являются основными компонентами тканей жизненно-важных органов, чья структура и функции нарушаются вследствие гликирования, что приводит к развитию серьезных осложнений заболевания [150]. Таким образом, актуальной и важной задачей является поиск новых, быстрых и более точных методов измерения всех фракций гликированных белков в крови.

Оптические методы исследования занимают особое место и широко применяются в области медицинской диагностики и терапии [151]. Для измерения и контроля уровня глюкозы в крови могут использоваться различные неинвазивные методы, такие как ИК-спектроскопия, комбинационная спектроскопия, оптическая когерентная томография, фотоакустические методы и др. [152, 153, 154]. Многие из исследований демонстрируют возможность применения оптических методов для определения гликированных белков [155]. Для нахождения новых эффективных способов диагностики и лечения сахарного диабета, предотвращения серьезных осложнений этого заболевания проводятся многочисленные исследования влияния сахарного диабета на различные свойства и функционирование биологических тканей и органов с помощью различных методов, широко используются оптические методы исследования [156]. Проводятся исследования флуоресцентных свойств конечных продуктов гликирования гемоглобина, кожи, роговицы, аорты, суставного хряща. Было обнаружено, что гликирование способствует повышению интенсивности флуоресценции биотканей и снижению интенсивности генерации второй гармоники [18, 157, 158, 159, 160]. Нативная флуоресцентная спектроскопия плазмы крови крыс с экспериментальным диабетом применялась для идентификации характерных особенностей спектра флуоресценции, связанных с метаболизмом глюкозы. Инкубация альбумина с глюкозой *in vitro* показала, что существует новая полоса флуоресценции, которая обусловлена образованием молекулярных сшивок, дающих флуоресценцию в диапазоне 400-430 нм при возбуждении на 320-350 нм. Флуоресцентные свойства этой полосы сходны для разных белков (например, для альбумина и коллагена), поскольку одним из основных продуктов гликирования, вызывающим эту флуоресценцию,

является пентозидин [161, 162]. Спектральный метод применялся для определения содержания Hb и абсолютного содержания HbA_{1c} в гемолизированных образцах крови человека. Оптимальные диапазоны длин волн, полученные с использованием метода наименьших квадратов с подвижным окном, были для Hb от 958 до 1036 нм и для Hb • HbA_{1c} с 1492 до 1858 нм, которые находились в пределах БИК области [163]. Так как гипергликемия изменяет структуру гемоглобина и эритроцитов, Мазаревица с соавторами предложили измерение показателя преломления гемоглобина и эритроцитарной массы у больных сахарным диабетом для определения степени гликированности. Поляризационно-чувствительная интерференционная микроскопия была использована для измерений показателя преломления при 18 различных значениях pH среды (pH = 2-13). Исследование показало, что показатель преломления зависит от pH и, следовательно, от заряда белковой R-группы [117]. Таким образом, оптические методы перспективны и позволяют разрабатывать новые и развивать имеющиеся неинвазивные и малоинвазивные методики, помогающие быстро и эффективно проводить диагностику сахарного диабета, используя оптические свойства конечных продуктов гликирования.

Одним из перспективных оптических методов, предлагаемых для диагностики и оценки развития рака, сахарного диабета и других заболеваний, является метод многоволновой рефрактометрии. В области биохимических исследований рефрактометрия используется для исследования различных взаимодействий, конформационных молекулярных преобразований, выявления фазовых переходов и выявления промежуточных реакций и поэтому является простым и надежным маркером патологии [4]. Широкое применение рефрактометрических методов в биомедицине основано на зависимости преломляющих свойств биологических тканей от их строения и химического состава. Поскольку при развитии патологии изменяются структура и состав биологических тканей, а, следовательно, претерпевают значительные изменения и их оптические свойства, то несколькими исследовательскими группами было предложено использовать показатель преломления, как один из основных оптических параметров, в качестве маркера для дифференциации нормальной и патологической биологической ткани, включая экспериментальный диабет у животных [15, 164]. Измерение показателя преломления было использовано несколькими научными группами для оценки изменения оптических свойств крови при развитии гипергликемии и сахарного диабета. Немонотонный характер зависимости показателя преломления растворов гемоглобина и цельной крови от концентрации глюкозы был выявлен после длительной инкубации растворов белков с глюкозой при измерениях методом оптической когерентной томографии в работах Тучина В.В. [165, 166]. Авторы этих работ сделали выводы об увеличении значения показателя преломления за счет взаимодействия молекул глюкозы и гемоглобина с образованием

различных форм гликированного гемоглобина с новыми молекулярными структурами и соответственно оптическими свойствами. В работах Жерновой и Лазаревой для исследования процесса гликирования растворов гемоглобина и альбумина был применен рефрактометр Аббе [167, 168]. Авторами также показано, что показатель преломления растворов гемоглобина и альбумина в присутствии глюкозы возрастает при длительной инкубации, что объясняется формированием новых молекулярных комплексов. Так как гипергликемия изменяет молекулярную структуру гемоглобина, так как глюкоза присоединяется к белковой R-группе, Мазаревица и соавторы предложили измерения показателя преломления гемоглобина и эритроцитарной массы у больных сахарным диабетом для определения степени гликированности [117].

Ранее показанная, формула (1.20) свидетельствует о том, что заряд белка оказывает влияние на показатель преломления. То есть показатель преломления зависит от содержания заряженных аминокислот в молекуле. Для изучения этой зависимости в работе [117] измеряли показатель преломления эритроцитов с 18 разными рН (от 2 до 13) и действительно оказалось, что показатель преломления зависит от рН, а следовательно от заряда R-группы белка. Полученные ими зависимости представлены на Рисунке 1.17 [117].

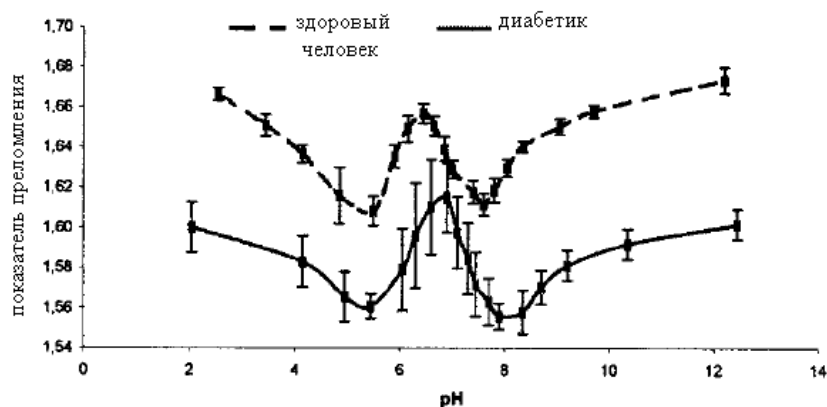


Рисунок 1.17 - Зависимость показателя преломления сухих эритроцитов от рН среды у здорового человека и больного сахарным диабетом [117]

В последние годы возрос интерес к изучению температурной зависимости показателя преломления, поскольку значимый вклад в температурную зависимость показателя преломления вносит поляризационная составляющая, которая важна для детектирования веществ с оптической активностью, таких как глюкоза и гликированные белки. В работах научных групп под руководством Смолянской и Тучина показана возможность использования метода многоволновой рефрактометрии для исследования и селекции гликированных белков

крови от негликированных с учетом отличий их молекулярного строения [155, 169]. Данные о дисперсионной и температурной зависимостях показателя преломления крови, её основных компонентов и их гликированных фракций, представляются значимыми для дифференциации гликированных форм белков от негликированных и разработки неинвазивных оптических методов диагностики, которые в настоящее время становятся востребованными в связи с многочисленными разработками приложений для смартфонов [170].

1.3.2 Показатель преломления – как «биологический маркер» онкологических заболеваний

Диагностические биомаркеры служат для ранней диагностики и выявления онкологических заболеваний. Как правило, выделяют прогностические биомаркеры, которые позволяют оценить прогноз развития заболевания, и предиктивные, которые дают возможность предсказать ответ на терапию. Обнаружение новых онкологических биомаркеров предоставило дополнительные возможности для персонализированной медицины [47].

В ряде работ показано, что значения показателей преломления могут использоваться в качестве маркера для различения нормальных и злокачественных тканей [4]. В первую очередь изменения в развитии патологии начинаются с изменения белкового состава крови и соответственно показателя преломления. В работе научной группы Тучина показана возможность определения различной степени развития рака у животных, связанная с различием дисперсии плазмы крови в широком диапазоне волн от видимого до ТГц [171]. Также следует отметить, что опухолевая ткань рака печени имеет более высокое светорассеяние (т. е. более высокие значения действительной части показателя преломления) и более низкое светопоглощение (т. е. более низкие значения мнимой части показателя преломления), чем нормальная ткань печени [61, 172, 173].

Кроме того, оптические карты измеренного показателя преломления для неокрашенных срезов ткани простаты и ткани молочной железы выявили кальцификацию груди и опухоль простаты (выражающие более высокие значения показателей преломления); эти результаты были подтверждены гистологическим исследованием. Примечательно, что оптические карты показателей преломления отображали тонкие морфологические детали в наномасштабе, которые не были восстановлены с помощью общего коэффициента, который был использован для классификации различных типов тканей желудка, включая низко и умеренно дифференцированные серозные и слизистые ткани [164]. В дерматологии сообщалось об оптической диагностике многочисленных патологических состояний на основе рефрактометрии, поскольку кожа легко доступна для падающего оптического поля. Значения

показателей преломления также коррелируют с различными физиологическими параметрами, такими как гидратация, концентрация белка, инфекция, эластичность, проводимость, деление клеток, насыщение кислородом, скорость метаболизма и т. д. [173]. Вместе эти исследования показывают, что различия в показателях преломления обеспечивает быстрое и неинвазивное окно в патологию ткани.

На Рисунке 1.18 представлены дисперсионные зависимости для тканей колоректальной слизистой оболочки и почек человека, как в здоровом, так и в патологическом (аденокарцинома колоректальной слизистой оболочки и CRCC в почках) состояниях [63, 174]. Показано, что дисперсии, рассчитанные с использованием отношений Крамерса-Кронинга, хорошо согласуются с кривыми типа Корню, которые могут быть получены из дискретных значений показателей преломления, выполненных на слизистой оболочке толстой кишки и тканях почек.

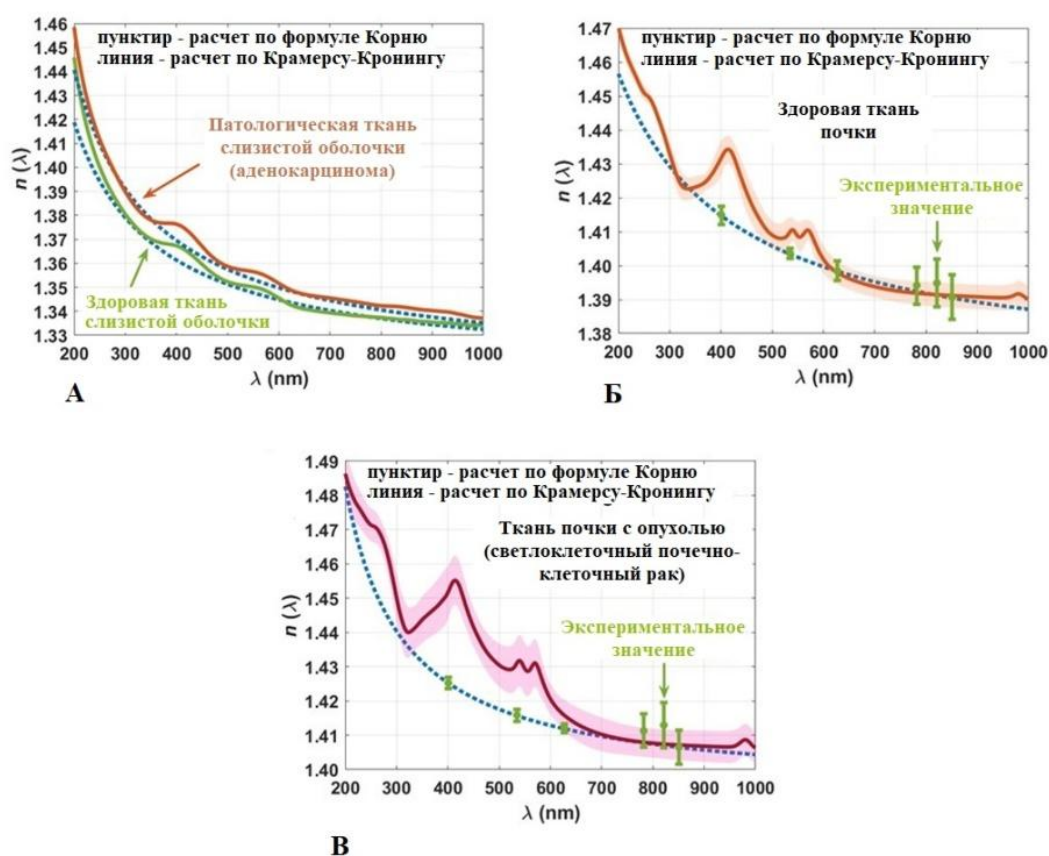


Рисунок 1.18 - Экспериментальные и рассчитанные дисперсионные зависимости показателей преломления тканей здоровой и аденокарциномы колоректальной слизистой оболочки человека (А), нормальной ткани почки человека (Б) и ткани почки человека со светлоклеточным почечно-клеточным раком (В) [63, 100, 174]

Также на Рисунке 1.18 отмечается, что показатели преломления для патологических тканей имеют более высокие значения, чем полученные для здоровых тканей во всем

спектральном диапазоне. Для нормальной печени такое хорошее совпадение наблюдается между 300 и 1000 нм, а для патологической печени — во всем спектральном диапазоне. Кривая, рассчитанная по соотношению Крамерса-Кронинга, дает информацию о полосах поглощения гемоглобина, поскольку, как и в работе [175], можно наблюдать полосу *Soret* при 418 нм и одну полосу при 550 нм, которая соответствует деоксигенированному гемоглобину. Сравнение величин этих полос показывает более высокое содержание крови в патологической ткани печени.

Согласно исследованиям в работах Лазаревой и Сонга, патологическая слизистая оболочка толстой кишки человека имеет примерно на 5% больше подвижной воды, чем здоровая слизистая оболочка, и аналогичные результаты могут наблюдаться в почках [25, 176]. Такое более высокое содержание воды в патологических тканях должно вызывать более низкую дисперсию, чем в здоровой версии тканей, но вместо этого графики на Рисунке 1.18 показывают более высокие дисперсионные кривые для патологических вариантов слизистой оболочки толстой кишки и почек. Такие вариации дисперсии тканей от здоровых к патологическим показывают, что они не зависят от дополнительной подвижной воды в патологических тканях. Фактически вклад воды в дисперсию тканей составляет всю воду в тканях, которая содержит подвижную воду и связанную с другими компонентами ткани. Поскольку общее содержание воды находится в равновесии между соседними тканями, ее содержание в здоровых и патологических тканях одинаково, но при развитии рака часть связанной воды превращается в подвижную, как объяснялось ранее [25, 176]. При одинаковом общем содержании воды в двух вариантах одной и той же ткани наблюдаемое увеличение дисперсии тканей от здоровых к патологическим, которое связано с образованием структур большего размера при развитии рака, которые увеличивают показатель преломления ткани во всем спектральном диапазоне.

Длина пространственной автокорреляции в небольшой области тканевого фазового изображения может быть использована в качестве внутреннего онкомаркера в гистопатологии. Этот параметр чувствителен к наномасштабным клеточным морфологическим изменениям и, следовательно, может информировать о канцерогенезе. Ванг с соавторами демонстрируют методику диагностики доброкачественной и злокачественной ткани молочной железы на основе высокочувствительных данных количественной фазовой визуализации, полученных с помощью пространственной световой интерференционной микроскопии [4]. Золотой стандарт в гистопатологии основан на ручном исследовании окрашенных срезов тканей, поэтому актуальным является поиск высокочувствительного и количественного метода исследования образцов тканей *in situ*, так как он позволит проводить раннюю диагностику заболеваний и автоматический скрининг. Распределение показателя преломления гистопатологических срезов,

которое дает информацию об организации ткани на молекулярном уровне, позволяет выявлять опухоли предстательной железы и кальцификацию молочной железы. Эти оптические карты сообщают о тонких, наноразмерных морфологических свойствах тканей и клеток, которые не могут быть восстановлены обычными красителями, включая гематоксилин и эозин. Результаты многочисленных исследований показывают, что показатель преломления ткани сообщает о наноразмерной архитектуре ткани и, в принципе, может использоваться в качестве внутреннего маркера для диагностики рака [4].

В работе Дьяченко с соавторами была показана возможность использования данных о показателе преломления клеток крови и их окружения для выбора оптимального оптического просветляющего агента с целью снижения рассеяния эритроцитов и других клеток крови и значительного увеличения вероятности обнаружения клеток меланомы [177].

Выводы по главе 1

Проведенный аналитический обзор научной литературы по теме исследования в области рефрактометрии биологических тканей и возможностей её применения в медицине позволил сформулировать цель и задачи диссертационной работы:

Цель: изучить в широком диапазоне длин волн и температур рефрактометрические свойства биологических сред в норме и при патологиях, связанных с развитием сахарного диабета и раковых опухолей, а также выявить связь рефрактометрических свойств биотканей с их структурой и основными компонентами.

Для достижения цели работы потребовалось решить следующие основные **задачи:**

6. Разработать методику и провести измерения показателя преломления наиболее значимых биологических сред в широком диапазоне температур и длин волн видимого и БИК диапазонов и проанализировать полученные дисперсионные зависимости.

7. Выявить связи между экспериментальными данными для показателей преломления, полученными рефрактометрическим методом, и составом, а также структурой биологических сред и их компонентов.

8. Разработать метод оценки показателя преломления крови по экспериментальным данным, полученным для гемоглобина и альбумин, как для основных белков крови.

9. Разработать метод оценки степени гликированности белков крови, гемоглобина и альбумина, на основе рефрактометрических данных широкого спектрального диапазона.

10. Разработать метод оценки степени дегидратации ткани при применении гиперосмотических оптических просветляющих агентов.

В главе 1 использован материал, частично опубликованный в работах:

1. Refractive index measurements of tissue and blood components and OCAs in a wide spectral range /**E. N. Lazareva**, L. Oliveira, I. Y. Yanina, N. V. Chernomyrdin, G. R. Musina, D. K. Tuchina, A. N. Bashkatov, K. I. Zaytsev, and V. V. Tuchin // Handbook of Tissue Optical Clearing: New Prospects in Optical Imaging, V. V. Tuchin, D. Zhu, and E. A. Genina, eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 2022. – P. 141-166

2. A.N. Bashkatov, K.V. Berezin, K.N. Dvoretzkiy, M.L. Chernavina, E.A. Genina, V.D. Genin, V.I. Kochubey, **E.N. Lazareva**, A.B. Pravdin, M.E. Shvachkina, P.A. Timoshina, D.K. Tuchina, D.D. Yakovlev, D.A. Yakovlev, I.Y. Yanina, O.S. Zhernovaya, V.V. Tuchin, «Measurement of tissue optical properties in the context of tissue optical clearing» - // J. Biomed. Opt. 2018. Vol.23 №9. P. 1-31

3. О.А. Смолянская, **Е.Н. Лазарева**, С.С. Налегает, Н.В. Петров, К.И. Зайцев, П.А. Тимошина, Д.К. Тучина, Я. Г.Торопова, О. В. Корнюшин, А.Ю. Бабенко, Ж.-П. Гийе, В.В. Тучин, «Мультимодальная оптическая диагностика гликированных биологических тканей» - // Успехи биологической химии. 2019. Т.59. С. 253–294

4. I.S. Martins, H.F. Silva, **E.N. Lazareva**, N.V. Chernomyrdin, K.I. Zaytsev, L.M. Oliveira, and V.V. Tuchin, «Measurement of tissue optical properties in a wide spectral range: a review [Invited]» - // Biomed. Opt. Express. 2023. №14, P. 249-298

Глава 2 Рефрактометрия биологических сред в широком диапазоне длин волн и температур

В данной главе показано экспериментальное исследование рефрактометрических свойств особо важных биологических тканей в широком диапазоне температур на выделенных длинах волн видимого и БИК диапазонов. Дан анализ дисперсионных и температурных зависимостей, даны коэффициенты для формулы Зельмейера, позволяющей восстанавливать значение показателя преломления биотканей в области 480-1550 нм. Приведено сравнение полученных данных с литературными.

2.1 Конструктивные особенности многоволнового рефрактометра Аббе и его применение для измерения показателя преломления биологических сред

Как сказано ранее, для измерения фазового показателя преломления твердых, жидких и плёночных образцов может быть использован рефрактометр Аббе. В данной диссертационной работе измерения показателей преломления проводились на многоволновом рефрактометре Аббе DR-M2/1550 (Атаго, Япония). На Рисунке 2.1 показана схема экспериментальной установки измерения показателя преломления на выделенных длинах волн при различных фиксированных температурах, которая состоит из рефрактометра Аббе (1) с дополнительной насадкой для проведения измерений в БИК области (6), блока питания (2), источника света (4) и термостата ЛОИП ЛТ 100 (ООО ЛОИП, Санкт-Петербург, Россия) (7).

Многоволновой рефрактометр Аббе DR-M2/1550 позволяет измерять показатель преломления в диапазоне длин волн 450-1550 нм с вносимой прибором погрешностью измерений ± 0.0002 . Источником света является лампа накаливания с высокой мощностью. Длина волны источника света определяется выбранным интерференционным фильтром, который устанавливается на выходе луча источника света. Для проведения большинства экспериментов в данной работе были выбраны интерференционные фильтры для длин волн 480 (± 2) нм, 486 (± 2) нм, 546 (± 2) нм, 589 (± 2) нм, 644 (± 2) нм, 656 (± 2) нм, 680 (± 5) нм, 800 (± 8) нм, 930 (± 6) нм, 1100 (± 26) нм, 1300 (± 25) нм и 1550 (± 25) нм. Для измерений показателя преломления в БИК области (680-1550 нм) на рефрактометр устанавливается специальный визуализатор. В начале каждого эксперимента производится калибровка прибора по табличному значению показателя преломления дистиллированной воды на длине волны 589 нм (полоса поглощения натрия).



Рисунок 2.1 - Экспериментальная установка для измерения действительной части показателя преломления: 1 - многоволновой рефрактометр Аббе DR-M2 1550 (Атаго, Япония) 2 – блок питания; 3 – рамка интерференционного фильтра; 4 – источник света WL-3 (Атаго, Япония); 5 – интерференционный фильтр; 6 – визуализатор для измерений в БИК области; 7 – циркуляционный термостат LOIP LT 100 (ООО «ЛОИП», Санкт-Петербург, Россия)

Принцип работы рефрактометра Аббе основан на измерении критического угла ($\alpha_{\text{пр}}$) [5, 178, 179, 180, 181, 182]. Возможны два случая, для которых ход лучей в призме Аббе показан на Рисунке 2.2. При падении света на границу раздела со стороны менее оптически плотной среды. В зависимости от угла падения луч во второй среде может составлять с нормалью углы, расположенные в интервале от нуля до $\alpha_{\text{пр}}$. Предельный угол преломления $\alpha_{\text{пр}}$ соответствует углу падения $i = 90^\circ$ (скользящий луч, Рисунок 2.2 (А)).

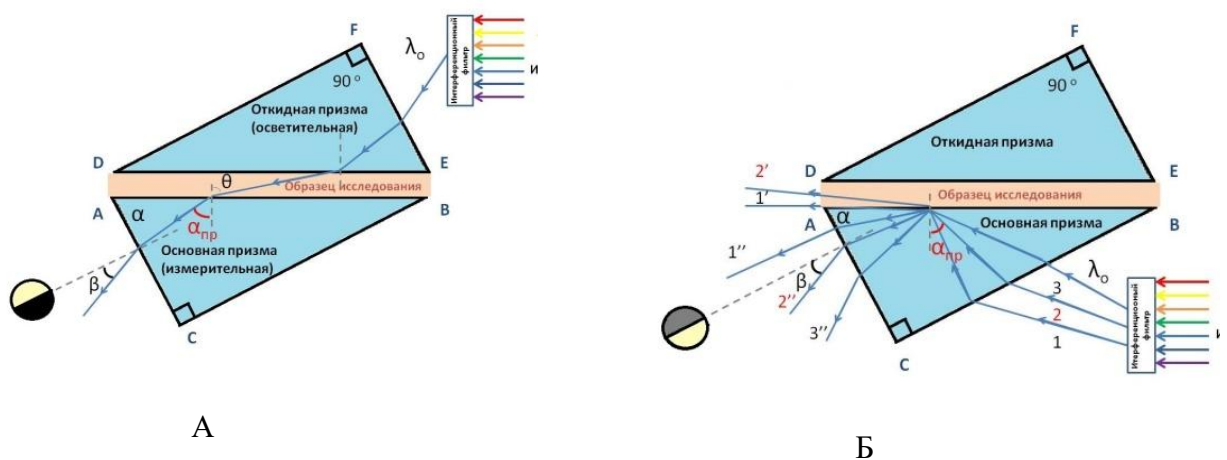


Рисунок 2.2 - Ход лучей в призме Аббе при измерении показателя преломления: А – методом скользящего луча; Б – методом полного внутреннего отражения

В результате в преломлённых лучах образуется резкая граница между светлой и тёмной областями. Легко видеть, что величина предельного угла и в этом случае определяется формулой [56]:

$$\sin \alpha_{\text{пр}} = \frac{n_1}{n_2}. \quad (2.1)$$

В случае падения луча света на границу раздела двух сред со стороны оптически более плотной среды ($n = n_2$) наблюдается явление полного внутреннего отражения (ПВО), как показано на Рисунке 2.2 (Б). Образец помещается на вершину измерительной призмы. Расходящийся световой пучок попадает на образец через призму, а затем с помощью зрительной трубы измеряется положение границы между яркими и темными областями. Для углов падения, меньших предельного, свет частично проникает в оптически менее плотную среду, а частично отражается. Для углов больших предельного преломленный луч будет направлен вдоль границы раздела сред, в результате этого в отражённых лучах образуется граница между светлой областью (полное отражение) и полутенью (частичное отражение). Световой луч полностью отражается, когда угол его падения больше критического угла $\alpha_{\text{пр}}$ (луч 3), и частично отражается при угле падения, меньшем $\alpha_{\text{пр}}$ (луч 2). На выходе из призмы образуется граница между светлой областью и полутенью. Обычно измеряется угол выхода критического луча (луча 1) из призмы в воздух β .

Из рассмотрения преломления световых лучей на грани плоскости призмы на Рисунке 2.2 (Б) показатель преломления образца n связан с углом β соотношением [183]:

$$n = \sin \alpha \sqrt{n_{\text{пр}}^2 - \sin^2 \beta} - \cos \alpha \sin \beta, \quad (2.2)$$

где α — угол преломления призмы (угол между гранями преломления), $n_{\text{пр}}$ — показатель преломления основной измерительной призмы.

При измерениях показателя преломления с помощью рефрактометра Аббе можно пользоваться как методом ПВО, так и методом скользящего луча. При измерениях по методу скользящего луча световые лучи от источника направляются на откидную призму и данный метод применим для измерения показателя преломления сред с низкими рассеивающими и поглощающими свойствами. В то время, как метод полного внутреннего отражения может быть применен для измерения показателя преломления сред с высоким поглощением, но слабым рассеянием.

Глубина проникновения света при ПВО в оптически менее плотную среду имеет порядок длины волны и определяется как расстояние от границы раздела, на котором амплитуда колебаний электрического вектора световой волны уменьшается в e раз. Оценить глубину проникновения световой волны в образец можно используя выражение:

$$d_{\text{пр}} = \frac{\lambda_1}{2\pi(\sin^2 \theta - n_{\text{об_пр}}^2)^{1/2}}, \quad (2.3)$$

где $\lambda_1 = \lambda/n_{\text{пр}}$ длина излучения в призме, $n_{\text{об_пр}} = n_{\text{об}}/n_{\text{пр}}$ отношение показателя преломления образца к показателю преломления призмы; θ – угол падения светового луча.

Для большинства случаев глубина проникновения приблизительно равна $\lambda/2$. Однако из формулы (2.3) следует, что чем ближе друг к другу показатели преломления призмы и образца, тем глубже внутрь образца проникает затухающая волна.

2.2 Экспериментальное определение и анализ дисперсионной и температурной зависимости показателя преломления воды в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах (480-1550 нм)

Основным компонентом большинства жидких и мягких биологических тканей является вода. Именно вода вносит значительный вклад в их оптические, в том числе рефрактометрические свойства. Поэтому важным этапом исследовательской работы в диссертации было экспериментальное определение и анализ дисперсионной и температурной зависимостей показателя преломления воды.

Для сравнительного анализа был проведен эксперимент по измерению показателя преломления дистиллированной воды при нагревании от комнатной до $(+50)^\circ\text{C}$ с шагом измерения 2°C . Результаты измерений для 3-х проб дистиллированной воды показаны на Рисунке 2.3. Полученная температурная зависимость близка к линейной, а отклонения не превышают пределов погрешности прибора. В случае воды линейное уменьшение показателя преломления объясняется расширением молекул и уменьшением ее плотности в результате нагрева.

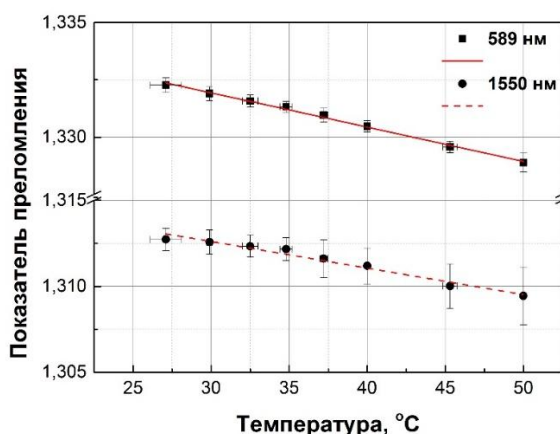


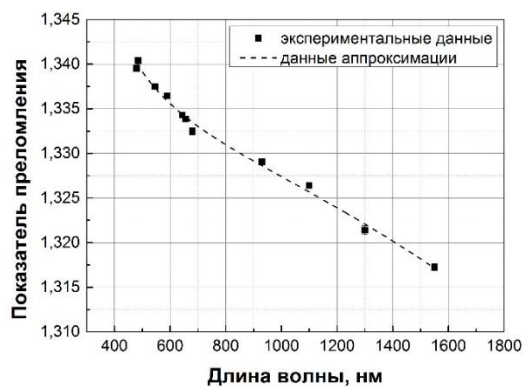
Рисунок 2.3 - Температурная зависимость показателя преломления воды (символы – экспериментальные данные, линии – данные аппроксимации)

Начальные значения показателя преломления и температурный инкремент показателя преломления для представления температурной зависимости показателя преломления воды в виде линейной функции (1.29) показаны на Рисунке 2.4. В Таблице 2.1 приведены данные для диапазона температур (+27) - (+50)°C.

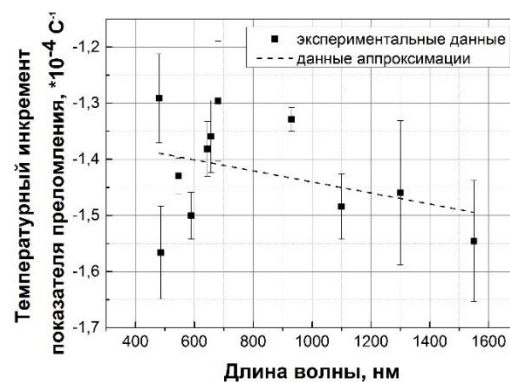
Таблица 2.1 - Начальное значение и температурный инкремент показателя преломления для воды при температуре (+27)°C

λ , нм	n_0 , (\pm CO*)	dn/dT , 10^{-4} C^{-1} (\pm CO*)
480	1.3395 (\pm 0.0005)	-1.291 (\pm 0.079)
486	1.3404 (\pm 0.0005)	-1.566 (\pm 0.082)
546	1.3375 (\pm 0.0003)	-1.430 (\pm 0.032)
589	1.3364 (\pm 0.0004)	-1.500 (\pm 0.041)
644	1.3343 (\pm 0.0004)	-1.381 (\pm 0.049)
656	1.3339 (\pm 0.0004)	-1.359 (\pm 0.064)
680	1.3325 (\pm 0.0006)	-1.296 (\pm 0.107)
930	1.3290 (\pm 0.0003)	-1.329 (\pm 0.021)
1100	1.3264 (\pm 0.0004)	-1.484 (\pm 0.058)
1300	1.3214 (\pm 0.0007)	-1.460 (\pm 0.128)
1550	1.3172 (\pm 0.0006)	-1.546 (\pm 0.108)

*CO – стандартное отклонение



А



Б

Рисунок 2.4 - Зависимость начального значения показателя преломления и температурного инкремента показателя преломления дистиллированной воды ($T = (+27)$ - $(+50)^\circ\text{C}$)

На Рисунке 2.5 представлена дисперсионная зависимость показателя преломления воды. На Рисунке 2.5 представлены экспериментальные данные и данные аппроксимации по формуле Коши (1.14) для видимой области и по формуле Зельмейера (1.13) в видимой и БИК области, так как у воды имеются полосы поглощения на длинах волн 1197 и 1450 нм. Аппроксимация выполнялась при помощи специальной компьютерной программы «OriginPro». Коэффициенты разложения показателя преломления воды для формул Коши и Зельмейера представлены в Таблицах 2.2 и 2.3.

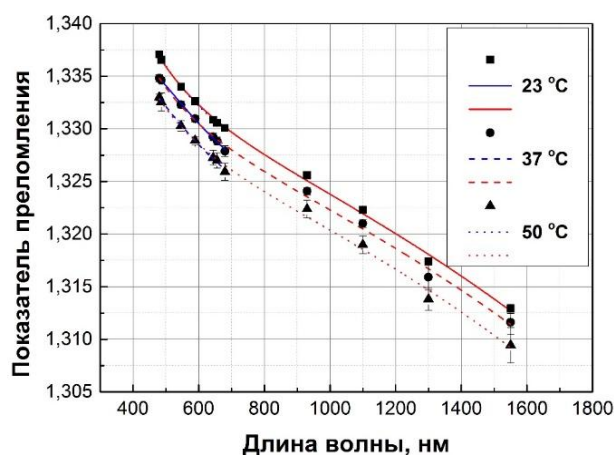


Рисунок 2.5 - Дисперсионная зависимость показателя преломления воды при температурах $(+27)$, $(+37)$, $(+50)^\circ\text{C}$ (символы – экспериментальные данные, линии – данные аппроксимации)

Таблица 2.2 - Коэффициенты для разложения показателя преломления воды по формуле Коши для видимой области

$T, ^\circ\text{C}$	A	B	$C, 10^8$	R^2
23	1.3199	5359	-3.3024	0.999
27	1.3196	5260	-3.4524	0.988
30	1.3196	5066	-2.9580	0.994
33	1.3190	5165	-3.0995	0.991
35	1.3185	5364	-3.4726	0.992
37	1.3183	5365	-3.5573	0.997
40	1.3182	5213	-3.4261	0.999
45	1.3176	4977	-2.9423	0.993
50	1.3171	4867	-2.7978	0.996

Таблица 2.3 - Коэффициенты для разложения показателя преломления воды по формуле Зельмейера в видимой и ближней инфракрасной области

$T, ^\circ\text{C}$	$A1$	$A2$	$B1, \text{нм}^{-2}$	$B2, 10^7 \text{нм}^{-2}$	R^2
23	0.76361	0.683	7299.2	4.03	0.993
27	0.7612	0.391	7923.5	2.51	0.997
30	0.7602	0.526	7962.6	3.32	0.996
33	0.7606	4.058	7658.1	23.56	0.995
35	0.7607	3.395	7380.1	19.10	0.996
37	0.7598	1.020	7221.5	5.89	0.997
40	0.7562	0.367	7635.4	2.30	0.996
45	0.7559	1.329	7285.5	7.48	0.995
50	0.7647	37.492	7766.7	204.90	0.998

Даймон и Масумара в своей работе значение температурного инкремента показателя преломления дистиллированной воды при начальной температуре (+21.5) $^\circ\text{C}$ на длине волны 587.725 нм равно $-0.95 \cdot 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$, в данной работе значение температурного инкремента показателя преломления, измеренное на длине волны 589 нм при температуре (+27) $^\circ\text{C}$ равно – $(1.50 \pm 0.04) \cdot 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ [7]. Различие коэффициентов температурного инкремента, вероятнее всего, связаны с разной начальной температурой измерения. В работе Кеденбурга и соавторов значения для показателя преломления воды при температуре $T=(+20)^\circ\text{C}$ 1.3345 для длины волны 550 нм и 1.3201 для длины волны 1300 нм [184]. В данной работе получены значения при температуре (+23) $^\circ\text{C}$ 1.3340 для длины волны 546 нм и 1.3174 для длины волны 1300 нм. Учитывая поправку на температуру, в видимой области экспериментальные данные хорошо согласуются с литературными. Для БИК области значение показателя преломления меньше литературных данных, это может объясняться вкладом поглощения и различиями образцов воды [185]. Согласно литературным данным, действительная и мнимая часть показателя

преломления воды в области от 480 до 1550 нм изменяется от $(1.3350 \pm 10^{-9}i)$ до $(1.3180 \pm 0.00009i)$ в работе Хэйла и от $(1.3370 \pm 1.8939 \cdot 10^{-9}i)$ до $(1.3154 \pm 0.00014925i)$ в работе Кеденбурга [184, 185].

2.3 Экспериментальное исследование рефрактометрических свойств мягких тканей в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах (480-1550 нм)

Величина показателя преломления биологических сред, как правило, варьируется от 1.34 до 1.7 [151, 186]. При этом показатель преломления требует оценки для широкого спектрального диапазона, поскольку дисперсия даёт более полную информацию, которая может быть использована для характеристики показателя преломления компонентов ткани [25], для количественной оценки рассеяния света на отдельных длинах волн через относительный показатель преломления [25], или использоваться для дифференцирования патологические ткани [4, 63, 174]. Однако, несмотря на обширную базу данных показателей преломления, информация о многих биологических тканях недоступна и мало изучена.

2.3.1. Методы и материалы для измерения показателя преломления мягких тканей в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах

В ходе экспериментов измерялся показатель преломления срезов наиболее значимых биотканей мышей, крыс и свиней.

Показатель преломления измерялся на многоволновом рефрактометре Аббе DR-M2/1550 (Атаго, Япония), подробное описание устройства которого дано в разделе 2.1. данной работы. Показатель преломления измерялся для следующих длин волн: 480 (± 2) нм, 486 (± 2) нм, 546 (± 2) нм, 589 (± 2) нм, 644 (± 2) нм, 656 (± 2) нм, 680 (± 5) нм, 800 (± 6) нм, 930 (± 6) нм, 1100 (± 26) нм, 1300 (± 25) нм и 1550 (± 25) нм. Измерения были выполнены при комнатной температуре при поддержании постоянной температуры измерительной призмы рефрактометра $(+23)^\circ\text{C}$.

Срезы тканей мышей были получены от здоровых лабораторных животных (возраст 2 месяца и весом 55 ± 15 г). Всего было исследовано 10 образцов мышинной кожи толщиной 324 ± 46 мкм, 6 образцов ткани мышинной почки.

Образцы тканей здоровых лабораторных крыс (возраст 6 месяцев и весом 200 ± 50 грамм): 7 образцов крысиной кожи толщиной 545 ± 45 мкм, 7 образцов срезов мышечной ткани толщиной 503 ± 60 мкм, 7 образцов среза ткани легкого толщиной 415 ± 32 мкм, 7 срезов образцов головного мозга крысы толщиной 485 ± 42 мкм.

Также был измерен показатель преломления 6 образцов срезов мышечной ткани свиньи толщиной 496 ± 66 мкм (возраст около 4 месяцев, вес 800-1000 грамм).

Все исследуемые образцы были получены от разных животных. Срезы тканей делались вручную, медицинским скальпелем, в течении 2 часов после наступления смерти животного, таким образом, что толщина слоя составляла 400-600 мкм, а размеры образца были 1,5 см в длину и 1 см в ширину. Толщину срезов измеряли микрометром у образцов, помещенных между двумя покровными стеклами.

2.3.2 Анализ дисперсионной зависимости показателя преломления мягких тканей в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах

Дисперсионная зависимость показателя преломления для образцов кожи крысы, кожи мыши, срезов мышечной ткани крысы и свиньи, ткани легкого крысы, почки мыши и головного мозга крысы показаны на Рисунках 2.6 (А) и 2.6 (Б) и даны в Таблице 2.4.

На основе полученных экспериментальных данных для спектрального диапазона 480 - 1550 нм были рассчитаны коэффициенты для дисперсионной формулы Зельмейера (1.13), которая принимает вид:

$$n_{\text{дермы кожи крысы}}(\lambda) = \sqrt{1 + \frac{0.85739 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 8367.03162} + \frac{705.97622 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 4283.6 \cdot 10^7}}, \quad (2.4)$$

$$n_{\text{дермы кожи мыши}}(\lambda) = \sqrt{1 + \frac{0.9257 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 7612.03655} + \frac{725.937558 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 4142.65 \cdot 10^7}}, \quad (2.5)$$

$$n_{\text{эпидермиса кожи мыши}}(\lambda) = \sqrt{1 + \frac{0.01572 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 7277.33697} + \frac{758.33932 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 4139.54 \cdot 10^7}}, \quad (2.6)$$

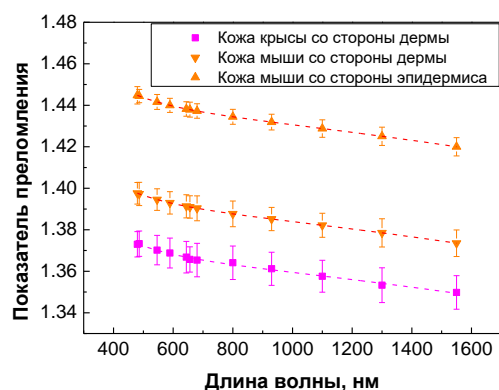
$$n_{\text{среза мышцы крысы}}(\lambda) = \sqrt{1 + \frac{0.86865 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 7859.41024} + \frac{592.91231 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 3488.4 \cdot 10^7}}, \quad (2.7)$$

$$n_{\text{среза мышцы свиньи}}(\lambda) = \sqrt{1 + \frac{0.82969 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 9967.85048} + \frac{702.34806 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 5453.26 \cdot 10^7}}, \quad (2.8)$$

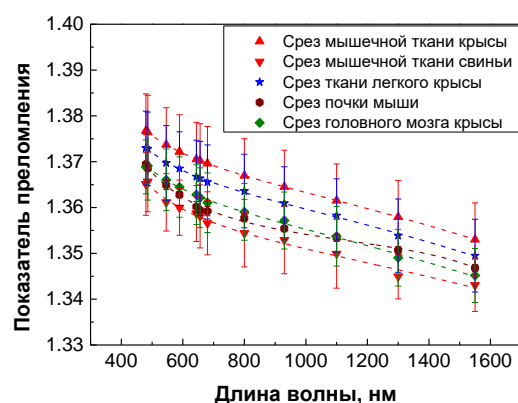
$$n_{\text{среза почки мыши}}(\lambda) = \sqrt{1 + \frac{0.82525 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 12890.70} + \frac{0.00676 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 0.338425 \cdot 10^7}}, \quad (2.9)$$

$$n_{\text{среза легких крысы}}(\lambda) = \sqrt{1 + \frac{0.8581 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 7937.71459} + \frac{1.00808 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 6.27383 \cdot 10^7}}, \quad (2.10)$$

$$n_{\text{среза головного мозга крысы}}(\lambda) = \sqrt{1 + \frac{0.84647 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 8373.62495} + \frac{688.16591 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 4064.31 \cdot 10^7}}. \quad (2.11)$$



А



Б

Рисунок 2.6 - Дисперсионная зависимость мягких тканей: А – кожа крысы и мыши со стороны дермы, кожа мыши со стороны эпидермиса; Б – срезы мышечных тканей крысы и свиньи, срез ткани легкого крысы, срез почки мыши, срез ткани головного мозга крысы. (Символы - экспериментальные данные, пунктирные линии – аппроксимация по формуле Зельмейера)

Таблица 2.4 - Показатель преломления наиболее значимых биологических сред

λ , нм	Кожа крысы со стороны дермы ($\pm CO^*$)	Кожа мыши со стороны дермы ($\pm CO^*$)	Кожа мыши со стороны эпидермиса ($\pm CO^*$)	Срез мышечной ткани крысы ($\pm CO^*$)	Срез мышечной ткани свиньи ($\pm CO^*$)	Срез ткани легкого крысы ($\pm CO^*$)	Срез ткани почки мыши ($\pm CO^*$)	Срез ткани головного мозга крысы ($\pm CO^*$)
480	1.373 (± 0.0061)	1.3976 (± 0.0052)	1.4448 (± 0.0042)	1.3767 (± 0.0081)	1.3651 (± 0.0068)	1.3730 (± 0.0080)	1.3695 (± 0.0012)	1.3689 (± 0.0059)
486	1.3733 (± 0.0061)	1.3973 (± 0.0056)	1.4445 (± 0.0032)	1.3764 (± 0.0081)	1.3657 (± 0.0066)	1.3728 (± 0.0080)	1.3685 (± 0.0014)	1.3691 (± 0.0075)
546	1.3702 (± 0.0071)	1.3945 (± 0.0052)	1.4416 (± 0.0036)	1.3737 (± 0.0083)	1.3611 (± 0.0063)	1.3697 (± 0.0082)	1.3649 (± 0.0010)	1.3661 (± 0.0067)
589	1.3688 (± 0.0072)	1.3930 (± 0.0054)	1.4400 (± 0.0034)	1.3722 (± 0.0078)	1.3600 (± 0.0060)	1.3685 (± 0.0080)	1.3628 (± 0.0007)	1.3645 (± 0.0066)
644	1.3668 (± 0.0076)	1.3913 (± 0.0056)	1.4382 (± 0.0035)	1.3705 (± 0.0082)	1.35872 (± 0.0061)	1.3667 (± 0.0080)	1.3602 (± 0.0011)	1.3628 (± 0.0065)
656	1.3657 (± 0.0061)	1.3910 (± 0.0054)	1.4379 (± 0.0036)	1.3702 (± 0.0082)	1.3581 (± 0.0069)	1.36637 (± 0.0081)	1.3594 (± 0.0005)	1.3621 (± 0.0065)
680	1.3654 (± 0.0081)	1.3904 (± 0.0060)	1.4372 (± 0.0035)	1.3696 (± 0.0084)	1.3566 (± 0.0069)	1.36557 (± 0.0081)	1.3592 ($\pm 0.0010E$)	1.3611 (± 0.0065)
800	1.3641 (± 0.0081)	1.3877 (± 0.0062)	1.4345 (± 0.0036)	1.3670 (± 0.0080)	1.3544 (± 0.0074)	1.3636 (± 0.0080)	1.3577 (± 0.0008)	1.3591 (± 0.0062)
930	1.3612 (± 0.0079)	1.3852 (± 0.0056)	1.4319 (± 0.0038)	1.3645 (± 0.0079)	1.3529 (± 0.0074)	1.3609 (± 0.0081)	1.3554 (± 0.0007)	1.3572 (± 0.0062)
1100	1.3576 (± 0.0077)	1.3822 (± 0.0058)	1.4288 (± 0.0042)	1.3615 (± 0.0085)	1.3499 (± 0.0075)	1.3583 (± 0.0080)	1.3534 (± 0.0008)	1.3537 (± 0.0065)
1300	1.3533 (± 0.0084)	1.3785 (± 0.0068)	1.4251 (± 0.0044)	1.3579 (± 0.0084)	1.3450 (± 0.0049)	1.3539 (± 0.0080)	1.3507 (± 0.0008)	1.3491 (± 0.0062)
1550	1.3498 (± 0.0081)	1.3735 (± 0.0064)	1.4200 (± 0.0044)	1.3530 (± 0.0085)	1.3431 (± 0.0057)	1.3495 (± 0.0079)	1.3468 (± 0.0008)	1.3452 (± 0.0059)

*CO – стандартное отклонение

Измерение показателя преломления биологических тканей является сложной задачей, для решения которой используются дополняющие друг друга прямые и косвенные методы, использующие моделирование [4, 15, 151]. Достоинством прямых методов является измерение показателей преломления ткани при наличии всех её компонентов. Однако неоднородность среды в виде клеточной суспензии, сильное поглощение и рассеяние не позволяют определить показатель преломления тканей прямым методом с высокой точностью, поэтому значения показателей преломления в таких случаях могут сильно различаться в зависимости от состояния образца и методики измерений.

Кожа относится к тканям, которые представляют наибольший интерес для исследования её оптических свойств, в том числе при разных физиологических состояниях. Многослойная структура кожи состоит из рогового слоя, эпидермиса, дермы и подкожно-жировой клетчатки. Значения действительной части показателя преломления для отдельных слоев и ткани кожи в целом в литературе варьируются от 1.34 до 1.56 [46, 187, 188, 189]. В данной работе показатели преломления эпидермиса и дермы кожи мыши составляют 1.4400 ± 0.0034 и 1.3930 ± 0.0056 для длины волны 589 нм, а для кожи крысы – 1.3668 ± 0.0072 для той же длины волны. Хотя некоторые отдельные биомолекулы кожи, такие как меланин, имеют очень высокие значения показателя преломления ($n = 1.70$) [190], они присутствуют в ней в более низких концентрациях, поэтому их вклад в общий показатель преломления кожи незначителен. Кроме того, кожа также содержит структурно анизотропные молекулы (например, коллаген), которые проявляют оптическое двулучепреломление — явление, при котором показатель преломления образца/ткани в направлении, параллельном распространению света, отличается от такового в перпендикулярном направлении [57, 191, 192, 193].

Значения показателя преломления для мышечных тканей колеблются от 1.37 до 1.46 [6, 22, 56, 57, 175, 194, 195, 196, 197]. По полученным результатам для мышечной ткани свиньи *ex vivo* показатель преломления изменяется с 1.3767 ± 0.0081 до 1.3530 ± 0.0085 в диапазоне от 480 до 1550 нм, а для мышечной ткани крысы с 1.3651 ± 0.0068 до 1.3431 ± 0.0057 . Можно отметить, что вариации значений показателей преломления для мышечных тканей значительно меньше, чем, например, для костной ткани и тканей, что свидетельствует об относительно однородной морфологии мышечных тканей. Действительно, преобладающими компонентами мышечной ткани являются вода (~75%) и волокна соединительной ткани (~20%), такие как коллаген; эти особенности отображают небольшие микроскопические колебания в структуре ткани, что подтверждает отмеченные тенденции в значениях показателя преломления.

Матито и соавторы представили данные для показателя преломления срезов нескольких тканей человека, в том числе ткани почки [198]. Для человеческой почки показатель преломления равен 1.500 на длине волны 633 нм, по нашим измерениям показатель

преломления здоровой ткани мышинной почки составил 1.3602 ± 0.0011 на длине волны 644 нм. Значительное различие может объясняться различными методиками измерения показателя преломления, а также различным происхождением ткани, так как человеческий орган и мышинный могут отличаться размерами клеточных структурных элементов, что влияет на плотность ткани

В результате измерений показатель преломления ткани легкого крысы равен 1.3685 ± 0.0080 для длины волны 589 нм. Полученный результат хорошо согласуется с имеющимися в литературе данными для легочной ткани собаки и свиньи, 1.38 для длины волны 630 нм [194], 1.342 ± 0.002 для 589 нм [199], в то время как по полученным данным этого эксперимента показатель преломления составил 1.3667 ± 0.0080 для длины волны 644 нм. Небольшие различия могут быть связаны с разными методами измерения показателя, а также особенностями биологической ткани.

Для среза тканей головного мозга характерна неоднородность среды, так как в его составе можно выделить серое и белое вещества головного мозга, паутинную оболочку и цереброспинальную жидкость. В ходе эксперимента на длине волны 589 нм для показателя преломления среза головного мозга крысы была получена величина 1.3645 ± 0.0066 . В работе Гонсалиса и соавторов показатель преломления среза головного мозга кролика варьируется от 1.35 до 1.38 для видимой и БИК областей [200]. Роган и соавторы определили показатель преломления тканей головного мозга человека, включая серое и белое вещества, равным 1.36 для диапазона длин волн 456-1064 нм [32].

На Рисунках 2.7 и 2.8 представлена дисперсионная зависимость для показателя преломления мягких тканей и воды, нормированного на величину 1 для длины волны 589 нм.

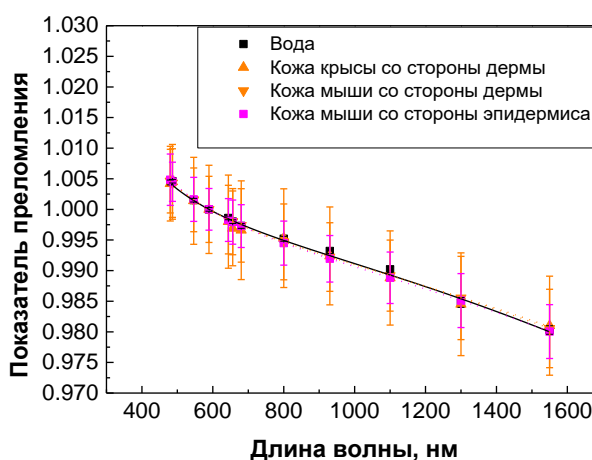


Рисунок 2.7 - Дисперсионная зависимость показателя преломления различных видов кожи, нормированного на 1 на длине волны 589 нм. (Символы - экспериментальные данные, линии – аппроксимация по формуле Зельмейера)

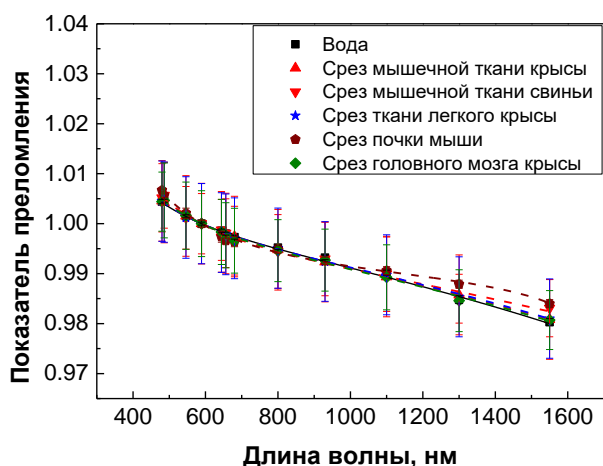


Рисунок 2.8 - Дисперсионная зависимость показателя преломления мягких тканей, нормированного на 1 на длине волны 589 нм. (Символы - экспериментальные данные, линии – аппроксимация по формуле Зельмейера)

Отклонение дисперсионной зависимости для тканей от дисперсионной зависимости воды для областей близких к ультрафиолетовой (УФ) может объясняться вкладом белковых составляющих с высокой частью мнимого показателя преломления. Также компоненты тканей определяют дисперсию в БИК спектральной области, для которой также наблюдается повышение показателя преломления. При этом, для тканей с большим содержанием воды дисперсия близка к дисперсионной зависимости воды, в то время как для среза почки отмечается наибольшее отклонение.

2.4 Экспериментальное исследование рефрактометрических свойств среза абдоминальной жировой ткани свиньи и вытопленного свиного жира (480-1550 нм)

Исследования оптических характеристик, в частности рефрактометрических, жировой ткани в широком диапазоне длин волн и температур представляют интерес для многих областей современной медицины, в частности дерматологии при фотодинамической терапии подкожных новообразований, в том числе злокачественных. Например, учитывая схожесть структурно-морфологических свойств жировых тканей, информация о них может быть полезной при разработке и улучшении методов диагностики и лечения рака молочной железы [183].

2.4.1 Методы и материалы для измерения показателя преломления жировой ткани в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах

В ходе экспериментов измерялся показатель преломления кали жира, вытопленной из исследуемых образцов жировой ткани, и тонкого среза жировой ткани. Для эксперимента брали абдоминальная жировая ткань здоровой свиньи. Возраст свиньи был около 4 месяцев. При проведении всех экспериментов жир вытапливался в чаше Петри на водяной бане, непосредственно после взятия ткани. На призму рефрактометра наносилось около 0.1 мл горячего вытопленного жира. Толщина исследуемого образца вытопленного жира составляла около 20 - 40 мкм. В ходе работ использовали образцы жировой ткани свиней (5 образцов), взятые из брюшной полости (возраст свиней 8-9 месяцев). Измерения показателя преломления проводили в течение 10 мин после помещения собранной капли липидов на призму рефрактометра. Также использовались нарезанные образцы жировой абдоминальной ткани. Срезы выполняли вручную, прикладывая скальпель к замороженным биоптатам. Толщина срезов, измеренная при помощи микрометра для образцов, помещенных между двумя покровными стеклами, составляла примерно 0.60 мм.

Для количественной оценки показателя преломления использовали многоволновой рефрактометр Аббе DR-M2/1550 (Атаго, Япония), подробное описание которого дано в разделе 2.1 данной диссертации. Образец (срез или расплавленную каплю жировой ткани) помещали на призму рефрактометра Аббе, соединенного с водно-циркуляционным термостатом ЛОИП ЛТ 100 (ООО ЛОИП, Санкт-Петербург, Россия). Рефрактометр позволял измерять показатель преломления при контроле температуры с точностью до 0.1°C и изменять от комнатной до (+50)°C с шагом 5°C. Измерения проводились через 10 минут после нанесения образца на призму. В ходе эксперимента использовались интерференционные фильтры с длинами волн 480 (±2) нм, 486 (±2) нм, 546 (±2) нм, 589 (±2) нм, 644 (±2) нм, 656 (±2) нм, 680 (±5) нм, 930 (±6) нм, 1100 (±26) нм, 1300 (±25) нм и 1550 (±25) нм. Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Statistics 6.0.

2.4.2 Анализ дисперсионной и температурной зависимостей показателя преломления среза жировой ткани свиньи и вытопленного свиного жира

На Рисунке 2.9 (А) представлены температурные зависимости показателя преломления вытопленной капли липидов жировой ткани свиньи для диапазона температур от (+25)°C до (+50)°C и их линейные аппроксимации для двух различных температурных диапазонов.

Аппроксимации проводились путем усреднения экспериментальных данных и нахождения первой и второй производных для определения локальных минимумов, максимумов и точек перегиба. На графиках видна удельная усредненная температура $T = (33 \pm 1)^\circ\text{C}$, характерная для всех длин волн видимого и БИК диапазонов. Синие стрелки и числа представляют температуры, соответствующие точке перегиба (изменению наклона) средней функции $n(T)$.

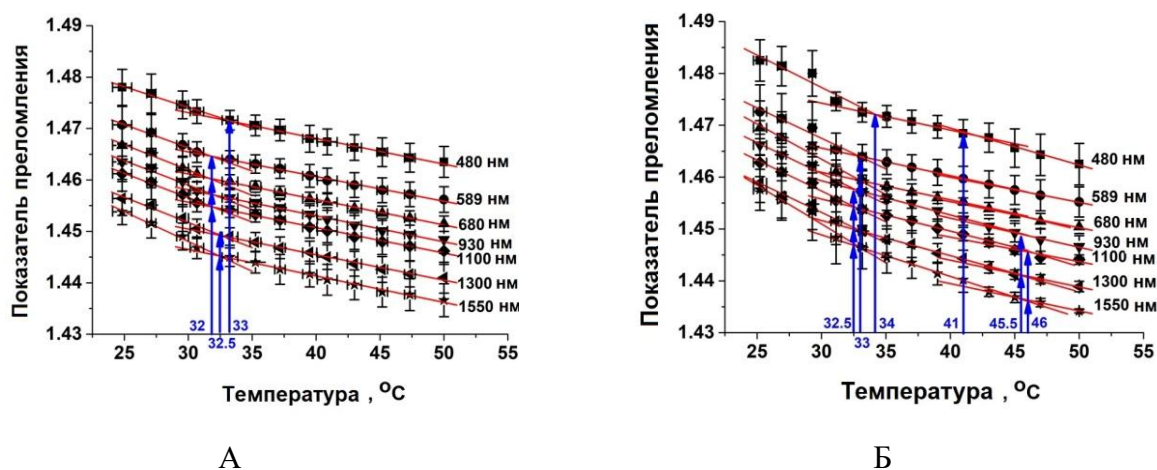


Рисунок 2.9 Температурные зависимости показателя преломления вытопленной капли липидов и срезов жировой ткани свиньи: для видимого и БИК диапазонов (символы – экспериментальные данные, линии – аппроксимация). Синие стрелки и числа представляют температуры, соответствующие перегибу (изменению наклона) средней функции $n(T)$

На Рисунке 2.9 (Б) представлены температурные зависимости среза жировой ткани свиньи для одного и того же диапазона температур от $(+25)^\circ\text{C}$ до $(+50)^\circ\text{C}$ и их линейные аппроксимации для трех различных температурных диапазонов. После математического анализа были определены удельные средние температуры $T = (+33.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ и $T = (+43.5 \pm 2.5)^\circ\text{C}$, соответствующие точкам перегиба и характерные для всех длин волн видимого и БИК диапазонов. Вторая удельная температура отчетливо видна для длин волн 480, 930 и 1550 нм.

Следует отметить, что для других длин волн разрыва данных показателя преломления при $(+30)^\circ\text{C}$, полученных для 480 нм, не наблюдалось. Поэтому это может рассматриваться как ошибкой измерения, которая может быть вызвана малой контрастностью границы между светлой и полутеневой областями рефрактометра. Также наилучшее приближение получено для данных в интервале температур от $(+25)$ до $(+34)^\circ\text{C}$ для всех длин волн.

Показатель преломления среза жировой ткани свиньи для температуры $(+25)^\circ\text{C}$ на длине волны 589 нм составляет 1.4726 ± 0.0052 , что хорошо согласуется с литературными данными [5, 201]. Показатель преломления вытопленного свиного жира при температуре $(+25)^\circ\text{C}$ на той же длине волны 1.4707 ± 0.0036 очень близок к показателям среза ткани. Несколько меньший показатель

преломления вытопленного жира по сравнению со срезом жировой ткани, вероятно, связан с различием их состава. Состав нарезанной ткани более сложен кроме липидов жировых капель, он содержит также мембранные фосфолипиды, ядра клеток и белки. По тем же причинам имеются различия между полученными температурными зависимостями показателя преломления для вытопленного жира и среза жировой ткани свиньи. Температура $(+33\pm 1)$ °С, являющаяся особой точкой температурной зависимости показателя преломления, как экстрагированных липидов, так и срезов жировой ткани, может соответствовать фазовому переходу, связанному с температурой плавления кристаллизованных липидов, существующих при температурах ниже этой точки. Вторая специфическая температурная точка $(+43\pm 2.5)$ °С может быть связана с изменением структуры жировой клетки, т. е. фазовым переходом фосфолипидов клеточных мембран [81].

Как указывалось ранее, показатель преломления тканей нелинейно зависит от длины волны [6, 57, 151, 178]. Для вытопленной капли липидов и срезов жировой ткани свиньи также наблюдается нелинейная зависимость от длины волны. После определения коэффициентов для формулы Зельмейера, дисперсионная зависимость в области 480-1550 нм может быть восстановлена с помощью формул:

$$n_{\text{вытопленного жира}}(\lambda) = \sqrt{1 + \frac{1.1313 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 10348.0147} + \frac{0.0357 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 0.6068 \cdot 10^7}}, \quad (2.12)$$

$$n_{\text{среза жировой ткани}}(\lambda) = \sqrt{1 + \frac{1.1322 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 12334.2013} + \frac{0.0245 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 0.6530 \cdot 10^7}}. \quad (2.13)$$

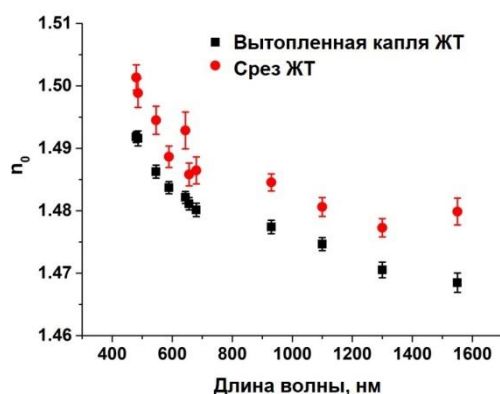
Коэффициент корреляции R2 был равным или больше 0.966.

Также были получены данные для показателей преломления при $T = 0^\circ\text{C}$ и температурных инкрементов показателя преломления для ряда длин волн, которые приведены в Таблице 2.5 и представлены на Рисунках 2.10 (А) и 2.10 (Б). Используя уравнение линейной функции (1.29) и данные Таблицы 2.5, можно рассчитать показатель преломления вытопленной капли и среза жировой ткани свиньи для всех температур от $(+25)$ до $(+50)^\circ\text{C}$. При длине волны 930 нм для вытопленной капли приращение температуры составляет $(dn/dT)_{\text{расплав}} = -(6.028 \pm 0.286) \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$, а для среза $-(7.867 \pm 0.362) \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$. Для той же длины волны в работе [102] температурный инкремент показателя преломления жировой ткани свиньи в диапазоне температур от $(+22)$ до $(+60)^\circ\text{C}$ был несколько ниже $-(5.3 \pm 0.6) \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$. Разница может быть связана с различными экспериментальными установками, диапазонами температур и естественной изменчивостью тканей.

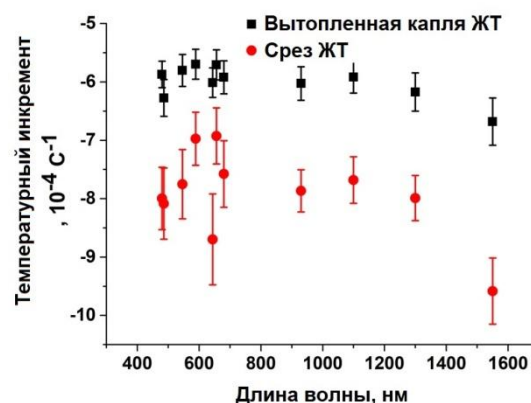
Таблица 2.5 - Показатель преломления при $T=0^{\circ}\text{C}$ (n_0) и температурный инкремент вытопленной капли и среза жировой ткани свиньи в интервале температур от $(+25)$ до $(+50)^{\circ}\text{C}$

λ , нм	$(n_0)_{\text{вытоп.}} (\text{CO}^*)$	$(dn/dT)_{\text{вытоп.}} (\text{CO}^*), 10^{-4} \text{C}^{-1}$	Среднее $(dn/dT)_{\text{вытоп.}} (\text{CO}^*), 10^{-4} \text{C}^{-1}$	$(n_0)_{\text{срез}} (\text{CO}^*)$	$(dn/dT)_{\text{срез}} (\text{CO}^*), 10^{-4} \text{C}^{-1}$	Среднее $(dn/dT)_{\text{срез}} (\text{CO}^*), 10^{-4} \text{C}^{-1}$
480	1.4918 (± 0.0009)	-5.870 (± 0.227)	-6.01 (± 0.29)	1.5014 (± 0.0020)	-7.996 (± 0.535)	-7.92 (± 0.74)
486	1.4916 (± 0.0012)	-6.275 (± 0.314)		1.4989 (± 0.0023)	-8.085 (± 0.610)	
546	1.4863 (± 0.0010)	-5.805 (± 0.274)		1.4945 (± 0.0023)	-7.752 (± 0.594)	
589	1.4837 (± 0.0010)	-5.698 (± 0.256)		1.4887 (± 0.0017)	-6.974 (± 0.454)	
644	1.4822 (± 0.0010)	-6.013 (± 0.252)		1.4929 (± 0.0030)	-8.697 (± 0.779)	
656	1.4811 (± 0.0010)	-5.708 (± 0.258)		1.4858 (± 0.0018)	-6.926 (± 0.480)	
680	1.4801 (± 0.0011)	-5.923 (± 0.283)		1.4865 (± 0.0022)	-7.578 (± 0.571)	
930	1.4774 (± 0.0011)	-6.028 (± 0.286)		1.4845 (± 0.0014)	-7.867 (± 0.362)	
1100	1.4747 (± 0.0011)	-5.918 (± 0.275)		1.4806 (± 0.0015)	-7.681 (± 0.397)	
1300	1.4705 (± 0.0012)	-6.174 (± 0.328)		1.4773 (± 0.0015)	-7.990 (± 0.385)	
1550	1.4685 (± 0.0015)	-6.681 (± 0.405)		1.4799 (± 0.0022)	-9.583 (± 0.566)	

*CO – стандартное отклонение



А



Б

Рисунок 2.10. Зависимость показателя преломления при $T=0^{\circ}\text{C}$ (А) и среднего прироста температуры ($\cdot 10^{-4} \text{C}^{-1}$) (Б) от длины волны для срезов и вытопленной капли липидов жировой ткани свиньи (■), усредненные по 5 образцам. Столбиками показаны стандартные отклонения.

В составе жировой ткани липиды представляют собой сложную смесь триглицеридов, поэтому нельзя наблюдать единую точку плавления. Температуры плавления различных жировых тканей представлены в Таблице 1.1. Согласно Таблице 1.1, свиной жир претерпевает фазовые переходы в интервале температур $(+36)–(+45)^\circ\text{C}$ [72]. Фосфолипиды, выделяющиеся в клеточной мембране, также могут вносить свой вклад в общий фазовый переход жировой ткани в диапазоне $(+38)–(+42)^\circ\text{C}$ [81].

Локальные изменения линейной зависимости показателя преломления от температуры могут быть связаны с фазовыми переходами липидных компонентов жировой ткани. Существование фазового перехода определяется как изменение относительного наклона температурной зависимости показателя преломления. Например, согласно литературным данным фазовые переходы для жировой ткани человека могут наблюдаться в интервале температур от $(+25)$ до $(+45)^\circ\text{C}$ [202]. Фазовые переходы для температур $(+32)^\circ\text{C}$ и $(+35)^\circ\text{C}$, хорошо согласуются с литературными данными, представленными в Таблице 1.1.

Температурные изменения показателя преломления фосфолипидного бислоя клеточных мембран, выделенных из брыжейки крысы, были обнаружены в интервале температур $(+38) – (+42)^\circ\text{C}$ [81]. Дифференциальная сканирующая калориметрия показала широкие эндотермические переходы с центром около $(+60)–(+65)^\circ\text{C}$, точно соответствующие температуре перехода, зарегистрированной для липидных экстрактов рогового слоя [203, 204]. Таким образом, экспериментально обнаруженные множественные фазовые переходы в жировой ткани при нагревании тканей связывают с липидами в липидных каплях клеток и фосфолипидами в клеточных мембранах.

Дисперсия биологических тканей определяется дисперсией её отдельных компонентов. Таким образом, показатель преломления можно рассчитать с помощью закона Гладстона-Дейла, согласно которому, если компоненты среды химически не взаимодействуют друг с другом, результирующий показатель преломления представляет собой среднее значение показателей преломления компонентов с их объемными долями в качестве весовых коэффициентов [205, 206].

$$n = \sum_{i=1}^N n_i f_i, \quad (2.14)$$

где n_i и f_i – показатель преломления и объемная доля компонентов соответственно; N – количество компонентов.

Жировая ткань обычно состоит примерно на 92% из липидов и на 8% из воды [151]. Можно рассчитать показатель преломления липидов $n_{\text{лип}}$ по известным показателям преломления жировой ткани $n_{\text{эсп}}$ и воды $n_{\text{воды}}$:

$$n_{\text{лип}} = \frac{(n_{\text{эксп}} - 0.08n_{\text{воды}})}{0.92}, \quad (2.15)$$

На Рисунке 2.11 представлены дисперсионные зависимости для жировой ткани и воды, полученные экспериментально, а также данные для липидов, рассчитанные по уравнению (2.15). Из Рисунка 2.11 видно, что форма дисперсионных кривых липидов, жировой ткани и воды подобна, что подтверждается корреляционным анализом (Таблица 2.6).

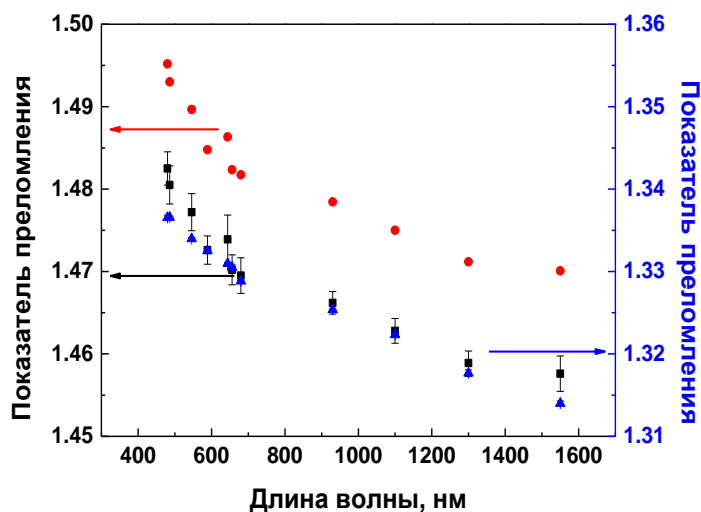


Рисунок 2.11 - Дисперсионная зависимость показателя преломления жировой ткани (■), жиров (●) и воды (▲). Температура 25°C для жировой ткани и воды. (Столбики показывают стандартные отклонения.)

Таблица 2.6 - Коэффициент корреляции Спирмена между дисперсионными зависимостями показателей преломления для абдоминальной жировой ткани свиньи, липидов и воды

	Вода	Жировая ткань свиньи	Липиды
Вода	1.00	0.98	0.98
Жировая ткань свиньи	0.98	1.00	1.00
Липиды	0.98	1.00	1.00

Данные для жировой ткани свиньи хорошо согласуются друг с другом и показывают аналогичную тенденцию (коэффициент ранговой корреляции Спирмена равен 1.0). Различие формы кривых жировой ткани и воды при длинах волн 1100, 1300 и 1550 нм в БИК можно объяснить включением аномальной дисперсии, обусловленной полосами поглощения жира [207, 208]. Некоторый вклад белков в общую дисперсию жировой также ожидается из-за их сильных полос поглощения в УФ [208].

Выводы по главе 2

Таким образом, в данной главе представлены результаты экспериментального исследования рефрактометрических свойств наиболее важных биологических сред в видимом и БИК диапазоне. Представлены значения показателей преломления, измеренные для длин волн близких к выделенным лазерным линиям. По измеренным данным, выполнена аппроксимация и рассчитаны коэффициенты для формулы Зельмейера. Проведен анализ полученных дисперсионных зависимостей и сравнение с литературными данными.

Рефрактометрическое исследование жировых тканей и выделенных из них липидов проводили в широком спектральном и температурном диапазонах. Впервые были измерены приращения температуры абдоминальной жировой ткани свиньи для одиннадцати длин волн в видимом и БИК диапазонах.

Полученные экспериментальные данные представляют большой интерес для разработки инновационных лазерных технологий разрушения жировых тканей и контроля их оптических свойств при нагреве. Количественные методы оптической фазовой визуализации, оптическая дифракционная томография и цифровая голографическая микроскопия также могут быть получены благодаря представленным данным, в частности, для прогнозирования диапазона изменений показателей преломления липидных включений в клетках и тканях при изменении температуры и длины волны.

Глава 2 написана на основе результатов опубликованных в работах:

1. E.N. Lazareva, L. Oliveira, I.Y. Yanina, N.V. Chernomyrdin, G.R. Musina, D.K. Tuchina, A.N. Bashkatov, K.I. Zaytsev, V.V. Tuchin, «Refractive index measurements of tissue and blood components and OCAs in a wide spectral range» - // Handbook of Tissue Optical Clearing: New Prospects in Optical Imaging, V.V. Tuchin, D. Zhu, and E.A. Genina, eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 2022. – P. 141-166.
2. I.Y. Yanina, **E.N Lazareva**, V.V. Tuchin, «Refractive index of adipose tissue and lipid droplet measured in wide spectral and temperature ranges» - // Applied Optics. 2018. Vol.57 №17, P. 4839-4848.
3. A.B. Bucharskaya, I.Y. Yanina, S.V. Atsigaida, V.D. Genin, **E.N. Lazareva**, N.A. Navolokin, P.A. Dyachenko, D.K. Tuchina, E.S. Tuchina, E.A. Genina, Y.V. Kistenev, V.V. Tuchin, «Optical clearing and testing of lung tissue using inhalation aerosols: prospects for monitoring the action of viral infections» - // Biophys Rev. 2022. Vol.14 №4. P. 1005-1022.

4. I.S. Martins, H.F. Silva, **E.N. Lazareva**, N.V. Chernomyrdin, K.I. Zaytsev, L.M. Oliveira, and V.V. Tuchin, «Measurement of tissue optical properties in a wide spectral range: a review [Invited]» - // Biomed. Opt. Express. 2023. №14. P. 249-298.

Глава 3 Рефрактометрия крови в широком диапазоне длин волн

В данной главе представляются результаты экспериментальных исследований оптических свойств компонентов крови, таких как гемоглобин и альбумин, методом рефрактометрии на выделенных длинах волн в видимом и БИК спектральных диапазонах (480-1550 нм). По полученным данным был проведен анализ зависимости показателя преломления от длины волны и концентрации, вычислены значения удельных инкрементов показателя преломления белков крови, а также коэффициенты для представления полученных дисперсионных зависимостей по формуле Зельмейера. Показана возможность вычисления показателя преломления крови по измеренным значениям показателей преломления растворов альбумина и гемоглобина. Для дисперсионной зависимости показателя преломления крови также получены коэффициенты, позволяющие проводить экстраполяцию данных по формуле Зельмейера в видимом и БИК диапазонах длин волн от 480 до 1550 нм.

3.1 Измерение показателя преломления раствора гемоглобина человека в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах (480-1550 нм)

Гемоглобин является одним из важнейших элементов крови, и его оптические свойства во многом определяют оптические свойства крови человека. Поскольку показатель преломления играет жизненно важную роль в качестве неинвазивного индикатора некоторых заболеваний, его знание имеет большое значение [209, 210]. Кроме того, гемоглобин является биологическим маркером для клинической диагностики различных заболеваний, в основном из-за тесной связи между патофизиологией различных заболеваний и состоянием эритроцитов [4, 211, 212, 213]. Учитывая форму и размер эритроцитов, его оптические свойства существенно влияют на оптические характеристики всей крови [214, 215]. Таким образом, оптические свойства гемоглобина могут предоставить нам ценную информацию, чрезвычайно полезную для медицинской диагностики [212] и общего состояния здоровья пациента. В то же время его роль в терапевтических приложениях, особенно в лазерной медицине, очень ценна [33, 13, 216].

Изучение оптических свойств гемоглобина важно для разработки методов диагностики и лазерного лечения, где учет оптических свойств крови имеет решающее значение. Различные оптические методы, широко используемые для характеристики тканей, такие как видимая и БИК спектроскопия, оптическая когерентная томография и флуоресцентная спектроскопия, требуют точных данных для показателей преломления ткани, крови и их компонентов для правильной количественной оценки экспериментальных данных [151, 217, 218].

3.1.1 Методы и материалы для измерения показателя преломления раствора гемоглобина

Экспериментальные исследования были проведены на растворах гемоглобина, полученного из цельной крови человека. Цельная кровь была взята из вены в вакуумную пробирку, в которую в качестве антикоагулянта добавлялся раствор гепарина. Образцы крови у здорового человека были взяты в Государственной организации здравоохранения «Саратовская городская клиническая больница No 2 имени В.И. Разумовского» с разрешения добровольцев. Разделение крови на фракции проводилось путем центрифугирования пробирок в течение 10 минут при 2000 об/мин и при комнатной температуре. После центрифугирования кровь разделяется на плазму, лейко-тромбоцитарный слой и суспензию эритроцитов. Для дальнейшего проведения гемолиза и получения растворов гемоглобина суспензию эритроцитов отделяли, трижды подвергали промыванию буферным раствором и помещали во флакон для замораживания в морозильной камере при температуре $(-25)^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч. Концентрация гемоглобина в полученном растворе оценивалась спектральным методом и составляла 260 г/л.

В ходе эксперимента был измерен показатель преломления трех образцов, взятых у одного добровольца. Также были проведены измерения показателя преломления для растворов различных концентраций, полученных путем разбавления основного раствора гемоглобина в солевом (буферном) растворе.

Измерения проводились с помощью многоволнового рефрактометра Аббе DR-M2/1550 (Атаго, Япония), подробное описание устройства и метод работы которого даны в Разделе 2.1. данной работы. Показатель преломления был измерен для образцов гемоглобина, полученных из цельной крови человека (65, 87, 173, и 260 г/л) на 11-ти длинах волн: 480 (± 2) нм, 486 (± 2) нм, 546 (± 2) нм, 589 (± 2) нм, 644 (± 2) нм, 656 (± 2) нм, 680 (± 5) нм, 930 (± 6) нм, 1100 (± 26) нм, 1300 (± 25) нм и 1550 (± 25) нм. Температура составила $(+23)^{\circ}\text{C}$. Средняя погрешность измерения показателя преломления составила ± 0.0003

При рефрактометрических измерениях слой образца на рабочей поверхности призмы имел небольшую толщину около 20 до 30 мкм. Время полной оксигенации (от 78,4% до 94,2%) гемоглобина в таком слое составляет около 6 - 10 с [219]. Поэтому можно предположить, что гемоглобин полностью насыщается кислородом, и процесс оксигенации во время измерений не влияет на результат. Для аппроксимации дисперсионной зависимости показателя преломления раствора гемоглобина использовалась формула Зельмейера, для записи которой определялись

эмпирические константы [220]. Математические расчеты выполнялись в программном пакете «Origin ProLab».

3.1.2 Анализ дисперсионной зависимости показателя преломления гемоглобина

Спектр оптической плотности раствора гемоглобина, полученного из цельной крови путем гемолиза, представлен на Рисунке 3.1. Из графика видно, что длины волн, доступные для измерения показателя преломления, являются полосы поглощения гемоглобина с совершенно разными абсорбционными характеристиками. Поэтому можно ожидать различного включения аномальной дисперсии в зависимость показателя преломления от длины волны на этих длинах волн. Длина волны 546 нм наиболее близка к изобестической точке 544 нм, где поглощение гемоглобина не зависит от степени оксигенации [221].

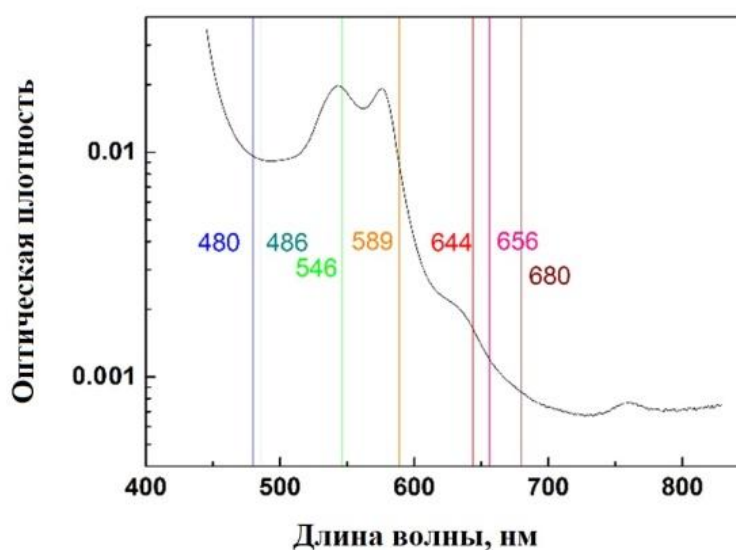


Рисунок 3.1 - Спектр поглощения (оптической плотности) раствора гемоглобина 260 г/л, полученного из цельной крови человека. Вертикальными линиями показаны видимые рабочие длины волн многоволнового рефрактометра Аббе DR-M2/1550 (Атаго, Япония)

В Таблице 3.1 представлены данные измерений показателя преломления для четырех различных концентраций гемоглобина: 65, 87, 173 и 260 г/л при комнатной температуре, (+23)°С.

Таблица 3.1 - Показатель преломления, измеренный для четырех различных концентраций раствора гемоглобина при комнатной температуре (+23)°C

Длина волны, нм	Концентрация гемоглобина 0 г/л (СО*)	Концентрация гемоглобина 65 г/л (СО*)	Концентрация гемоглобина 87 г/л (СО*)	Концентрация гемоглобина 173 г/л (СО*)	Концентрация гемоглобина 260 г/л (СО*)
480	1.3371 (±0.0003)	1.3476 (±0.0003)	1.3571 (±0.0003)	1.3728 (±0.0003)	1.3879 (±0.0002)
486	1.3371 (±0.0002)	1.3478 (±0.0002)	1.3563 (±0.0002)	1.3721 (±0.0002)	1.3871 (±0.0004)
546	1.3342 (±0.0002)	1.3448 (±0.0002)	1.3533 (±0.0002)	1.3681 (±0.0007)	1.3836 (±0.0002)
589	1.3329 (±0.0002)	1.3438 (±0.0002)	1.3519 (±0.0003)	1.3667 (±0.0004)	1.3821 (±0.0004)
644	1.3313 (±0.0002)	1.3419 (±0.0002)	1.3497 (±0.0002)	1.3640 (±0.0003)	1.3801 (±0.0003)
656	1.3308 (±0.0002)	1.3414 (±0.0002)	1.3493 (±0.0002)	1.3647 (±0.0003)	1.3792 (±0.0009)
680	1.3301 (±0.0002)	1.3403 (±0.0003)	1.3482 (±0.0003)	1.3633 (±0.0003)	1.3771 (±0.0002)
930	1.3259 (±0.0002)	1.3360 (±0.0002)	1.3440 (±0.0002)	1.3572 (±0.0003)	1.3735 (±0.0007)
1100	1.3222 (±0.0002)	1.3329 (±0.0002)	1.3411 (±0.0002)	1.3542 (±0.0002)	1.3690 (±0.0006)
1300	1.3174 (±0.0002)	1.3280 (±0.0005)	1.3364 (±0.0002)	1.3503 (±0.0002)	1.3642 (±0.0004)
1550	1.3140 (±0.0002)	1.3244 (±0.0004)	1.3314 (±0.0003)	1.3458 (±0.0002)	1.3598 (±0.0004)

*СО – стандартное отклонение

Хорошо известно, что показатель преломления белков нелинейно зависит от длины волны [8, 59, 207, 209, 222, 223, 224, 225]. На Рисунке 3.2 показаны дисперсионные кривые для растворов гемоглобина в видимой и БИК областей спектра. Символы представляют собой экспериментальные данные из Таблицы 3.1, а линии соответствуют аппроксимации экспериментальных данных по формуле Зельмейера, уравнение (1.13). В Таблице 3.2 представлены данные для формулы Зельмейера. Как следует из Таблицы 3.2, для всех длин волн и концентраций гемоглобина измеренные показатели преломления хорошо соответствуют формуле Зельмейера с коэффициентом корреляции R^2 , равным или лучше 0.993. В частности, наблюдается линейная зависимость между показателем преломления и концентрацией гемоглобина. Показатель преломления образцов гемоглобина также зависит от температуры, хотя влияние температуры на показатель преломления невелико по сравнению с влиянием концентрации гемоглобина.

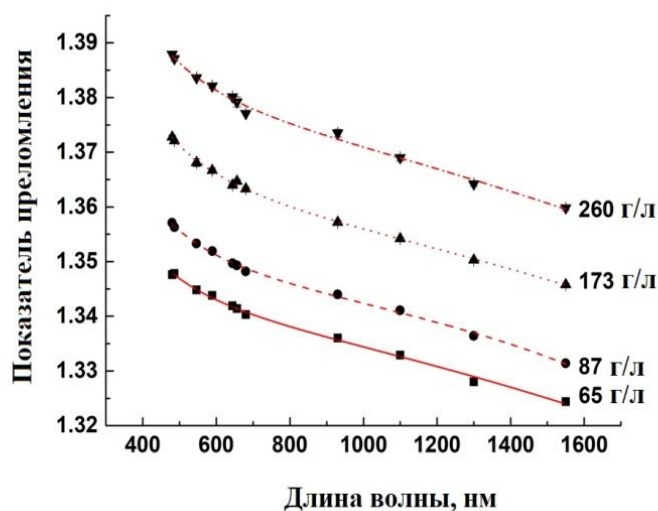
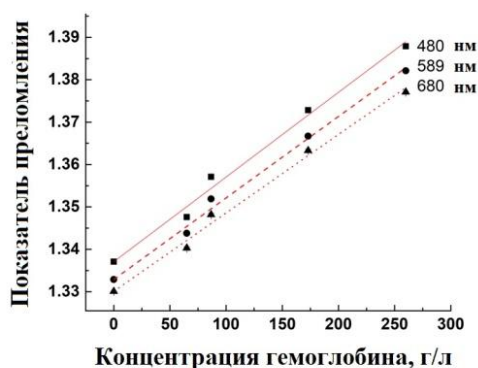


Рисунок 3.2 - Дисперсионная зависимость для растворов гемоглобина (символы — экспериментальные данные, линии - аппроксимации экспериментальных данных по формуле Зельмейера)

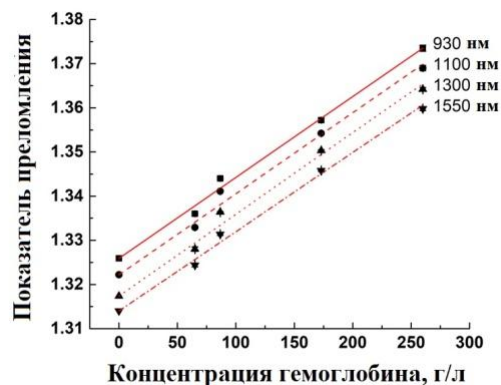
Таблица 3.2 - Коэффициенты формулы Зельмейера для растворов гемоглобина различной концентрации

Концентрация Нв, г/л	A1	A2	B1, 1/нм ²	B2, 10 ⁷ (1/нм ²)	R ²
65	0.79099	685.08237	8366.45239	4024.35	0.995
87	0.80835	450.24119	9983.69749	2842.83	0.999
173	0.84507	402.89873	11065.32117	2540.72	0.998
260	0.88871	190.95319	10187.17167	1039.98	0.993

На Рисунке 3.3 представлена зависимость показателя преломления раствора гемоглобина человека от концентрации гемоглобина для комнатной температуры (+23)°С. Эти данные можно использовать для расчета концентрации гемоглобина в образце крови на основе знания показателя преломления и использования предоставленного приращения рефракции. Эта зависимость может быть описана линейным уравнением (1.27).



А



Б

Рисунок 3.3 - Зависимость показателя преломления от концентрации гемоглобина в растворе для: видимого (А) и БИК (Б) диапазонов (символы – экспериментальные данные, линии – аппроксимация этих данных по формуле Зельмейера)

Таблица 3.3 - Показатель преломления дистиллированной воды n_{H_2O} и удельный инкремент показателя преломления dn/dC для растворов гемоглобина, полученных путем гемолиза, для комнатной температуры (+23)°С. Среднее статистическое отклонение указано в скобках.

Длина волны, нм	n_{H_2O} (CO*)	α , мл/г (CO*)	β , мл/г (CO*)
480	1.3371 (±0.0003)	0.199 (±0.006)	0.149 (±0.005)
486	1.3371 (±0.0002)	0.196 (±0.005)	0.147 (±0.004)
546	1.3342 (±0.0001)	0.193 (±0.005)	0.144 (±0.004)
589	1.3329 (±0.0002)	0.192 (±0.005)	0.144 (±0.003)
644	1.3313 (±0.0002)	0.189 (±0.004)	0.142 (±0.003)
656	1.3308 (±0.0002)	0.190 (±0.005)	0.143 (±0.003)
680	1.3301 (±0.0001)	0.185 (±0.005)	0.139 (±0.004)
930	1.3259 (±0.0002)	0.183 (±0.004)	0.138 (±0.003)
1100	1.3222 (±0.0002)	0.183 (±0.005)	0.139 (±0.004)
1300	1.3174 (±0.0002)	0.185 (±0.006)	0.140 (±0.004)
1550	1.3140 (±0.0002)	0.179 (±0.004)	0.136 (±0.003)

*CO – стандартное отклонение

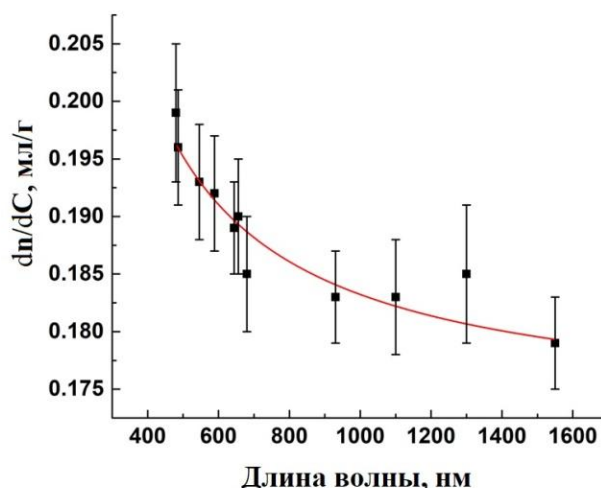


Рисунок 3.4 - Зависимость удельного инкремента показателя преломления (α) раствора гемоглобина от длины волны (символы – расчетные данные, линии – аппроксимация данных)

Аппроксимация зависимости удельного инкремента показателя преломления от длины волны проводилась при помощи пакета программ «Origin ProLab». Наилучшее соответствие было достигнуто с использованием формулы:

$$y(x) = \frac{Cx}{(D+x)}, \quad (3.1)$$

где $C=0.17263 \pm 0.00157$, $D= - 57.8324 \pm 5.56032$. Коэффициент корреляции был равен $R^2=0.90$.

По результатам измерений установлено, что существует линейная зависимость между показателем преломления и концентрацией гемоглобина. В Таблице А3 (Приложение А) обобщены имеющиеся в литературе данные по показателю преломления гемоглобина.

В настоящее время в литературе очень мало данных по измерению показателей преломления растворов гемоглобина для концентраций, близких к таковым в эритроцитах, в частности данные для БИК области практически отсутствуют. Показатель преломления раствора гемоглобина 260 г/л, полученного из цельной крови при комнатной температуре (+23)°С, для длины волны 480 нм оказался равным 1.3879 ± 0.0002 , для 589 нм 1.3821 ± 0.0004 , для 1100 нм. до 1.3690 ± 0.0006 , а для 1550 нм до 1.3598 ± 0.0002 . Удельный инкремент показателя преломления гемоглобина составил 0.199 ± 0.006 мл/г для длины волны 480 нм, 0.192 ± 0.005 мл/г для длины волны 589 нм, 0.183 ± 0.005 мл/г для длины волны 930 нм и 0.179 ± 0.004 мл/г для длины волны 1550 нм.

Фрайбель и соавторы также измерили показатель преломления раствора гемоглобина 287 г/л, полученного из цельной крови [13]. Согласно их измерениям с использованием спектрального метода и формулы Френеля, показатель преломления составил 1.409 для длины волны 400 нм, 1.406 для длины волны 589 нм, 1.404 для длины волны 700 нм и 1.400 для длины волны 1100 нм. В другой статье та же научная группа получила на длине волны 633 нм $n = 1.3750$ для концентрации гемоглобина 165 г/л и $n = 1,3600$ для концентрации 104 г/л [226]. В работах Джин, Парка, Жерновой, Яхайя и Ванга исследовалась рефракция раствора, полученного из сухого гемоглобина [80, 207, 211, 222, 223]. Жерновая и соавторы измеряли на рефрактометре Аббе показатель преломления оксигенированного и деоксигенированного гемоглобина 140 г/л для 9 выделенных длин волн при температуре (+20) °C [207]. Например, значения показателя преломления составили 1.361 для длины волны 486 нм, 1.357 для длины волны 589 нм, 1.352 для длины волны 706.5 нм. Яхайя и Загхир получили значения показателя преломления оксигенированного человеческого гемоглобина 150 г/л: 1.36481 для длины волны 436 нм, 1.35724 для длины волны 589 нм и 1.35587 для длины волны 657.2 нм [222]. Ванг и соавторы измерили показатель преломления 50% оксигемоглобина 320 г/л с помощью фиброспектрометра при температуре 20°C. Он составил 1.3775 для длины волны 500 нм, 1.3684 для длины волны 600 нм и 1.3612 для длины волны 700 нм [223]. Джин и соавторы определили показатель преломления гемоглобина для концентрации 12.97 ммоль/л как 1.3871 для длины волны 532 нм и 1.3800 для длины волны 632 нм [80]. Парк и его научная группа измеряли дисперсию растворов гемоглобина, приготовленных из белкового порошка гемоглобина, при трех различных концентрациях: 0.05, 0.15 и 0,30 г/мл. В данной работе показатель преломления для 0.15 г/мл составил 1.3687 при длине волны 560 нм [227].

Научные группы Фрайбеля и Жерновой в своих работах рассчитали удельный прирост показателя преломления (+20°C), равный 0.147 мл/г, 0.2015 мл/г и 0.151 мл/г для длины волны 589 нм и 0.183 ± 0.003 мл/г для длины волны 589 нм [13, 52, 207, 226]. В исследовании Парка диапазон длин волн был 440–700 нм соответственно, а удельный инкремент показателя преломления гемоглобина составил 0.192 ± 0.005 мл/г для длины волны 589 нм и температуры (+23)°C [227]. Расхождение между литературными и нашими данными может быть связано с различиями в протоколах подготовки проб, так как гемоглобин человека может отличаться по содержанию различных форм гемоглобина донорской крови. Специфика экспериментальных установок также может играть роль. На Рисунке 3.4 видно, что удельный инкремент показателя преломления раствора человеческого гемоглобина уменьшается с увеличением длины волны. Это может объясняться теорией дисперсии многокомпонентных материй и вызвано сильными полосами поглощения гемоглобина в УФ и видимом диапазонах и воды в БИК диапазоне. Зависимость удельного инкремента показателя преломления α раствора гемоглобина от длины

волны хорошо согласуется с литературными данными, приведенными в работах Джанга для цельной крови с использованием метода спектрометра с интегрирующей сферой и Фрайбеля для раствора гемоглобина в интактной цитоплазме отдельных эритроцитов [52, 228].

3.2 Измерение показателя преломления раствора сывороточного альбумина человека в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах (480-1550 нм)

Сывороточный альбумин является наиболее распространенным белком плазмы крови. Он вырабатывается в печени и играет решающую роль в поддержании онкотического давления, а также в транспорте биомолекул с низкой растворимостью в воде, в том числе жирорастворимых гормонов, солей желчных кислот, неконъюгированного билирубина и др. [229]. Нормальная концентрация альбумина в сыворотке крови для взрослых составляет 35-50 г/л [230]. Отклонения в обе стороны свидетельствуют о широком спектре аномальных состояний и заболеваний. Поскольку альбумин оптически полностью прозрачен, классическая биомедицинская методика определения его концентрации путем измерения оптического поглощения неприменима напрямую. По этой причине наиболее распространенный способ измерения его концентрации основан на регистрации изменения оптической плотности при связывании с красителем, таким как бромкрезоловый зеленый или бромкрезоловый пурпурный [231]. Однако этот метод требует много времени и не позволяет контролировать концентрацию альбумина в режиме реального времени. В то же время представляет интерес для исследования и анализ зависимости плотности биологических структур от концентрации белков и других сложных молекул в среде. Показатель преломления разбавленных водных растворов белков, нуклеиновых кислот и других биологически интересных высокомолекулярных веществ пропорционален концентрации этих растворов. Коэффициенты пропорциональности, которые иногда называют биологическими удельными приращениями преломления, являются экспериментальными величинами, которые мало варьируют в случае высокомолекулярных веществ, но играют важную роль при изучении конформации белков внутри клеток и изменения сухой массы [232].

3.2.1 Методы и материалы измерения показателя преломления растворов сывороточного альбумина человека

Показатель преломления растворов сывороточного альбумина человека с концентрациями 35, 45, 55, 100 и 200 мг/мл был измерен при комнатной температуре (+24°C).

Для измерений лиофилизированный порошок сывороточного человеческого альбумина (Sigma Aldrich, США) разводился буферным раствором до нужной концентрации. Измерения выполнялись на многоволновом рефрактометре Аббе DR-M2/1550 (Атаго, Япония) с набором интерференционных фильтров. Подробное описание метода измерения показателя преломления на многоволновом рефрактометре Аббе DR-M2/1550 (Атаго, Япония) изложено ранее в Разделе 2.1. Показатель преломления измерялся для следующих длин волн: 480 (± 2) нм, 486 (± 2) нм, 546 (± 2) нм, 589 (± 2) нм, 644 (± 2) нм, 656 (± 2) нм, 680 (± 5) нм, 800 (± 6) нм, 930 (± 6) нм, 1100 (± 26) нм, 1300 (± 25) нм и 1550 (± 25) нм.

3.2.2 Анализ дисперсионной зависимости показателя преломления растворов сывороточного альбумина человека

На Рисунке 3.5 представлена зависимость показателя преломления растворов сывороточного альбумина человека от концентрации (Рисунок 3.5 (А)), длины волны (Рисунок 3.5 (Б)).

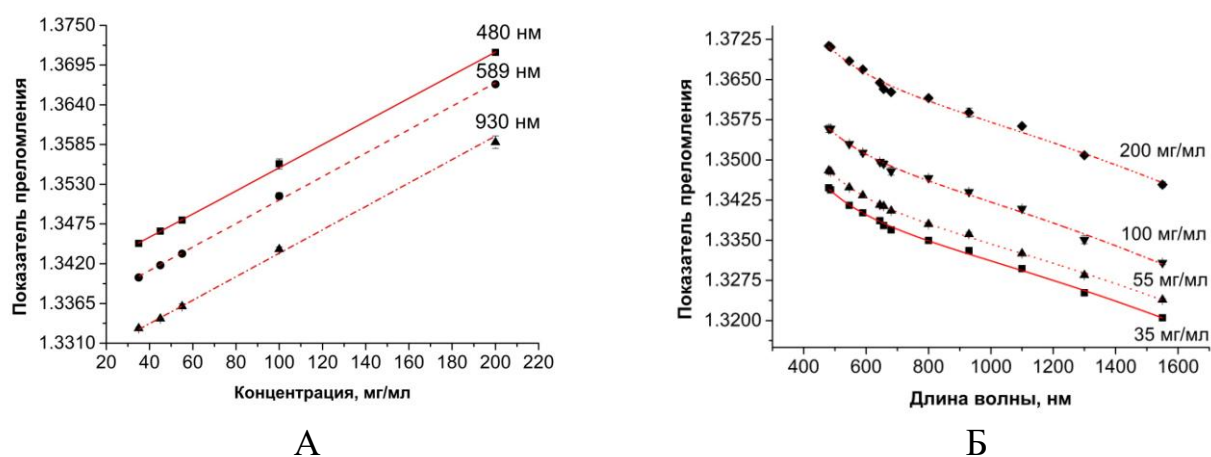


Рисунок 3.5 - Зависимости показателя преломления растворов сывороточного альбумина человека:

А - Зависимость показателя преломления растворов сывороточного альбумина человека от концентрации при температуре (+24) °С. ($R^2 \geq 0,98$; средняя ошибка измерений $\pm 0,0003$);

Б - Дисперсионная зависимость показателя преломления растворов сывороточного альбумина человека 35, 55, 100 и 200 мг/мл при температуре (+24) °С. ($R^2 \geq 0,995$; средняя ошибка измерений $\pm 0,0003$)

Для аппроксимации зависимости показателя преломления от концентрации альбумина была использована формула линейной зависимости:

$$n(C) = n_0(C = 0) + \frac{dn}{dC} * C. \quad (3.2)$$

Коэффициенты, найденные в результате аппроксимации по формуле (3.2), приведены в Таблице 3.4.

Таблица 3.4 - Коэффициенты для восстановления зависимости показателя преломления раствора сывороточного альбумина человека от концентрации при температуре (+24) °С.

Длина волны, нм	$n_0(C=0)$ ($\pm CO^*$)	$dn/dC, 10^{-4}$ мг/мл (CO)	R^2
480	1.3393 (± 0.0002)	1.606 (± 0.002)	0.999
486	1.3389 (± 0.0004)	1.623 (± 0.004)	0.998
546	1.3359 (± 0.0003)	1.638 (± 0.003)	0.999
589	1.3346 (± 0.0003)	1.625 (± 0.003)	0.999
644	1.3332 (± 0.0004)	1.572 (± 0.003)	0.998
656	1.3329 (± 0.0006)	1.535 (± 0.005)	0.995
680	1.3320 (± 0.0003)	1.542 (± 0.003)	0.998
800	1.3294 (± 0.0005)	1.623 (± 0.005)	0.997
930	1.3276 (± 0.0004)	1.574 (± 0.003)	0.998
1100	1.3241 (± 0.0004)	1.622 (± 0.003)	0.998
1300	1.3196 (± 0.0002)	1.560 (± 0.002)	0.999
1550	1.3156 (± 0.0002)	1.495 (± 0.002)	0.999

*CO – стандартное отклонение

Для аппроксимации дисперсионной зависимости показателя преломления растворов сывороточного альбумина человека была использована формула Зельмейера (1.13). В Таблице 3.5 приведены коэффициенты A_1 , A_2 , B_1 , B_2 , позволяющие по формуле Зельмейера восстановить дисперсионную зависимость для растворов сывороточного альбумина человека различной концентрации при температуре (+24) °С в диапазоне длин волн 480-1550 нм.

Таблица 3.5 - Коэффициенты для формулы Зельмейера для восстановления дисперсионной зависимости показателя преломления раствора сывороточного альбумина человека при температуре (+24) °С

Концентрация альбумина, мг/мл	A_1	A_2	$B_1, 1/\text{нм}^2$	$B_2, *10^{10}$ ($1/\text{нм}^2$)	R^2
35	0.78284	745.80866	8264.06289	4.27991	0.997
45	0.78725	745.16755	8261.21264	4.27633	0.997
55	0.79061	737.19422	8546.1684	4.32003	0.999
100	0.81448	790.22595	7753.49632	4.04895	0.993
200	0.85357	778.61143	8038.85745	4.11446	0.989

Полученные в ходе исследования результаты хорошо согласуются с известными литературными данными, которые приведены в Таблице А2 Приложения А, и могут служить основой для дальнейшего изучения дисперсионной и температурной зависимостей биологических сред, в частности крови и её компонентов. В работе Максимова показатель преломления сывороточного бычьего альбумина 5% измеренный при помощи интерференционного микроскопа на длинах волн 532, 633 и 850, был равен $1.3623 \pm 0.050\%$, $1.3614 \pm 0.007\%$, $1.3576 \pm 0.073\%$ [233]. По результатам, полученным другими научными группами, существуют лишь незначительные различия в показателях преломления между сывороткой и плазмой [76, 218, 234, 235]. Научная группа Лиу в своей работе показала, что значения показателя преломления сыворотки и плазмы, полученные из цельной крови кролика и измеренные методом лазерной рефрактометрии, равны 1.3483 и 1.3479 [234]. Мэйнке и соавторы измеряли показатель преломления плазмы человека на рефрактометре Аббе и получили величины показателей преломления 1.3577 на длине волны 400 нм, 1.3506 на 500 нм, 1.3473 на 600 нм, и 1.3438 на 700 нм [218]. Мэтли и соавторы определили показатель преломления плазмы человека равный 1.350 для видимой спектральной области 500-600 нм [235].

3.3 Расчет показателя преломления крови из соотношения содержания гемоглобина и альбумина, как основных составляющих компонентов крови - эритроцитов и плазмы

Оптические свойства крови можно рассматривать микро- и макроскопическим способом. В качестве микроскопического объекта кровь представляет собой среду, обладающую сильным рассеянием. Это гетерогенная среда, состоящая из плазмы и форменных элементов крови. Плазма крови состоит из 90% воды и 10% белков. Форменные элементы крови - это в основном эритроциты (почти 99%), лейкоциты (1%) и тромбоциты (>1%). Эритроциты имеют самые большие геометрические размеры, как правило: 6.2-8.2 мкм и, главным образом, определяют оптические свойства крови [34, 47, 151, 236, 237]. Количественная и качественная информация об оптических свойствах крови, в частности о показателе преломления, представляет большой интерес для многих областей биомедицинских исследований и практической медицины, так как неинвазивные или малоинвазивные оптические технологии все чаще используются в диагностике и терапии [11, 33, 47, 151, 237, 238]. Хорошо известно, что оптические свойства крови определяются такими физиологическими и биологическими параметрами, как гематокрит, температура, осмолярность, насыщение кислородом или другими газами,

ригидность мембраны эритроцитов, и при этом сложным образом зависят от длины волны [11, 80, 151, 207, 209, 222, 223, 238, 239]. Видимую и БИК области спектра часто называют «терапевтическим/диагностическим» окном, так как именно в этом диапазоне длин волн малый вклад в поглощение дает вода, которая является основным компонентом многих биологических тканей. В настоящее время возобновился интерес исследователей к проблеме измерения показателя преломления различных биологических тканей и крови в широком диапазоне длин волн, поскольку именно показатель преломления предлагается использовать в качестве эндогенного диагностического маркера различных заболеваний [4, 117, 214, 240, 241]. Например, Плотникова и соавторы показали, что величина показателя преломления сыворотки крови может быть использована в качестве дополнительного критерия для оценки динамики изменений свойств сыворотки крови при прохождении курса противоопухолевой терапии [241]. Знание показателя преломления крови в широком диапазоне длин волн, оптической дисперсии, требуется для описания оптических свойств различных слоев кровенасыщенных тканей, например, методом статистического моделирования Монте-Карло [151, 242]. Знание оптических свойств тканей и крови позволяет определять оптимальную длину волны воздействия, при которой глубина проникновения лазерного излучения максимальна. Это важно при моделировании взаимодействия лазерного излучения с тканью, например, при планировании таких клинических процедур, как лазерный внутритканевый нагрев или фотодинамическая терапия, а также при выборе рабочих длин волн пульсовых оксиметров, которые широко используются в различных областях медицины для мониторинга насыщения крови кислородом [11, 33, 47, 237, 238]. Таким образом, определение оптической дисперсии крови и ее компонентов в видимой и БИК областях спектра является актуальной задачей, поскольку в литературе нет полных данных. Кроме того, известные данные для показателей преломления крови сильно различаются между собой, что служит дополнительной мотивацией к проведению исследований [6, 194, 207, 216, 222, 239].

Поскольку кровь является биологической предельно мутной средой с высокой анизотропией рассеяния ($g = 0.9996$) [34], обладающей сильным рассеянием и поглощением в видимой области, то для нахождения показателя преломления и дисперсионной зависимости используются разнообразные модели рассеяния света на частицах и другие косвенные методы. Например, эмпирические методы, основанные на вычислении показателя преломления крови по экспериментальным значениям показателя преломления её компонентов [239] или теоретические методы, позволяющие вычислять действительную часть показателя преломления по измеренным спектрам его мнимой части (спектрам поглощения) с использованием соотношений Крамерса-Кронига [80, 209, 239].

Среди прямых методов наиболее часто используются различные модификации ОКТ [46, 47, 151, 214, 227] и фазовой микроскопии [220, 240, 243], лазерный рефрактометр с поллой призмой [216, 244], методы, основанные на применении принципа полного внутреннего отражения [6, 80, 207]. Данные методы обладают рядом достоинств, но имеют и недостатки. Методы с применением ОКТ позволяют выполнять измерения показателя преломления в рассеивающих средах, но с точностью не превышающей 0.01-0.001, что не всегда бывает достаточно в аналитических приложениях. Однако в *in vivo* измерениях ОКТ дает широкие возможности для медицинских применений там, где предельной точности измерения показателя преломления хватает [46, 151, 214, 227, 228, 245, 246, 247]. Различные виды фазовой микроскопии наиболее часто применяются для исследования рефракторных свойств отдельных клеток крови, например эритроцитов [220, 240, 243]. Применение лазерного рефрактометра с поллой призмой позволяет измерять показатель преломления жидкостей, имеющих большие коэффициенты рассеяния и поглощения, к которым относится кровь. Метод обеспечивает *in vitro* измерения с точностью до 0.01-0.0001. К недостаткам метода можно отнести необходимость использования лазерных источников излучения достаточно высокой мощности [216, 244]. Методы на основе полного внутреннего отражения позволяют проводить *in vitro* измерения показателя преломления крови и её отдельных компонентов с точностью 0.0001-0.00001, а простота и малый объём требуемого материала делают их доступными для оперативного мониторинга показателя преломления [6, 80, 207].

3.3.1 Методика расчета показателя преломления крови в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах

Показатель преломления является комплексной величиной $\tilde{n}=n+ik$, его действительная и мнимая части могут быть описаны в рамках электронной теории в виде уравнений (1.5) и (1.6) [1, 205, 220].

Показатель преломления многокомпонентной биологической среды можно рассчитать по закону Глэдстона-Дейла (1.21), согласно которому, если компоненты среды не взаимодействуют химически между собой, то результирующий показатель преломления есть среднее от показателя преломления компонентов с их объемными долями в качестве весовых множителей [205, 220].

В виде упрощенной модели кровь можно представить, как двухкомпонентную среду, состоящую из эритроцитов, взвешенных в плазме, то формулу (1.13) можно применить к крови, записав в виде:

$$n_{\text{Крови}} = n_{\text{Эр}} f_{\text{Эр}} + n_{\text{Пл}} f_{\text{Пл}}, \quad (3.3)$$

где $n_{\text{Крови}}$ – показатель преломления крови, $n_{\text{Эр}}$ – показатель преломления эритроцитов, $f_{\text{Эр}}$ – объемная доля эритроцитов, $n_{\text{Пл}}$ – показатель преломления плазмы, $f_{\text{Пл}}$ – объемная доля плазмы в крови.

Так как плазма на 90%-ов состоит из воды и 10%-ов из белков, основным из которых является альбумин, то показатель преломления плазмы можно вычислить по формуле Гладстона-Дейла записав её в виде:

$$n_{\text{Пл}} = 0.9 n_{\text{Воды}} + 0.1 n_{\text{Аль}}, \quad (3.4)$$

где $n_{\text{Пл}}$ – показатель преломления плазмы крови, $n_{\text{Воды}}$ – показатель преломления воды, $n_{\text{Аль}}$ – показатель преломления чистого альбумина.

Показатель преломления эритроцита также можно вычислить по формуле (1.13), учитывая, что основной белок в эритроцитах – гемоглобин занимает 25% его объема, а остальной составляющей является вода:

$$n_{\text{Эр}} = 0.75 n_{\text{Воды}} + 0.25 n_{\text{Нб}}, \quad (3.5)$$

где $n_{\text{Эр}}$ – показатель преломления эритроцита, $n_{\text{Воды}}$ – показатель преломления воды, $n_{\text{Нб}}$ – показатель преломления чистого гемоглобина.

Для экспериментальных исследований раствор гемоглобина был получен из цельной крови здорового человека. Цельная кровь собиралась в пробирки, содержащие гепарин для предотвращения коагуляции. Образец крови центрифугировался 10 мин при скорости 2000 об/мин с целью разделения крови на фракции и отделения эритроцитов от плазмы и других форменных элементов крови. Эритроциты отбирались в отдельную пробирку, а затем проводился их гемолиз путем многократного «замораживания-размораживания» эритроцитарной массы при температуре (-18) °С. Концентрация гемоглобина в исследуемых образцах была вычислена спектральным методом по спектрам поглощения и составляла 260 г/л, что соответствует среднему значению концентрации гемоглобина в эритроците.

Для получения раствора альбумина использовался сухой сывороточный человеческий альбумин (Sigma-Aldrich), который разводился в физиологическом растворе 0,9%-го NaCl до концентрации 55 г/л. Полученная концентрация соответствовала среднему значению концентрации альбумина в плазме крови.

Показатель преломления измерялся на многоволновом рефрактометре Аббе (Атаго, Япония), подробные конструктивные особенности которого описаны в Разделе 2.1 данной диссертации. Источником излучения в данной установке является лампа накаливания высокой мощности. Для селекции длин волн использовались узкополосные интерференционные фильтры для 480 (±2) нм, 486 (±2) нм, 546 (±2) нм, 589 (±2) нм, 644 (±2) нм, 656 (±2) нм, 680

(±5) нм, 930 (±6) нм, 1100 (±26) нм, 1300 (±25) нм и 1550 (±25) нм. Погрешность измерений, вносимая прибором, составляет ±0.0002.

В начале каждого измерения выполнялась калибровка прибора по известному табличному значению показателя преломления дистиллированной воды. Температура образца во время измерений была (+24)°С и постоянно поддерживалась водным циркуляционным рефрактометром.

Показатель преломления крови рассчитывался по формулам (3.3), (3.4) и (3.5). Объемные доли плазмы и эритроцитов брались 0.55 и 0.45, что соответствует гематокриту 45%-ов. Показатель преломления чистого альбумина рассчитывался по формуле Гладстона-Дейла через измеренный показатель преломления раствора альбумина 55 г/л:

$$n_{\text{Alb}} = (n_{\text{р-р Alb}} - f_{\text{Воды}} n_{\text{Воды}}) / f_{\text{Alb}}, \quad (3.6)$$

Где n_{Alb} – показатель преломления чистого альбумина, $n_{\text{р-р Alb}}$ – показатель преломления раствора альбумина, $f_{\text{Воды}}$ – объемная доля воды, $n_{\text{Воды}}$ – показатель преломления воды, f_{Alb} – объемная доля чистого альбумина в плазме.

Показатель преломления чистого гемоглобина для формулы (3.5) рассчитывался по измеренному показателю преломления раствора гемоглобина 260 г/л:

$$n_{\text{Hb}} = (n_{\text{р-р Hb}} - f_{\text{Воды}} n_{\text{Воды}}) / f_{\text{Hb}}, \quad (3.7)$$

где n_{Hb} – показатель преломления гемоглобина в эритроците, $n_{\text{р-р Hb}}$ – показатель преломления раствора гемоглобина, $f_{\text{Воды}}$ – объемная доля воды, $n_{\text{Воды}}$ – показатель преломления воды, f_{Hb} – объемная доля гемоглобина в эритроците.

Аппроксимация показателя преломления крови была выполнена по формуле Зельмейера (1.13), которая дает наилучший результат для описания дисперсионной зависимости многокомпонентной системы вблизи полосы поглощения каждого компонента [220].

3.3.2 Анализ полученных результатов и сравнение с литературными данными

Значения показателей преломления растворов гемоглобина, альбумина и крови, вычисленные по формуле (3.3), измеренные для 11-ти длин волн видимого и БИК диапазонов, представлены в Таблице 3.6.

Таблица 3.6 - Показатель преломления гемоглобина и раствора гемоглобина для температуры (+24) °С

Длина волны, нм	Показатель преломления раствора гемоглобина в воде (260 г/л) ($\pm CO^*$)	Показатель преломления раствора альбумина в воде (55 г/л) ($\pm CO^*$)	Показатель преломления крови ($\pm CO^*$)
480	1.3945 (± 0.0002)	1.3480 (± 0.0002)	1.3690 (± 0.0002)
486	1.3939 (± 0.0002)	1.3478 (± 0.0002)	1.3686 (± 0.0002)
546	1.3885 (± 0.0002)	1.3449 (± 0.0002)	1.3645 (± 0.0002)
589	1.3880 (± 0.0003)	1.3434 (± 0.0002)	1.3635 (± 0.0002)
644	1.3854 (± 0.0003)	1.3416 (± 0.0002)	1.3613 (± 0.0002)
656	1.3849 (± 0.0004)	1.3414 (± 0.0002)	1.3610 (± 0.0002)
680	1.3837 (± 0.0002)	1.3405 (± 0.0002)	1.3600 (± 0.0002)
930	1.3782 (± 0.0005)	1.3380 (± 0.0004)	1.3561 (± 0.0003)
1100	1.3751 (± 0.0006)	1.3361 (± 0.0003)	1.3537 (± 0.0003)
1300	1.3707 (± 0.0004)	1.3325 (± 0.0004)	1.3497 (± 0.0003)
1550	1.3665 (± 0.0005)	1.3285 (± 0.0004)	1.3456 (± 0.0003)

*CO – стандартное отклонение

На Рисунке 3.6 показана дисперсионная зависимость показателя преломления крови для вычисленных значений показателей преломления (квадраты) и наилучшая аппроксимация (красная сплошная линия), выполненная при помощи формулы Зельмейера (1.13). Как видно из графика, для видимого и БИК диапазонов дисперсионная зависимость крови имеет нелинейный вид, а величина показателя преломления уменьшается с увеличением длины волны.

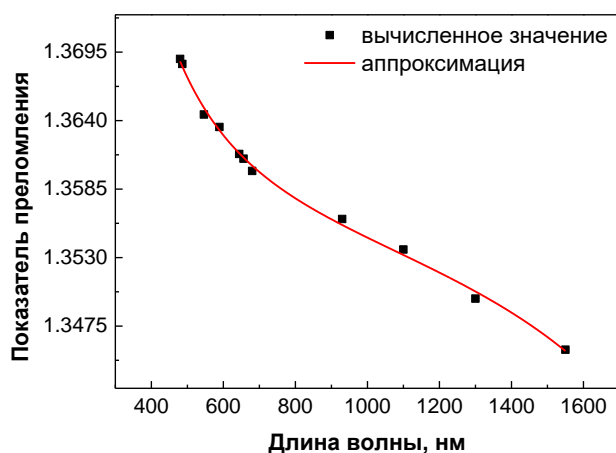


Рисунок 3.6 - Дисперсионная зависимость показателя преломления крови (Символы - экспериментальные данные, линии – аппроксимация по формуле Зельмейера)

После нахождения эмпирических констант формула Зельмейера (1.13) примет вид:

$$n_{\text{крови}}^2(\lambda) = 1 + \frac{0,83423 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 10775,44775} + \frac{0,04296 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 6,13587 \cdot 10^6}. \quad (3.8)$$

Коэффициент согласования для формулы Зельмейера равен $R^2=0.99$.

На Рисунке 3.7 - представлено сравнение значения показателя преломления крови, полученного при расчетах, с данными, имеющимися в литературе [6, 194, 216, 222, 244]. Данные представлены в Таблице А2 (Приложение А)

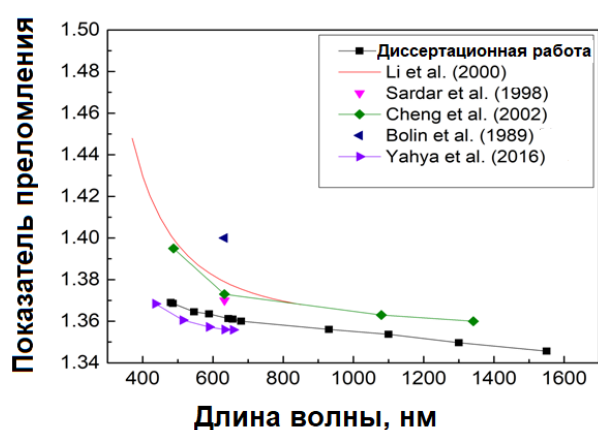


Рисунок 3.7 - Дисперсионные зависимости для крови и их сравнение с литературными данными

Как уже было сказано ранее, измерение показателя преломления крови является сложной задачей, для решения которой используются дополняющие друг друга прямые и косвенные методы. Достоинством прямых методов является измерение показателя преломления крови при наличии всех её компонентов. Однако неоднородность среды в виде клеточной суспензии,

сильное поглощение и рассеяние не позволяют измерить показатель преломления цельной крови прямым методом с высокой точностью, поэтому значения показателя преломления в таких случаях могут сильно различаться в зависимости от состояния образца и методики измерений. На результат измерения показателя преломления крови прямыми методами также влияют два дополнительных важных явления: оседание и агрегация. Необходимое использование антикоагулянтов может приводить к деформации отдельных форменных элементов крови, что отразится на её оптических свойствах. Например, известно, что использование гепарина может приводить к изменению размеров и формы тромбоцитов и лейкоцитов, а избыточное количество K_2EDTA может быть гипертоническим и приводить к осмотическому сжатию. Оседание связано с тем, что плотность кровяных клеток выше, чем плотность плазмы и физиологического раствора. Хотя скорость оседания в нормальной крови не велика (до 30 мм/час), она может влиять при длительных измерениях оптических характеристик образца [47, 236]. Научной группой Болина получено значение показателя преломления крови, равное 1.400, при помощи волоконно-оптического лазерного рефрактометра на длине волны 632.8 нм [194]. Сарадар и соавторы измерили показатель преломления нескольких концентраций разбавленного раствора цельной крови при помощи лазерного рефрактометра с поллой призмой [216]. Так для 60% раствора крови ими был получен показатель преломления 1.37 на длине волны 632.8 нм. Ли с соавторами провели измерения рефракции образцов крови разных групп (группа O(I), группа A(II) и группа B(III)) методом, основанном на принципе полного внутреннего отражения и представили дисперсионную формулу для вычисления усреднённого показателя преломления крови для видимой и БИК областей. Согласно данной формуле, ими было получено значение показателя преломления 1.4480-1.3680 для диапазона длин волн 370-850 нм [244]. Ченг с соавторами измерили показатель преломления цельной крови методом полного внутреннего отражения с использованием нескольких лазеров. Ими были получены значения показателей преломления 1.395 для 488 нм, 1.373 для 632.8 нм, 1.363 для 1079.5 нм, 1.360 для 1341.4 нм [6].

Методы моделирования позволяют восстановить значение показателя преломления крови для широкого диапазона длин волн без учёта неоднородности среды по известным данным для каждого её компонента. В данной работе методом моделирования при использовании значений показателя преломления альбумина и гемоглобина, измеренных рефрактометрическим методом, получены значения показателя преломления крови 1.3690-1.3456 для диапазона длин волн 480-1550 нм. Яхайя с соавторами представили расчет реальной части показателя преломления крови человека при разных концентрациях гемоглобина, температурах и длинах волн на основании экспериментальных значений показателей преломления водных растворов сухого гемоглобина, полученных с использованием Аббемат

рефрактометра. Для примера при комнатной температуре, концентрации гемоглобина 150 г/л и длинах волн 436.1, 513.9, 589.1, 633.2 и 657.2 нм ими были получены значения показателя преломления крови 1.36481, 1.36053, 1.35724, 1.35601 и 1.35587, соответственно [222]. Значения показателей преломления, полученные в данной работе и в работе [222], не сильно различаются, что можно видеть на Рисунке 3.7. Расхождения могут быть связаны с различиями в протоколах подготовки образцов крови и её компонентов, со спецификой экспериментальных установок и методами моделирования.

Выводы по главе 3

Показатель преломления растворов гемоглобина и альбумина измерялся в видимом и БИК диапазонах с помощью многоволнового рефрактометра. Данные аппроксимировались формулой Зельмейера с высокой точностью во всем диапазоне длин волн. Из этих измерений для каждой длины волны от 480 до 1550 нм были получены абсолютное значение начального показателя преломления n_0 и удельного приращения преломления dn/dC от концентрации для комнатной температуры (+23)-(24)°С. Полученные данные хорошо согласуются с имеющимися в литературе и дополняют уже измеренные значения, как это сделано для новых длин волн, что позволило оценить удельный прирост рефракции dn/dC в широком спектральном диапазоне. Также была показана возможность моделирования показателя преломления крови по измеренным значениям показателей преломления растворов альбумина и гемоглобина в воде. Для дисперсионной зависимости показателя преломления крови получены коэффициенты, позволяющие проводить экстраполяцию данных по формуле Зельмейера в видимом и БИК диапазоне длин волн. Результаты показывают, что предложенный метод расчета показателя преломления многокомпонентных сред подходит для вычисления показателя преломления крови в видимой и БИК областях спектра и может служить для быстрой его оценки. Полученные данные хорошо дополняют имеющиеся в литературе и важны для вычисления распределения света в кровенасыщенных тканях, интерпретации результатов, полученных с помощью оптической когерентной томографии, флуоресцентной диагностики, диафаноскопии в БИК области спектра, а также для обеспечения точной дозиметрии при проведении фотодинамической терапии и лазерной термотерапии.

При написании главы 3 использованы результаты, представленные в работах:

1. **E.N Lazareva, V.V. Tuchin**, «Measurement of refractive index of hemoglobin in the visible/NIR spectral range» - // Journal of Biomedical Optics, 2018. Vol.23 №3. P. 1-9

2. **E.N. Lazareva**, V.V. Tuchin, «Blood refractive index modelling in the visible and near infrared spectral regions» - // Journal of Biomedical Photonics & Eng. 2018. Vol.4. №1. P. 010503 (1-8).
3. T. Ermatov, R.E. Noskov, A.A. Machnev, I. Gnusov, V. Atkin, **E.N. Lazareva**, S.V. German, S.S. Kosolobov, T.S. Zatsepin, O.V. Sergeeva, J.S. Skibina, P.Ginzburg, V.V. Tuchin, P.G. Lagoudakis, D.A. Gorin, «Multispectral sensing of biological liquids with hollow-core microstructured optical fibres» - // Light: Science and Applications. 2020. Vol.9. №173. P. 1-12
4. Refractive index measurements of tissue and blood components and OCAs in a wide spectral range / **E.N. Lazareva**, D.K. Tuchina, A.N. Bashkatov [et al.] // Handbook of Tissue Optical Clearing: New Prospects in Optical Imaging, V. V. Tuchin, D. Zhu, and E. A. Genina, eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 2022. – P. 141-166

Глава 4 Применение метода многоволновой рефрактометрии для исследования белков крови, гемоглобина и альбумина, при сахарном диабете

В данной главе представлены результаты экспериментального исследования оптических характеристик гликированных фракций белков крови человека, таких как гемоглобин и альбумин, методами многоволновой рефрактометрии и флуоресценции. Показаны характерные особенности дисперсионных и температурных зависимостей показателя преломления растворов гемоглобина, альбумина, их гликированных фракций, а также их смесей в пределах физиологических и патологических концентраций, получены аппроксимационные формулы для дисперсионных зависимостей и температурных инкрементов показателя преломления, обеспечивающих наилучшую корреляцию с экспериментальными данными. Показаны характерные особенности спектров флуоресценции растворов гемоглобина, альбумина, их гликированных фракций, а также их смесей в пределах физиологических и патологических концентраций. Возможности применения метода многоволновой рефрактометрии продемонстрированы на примере экспериментального исследования оптических характеристик растворов гемоглобина, полученного из цельной крови добровольцев с сахарным диабетом I-го типа.

4.1 Экспериментальное исследование растворов гликированного гемоглобина человека методами многоволновой рефрактометрии и флуоресценции

Содержание гликированного белка в крови человека является долгосрочным гликемическим индикатором. Гликированный гемоглобин HbA1c является одним из наиболее важным гликированным белком, который позволяет измерять средний уровень глюкозы в крови за последние 2-3 месяца по отношению к концентрации молекул гемоглобина (Hb), к которым присоединена молекула глюкозы [125]. Многие работы демонстрируют возможность использования оптических методов для определения гликированных белков [17]. Однако, в большинстве случаев применение оптических методов требует сложных расчетов и точной информации об оптических параметрах, таких как показатель преломления, коэффициент поглощения, коэффициент рассеяния и др., в различных условиях окружающей среды [151].

4.1.1 Методы и материалы исследования оптических свойств растворов гликированного и негликированного гемоглобина

Для выявления отличительных особенностей и возможности детерминации гликированной фракции белка от негликированной был проведен сравнительный анализ растворов гликированных и негликированных форм белков крови, гемоглобина, и их смесей для длин волн возбуждения 260, 270 и 280 нм при использовании методов рефрактометрии и флуоресцентной спектроскопии. Показатели преломления двух форм гемоглобина были измерены для 12 длин волн видимого и БИК диапазонов (480-1550 нм) при температурах от (+25)°С до (+50)°С.

В качестве образцов для исследования были взяты растворы человеческого гемоглобина (Hb) 3мг/мл, гликированного гемоглобина(HbA1c) 3мг/мл. Выбор данных концентраций обусловлен требованиями используемого лабораторного оборудования для обеспечения достоверных и корректных измерений. Для приготовления растворов заданной концентрации использовали лиофилизированный порошок человеческого гемоглобина (Hb), а также гемолизат гликированного гемоглобина (HbA1c) (ООО «Компания «Элта»», Россия). Разбавление проводили при помощи фосфатного буферного раствора (рН=7.4). Смеси растворов были получены в результате соединения растворов гликированной и негликированной форм белков с одинаковой концентрацией в различных пропорциях: смесь 1 - 3Hb: 1 HbA1c; смесь 2 - 1Hb: 1 HbA1c; смесь 3 - 1Hb: 3 HbA1c.

Для рефрактометрических измерений использовали коммерческий многоволновой рефрактометр Аббе DR-M2 / 1550 (Атаго, Япония), конструктивные особенности и работа которого описаны в Разделе 2.1. Для выбора длины волны использовались узкополосные интерференционные фильтры 480 (± 2) нм, 486 (± 2) нм, 546 (± 2) нм, 589 (± 2) нм, 644 (± 2) нм, 656 (± 2) нм, 680 (± 5) нм, 800 (± 6) нм, 930 (± 8) нм, 1100 (± 26) нм, 1300 (± 25) нм и 1550 (± 25) нм. Погрешность измерения, вносимая прибором, составляла $\pm 0,0002$. При измерении показателя преломления для 12 длин волн температура изменялась от (+25) до (+50)°С. Показатель преломления рассчитывался как среднее значение по 3 измерениям для каждого из 3 образцов измеряемого раствора.

Исследования спектров флуоресценции проводили на флуоресцентном спектрометре CaryEclipse (Varian, Бельгия). Длины волн возбуждения были выбраны 260, 270 и 280 нм, ширина щели 10*10 нм. Для измерений использовалась кварцевая кювета толщиной 10 мм, в которую заливалось 2 мл раствора. Растворы для измерений были сильно разбавлены до концентрации, при которой оптическая плотность составляет 0.1 в спектральной области

возбуждения. Оптическую плотность исследуемых растворов измеряли на спектрометре UV-3600 (Shimadzu, Япония). Спектры возбуждения флуоресценции были обработаны методом гауссова анализа в программе OriginLabPro.

4.1.2 Результаты исследования растворов гликированного и негликированного гемоглобина

На Рисунке 4.1 представлена зависимость показателя преломления растворов гликированного и негликированного гемоглобина от длины волны при температуре (+25)°C.

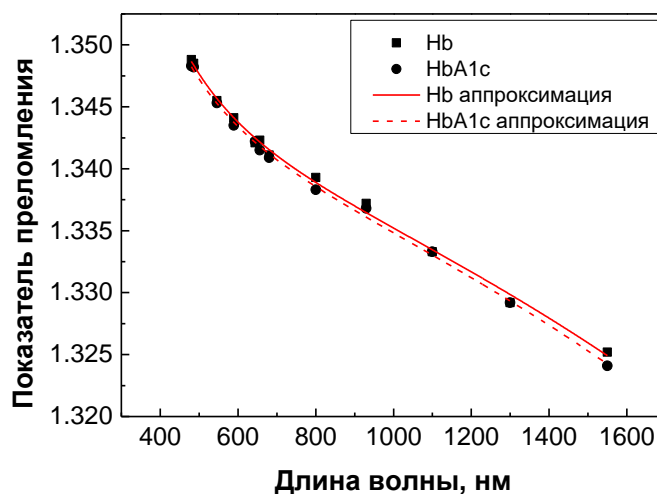


Рисунок 4.1 - Дисперсионная зависимость растворов гликированного и негликированного гемоглобина (Символы - экспериментальные данные, линии - аппроксимация по формуле Зельмейера)

По результатам измерений на 12-ти длинах волн была выполнена аппроксимация по формуле Зельмейера (1.20). После вычисления коэффициентов для восстановления дисперсионной зависимости растворов гликированного и негликированного гемоглобина в диапазоне длин волн 480-1550 нм при температуре (+25)°C могут быть использованы формулы:

$$n_{\text{Hb}}^2(\lambda) = 1 + \frac{0.79282 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 8396.00447} + \frac{729.43254 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 4.35904}. \quad (4.1)$$

$$n_{\text{HbA1c}}^2(\lambda) = 1 + \frac{0.79258 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 8183.20913} + \frac{744.27896 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 4.2882}. \quad (4.2)$$

Величина среднего статистического отклонения для аппроксимации показателя преломления растворов гемоглобина и гликированного гемоглобина по формуле Зельмейера равна 0.996 и 0.997 соответственно.

Так как показатель преломления сильно зависит от концентрации, то для удобства построения температурных зависимостей использовался нормированный показатель преломления, который был получен делением экспериментального показателя, поделенного на начальный показатель преломления при (+25) °С.

$$n_{\text{норм}}(T) = \frac{n_{\text{эксп}}(T)}{n_{\text{эксп}}(T=+25^{\circ}\text{C})}, \quad (4.3)$$

где $n_{\text{эксп}}(T)$ –показатель преломления, измеренный при фиксированной температуре от (+25) до (+50)°С, $n_{\text{эксп}}(T=+25^{\circ}\text{C})$ – показатель преломления, измеренный при (+25)°С.

В дальнейшем для аппроксимации температурной зависимости нормированного показателя преломления растворов гликированного, негликированного гемоглобина и их смесей в диапазоне температур от (+25) до (+50)°С была использована формула линейной зависимости:

$$n(T) = n_0(T = 0^{\circ}\text{C}) + \frac{dn}{dT} * T. \quad (4.4)$$

Результаты измерений и коэффициенты, найденные в результате аппроксимации по формуле (4.3), приведены в Таблице 4.1 и показаны на Рисунках 4.2, 4.3 и 4.4.

На основании полученных результатов установлено увеличение модуля приращения температуры для растворов с преобладанием в растворах гликированного гемоглобина, что показано на Рисунках 4.4(А) и 4.4(Б). Полная производная показателя преломления по температуре связана с эффектом теплового расширения и температурной зависимостью поляризуемости молекул [12, 36, 117]. В связи с этим различия, полученные для Нб и НбА1с, можно объяснить с учетом их различной молекулярной структуры и поляризуемостью молекулы. Правило аддитивности справедливо для молекулярных комплексов, состоящих из молекул с различной поляризуемостью. В этом случае полная поляризуемость считается равной сумме поляризуемости каждой из молекул. Таким образом, молекулярный комплекс гемоглобина с глюкозой имеет большую молекулярную поляризуемость, и показатель преломления зависит от содержания заряженных аминокислот в молекуле. Зависимость показателя преломления сухих эритроцитов, взятых у пациентов, больных сахарным диабетом, от рН (рН = 2-13) и, следовательно, от заряда R-группы белков была показана научной группой Мазаревича с помощью поляризационно-чувствительной интерференционной микроскопии на длине волны 550 нм [117].

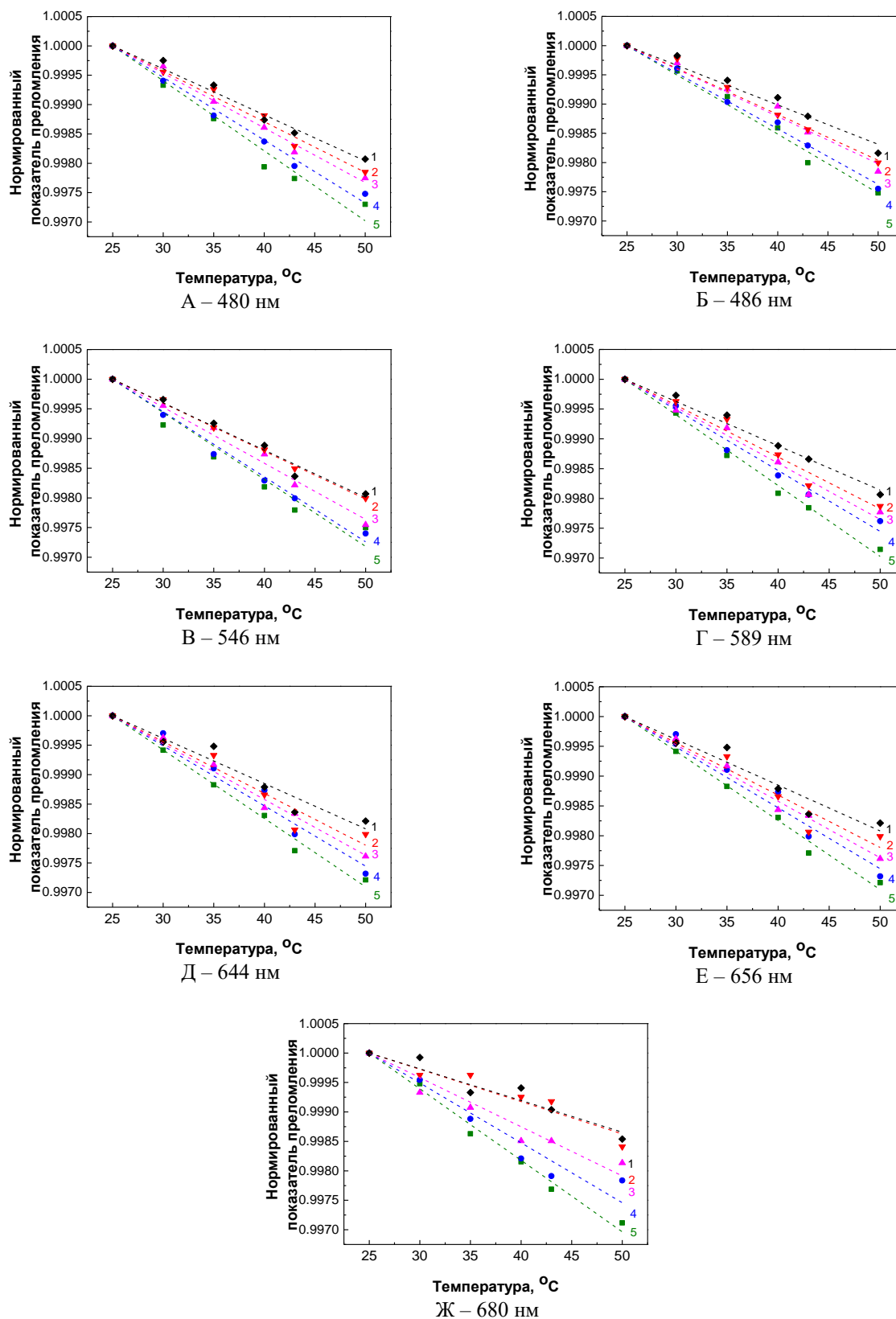


Рисунок 4.2 - Температурные зависимости нормированного показателя преломления растворов гемоглобина, гликированного гемоглобина и их смесей для длин волн видимого диапазона: А –480 нм, Б –486 нм, В –546 нм, Г –589 нм, Д –644 нм, Е –656 нм, Ж –680 нм. (1- Hb, 2- 3Hb:1HbA1c, 3 -1Hb:1HbA1c , 4- Hb:HbA1c, 5 -HbA1c)

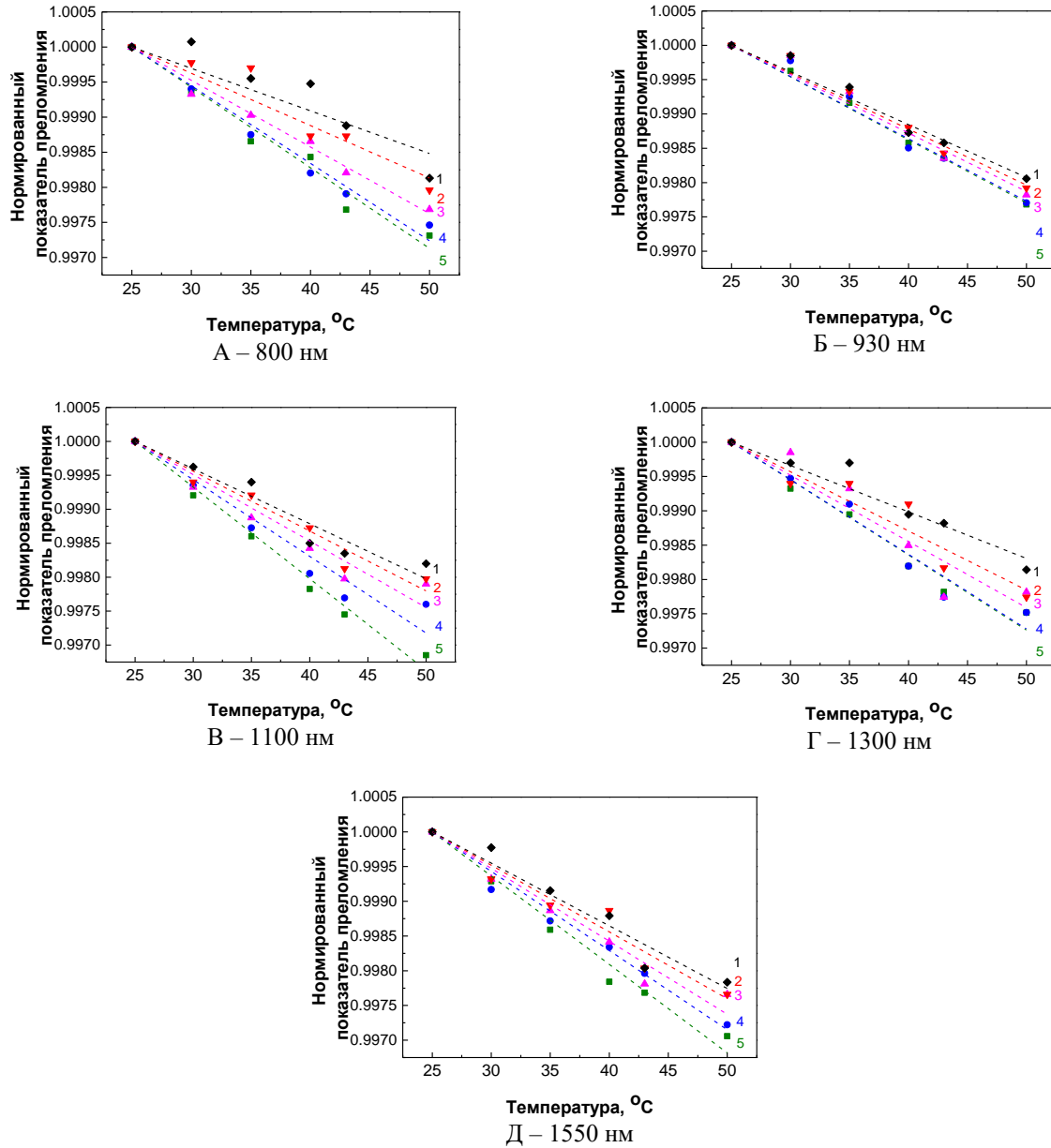
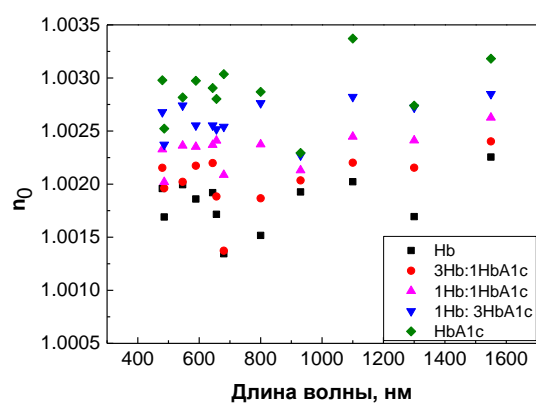


Рисунок 4.3 - Температурные зависимости нормированного показателя преломления растворов гемоглобина, гликированного гемоглобина и их смесей для длин волн БИК диапазона: А – 800 нм, Б – 930 нм, В – 1100 нм, Г – 1300 нм, Д – 1550 нм. (1-Нб, 2- 3Нб:1НбА1с, 3 -1Нб:1НбА1с, 4- Нб:НбА1с, 5 -НбА1с)

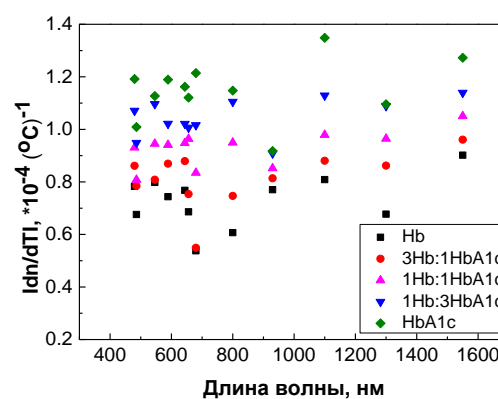
Таблица 4.1 - Данные для аппроксимации температурной зависимости нормированного показателя преломления растворов гемоглобина, гликированного гемоглобина и их смесей в диапазоне от (+25) до (+50)°C

НbA1c			
Длина волны, нм	$n_0(T=0^\circ\text{C})$	$dn/dT, 10^{-4} (^\circ\text{C}^{-1})$	R^2
480	1.0030	-1.19156	0.965
486	1.0025	-1.00915	0.983
546	1.0028	-1.12687	0.958
589	1.0030	-1.18945	0.992
644	1.0029	-1.16194	0.987
656	1.0028	-1.1209	0.996
680	1.0030	-1.21424	0.986
800	1.0029	-1.14765	0.964
930	1.0023	-0.91754	0.996
1100	1.0034	-1.34858	0.985
1300	1.0027	-1.09578	0.963
1550	1.0032	-1.27257	0.977
1Нb :3 НbA1c			
Длина волны, нм	$n_0(T=0^\circ\text{C})$	$dn/dT, 10^{-4} (^\circ\text{C}^{-1})$	R^2
480	1.0027	-1.07098	0.988
486	1.0024	-0.94861	0.994
546	1.0027	-1.09642	0.989
589	1.0026	-1.02131	0.978
644	1.0026	-1.02127	0.969
656	1.0025	-1.00663	0.988
680	1.0025	-1.01604	0.916
800	1.0028	-1.01520	0.978
930	1.0023	-0.90850	0.978
1100	1.0028	-1.12889	0.923
1300	1.0027	-1.08874	0.948
1550	1.0029	-1.13959	0.985
1Нb :1НbA1c			
Длина волны, нм	$n_0(T=0^\circ\text{C})$	$dn/dT, 10^{-4} (^\circ\text{C}^{-1})$	R^2
480	1.0023	-0.93083	0.987
486	1.0020	-0.80803	0.982
546	1.0024	-0.94519	0.986
589	1.0024	-0.94074	0.969
644	1.0024	-0.94790	0.987
656	1.0024	-0.96384	0.985
680	1.0021	-0.83477	0.938
800	1.0024	-0.89963	0.984
930	1.0021	-0.85190	0.974
1100	1.0025	-0.97887	0.928
1300	1.0024	-0.96445	0.878
1550	1.0026	-1.05058	0.949
3Нb : 1НbA1c			
Длина волны, нм	$n_0(T=0^\circ\text{C})$	$dn/dT, 10^{-4} (^\circ\text{C}^{-1})$	R^2
480	1.0022	-0.8615	0.981
486	1.0020	-0.7848	0.991
546	1.0020	-0.8086	0.997
589	1.0022	-0.8693	0.968
644	1.0022	-0.8793	0.925
656	1.0019	-0.7535	0.906

3Hb : 1HbA1c			
Длина волны, нм	$n_0(T=0^\circ\text{C})$	$dn/dT, 10^{-4} (^\circ\text{C}^{-1})$	R^2
680	1.0014	-0.5491	0.903
800	1.0019	-0.7467	0.915
930	1.0020	-0.8139	0.977
1100	1.0022	-0.8807	0.942
1300	1.0022	-0.8620	0.884
1550	1.0024	-0.9608	0.935
Hb			
Длина волны, нм	$n_0(T=0^\circ\text{C})$	$dn/dT, 10^{-4} (^\circ\text{C}^{-1})$	R^2
480	1.0020	-0.7832	0.982
486	1.0017	-0.6760	0.977
546	1.0020	0.7979	0.975
589	1.0019	-0.7438	0.989
644	1.0019	-0.7679	0.927
656	1.0017	-0.6862	0.985
680	1.0013	-0.5376	0.916
800	1.0015	-0.6069	0.868
930	1.0019	-0.7704	0.971
1100	1.0020	-0.8089	0.907
1300	1.0017	-0.6774	0.929
1550	1.0023	-0.9019	0.942



А



Б

Рисунок 4.4 - Начальное значение нормированного показателя преломления (А) и температурный инкремент (Б) растворов гемоглобина, гликированного гемоглобина и их смесей, определенные по формуле (4.4)

На Рисунке 4.5 показана зависимость температурного инкремента нормированного показателя преломления от концентрации гликированного гемоглобина в растворе. Полученная зависимость близка к линейной зависимости, что позволяет её использовать в качестве градуировочного графика для определения концентрации гликированного гемоглобина в растворе.

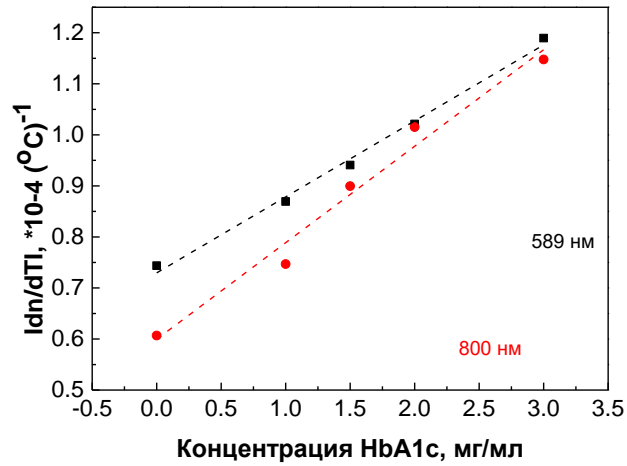


Рисунок 4.5 - Зависимость температурного инкремента нормированного показателя преломления от концентрации гликированного гемоглобина в растворе

Спектры флуоресценции гемоглобина и гликированного гемоглобина для выделенного диапазона длин волн 300-420 нм показаны на Рисунке 4.6, а их основные параметры приведены в Таблице 4.2.

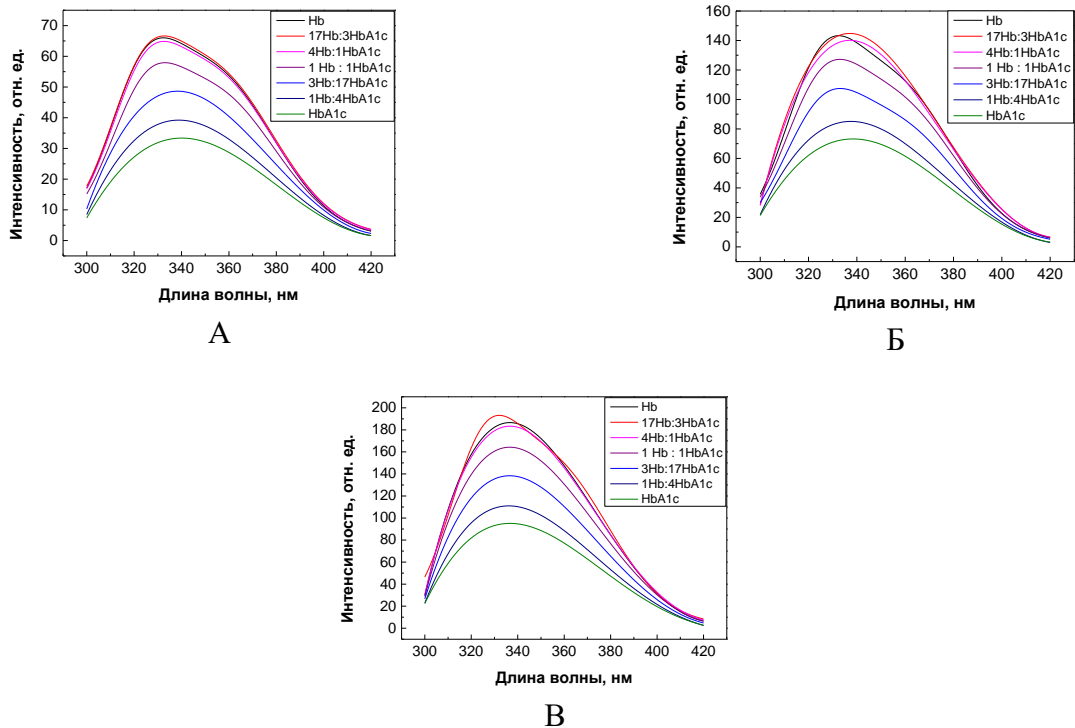


Рисунок 4.6 - Спектры флуоресценции растворов гемоглобина, гликированного гемоглобина и их смесей в диапазоне 300-420 нм при длине волны возбуждения: А –260 нм, Б – 270 нм, В –280 нм

Таблица 4.2 - Основные характеристики спектров флуоресценции растворов гемоглобина, гликированного гемоглобина и их смесей в диапазоне 300-420 нм при длине волны возбуждения 260 нм, 270 нм и 280 нм

260 нм				
	λ, нм	FWHM	Интенсивность, отн.ед.	R^2
Нб	322,7±0,1	71,6	66,7	0,9995
17Нб : 3НбА1с	322,8±0,1	71,4	66,9	0,9996
4Нб : 1НбА1с	322,9±0,1	71,3	65,2	0,9997
1Нб : 1НбА1с	323,1±0,1	72,3	58,6	0,9996
1Нб : 4НбА1с	342,5±0,3	73,8	49,3	0,9963
3Нб : 17НбА1с	342,9±0,3	75,7	39,6	0,9961
НбА1с	343,9±0,3	76,8	33,7	0,9962
270 нм				
	λ, nm	FWHM	Интенсивность, отн.ед.	R^2
Нб	331,3±0,3	70,3	143,3	0,976
17Нб : 3НбА1с	341,3±0,3	70,2	144,8	0,976
4Нб : 1НбА1с	341,4±0,3	70,7	140,1	0,977
1Нб : 1НбА1с	331,6±0,3	71,8	127,2	0,978
1Нб : 4НбА1с	332,5±0,3	73,3	107,4	0,979
3Нб : 17НбА1с	341,6±0,3	75,9	85,1	0,980
НбА1с	342,0±0,3	78,0	73,2	0,985
280 нм				
	λ, nm	FWHM	Интенсивность, отн.ед.	R^2
Нб	341,2±0,4	69,2	186,6	0,972
17Нб : 3НбА1с	341,2±0,4	68,9	193,1	0,971
4Нб : 1НбА1с	341,3±0,4	69,3	183,3	0,973
1Нб : 1НбА1с	341,3±0,4	70,3	164,2	0,972
1Нб : 4НбА1с	341,3±0,4	71,7	138,3	0,973
3Нб : 17НбА1с	341,1±0,4	73,9	111,0	0,970
НбА1с	341,4±0,4	76,2	95,1	0,974

Длины волн 260, 270 и 280 нм возбуждения спектра флуоресценции были выбраны, так как пик спектра флуоресценции белков крови, наблюдаемый при 320 нм, соответствует флуоресценции триптофана, который поглощает УФ-излучение с максимумами при 220 нм и 280 нм и флуоресценцией в белках при 328 ÷ 350 нм [248, 249]. Полученные спектральные зависимости были обработаны методом гауссова анализа в программе «OriginLab Pro».

Согласно данным, имеющимся в литературе, колебательная активность составляющей белковой части изменяется при присоединении глюкозы и формировании гликированного белка и может быть связана с флуоресценцией триптофановой и тирозиновой частей молекулы [250]. Сдвиг положения пика в коротковолновой области спектра возбуждения флуоресценции гликированных белков для разных длин волн возбуждения можно объяснить увеличением вклада флуоресценции тирозина. Таким образом, изменение положения максимума флуоресценции гемоглобина для разных длин волн возбуждения объясняется изменением

вклада флуоресценции триптофана и тирозина. Усиление колебаний триптофана приводит к эмиссии тирозина. Относительное изменение интенсивности флуоресценции триптофана и тирозина приводит к формированию составных спектров и изменению положения максимумов для гликированных и негликированных форм белков.

4.2 Экспериментальное исследование растворов гликированного альбумина человека методами многоволновой рефрактометрии и флуоресценции

Гликированный альбумин также предложен в качестве дополнительного маркера для контроля уровня гликемии у людей с сахарным диабетом. *In vivo* доля гликированного альбумина у здоровых людей колеблется от 1%-а до 10%-ов, а при сахарном диабете эта доля может увеличиваться в два-три раза. Данные об оптических свойствах гликированных белков, в частности альбумина, могут помочь в разработке новых диагностических методов и улучшения уже имеющихся [134, 143].

4.2.1 Методы и материалы исследования растворов гликированного и негликированного альбумина

Исследования оптических свойств, аналогичные описанным в разделе 4.1.1 для растворов гемоглобина и гликированного гемоглобина и их смесей, были выполнены для растворов сывороточного альбумина человека, гликированного альбумина человека и их смесей.

В качестве образцов для исследования были взяты растворы человеческого альбумина (Alb) 0.65 мг/мл и гликированного альбумина (GA) 0.65 мг/мл. Выбор данных концентраций также обусловлен требованиями используемого лабораторного оборудования для обеспечения достоверных и корректных измерений. Для приготовления растворов заданной концентрации использовали лиофилизированный порошок сывороточного альбумина человека (Alb) и гликированного альбумина человека (GA) (Sigma-Aldrich, США). Разбавление проводили при помощи фосфатного буферного раствора (pH=7.4). Смеси растворов были получены в результате соединения растворов гликированной и негликированной форм белков с одинаковой концентрацией в различных пропорциях: смесь 1 - 4Alb: 1 GA; смесь 2 - 17Alb: 3 GA; смесь 3 - 1Alb: 1 GA; смесь 4 - 3Alb: 17 GA; смесь 5 - 1Alb: 4 GA.

4.2.2 Результаты исследования растворов гликированного и негликированного альбумина

На Рисунке 4.7 представлен график для дисперсионной зависимости альбумина и гликированного альбумина и построены аппроксимационные кривые по формуле Зельмейера (1.20).

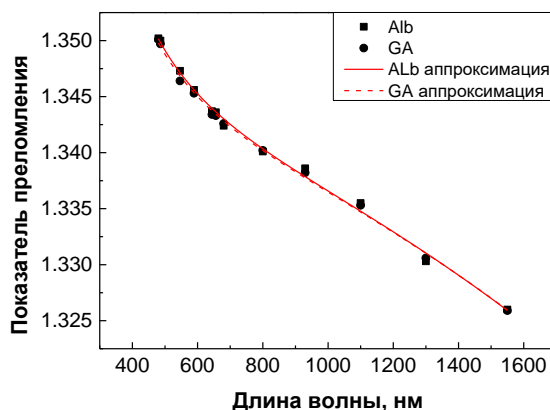


Рисунок 4.7 - Дисперсионная зависимость растворов гликированного и негликированного альбумина с концентрацией 0.65 мг/мл

По результатам измерений на 12-ти длинах волн была выполнена аппроксимация по формуле Зельмейера (1.20). После вычисления коэффициентов для восстановления дисперсионной зависимости растворов гликированного и негликированного альбумина в диапазоне длин волн 480-1550 нм при температуре (+25)°C могут быть использованы формулы:

$$n_{\text{Alb}}^2(\lambda) = 1 + \frac{0,79727 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 8266,1298} + \frac{748,3268 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 4,2833}. \quad (4.5)$$

$$n_{\text{GA}}^2(\lambda) = 1 + \frac{0,797 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 8060,0164} + \frac{744,5313 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 4,3066}. \quad (4.6)$$

Величина среднего статистического отклонения для аппроксимации показателя преломления растворов сывороточного альбумина и гликированного альбумина по формуле Зельмейера равна 0.995 и 0.997 соответственно.

Результаты рефрактометрических измерений и коэффициенты, найденные в результате аппроксимации по формуле (4.3), приведены в Таблице 4.3 и показаны на Рисунках 4.8, 4.9 и 4.10. На Рисунке 4.11 показана зависимость температурного инкремента нормированного показателя преломления от концентрации гликированного альбумина в растворе. Полученная зависимость, аналогично как для растворов гемоглобина в Разделе 4.2.1., близка к линейной зависимости, что позволяет её использовать в качестве градуировочного графика для определения концентрации гликированного альбумина в растворе.

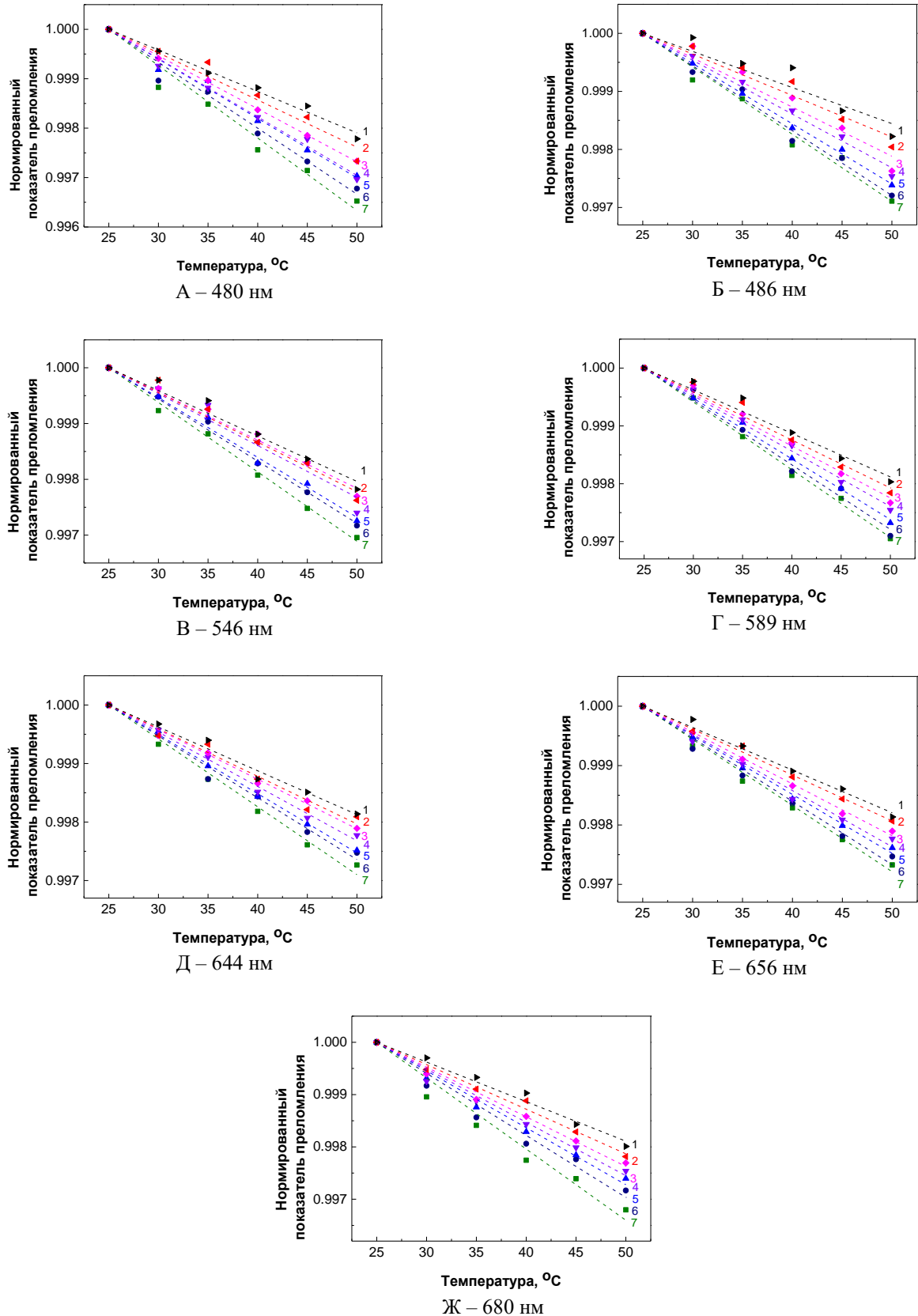


Рисунок 4.8 - Температурные зависимости нормированного показателя преломления растворов альбумина, гликированного альбумина и их смесей для длин волн видимой области: А – 480 нм, Б – 486 нм, В – 546 нм, Г – 589 нм, Д – 644 нм, Е – 656 нм, Ж – 680 нм. (1-Alb, 2-Alb:GA, 3 - Alb:GA, 4- Alb:GA, 5 - Alb:GA, 6 - Alb:GA, 7 - GA)

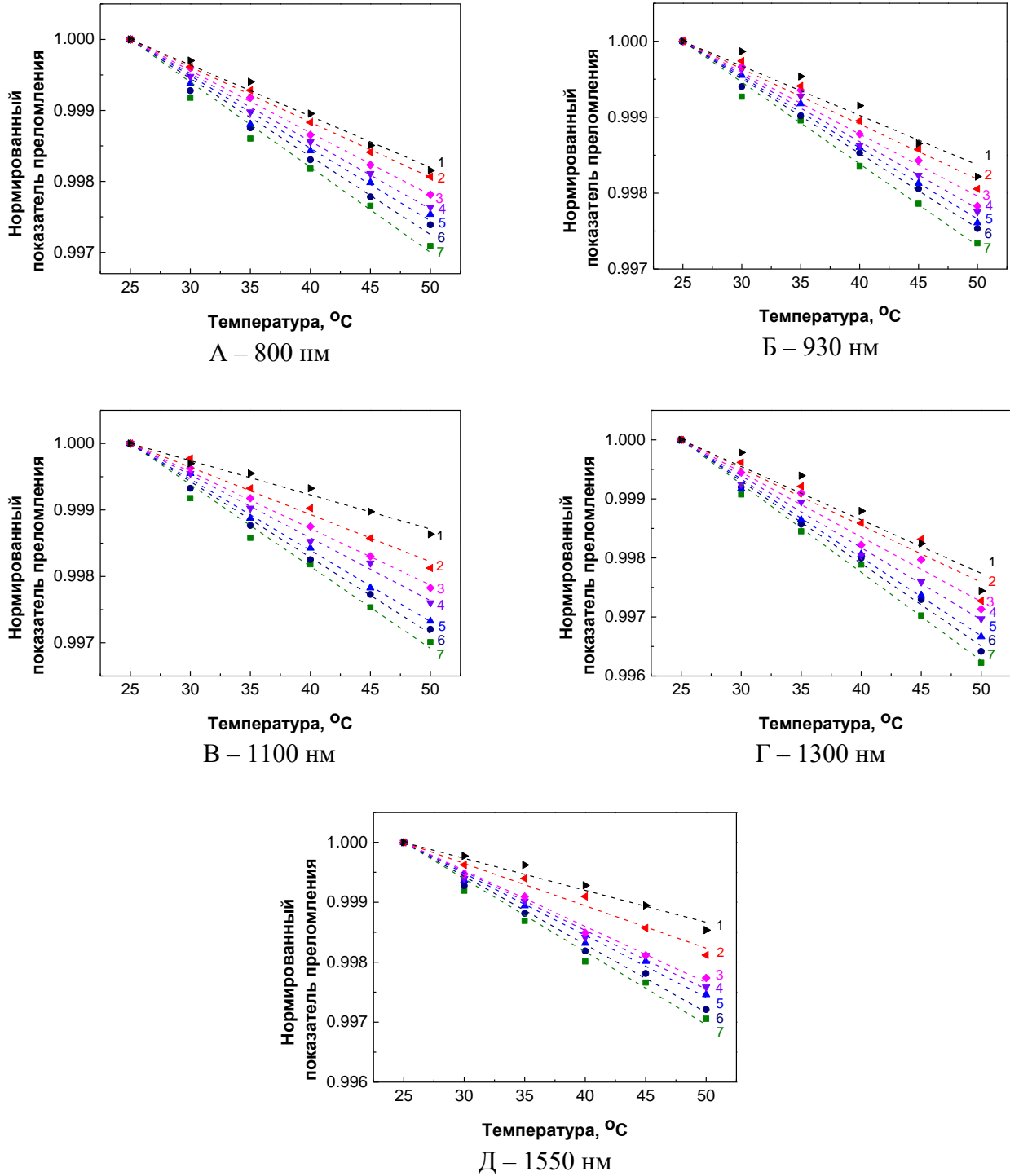


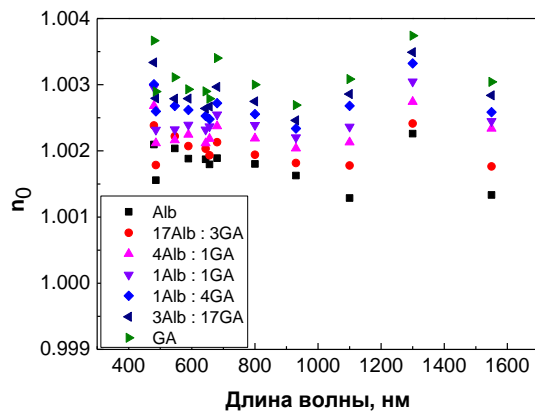
Рисунок 4.9 - Температурные зависимости нормированного показателя преломления растворов альбумина, гликированного альбумина и их смесей для длин волн БИК области: А – 800 нм, Б – 930 нм, В – 1100 нм, Г – 1300 нм, Д – 1550 нм. (1-Alb, 2- Alb:GA, 3 - Alb:GA, 4- Alb:GA, 5 - Alb:GA, 6 - Alb:GA, 7 - GA)

Таблица 4.3 - Данные для аппроксимации температурной зависимости нормированного показателя преломления растворов альбумина, гликированного альбумина и их смесей в диапазоне от (+25) до (+50)°C

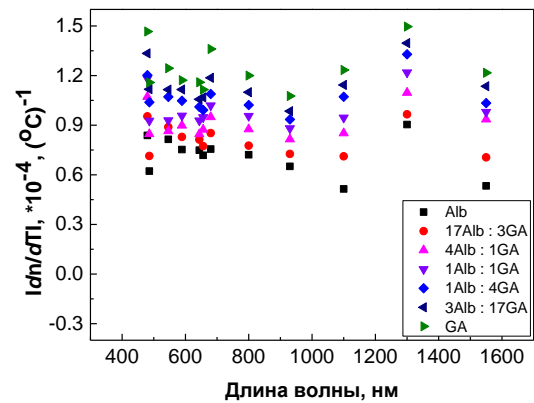
GA			
Длина волны, нм	$n_0(T=0^\circ\text{C})$	$dn/dT, 10^{-4} (^\circ\text{C}^{-1})$	R^2
480	1.0037	-1.4664	0.984
486	1.0029	-1.1583	0.973
546	1.0031	-1.2443	0.959
589	1.0029	-1.1719	0.966
644	1.0029	-1.1597	0.970
656	1.0028	-1.1154	0.962
680	1.0034	-1.3608	0.960
800	1.0030	-1.2003	0.950
930	1.0027	-1.0766	0.949
1100	1.0031	-1.2339	0.945
1300	1.0037	-1.4958	0.963
1550	1.0030	-1.2168	0.977
3Alb:17GA			
Длина волны, нм	$n_0(T=0^\circ\text{C})$	$dn/dT, 10^{-4} (^\circ\text{C}^{-1})$	R^2
480	1.0033	-1.3342	0.959
486	1.0028	-1.1174	0.898
546	1.0028	-1.1154	0.982
589	1.0028	-1.1159	0.964
644	1.0026	-1.0566	0.986
656	1.0027	-1.0680	0.957
680	1.0030	-1.1864	0.930
800	1.0028	-1.0993	0.982
930	1.0025	-0.9847	0.930
1100	1.0029	-1.1435	0.961
1300	1.0035	-1.3963	0.925
1550	1.0028	-1.1355	0.994
1Alb:4GA			
Длина волны, нм	$n_0(T=0^\circ\text{C})$	$dn/dT, 10^{-4} (^\circ\text{C}^{-1})$	R^2
480	1.0030	-1.2021	0.975
486	1.0026	-1.0389	0.991
546	1.0027	-1.0715	0.976
589	1.0026	-1.0475	0.959
644	1.0025	1.0109	0.912
656	1.0025	-0.9915	0.970
680	1.0027	-1.0886	0.950
800	1.0026	-1.0218	0.937
930	1.0023	-0.9350	0.930
1100	1.0027	-1.0721	0.972
1300	1.0033	-1.3285	0.939
1550	1.0026	-1.0337	0.955
1Alb:1GA			
Длина волны, нм	$n_0(T=0^\circ\text{C})$	$dn/dT, 10^{-4} (^\circ\text{C}^{-1})$	R^2
480	1.0030	-1.1826	0.991
486	1.0023	-0.9271	0.967

1Alb:1GA			
Длина волны, нм	$n_0(T=0^\circ\text{C})$	$dn/dT, 10^{-4} (^\circ\text{C}^{-1})$	R^2
546	1.0023	-0.9295	0.988
589	1.0024	-0.9573	0.963
644	1.0023	-0.9281	0.930
656	1.0024	-0.9475	0.959
680	1.0026	-1.0194	0.987
800	1.0024	-0.9556	0.969
930	1.0022	-0.8809	0.909
1100	1.0024	-0.9457	0.952
1300	1.0031	-1.2187	0.953
1550	1.0025	-0.9796	0.992
4Alb:1GA			
Длина волны, нм	$n_0(T=0^\circ\text{C})$	$dn/dT, 10^{-4} (^\circ\text{C}^{-1})$	R^2
480	1.0027	-1.0721	0.994
486	1.0021	-0.8466	0.978
546	1.0022	-0.8646	0.963
589	1.0023	-0.8983	0.966
644	1.0021	-0.8461	0.969
656	1.0022	-0.8734	0.995
680	1.0024	-0.9496	0.985
800	1.0022	-0.8756	0.981
930	1.0020	-0.8152	0.921
1100	1.0021	-0.8519	0.956
1300	1.0027	-1.0967	0.823
1550	1.0023	-0.9352	0.929
17Alb:3GA			
Длина волны, нм	$n_0(T=0^\circ\text{C})$	$dn/dT, 10^{-4} (^\circ\text{C}^{-1})$	R^2
480	1.0024	-0.9535	0.897
486	1.0018	-0.7142	0.882
546	1.0022	-0.8886	0.971
589	1.0021	-0.8289	0.966
644	1.0020	-0.8130	0.979
656	1.0019	-0.7733	0.974
680	1.0021	-0.8524	0.955
800	1.0019	-0.7766	0.985
930	1.0018	-0.7265	0.966
1100	1.0018	-0.7118	0.969
1300	1.0024	-0.9655	0.995
1550	1.0018	-0.7058	0.985
Alb			
Длина волны, нм	$n_0(T=0^\circ\text{C})$	$dn/dT, 10^{-4} (^\circ\text{C}^{-1})$	R^2
480	1.0021	-0.8383	0.938
486	1.0016	-0.6226	0.949
546	1.0020	-0.8149	0.871
589	1.0019	-0.7528	0.942
644	1.0019	-0.7491	0.919

Alb			
Длина волны, нм	$n_0(T=0^\circ\text{C})$	$dn/dT, 10^{-4} (^\circ\text{C}^{-1})$	R^2
656	1.0018	-0.7180	0.985
680	1.0019	-0.7557	0.949
800	1.0018	-0.7212	0.985
930	1.0016	-0.6510	0.967
1100	1.0013	-0.5148	0.948
1300	1.0023	-0.9039	0.952
1550	1.0013	-0.5333	0.953



А



Б

Рисунок 4.10 - Начальное значение нормированного показателя преломления (А) и температурный инкремент (Б) растворов альбумина, гликированного альбумина и их смесей, определенные по формуле (1.20)

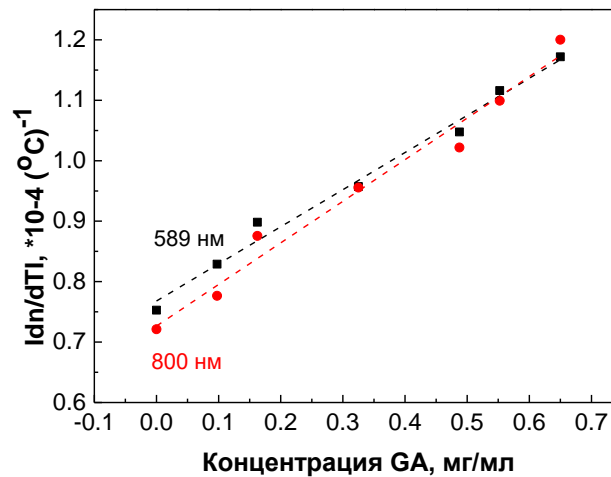


Рисунок 4.11 - Зависимость температурного инкремента нормированного показателя преломления от концентрации гликированного альбумина в растворе

Длины волн 260, 270 и 280 нм возбуждения спектра флуоресценции были выбраны, так как пик спектра флуоресценции белков крови, наблюдаемый при 320 нм, соответствует флуоресценции триптофана, который поглощает УФ-излучение с максимумами при 220 нм и 280 нм и флуоресценцией в белках при 328 ÷ 350 нм [106, 249].

Полученные спектральные зависимости были обработаны методом гауссова анализа в программе «OriginLab Pro».

На Рисунке 4.12 и в Таблице 4.4 даны основные параметры спектров флуоресценции альбумина и гликированного альбумина для выделенного диапазона длин волн 300-500 нм.

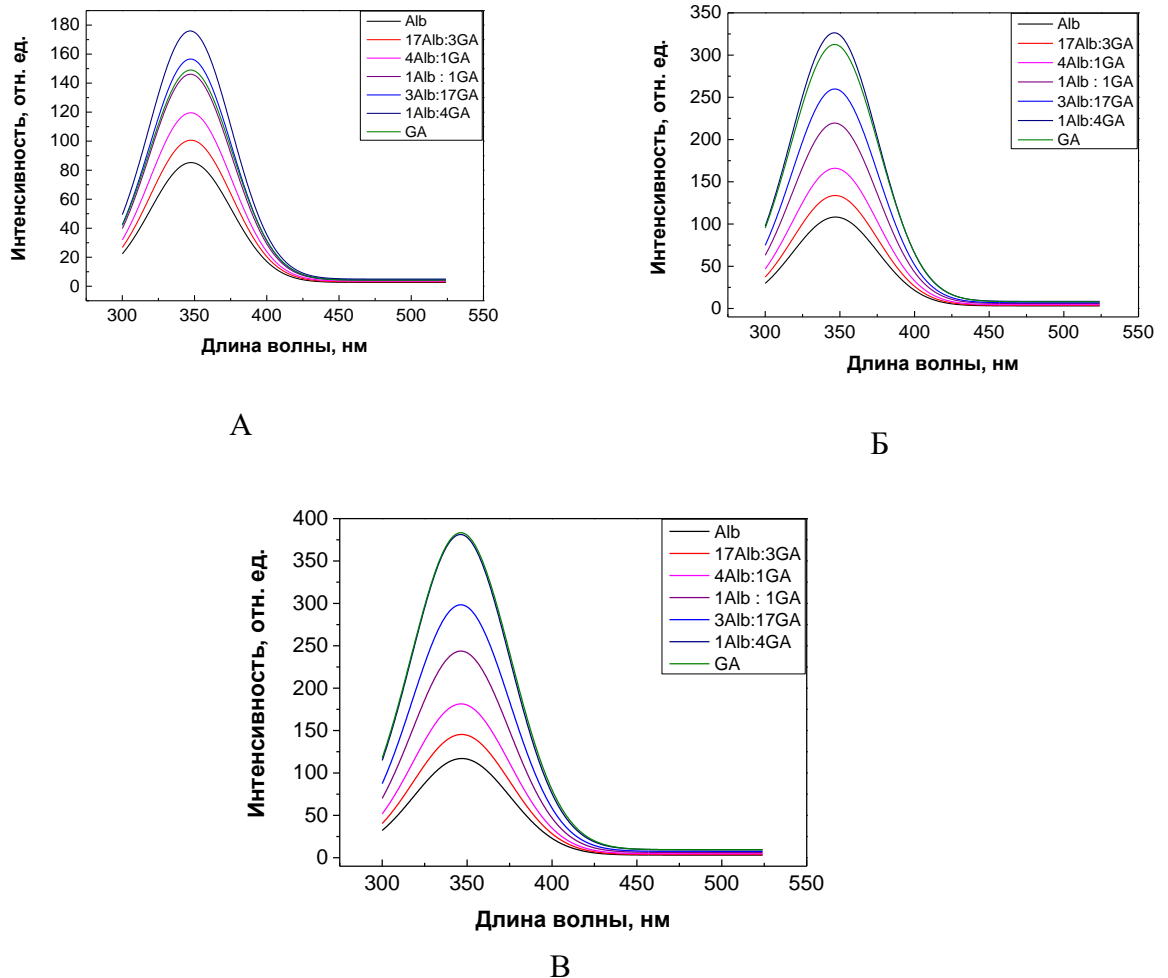


Рисунок 4.12 - Спектры флуоресценции растворов альбумина, гликированного альбумина и их смесей в диапазоне 300-500 нм при длине волны возбуждения: А – 260 нм, Б – 270 нм, В – 280 нм

Таблица 4.4 - Основные характеристики спектров флуоресценции растворов альбумина, гликированного альбумина и их смесей в диапазоне 300-500 нм при длине волны возбуждения 260 нм, 270 нм и 280 нм

260 нм				
	λ, nm	FWHM	Интенсивность, отн.ед.	R^2
Alb	347.6±0.2	66.1	85.2	0.987
17Alb : 3GA	347.5±0.2	66.5	100.7	0.988
4Alb : 1GA	347.3±0.2	66.5	119.6	0.988
1Alb : 1GA	347.2±0.2	66.8	146.1	0.989
1Alb : 4GA	347.3±0.2	66.8	156.6	0.990
3Alb : 17GA	346.9±0.2	67.3	175.9	0.991
GA	347.3±0.2	67.9	149.0	0.992
270 нм				
	λ, nm	FWHM	Интенсивность, отн.ед.	R^2
Alb	347.0±0.2	66.9	108.2	0.988
17Alb : 3GA	346.8±0.2	66.9	133.7	0.988
4Alb : 1GA	346.7±0.2	67.2	165.9	0.989
1Alb : 1GA	346.5±0.2	67.4	219.5	0.990
1Alb : 4GA	346.6±0.2	67.6	259.9	0.991
3Alb : 17GA	346.3±0.2	68.3	326.4	0.992
GA	346.5±0.2	69.2	312.5	0.994
280 нм				
	λ, nm	FWHM	Интенсивность, отн.ед.	R^2
Alb	346.9±0.2	66.8	117.0	0.988
17Alb : 3GA	346.8±0.2	66.9	145.4	0.989
4Alb : 1GA	346.4±0.2	67.2	181.5	0.989
1Alb : 1GA	346.3±0.2	67.3	243.7	0.990
1Alb : 4GA	346.3±0.2	67.8	298.3	0.991
3Alb : 17GA	346.1±0.2	68.3	381.3	0.992
GA	346.3±0.2	69.3	383.4	0.994

Изменение положения пика интенсивности не изменяется у растворов альбумина, гликированного альбумина и их смесей. Полученный результат хорошо согласуется с литературными данными, так как гликирование альбумина не приводит к изменению полярности окружения триптофановых остатков и положение максимума полосы собственной флуоресценции остается неизменным [161, 251]. При этом полученные результаты показали, что, как и при гликировании альбумина, при увеличении содержания гликированного альбумина в растворе наблюдается заметный рост интенсивности флуоресцентной полосы.

4.3 Экспериментальное исследование рефракции гемоглобина, полученного из крови добровольцев с сахарным диабетом I-го типа, методом многоволновой рефрактометрии в диапазоне 480-1500 нм

Актуальной задачей в настоящее время является поиск методов, позволяющих быстро и безболезненно проводить диагностику социально-значимых заболеваний, в том числе сахарного диабета. Оптические методы занимают особое место в области медицинской диагностики и терапии, так как обладают рядом преимуществ и позволяют разработать компактное и быстрое оборудование. Многие работы демонстрируют возможность использования оптических методов для определения гликированных белков крови, а также показывают возможность определения уровня гликемии [153, 165, 170].

4.3.1 Методы и материалы исследования рефракции гемоглобина, полученного из крови добровольцев с сахарным диабетом I-го типа

Экспериментальные исследования проводились на растворах гемоглобина, полученного из цельной крови пациентов-добровольцев с сахарным диабетом I-го типа. Выбор добровольцев осуществлялся таким образом, что какие-либо сопутствующие хронические заболевания у пациентов-добровольцев отсутствовали. Забор цельной крови был выполнен из вены в вакуумную пробирку с антикоагулянтом K_2EDTA . Образцы крови были взяты в Государственной организации здравоохранения «Саратовская городская клиническая больница No 2 имени В. И. Разумовского» с разрешения добровольцев. Разделение крови на фракции проводилось путем центрифугирования пробирок в течение 10 мин при 2000 об/мин и при комнатной температуре. После центрифугирования кровь разделяется на плазму, лейко-тромбоцитарный слой и суспензию эритроцитов. Для дальнейшего проведения гемолиза и получения растворов гемоглобина суспензию эритроцитов отделяли, трижды подвергали промыванию буферным раствором и помещали во флакон для замораживания в морозильной камере при температуре $(-25)^\circ C$ в течение 24 ч. В Таблице 4.5 приведены биохимические параметры крови добровольцев, полученные в лаборатории медицинского учреждения.

Таблица 4.5 - Биохимические параметры крови добровольцев с сахарным диабетом I-го типа

	Общий гемоглобин	НbA1с, %	Глюкоза	Замечания
Доброволец 1 (контроль)	146	6.9	385	38 лет, сопутствующих заболеваний нет
Доброволец 2 (СД)	131	7.8	435	18 лет, сопутствующих заболеваний нет
Доброволец 3 (СД)	169*	10.4*	412	22 года, сопутствующих заболеваний нет
Доброволец 4 (СД)	123*	12*	407*	18 лет, сопутствующих заболеваний нет
Доброволец 5 (СД)	128*	12.9*	435*	31 год, сопутствующих заболеваний нет

достоверность отличий: * $p \leq 0.05$ по сравнению с добровольцем 1

Для рефрактометрических измерений использовали коммерческий многоволновой рефрактометр Abbe DR-M2/1550 (Атаго, Япония), конструктивные особенности и работа которого описаны в Разделе 2.1. Для выбора длины волны использовались узкополосные интерференционные фильтры для 480 (± 2) нм, 486 (± 2) нм, 546 (± 2) нм, 589 (± 2) нм, 644 (± 2) нм, 656 (± 2) нм, 680 (± 5) нм, 800 (± 8) нм, 930 (± 6) нм, 1100 (± 26) нм, 1300 (± 25) нм и 1550 (± 25) нм. При измерении показателя преломления температура изменялась от (+24) до (+50) °С. Показатель преломления рассчитывался как среднее значение по 3 измерениям для каждого из 3 образцов измеряемого раствора.

4.3.2 Результаты исследования рефракции гемоглобина, полученного из крови добровольцев с сахарным диабетом I-го типа

На Рисунке 4.13 показана дисперсионная зависимость показателя преломления образцов раствора гемоглобина, полученного из цельной крови добровольцев с сахарным диабетом и без него при комнатной температуре (+24°C). Экспериментальные данные приведены в Таблице 4.6.

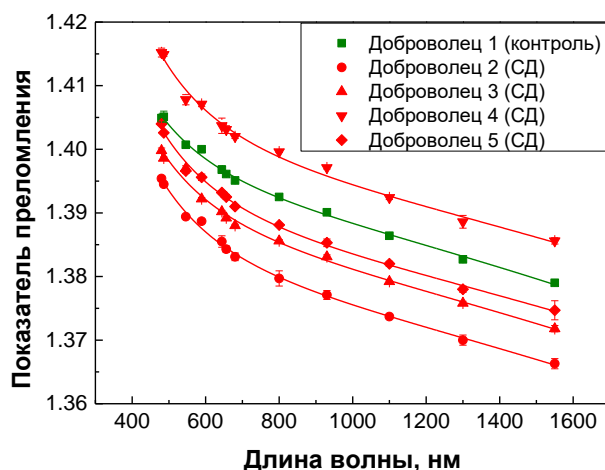


Рисунок 4.13 - Дисперсионная зависимость показателя преломления растворов гемоглобина, полученного из цельной крови добровольцев с сахарным диабетом I-го типа и без (Символы - экспериментальные данные, линии – аппроксимация по формуле Зельмейера)

Таблица 4.6 - Показатель преломления растворов гемоглобина, полученного из цельной крови добровольцев с сахарным диабетом I-го типа и без

Длина волны, нм	Доброволец 1 (контроль) ($\pm CO^*$)	Доброволец 2 (СД) ($\pm CO^*$)	Доброволец 3 (СД) ($\pm CO^*$)	Доброволец 4 (СД) ($\pm CO^*$)	Доброволец 5 (СД) ($\pm CO^*$)
480	1.4049 (± 0.0006)	1.3954 (± 0.0004)	1.3998 (± 0.0004)	1.4152 (± 0.0007)	1.4040 (± 0.0001)
486	1.4051 (± 0.0009)	1.3945 (± 0.0003)	1.3986 (± 0.0002)	1.4149 (± 0.0003)	1.4026 (± 0.0002)
546	1.4007 (± 0.0004)	1.3894 (± 0.0002)	1.3970 (± 0.0004)	1.4078 (± 0.0008)	1.3966 (± 0.0004)
589	1.4000 (± 0.0003)	1.3887 (± 0.0002)	1.3922 (± 0.0002)	1.4071 (± 0.0004)	1.3956 (± 0.0005)
644	1.3968 (± 0.0006)	1.3855 (± 0.0009)	1.3902 (± 0.0002)	1.4037 (± 0.0012)	1.3932 (± 0.0003)
656	1.3961 (± 0.0004)	1.3843 (± 0.0005)	1.3892 (± 0.0003)	1.4031 (± 0.0006)	1.3925 (± 0.0004)
680	1.3951 (± 0.0003)	1.3831 (± 0.0006)	1.3880 (± 0.0002)	1.4020 (± 0.0003)	1.3910 (± 0.0003)
800	1.3925 (± 0.0004)	1.3797 (± 0.0012)	1.3856 (± 0.0002)	1.3996 (± 0.0001)	1.3881 (± 0.0002)
930	1.3901 (± 0.0001)	1.3771 (± 0.0007)	1.3831 (± 0.0003)	1.3971 (± 0.0002)	1.3853 (± 0.0006)
1100	1.3864 (± 0.0001)	1.3737 (± 0.0003)	1.3792 (± 0.0002)	1.3924 (± 0.0003)	1.3820 (± 0.0004)
1300	1.3827 (± 0.0003)	1.3700 (± 0.0008)	1.3758 (± 0.0003)	1.3886 (± 0.0010)	1.3780 (± 0.0005)
1550	1.3790 (± 0.0003)	1.3663 (± 0.0008)	1.3718 (± 0.0005)	1.3856 (± 0.0005)	1.3747 (± 0.0015)

*CO – стандартное отклонение

Для полученных растворов была построена зависимость экспериментально измеренного показателя преломления от концентрации общего гемоглобина (Таблица 4.5). Полученная зависимость имеет линейный вид и показана на Рисунках 4.14 (А) и 4.14 (Б). Данные для линейной аппроксимации зависимости показателя преломления раствора гемоглобина от концентрации общего гемоглобина приведены в Таблице 4.7.

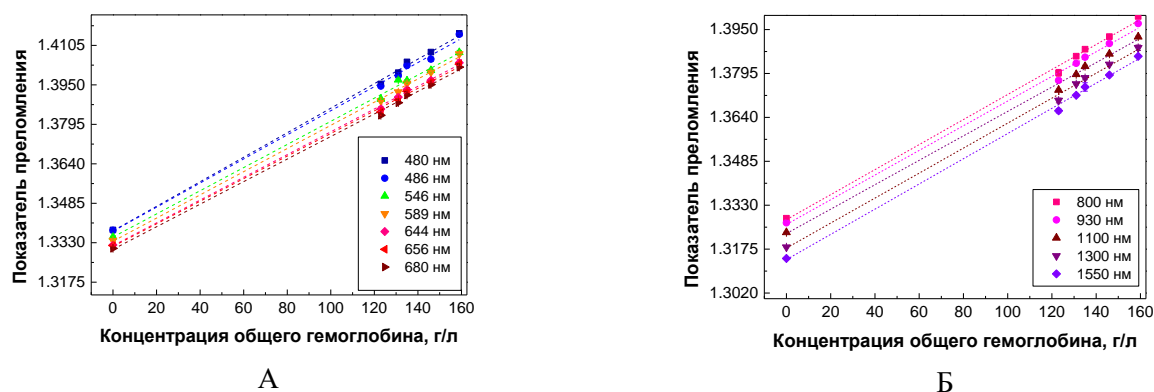


Рисунок 4.14 - Зависимость показателя преломления раствора гемоглобина, полученного из цельной крови добровольцев, от концентрации общего гемоглобина (Символы - экспериментальные данные, линии – линейная аппроксимация)

Таблица 4.7 - Коэффициенты для аппроксимации концентрационной зависимости показателя преломления растворов гемоглобина, полученного из цельной крови добровольцев с сахарным диабетом I-го типа и без

Длина волны, нм	$n_0, (\pm CO^*)$	$dn/dC, 10^{-4} 1/^\circ C, (\pm CO^*)$	R^2
480	1.3377 (± 0.0012)	4.817 (± 0.096)	0.998
486	1.3375 (± 0.0016)	4.733 (± 0.126)	0.996
546	1.3352 (± 0.0014)	4.545 (± 0.113)	0.997
589	1.3336 (± 0.0009)	4.553 (± 0.073)	0.998
644	1.3319 (± 0.0009)	4.471 (± 0.071)	0.999
656	1.3316 (± 0.0012)	4.436 (± 0.092)	0.998
680	1.3304 (± 0.0012)	4.431 (± 0.092)	0.998
800	1.3279 (± 0.0015)	4.417 (± 0.116)	0.997
930	1.3262 (± 0.0016)	4.353 (± 0.126)	0.996
1100	1.3230 (± 0.0013)	4.311 (± 0.105)	0.997
1300	1.3179 (± 0.0012)	4.410 (± 0.916)	0.998
1550	1.3138 (± 0.0013)	4.450 (± 0.101)	0.997

*CO- стандартное отклонение

Чтобы исключить влияние концентрации гемоглобина на показатель преломления и для удобства построения температурных зависимостей, показатель преломления нормировался, путем деления экспериментального показателя на величину начального показателя при температуре (+24) °С.

$$n_{\text{норм}}(T) = \frac{n_{\text{эксп}}(T)}{n_{\text{эксп}}(T=24^{\circ}\text{C})}, \quad (4.7)$$

где $n_{\text{эксп}}(T)$ –показатель преломления, измеренный при фиксированной температуре от (+24) до (+50)°С, $n_{\text{эксп}}(T=24^{\circ}\text{C})$ – показатель преломления, измеренный при (+24) °С.

В дальнейшем для аппроксимации температурной зависимости нормированного показателя преломления растворов гемоглобина, полученного из цельной крови добровольцев с сахарным диабетом и без, в диапазоне температур от (+24) до (+50)°С была использована формула линейной зависимости:

$$n(T) = n_0(T = 0^{\circ}\text{C}) + \frac{dn}{dT}T. \quad (4.8)$$

Результаты измерений и коэффициенты, найденные в результате аппроксимации по формуле (4.3), приведены в Таблицах 4.8 и 4.9 и показаны на Рисунках 4.15, 4.16 и 4.17.

Таблица 4.8 - Начальное значение (n_0) температурной зависимости нормированного показателя преломления раствора гемоглобина, полученного из цельной крови добровольцев с сахарным диабетом I-го типа и без для температуры от (+24)°С до (+50)°С

Длина волны, нм	Доброволец 1 (контроль)	Доброволец 2 (СД)	Доброволец 3 (СД)	Доброволец 4 (СД)	Доброволец 5 (СД)
480	1.0036	1.0048	1.0050	1.0026	1.0036
486	1.0035	1.0040	1.0037	1.0026	1.0034
546	1.0021	1.0022	1.0039	1.0021	1.0026
589	1.0028	1.0029	1.0045	1.0016	1.0029
644	1.0034	1.0025	1.0028	1.0030	1.0028
656	1.0033	1.0026	1.0022	1.0024	1.0029
680	1.0030	1.0035	1.0028	1.0025	1.0025
800	1.0032	1.0024	1.0023	1.0020	1.0020
930	1.0031	1.0017	1.0027	1.0027	1.0022
1100	1.0033	1.0021	1.0020	1.0015	1.0020
1300	1.0028	1.0026	1.0043	1.0024	1.0022
1550	1.0032	1.0033	1.0043	1.0026	1.0023

Таблица 4.9 - Температурный инкремент показателя преломления раствора гемоглобина, полученного из цельной крови добровольцев с сахарным диабетом I-го типа и без для температуры от (+24)°C до (+50)°C

Длина волны, нм	Доброволец 1 (контроль) ($\pm CO^*$)	Доброволец 2 (СД) ($\pm CO^*$)	Доброволец 3 (СД) ($\pm CO^*$)	Доброволец 4 (СД) ($\pm CO^*$)	Доброволец 5 (СД) ($\pm CO^*$)
480	1.3680 (± 0.0231)	1.5963 (± 0.0747)	1.7630 (± 0.1435)	1.0568 (± 0.0858)	1.9443 (± 0.1319)
486	1.2506 (± 0.0303)	1.4756 (± 0.0578)	1.6549 (± 0.0905)	1.0562 (± 0.0682)	1.5581 (± 0.0788)
546	1.1043 (± 0.0492)	1.3450 (± 0.0693)	1.3766 (± 0.0767)	1.0446 (± 0.1149)	1.2889 (± 0.0748)
589	0.9959 (± 0.0600)	1.2851 (± 0.1102)	1.3645 (± 0.0463)	1.0432 (± 0.0733)	1.2504 (± 0.0285)
644	0.9060 (± 0.0594)	1.2778 (± 0.0664)	1.3130 (± 0.1009)	1.0104 (± 0.0723)	1.2042 (± 0.0432)
656	0.9704 (± 0.0723)	1.0927 (± 0.0886)	1.2053 (± 0.0734)	0.9714 (± 0.0323)	1.1789 (± 0.0375)
680	0.7251 (± 0.0649)	1.0880 (± 0.1104)	1.0037 (± 0.0473)	0.8896 (± 0.0260)	1.0738 (± 0.0419)
800	0.9302 (± 0.0902)	0.9845 (± 0.0310)	0.9760 (± 0.0368)	0.7716 (± 0.0835)	1.0736 (± 0.0433)
930	0.9523 (± 0.0385)	0.9674 (± 0.0875)	0.9727 (± 0.076)	0.7539 (± 0.0673)	1.0725 (± 0.0506)
1100	0.6808 (± 0.0560)	0.8281 (± 0.0557)	0.8259 (± 0.0709)	0.7296 (± 0.0436)	0.9841 (± 0.0507)
1300	0.7669 (± 0.0786)	0.6955 (± 0.0438)	0.8211 (± 0.0276)	0.6410 (± 0.0428)	0.9039 (± 0.0342)
1550	0.5929 (± 0.0576)	0.6712 (± 0.0649)	0.8172 (± 0.0402)	0.5232 (± 0.0354)	0.8554 (± 0.0246)

*CO – стандартное отклонение

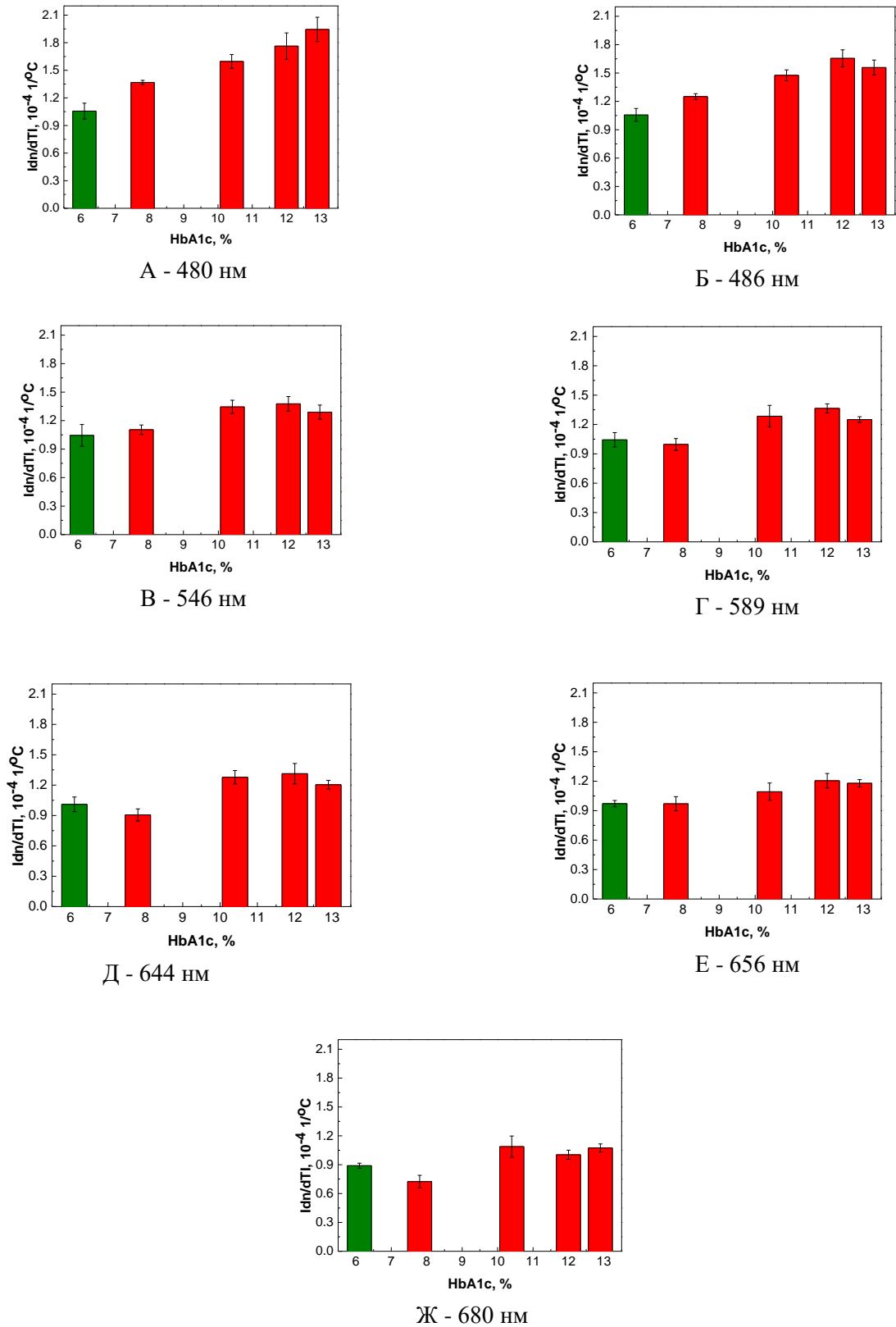


Рисунок 4.15 - Корреляция температурного инкремента показателя преломления раствора гемоглобина, полученного от добровольцев с сахарным диабетом I-го типа и без, и количества гликированного гемоглобина в исследуемом растворе: А – 480 нм; Б – 486 нм; В – 546 нм; Г – 589 нм; Д – 644 нм; Е – 656 нм; Ж – 680 нм.

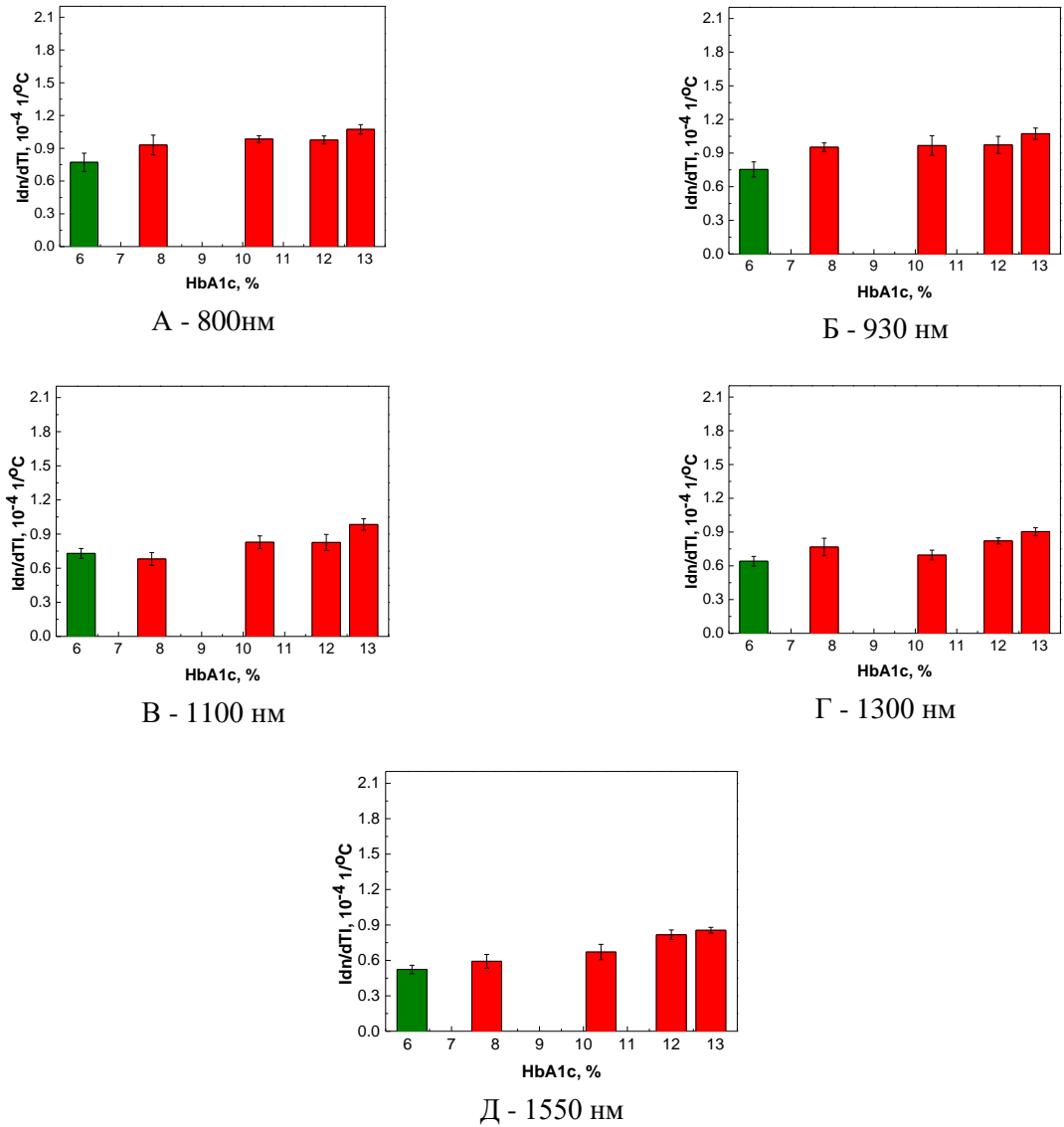


Рисунок 4.16 - Корреляция температурного инкремента показателя преломления раствора гемоглобина, полученного от добровольцев с сахарным диабетом I-го типа и без, и количества гликированного гемоглобина в исследуемом растворе: А – 800 нм; Б – 930 нм; В – 1100 нм; Г – 1300 нм; Д – 1550 нм.

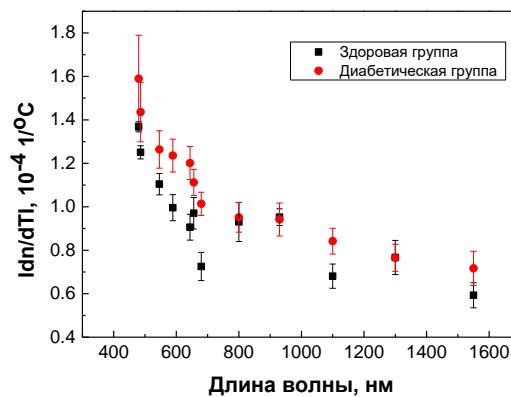


Рисунок 4.17 - Зависимость температурного инкремента показателя преломления раствора гемоглобина, полученного от добровольцев, от длины волны

Для количественной оценки связи температурного инкремента показателя преломления и количеством гликированного гемоглобина, полученного из цельной крови добровольцев с сахарным диабетом I-го типа, были рассчитаны коэффициенты корреляции Пирсона. Коэффициент корреляции между количеством гликированного гемоглобина в растворе HbA1c и температурным инкрементом показателя преломления на длине волны измерения можно записать в виде

$$\rho_{\frac{dn_i}{dT}, HbA1c} = \frac{\text{cov}(\frac{dn_i}{dT}, HbA1c)}{\sigma_{\frac{dn_i}{dT}} \sigma_{HbA1c}} = \frac{M\{[\frac{dn_i}{dT} - M(\frac{dn_i}{dT})][B_i - M(HbA1c)]\}}{\sigma_{\frac{dn_i}{dT}} \sigma_{HbA1c}}, \quad (11)$$

где $\sigma_{\frac{dn_i}{dT}}$, σ_{HbA1c} – стандартные отклонения температурного инкремента показателя преломления на i -ой длине волны измерения ($\frac{dn_i}{dT}$) и количеством гликированного гемоглобина (HbA1c), соответственно; $M(\frac{dn_i}{dT})$ и $M(HbA1c)$ – ожидаемое значение переменной; $\text{cov}(n_{589}, B_i)$ – ковариация.

Таблица 4.10 - Коэффициенты корреляции Пирсона связи температурного инкремента показателя преломления и количества гликированного гемоглобина, полученного из цельной крови добровольцев с сахарным диабетом I-го типа

Длина волны, нм	Коэффициенты корреляции Пирсона
480	0.990
486	0.963
546	0.892
589	0.856
644	0.800
656	0.956
680	0.723
800	0.917
930	0.877
1100	0.861
1300	0.821
1550	0.981

Учитывая результаты, показанные в Таблице 4.10, на длинах волн 546, 589, 644, 680, 930, 1100 и 1300 нм наблюдается высокая корреляция температурного инкремента показателя преломления и количества гликированного гемоглобина, полученного из цельной крови добровольцев с сахарным диабетом I-го типа, а для длин волн 480, 486, 656, 800 и 1550 нм очень высокая. Однако коэффициент корреляции Пирсона для всех длин волн больше 0.7, что свидетельствует о хорошем согласовании полученных данных, а температурный инкремент показателя преломления гемоглобина может быть использован для определения содержания гликированного гемоглобина.

Выводы по главе 4

В главе 4 показаны результаты измерений показателей преломления и спектров флуоресценции растворов гемоглобина, альбумина, их гликированных фракций, а также их смесей в пределах физиологических и патологических концентраций. Получены данные для аппроксимации дисперсионных и температурных зависимостей показателей преломления исследованных растворов. Анализ спектров флуоресценции растворов гемоглобина, альбумина, их гликированных фракций, а также их смесей дополняет рефрактометрические измерения и также демонстрирует возможность отличия гликированных белков от негликированных. Полученные данные хорошо согласуются с имеющимися литературными данными и дополняют их. Также впервые показана возможность определения степени гликирования белков крови рефрактометрическим методом. Данная методика использована при исследованиях гемоглобина, полученных из цельной крови добровольцев с сахарным диабетом I-го типа и без.

Следует отметить, что полученные новые данные для дисперсии показателя преломления гемоглобина, альбумина, гликированного гемоглобина, гликированного альбумина в видимой и БИК области, могут существенно дополнить имеющуюся литературную базу и послужат хорошей основой для выполнения работ по моделированию оптических свойств крови, её компонентов и биологических тканей в норме и в условиях развития диабета.

В главе 4 представлены результаты из работ:

1. О.А. Смолянская, **Е.Н. Лазарева**, С.С. Налегает, Н.В. Петров, К.И. Зайцев, П.А. Тимошина, Д.К. Тучина, Я.Г. Торопова, О. В. Корнюшин, А.Ю. Бабенко, Ж.-П. Гийе, В.В. Тучин, «Мультимодальная оптическая диагностика гликированных биологических тканей» - // Успехи биологической химии. 2019. Т.59. С. 253–294.

2. **E.N. Lazareva**, A.Y. Zyubin, I.G. Samusev, V.A. Slezhkin, V.I. Kochubey, and V.V. Tuchin «Refraction, fluorescence, and Raman spectroscopy of normal and glycated hemoglobin» - // Proc. SPIE. 2018. Vol.10685. P. 1068540

3. **E.N. Lazareva**, A.Y. Zyubin, N.I. Dikht, A.B. Bucharskaya, I.G. Samusev, V.A. Slezhkin, V.I. Kochubey, V.V. Tuchin, «Optical Properties of Glycated and Non-Glycated Hemoglobin–Raman/Fluorescence Spectroscopy and Refractometry» -// J. of Biomedical Photonics & Eng. 2022. Vol.8 №2. P. 020303 (9).

4. **E. N. Lazareva**, L. Oliveira, I. Y. Yanina, N. V. Chernomyrdin, G. R. Musina, D. K. Tuchina, A. N. Bashkatov, K. I. Zaytsev, and V. V. Tuchin, «Refractive index measurements of tissue and blood components and OCAs in a wide spectral range» - // Handbook of Tissue Optical Clearing:

New Prospects in Optical Imaging, V. V. Tuchin, D. Zhu, and E. A. Genina, eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 2022. – P. 141-166.

Глава 5 Применение метода многоволновой рефрактометрии при исследовании биологических тканей и их компонентов при моделировании развития опухолевой ткани альвеолярного рака печени у крыс

В главе представлены результаты экспериментальных исследований рефрактометрических свойств плазмы крови и опухолевой ткани, полученных от крыс с перевитой модельной опухолью альвеолярного рака печени. Для показателей преломления получены дисперсионные зависимости в диапазоне длин волн 480-1550 нм и выполнено сопоставление полученных результатов с результатами биохимического анализа сыворотки крови. Также предложено дальнейшее развитие рефрактометрического метода оценки степени дегидратации кожи, ранее описанного в работах [252, 253], и его применение для *in vitro* и *in vivo* исследований, которые проводились на лабораторных животных с привитой опухолью альвеолярного рака печени [254]. *In vitro* измерения при применении 70%-го раствора глицерина и 40%-го раствора глюкозы в качестве оптических просветляющих агентов были выполнены на многоволновом рефрактометре Аббе (Атаго, Япония) для длин волн 486, 589, 680, 930 и 1300 нм. В качестве примера при проведении *in vivo* экспериментов выполнена оценка дегидратации кожи на участках с подкожным опухолевым новообразованием и на контрольных (здоровых) участках кожи рефрактометрическим методом для длин волн 480, 486, 546, 589, 644, 656, 680, 800, 930, 1100, 1300 и 1550 нм.

5.1 Экспериментальное исследование сыворотки крови крыс с модельной перевитой опухолью методом многоволновой рефрактометрии

Многочисленные компоненты крови оказывают значительное влияние на ее оптические свойства, причем их вклад может изменяться при развитии патологических состояний. Изменение состава крови при патологиях приводит к изменению её оптических свойств, что может быть использовано для разработки новых методов диагностики различных заболеваний. Особенный интерес представляет выявление онкологической патологии на ранних этапах, а также поиск объективных критериев для прогноза динамики развития заболевания и лечения, которые бы позволили проводить диагностику заболеваний на ранних стадиях, когда эффективны щадящие методы терапии [11, 164, 241].

5.1.1 Методы и материалы исследования рефрактометрических свойств сыворотки, полученной из крови крыс с перевитой модельной опухолью

Экспериментальное исследование было выполнено на белых беспородных половозрелых крысах-самцах, по методике, описанной в статье [255]. Эксперименты на животных выполняли в соответствии с международными этическими нормами [256]. В ходе исследования у крыс моделировали развитие опухолевой ткани альвеолярного рака печени (холангиокарцинома, PC1), осуществляя введение 0.5 мл 25%-ой опухолевой взвеси в растворе Хэнкса подкожно в область лопатки [255].

Животных выводили из эксперимента на 14 и 28 день после имплантации опухоли. Измеряли массу тела и размер опухоли. Истинная масса тела экспериментальных животных вычислялась при вычитании массы опухоли из общей массы тела. Забор крови животных проводился в специальные пробирки с коагулянтом. После 10 мин центрифугирования отделяли сыворотку крови, которую использовали для проведения биохимического анализа и рефрактометрических измерений. Биохимические исследования проводились на полуавтоматическом анализаторе Clima MC-15 (RAL, Испания) с использованием наборов реагентов для определения общего белка, альбумина и глюкозы (Диакон-ДС, Россия). Животные были разделены на 3 группы: группа 1 – контрольные здоровые животные ($N=6$); группа 2 – животные через 14 суток после имплантации опухоли ($N=4$); группа 3 – животные через 28 суток после имплантации опухоли ($N=5$). Для обработки полученных в ходе исследований данных был использован пакет прикладных статистических программ SSPS-13.0. Проверку нормальности распределения значений в выборке проводили с помощью теста Колмогорова — Смирнова. Рассчитывали среднее арифметическое (M); среднеквадратическое отклонение, в случае отличия распределения от нормального использовали медиану и квартили. Показатель достоверности различий (P) определяли с использованием критериев Стьюдента (t) и Манна — Уитни в случае отличия распределения от нормального. Характеристика животных по биохимическим параметрам и измеренным массам приведена в Таблицах 5.1 и 5.2.

Таким образом, у экспериментальных крыс наблюдается значительное изменение биохимических показателей в динамике развития опухоли. Так, через 14 дней (группа 1) после перевивки опухоли значительно повышены значения аланинаминотрансфераза (АЛТ), глюкозы и щелочной фосфатазы по сравнению с контрольной группой. Через 28 дней (группа 2) наблюдается достоверное увеличение аспаратаминотрансфераза (АСТ), снижение количества общего белка, альбумина и мочевины по сравнению с контрольными животными.

Таблица 5.1 - Содержание ряда биохимических параметров в сыворотке крови крыс с развитой первичной опухолевой тканью

Группа	АСТ	АЛТ	Общий билирубин	Мочевина	Щелочная фосфатаза
Контрольная группа (здоровые животные)	131 [113.3;149.5]	49.5 [45.5;54.3]	5.3 [4.5;6.1]	3.2 [2.4;3.9]	325.5 [297.8;426.8]
Группа 1 (через 14 дней после привития опухоли)	136 [84.5;154.5]	68* [59.3;76.8]	5.2 [4.9;5.8]	3.9 [2.9;4.4]	736* [625;845.5]
Группа 2 (через 28 дней после привития опухоли)	205** [168;228]	37 [29;54]	5 [4.5;6.1]	1.6** [1.2;1.8]	394 [342;662]

Примечание: данные представлены как медиана и квартили биохимических показателей.

АСТ - аспаратаминотрансфераза; АЛТ - аланинаминотрансфераза; достоверность отличий * $p \leq 0.05$ по сравнению с контрольной группой группы животных; ** $p \leq 0.01$ по сравнению с контрольной группой.

Таблица 5.2 - Содержание белка и глюкозы в сыворотке крови экспериментальных животных и масса опухоли

Группа	Масса крысы, г	Масса опухоли, г	Общий белок (г/л)	Альбумин (г/л)	Глюкоза (моль/л)
Контрольная группа (здоровые животные)	400-500	-	83 [67;86.3]	37 [35.5;39.3]	5.2 [4.9;5.7]
Группа 1 (через 14 дней после привития опухоли)	150-200	0.98	73* [69.5;77.3]	39* [36.5;40.8]	7.8* [6.7;8.9]
Группа 2 (через 28 дней после привития опухоли)	150-200	26.27	57** [55;64]	21** [19;23]	5.4** [5;5.7]

Примечание: достоверность отличий * $p \leq 0.05$ по сравнению с контрольной группой группы животных; ** $p \leq 0.01$ по сравнению с контрольной группой.

Показатель преломления измерялся на многоволновом рефрактометре Аббе DR-M2/1550 (Атаго, Япония). Источником излучения в данной установке является лампа накаливания высокой мощности. Для селекции длин волн использовались узкополосные интерференционные фильтры для 480 (± 2) нм, 486 (± 2) нм, 546 (± 2) нм, 589 (± 2) нм, 644 (± 2) нм, 656 (± 2) нм, 680 (± 5) нм, 800 (± 8) нм, 930 (± 6) нм, 1100 (± 26) нм, 1300 (± 25) нм и 1550 (± 25) нм. Погрешность измерений, вносимая прибором, составляет ± 0.0002 . Температура измерений во время эксперимента составляла $(+27)^\circ\text{C}$ и поддерживалась при помощи циркуляционного термостата.

5.1.2 Результаты исследования рефрактометрических свойств сыворотки, полученной из крови крыс с перевитой модельной опухолью

На Рисунке 5.1 показана дисперсионная зависимость показателя преломления сыворотки крови, полученная после усреднения данных для 3-х групп животных. Данные для показателей преломления приведены в Таблице 5.3.

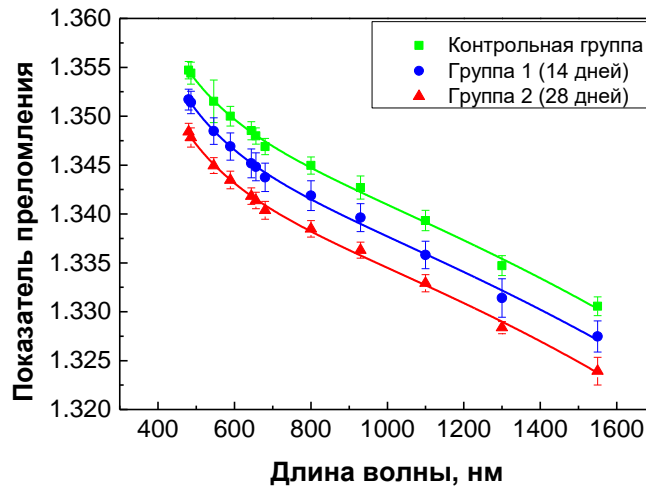


Рисунок 5.1 - Дисперсионная зависимость показателя преломления сыворотки крови крыс (Символы – экспериментальные данные, линии – аппроксимация по формуле Зельмейера, бары – стандартное отклонение)

Для выявления связи показателя преломления сыворотки крови с развитием опухоли были построены корреляционные зависимости показателя от биохимических параметров, измеренных стандартными биохимическими методами (см. Раздел 5.1.1) для исследуемых образцов. Результат показан на Рисунке 5.2.

Для количественной оценки связи показателя преломления и биохимических параметров плазмы крови крыс были рассчитаны коэффициенты корреляции Пирсона. Коэффициент корреляции между значениями биохимических параметров B_i и показателя преломления на длине волны 589 нм можно записать в виде

$$\rho_{n_{589}, B_i} = \frac{\text{cov}(n_{589}, B_i)}{\sigma_{n_{589}} \sigma_{B_i}} = \frac{M\{[n_{589} - M(n_{589})][B_i - M(B_i)]\}}{\sigma_{n_{589}} \sigma_{B_i}}, \quad (5.1)$$

где $\sigma_{n_{589}}$, σ_{B_i} – стандартные отклонения показателя преломления плазмы крови крыс на длине волны 589 нм (n_{589}) и биохимических параметров плазмы крови (B_i), соответственно; $M(n_{589})$ и $M(B_i)$ – ожидаемое значение переменной; $\text{cov}(n_{589}, B_i)$ – ковариация.

Таблица 5.3 - Показатель преломления образцов сыворотки крови, усреднённый по группе

Длина волны, нм	Контрольная группа (Здоровые животные) (\pm СО*)	Группа 1 (14 дней после перевития опухоли) (\pm СО*)	Группа 2 (28 дней после перевития опухоли) (\pm СО*)
480	1.3547 (\pm 0.0009)	1.3517 (\pm 0.0011)	1.3484 (\pm 0.0009)
486	1.3544 (\pm 0.0011)	1.3514 (\pm 0.0011)	1.3478 (\pm 0.0010)
546	1.3515 (\pm 0.0022)	1.3485 (\pm 0.0014)	1.3449 (\pm 0.0008)
589	1.3500 (\pm 0.0010)	1.3469 (\pm 0.0014)	1.3435 (\pm 0.0009)
644	1.3485 (\pm 0.0009)	1.3452 (\pm 0.0015)	1.3418 (\pm 0.0008)
656	1.3480 (\pm 0.0008)	1.3448 (\pm 0.0014)	1.3414 (\pm 0.0008)
680	1.3469 (\pm 0.0008)	1.3438 (\pm 0.0015)	1.3404 (\pm 0.0009)
800	1.3450 (\pm 0.0009)	1.3419 (\pm 0.0015)	1.3385 (\pm 0.0008)
930	1.3427 (\pm 0.0012)	1.3396 (\pm 0.0014)	1.3363 (\pm 0.0008)
1100	1.3393 (\pm 0.0010)	1.3358 (\pm 0.0014)	1.3329 (\pm 0.0009)
1300	1.3347 (\pm 0.0010)	1.3314 (\pm 0.0020)	1.3284 (\pm 0.0006)
1550	1.3306 (\pm 0.0009)	1.3275 (\pm 0.0016)	1.3239 (\pm 0.0014)

*СО – стандартное отклонение

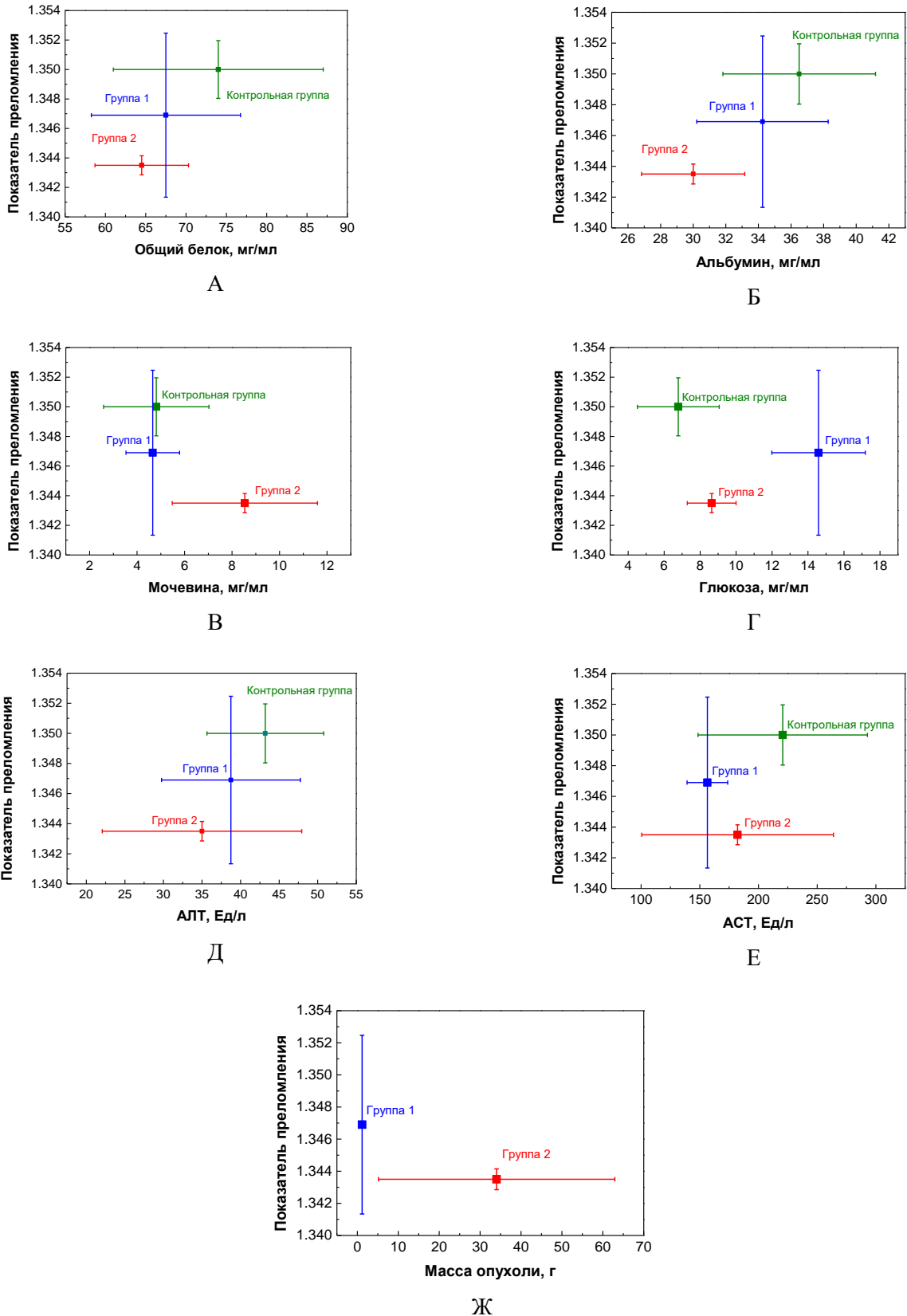


Рисунок 5.2 - Зависимость показателя преломления сыворотки крови крыс от биохимических параметров и массы опухоли: А – общий белок; Б – альбумин; В – мочеви́на; Г – глюкоза; Д – АЛТ; Е – АСТ; Ж – масса опухоли; (зеленые квадраты - контрольная группа, синие квадраты – группа 1 (14 дней), красные квадраты – группа 2 (28 дней после имплантации опухоли))

Таблица 5.4 - Коэффициенты корреляции Пирсона связи показателя преломления и биохимических параметров плазмы крови крыс

Биохимический параметр	Коэффициенты корреляции Пирсона
Общий белок	0.9722
Альбумин	0.9889
Мочевина	-0.862
Глюкоза	-0.202
АЛТ	0.997
АСТ	0.573
Масса опухоли	-1

По данным Таблицы 5.4 можно отметить, что наблюдается хорошая корреляция показателя преломления сыворотки крови с усредненными значениями для таких биохимических параметров, как общий белок, альбумин, и АЛТ. Полученная связь с биохимическими параметрами крови подтверждает влияние изменения состава крови на её оптические свойства при развитии и росте опухоли, в частности показателя преломления в видимой и БИК областях.

5.2 Экспериментальное исследование рефрактометрических свойств ткани модельной опухоли, индуцированной раковыми клетками человека, методом многоволновой рефрактометрии

Метод многоволновой рефрактометрии является одним из перспективных оптических методов, предлагаемых для диагностики и оценки развития различных заболеваний. Несколько научными группами было предложено использовать показатель преломления в качестве «биологического маркера», позволяющего различать нормальную и патологическую ткани, поэтому точные и расширенные данные об оптических свойствах патологических тканей имеют большое значение и важны для области биофотоники и медицинской диагностики [61, 63, 174, 173].

5.2.1 Методы и материалы исследования рефрактометрических свойств ткани модельной опухоли, индуцированной раковыми клетками человека, методом рефрактометрии

В этом разделе приводятся результаты экспериментального исследования рефрактометрических свойств опухолевых тканей, полученных от лабораторных животных методика работы с которыми подробно описана в Разделе 5.1.1. После изъятия опухолевая ткань подвергалась быстрой заморозке.

Показатель преломления измерялся на многоволновом рефрактометре Аббе DR-M2/1550 («Атаго», Япония) с использованием интерференционных фильтров 480-1550 нм. Для селекции длин волн использовались узкополосные интерференционные фильтры для 480 (± 2) нм, 486 (± 2) нм, 546 (± 2) нм, 589 (± 2) нм, 644 (± 2) нм, 656 (± 2) нм, 680 (± 5) нм, 800 (± 8) нм, 930 (± 6) нм, 1100 (± 26) нм, 1300 (± 25) нм и 1550 (± 25) нм. Погрешность измерений, вносимая прибором, составляет ± 0.0002 . Образцами исследования были тонкие срезы $0.5\text{мм} \pm 0.1$ мм здоровых и патологических тканей, которые помещались на измерительную призму рефрактометра. Температура образца во время измерений постоянно поддерживалась водным циркуляционным термостатом и была $(+24)^\circ\text{C}$.

Аппроксимация показателя преломления была выполнена по формуле Зельмейера (1.13), которая дает наилучший результат для описания дисперсионной зависимости многокомпонентной системы вблизи полосы поглощения каждого компонента [27].

5.2.2 Результаты исследования ткани модельной опухоли, индуцированной раковыми клетками человека, методом многоволновой рефрактометрии

Значения показателей преломления срезов опухолевой ткани модельного рака печени, измеренные для 12-ти длин волн видимого и БИК диапазонов, представлены в Таблице 5.5. На Рисунке 5.3 показана дисперсионная зависимость показателей преломления и наилучшая аппроксимация, выполненная при помощи формулы Зельмейера. Как видно из графика, для видимого и БИК диапазонов дисперсионная зависимость показателя преломления измеренных образцов имеет нелинейный вид, а значение показателя преломления уменьшается с увеличением длины волны.

На Рисунке 5.3 можно отметить большее значение показателя преломления для группы 2 (28 дней) по сравнению с группой 1 (14 дней). Это может объясняться увеличением содержания белка в опухолевой ткани при её развитии.

Таблица 5.5 - Показатель преломления опухолевой ткани модельного рака печени

Длина волны, нм	Показатель преломления (Группа 1 после 14 дней) (\pm СО*)	Показатель преломления (Группа 2 после 28 дней) (\pm СО*)
480	1.3514 (\pm 0.0005)	1.3524 (\pm 0.0026)
486	1.3503 (\pm 0.0020)	1.3527 (\pm 0.0020)
546	1.3479 (\pm 0.0014)	1.3496 (\pm 0.0024)
589	1.3461 (\pm 0.0019)	1.3483 (\pm 0.0020)
644	1.3443 (\pm 0.0015)	1.3465 (\pm 0.0023)
656	1.3437 (\pm 0.0015)	1.3461 (\pm 0.0022)
680	1.3421 (\pm 0.0016)	1.3449 (\pm 0.0020)
800	1.3398 (\pm 0.0018)	1.3437 (\pm 0.0025)
930	1.3386 (\pm 0.0022)	1.3408 (\pm 0.0026)
1100	1.3366 (\pm 0.0027)	1.3373 (\pm 0.0031)
1300	1.3319 (\pm 0.0016)	1.3329 (\pm 0.0020)
1550	1.3279 (\pm 0.0029)	1.3296 (\pm 0.0023)

*СО - стандартное отклонение

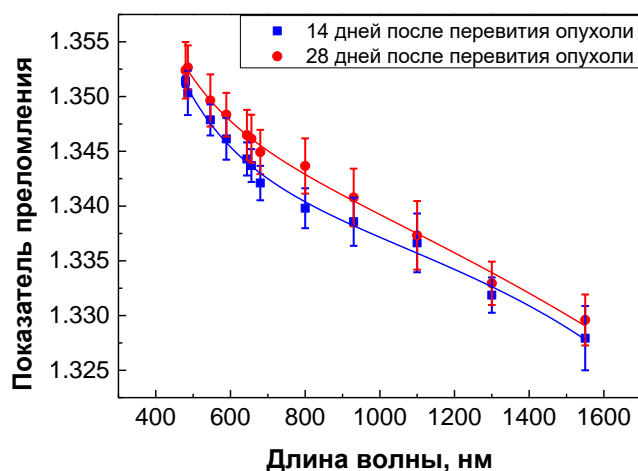
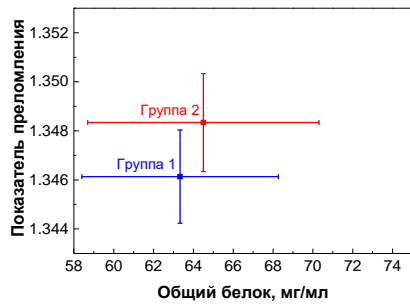
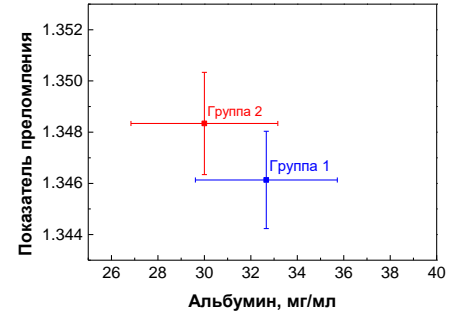


Рисунок 5.3 - Дисперсионная зависимость среза ткани модельной опухоли для группы 1 (14 дней после перевития опухоли) и группы 2 (28 дней после перевития опухоли) (Символы - экспериментальные данные, линии – аппроксимация по формуле Зельмейера)

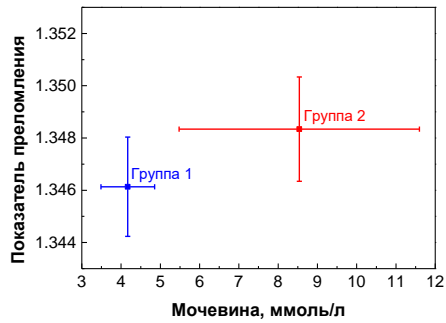
На Рисунке 5.4 приведена корреляция с биохимическими параметрами крови лабораторных животных при развитии опухоли, как для отдельных образцов ткани, так и среднее значение по группам.



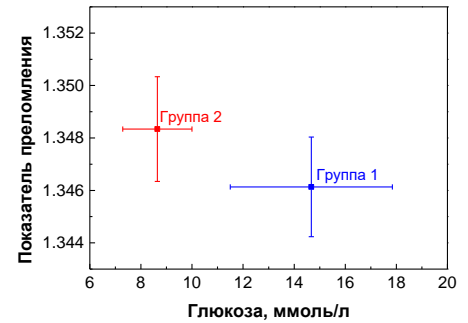
А



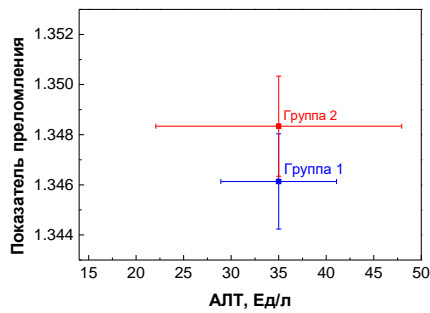
Б



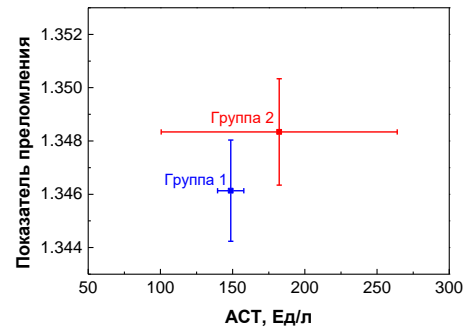
В



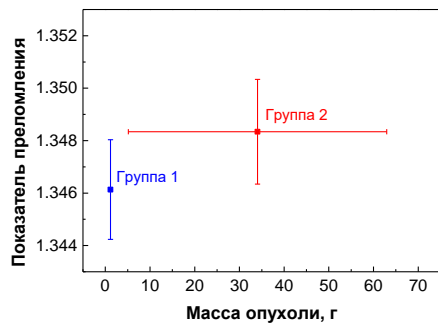
Г



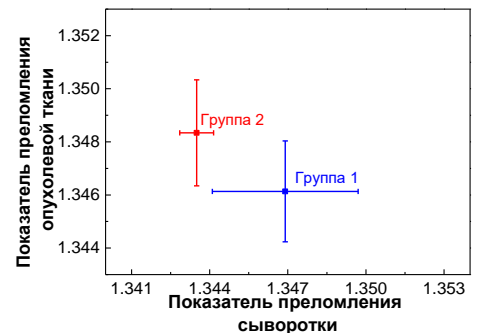
Д



Е



Ё



Ж

Рисунок 5.4 - Корреляция показателя преломления с биохимическими параметрами крови лабораторных животных при развитии опухоли: А – общий белок; Б – альбумин; В – мочевина; Г – глюкоза; Д – АЛТ; Е – АСТ; Ё – масса опухоли; Ж – показатель преломления сыворотки.

Для спектрального диапазона 480-1550 нм по полученным экспериментальным данным были рассчитаны коэффициенты для дисперсионной формулы Зельмейера, которая приобретает вид:

$$n_{\text{ткань модельной опухоли (группа 1)}}(\lambda) = \sqrt{1 + \frac{0.78891 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 10758.20899} + \frac{0.05988 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 7.29357 \cdot 10^6}}, \quad (5.2)$$

$$n_{\text{ткань модельной опухоли (группа 2)}}(\lambda) = \sqrt{1 + \frac{0.80328 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 8392.62394} + \frac{691.90494 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 4.1844 \cdot 10^{10}}}. \quad (5.3)$$

В работе [11] приведены данные для показателя преломления рака печени человека, измеренные методом лазерной рефрактометрии. Величина показателя преломления была 1.373 ± 0.007 для длины волны 450 нм, 1.368 ± 0.006 - 532 нм, 1.362 ± 0.011 - 632,8 нм, 1.355 ± 0.003 - 964 нм, 1.347 ± 0.005 - 1551 нм. По полученным результатам в данной работе показатель преломления для группы 1 изменялся от 1.3695 ± 0.0002 на длине волны 480 нм до 1.3468 ± 0.0008 на длине волны 1.550 нм, а для группы 2 от 1.3524 ± 0.0026 до 1.3296 ± 0.0023 что хорошо согласуется с уже имеющимися литературными данными.

Для количественной оценки связи показателя преломления опухолевой ткани модельного рака печени и биохимических параметров плазмы крови крыс были рассчитаны коэффициенты корреляции Пирсона. Коэффициент корреляции между значениями биохимических параметров B_i и показателя преломления на длине волны 589 нм можно записать в виде

$$\rho_{n_{589}, B_i} = \frac{\text{cov}(n_{589}, B_i)}{\sigma_{n_{589}} \sigma_{B_i}} = \frac{M\{[n_{589} - M(n_{589})][B_i - M(B_i)]\}}{\sigma_{n_{589}} \sigma_{B_i}}, \quad (5.4)$$

где $\sigma_{n_{589}}$, σ_{B_i} – стандартные отклонения показателя преломления опухолевой ткани на длине волны 589 нм (n_{589}) и значениями биохимических параметров сыворотки крови крыс (B_i), соответственно; $M(n_{589})$ и $M(B_i)$ – ожидаемое значение переменной; $\text{cov}(n_{589}, B_i)$ – ковариация.

Таблица 5.6 Коэффициенты корреляции Пирсона связи показателя преломления опухолевой ткани модельного рака печени и биохимических параметров плазмы крови крыс

Биохимический параметр	Коэффициент корреляции Пирсона
Общий белок	1
Альбумин	-1
Мочевина	1
Глюкоза	-1
АЛТ	1
АСТ	1
Масса опухоли	1
Показатель преломления сыворотки крови	-1

Полученная связь с биохимическими параметрами подтверждает влияние изменения состава опухоли на её оптические свойства, в частности показателя преломления в видимой и БИК областях. Полученный результат представляет собой новые данные, которые могут быть полезны при разработке новых и улучшения существующих методов диагностики и лечения онкологических заболеваний, в том числе связанных с жидкостной биопсией онкологических тканей.

5.3 Экспериментальное исследование дегидратации кожи в норме и при развитии патологии методом многоволновой рефрактометрии

В настоящее время для диагностики и терапии различных заболеваний широкое распространение получили оптические методы, например, фотоакустическая и терагерцовая спектроскопия и визуализация, и ряд других методов [20, 257, 258, 259, 260]. Применение оптических методов сильно ограничено малой глубиной зондирования биологических тканей [260]. Однако при воздействии гиперосмотических оптических просветляющих агентов (ОПА) на ткань можно достичь заметного уменьшения рассеяния и поглощения на полосах воды во всем диапазоне рабочих длин волн за счёт дегидратации ткани, соответственно, увеличения оптического пропускания [151, 261, 262, 263, 264, 265]. Повышение контраста изображения за счёт дегидратации и просветления ткани в области патологии чрезвычайно важно при диагностике предраковых состояний, ранних стадий рака и других заболеваниях [20, 257, 258, 259, 260, 266]. В ряде работ показано различие в содержании свободной и связанной воды в тканях и установлено повышенное содержание свободной воды в опухолевых тканях [267, 268, 269, 270, 271]. Предполагается, что на содержание свободной воды влияют молекулы белка, которые изменяются в результате развития патологии. Например, в работе [269] показано, что связанная вода взаимодействует с белком и удаляется вместе с ним. Традиционными методами количественной оценки дегидратации биологической ткани при воздействии ОПА являются измерения изменения веса и геометрических параметров [252, 253, 261]. Однако, данные методы на практике применимы только для *in vitro* или *ex vivo* измерений. Рефрактометрический метод позволяет выполнить оценку степени дегидратации как для *in vitro* и *ex vivo*, так и *in vivo* измерений. А измерение рефракции одновременно на нескольких длинах волн позволяет получить более достоверную информацию о степени дегидратации ткани за счет сбора большего числа данных и рассчитывать на определение состава экстрагированной жидкости.

5.3.1 Описание методики оценки дегидратации кожи при использовании гиперосмотических агентов и рефрактометрического метода

Оценка степени дегидратации образца кожи выполнялась при использовании выражения Гладстона-Дейла для многокомпонентного раствора [24, 30, 31]:

$$n(\lambda, t) = \sum_i n_i(\lambda) f_i(t), \quad (5.5)$$

где n – показатель преломления раствора, i – число компонентов раствора, n_i – показатель преломления i -го компонента, f_i – объёмная доля i -го компонента.

Выражение (5.4) в нашем случае приобретает вид:

$$n_{\text{эксп}}(\lambda, t) = n_{\text{ОПА}}(\lambda) f_{\text{ОПА}}(t) + n_{\text{NaCl}}(\lambda) f_{\text{NaCl}}(t) + n_{\text{экт.}}(\lambda) f_{\text{экт.}}(t), \quad (5.6)$$

где $n_{\text{эксп}}$ – показатель преломления экспериментального раствора, $n_{\text{ОПА}}$ – показатель преломления ОПА, $f_{\text{ОПА}}$ – объёмная доля ОПА (глицерина или глюкозы), n_{NaCl} – показатель преломления физиологического раствора, f_{NaCl} – объёмная доля физиологического раствора, $n_{\text{экт.}}$ – показатель преломления экстрагированной жидкости, $f_{\text{экт.}}$ – объёмная доля экстрагированной жидкости.

Из формулы (5.6) по измеренным и известным в литературе данным для начальных растворов вычисляется показатель преломления ОПА.

Записав выражение (5.6) для растворов, полученных после проведения эксперимента по просветлению, по известным данным вычисляется объёмная доля экстрагированной жидкости. Выражения для нахождения объёмной доли экстрагированной жидкости в растворах глицерина и глюкозы будут иметь вид:

$$f_{\text{экт.}}(t) = \frac{n_{\text{эксп}}(\lambda, t) - n_{\text{ОПА}}(\lambda) + (n_{\text{ОПА}}(\lambda) - n_{\text{NaCl}}(\lambda)) f_{\text{NaCl}}(t)}{(n_{\text{экт.}}(\lambda) - n_{\text{ОПА}}(\lambda))}. \quad (5.7)$$

Изменение объёмной доли экстрагированной жидкости в растворе ОПА оценивалось по формуле:

$$\Delta f = f_{60} - f_0, \quad (5.8)$$

где f_{60} – объёмная доля экстрагированной жидкости в растворе ОПА после 60 мин воздействия на образец, f_0 – объёмная доля экстрагированной жидкости в растворе ОПА до эксперимента по просветлению кожи крысы.

Найденное значение объёмной доли экстрагированной жидкости в растворе ОПА усреднялось по 5 длинам волн. Так как данная величина является постоянной для всех длин волн, то используя также выражение (5.6) можно определить показатель преломления экстрагированной жидкости. Вычесть вклад воды, глицерина и глюкозы и провести сравнение полученной дисперсионной зависимости с дисперсией воды.

$$n_{\text{экст.}}(\lambda) = \frac{n_{\text{эксп}}(\lambda, t) - n_{\text{ОПА}}(\lambda) + n_{\text{ОПА}}(\lambda) f_{\text{экст.}}(t) + (n_{\text{ОПА}}(\lambda) - n_{\text{NaCl}}(\lambda)) f_{\text{NaCl}}(t)}{f_{\text{экст.}}(\lambda)}. \quad (5.9)$$

5.3.2 Материалы исследования дегидратации кожи при применении гиперосмотических агентов

Для *in vitro* измерений во время эксперимента по оптическому просветлению в качестве образцов исследования были использованы образцы кожи здоровых лабораторных крыс. При помощи микрометра выполнялись измерения толщины, ширины и длины образцов до и после эксперимента. На аналитических весах (Scientech, SA210, США) с точностью ± 1 мг измерялся вес образцов до и после эксперимента. Измерения параметров после эксперимента выполнялись после полного удаления просветляющего раствора с обеих сторон образца.

Образцы помещались в закрытую герметичную ёмкость, в которую добавлялось 2 мл просветляющего раствора. В качестве оптического просветляющего раствора были использованы 70%-ый раствор глицерина и 40%-ый раствор глюкозы при добавлении физиологического раствора. Измерения показателя преломления просветляющего раствора проводились до начала эксперимента и каждые 5 мин после помещения образца кожи в раствор с просветляющим агентом в течение 20 мин, затем каждые 10 мин в течение ещё 40 мин. Для измерений делали забор 10 мкл раствора и брали три пробы для каждого раствора.

Показатель преломления измерялся на многоволновом рефрактометре Аббе DR-M2/1550 (Атаго, Япония), подробное описание которого дано в Разделе 2.1. Для селекции длин волн при *in vitro* исследовании использовались узкополосные интерференционные фильтры для 486 (± 2) нм, 589 (± 2) нм, 680 (± 5) нм, 930 (± 6) нм, 1300 (± 25) нм. Погрешность измерений, вносимая прибором, составляет ± 0.0002 . В начале измерений проводилась калибровка прибора по табличному значению показателя преломления дистиллированной воды. Температура измерений во время эксперимента составляла $(+22)^\circ\text{C}$ и поддерживалась при помощи циркуляционного термостата

Исследования *in vivo* были проведены на двух лабораторных крысах линии Vistar (половозрелых самок весом 300-400 г). Животным была привита опухоль, путем подкожной инъекции в область лопаток по 0.5 мл 25%-ой опухолевой взвеси штамма альвеолярного рака печени PC1 в растворе Хэнкса. Исследования проводились спустя 16 дней после инъекции. Для эксперимента по просветлению раствор глицерина 99,3%-а заливался в специальную кювету в количестве 1мл, которая открытой частью касалась кожи для обеспечения полного контакта ОПА с поверхностью кожи в течение 30 мин. После воздействия ОПА он забирался из кюветы для измерения показателя преломления. Показатель преломления растворов глицерина, как и

при описанном ранее *in vitro* эксперименте, измерялся на многоволновом рефрактометре Аббе DR-M2/1550 (Атаго, Япония). Для селекции длин волн также использовались интерференционные фильтры для 480 (± 2) нм, 486 (± 2) нм, 546 (± 2) нм, 589 (± 2) нм, 644 (± 2) нм, 656 (± 2) нм, 680 (± 5) нм, 800 (± 8) нм, 930 (± 6) нм, 1100 (± 26) нм, 1300 (± 25) нм и 1550 (± 25) нм. Температура раствора во время измерений показателя преломления составляла $(+27)^\circ\text{C}$ и поддерживалась постоянной при помощи циркуляционного термостата. Объем экстрагированной жидкости вычислялся по формуле (5.9).

5.3.3 Результаты исследования дегидратации кожи при применении гиперосмотических агентов

Полученные в результате *in vitro* измерений зависимости показателя преломления раствора ОПА от времени показаны на Рисунке 5.5. Аппроксимация полученных зависимостей выполнялась при использовании экспоненциальной функции:

$$y(x) = y_0 + Ae^{Bx}, \quad (5.10)$$

где y_0 , A и B – постоянные величины.

Аппроксимация показана на графиках сплошными линиями.

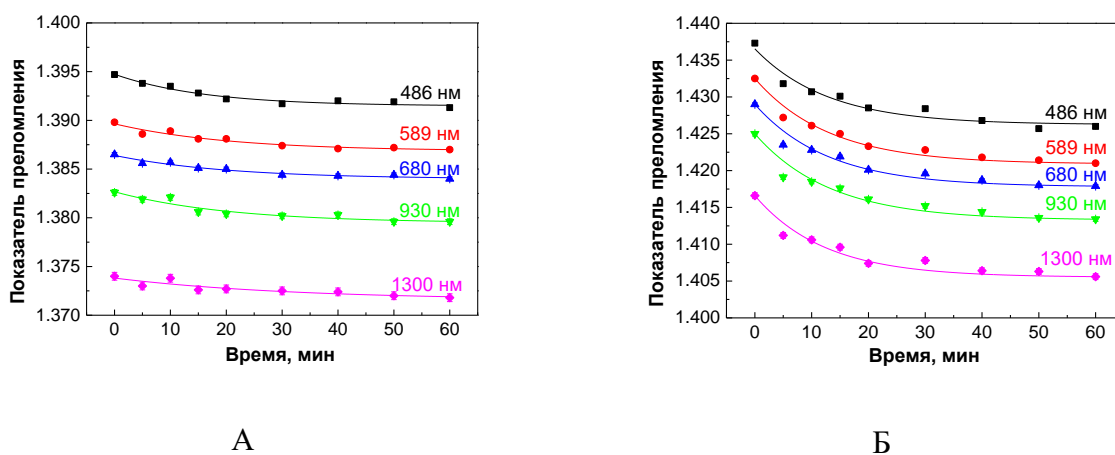


Рисунок 5.5 - Зависимость показателя преломления просветляющего раствора от времени: А - 40%-ый раствор глюкозы; Б - 70%-ый раствор глицерина

На Рисунке 5.5 заметно, что показатель преломления 70%-го раствора глицерина уменьшился сильнее, по сравнению с показателем преломления 40%-го раствора глюкозы. Хорошо известно, что глицерин обладает высокой вязкостью и гигроскопичностью. Однако процесс взаимодействия глицерина с кожей достаточно сложен и на сегодняшний день не полностью изучен, несмотря на обширную литературу на эту тему [272]. Благодаря высокой

гигроскопичности и высокой вязкости на сравнительно малых интервалах времени (1-2 часа) он в основном действует как гиперосмотический агент, экстрагирующий интерстициальную свободную и слабо связанную воду из ткани, в меньшей степени проникая в ткань за счет диффузии [273, 274]. Глюкоза также является одним из распространенных ОПА. В работе [275] было показано, что процесс ОП при применении глюкозы происходит в три раза быстрее, чем при применении глицерина.

По измеренным значениям показателя преломления согласно формуле (5.7) был выполнен расчет объёмных долей воды в исследуемых растворах для пяти длин волн видимой и БИК областей. Усредненные по пяти измерениям данные для образцов кожи и растворов глюкозы и глицерина приведены в Таблицах 5.7 и 5.8

Таблица 5.7 - Данные для образцов кожи и ОПА при воздействии 40%-го раствора глюкозы

	Вес образца, мг (СО*)	Толщина образца, мм (СО*)	Длина образца, мм (СО*)	Ширина образца, мм	Объем ОПА, мл (СО*)	Показатель преломления ОПА (СО*)	λ , нм	Объемная доля воды и экстрагированной жидкости в ОПА, % (СО*)	Средняя объемная доля воды и экстрагированной жидкости в ОПА, % (СО*)
До воздействия	756 (±35)	1.55 (±0.20)	12.6 (±0.15)	10.05 (±0.20)	2	1.3947 (±0.0002) 1.3898 (±0.0002) 1.3865 (±0.0002) 1.3826 (±0.0003) 1.3740 (±0.0004)	486 589 680 930 1300	60 60 60 60 60	60
После 60 мин воздействия ОПА	640 (±25)	1.55 (±0.20)	10.50 (±0.17)	7.00 (±0.18)	1.5**	1.3913 (±0.0002) 1.3870 (±0.0002) 1.3840 (±0.0003) 1.3796 (±0.0003) 1.3718 (±0.0004)	486 589 680 930 1300	62.39 62.01 61.80 62.15 61.74	62.02 (±0.27)

*СО – стандартное отклонение.

** не учитывался объём раствора, оставшегося на образце после его взятия из раствора.

Таблица 5.8 - Данные для образцов кожи и ОПА при воздействии 70%-раствора глицерина

	Вес образца (мг)	Толщина образца (мм)	Длина образца (мм)	Ширина образца (мм)	Объем ОПА (мл)	Показатель преломления (стандартное отклонение)	λ (нм)	Объемная доля воды и экстрагированной жидкости в ОПА, %	Средняя объемная доля воды и экстрагированной жидкости в ОПА, %
До воздействия	805 (± 41)	1.55 (± 0.20)	12.20 (± 0.20)	10.50 (± 0.23)	2	1.4373 (± 0.0002) 1.4325 (± 0.0002) 1.4290 (± 0.0002) 1.4250 (± 0.0003) 1.4166 (± 0.0003)	486 589 680 930 1300	30 30 30 30 30	30
После 60 мин воздействия ОПА	530 (± 34)	1.55 (± 0.20)	10.00 (± 0.24)	8.10 (± 0.21)	1.7*	1.4260 (± 0.0002) 1.4210 (± 0.0003) 1.4179 (± 0.0002) 1.4134 (± 0.0003) 1.4056 (± 0.0004)	486 589 680 930 1300	37.96 38.16 37.91 38.27 38.26	38.11 (± 0.17)

* не учитывался объем раствора, оставшегося на образце после его взятия из раствора

На Рисунке 5.6 показан прирост объемной доли экстрагированной жидкости в 70%-ом растворе глицерина и 40%-ом растворе глюкозы после 60 мин воздействия ОПА на образец кожи крысы, вычисленный по формуле (5.9).

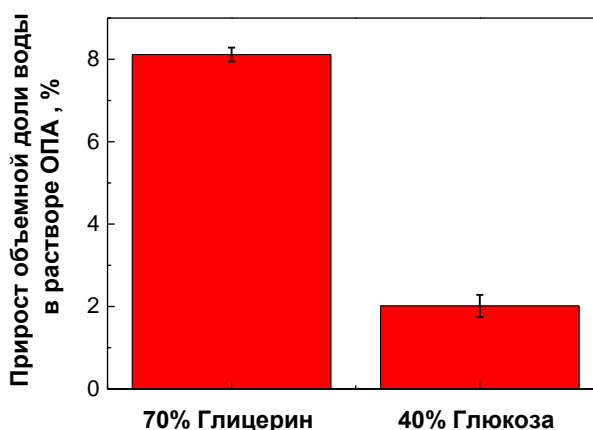


Рисунок 5.6 - Изменение объемной доли экстрагированной жидкости в 70%-ом растворе глицерина и 40%-ом растворе глюкозы после просветления образца кожи крысы

На Рисунке 5.6 можно отметить, что 70%-ый раствор глицерина приводит к большей дегидратации кожи по сравнению 40%-ым раствором глюкозы. Прирост объемной доли

экстрагированной жидкости в 70%-ом растворе глицерина составил 8,11%, а в 40%-ом растворе глюкозы – 2,02%. Благодаря высокой гигроскопичности, глицерин является одним из наиболее эффективных гиперосмотических просветляющих агентов, что подтверждает полученный нами результат.

Измерение показателя преломления на нескольких длинах позволило выполнить по формуле (5.9) расчет дисперсионной зависимости показателя преломления экстрагированного вещества и провести сравнение с дисперсией воды. Дисперсионные зависимости для воды, 70%-го глицерина, 40%-ой глюкозы и экстрагированной жидкости после взаимодействия кожи с растворами глюкозы и глицерина показаны на Рисунке 5.6.

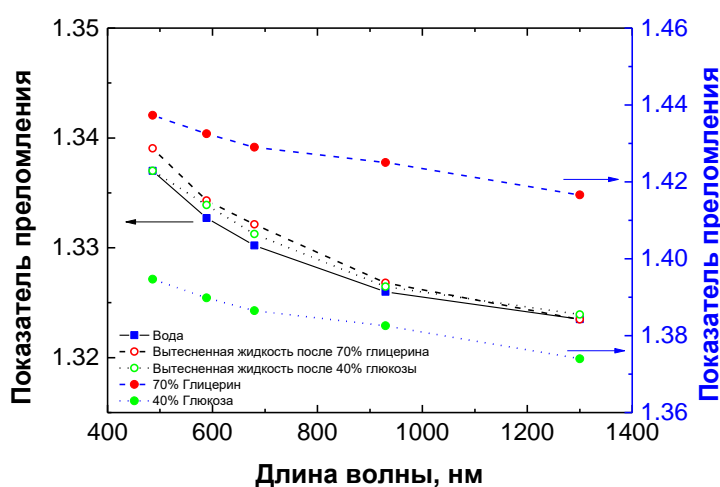


Рисунок 5.7 - Дисперсионные зависимости для воды, 70%-го глицерина, 40%-го глюкозы и выделенной жидкости после взаимодействия кожи с растворами глюкозы и глицерина

Представленная на Рисунке 5.7 дисперсионная кривая для вытесненной из кожи жидкости после воздействия 40%-го раствора глюкозы близка к дисперсионной зависимости для воды, однако несколько большие значения показателя преломления для всех длин волн, кроме 486 нм, свидетельствуют о присутствии белков и солей в экстракте. После воздействия 70%-го раствора глицерина дисперсия завышена для всех длин волн в видимой области и совпадает с дисперсией воды в БИК области, что также может объясняться вытеснением из ткани межклеточной жидкости, в состав которой входит не только вода, но и белки, и соли. Можно предположить, что вклад белкового компонента несколько выше при воздействии глицерина, поскольку молекулы белков имеют высокое поглощение в УФ области, что приводит к заметному вкладу аномальной дисперсии в УФ и соответствующим изменениям в коротковолновой видимой области за счет крыльев линий поглощения.

Исходя из литературных данных и полученных нами ранее результатов, раствор глицерина был выбран в качестве ОПА для проведения *in vivo* исследований, при которых выполняло сравнение степени дегидратации биологической ткани на здоровом участке кожи и на участке кожи над опухолью. По полученным значениям показателя преломления при использовании формулы (5.9) был выполнен расчет содержания объёмных долей глицерина и воды в растворах после *in vivo* эксперимента. Полученные значения объёмных долей были усреднены для 12-ти длин волн для каждого раствора. Полученные данные приведены на Рисунках 5.8 и 5.9, и в Таблице 5.9.

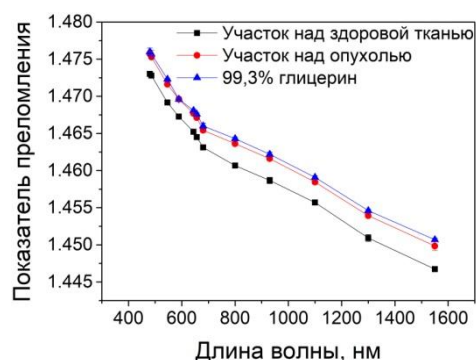


Рисунок 5.8 - Дисперсионная зависимость показателя преломления 99,3%-раствора глицерина и растворов глицерина после *in vivo* эксперимента на участках кожи над здоровой тканью и над опухолью

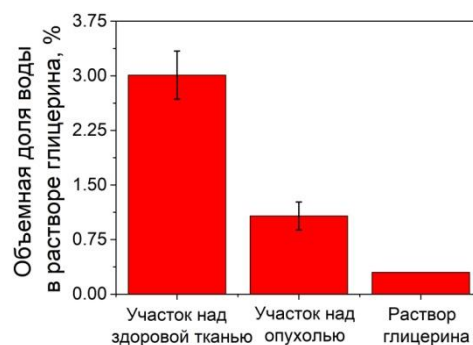


Рисунок 5.9 - Объемная доля воды в растворе глицерина после *in vivo* эксперимента на участках кожи над здоровой тканью и над опухолью, вычисленная по показателю преломления на 12-ти длинах волн с последующим усреднением

Таблица 5.9 - Содержание воды в растворе глицерина после *in vivo* эксперимента по просветлению кожи крысы

Образец	Объемная доля глицерина, %	Объемная доля воды, %
Контрольный участок кожи	97.0(±0.3)	3.0(±0.3)
Участок кожи над опухолью	98.9(±0.2)	1.1(±0.2)
Раствор глицерина	99.3	0.7

По полученным результатам дегидратация здорового участка кожи крысы составила $3.0 \pm 0.3\%$, а для участка кожи крысы над опухолью составила $1.1 \pm 0.2\%$. Этот результат в целом согласуется с данными работы группы Тромберга [267], полученными на основе спектральных измерений для участков здоровой ткани и карциномы женской молочной железы, для которых содержание объемной (связанной) воды в здоровой ткани в среднем было на уровне 15-16%, а в опухоли порядка 30%. Что в соответствии с результатами работ [116] [276] означает, что при взятой концентрации раствора глицерина с содержанием воды, равным 30%, поток

экстрагируемой из злокачественной ткани воды должен быть небольшим, в то время как для здоровой ткани он оказывается относительно высоким. Таким образом, рефрактометрический метод позволяет быстро и просто выполнить оценку дегидратации кожи при *in vivo* эксперименте по оптическому просветлению. Полученный результат позволяет делать детерминацию здорового участка кожи и участка кожи над опухолью, что может быть использовано для разработки оптических методов определения границ опухоли. Также на Рисунке 5.8 можно заметить, что для БИК области различия показателей преломления растворов глицерина после *in vivo* эксперимента над участками без опухоли и с опухолью наиболее заметно. Разность показателей преломления начального раствора глицерина и показателя преломления раствора глицерина после *in vivo* измерений на участках кожи над здоровой тканью составляет 0.0029 для видимой области (480-680 нм) и 0.0036 для БИК области (930-1550 нм), а для начального раствора глицерина и раствора глицерина после *in vivo* эксперимента на участках кожи над опухолью данная величина равна 0.0004 и 0.0007, соответственно, может объясняться сильным вкладом аномальной дисперсии, обусловленной поглощением воды в БИК спектральной области.

Выводы по главе 5

Показанные в главе 5 результаты позволяют сделать выводы о том, что показатель преломления сыворотки крови коррелирует со степенью развития опухолевой ткани модельного рака и его величина уменьшается с ростом опухоли. В то время, как показатель преломления опухолевой ткани модельного рака печени увеличивается с ростом опухоли, что свидетельствует об изменении её структуры и уплотнении. Для дисперсионных зависимостей показателя преломления были получены коэффициенты, позволяющие проводить экстраполяцию данных по формуле Зельмейера в видимом и БИК диапазоне длин волн. Полученные данные хорошо согласуются с известными литературными данными и могут служить основой для дальнейшего изучения оптических характеристик биологических сред и их изменения при развитии патологии.

Показано, что метод рефрактометрии позволяет быстро и с высокой точностью оценить степень дегидратации биологической ткани при воздействии ОПА. Согласно полученным результатам показатель преломления просветляющего раствора уменьшался, что свидетельствовало о дегидратации ткани и позволило выполнить количественную оценку объёма экстрагированной жидкости. Измерения на нескольких длинах волн видимого и БИК диапазонов позволили расширить возможности данного метода, в том числе и для анализа дисперсионных кривых экстрагированной межтканевой жидкости. Применение метода дает

возможность установить различия степени дегидратации для участков кожи над здоровой тканью и над опухолью. В дальнейшем метод многоволновой рефрактометрии для оценки степени дегидратации биоткани может быть применен для разработки новых экспресс методов диагностики и мониторинга онкологических заболеваний и повышения эффективности методов, применяемых на практике в настоящее время.

Знание преломляющих свойств патологических тканей и крови имеет особое значение для определения длины волны взаимодействия, оптимизирующей глубину проникновения и распределение лазерного излучения внутри ткани. Эти данные имеют решающее значение для выбора рабочих длин волн пульсоксиметров, для разработки клинических протоколов лазерного лечения с использованием внутритканевого нагрева или фотодинамической терапии и т. д.

В главе 5 представлены результаты из работ:

1. М.М. Назаров, О.П. Черкасова, **Е.Н. Лазарева**, А.Б. Бучарская, Н.А. Наволокин, В.В. Тучин, А.П. Шкуринов, «Комплексное изучение особенностей поглощения сыворотки крови крыс с экспериментальным раком печени» - // Оптика и спектроскопия. 2019. Т.126. Вып. 6. С. 799-808.

2. А.А. Манькова, О.П. Черкасова, **Е.Н. Лазарева**, А.Б. Бучарская, П.А. Дьяченко, Ю.В. Кистенев, Д.А. Вражнов, В.Е. Скиба, В.В. Тучин, А.П. Шкуринов, «Исследование сыворотки крови у крыс с трансплантированной холангиокарциномой с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния света» - // Оптика и спектроскопия. 2020. Т.128. Вып. 7. С. 956-963.

3. **E.N. Lazareva**, P.A. Dyachenko, A.B. Bucharskaya, N.A. Navolokin, V.V. Tuchin, «Estimation of dehydration of skin by refractometric method using optical clearing agents» - // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. 2019. Vol.5 №2. P. 020305 (7).

4. I.S. Martins, H.F. Silva, **E.N. Lazareva**, N.V. Chernomyrdin, K.I. Zaytsev, L.M. Oliveira, and V.V. Tuchin, «Measurement of tissue optical properties in a wide spectral range: a review [Invited]» - // Biomed. Opt. Express. 2023. №14. P. 249-298.

Заключение

Основные результаты, представленные в работе, заключаются в следующем:

1. Получены данные для показателей преломления биологических сред, таких как кожа мыши, кожа крысы, срезы мышечной ткани свиньи и крысы, срезы тканей головного мозга крысы, срезы почки мыши, в широком диапазоне температур для видимой и БИК спектральных областей (480-1550 нм). Проведен анализ их дисперсионных и температурных зависимостей. Определены коэффициенты для формулы Зельмейера, позволяющие восстанавливать показатель преломления в диапазоне 480-1550 нм.
2. Для жировой ткани свиньи получены и проанализированы дисперсионная и температурная зависимости показателей преломления среза ткани и вытопленной жировой капли. Определены температуры, которые могут соответствовать фазовым переходам.
3. Получены данные для показателей преломления растворов гемоглобина и альбумина человека. Получена зависимость от концентрации основного белкового компонента в растворе. Определены коэффициенты для дисперсионной формулы Зельмейера, позволяющие восстанавливать показатель преломления в спектральном диапазоне 480-1550 нм.
4. По экспериментальным данным измеренных показателей преломления альбумина и гемоглобина человека рассчитан показатель преломления крови для видимой и БИК спектральных областей (480-1550 нм).
5. Измерены значения показателей преломления растворов гликированных белков крови (альбумина и гемоглобина) и их смесей. Установлена возможность детерминации гликированной и негликированной фракций по величине температурного инкремента показателя преломления. Установлена зависимость, позволяющая проводить оценку уровня гликированности белков крови.
6. Показана возможность оценки степени гликированности гемоглобина методом многоволновой рефрактометрии на примере исследования рефрактометрических свойств растворов гемоглобина, полученного от цельной крови добровольцев с сахарным диабетом I-го типа.
7. Для выделенных 12 длин волн видимой и БИК спектральных областей (480-1550 нм) определены показатели преломления сыворотки крови крыс с опухолевой тканью модельного рака печени. Установлена корреляция показателя преломления сыворотки с

биохимическими параметрами сыворотки и корреляция показателя преломления сыворотки крови со степенью развития опухолевой ткани.

8. Показатель преломления опухолевой ткани модельного рака увеличивается при развитии опухоли, что подтверждает возможность использования величины показателя преломления в качестве «биомаркера», позволяющего детерминировать здоровую ткань от патологической.

9. При действии гиперосмотического агента ассоциированная с показателем преломления дегидратация участка кожи крыс над развитой модельной опухолью рака печени в 3 раза ниже по сравнению со здоровыми участками кожи.

Представленные в данной диссертационной работе экспериментальные данные о рефрактометрических свойствах различных тканей и их компонентов в широком диапазоне длин волн и температур необходимы для наиболее полного описания оптических свойств многокомпонентных тканей, в частности, при исследованиях *in vivo*. Например, при решении прямой и обратной задач взаимодействия световых пучков со сложноорганизованными тканями с использованием статистического моделирования Монте-Карло. Также полученные результаты важны для усовершенствования и развития оптических методов диагностики и терапии социально-значимых заболеваний, таких как сахарный диабет и онкологические заболевания.

Список сокращений и условных обозначений

АСТ - аспаратаминотрансфераза

АЛТ - аланинаминотрансфераза

БИК – ближний инфракрасный

КПП -конечные продукты гликирования

НДПП - непрерывная дисперсия показателя преломления

ОКТ – оптическая когерентная томография

ОП – оптическое просветление

ОПА – оптический просветляющий агент

ПВО – полное внутренне отражение

СЖК - свободные жирные кислоты

СКР - спектроскопия комбинационного рассеяния

УФ - ультрафиолетовый

Аlb – альбумин

GA – гликированный альбумин

Hb – гемоглобин

HbA1c – гликированный гемоглобин

Благодарности

Выражаю свою глубокую благодарность за помощь в исследованиях и обсуждение результатов руководителю коллективного центра НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии СГМУ им. В.И. Разумовского д.б.н. А.Б. Бучарской, профессору кафедры оптики и биофотоники СГУ имени Н.Г. Чернышевского д.ф.-м.н. В.И. Кочубею, доценту кафедры оптики и биофотоники СГУ имени Н.Г. Чернышевского к.ф.-м.н. И.Ю. Яниной, а также всем сотрудникам кафедры оптики и биофотоники, оказавшим поддержку и высказавшим полезные советы и замечания.

Особую искреннюю благодарность выражаю своему научному руководителю – Тучину Валерию Викторовичу, д.ф.-м.н., профессору, заслуженному деятелю науки РФ, чл.-корр. РАН, заведующему кафедрой оптики и биофотоники СГУ, за оказанную помощь в решении важных научных задач, а также проявившему терпение и внимание за время подготовки диссертации и к её защите. Именно Валерий Викторович способствовал моему становлению в профессии и помог в поиске своего места в научном мире. За время работы в научном коллективе под его руководством я многому научилась и особенно ценны его слова поддержки и советы, вдохновляющие на новые свершения.

Список литературы

- [1] S. Singh, "Refractive index measurement and its applications," *Physica Scripta*, vol. 65, no. 2, pp. 167-180, 2002.
- [2] R. Khan, B. Gul, S. Khan, H. Nisar and I. Ahmad, "Refractive index of biological tissues: Review, measurement techniques, and applications," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 33, p. 102192, 2021.
- [3] N. Gomes, V. V. Tuchin and L. M. Oliveira, "UV-NIR efficiency of the refractive index matching mechanism on colorectal muscle during treatment with different glycerol solutions," *J. Biomed. Phot. & Eng.*, vol. 6, no. 2, p. 3374, 2020.
- [4] Z. Wang, K. Tangella, A. Balla and G. Popescu, "Tissue refractive index as marker of disease," *J. Biomed. Opt.*, vol. 16, no. 11, p. 116017, 2011.
- [5] J. Lai, Z. Li, C. Wang and A. He, "Experimental measurement of the refractive index of biological tissues by total internal reflection," *Appl. Opt.*, vol. 44, p. 1845–1849, 2005.
- [6] S. Cheng, H. Y. Shen, G. Zhang, C. Huang and X. J. Huang, "Measurement of the refractive index of biotissue at four laser wavelengths," *Proc. SPIE.*, vol. 4916, p. 172–176, 2002.
- [7] M. Daimon and A. Masumura, "Measurement of the refractive index of distilled water from the near-infrared region to the ultraviolet region," *Appl. Opt.*, vol. 46, no. 18, pp. 3811-3820, 2007.
- [8] J. Gienger, H. Groß, J. Neukammer and M. Bär, "Determining the refractive index of human hemoglobin solutions by Kramers-Kronig relations with an improved absorption model," *Appl. Opt.*, vol. 55, no. 31, pp. 8951-8961, 2016.
- [9] O. Sijilmassi, P. G. Parejo and A. Á. Herrero, "Evaluation of the refractive indices of pure organic dyes using binary mixture models," *Journal of Molecular Liquids*, no. 1, p. 122221, 2023.
- [10] H. Ding, J. Q. Lu, W. A. Wooden, P. J. Kragel and X.-H. Hu, "Refractive indices of human skin tissues at eight wavelengths and estimated dispersion relations between 300 and 1600 nm," *Phys. Med. Biol.*, vol. 51, no. 6, pp. 1479-1489, 2006.
- [11] N. Bosschaart, G. J. Edelman, M. C. G. Aalders, T. G. van Leeuwen and D. J. Faber, "A literature review and novel theoretical approach on the optical properties of whole blood," *Lasers in Medical Science*, vol. 29, no. 2, p. 453–479, 2014.
- [12] G. M. Artmann, C. Kelemen, D. Porst, G. Buldt and S. Chien, "Temperature transitions of protein properties in human red blood cells," *Biophys. J.*, vol. 75, p. 3179–3183, 1998.
- [13] M. Friebel, M. Roggan, A. Müller, I. Meinke, A. Roggan and M. B. Gmbh, "Determination of optical properties of human blood in the spectral range 250 to 1100 nm using Monte Carlo simulations with hematocrit-dependent effective scattering phase functions," *J. Biomed. Opt.*, vol. 11, p. 034021, 2006.
- [14] S. Baar, "Osmotic resistance of heat-damaged erythrocytes," *J. Clin. Pathol.*, vol. 20, no. 3, pp. 239-243,

1967.

- [15] P. Giannios, S. Koutsoumpos, K. Toutouzas, M. Matiatou, G. Zografos and K. Moutzouris, "Complex refractive index of normal and malignant human colorectal tissue in the visible and near-infrared," *J. Biophotonics*, vol. 10, no. 2, p. 303–310, 2017.
- [16] Л. Плотникова, А. Поляничко, М. Кобелева, М. Успенская, А. Гарифуллин и С. Волошин, «Рефрактометрический метод исследования уровня протеинемии и электролитных нарушений в сыворотке крови больных множественной миеломой,» *Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики*, т. 2, сс. 263-268, 2017.
- [17] F. G. Martino, M. Vitillo, M. Pieri, G. Marrone, F. Gangeri, F. Ansali, M. Dessì, S. Bernardini, N. Di Daniele and A. Noce, "Biomarkers of Glyco-Metabolic Control in Hemodialysis Patients: Glycated Hemoglobin vs. Glycated Albumin," *Medicina (Kaunas)*, vol. 57, no. 7, p. 712, 2021.
- [18] A. Ghazaryan, M. Omar, Tserevelakis, G. J. and V. Ntziachristos, "Optoacoustic detection of tissue glycation," *Biomed. Opt. Express*, vol. 6, no. 9, p. 3149, 2015.
- [19] I. Costantini, R. Cicchi, L. Silvestri, F. Vanzi and F. Pavone, "In-vivo and ex-vivo optical clearing methods for biological tissues: review," *Biomed. Opt. Express*, vol. 10, no. 10, pp. 5251-5267, 2019.
- [20] W. Blondel, P. Rakotomanga, G. Khairallah, C. Soussen, W. Feng, D. Zhu, H. Chen, C. Daul, A. Delconte, F. Marchal and M. Amouroux, "Skin optical properties modifications using optical clearing agents: experimental and modelling results," *International Conference Laser Optics (ICLO)*, p. 507, 2018.
- [21] K. Yoshida, K. Ohkubo, N. Ojima and K. Iwata, "Application of the critical angle method to refractive index measurement of human skin in vivo under partial contact," *J. Biomed. Opt.*, vol. 18, no. 3, pp. 037002-037002, 2013.
- [22] N. Chen, M. Chen, S. Liu, Q. Guo, Z. Chen and T. Wang, "Change in refractive index of muscle tissue during laser-induced interstitial thermotherapy," *Biomed. Mater. Eng.*, vol. 24, no. 7, p. 807–813, 2014.
- [23] S. Nikitin, T. Khokhlova and I. Pelivanov, "Temperature dependence of the optoacoustic transformation efficiency in ex vivo tissues for application in monitoring thermal therapies," *J. Biomed. Opt.*, vol. 17, pp. 061214-1–9, 2012.
- [24] Б. А. Фихман, Микробиологическа рефрактометрия, Москва: Медицина, 1967, с. 280.
- [25] E. N. Lazareva, L. Oliveira, I. Y. Yanina, N. V. Chernomyrdin, G. R. Musina, D. K. Tuchina, A. N. Bashkatov, K. I. Zaytsev and V. V. Tuchin, "Refractive index measurements of tissue and blood components and OCAs in a wide spectral range," in *Handbook of Tissue Optical Clearing: New Prospects in Optical Imaging*, V. V. Tuchin, D. Zhu and E. A. Genina, Eds., Boca Raton, CRC Press, 2022, p. 141–166.
- [26] Д. В. Сивухин, Общий курс физики. В 5 т. Том IV. Оптика, Москва: Физматлит, 2005, p. 792.
- [27] W. Sellmeier, "Zur Erklärung der abnormen Farbenfolge im Spectrum einiger Substanzen," *Annalen Der Physik Und Chemie*, vol. 219, no. 6, p. 272–282, 1871.
- [28] G. Ghosh, "Sellmeier coefficients and dispersion of thermo-optic coefficients for some optical glasses,"

Appl. Opt., vol. 36, no. 7, p. 1540, 1997.

- [29] D. H. Jundt, "Temperature-dependent Sellmeier equation for the index of refraction, n_e , in congruent lithium niobate," *Opt. Lett.*, vol. 22, no. 20, p. 1553, 1997.
- [30] А. Ю. Яценко, Теория рефракции, Казань: Издательство Казанского университета, 1990, p. 130.
- [31] R. Barer, "Spectrophotometry of clarified cell suspensions," *Science*, p. 121, 1955.
- [32] A. Roggan, K. Dörschel, O. Minet, D. Wolff and G. Müller, "The optical properties of biological tissue in the near infrared wavelength range — review and measurements," in *Laser-Induced Interstitial Thermotherapy*, Bellingham, SPIE Press, 1995, pp. 10-44.
- [33] S. L. Jacques, "Optical properties of biological tissues: A review," *Phys. Med. Biol.*, vol. 58, p. R37–61, 2013.
- [34] V. V. Tuchin, "Tissue optics and photonics: Light-tissue interaction [Review]," *J. of Biomedical Photonics & Eng.*, vol. 1, no. 2, pp. 98-134, 2015.
- [35] A. Erokhin, N. Morachevskii and F. Faizulloev, "Temperature dependence of the refractive index in condensed media," *Zh. Eksp. Teor. Fiz.*, vol. 74, pp. 1336-1341, 1978.
- [36] М. Волькенштейн, Молекулярная оптика, Москва, 1951.
- [37] Н. Г. Басов, О. Н. Крохин, Н. В. Морачевский и Г. В. Склизков, «Объемный и поверхностный эффекты, возникающие при воздействии излучения лазера на оптическое стекло,» *Прик. Мат. Теор. Физ.*, т. 6, сс. 44-49, 1971.
- [38] Г. А. Аскарян, «Тепловой след и самофокусировка мощного луча в среде,» *Журнал экспериментальной и теоретической физики*, т. 60, № 4, сс. 1295-1299, 1971.
- [39] Б. Хлебцов, В. Ханадеев и Н. Хлебцов, «Определение размера, концентрации и показателя преломления наночастиц оксида кремния методом спектротурбидиметрии,» *Оптика и спектроскопия*, т. 105, № 5, сс. 801-808, 2008.
- [40] Н. Г. Хлебцов, Л. А. Трачук и А. Г. Мельников, «Влияние размера, формы и структуры металлических наночастиц на зависимость их оптических свойств от показателя преломления дисперсионной среды,» *Оптика и спектроскопия*, т. 98, № 1, сс. 83-90, 2005.
- [41] D. Huang, E. A. Swanson and C. P. Lin, "Optical coherence tomography," *Science*, vol. 254, no. 5035, p. 1178–1181, 1991.
- [42] J. G. Fujimoto, C. Pitris, S. A. Boppart and M. E. Brezinski, "Optical coherence tomography: an emerging technology for biomedical imaging and optical biopsy," *Neoplasia*, vol. 2, no. 1-2, pp. 9-25, 2000.
- [43] J. Bille, High resolution imaging in microscopy and ophthalmology, Cham: Springer, 2019.
- [44] J. Stritzel, M. Rahlves and B. Roth, "Refractive-index measurement and inverse correction using optical coherence tomography," *Opt. Lett.*, no. 40, pp. 558-5561, 2015.

- [45] В. В. Тучин, *Оптическая биомедицинская диагностика: в 2 т.*, Москва: Физматлит, 2006, с. 560.
- [46] G. J. Tearney, M. E. Brezinski, J. F. Southern, B. E. Bouma, M. R. Hee and J. G. Fujimoto, "Determination of the refractive index of highly scattering human tissue by optical coherence tomography," *Opt. Lett.*, vol. 20, p. 2258–2260, 1995.
- [47] V. V. Tuchin, *Handbook of optical biomedical diagnostics. Light-tissue interaction*, 2nd Edition, Bellingham, WA: SPIE Press, 2016.
- [48] S. Kim, J. Na, M. J. Kim and B. H. Lee, "Simultaneous measurement of refractive index and thickness by combining low-coherence interferometry and confocal optics," *Opt. Express*, vol. 16, p. 5516–5526, 2008.
- [49] Y. Zhou, K. K. H. Chan, T. Lai and S. Tang, "Characterizing refractive index and thickness of biological tissues using combined multiphoton microscopy and optical coherence tomography," *Biomed. Opt. Express*, vol. 4, pp. 38-50, 2013.
- [50] P. H. Tomlins, P. Woolliams, C. Hart, A. Beaumont and M. Tedaldi, "Optical coherence refractometry," *Opt. Lett.*, vol. 33, p. 2272–2274, 2008.
- [51] A. R. Knuettel and M. Boehlau-Godau, "Spatially confined and temporally resolved refractive index and scattering evaluation in human skin performed with optical coherence tomography," *J. Biomed. Opt.*, vol. 5, no. 1, pp. 83-92, 2000.
- [52] M. Friebel and M. Meinke, "Model function to calculate the refractive index of native hemoglobin in the wavelength range of 250 to 1100 nm dependent on concentration," *Appl. Opt.*, vol. 45, no. 12, p. 2838–2842, 2006.
- [53] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira and V. V. Tuchin, "Water content and scatterers dispersion evaluation in colorectal tissues," *J. Biomed. Phot. Eng.*, vol. 3, no. 4, p. 040301, 2017.
- [54] V. V. Tuchin, *Optical clearing of tissues and blood*, Bellingham: SPIE Press, 2006.
- [55] L. Oliveira and V. V. Tuchin, *The optical clearing method – a new tool for clinical practice and biomedical engineering*, Cham-Switzerland: Springer, 2019.
- [56] Q. Ye, J. Wang, Z.-C. Deng, W.-Y. Zhou, C.-P. Zhang and J.-G. Tian, "Measurement of the complex refractive index of tissue-mimicking phantoms and biotissue by extended differential total reflection method," *J. Biomed. Opt.*, vol. 16, no. 9, p. 097001, 2011.
- [57] H. Liu and S. Xie, "Measurement method of the refractive index of biotissue by total internal reflection," *Appl. Opt.*, vol. 35, p. 1793–1795, 1996.
- [58] V. Trivedi, S. Mahajan, M. Joglekar, V. Chhaniwal, Z. Zalevsky, B. Javidi and A. Anand, "3D printed hand-held refractometer based on laser speckle correlation," *Optics and Lasers in Engineering*, vol. 118, pp. 7-13, 2019.
- [59] O. Sydoruk, O. Zhernovaya, V. V. Tuchin and A. Douplik, "Refractive index of solutions of human hemoglobin from the near-infrared to the ultraviolet range: Kramers-Kronig analysis," *J. Biomed. Opt.*, vol. 17, no. 11, p. 115002, 2012.

- [60] V. Lucarini, K.-E. Peiponen, J. J. Saarinen and E. M. Vartainen, *Kramers-Kronig relations in optical materials research*, Berlin: Springer, 2005.
- [61] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira and V. V. Tuchin, "Measurement of optical properties of normal and pathological human liver tissue from deep-UV to NIR, in *Tissue Optics and Photonics*," *Proc. SPIE*, vol. 11363, p. 113630G, 2020.
- [62] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, M. D. Kozintseva, V. I. Kochubei, S. Y. Gorodkov and V. V. Tuchin, "Optical properties of peritoneal biological tissues in the spectral range of 350–2500 nm," *Opt. Spectrosc.*, vol. 120, no. 1, p. 1–8, 2016.
- [63] A. R. Botelho, H. F. Silva, I. S. Martins, I. C. Carneiro, S. D. Carvalho, R. M. Henrique, V. V. Tuchin and L. M. Oliveira, "Fast calculation of spectral optical properties and pigment content detection in human normal and pathological kidney," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, no. 286, p. 122002, 2023.
- [64] А. Б. Рубин, *Биофизика: учебник для биологических спец. вузов: в 2 т., А. Б. Рубин, Ред., Москва: Университет, 1999, p. 448.*
- [65] О. Мяделец, В. Мяделец, И. Соболевская и Т. Кичиригина, «Белая и бурая жировые ткани: взаимодействие со скелетной мышечной тканью,» *Вестник ВГМУ*, т. 13, № 5, сс. 32-44, 2014.
- [66] В. Быков, *Цитология и общая гистология: функциональная морфология клеток и тканей человека*, В. Быков, Ред., СПб.: Сотис, 2000, с. 520.
- [67] В. Дубровский, Б. Дворкин, И. Янина и В. Тучин, «Фотовоздействие на клетки жировой ткани человека in vitro,» *Цитология*, т. 53, № 5, с. 423–432, 2011.
- [68] Е. Северин, *Биохимия: Учебник для вузов*, Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2009, p. 768.
- [69] Ю. Афанасьев, Н. Юрина и К. Е.Ф., *Гистология, эмбриология, цитология: Учебник*, Ю. Афанасьев и Н. Юрина, Ред., Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2012.
- [70] S. Ojha, H. Budge and M. E. Symonds, "Adipocytes in normal tissue biology," in *Pathobiology of Human Disease*, Nottingham, Elsevier Inc, 2014, pp. 2003-2013.
- [71] G. S. F. Castro, B. B. Almeida, D. S. Leonardi, P. P. Ovídio and A. A. Jordão, "Association between hepatic cholesterol and oleic acid in the liver of rats treated with partially hydrogenated vegetable oil," *Rev. Nutr.*, vol. 25, p. 45–56, 2012.
- [72] S. N. Turk and S. B. Smith, "Carcass fatty acid mapping," *Meat Sci.*, vol. 81, p. 658–663, 2009.
- [73] R. F. Reinoso, B. A. Telfer and M. Rowland, "Tissue water content in rats measured by desiccation," *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, vol. 32, no. 2, p. 87–92, 1997.
- [74] M. E. Popovic, "Thermodynamic properties of human tissues," *Thermal Science*, vol. 24, no. 68, pp. 4115-4133, 2020.
- [75] E. N. Lazareva and V. V. Tuchin, "Blood refractive index modelling in the visible and near infrared spectral regions," *J. Biomed. Phot. Eng.*, vol. 4, no. 1, p. 010503, 2018.

- [76] T. Ermatov, R. E. Noskov, A. A. Machnev, I. Gnusov, V. Atkin, E. N. Lazareva, S. V. German, S. S. Kosolobov, T. S. Zatsepin, O. V. Sergeeva, J. S. Skibina, P. Ginzburg, V. V. Tuchin, P. G. Lagoudakis and D. A. Gorin, "Multispectral sensing of biological liquids with hollow-core microstructured optical fibres," *Light: Sci. Appl.*, vol. 9, p. 173, 2020.
- [77] А. Башкатов, Д. Жестков, Э. Генина и В. Тучин, «Иммерсионное просветление крови человека в видимом и ближнем ИК спектральных диапазонах,» *Оптика и спектроскопия*, т. 98, № 4, с. 695–703, 2005.
- [78] А. Ярославская, А. Приезжев, Х. Родригес, И. В. Ярославский и Г. Баттарби, «Оптика крови,» в *Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 1*, Москва, Физматлит, 2006, p. 157–196.
- [79] A. Nilsson, G. Lucassen, W. Verkruijsse, S. Andersson-Engels and M. J. C. van Gemert, "Changes in optical properties of human whole blood in vitro due to slow heating," *Photochem. Photobiology.*, vol. 65, no. 2, p. 366–373, 1997.
- [80] Y. L. Jin, J. Y. Chen, L. Xu and P. N. Wang, "Refractive index measurement for biomaterial samples by total internal reflection," *Phys. Med. Biol.*, vol. 51, p. 371–379, 2006.
- [81] M. Haruna, K. Yodena, M. Ohmi and A. Seiyama, "Detection of phase transition of a biological membrane by precise re-fractive-index measurement based on the low coherence interferometry," *Proceedings of SPIE*, vol. 3915, 2000.
- [82] J. C. Bischof and X. and He, "Thermal stability of proteins," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1066, p. 12–33, 2006.
- [83] K. Ruckpaul, H. Rein and F. Jung, "Correlations between thermal stability and circular dichroism of hemoglobin derivatives of different species," *FEBS Lett.*, vol. 13, p. 193–194, 1971.
- [84] M. E. Clementi, S. G. Condo, M. Castagnola and B. Giardina, "Hemoglobin function under extreme life conditions," *Eur. J. Biochem.*, vol. 223, p. 309–317, 1994.
- [85] J. Kinderlerer, H. Lehmann and K. F. Tipton, "Thermal denaturation of human haemoglobins," *Biochem. J.*, vol. 119, p. 66–67, 1970.
- [86] J. Kinderlerer, H. Lehmann and K. F. Tipton, "The thermal denaturation of human oxyhaemoglobins A, A2, C and S," *Biochem. J.*, vol. 135, p. 805–814, 1973.
- [87] T. Yang and K. W. Olsen, "Effects of crosslinking on the thermal stability of hemoglobins. II. The stabilization of met-, cyanomet-, and car- bonmonoxyhemoglobins A and S with bis(3,5-dibromosalicyl) fumarate," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 261, p. 283–290, 1988.
- [88] T. Yang and K. W. Olsen, "The Thermal Stability of Hb O-Indonesia [$\alpha 116(\text{GH4})\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}$]," *Hemoglobin*, vol. 14, no. 6, p. 641–646, 1990.
- [89] Y. B. Yan, Q. Wang, H. W. He and H. M. Zhou, "Protein thermal aggregation involves distinct regions: sequential events in the heat-induced unfolding and aggregation of hemoglobin," *Biophys. J.*, vol. 86, p. 1682–1690, 2004.
- [90] W. Q. Sun, "Dielectric relaxation of water and water-plasticized bio-molecules in relation to cellular water

- organization, cytoplasmic viscosity, and desiccation tolerance in recalcitrant seed tissues," *Plant Physiol.*, vol. 124, p. 1203–1216, 2000.
- [91] R. Glaser, *Biophysics*, Berlin/Heidelberg/New York: Springer, 2004.
- [92] C. Kelemen, S. Chien and G. M. Artmann, "Temperature transition of human hemoglobin at body temperature: effects of calcium," *Biophys. J.*, vol. 80, p. 2622–2630, 2001.
- [93] I. Digel, C. Maggakis-Kelemen, K. F. Zerlin, P. Linder, N. Kasischke, P. Kayser, D. Porst, A. Temiz Artmann and G. M. Artmann, "Body temperature-related structural transitions of monotremal and human hemoglobin," *Biophys. J.*, vol. 91, no. 8, pp. 3014–3021, 2006.
- [94] A. Bierzynski, "Methods of peptide conformation studies," *Acta Biochim.*, vol. 48, p. 1091–1099, 2001.
- [95] G. Geraci and L. J. Parkhurst, "Circular dichroism spectra of hemoglobins," *Methods Enzymol.*, vol. 76, p. 262–275, 1981.
- [96] R. Li, Y. Nagai and M. Nagai, "Changes of tyrosine and tryptophan residues in human hemoglobin by oxygen binding: near- and far-UV circular dichroism of isolated chains and recombined hemoglobin," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 82, p. 93–101, 2000.
- [97] E. N. Lazareva and V. V. Tuchin, "The temperature dependence of refractive index of hemoglobin at the wavelengths 930 and 1100 nm," *Proc. SPIE*, vol. 9917, p. 99170U, 2016.
- [98] I. L. Cameron, V. A. Ord and G. D. Fullerton, "Water of hydration in the intra- and extra-cellular environment of human erythrocytes," *Biochem. Cell Biol.*, vol. 66, p. 1186–1199, 1988.
- [99] D. Arosio, H. E. Kwansa, H. Gering, G. Piszczek and E. Bucci, "Static and dynamic light scattering approach to the hydration of hemoglobin and its supertetramers in the presence of osmolites," *Biopolymers*, vol. 63, p. 1–11, 2002.
- [100] I. S. Martins, H. F. Silva, E. N. Lazareva, N. V. Chernomyrdin, K. I. Zaytsev, L. M. Oliveira and V. V. Tuchin, "Measurement of tissue optical properties in a wide spectral range: a review [Invited]," *Biomed. Opt. Express*, vol. 14, no. 1, pp. 249–298, 2022.
- [101] А. Башкатов, Э. Генина, В. Кочубей и В. Тучин, «Оптические свойства подкожной жировой ткани в спектральном диапазоне 400–2500 нм,» *Оптика и спектроскопия*, т. 99, № 5, pp. 868–874, 2005.
- [102] I. Y. Yanina, A. P. Popov, A. V. Bykov and V. V. Tuchin, "Monitoring of temperature-mediated adipose tissue phase transitions by refractive index measurements," *Proc. SPIE*, vol. 9421, p. 94210K, 2014.
- [103] B. Gul, S. Ashraf, S. Khan, H. Nisar and I. Ahmad, "Cell refractive index: Models, insights, applications and future perspectives," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 33, p. 102096, 2021.
- [104] J. H. Jung, K. Kim, J. Yoon and Y. K. Park, "Hyperspectral optical diffraction tomography," *Optics Express*, vol. 24, no. 3, pp. 2006–2012, 2016.
- [105] Q. Zhang, L. Zhong, P. Tang, Y. Yuan, S. Liu, J. Tian and X. Lu, "Quantitative refractive index distribution of single cell by combining phase-shifting interferometry and AFM imaging," *Scientific Reports*, vol. 7, p. 2532, 2017.

- [106] P. Y. Liu, L. K. Chin, W. Ser, H. F. Chen, C.-M. Hsieh, C.-H. Lee, K.-B. Sung, T. C. Ayi, P. H. Yap, B. Liedberg, K. Wang, T. Bourouina and Y. Leprince-Wang, "Cell refractive index for cell biology and disease diagnosis: past, present and future," *Lab on a Chip*, vol. 4, no. 16, p. 634–644, 2016.
- [107] W. Z. Song, A. Q. Liu, S. Swaminathan, C. S. Lim, P. H. Yap and T. C. Ayi, "Determination of single living cell's dry/water mass using optofluidic chip," *Applied Physics Letters*, vol. 97, no. 22, p. 223902, 2007.
- [108] P. Ledwig and F. E. Robles, "Quantitative 3D refractive index tomography of opaque samples in epi-mode," *Optica*, vol. 8, no. 1, pp. 6-14, 2021.
- [109] M. Baczewska, K. Eder, S. Ketelhut, B. Kemper and M. Kujawińska, "Refractive index changes of cells and cellular compartments upon paraformaldehyde fixation acquired by tomographic phase microscopy," *Cytometry Part A*, vol. 99, no. 4, p. 2021, 388–398.
- [110] X. Chen, M. E. Kandel, C. Hu, Y. J. Lee and G. Popescu, "Wolf phase tomography (WPT) of transparent structures using partially coherent illumination," *Light: Sci. Appl.*, vol. 9, p. 142, 2020.
- [111] S. Bettati, A. Mozzarelli and M. F. Perutz., "Allosteric mechanism of haemoglobin: rupture of salt-bridges raises the oxygen affinity of the T-structure," *J. Mol. Biol.*, vol. 281, p. 581–585, 1998.
- [112] J. E. Knapp, M. A. Oliveira, Q. Xie, S. R. Ernst, A. F. Riggs and M. L. Hackert, "The structural and functional analysis of the hemoglobin D component from chicken," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, p. 6411–6420, 1999.
- [113] M. Levantino, A. Cupane and L. Zimanyi, "Quaternary structure dependence of kinetic hole burning and conformational substates interconversion in hemoglobin," *Biochemistry*, vol. 42, p. 4499–4505, 2003.
- [114] J. A. Lukin, G. Kontaxis, V. Simplaceanu, Y. Yuan, A. Bax and H. C., "Quaternary structure of hemoglobin in solution," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, vol. 100, p. 517–520, 2003.
- [115] J. Williamson, M. Shanahan and R. Hochmuth, "The influence of temperature on red cell deformability," *Blood*, vol. 46, no. 4, pp. 611-624, 1975.
- [116] S. Carvalho, N. Gueiral, E. Nogueira, R. Henrique, L. Oliveira and T. V.V., "Glucose diffusion in colorectal mucosa—a comparative study between normal and cancer tissues," *Biomed. Opt.*, vol. 22, no. 9, p. 091506, 2017.
- [117] G. Mazarevica, T. Freivalds and A. Jurka, "Properties of erythrocyte light refraction in diabetic patients," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 7, no. 2, p. 244–247, 2002.
- [118] I. D. Federation, "IDF Diabetes Atlas, 10th edn.," Belgium: International Diabetes Federation, Brussels, 2021.
- [119] K. Ogurtsova, J. Fernandes, Y. Huang, U. Linnenkamp, L. Guariguata, N. Cho, D. Cavan, J. Shaw and L. Makaroff, "IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 28, pp. 40-50, 2017.
- [120] S. Chatterjee, K. Khunti and M. Davies, "Type 2 diabetes," *Lancet*, vol. 389, p. 2239–2251, 2017.

- [121] M. Pohanka, "Glycated hemoglobin and methods for its point of care testing," *Biosensors*, vol. 11, no. 3, p. 70, 2021.
- [122] J. Mitsios, E. Ekinici, G. Mitsios, L. Churilov and V. Thijs, "Relationship between glycated hemoglobin and stroke risk: a systematic review and meta-analysis," *Journal of the American Heart Association*, vol. 7, no. 11, p. e009461, 2018.
- [123] C. Weykamp, "HbA1c: A review of analytical and clinical aspects," *Annals of Laboratory Medicine*, vol. 33, no. 6, pp. 393-400, 2013.
- [124] X. Rossello, S. Raposeiras-Roubin and B. Oliva, "Glycated hemoglobin and subclinical atherosclerosis in people without diabetes," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 77, no. 22, p. 2777–2791, 2021.
- [125] T. Bomholt, T. Adrian, K. Nørgaard, A. Ranjan, T. Almdal, A. Larsson, M. Vadstrup and M. Rix, "The use of HbA1c, glycated albumin and continuous glucose monitoring to assess glucose control in the chronic kidney disease population including dialysis," *Nephron*, vol. 145, pp. 14-19, 2021.
- [126] M. Martinez, J. Santamarina and A. Pavesi, "Glycemic variability and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes," *BMJ Open Diabetes Research and Care*, vol. 9, p. e002032, 2021.
- [127] S. Gupta, U. Jain and N. Chauhan, "Laboratory diagnosis of HbA1c: a review," *Journal of Nanomedicine Research*, vol. 5, no. 4, p. 00120, 2017.
- [128] M. O. Ezegbogu and K. Abdulsalam, "Glycated haemoglobin (HbA1c): an update on available methods," *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, vol. 11, no. 1, p. 8 – 14, 2018.
- [129] R. V. Machry, D. V. Rados, G. Ribeiro de Gregório and T. C. Rodrigues, "Self-monitoring blood glucose improves glycemic control in type 2 diabetes without intensive treatment: A systematic review and meta-analysis," *Diabetes Research and Clinical Practice*, no. 142, pp. 173-187, 2018.
- [130] M. Mallya, R. Shenoy, G. Kodyalamoole, M. Biswas, J. Karumathil and S. Kamath, "Absorption spectroscopy for the estimation of glycated hemoglobin (HbA1c) for the diagnosis and management of diabetes mellitus: a pilot study," *Photomed. Laser Surg.*, vol. 31, no. 5, p. 219–224, 2013.
- [131] M. Inaba, S. Okuno, Y. Kumeda, S. Yamada, Y. Imanishi, T. Tabata, M. Okamura, S. Okada, T. Yamakawa, E. Ishimura and Y. Nishizawa, "Glycated albumin is a better glycemic indicator than glycated hemoglobin values in hemodialysis patients with diabetes: effect of anemia and erythropoietin injection," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 18, no. 3, pp. 896-903, 2007.
- [132] D. Sany, Y. Elshahawy and W. Anwar, "Glycated albumin versus glycated hemoglobin as glycemic indicator in hemodialysis patients with diabetes mellitus: variables that influence," *Saudi J Kidney Dis Transpl*, vol. 24, no. 2, pp. 260-273, 2013.
- [133] K. Hashimoto, T. Osugi, S. Noguchi, Y. Morimoto, K. Wasada, S. Imai, M. Waguri, R. Toyoda, T. Fujita, S. Kasayama and M. Koga, "A1C but not serum glycated albumin is elevated because of iron deficiency in late pregnancy in diabetic women," *Diabet. Care*, vol. 33, no. 3, pp. 509-511, 2008.
- [134] D. Dai, Y. Mo and J. Zhou, "Glycated albumin and its variability: Clinical significance, research progress and overall review," *Obesity Medicine*, vol. 19, p. 100256, 2020.

- [135] H. Roohk and A. Zaidi, "A review of glycated albumin as an intermediate glycation index for controlling diabetes," *J. Diabet. Sci. Technol.*, vol. 2, no. 6, pp. 1114-1121, 2008.
- [136] E. Bourdon, N. Loreau and D. Blache, "Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin," *The FASEB Journal*, vol. 13, no. 2, p. 233-244, 1999.
- [137] R. Kisugi, T. Kouzuma, T. Yamamoto, S. Akizuki, H. Miyamoto, Y. Someya, J. Yokoyama, I. Abe, N. Hirai and A. Ohnishi, "Structural and glycation site changes of albumin in diabetic patient with very high glycated albumin," *Clin. Chim. Acta*, vol. 382, p. 59-64, 2007.
- [138] N. Ahmed and P. J. Thornalley, "Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications?," *Diabetes, Obesity and Metabolism*, vol. 9, no. 3, p. 233-245, 2007.
- [139] S. Kosecki, P. Rodgers and M. Adams, "Glycemic monitoring in diabetics with sickle cell plus beta-thalassemia hemoglobinopathy," *Ann Pharmacother*, vol. 39, no. 9, pp. 1557-1560, 2005.
- [140] P. Rondeau and E. Bourdon, "The glycation of albumin: Structural and functional impacts," *Biochimie*, vol. 93, no. 4, p. 645-658, 2011.
- [141] T. Kohzuma, X. Tao and M. Koga, "Glycated albumin as biomarker: Evidence and its outcomes," *J Diabetes Complications*, vol. 35, no. 11, p. 108040, 2021.
- [142] A. Gugliucci, "Glycation as the glucose link to diabetic complications," *J Am Osteopath Assoc*, vol. 100, no. 10, pp. 621-634, 2000.
- [143] R. V. Giglio, B. Lo Sasso, L. Agnello, G. Bivona, R. Maniscalco, D. Ligi, F. Mannello and M. Ciaccio, "Recent Updates and Advances in the Use of Glycated Albumin for the Diagnosis and Monitoring of Diabetes and Renal, Cerebro- and Cardio-Metabolic Diseases," *Journal of Clinical Medicine*, vol. 9, no. 11, p. 3634, 2020.
- [144] M. Boada, P. Martínez-Lage, P. Serrano-Castro, M. Costa and A. Páez, "Therapeutic plasma exchange with albumin: a new approach to treat Alzheimer's disease," *Expert Review of Neurotherapeutics*, vol. 21, no. 8, pp. 843-849, 2021.
- [145] J. Wen, F. Hu and Q. Yang, "Comparison of hemoglobin alc, glycated albumin and fasting plasma glucose for prediction of arterial stiffness in chinese adults," *Diabetes Metab Syndr Obes*, vol. 10, no. 13, pp. 65-70, 2020.
- [146] M. Koga, S. Kasayama, H. Kanehara and Y. Bando, "CLD (chronic liver diseases)- HbA1C as a suitable indicator for estimation of mean plasma glucose in patients with chronic liver diseases," *Diabet. Res. Clin. Pract.*, vol. 81, no. 2, pp. 258-262, 2008.
- [147] M. Koga, S. Matsumoto, H. Saito and S. Kasayama, "Body mass index negatively influences glycated albumin, but not glycated hemoglobin, in diabetic patients," *Endocrine Journal*, vol. 53, no. 3, p. 387-391, 2006.
- [148] M. Koga, J. Murai, H. Saito, S. Matsumoto and S. Kasayama, "Effects of thyroid hormone on serum glycated albumin levels: Study on non-diabetic subjects," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 84, no. 2, p. 163-167, 2009.

- [149] R. Nishimura, A. Kanda, H. Sano, T. Matsudaira, Y. Miyashita, A. Morimoto, T. Shirasawa, T. Kawaguchi and N. Tajima, "Glycated albumin is low in obese, non-diabetic children," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 71, no. 3, p. 334–338, 2006.
- [150] G. M. Campos de Macedo, S. Nunes and T. Barreto, "Skin disorders in diabetes mellitus: an epidemiology and physiopathology," *Diabetol. Metab. Syndr.*, vol. 8, no. 1, p. 63, 2016.
- [151] V. V. Tuchin, *Tissue optics: light scattering methods and instruments for medical diagnostics*, Bellingham, Washington: SPIE Press, 2015.
- [152] L. K. Aishwarya, R. Rashmi, S. Sadanand, C. K. Narayanappa and N. Sriram, "Studies on relating to monitoring blood glucose levels using noninvasive optical methods," *2nd IEEE International Conference on Recent Trends in Electronics, Information & Communication Technology (RTEICT)*, 2017.
- [153] Y. T. Lan, Y. P. Kuang, L. P. Zhou, G. Y. Wu, P. C. Gu, H. J. Wei and K. Chen, "Noninvasive monitoring of blood glucose concentration in diabetic patients with optical coherence tomography," *Laser Physics Letters*, vol. 14, no. 3, p. 035603, 2017.
- [154] Н. Максимова, А. Наговицын и Г. Максимов, «Роль ионного транспорта в регуляции сродства гемоглобина к кислороду при сахарном диабете,» *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, т. 4, сс. 456-458, 2002.
- [155] O. Smolyanskaya, E. Lazareva, S. Nalegaev, N. Petrov, K. Zaytsev, P. Timoshina, D. Tuchina, Y. G. Toropova, O. Korniyushin, A. Y. Babenko, J.-P. Guillet and V. Tuchin, "Multimodal Optical Diagnostics of Glycated Biological Tissues," *Biochemistry*, vol. 84, no. 1, pp. 124-143, 2019.
- [156] D. K. Tuchina and V. V. Tuchin, "Optical and structural properties of biological tissues under diabetes mellitus," *J. of Biomedical Photonics & Eng.*, vol. 4, no. 2, pp. 020201-22, 2018.
- [157] J. Kinnunen, H. Kokkonen, V. Kovanen, M. Hauta-Kasari, P. Vahimaa, M. Lammi, J. Töyräs and J. Jurvelin, "Nondestructive fluorescence-based quantification of threose-induced collagen cross-linking in bovine articular cartilage," *J. Biomed. Opt.*, vol. 17, no. 9, p. 097003, 2012.
- [158] J.-Y. Tseng, A. A. Ghazaryan, W. Lo, Y.-F. Chen, V. Hovhannisyan, S.-J. Chen, H. Tan and C.-Y. Dong, "Multiphoton spectral microscopy for imaging and quantification of tissue glycation," *Biomedical Optics Express*, vol. 2, no. 2, p. 218, 2010.
- [159] Y.-J. Hwang, J. Granelli and J. Lyubovitsky, "Multiphoton optical image guided spectroscopy method for characterization of collagen-based materials modified by glycation," *Analytical Chemistry*, vol. 83, no. 1, p. 200–206, 2011.
- [160] M. Yokota and Y. Tokudome, "The effect of glycation on epidermal lipid content, its metabolism and change in barrier function," *Skin Pharmacol. Physiol.*, vol. 29, p. 231–242, 2016.
- [161] E. Shirshin, O. Cherkasova, T. Tikhonova, E. Berlovskaya, A. Priezzhev and V. Fadeev, "Native fluorescence spectroscopy of blood plasma of rats with experimental diabetes: identifying fingerprints of glucose-related metabolic pathways," *J. Biomed. Opt.*, vol. 20, no. 5, p. 051033, 2015.
- [162] N. R. Rovnyagina, T. N. Tikhonova, D. S. Molodenskiy and E. Shirshin, "Albumin conformational changes during glycation and thermal denaturation processes revealed by fluorescence spectroscopy and

- small-angle X-ray scattering," *Izvestiya of Saratov University. New series. Series: Physics.*, vol. 17, no. 3, pp. 179-190, 2017.
- [163] T. Pan, M. Li, J. Chen and H. Xue, "Quantification of glycated hemoglobin indicator HbA1c through near-infrared spectroscopy," *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, vol. 7, no. 4, p. 1350060, 2014.
- [164] S. Carvalho, N. Gueiral, E. Nogueira, R. Henrique, L. Oliveira and V. V. Tuchin, "Wavelength dependence of the refractive index of human colorectal tissues: comparison between healthy mucosa and cancer," *J. of Biomedical Photonics & Eng.*, vol. 2, no. 4, pp. 040307-9, 2016.
- [165] V. Tuchin, R. Wang, E. Galanzha, N. Lakodina and A. Solovieva, "Monitoring of glycated haemoglobin in a whole blood by refractive index measurement with OCT/CLEO/QELS," *Conference: Lasers and Electro-Optics. CLEO '03*, p. 120, 2003.
- [166] V. V. Tuchin, R. K. Wang, E. I. Galanzha, J. B. Elder and D. M. Zhestkov, "Monitoring of glycated hemoglobin by OCT measurement of refractive index," *Proc. SPIE.*, vol. 5316, pp. 66-77, 2004.
- [167] O. S. Zhernovaya, V. V. Tuchin and I. V. Meglinski, "Monitoring of blood proteins glycation by refractive index and spectral measurements," *Las. Phys. Lett.*, vol. 5, no. 6, pp. 460-464, 2008.
- [168] E. N. Lazareva and V. V. Tuchin, "Monitoring of hemoglobin glycation using spectral and refraction measurements," *Proc. SPIE*, vol. 6534, p. 653426, 2007.
- [169] E. N. Lazareva, A. Y. Zyubin, I. G. Samusev, V. A. Slezhkin, V. Kochubey and V. Tuchin, "Refraction, fluorescence, and Raman spectroscopy of normal and glycated hemoglobin," *Proc. SPIE*, vol. 10685, p. 1068540, 2018.
- [170] M. B. Martos-Cabrera, A. Velando-Soriano, L. Pradas-Hernández, N. Suleiman-Martos, G. A. Cañadas-De la Fuente, L. Albendín-García and J. L. Gómez-Urquiza, "Smartphones and apps to control glycosylated hemoglobin (HbA1c) level in diabetes: A systematic review and meta-analysis," *Journal of Clinical Medicine*, vol. 9, no. 3, p. 693, 2020.
- [171] M. M. Nazarov, O. P. Cherkasova, E. N. Lazareva, A. B. Bucharskaya, N. A. Navolokin, V. V. Tuchin and A. P. Shkurinov, "A Complex study of the peculiarities of blood serum absorption of rats with experimental liver cancer," *Opt. Spectrosc.*, vol. 126, no. 6, p. 721-729, 2019.
- [172] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira and V. V. Tuchin, "Measuring optical properties of human liver between 400 and 1000 nm," *Quant. Elect.*, vol. 49, no. 1, pp. 13-19, 2019.
- [173] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira and V. V. Tuchin, "Simple multimodal optical technique for evaluation of free/bound water and dispersion of human liver tissue," *J. Biomed. Opt.*, vol. 22, no. 1, pp. 125002-1-10, 2017.
- [174] S. Carvalho, I. Carneiro, R. Henrique, V. Tuchin and L. Oliveira, "Lipofuscin-type pigment as a marker of colorectal cancer," *Electronics*, vol. 9, no. 11, p. 1805, 2020.
- [175] Z. Deng, J. Wang and Q. Ye, "Determination of continuous complex refractive index dispersion of biotissue based on internal reflection," *J. Biomed. Opt.*, vol. 21, no. 1, p. 015003, 2016.

- [176] Q. W. Song, C.-Y. Ku, C. Zhang and R. Michalak, "Modified critical angle method for measuring the refractive index of bio-optical materials and its application to bacteriorhodopsin," *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 12, no. 5, p. 797, 1995.
- [177] P. A. Dyachenko, L. E. Dolotov, E. N. Lazareva, A. A. Kozlova, O. A. Inozemtseva, R. A. Verkhovskii, G. A. Afanaseva, N. A. Shushunova, V. V. Tuchin, E. I. Galanzha, V. P. and Zharov and D. o. M. C. i. W. B. S. Usin, "Detection of melanoma cells in whole blood samples using spectral imaging and optical clearing," *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, vol. 27, no. 1, p. 7200711, 2011.
- [178] J. Rheims, J. Kosery and T. Wriedt, "Refractive index measurements in the near-IR using an Abbe refractometer," *Meas. Sci. Technol.*, vol. 8, p. 601–605, 1997.
- [179] G. H. Meeten and A. N. North, "Refractive index measurement of turbid colloid fluids by transmission near the critical angle," *Meas. Sci. Technol.*, vol. 2, p. 441–447, 1991.
- [180] H. Contreras-Tello, R. Márquez-Islas, O. Vázquez-Estrada, C. Sánchez-Pérez and A. García-Valenzuela, "Understanding the performance of Abbe-type refractometers with optically absorbing fluids," *Meas. Sci. Technol.*, vol. 25, p. 075201, 2014.
- [181] G. H. Meeten and A. North, "Refractive index measurement of absorbing and turbid fluids by reflection near the critical angle," *Meas. Sci. Technol.*, vol. 6, p. 214–221, 1995.
- [182] G. Morales-Luna, H. Contreras-Tello, A. García-Valenzuela and R. G. Barrera, "Experimental test of reflectivity formulas for turbid colloids: beyond the Fresnel reflection amplitudes," *J. Phys. Chem. B*, vol. 120, p. 583–595, 2016.
- [183] I. Y. Yanina, E. N. Lazareva and V. V. Tuchin, "Refractive index of adipose tissue and lipid droplet measured in wide spectral and temperature ranges," *Appl. Opt.*, vol. 57, no. 17, p. 4839–4848, 2018.
- [184] S. Kedenburg, M. Vieweg, T. Gissibl and H. Giessen, "Linear refractive index and absorption measurements of nonlinear optical liquids in the visible and near-infrared spectral region," *Opt. Mat. Express.*, vol. 2, no. 11, pp. 1588-1611, 2012.
- [185] G. M. Hale and M. R. Querry, "Optical constants of water in the 200-nm to 200- μ m wavelength region," *Appl. Opt.*, vol. 12, no. 3, pp. 555-563, 1973.
- [186] J. Mobley, T. Vo-Dinh and V. V. Tuchin, "Optical properties of tissue," in *Biomedical Photonics Handbook*, T. Vo-Dinh, Ed., Boca Raton, CRC Press, 2015, p. 23–121.
- [187] A. Bhandari, S. Stamnes, B. Hamre, Ø. Frette, K. Stamnes and J. J. Stamnes, "Stokes scattering matrix for human skin," *Appl. Opt.*, vol. 51, no. 31, p. 7487–7498, 2012.
- [188] V. V. Tuchin, S. R. Utz and I. V. Yaroslavsky, "Tissue optics, light distribution," *Opt. Eng.*, vol. 33, no. 10, p. 3178–3188, 1994.
- [189] X. U. Zhang, D. J. Faber, A. L. Post, T. G. van Leeuwen and H. J. C. M. Sterenborg, "Refractive index measurement using single fiber reflectance spectroscopy," *J. Biophotonics*, vol. 12, p. e201900019, 2019.
- [190] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, V. I. Kochubey, M. M. Stolnitz, T. A. Bashkatova and O. V. Novikova, "Optical properties of melanin in the skin and skin-like phantoms," *Proc SPIE Controlling Tissue Optical*

Properties: Applications in Clinical Study, p. 219–226, 2000.

- [191] I. Ahmad, A. Gribble, M. Ikram, M. Pop and A. Vitkin, "Polarimetric assessment of healthy and radiofrequency ablated porcine myocardial tissue," *J. Of Biophotonics*, vol. 9, no. 7, p. 750–759, 2016.
- [192] I. Ahmad, "Review of the emerging role of optical polarimetry in characterization of pathological myocardium," *J. Biomed. Opt.*, vol. 22, no. 10, p. 100901, 2017.
- [193] I. Ahmad, M. Ahmad, K. Khan, S. Ashraf, S. Ahmad and M. Ikram, "Ex vivo characterization of normal and adenocarcinoma colon samples by Mueller matrix polarimetry," *J. Biomed. Opt.*, vol. 20, no. 5, p. 056012, 2015.
- [194] F. P. Bolin, L. E. Preuss, R. C. Taylor and R. J. Ference, "Refractive index of some mammalian tissues using a fiber optic cladding method," *Appl. Opt.*, vol. 28, pp. 2297–2303, 1989.
- [195] P. Sun and Y. Wang, "Measurements of optical parameters of phantom solution and bulk animal tissues in vitro at 650nm," *Opt. Laser. Technol.*, vol. 42, no. 1, p. 1–7, 2010.
- [196] A. Zysk, S. Adie, J. Armstrong, M. Leigh, A. Paduch and D. Sampson, "Needle-based refractive index measurement using low-coherence interferometry," *Opt. Express.*, vol. 32, no. 4, p. 385–387, 2007.
- [197] J. Dirckx, L. Kuypers and W. Decraemer, "Refractive index of tissue measured with confocal microscopy," *J. Biomed. Opt.*, vol. 10, no. 4, p. 1–8, 2005.
- [198] M. Matiatou, P. Giannios, S. Koutsoumpos, K. Toutouzas, G. Zografos и К. Moutzouris, «Data on the refractive index of freshly-excised human tissues in the visible and near-infrared spectral range,» *Results in Physics*, т. 22, p. 103833, 2021.
- [199] R. Bacallao, S. Sohrab and C. Phillips, "Guiding principles of specimen preservation for confocal fluorescence microscopy," in *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*, J. Pawley, Ed., NY, Springer New York, 2006, p. 368–380.
- [200] T. Gonçalves, I. Martins, H. Silva, V. Tuchin and L. Oliveira, "Spectral optical properties of rabbit brain cortex between," *Photochem.*, vol. 1, no. 2, pp. 190–208, 2021.
- [201] L. Lin, H. Li and S. Xie, "Linear method of determining the refractive index of biotissue," *Proc. SPIE*, vol. 3863, p. 177–182, 1999.
- [202] S. Schmidt-Nielsen, "Melting points of human fats as related to their location in the body," *Acta Physiol. Scand.*, vol. 12, no. 2-3, p. 123–129, 1946.
- [203] G. M. Golden, D. B. Guzek, R. R. Harris, J. E. McKie and R. O. Potts, "Lipid thermotropic transitions in human stratum corneum," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 86, p. 255–259, 1986.
- [204] G. M. Golden, D. B. Guzek, A. H. Kennedy, J. E. McKie and R. O. Potts, "Stratum corneum lipid phase transitions and water barrier properties," *Biochemistry*, vol. 26, p. 2382–2388, 1987.
- [205] W. Heller, "Remarks on refractive index mixture rules," *J. Phys. Chem.*, vol. 69, p. 1123–1129, 1965.
- [206] M. I. Gurr, R. T. Jung, M. P. Robinson and W. P. James, "Adipose tissue cellularity in man: the relationship between fat cell size and number, the mass and distribution of body fat and the history of

- weight gain and loss," *Int. J. Obes.*, vol. 6, p. 419–436, 1982.
- [207] O. Zhernovaya, O. Sydoruk, V. Tuchin and A. Douplik, "The refractive index of human hemoglobin in the visible range," *Phys. Med. Biol.*, vol. 56, pp. 4013–4021, 2011.
- [208] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, V. I. Kochubey and V. V. Tuchin, "Optical properties of the subcutaneous adipose tissue in the spectral range 400–2500 nm," *Opt. Spectr.*, vol. 99, p. 836–842, 2005.
- [209] D. J. Faber, M. C. G. Aalders, E. G. Mik, B. A. Hooper, M. J. C. van Gemert and T. G. van Leeuwen, "Oxygen saturation-dependent absorption and scattering of blood," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 93, p. 028102, 2004.
- [210] E. N. Lazareva and V. V. Tuchin, "Measurement of refractive index of hemoglobin in the visible/NIR spectral range," *J. Biomed. Opt.*, vol. 23, no. 3, pp. 1–9, 2018.
- [211] Y. Park, M. Popescu, G. Lykotrafitis, G. Choi, W. Feld, M. S. Suresh and S. Suresh, "Refractive index maps and membrane dynamics of human red blood cells parasitized by plasmodium falciparum," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 105, p. 13730–13735, 2008.
- [212] Y. M. Serebrennikova, D. E. Huffman and L. H. Garcia-Rubio, "Characterization of red blood cells with multiwavelength transmission spectroscopy," *BioMed Res. Int.*, p. 382641, 2015.
- [213] M. T. Rinehart, H. S. Park, K. A. Walzer, J. T. A. Chi and A. Wax, "Hemoglobin consumption by *P. falciparum* in individual erythrocytes imaged via quantitative phase spectroscopy," *Sci. Rep.*, vol. 6, pp. 1–9, 2016.
- [214] M. Jedrzejewska-Szczerska, "Measurement of complex refractive index of human blood by low-coherence interferometry," *Eur. Phys. J. Spec. Top.*, vol. 222, p. 2367–2372, 2013.
- [215] L. Berkow, "Factors affecting hemoglobin measurement," *J. Clin. Monit. Comput.*, vol. 27, p. 499–508, 2013.
- [216] D. K. Sardar and L. B. Levy, "Optical properties of whole blood," *Laser Med. Sci.*, vol. 13, pp. 106–111, 1998.
- [217] M. C. Meinke, M. Friebel and J. Helfmann, "Optical properties of flowing blood cells," *Advanced Optical Flow Cytometry*, p. 95–132, 2011.
- [218] M. Meinke, G. Müller, J. Helfmann and M. Friebel, "Optical properties of platelets and blood plasma and their influence on the optical behavior of whole blood in the visible to near infrared wavelength range," *J. Biomed. Opt.*, vol. 12, no. 1, p. 014024, 2007.
- [219] G. V. Maksimov, O. G. Luneva, N. V. Maksimova, E. Matettuchi, E. A. Medvedev, V. Z. Pashchenko and A. B. Rubin, "Role of viscosity and permeability of the erythrocyte plasma membrane in changes in oxygen-binding properties of hemoglobin during diabetes mellitus," *Bull. Exp. Biol. Med.*, vol. 140, no. 5, p. 510–513, 2005.
- [220] J. Singh, *Optical Properties of Condensed Matter and Applications*, J. Singh, Ed., Chichester : Wiley, 2006, p. 440.

- [221] S. A. Prahl, "Optical absorption of hemoglobin," Scott Prahl, 1999. [Online]. Available: <https://omlc.org/spectra/hemoglobin/>. [Accessed 20 04 2023].
- [222] M. Yahya and M. Z. Saghir, "Empirical modelling to predict the refractive index of human blood," *Phys. Med. Biol.*, vol. 61, p. 1405–1415, 2016.
- [223] J. Wang, Z. Deng, X. Wang, Q. Ye, W. Zhou, J. Mei, C. Zhang and J. Tian, "Measurement of the refractive index of hemoglobin solutions for a continuous spectral region," *J. Biophotonics*, vol. 6, no. 7, p. 2536–2541, 2015.
- [224] S. Shumilina, "Dispersion of real and imaginary part of the complex refractive index of hemoglobin in the range 450 to 820 nm," *Bullet. Beloruss. SSR Acad. Sci. Phys.-Math.*, vol. 1, p. 79–84, 1984.
- [225] M. Andersen and L. Painter, "Dispersion equation and polarizability of bovine serum albumin from measurements of refractive indices," *Biopolymers*, vol. 13, pp. 1261-1267, 1974.
- [226] M. Friebel, "Determination of the complex refractive index of highly concentrated hemoglobin solutions using transmittance and reflectance measurements," *J. Biomed. Opt.*, vol. 10, no. 6, p. 064019, 2006.
- [227] Y. Park, T. Yamauchi, W. Choi, R. Dasari and M. Feld, "Spectroscopic phase microscopy for quantifying hemoglobin concentrations in intact red blood cells," *Opt. Lett.*, vol. 34, no. 23, pp. 3668-3670, 2009.
- [228] J.-H. Jung, J. Jang и Y. Park, «Spectro-refractometry of individual microscopic objects using swept-source quantitative phase imaging,» *Anal. Chem.*, т. 85, № 21, p. 10519–10525, 2013.
- [229] S. Al-Harhi, J. I. Lachowicz, M. E. Nowakowski, M. Jaremko и Ł. Jaremko, «Towards the Functional High-Resolution Coordination Chemistry of Blood Plasma Human Serum Albumin,» *J. Inorg. Biochem.*, т. 198, p. 110716, 2019.
- [230] J. T. Busher, «Serum albumin and globulin,» в *Clinical methods: The history, physical, and laboratory examinations. 3rd edition*, H. K. Walker, W. D. Hall и J. W. Hurst, Ред., Boston, Butterworths, 1990, pp. 497-499.
- [231] E. B. Duly, S. Grimason, P. Grimason, G. Barnes and T. R. Trinick, "Measurement of serum albumin by capillary zone electrophoresis, bromocresol green, bromocresol purple, and immunoassay methods," *Journal of Clinical Pathology*, vol. 56, no. 10, p. 780–781, 2003.
- [232] G. G. Levin, T. V. Bulygin, E. Kalinin and G. N. Vishnyakov, "Application of computerized interference microscope for monitoring oscillations of dry cell weight and morphology of living cells," *Proc. SPIE*, vol. 4260, p. 149, 2001.
- [233] G. V. Maksimov, A. D. Ivanov, A. A. Samoilenko, A. A. Golopolosov and G. G. Levin, "Measurement of dispersion of the refractive index of microscopic volumes of the BSA aqueous solution using an interference microscope," *Optics and spectroscopy*, vol. 129, no. 3, p. 347–351, 2021.
- [234] S. Liu, Z. Deng, J. Li, J. Wang, N. Huang, R. Cui, Q. Zhang, J. Mei, W. Zhou, C. Zhang, Q. Ye and J. and Tian, "Measurement of the refractive index of whole blood and its components for a continuous spectral region," *J. Biomed. Opt.*, vol. 24, no. 3, p. 035003, 2019.
- [235] L. Y. Mattley, G. Leparc, R. Potter and L. Garcia-Rubio, "Light scattering and absorption model for the

- qualitative interpretation of human blood platelets spectral data," *Photochem. Photobiol.*, vol. 715, p. 610–619, 2000.
- [236] J. A. Lamasso, "Error in hematocrit value produced by excessive ethylenediaminetetraacetate," *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 44, pp. 109-110, 1965.
- [237] J. Heijmans, L. Cheng and F. Wieringa, "Optical fiber sensors for medical applications – Practical engineering considerations," *IFMBE Proceedings*, vol. 22, pp. 2330-2334, 2009.
- [238] A. N. Yaroslavsky, I. V. Yaroslavsky, T. Goldbach and H.-J. Schwarzmaier, "Optical properties of blood in the near infrared spectral range," *Proc. SPIE*, vol. 2678, pp. 314-324, 1996.
- [239] D. Rowe, D. Smith and J. S. Wilkinson, "Complex refractive index spectra of whole blood and aqueous solutions of anticoagulants, analgesics and buffers in the mid-infrared," *Scientific Reports*, vol. 7, p. 7356, 2017.
- [240] H. Majeed, S. Sridharan, M. Mir, L. Ma, E. Min, W. Jung and G. Popescu, "Quantitative phase imaging for medical diagnosis," *J. Biophotonics*, vol. 10, no. 2, p. 177–205, 2017.
- [241] L. V. Plotnikova, A. M. Polyanichko, M. O. Kobeleva, A. A. Nikekhin, M. V. Uspenskaya, A. V. Kayava, A. D. Garifullin and S. W. Voloshin, "Analysis of blood serum by the method of refractometry in antitumor therapy in patients with multiple myeloma," *Optics and Spectroscopy*, vol. 124, no. 1, pp. 140-142, 2018.
- [242] A. N. Bashkatov, E. A. Genina and V. V. Tuchin, "Optical properties of skin, subcutaneous, and muscle tissues: a review," *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, vol. 4, no. 1, pp. 9-38, 2011.
- [243] F. E. Robles, L. L. Satterwhite and A. Wax, "Non-linear phase dispersion spectroscopy," *Opt. Lett.*, vol. 36, no. 23, pp. 4665-4667, 2011.
- [244] H. Li, L. Lin and S. Xie, "Refractive index of human whole blood with different types in the visible and nearinfrared ranges," *Proceedings of SPIE*, vol. 3914, pp. 517-521, 2000.
- [245] I. Y. Yanina, N. A. Trunina and V. V. Tuchin, "Photoinduced cell morphology alterations quantified within adipose tissues by spectral optical coherence tomography," *J. Biomed. Opt.*, vol. 18, no. 11, p. 111407, 2013.
- [246] H.-C. Cheng and Y.-C. Liu, "Simultaneous measurement of group refractive index and thickness of optical samples using optical coherence tomography," *Appl. Opt.*, vol. 49, pp. 790-797, 2010.
- [247] F. E. Robles, C. Wilson, G. Grant and A. Wax, "Molecular imaging true-colour spectroscopic optical coherence tomography," *Nature Photonics*, vol. 5, no. 12, pp. 744-747, 2011.
- [248] J. T. Liu, L. Y. Chen, M. C. Shih, Y. Chang and W. Y. Chen, "The investigation of recognition interaction between phenylboronate monolayer and glycosylated hemoglobin using surface plasmon resonance," *Analytical Biochemistry*, vol. 375, no. 1, pp. 90-96, 2008.
- [249] J. Li, K. W. Chang, C. H. Wang, C. H. Yang, S. C. Shieh and G. B. Lee, "On-chip, aptamer-based sandwich assay for detection of glycosylated hemoglobins via magnetic beads," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 79, pp. 887-893, 2016.

- [250] J. Lin, J. Lin, Z. Huang, P. Lu, J. Wang, X. Wang and R. Chen, "Raman spectroscopy of human hemoglobin for diabetes detection," *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, vol. 07, no. 01, p. 1350051, 2014.
- [251] Н. Р. Ровнягина, Т. Н. Тихонова, Д. С. Молоденский и Е. А. Ширшин, «Детектирование конформационных изменений альбумина при его гликировании и термической денатурации методами флуоресцентной спектроскопии и малоуглового рентгеновского рассеяния,» *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика*, т. 17, № 3, сс. 179-190, 2017.
- [252] A. Bashkatov, E. Genina, I. Korovina, V. Kochubey, Y. Sinichkin and T. V.V., "In vivo and in vitro study of control of rat skin optical properties by acting of osmotic liquid," *Proc. of SPIE*, vol. 4224, pp. 0277-786X!00, 2000.
- [253] E. Genina, B. A. K. I. Y. Sinichkin and V. Tuchin, "Control of skin optical properties: in vivo and in vitro study," *Asian Journal of Physics*, vol. 10, no. 4, pp. 493-501, 2001.
- [254] E. Lazareva, P. Dyachenko, A. Bucharskaya, N. Navolokin and V. Tuchin, "Estimation of dehydration of skin by refractometric method using optical clearing agents," *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*, vol. 5, no. 2, pp. 020305-1-7, 2019.
- [255] A. Bucharskaya, N. Dikht, G. Afanas'eva, G. Terentyuk, N. Zakharova, G. Maslyakova, B. Khlebtsov and N. Khlebtsov, *Saratov. Nauch.-Med. Zh.*, vol. 11, p. 107, 2015.
- [256] "International guiding principles for biomedical research involving animals. CIOMS and ICLAS.," 2012. [Online]. Available: <http://www.cioms.ch/index.php/12-newsflash/227-cioms-and-iclas-release-the-new-international-guiding-principles-for-biomedical-research-involving-animals>.
- [257] E. Genina, A. Bashkatov, Y. Sinichkin, I. Yanina and V. Tuchin, "Optical clearing of biological tissues: prospects of application in medical diagnostics and phototherapy [Review]," *J. Biomed. Photon. Eng.*, vol. 1, no. 1, p. 22–58, 2015.
- [258] A. Bashkatov, K. Berezin, K. Dvoretzkiy, M. Chernavina, E. Genina, V. Genin, V. Kochubey, E. Lazareva, A. Pravdin, M. Shvachkina, P. Timoshina, D. Tuchina, D. Yakovlev, D. Yakovlev, I. Yanina and O. Zhernovaya, "Measurement of tissue optical properties in the context of tissue optical clearing," *J. Biomed. Opt.*, vol. 23, no. 9, pp. 091416-091416, 2018.
- [259] R. Shi, M. Chen, V. V. Tuchin and Z. D., "Accessing to arteriovenous blood flow dynamics response using combined laser speckle contrast imaging and skin optical clearing," *Biomed. Opt. Express*, vol. 6, no. 6, pp. 1977-89, 2015.
- [260] D. Zhu, K. Larin, Q. Luo and V. Tuchin, "Recent progress in tissue optical clearing," *Laser Photon.*, vol. 7, no. 5, p. 732–757, 2013.
- [261] D. K. Tuchina, V. D. Genin, A. N. Bashkatov, E. A. Genina and V. V. and Tuchin, "Optical clearing of skin tissue ex vivo with polyethylene glycol," *Optics and Spectroscopy*, vol. 120, no. 1, p. 28–37, 2016.
- [262] D. K. Tuchina, P. A. Timoshina, V. V. Tuchin, A. N. Bashkatov and E. A. Genina, "Kinetics of rat skin optical clearing at topical application of 40% glucose: ex vivo and in vivo studies," *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 25, no. 1, p. 1–8, 2019.

- [263] W. Feng, R. Shi, N. Ma, D. K. Tuchina, V. V. Tuchin and D. Zhu, "Skin optical clearing potential of disaccharides," *J. Biomed. Opt.*, vol. 21, no. 8, p. 081207, 2016.
- [264] L. M. Oliveira, M. I. Carvalho, E. M. Nogueira and V. V. Tuchin, "Skeletal muscle dispersion (400–1000 nm) and kinetics at optical clearing," *J. Biophotonics*, vol. 11, no. 1, p. e201700094, 2018.
- [265] E. A. Genina, A. N. Bashkatov, Y. P. Sinichkin and V. V. Tuchin, "Optical clearing of skin under action of glycerol: ex vivo and in vivo investigations," *Optics and Spectroscopy*, vol. 109, no. 2, p. 225–231, 2010.
- [266] M. H. Khan, B. Choi, S. Chess, K. M. J. Kelly and J. Nelson, "Optical clearing of in vivo human skin: implications for light-based diagnostic imaging and therapeutics," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 34, no. 2, p. 83–85, 2004.
- [267] S. Chung, A. Cerussi, C. Klifa, H. Baek, O. Birgul, G. Gulsen, S. Merritt, H. D. and B. Tromberg, "In vivo water state measurements in breast cancer using broadband diffuse optical spectroscopy," *Physics and Engineering in Medicine*, vol. 53, no. 23, p. 6713–6727, 2008.
- [268] S. Sy, S. Huang, Y. Wang, J. Yu, A. T. Ahuja and Y. T. Zhang, "Terahertz spectroscopy of liver cirrhosis: investigating the origin of contrast," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 55, no. 24, p. 7587–7596, 2010.
- [269] S. Mickan, J. Dordick, J. Munch, D. Abbott and X.-C. Zhang, "Terahertz spectroscopy of bound water in nano suspensions," *Proceeding of SPIE*, vol. 4937, pp. 49-61, 2002.
- [270] A. S. Kolesnikov, E. A. Kolesnikova, A. P. Popov, M. M. Nazarov, A. P. Skurinov and V. V. Tuchin, "In vitro terahertz monitoring of muscle tissue dehydration under the action of hyperosmotic agents," *Quantum Electronics*, vol. 44, no. 7, p. 633–640, 2014.
- [271] D. Leonard and K. Meek, "Refractive indices of the collagen fibrils and extrafibrillar material of the corneal stroma," *Biophys. J.*, vol. 72, no. 3, p. 1382, 1997.
- [272] J. Wiechers, J. Dederen and A. Rawlings, "Moisturization mechanisms: internal occlusion by orthorhombic lipid phase stabilizers a novel mechanism of skin moisturization," in *Skin Moisturization. 2nd Edition. informa healthcare.*, A. Rawlings and J. Leyden, Eds., New York, Taylor & Francis Group, 2009, pp. 309-321.
- [273] Э. Генина, А. Башкатов, Ю. Синичкин и В. Тучин, «Оптическое просветление кожи под действием глицерина: исследования ex vivo и in vivo,» *Оптика и спектроскопия*, т. 109, сс. 1312-1319, 2010.
- [274] G. Vargas, E. Chan, J. Barton, I. H. Rylander and A. Welch, "Use of an agent to reduce scattering in skin," *Laser. Surg. Med.*, vol. 24, p. 133–141, 1999.
- [275] R. Cicchi, F. Pavone, D. Massi and D. D. Sampson, "Contrast and depth enhancement in two-photon microscopy of human skin ex vivo by use of optical clearing agents," *Opt. Express.*, vol. 13, p. 2337–2344, 2005.
- [276] А. Сдобнов, Ю. Ладеманн, М. Дарвин и В. Тучин, «Методы молекулярной оптической визуализации в дерматологии при оптическом просветлении кожи,» *Успехи биологической химии*, т. 59, с. 295–322, 2019.

- [277] S. A. Alexandrov, A. V. Zvyagin, K. K. M. B. D. Silva and D. D. Sampson, "Bifocal optical coherence refractometry of turbid media," *Opt. Lett.*, vol. 28, no. 2, pp. 117-119, 2003.
- [278] D. Chan, B. Schulz, K. Gloystein and H. Muller, "In vivo spectroscopic ellipsometry measurements on human skin," *J. Biomed. Opt.*, vol. 12, no. 1, p. 014023, 2007.
- [279] H. Ding, J. Lu, K. Jacobs and X.-H. Hu, "Determination of refractive indices of porcine skin tissues and Intralipid at eight wavelengths between 325 and 1557 nm," *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 22, no. 6, pp. 1151-1157, 2005.
- [280] A. Zysk, E. Chaney and S. Boppart, "Refractive index of carcinogen-induced rat mammary tumours," *Phys. Med. Biol.*, vol. 51, pp. 2165-2177, 2006.
- [281] H. Mantsch, C. Madec, R. Lewis and R. McElhaney, "Thermotropic phase behavior of model membranes composed of phosphatidylcholines containing dl-methyl anteiso-branched fatty," *Biochemistry*, vol. 26, p. 4045-4049, 1987.
- [282] C. F. Cook, R. W. Bray and K. G. Weckel, "Variations in the chemical and physical properties of three bovine lipid depots," *J. Animal Sci.*, vol. 24, no. 4, pp. 1192-1194, 1965.
- [283] W. Song, L. Zhang, S. Ness and J. Yi, "Wavelength-dependent optical properties of melanosomes in retinal pigmented epithelium and their changes with melanin bleaching: a numerical study," *Biomed. Opt. Express*, vol. 8, no. 9, pp. 3966-3980, 2017.
- [284] B. S. Goldschmidt, S. Mehta, J. Mosley, C. Walter, P. J. D. Whiteside, H. K. Hunt and J. A. Viator, "Photoacoustic measurement of refractive index of dye solutions and myoglobin for biosensing applications," *Biomed. Opt. Express*, vol. 4, pp. 2463-2476, 2013.
- [285] M. Rajadhyaksha, M. Grossman, D. Esterowitz, R. Webb and R. Anderson, "In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 104, no. 6, pp. 946-952, 1995.

Приложение А. Дополнительные таблицы

Таблица А1. Показатель преломления биологических сред

Ткань	λ , нм	n, n_g (СО)*	Замечания (образец, метод)	Ссылка
Кожа человека	980	1.5(0.02)	<i>In vivo</i> , роговой слой тыльной поверхности большого пальца	[277]
	300-780	1.419(0.002)	<i>In vivo</i> , роговой слой, эллипсометрия	[278]
	325	1.492	<i>In vitro</i> , эпидермис, метод измерения кривой когерентного отражения $n(\lambda) = 1.41188 + \frac{9091.11}{\lambda^2} - \frac{7.64945 \times 10^7}{\lambda^4}, \lambda \text{ в нм}$	[10]
	442	1.451		
	532	1.449		
	633	1.435		
	850	1.418		
	1064	1.432		
	1310	1.424		
	1557	1.403		
	325	1.403	<i>In vitro</i> , дерма, метод измерения кривой когерентного отражения $n(\lambda) = 1.36578 + \frac{9463.72}{\lambda^2} - \frac{5.93644 \times 10^8}{\lambda^4}$, λ в нм	[10]
	442	1.399		
	532	1.380		
633	1.395			
850	1.387			
1064	1.380			
1310	1.362			
1557	1.365			
1300	1.41(0.03)	<i>In vitro</i> , дерма, ОКТ	[46]	
1300	1.51(0.02)	<i>In vivo</i> , роговой слой, ОКТ	[46]	
1300	1.34(0.01)	<i>In vivo</i> , эпидермис, ОКТ	[46]	
Кожа свиньи	325	1.413	<i>In vitro</i> , эпидермис (s-поляризация), метод измерения критического угла при полном внутреннем отражении	[279]
	442	1.379		
	532	1.407		
	633	1.389		
	850	1.402		
	1064	1.419		
	1310	1.386		
	1557	1.372		
	325	1.392	<i>In vitro</i> , эпидермис (p-поляризация), метод измерения критического угла при полном внутреннем отражении	[279]
	442	1.355		
	532	1.393		
	633	1.383		
	850	1.401		
	1064	1.420		
	1310	1.384		
	1557	1.364		
	325	1.393	<i>In vitro</i> , дерма (s-поляризация), метод измерения критического угла при полном внутреннем отражении	[279]
	442	1.374		
	532	1.359		
	633	1.355		
	850	1.364		
1064	1.360			
1310	1.360			
1557	1.362			
325	1.393	<i>In vitro</i> , дерма (p-поляризация), метод измерения критического угла при полном внутреннем отражении	[279]	
442	1.378			
532	1.360			
633	1.354			
850	1.364			
1064	1.360			
1310	1.359			
1557	1.361			
Кожа курицы	1310	1.424(0.022)	<i>In vitro</i> , кожа, ОКТ	[196]

Ткань	λ , нм	n, n_g (СО)*	Замечания (образец, метод)	Ссылка	
Жировая ткань свиньи	650	1.382(0.006)	<i>In vitro</i> , измерение критического угла при полном внутреннем отражении	[195]	
	488 632.8 1079.5 1341.4	1.510(0.002) 1.492(0.003) 1.482(0.002) 1.478(0.004)	<i>In vitro</i> , измерение критического угла при полном внутреннем отражении В спектральной области (Уравнение Коши): $n(\lambda) = 1.4753 + \frac{4.3902 \times 10^{-3}}{\lambda^2} + \frac{9.2385 \times 10^{-4}}{\lambda^4},$ [λ] в мкм	[6]	
	432 532.1 632.9 732.2	1.4793 1.4717 1.4678 1.4655	<i>In vitro</i> , измерение критического угла при полном внутреннем отражении В спектральной области (Уравнение Коши): $n(\lambda) = 1.45978 + \frac{2.83095 \times 10^3}{\lambda^2} + \frac{1.53151 \times 10^8}{\lambda^4}$ или (Уравнение Корню): $n(\lambda) = 1.45619 + \frac{4.71521}{\lambda - 228.085}$ или (Уравнение Конради): $n(\lambda) = 1.4564 + \frac{5.54824}{\lambda} + \frac{1.69195 \times 10^7}{\lambda^{3.5}},$ [λ] в нм	[175]	
	632.8	1.4699(0.0003)	<i>In vitro</i> , измерение критического угла при полном внутреннем отражении	[5]	
	632.8	1.464	<i>In vitro</i> , измерение критического угла при полном внутреннем отражении	[201]	
	632.8	1.4663(0.0030) (s-polarized) 1.4676(0.0030) (p-polarized)	<i>In vitro</i> , расширенный дифференциальный метод полного внутреннего отражения	[280]	
	480 589 680 930 1100 1300 1550	1.478(0.0035) 1.4707(0.0036) 1.4667(0.0036) 1.4635(0.0034) 1.4612(0.0034) 1.4564(0.0033) 1.4538(0.0025)	<i>In vitro</i> , вытопленный, рефрактометр Аббе В данном спектральном диапазоне (уравнение Зельмейера): $n^2(\lambda) = 1 + \frac{1.1313 \times \lambda^2}{\lambda^2 - 10348.0147} + \frac{0.0357 \times \lambda^2}{\lambda^2 - 0.6068},$ [λ] в нм	[183]	
	480 589 680 930 1100 1300 1550	1.4825(0.0040) 1.4726(0.0052) 1.4695(0.0052) 1.4662(0.0047) 1.4628(0.0055) 1.4589(0.0053) 1.4576(0.0025)	<i>In vitro</i> , срез, рефрактометр Аббе В данном спектральном диапазоне (уравнение Зельмейера): $n^2(\lambda) = 1 + \frac{1.1236 \times \lambda^2}{\lambda^2 - 10556.6963} + \frac{0.2725 \times \lambda^2}{\lambda^2 - 1.8867},$ [λ] в нм	[183]	
	632.8	1.493 (0.005)	Лазерный рефрактометр	[57]	
	930	1.464 (0.002)	Аббе рефрактометр	[281]	
	Жировая ткань человека	480 589 680 930 1100 1300 1550	1.4746(0.0008) 1.4677(0.0004) 1.4632(0.0010) 1.4581(0.0011) 1.4545(0.0013) 1.4499(0.0003) 1.4454(0.0011)	<i>In vitro</i> , срез, абдоминальный жир человека, рефрактометр Аббе В данном спектральном диапазоне (уравнение Зельмейера): $n^2(\lambda) = 1 + \frac{1.1236 \times \lambda^2}{\lambda^2 - 10556.6963} + \frac{0.2725 \times \lambda^2}{\lambda^2 - 1.8867},$ [λ] в нм	[183]
		1300	n_g : 1.467 (0.008)	<i>In vitro</i> , брыжеечная жировая ткань человека, ОКТ	[46]
		456-1064	1.44	Подкожная жировая ткань, двойная интегрирующая сфера, обратный метод Монте-Карло	[32]
		456-1064	1.46	Абдоминальная жировая ткань, двойная интегрирующая сфера, обратный метод Монте-Карло	[32]

Продолжение Таблицы А1

Ткань	λ , нм	n, n_g (СО)*	Замечания (образец, метод)	Ссылка
Жировая ткань крысы	800	n_g : 1.467 (0.026)	<i>In vitro</i> , ОКТ	[280]
Жировая ткани курицы	1310	n_g : 1.450 (0.004)	<i>In vitro</i> , низкокогерентная интерферометрия	[196]
Жировая ткань бычья	589	1.4536 (внутримышечная жировая ткань) 1.4522 (внутренняя подкожная жировая клетчатка) 1.4523 (наружная подкожная жировая клетчатка)	<i>In vitro</i> , рефрактометр Аббе	[282]
Кровь человека	632.8	1.400	Цельная кровь, лазерный рефрактометр	[194]
	632.8	1.37	60%-ый раствор крови, лазерный рефрактометр	[216]
	370	1.4480	Цельная кровь, ПВО	[244]
	850	1.3680		
	480	1.395	Цельная кровь, ПВО	[6]
	632.8	1.373		
	1079.5	1.363		
1341.4	1.360			
	436.1	1.36481	Расчет показателя преломления крови через показатель преломления гемоглобина 150 г/л, рефрактометр Аббемат	[222]
	513.9	1.36053		
	589.1	1.35724		
	633.2	1.35601		
	657.2	1.35587		
Меланосомы	300	1.605	Меланосомы пигментного эпителия сетчатки	[283]
	400	1.644		
	500	1.650		
	600	1.651		
	700	1.651		
	800	1.651		
	900	1.651		
	1000	1.65		
	1100	1.65		
	1200	1.65		
	1300	1.65		
	1400	1.65		
	1500	1.65		
	1600	1.65		
1700	1.65			
1800	1.65			
1900	1.65			
2000	1.65			
Миоглобин	589	1.335	Миоглобин 460 мг/мл, рефрактометр Атаго R-5000	[284]
Мышечная ткань свиньи	488	1.402(0.002)	<i>In vitro</i> , метод измерения критического угла при полном внутреннем отражении $n(\lambda) = 1.3694 + \frac{7.3223 \times 10^{-5}}{\lambda^2} + \frac{1.8317 \times 10^{-3}}{\lambda^4}$	[6]
	632.8	1.381(0.002)		
	1079.5	1.372(0.003)		
	1341.4	1.370(0.003)		

Продолжение Таблицы А1

Ткань	λ , нм	n, n_g (CO)*	Замечания (образец, метод)	Ссылка
Мышечная ткань свиньи	488	1.399(0.002)	<i>In vitro</i> , метод измерения критического угла при полном внутреннем отражении $n(\lambda) = 1.3657 + \frac{1.5123 \times 10^{-3}}{\lambda^2} + \frac{1.5291 \times 10^{-3}}{\lambda^4}$	[6]
	632.8	1.379(0.002)		
	1079.5	1.370(0.002)		
	1341.4	1.367(0.003)		
Мышечная ткань овцы	488	1.404(0.003)	<i>In vitro</i> , метод измерения критического угла при полном внутреннем отражении $n(\lambda) = 1.3716 + \frac{5.8677 \times 10^{-3}}{\lambda^2} + \frac{4.3999 \times 10^{-4}}{\lambda^4}$	[6]
	632.8	1.389(0.002)		
	1079.5	1.378(0.004)		
	1341.4	1.375(0.003)	<i>In vitro</i> , метод измерения критического угла при полном внутреннем отражении $n(\lambda) = 1.3682 + \frac{8.7456 \times 10^{-3}}{\lambda^2} - \frac{1.6532 \times 10^{-4}}{\lambda^4}$	[6]
	488	1.402(0.002)		
	632.8	1.389(0.002)		
Мышечная ткань курицы	632.8	1.375(0.003)	<i>In vitro</i> , низкокогерентная интерферометрия	[196]
	1079.5	1.373(0.003)		
	1341.4	1.399(0.013)		
	1310	1.410(0.014)		
Печень курицы	1310	1.399(0.013)	<i>In vitro</i> , метод измерения критического угла при полном внутреннем отражении $n(\lambda) = 1.3535 + \frac{13.56}{\lambda - 37.24}$	[173, 172]
	401.4	1.3906±0.0009		
	532.5	1.3807±0.0023		
	668.1	1.3750±0.0007		
	782.1	1.3720±0.0015		
	820.8	1.3721±0.0012		
850.7	1.3720±0.0006			
Эумеланин	350	1.791(0.001)	Природный эумеланин, выделенный и очищенный из чернил каракатицы <i>Sepia officinalis</i> (Sigma, M-2649) $n(\lambda) = 1.68395 - \frac{1.87232 \cdot 10^4}{\lambda^2} + \frac{1.09644 \cdot 10^{10}}{\lambda^4} - \frac{8.64842 \cdot 10^{14}}{\lambda^6}$	[190]
	400	1.784(0.004)		
	450	1.753(0.003)		
	500	1.733(0.007)		
	550	1.710(0.002)		
	600	1.697(0.001)		
	650	1.686(0.006)		
	700	1.682(0.004)		
	750	1.682(0.003)		
	800	1.680(0.003)		
	600	1.7	Природный эумеланин, выделенный и очищенный из чернил каракатицы <i>Sepia officinalis</i>	[285]

* n — фазовый показатель преломления, n_g — групповой показатель преломления. CO — стандартное отклонение.

Таблица А2. Показатель преломления растворов альбумина и плазмы

λ , нм	n (CO)*	Замечания (образец, метод)	Ссылка
488 632.8 1079.5 1341.4	1.350 (0.002) 1.345 (0.002) 1.332 (0.003) 1.327 (0.004)	Измерение критического угла при полном внутреннем отражении $n(\lambda) = 1.3194 + \frac{1.4578 \times 10^{-2}}{\lambda^2} - \frac{1.7383 \times 10^{-3}}{\lambda^4}$	[6]
480 486 546 589 644 656 680 930 1100 1300 1550	1.3480 (0.0002) 1.3478 (0.0002) 1.3449 (0.0002) 1.3434 (0.0002) 1.3416 (0.0002) 1.3414 (0.0002) 1.3405 (0.0002) 1.3380 (0.0004) 1.3361 (0.0003) 1.3325 (0.0004) 1.3285 (0.0004)	Раствор альбумина (55 г/л), приготовленный из сухого сывороточного альбумина человека (Sigma Aldrich, США), многоволновой рефрактометр Аббе DR-M2/1550 (Атаго, Япония)	[75, 258]
480 486 546 589 644 656 680 800	1.3444 (0.0004) 1.3436 (0.0003) 1.3406 (0.0002) 1.3392 (0.0003) 1.3375 (0.0001) 1.3373 (0.0002) 1.3365 (0.0001) 1.3343 (0.0003)	Раствор бычьего сывороточного альбумина (40 г/л), многоволновой рефрактометр Аббе DR-M2/1550 (Атаго, Япония)	[76]
600	1.347	Плазма	[235]
532 633 850	1.3623 (0.050%) 1.3614 (0.007%) 1.3576 (0.073%)	Раствор бычьего сывороточного альбумина 5%, интерференционный микроскоп	[233]
400 500 600 700	1.3577 1.3506 1,3473 1,3438	Плазма крови человека, рефрактометр Аббе	[218]

*CO — стандартное отклонение.

Таблица А3. Показатель преломления растворов гемоглобина

λ , нм	Концентрация, г/л	n (СО)*	Замечания (образец, метод)	Ссылка		
250	46	1.398	Гемоглобин человека из свежей суспензии эритроцитов; Видимый-БИК-спектрометр	[52, 226]		
	104	1.406				
	165	1.435				
	287	1.470				
300	46	1.373				
	104	1.389				
	165	1.405				
	287	1.441				
400	46	1.354				
	104	1.367				
	165	1.383				
	287	1.409				
400	20	1.35223	Бычий гемоглобин (сухой); Нб; рН 7,4; Комнатная температура; Непрерывная дисперсия показателя преломления (НДПП)	[223]		
	40	1.35495				
	60	1.35806				
	80	1.36078				
	120	1.36369				
	140	1.36600				
	280	1.37010				
	320	1.38621				
400	20	1.35107	Бычий гемоглобин (сухой); НбО ₂ ; рН 7,4; Комнатная температура; НДПП			
	40	1.35417				
	60	1.35767				
	80	1.36039				
	120	1.36369				
	140	1.36602				
	280	1.36951				
	320	1.38660				
400	320	1.3822	Бычий гемоглобин (лиофилизированный порошок); 0,5% НбО ₂ ; T=(+20)°C; Оптоволоконный спектрометр	[175]		
400	320	1.3775	Бычий гемоглобин (лиофилизированный порошок); 0,5% Нб; T=(+20)°C; Оптоволоконный спектрометр			
401 435.8	140	1.365	Гемоглобин человека (лиофилизированный порошок); Нб; T=(+20)°C; рН 7,4; ПВО (полное внутреннее отражение)	[59, 207]		
435.8		1.367				
401 435.8	140	1.369	Гемоглобин человека (лиофилизированный порошок); НбО ₂ ; T=(+20)°C; рН 7,4; ПВО			
435.8		1.366				
436	150	1.36481	Гемоглобин человека (сухой); T=20°C; рН 7.4; Аббемат рефрактометр	[222]		
438	140	1.374	Бычий гемоглобин (сухой); Нб; НбО ₂ ; рН 7.4; Комнатная температура; НДПП	[223]		
440	50	1.3562	Гемоглобин человека (лиофилизированный порошок); Фазово-контрастная микроскопия	[227]		
	150	1.3780				
	300	1.4187				
450	320	1.3888	Бычий гемоглобин (лиофилизированный порошок); 0,5% НбО ₂ ; T=(+20)°C; Оптоволоконный спектрометр	[175]		
450	320	1.3933	Бычий гемоглобин (лиофилизированный порошок); 0,5% Нб; T=(+20)°C; Оптоволоконный спектрометр			
480	65	1.3476(0.0003)	Гемоглобин из цельной крови человека; НбО ₂ ; T=(+23)°C; Многоволновой рефрактометр Аббе	[210]		
	87	1.3571(0.0003)				
	173	1.3728(0.0003)				
	260	1.3879(0.0002)				
486	65	1.3478(0.0002)	Гемоглобин из цельной крови человека; НбО ₂ ; T=(+23)°C; Многоволновой рефрактометр Аббе	[210]		
	87	1.3563(0.0002)				
	173	1.3721(0.0002)				
	260	1.3871(0.0004)				

λ , нм	Концентрация, г/л	n (СО)	Замечания (образец, метод)	Ссылка
486.1	140	1.361	Гемоглобин человека (лиофилизированный порошок); Hb; T=20°C; pH 7,4; ПВО	[59, 207]
486.1	140	1.361	Гемоглобин человека (лиофилизированный порошок); HbO ₂ ; T=20°C; pH 7,4; ПВО	
500	287	1.413	Гемоглобин человека из свежей суспензии эритроцитов; Видимый-БИК-спектрометр	[52, 226]
	165	1.383		
	104	1.363		
	46	1.348		
500	20	1.34583	Бычий гемоглобин (сухой); Hb; pH 7,4; Комнатная температура; НДПП	[223]
	40	1.34913		
	60	1.35223		
	80	1.35592		
	120	1.35922		
	140	1.36175		
	280	1.36544		
320	1.38408			
500	20	1.34505	Бычий гемоглобин (сухой); HbO ₂ ; pH 7,4; Комнатная температура; НДПП	[223]
	40	1.34854		
	60	1.35262		
	80	1.35573		
	120	1.35845		
	140	1.36214		
	280	1.36544		
320	1.38505			
513.9	150	1.36053	Гемоглобин человека (сухой); T=(+20)°C; pH 7.4; Аббемат рефрактометр	[222]
532	1.7	1.3400	Гемоглобин человека (свежая кровь человека); T=(+25)°C; ПВО	[80]
	2.5	1.3431		
	4	1.3485		
	7	1.3604		
	12.97	1.3871		
546	65	1.3448(0.0002)	Гемоглобин из цельной крови человека; HbO ₂ ; T=(+23)°C; Многоволновой рефрактометр Аббе	[210]
	87	1.3533(0.0002)		
	173	1.3681(0.0007)		
	260	1.3836(0.0002)		
546	50	1.3472	Гемоглобин человека (лиофилизированный порошок); Фазово-контрастная микроскопия	[227]
	150	1.3700		
	300	1.4051		
546.1	140	1.357	Гемоглобин человека (лиофилизированный порошок); Hb; T=(+20)°C; pH 7,4; ПВО	[59, 207]
546.1	140	1.357	Гемоглобин человека (лиофилизированный порошок); HbO ₂ ; T=(+20)°C; pH 7,4; ПВО	
550	320	1.3724	Бычий гемоглобин (лиофилизированный порошок); 0,5% HbO ₂ ; T=(+20)°C; Оптоволоконный спектрометр	[175]
550	320	1.3738	Бычий гемоглобин (лиофилизированный порошок); 0,5% Hb; T=(+20)°C; Оптоволоконный спектрометр	
560	50	1.3466	Гемоглобин человека (лиофилизированный порошок); Фазово-контрастная микроскопия	[227]
	150	1.3687		
	300	1.4033		
580	50	1.3451	Гемоглобин человека (лиофилизированный порошок); Фазово-контрастная микроскопия	[227]
	150	1.3668		
	300	1.4025		
587.6	140	1.356	Гемоглобин человека (лиофилизированный порошок); Hb; T=(+20)°C; pH 7,4; ПВО	[59, 207]
587.6	140	1.357	Гемоглобин человека (лиофилизированный порошок); HbO ₂ ; T=(+20)°C; pH 7,4; ПВО	

λ , нм	Концентрация, г/л	n (СО)	Замечания (образец, метод)	Ссылка
589	65 87 173 260	1.3438(0.0002) 1.3519(0.0003) 1.3667(0.0004) 1.3821(0.0004)	Гемоглобин из цельной крови человека; HbO ₂ ; T=(+23)°C; Многоволновой рефрактометр Аббе	[210]
589	46 104 165 287	1.343 1.357 1.375 1.406	Гемоглобин человека из свежей суспензии эритроцитов; Видимый-БИК-спектрометр	[52, 226]
589.2	150	1.35724	Гемоглобин человека (сухой); T=(+20)°C; pH 7.4; Аббемат рефрактометр	[222]
589.3	140	1.356	Гемоглобин человека (лиофилизированный порошок); Hb; T=(+20)°C; pH 7,4; ПВО	[59, 207]
589.3	140	1.357	Гемоглобин человека (лиофилизированный порошок); HbO ₂ ; T=(+20)°C; pH 7,4; ПВО	
600	50 150 300	1.3443 1.3666 1.4014	Гемоглобин человека (лиофилизированный порошок); Фазово-контрастная микроскопия	[227]
600	20 40 60 80 120 140 280 320	1.34233 1.34485 1.34874 1.34835 1.3520 1.35495 1.36155 1.38233	Бычий гемоглобин (сухой); Hb; pH 7,4; Комнатная температура; НДПП	[223]
600	20 40 60 80 120 140 280 320	1.34136 1.34447 1.34874 1.35068 1.35456 1.35767 1.36155 1.38058	Бычий гемоглобин (сухой); HbO ₂ ; pH 7,4; Комнатная температура; НДПП	
600	320	1.3684	Бычий гемоглобин (лиофилизированный порошок); 0,5% HbO ₂ ; T=(+20)°C; Опволоконный спектрометр	[175]
600	320	1.3702	Бычий гемоглобин (лиофилизированный порошок); 0,5% Hb; T=(+20)°C; Опволоконный спектрометр	
632	1.7 2.5 4 7 12.97	1.3626 1.3360 1.3425 1.3538 1.3800	Гемоглобин человека (свежая кровь человека); T=(+25)°C; ПВО	[80]
632.8 656.3	140	1.354 1.354	Гемоглобин человека (лиофилизированный порошок); Hb; T=(+20)°C; pH 7,4; ПВО	[59, 207]
632.8 656.3	140	1.355 1.354	Гемоглобин человека (лиофилизированный порошок); HbO ₂ ; T=(+20)°C; pH 7,4; ПВО	
633.2 657.2	150	1.35601 1.35587	Гемоглобин человека (сухой); T=(+20)°C; pH 7.4; Аббемат рефрактометр	[222]
633	104 165	1.3600 1.3750	Гемоглобин человека (сухой); T=(+20)°C; pH 7.4; Аббемат рефрактометр	[226]
644	65 87 173 260	1.3419(0.0002) 1.3497(0.0002) 1.3640(0.0003) 1.3801(0.0003)	Гемоглобин из цельной крови человека; HbO ₂ ; T=(+23)°C; Многоволновой рефрактометр Аббе	[210]

λ , нм	Концентрация, г/л	n (СО)	Замечания (образец, метод)	Ссылка
650	320	1.3652	Бычий гемоглобин (лиофилизированный порошок); 0,5% HbO ₂ ; T=(+20)°C; Оптоволоконный спектрометр	[175]
650	320	1.3668	Бычий гемоглобин (лиофилизированный порошок); 0,5% Hb; T=(+20)°C; Оптоволоконный спектрометр	
655	50	1.3408	Гемоглобин человека (лиофилизированный порошок); Фазово-контрастная микроскопия	[227]
	150	1.3642		
	300	1.3969		
656	65	1.3414(0.0002)	Гемоглобин из цельной крови человека; HbO ₂ ; T=(+23)°C; Многоволновой рефрактометр Аббе	[210]
	87	1.3493(0.0002)		
	173	1.3647(0.0003)		
	260	1.3792(0.0009)		
680	65	1.3403(0.0003)	Гемоглобин из цельной крови человека; HbO ₂ ; T=(+23)°C; Многоволновой рефрактометр Аббе	[210]
	87	1.3482(0.0003)		
	173	1.3633(0.0003)		
	260	1.3771(0.0002)		
700	50	1.3405	Гемоглобин человека (лиофилизированный порошок); Фазово-контрастная микроскопия	[227]
	150	1.3634		
	300	1.3971		
700	20	1.33961	Бычий гемоглобин (сухой); Hb; pH 7,4; Комнатная температура; НДПП	[223]
	40	1.34252		
	60	1.34602		
	80	1.34874		
	120	1.35184		
	140	1.35456		
	280	1.35806		
320	1.37709			
700	20	1.33883	Бычий гемоглобин (сухой); HbO ₂ ; pH 7,4; Комнатная температура; НДПП	[223]
	40	1.34175		
	60	1.34583		
	80	1.34835		
	120	1.35107		
	140	1.35476		
	280	1.35748		
320	1.3767			
700	320	1.3612	Бычий гемоглобин (лиофилизированный порошок); 0,5% HbO ₂ ; T=(+20)°C; Оптоволоконный спектрометр	[175]
700	320	1.3637	Бычий гемоглобин (лиофилизированный порошок); 0,5% Hb; T=(+20)°C; Оптоволоконный спектрометр	
700	46	1.341	Гемоглобин человека из свежей суспензии эритроцитов; Видимый-БИК-спектрометр	[52, 226]
	104	1.356		
	165	1.374		
	287	1.404		
706.5	140	1.352	Гемоглобин человека (лиофилизированный порошок); Hb; T=(+20)°C; pH 7,4; ПВО	[59, 207]
706.5	140	1.352	Гемоглобин человека (лиофилизированный порошок); HbO ₂ ; T=(+20)°C; pH 7,4; ПВО	
750	320	1.3589	Бычий гемоглобин (лиофилизированный порошок); 0,5% HbO ₂ ; T=(+20)°C; Оптоволоконный спектрометр	[175]
750	320	1.3599	Бычий гемоглобин (лиофилизированный порошок); 0,5% Hb; T=(+20)°C; Оптоволоконный спектрометр	
800	46	1.338	Гемоглобин человека из свежей суспензии эритроцитов; Видимый-БИК-спектрометр	[52, 226]
	104	1.353		
	165	1.370		
	287	1.400		
900	46	1.338	Гемоглобин человека из свежей суспензии эритроцитов; Видимый-БИК-спектрометр	[52, 226]
	104	1.352		
	165	1.369		
	287	1.401		

λ , нм	Концентрация, г/л	n (СО)	Замечания (образец, метод)	Ссылка
930	65 87 173 260	1.3360(0.0002) 1.3440(0.0002) 1.3572(0.0003) 1.3735(0.0007)	Гемоглобин из цельной крови человека; HbO ₂ ; T=(+23)°C; Многоволновой рефрактометр Аббе	[210]
1000	46 104 165 287	1.338 1.353 1.370 1.401	Гемоглобин человека из свежей суспензии эритроцитов; Видимый-БИК-спектрометр	[52, 226]
1100	46 104 165 287	1.337 1.352 1.369 1.400	Гемоглобин человека из свежей суспензии эритроцитов; Видимый-БИК-спектрометр	[52, 226]
1100	65 87 173 260	1.3329(0.0002) 1.3411(0.0002) 1.3542(0.0002) 1.3690(0.0006)	Гемоглобин из цельной крови человека; HbO ₂ ; T=(+23)°C; Многоволновой рефрактометр Аббе	[210]
1300	65 87 173 260	1.3280(0.0005) 1.3364(0.0002) 1.3503(0.0002) 1.3642(0.0004)	Гемоглобин из цельной крови человека; HbO ₂ ; T=(+23)°C; Многоволновой рефрактометр Аббе	[210]
1550	65 87 173 260	1.3244(0.0004) 1.3314(0.0003) 1.3458(0.0002) 1.3598(0.0004)	Гемоглобин из цельной крови человека; HbO ₂ ; T=(+23)°C; Многоволновой рефрактометр Аббе	[210]

*СО — стандартное отклонение.