

*Моим внукам
Даше, Жене, Степе и Серафиму*

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список обозначений	10
Сокращения	25
Предисловие к первому изданию	31
Предисловие ко второму изданию	35
Предисловие к переводу	37

Часть I. Введение в оптику биологических тканей

Глава 1. Оптические свойства биологических тканей с многократным рассеянием	40
1.1. Распространение непрерывного светового излучения в биологических тканях.	40
1.1.1. Рассеяние и поглощение (40). 1.1.2. Теоретическое описание (48). 1.1.3. Моделирование методом Монте-Карло (56).	
1.2. Распространение коротких импульсов в биологических тканях	63
1.2.1. Принципы распространения и теоретическое обоснование (63). 1.2.2. Импульсная спектроскопия и визуализация биологических тканей с разрешением во времени (66). 1.2.3. Когерентное рассеяние назад (67).	
1.3. Диффузионные волны фотонной плотности	69
1.3.1. Принципы формирования и теоретические основы (69). 1.3.2. Модуляционная спектроскопия и визуализация биологических тканей (72).	
1.4. Распространение пространственно-модулированного излучения в биотканях	76
1.4.1. Введение (76). 1.4.2. Теория и измерение спектра пространственных частот (77). 1.4.3. Пространственно-модуляционная спектроскопия и визуализация биотканей (86).	
1.5. Заключение	92
Глава 2. Распространение поляризованного света в биологических тканях	93
2.1. Введение	93
2.2. Структура и анизотропия биотканей	93
2.3. Рассеяние света частицей	97
2.4. Описание и регистрация поляризованного света	99
2.5. Взаимодействие света со случайной однократно рассеивающей средой	101
2.6. Векторное уравнение переноса излучения	105
2.7. Моделирование методом Монте-Карло.	108
2.8. Сильно рассеивающие биоткани и фантомы	116

Глава 3. Дискретные модели биологических тканей	124
3.1. Введение	124
3.2. Вариации показателя преломления	124
3.3. Распределение частиц по размерам	126
3.4. Пространственная упорядоченность частиц	128
3.5. Рассеяние системами плотно упакованных частиц	129
3.6. Оптические свойства тканей глаза	135
3.6.1. Оптические модели (135). 3.6.2. Спектральные характеристики (151).	
3.6.3. Поляризационные свойства (163).	
Глава 4. Оптотермическое, оптоакустическое и акустооптическое взаимодействие света с биотканями	169
4.1. Основные принципы и классификация	169
4.2. Метод ОА (ФА) газовой ячейки	173
4.3. Модуляционный (фазовый) ОА- (ФА-) метод	173
4.4. ОА- (ФА-) метод с временным разрешением	175
4.5. Основы ОА/ФА-томографии и микроскопии	177
4.6. Оптотермическая радиометрия	186
4.7. Оптотермическая спектроскопия и визуализация	192
4.8. Акустооптические взаимодействия	207
4.9. Тепловые эффекты	213
4.10. Сонолюминесценция	215
4.11. Перспективные приложения и методы измерений	217
4.11.1. Визуализация сосудов (217). 4.11.2. Мониторинг глюкозы в тканях (217).	
4.11.3. Определения содержания гемоглобина и степени оксигенации (219).	
4.11.4. Измерение температуры (220). 4.11.5. Мониторинг лазерной абляции	
ткани (226). 4.11.6. Цитометрия и визуализация <i>in vivo</i> сторожевых лимфо-	
узлов (226). 4.11.7. ОА/ФА-датчики (229).	
4.12. Заключение	233
Глава 5. Флуоресценция и неупругое рассеяние света	237
5.1. Флуоресценция	237
5.2. Многофотонная флуоресценция	248
5.3. Колебательная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния	256
Глава 6. Фантомы биологических тканей	262
6.1. Введение	262
6.2. Концепция построения фантомов	263
6.3. Примеры фантомов биологических тканей	266
6.4. Примеры моделей органов	273
Глава 7. Методы и алгоритмы для измерения оптических параметров биологических тканей	274
7.1. Основные принципы	274
7.2. Метод интегрирующих сфер	327

7.3. Многопоточные модели	328
7.4. Обратный метод добавления–удвоения	331
7.5. Обратный метод Монте-Карло	333
7.6. Методы с пространственным разрешением	336
7.7. Оптическая когерентная томография	341
7.8. Прямые измерения фазовой функции рассеяния	343
7.9. Определение оптических параметров биотканей	344
7.10. Определение оптических параметров крови	347
7.11. Измерение глубины проникновения света в биоткань и дозиметрия излучения	356
7.12. Измерения показателя преломления	359
Глава 8. Эффекты когерентности света при взаимодействии лазерного излучения с биотканями и потоками клеток	391
8.1. Формирование спекл-структур	391
8.2. Интерференция спекл-полей	397
8.3. Распространение пространственно-модулированных лазерных пучков в рассеивающей среде	399
8.4. Динамическое рассеяние света	402
8.4.1. Квазиупругое рассеяние света (402). 8.4.2. Динамические спеклы (403). 8.4.3. Спеклоскопия полного поля (404). 8.4.4. Диффузионно-волновая спектроскопия (410).	
8.5. Конфокальная микроскопия	414
8.6. Оптическая когерентная томография	418
8.7. Генерация второй гармоники и нелинейное комбинационное рассеяние	425
Глава 9. Управление оптическими свойствами биологических тканей	429
9.1. Основы управления оптическими свойствами тканей и краткий обзор	429
9.2. Оптическая иммерсия с помощью экзогенных химических агентов	435
9.2.1. Принципы оптической иммерсии (435). 9.2.2. Транспорт воды (440). 9.2.3. Набухание и гидратация ткани (441).	
9.3. Оптическое просветление фиброзных тканей	442
9.3.1. Спектральные свойства склеры при иммерсии (442). 9.3.2. Модуляционная спектроскопия склеры <i>in vitro</i> (457). 9.3.3. Исследования склеры <i>in vivo</i> (459). 9.3.4. Иммерсия твердой мозговой оболочки и скорость диффузии агентов (462).	
9.4. Оптическое просветление кожи	464
9.4.1. Введение (464). 9.4.2. Спектральные измерения <i>in vitro</i> (465). 9.4.3. Спектральные измерения отражательной способности <i>in vivo</i> (470). 9.4.4. Модуляционные измерения <i>in vivo</i> (475). 9.4.5. ОКТ-визуализация (476). 9.4.6. Доставка просветляющих агентов, проницаемость кожи и функция резервуара (480).	
9.5. Оптическое просветление тканей пищеварительного тракта	487
9.5.1. Спектральные измерения (487). 9.5.2. ОКТ-визуализация (488).	
9.6. Другие перспективные оптические методы	489
9.6.1. Поляризационные измерения (489). 9.6.2. Конфокальная микроскопия (494). 9.6.3. Регистрация флуоресценции (494). 9.6.4. Двухфотонная сканирующая флуоресцентная микроскопия (497). 9.6.5. Генерация второй гармоники (499). 9.6.6. Колебательная, КР- и КАСКР-спектроскопия (500). 9.6.7. Терагерцовая спектроскопия (502).	

9.7. Визуализация клеток и клеточных потоков.	503
9.7.1. Визуализация кровотока (503). 9.7.2. Оптическое просветление крови (506). 9.7.3. Исследование клеток (522).	
9.8. Некоторые применения метода иммерсии биотканей.	526
9.8.1. Измерение содержания глюкозы в биоткани (526). 9.8.2. Прецизионная лазерная хирургия (534).	
9.9. Другие методы управления оптическими свойствами биотканей.	536
9.9.1. Компрессия и растяжение биоткани (536). 9.9.2. Температурные эффекты и коагуляция ткани (541). 9.9.3. Отбеливание ткани (544).	
9.10. Заключение	545

Часть II. Методы рассеяния света и медицинская диагностика

Глава 10. Спектроскопия и визуализация биотканей в стационарном режиме	548
10.1. Методы и устройства для <i>in vivo</i> спектроскопии и визуализации биотканей	548
10.2. Пример системы для спектроскопии биотканей	552
10.3. Пример системы визуализации	554
10.4. Спектроскопия рассеяния света	554
Глава 11. Спектроскопия и томография с разрешением во времени и пространстве	560
11.1. Методы и устройства для импульсных измерений	560
11.2. Модуляционные методы и устройства	566
11.3. Метод фазированной решетки для интенсивности	573
11.4. Измерения <i>in vivo</i> и примеры клинических исследований	578
11.5. Метод пространственной модуляции	585
Глава 12. Поляризационно-чувствительные методы	591
12.1. Поляризационная визуализация	591
12.1.1. Метод просвечивания (591). 12.1.2. Поляризационная визуализация с использованием рассеяния назад (592).	
12.2. Поляризационная отражательная спектроскопия биотканей.	599
12.2.1. Поляризационная спектроскопия с разрешением по глубине (599). 12.2.2. Поляризационная спектроскопия поверхностного слоя эпителия (602).	
12.3. Поляризационная микроскопия.	603
12.4. Цифровые измерения фотоупругости.	610
12.5. Измерения поляризации флуоресценции	611
12.6. Заключение	616
Глава 13. Когерентные методы и устройства для биомедицинской диагностики и визуализации	617
13.1. Фотонно-корреляционная спектроскопия прозрачных биотканей и потоков клеток	617
13.1.1. Введение (617). 13.1.2. Диагностика катаракты (617). 13.1.3. Мониторинг потоков крови и лимфы в микрососудах (622).	
13.2. Диффузионно-волновая спектроскопия и интерферометрия: измерения микроциркуляции крови.	626

13.3. Визуализация кровотока	632
13.4. Интерферометрические и спекл-интерферометрические методы измерения биовибраций.	641
13.5. Оптическая спекл-топография и томография биотканей	647
13.6. Методы когерентной микроскопии	656
13.7. Интерференционная ретинометрия и исследование седиментации крови	661
Глава 14. Оптическая когерентная томография и гетеродинная визуализация . .	665
14.1. ОКТ	665
14.1.1. Введение (665). 14.1.2. Амплитудная (временная) ОКТ (665). 14.1.3. Двухволновая волоконная ОКТ (666). 14.1.4. Волоконная ОКТ сверхвысокого разрешения (667). 14.1.5. Спектральная ОКТ (668). 14.1.6. Доплеровская ОКТ (669). 14.1.7. Поляризационно-чувствительная ОКТ (672). 14.1.8. Дифференциальная фазочувствительная ОКТ (673). 14.1.9. ОКТ полного поля (673). 14.1.10. Оптическая когерентная микроскопия (676). 14.1.11. Эндоскопическая ОКТ (678). 14.1.12. Спекл-ОКТ (679).	
14.2. Оптическая гетеродинная визуализация.	682
14.3. Резюме	687
Заключение	689
Список литературы	691
Предметный указатель	796

СПИСОК ОБОЗНАЧЕНИЙ

- $2l$ — расстояние между двумя точечными источниками света, формируемыми в узловой плоскости
- $2R_a$ — диаметр круглого отверстия
- $A = \lg(1/R_d)$ — эффективная экстинкция
- \bar{a} — численный коэффициент, зависящий от вида уравнения диффузии
- a — радиус рассеивающей частицы, нм или мкм
- A — амплитуда сигнала в модуляционном методе
- A — акустическая амплитуда
- $A = \langle i \rangle^2$ — квадрат среднего значения фототока (линия отсчета автокорреляционной функции)
- a' — наибольший размер несферической частицы, нм или мкм
- A_0 — начальная амплитуда из-за инструментального отклика
- A_{ac} — переменная составляющая амплитуды волны фотонной плотности
- A_{dc} — постоянная составляющая амплитуды волны фотонной плотности
- a_m — наиболее вероятный радиус рассеивателя, мкм
- a_n и b_n — коэффициенты Ми
- $A(\mathbf{r})$ — описывает оптическое поглощение биоткани в точке \mathbf{r}
- a_T — температуропроводность среды, $\text{м}^2/\text{с}$
- B_d — ширина полосы приемника
- b_s — учитывает дополнительное облучение наружных слоев биоткани из-за рассеяния назад (эффект рециркуляции фотонов)
- c — скорость света в среде, $\text{см}/\text{с}$
- c_0 — скорость света в вакууме, $\text{см}/\text{с}$
- C_1 и C_2 — концентрации молекул в двух полупространствах, разделенных мембраной
- $C_a(x, t)$ — концентрация агента
- C_{a0} — начальная концентрация агента
- c_{ab} — концентрация поглотителя в мкМ, mM или M
- c_b — удельная теплоемкость крови, Дж/(кг · К)
- C_{Hb} — концентрация гемоглобина
- $C_i(x, t)$ — концентрация жидкости
- c_P — удельная теплоемкость при постоянном давлении, Дж/(кг · К)
- c_s — относительная концентрация рассеивающих центров
- \bar{C}_S — средняя концентрация растворенного вещества в двух взаимодействующих растворах
- c_V — удельная теплоемкость при постоянном объеме, Дж/(кг · К)

- C_n^α — полиномы Гегенбауэра
 $\langle C \rangle$ — средняя концентрация крови
 $\langle C \rangle V_{\text{rms}}$ — поток крови или перфузия
 $D = z\lambda/(\pi L_\phi^2)$ — волновой параметр
 D — коэффициент диффузии фотонов, $\text{см}^2/\text{с}$
 D_A — двойное ослабление (линейный дихроизм)
 D_a — коэффициент диффузии агента, $\text{см}^2/\text{с}$
 D_B — коэффициент броуновской диффузии, $\text{см}^2/\text{с}$
 D_f — коэффициент диффузии жидкости, $\text{см}^2/\text{с}$
 d — толщина образца (слоя биоткани), см
 \mathbf{D}^{-1} — обратная матрица измерения
 D_\perp — поперечный размер распространяющегося в коже светового пучка в сечении, для которого полная плотность потока энергии максимальна (на уровне $1/e^2$), см
 D_\parallel — продольный размер области распространяющегося в коже светового пучка, в пределах которой полная плотность потока энергии максимальна (на уровне $1/e^2$), см
 $d\Omega'$ — элемент телесного угла в выбранном направлении, ср
 d_{av} — средний размер спекла в дальней зоне
 D_f — фрактальная (объемная) размерность
 D_I — структурная функция флуктуаций интенсивности
 d_p — длина области перекрывания возбуждающего и пробного лазерных пучков, см
 d_s — среднее расстояние между центрами тяжести частиц
 D_T — коэффициент трансляционной диффузии
 D_{Tf} — коэффициент трансляционной диффузии для быстропротекающего процесса
 D_{Ts} — коэффициент трансляционной диффузии для медленно протекающего процесса
 D_V — диаметр микрососуда
 $d\bar{n}/d\lambda$ — матриальная дисперсия, $1/\text{нм}$
 dn/dT — температурный градиент показателя преломления среды (биоткани), $1/^\circ\text{C}$
 DPF — дифференциальный фактор длины пути, учитывающий увеличение длины пути фотона при миграции из-за рассеяния
 dS — термоупругая деформация, см
 E — энергия падающего импульса, Дж
 e — заряд электрона
 E_0 — энергия падающего импульса на поверхности образца, $\text{Дж}/\text{см}^2$
 E_{0j} — амплитуда рассеяния изолированной частицы, $\text{В}/\text{м}$
 $\mathbf{E}_{\perp i}$ — компонента электрического поля падающего света, перпендикулярная плоскости рассеяния, $\text{В}/\text{м}$
 $\mathbf{E}_{\parallel i}$ — компонента электрического поля падающего света, параллельная плоскости рассеяния, $\text{В}/\text{м}$
 $\mathbf{E}_{\parallel s}$ — компонента электрического поля рассеянного света, параллельная плоскости рассеяния, $\text{В}/\text{м}$

- $\mathbf{E}_{\perp s}$ — компонента электрического поля рассеянного света, перпендикулярная плоскости рассеяния, В/м
- \mathbf{E}_s — вектор электрического поля рассеянной волны, В/м
- E_s — амплитуда рассеянной волны, В/м
- E_T — поглощенная энергия импульса, Дж
- $E(0)$ — подповерхностная энергетическая освещенность, Дж/см²
- $F(\text{Hct})$ — функция упаковки эритроцитов
- $F(\mathbf{r})$ — плотность потока излучения или интенсивность, Вт/см²
- $f(t, t')$ описывает временную эволюцию δ -образного импульса после однократного рассеяния
- $f_{1,2}$ — объемные фракции компонентов ткани
- f_a — частота акустических колебаний, Гц
- f_c — объемная доля коллагена в биоткани
- f_{cp} — объемная доля внутриклеточной жидкости в биоткани
- f_{cyl} — поверхностная доля торцов цилиндров
- f_D — доплеровская частота
- f_{D_s} — доплеровский сдвиг частоты
- f_i — объемная доля волокон в биоткани
- f_{ge} — сила осциллятора перехода между основным и возбужденным состояниями
- $F_{\text{int}}(\theta)$ — интерференционный член, учитывающий пространственную корреляцию частиц
- $f_n = g^n$ — момент n -го порядка фазовой функции
- f_{nc} — объемная доля ядер в содержимом клеток
- f_{or} — объемная доля органелл в содержимом клеток
- f_p — частота повторения импульсов
- f_r — фиксированная опорная (синхронизирующая) частота
- f_{RBCi} — объемная доля эритроцитов
- f_s — объемная доля рассеивателей
- f_T — фокусное расстояние «тепловой линзы», см
- F_V — полная объемная доля частиц
- f_σ — оптическая постоянная материала
- $g_1(\tau)$ — автокорреляционная функция первого порядка (нормированная автокорреляционная функция оптического поля)
- $g_2(\Delta\xi)$ — автокорреляционная функция флуктуаций интенсивности
- G — область, в которой исследуется перенос излучения
- g — параметр анизотропии рассеяния (средний косинус угла рассеяния θ , $\langle \cos(\theta) \rangle$)
- $G_1(\tau)$ — автокорреляционная функция скалярного электрического поля, $E(t)$, рассеянного света
- $G(f)$ — спектр мощности с гауссовой огибающей
- $g(r)$ — функция радиального распределения рассеивающих центров (отношение локальной плотности рассеивающих центров к средней)

- $G(r)$ — бинарная корреляционная функция «плотность–плотность»
 \tilde{g}_2 — автокорреляционная функция флуктуационной компоненты интенсивности
 g_d — фактор анизотропии рассеяния для дермы
 g_e — фактор анизотропии рассеяния для эпидермиса
 G_s — фактор ослабления, учитывающий рассеяние и геометрию биоткани
 G_V — градиент плотности потока
 H или Hct — гематокрит крови
 H — степень гидратации биоткани
 h — постоянная Планка
 h — эффективный коэффициент переноса энергии
 $H(\mathbf{r}, \bar{t})$ — функция источника тепла, определяемая как тепловая энергия, вносимая источником света в единицу времени на единицу объема и пропорциональная оптическому коэффициенту поглощения
 $h\nu$ — энергия фотона
 $h(x, y)$ — пространственные вариации толщины случайного фазового экрана
 $I(\theta)/I(0) \equiv p(\theta)$ — нормированная индикатриса рассеяния, 1/ср
 $I(\theta)$ — индикатриса рассеяния (угловая зависимость интенсивности рассеянного света), Вт/(см² · ср)
 $i = (-1)^{1/2}$ — мнимая единица
 I_{AS}, I_S — интенсивность антистоксовой и стоксовой линий комбинационного рассеяния для данного колебательного состояния
 I_F — интенсивность флуоресценции
 I_i — энергетическая освещенность или интенсивность в падающем пучке света, Вт/см²
 $\langle I \rangle$ — среднее значение флуктуаций интенсивности
 I — относится к энергетической освещенности или интенсивности света, Вт/см²
 $I_{\perp}(t)$ — интенсивность рассеянного света, поляризованного ортогонально поляризации падающего света
 $I(\mathbf{r}, \mathbf{s})$ — энергетическая яркость (или удельная интенсивность) — средняя плотность потока мощности в точке \mathbf{r} в данном направлении \mathbf{s} , Вт/(см² · ср)
 $I(\mathbf{r}, \mathbf{s}, t)$ — зависящая от времени энергетическая яркость (или удельная интенсивность), Вт/(см² · ср)
 $I(0)$ — интенсивность в центре пучка
 $I(d)$ — интенсивность света, прошедшего через образец толщиной d , измеренная удаленным фотоприемником с малой апертурой (коллимированное пропускание), Вт/см²
 I, Q, U и V — параметры Стокса
 $I_H, I_V, I_{+45^\circ}, I_{-45^\circ}, I_R$ и I_L — интенсивность света, измеренная через расположенные перед приемником линейный поляризатор, ориентированный горизонтально, вертикально, под углом $+45^\circ$, под углом -45° , правый и левый круговые анализаторы соответственно
 $I_{in}(\eta_c)$ — угловое распределение энергетической яркости падающего света
 $I_{\Sigma}(\theta)$ — угловое распределение интенсивности света, рассеянного системой N частиц

- $I_{\Sigma}(x, y)$ — интенсивность света, прошедшего через случайный фазовый экран
- I_{\parallel} и I_{\perp} — интенсивности прошедшего (рассеянного) света, поляризованного параллельно или перпендикулярно направлению линейной поляризации падающего света соответственно
- $I(\theta)$ — угловое распределение света, рассеянного частицей, Вт/(см² · ср)
- $I(2\omega)$ — интенсивность сигнала второй гармоники
- $I_0(\lambda)$ — спектр интенсивности падающего света
- I_0 — интенсивность падающего света, Вт/см²
- I_b — интенсивность равномерной фоновой засветки
- $I_c(x, y)$ — интенсивность света, пропущенного в прямом направлении (когерентная компонента)
- $I_{F\parallel}$ и $I_{F\perp}$ — интенсивности света флуоресценции, поляризованного параллельно или перпендикулярно вектору электрического поля возбуждающего света
- I_{par} и I_{per} — интенсивности изображений в свете, поляризованном параллельно или перпендикулярно направлению линейной поляризации падающего света соответственно
- $I_r(r)$ и $I_s(r)$ — распределения интенсивности в опорном и сигнальном поле
- I_{rest} и I_{test} — интенсивность света, измеренная, когда объект (ткань мозга, скелетная мышца и т. п.) находится в покое, и во время теста (индуцированная активность мозга, холодовой или визуальный тест, физическая нагрузка и т. п.)
- $I_s(x, y)$ — интенсивность рассеянной компоненты
- I_{sp} — средняя интенсивность спеклов
- J — плотность потока вещества, моль/(с · см²)
- J_0 — функция Бесселя нулевого порядка
- J_1 — функция Бесселя первого порядка
- J_S — поток растворенного вещества
- J_w — поток воды
- $k = 2\pi/\lambda$ — волновое число
- k_a — волновой вектор акустической волны
- k_F — скорость перехода в основное электронное состояние S_0 (включая его колебательные состояния) с испусканием флуоресценции
- k_{ET} — скорость безызлучательного переноса энергии на соседние молекулы
- K, S — параметры Кубелки–Мунка
- $K_{\phi}(\Delta x)$ — коэффициент корреляции фазовых флуктуаций граничного поля
- k_B — постоянная Больцмана
- k_{bvo} — фактор, учитывающий перекрестные помехи между изменениями объема и оксигенации крови
- k_G — теплопроводность газа, Вт/К
- $k_i(\omega)$ — мнимая часть волнового вектора волны фотонной плотности, 1/см
- $k_r(\omega)$ — действительная часть волнового вектора волны фотонной плотности, 1/см
- k_{IC} — скорость внутренней конверсии в основное состояние S_0
- k_{ISC} — скорость интеркомбинационных переходов из синглетного в триплетное состояние T_1

- k_T — коэффициент теплопроводности, Вт/К
 L — полная средняя длина пробега фотона, см
 L — толщина слоя биоткани, см
 $L = D\lambda/2l$ — период интерференционных полос (D — среднее расстояние между узловой плоскостью глаза и сетчаткой)
 L_D — феноменологический коэффициент, характеризующий обменный поток, индуцированный осмотическим давлением
 L_ϕ — длина корреляции фазовых флуктуаций рассеянного поля
 l_0 — амплитуда продольных гармонических колебаний
 L_c — длина корреляции неоднородностей (случайного рельефа)
 l_c — длина когерентности источника света
 $l_d = \mu_{\text{eff}}^{-1}$ — диффузионная длина, см
 l_e — глубина проникновения света в биоткань
 L_p — феноменологический коэффициент, отражающий возможность вызывать объемный поток путем повышения гидростатического давления
 L_{pd} — феноменологический коэффициент, отражающий, с одной стороны, объемный поток через мембрану, который может быть вызван осмотическим давлением, а с другой стороны — эффективность разделения молекул воды и растворенного вещества
 $l_{\text{ph}} = \mu_t^{-1}$ — средняя длина свободного пробега фотона, см
 $l_s = \mu_s^{-1}$ — длина рассеяния, см
 $l_{\text{tr}} = (\mu'_s + \mu_a)^{-1}$ — средняя транспортная длина свободного пробега фотона, см
 l_T — длина диффузии тепла (тепловая длина), см
 M — молекулярный вес
 $m \equiv n_s/n_0$ — относительный показатель преломления рассеивателей
 $M = I_1/I_0$ — глубина модуляции интенсивности, определяемая как отношение интенсивности I_1 на основной частоте модуляции к постоянной составляющей интенсивности I_0
 M — нормированная (4×4)-матрица рассеяния (матрица интенсивности или матрица Мюллера) (МРС)
 M_0 — нулевой момент спектра плотности мощности $S(\nu)$ флуктуаций интенсивности
 M_1 — первый момент спектра плотности мощности $S(\nu)$ флуктуаций интенсивности
 m_I — глубина модуляции интенсивности падающего света
 M_{ij} — элементы МРС, $i, j = 1-4$, 16 элементов
 \bar{M}_{ij} — элементы МРС, нормированные на первый элемент
 M_{ij}^0 — элементы МРС изолированной частицы
 m_{RBC} — относительный показатель преломления эритроцита
 m_t — количество растворенного вещества в момент времени t
 m_∞ — количество растворенного вещества в состоянии равновесия
 $m_U \equiv \text{AC}_{\text{detector}}/\text{DC}_{\text{detector}}$ — глубина модуляции интенсивности рассеянного света
 n — средний показатель преломления биоткани относительно окружающей среды
 n'' — мнимая часть показателя преломления

- \bar{n} — средний показатель преломления рассеивающей среды
 N — число рассеивателей (частиц)
 $N = \theta/2\pi$ — порядок интерференционной полосы (θ — оптическая фаза)
 N_0 — число рассеивателей в единице объема
 $N_1(z) = z \cdot \mu_s^{\text{ex}}$ — среднее число актов рассеяния фотонов возбуждающего света до достижения флуорофора (z — глубина залегания флуорофора)
 $N_2(z) = z \cdot \mu_s^{\text{em}}$ — среднее число актов рассеяния фотонов испущенного света до выхода из среды (z — глубина залегания флуорофора)
 \bar{N} — вектор внешней нормали к ∂G
 n_{2f} — скорость двухфотонного возбуждения
 n_0 — показатель преломления базового вещества
 \bar{n}_0 — средний фоновый показатель преломления
 n_c — показатель преломления коллагеновых волокон
 n_{cp} — показатель преломления цитоплазмы
 n_e — показатель преломления необыкновенного луча
 n_i — показатель преломления волокон биоткани (коллагеновых или эластиновых)
 n_{g0} — показатель преломления базового вещества биоткани
 \bar{n}_{g1} — эффективный (средний) групповой показатель преломления биоткани
 n_{g2} — групповой показатель преломления однородной эталонной среды (воздуха)
 n_g — групповой показатель преломления
 n_{gs} — групповой показатель преломления рассеивателей
 $n_{\text{H}_2\text{O}}$ — показатель преломления воды
 $N_i = f_{\text{RBCi}}/V_{\text{RBCi}}$ — число эритроцитов в единице объема крови
 $N_{\text{int}} = [\arcsin(\lambda/2l)]^{-1}$ — число интерференционных полос на единицу угла зрения (угловая разрешающая способность глаза или ретинальная острота зрения)
 n_{is} — показатель преломления интерстициальной жидкости
 n_{nc} — показатель преломления клеточного ядра
 n_o — показатель преломления обыкновенного луча
 n_{or} — показатель преломления клеточных органелл
 N_p — число диаметров частиц
 n_s — показатель преломления рассеивающих центров
 \bar{n}_s — показатель преломления рассеивающей частицы, полученный усреднением показателей преломления компонентов биоткани
 \bar{n}_{sc} — средний показатель преломления склеры глаза
 N_{sp} — число спеклов в пределах апертуры приемника
 NA — числовая апертура объектива или волоконного световода
 $n(x, y)$ — пространственные вариации показателя преломления случайного фазового экрана
 \bar{n}_t — средний показатель преломления биоткани
 OD — оптическая плотность
 osm — осмотическая концентрация раствора

- p — размерность упаковки
 p — коэффициент пористости
 P — мощность лазерного пучка, Вт
 P — наведенная поляризация
 P_a — коэффициент проицаемости
 P_0 — средняя падающая мощность, Вт
 $P_C = V/I = [Q^2 + U^2]^{1/2}/I$ — степень круговой поляризации
 $P_{FL} = (I_{F\parallel} - I_{F\perp})/(I_{F\parallel} + I_{F\perp})$ — степень линейной поляризации света флуоресценции
 $P_L = (I_{\parallel} - I_{\perp})/(I_{\parallel} + I_{\perp})$ — степень линейной поляризации
 $P_L^r(\lambda)$ — спектральная зависимость степени остаточной поляризации
 P_{\min} — минимальная регистрируемая мощность сигнала
 $p(I)$ — функция распределения интенсивности (плотность вероятности интенсивности)
 $p(s)$ функция распределения длин пробега фотонов в среде
 $p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') = p(\theta)$ — фазовая функция рассеяния (плотность вероятности рассеяния в направлении \mathbf{s}' фотона, распространяющегося в направлении \mathbf{s}), 1/ср
 $p_{\text{ГК}}(\theta)$ — фазовая функция Гегенбауэра (ФФГ)
 $p_{\text{НГ}}(\theta)$ — фазовая функция Хенъи–Гринштейна (ФФХГ)
 PI — поляризационное изображение
 $P_n^l(\cos \theta)$ — полиномы Лежандра
 $p(\Delta L)$ — функция распределения (плотность вероятности) вариаций рельефа
 $p(\mathbf{r}, \bar{t})$ — акустическая волна
 \mathbf{q} — вектор рассеяния
 $|\mathbf{q}|$ — модуль вектора рассеяния
 $q(\mathbf{r})$ функция источника (число фотонов, инжектируемых в единицу объема)
 $Q, U,$ и V — степень горизонтальной линейной, 45°-линейной и круговой поляризации, соответственно
 Q_a — параметр асимметрии флуктуаций интенсивности
 q_b — скорость перфузии крови (1/с), определяемая как объем крови, проходящий через единицу объема биоткани в секунду
 Q_s — фактор эффективности рассеяния
 r — поперечная пространственная координата
 $r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$ — анизотропия поляризации
 $r_F = (I_{F\parallel} - I_{F\perp})/(I_{F\parallel} + 2I_{F\perp})$ — анизотропия поляризации флуоресценции
 $\mathbf{R}(\phi)$ — матрица Стокса поворота на угол ϕ
 \mathbf{r} — радиус-вектор рассеивателя или заданной точки, в которой оценивается энергетическая яркость, см
 $r_{\perp\parallel}(\tau)$ — функция кросс-корреляции (коэффициент корреляции) для двух поляризационных состояний

- $R_{\parallel}(\lambda)$ и $R_{\perp}(\lambda)$ — спектры отражения при параллельной и перпендикулярной ориентации поляризационного фильтра
 \widehat{R} — оператор отражения
 \overline{R} — (4×1) -вектор отклика, соответствующий четырем установкам системы «фазовая пластинка–анализатор»
 R_a — коэффициент отражения от задней поверхности образца, пропитанного агентом
 $R_{\theta}(\lambda)$ — спектр света, отраженного под углами в интервале от θ до $(\theta + d\theta)$
 r_0 — радиус падающего пучка света, см
 R_{bd} — расстояние между осью возбуждающего лазерного пучка и акустическим приемником, см
 R_d — коэффициент диффузного отражения
 $R_F = [(n - 1)/(n + 1)]^2$ — коэффициент френелевского отражения
 R_G — радиус газовой ячейки, см
 r_h — гидродинамический радиус частицы
 R_o — размер (для цилиндрической формы — радиус) биообъекта, см
 r_p — радиус диафрагмы малого сечения
 r_{RBC} — радиус эритроцита
 r_s — радиус рассеянного пучка в плоскости наблюдения
 R_s — коэффициент отражения от задней поверхности контрольного образца
 r_{sd} — расстояние между источником света и приемником на поверхности биоткани, см
 $R(\eta'_c, \eta_c)$ — функция перераспределения при отражении
 $RT\Delta C_s$ — осмотическое давление
 $R(z)$ — оптический коэффициент отражения или рассеяния назад
 s — полная длина пробега фотона (или средняя длина пробега фотона)
 S — насыщение гемоглобина кислородом
 S — член, описывающий источник тепла, Вт/м³
 S — площадь образца
 S_D — поверхность регистрации
 \mathbf{S} — вектор Стокса
 \mathbf{S}_s — вектор Стокса рассеянного света
 \mathbf{S}_i — вектор Стокса падающего света
 \mathbf{s} и \mathbf{s}' — направления распространения фотона или единичные векторы для падающей и рассеянной волн
 $|\mathbf{s}| = 2k \sin(\theta/2)$ — величина волнового вектора рассеянной волны $k = 2\pi\bar{n}/\lambda_0$
 \mathbf{S}_0 — единичный вектор направления падающей волны
 \mathbf{S}_1 — единичный вектор направления рассеянной волны
 $S(\mathbf{r}, \mathbf{s})$ — распределение падающего света на ∂G
 $S(f)$ — спектр мощности флуктуаций интенсивности спекл-поля
 $S(q)$ — структурный фактор
 $S_3(\theta)$ — трехмерный структурный фактор

- $S_2(\theta)$ — двумерный структурный фактор
 $S(\omega)$ — спектр флуктуаций интенсивности
 S_{1-4} — элементы амплитудной матрицы рассеяния (S-матрицы) или матрицы Джонса
 $S_r(t)$ — поверхностный радиометрический сигнал
 $S(\bar{t})$ — величина, описывающая форму облучающего импульса
 T_a — период акустической волны
 $T_\theta(\lambda)$ — спектр пропускания, полученный с помощью измерительной системы с конечным углом зрения (регистрируется коллимированный пучок света плюс часть света, рассеянного вперед в диапазоне углов от 0 до θ)
 t_0 — не зависящее от координат амплитудное пропускание случайного фазового экрана
 t_1 — первый момент функции распределения $f(t, t')$; временной интервал отдельного акта рассеяния, с
 T — абсолютная температура
 T — время экспозиции, с
 $T(\mathbf{r})$ — изменение температуры биоткани в точке \mathbf{r}
 $T(\eta'_c, \eta_c)$ — функция перераспределения пропускания
 T_a — температура артериальной крови, К
 t_b — температура крови
 $T_c(\lambda)$ — спектр коллимированного пропускания
 T_c — коэффициент коллимированного пропускания
 T_d — коэффициент диффузного пропускания
 T_s и T_e — температура поверхности биоткани и окружающей среды соответственно
 $t_s(x, y)$ — амплитудный коэффициент пропускания случайного фазового экрана
 $T_t = T_c + T_d$ — коэффициент полного пропускания
 $T_t(\lambda)$ — спектр полного пропускания
 t — время, с
 $U(\mathbf{r})$ — полная плотность потока энергии, Вт /см²
 $\langle U \rangle$ — усредненная амплитуда выходного сигнала гомодинного интерферометра
 U_m — максимальное значение полной плотности потока энергии, Вт /см²
 V — освещаемый объем
 V — объем образца биоткани
 v — скорость движения объекта относительно пучка света
 V_c — объем коллагеновых волокон
 V_e — объем эритроцита
 V_M — молекулярный объем
 $\bar{V}(z)$ — контраст полос средней интенсивности
 V_Φ — фазовая скорость волны фотонной плотности, см/с
 V_0 — контраст интерференционной картины в исходном лазерном пучке
 v_a — скорость акустических волн в среде, м/с
 V_I — контраст флуктуаций интенсивности

- v_p — радиус (в оптических единицах) сопряженных микроотверстий в конфокальной микроскопической системе
 V_P — контраст поляризационного изображения
 V_{RBC} — объем эритроцита, мкм³
 V_{rms} — среднеквадратичная скорость движущихся частиц
 V_s — скорость движущейся частицы
 \bar{V}_S — парциальные молярные объемы растворенного вещества
 v_{sh} — сдвиговая скорость
 V_V — параметр, прямо пропорциональный скорости потока
 \bar{V}_w — парциальный молярный объем воды
 w — радиус лазерного (гауссова) пучка (или радиус цилиндра, засвечиваемого лазерным пучком), см
 w_p — радиус зондирующего лазерного пучка, см
 w_0 — радиус перетяжки гауссова пучка
 x^0 — фиксированная точка плоскости, в которой наблюдаются спеклы
 $x = 2\pi a/\lambda$ — параметр размера (дифракции)
 z — линейная координата (глубина в среде), см
 $\bar{\mathbf{Z}}$ — нормированная фазовая матрица
 $z_0 = (\mu'_s)^{-1}$ — транспортная длина рассеяния, см

Греческие

- $\alpha(z)$ — отражательная способность образца на глубине z
 α_{Hb} — спектрально-зависимый коэффициент пропорциональности между мнимой частью показателя преломления гемоглобина и его концентрацией
 α_i — угол падения пучка, град
 β — коэффициент объемного расширения, 1/K
 β — глубина модуляции фотоэлектрического сигнала интерферометра
 $\langle\beta\rangle$ — усредненная по ориентациям первая гиперполяризуемость молекулы
 β_{sb} — параметр эффективности собственных биений
 Γ — параметр Грюнайзена (безразмерный зависящий от температуры фактор, пропорциональный доле тепловой энергии, преобразуемой в механическое напряжение)
 Γ_{eff} — эффективная скорость сдвига
 Γ_T — параметр релаксации
 $\gamma = c_P/c_V$ — отношение удельных теплоемкостей
 $\gamma_{11}(\Delta t)$ — степень временной когерентности света
 $\Delta\psi$ — сдвиг фазы в измерительном интерферометре, град
 Δa — полуширина распределения по радиусам
 $\Delta E_{vib} = h\nu_{vib}$ — энергия колебательного состояния молекулы
 ΔF — ширина усредненного спектра
 $\Delta\tilde{k}$ — сдвиг волнового числа

- $\Delta L = \Delta(nh)$ — изменение оптической длины (рельефа)
 Δn — разность показателей преломления
 $\Delta n_{\text{оe}}$ — разность показателей преломления из-за двулучепреломления формы
 Δp — изменение давления, Па
 Δp — гидростатическое давление, Па
 $\Delta R^r(\lambda)$ — дифференциальный спектр остаточной поляризации
 ΔV — изменение освещаемого объема из-за локального повышения температуры, м³
 Δw — изменение радиуса цилиндра, засвечиваемого лазерным пучком, из-за локального повышения температуры, см
 Δx — линейный сдвиг центра максимального диффузного отражения, см
 Δz — продольное смещение объекта
 ΔT — локальное повышение температуры, °С
 ΔT — оптическое просветление (увеличение коэффициента пропускания)
 Δx_{T} — амплитуда механических колебаний, см
 $\langle \Delta n \rangle$ — изменение среднего показателя преломления
 $\Delta \Phi_0$ — начальная инструментальная фаза
 $\Delta \theta$ — угловая ширина когерентного пика в рассеянии назад, угл. град
 $\Delta \lambda$ — ширина спектра источника света
 $\Delta \xi$ — изменение переменной
 $\Delta \Psi_I(r)$ — детерминированная разность фаз интерферирующих волн
 $\Delta \Phi$ — фазовый сдвиг относительно фазы модуляции падающего света (фазовая задержка), град
 $\langle \Delta r^2(\tau) \rangle$ — среднеквадратичное смещение частицы за временной промежуток τ
 $\Delta \Phi_I(r)$ — случайная разность фаз
 ΔT_{S} — изменение температуры образца, °С
 ΔT_{G} — изменение температуры окружающего газа, °С
 Δt — временной сдвиг пика прошедшего импульса
 $\Delta \Phi_I(r)$ — зависящая от времени разность фаз, связанная с движением объекта
 $\delta = 2\pi d \Delta n / \lambda_0$ — фазовая задержка (запаздывание) оптического поля
 δ_{n} и δ_{d} — параметры, связанные со средними вкладами в ультразвуковую модуляцию интенсивности света за счет свободного пробега фотона и акта рассеяния соответственно
 $\delta_{\text{оe}} = 2\pi d \Delta n_{\text{оe}} / \lambda_0$ — фазовая задержка оптического поля из-за двулучепреломления
 $\delta p(\omega)$ — амплитуда гармонической модуляции давления, Па
 $\delta P(t)$ — зависящее от времени изменение давления, Па
 ∂G — поверхность, ограничивающая область G
 $\partial n / \partial p$ — адиабатический пьезооптический коэффициент
 Δz_{opt} — оптическая длина пути
 ε_{ab} — коэффициент поглощения, выраженный в моль⁻¹ · см⁻¹
 $\varepsilon_{\lambda}^{\text{d}}$ — коэффициент экстинкции дезоксигемоглобина на длине волны λ , выраженный в моль⁻¹ · см⁻¹

- ε_λ^0 — коэффициент экстинкции оксигемоглобина на длине волны λ , выраженный в моль⁻¹ · см⁻¹
 ε_λ — коэффициент экстинкции на длине волны λ , выраженный в моль⁻¹ · см⁻¹
 η — абсолютная вязкость среды
 $\eta(a)$ или $\eta(2a)$ — функция распределения рассеивающих частиц по радиусам (a) или диаметрам ($2a$)
 η_c — косинус полярного угла
 η_F — квантовый выход флуоресценции
 η_q — квантовая эффективность приемника
 $\eta'(2a)$ — распределение $\eta(2a)$ с поправкой на корреляцию
 θ — угол рассеяния, град
 θ_I — угол между волновыми векторами интерферирующих волн
 $\theta_{\text{rnd}}^{\text{GK}}$ — случайный угол рассеяния фазовой функции Гегенбауэра
 $\theta_{\text{rnd}}^{\text{HG}}$ — случайный угол рассеяния фазовой функции Хеньи–Гринштейна
 $\Lambda = \frac{\sigma_{\text{sca}}}{\sigma_{\text{ext}}} = \frac{\mu_s}{\mu_t}$ альbedo для однократного рассеяния (характеризует соотношение рассеивающих и поглощающих свойств биоткани)
 $\Lambda' = \frac{\mu_s'}{\mu_a + \mu_s}$ — транспортное альbedo
 Λ_Φ — длина волны фотонной плотности, см
 Λ_I — расстояние между интерференционными полосами
 $\lambda = \lambda_0/\bar{n}$ — длина волны в рассеивающей среде, нм
 λ_0 — длина волны света в вакууме, нм
 λ_p — длина волны зондирующего пучка, нм
 μ_a' — коэффициент поглощения на длине волны теплового излучения, 1/см
 μ_a — коэффициент поглощения, 1/см
 μ_b — коэффициент рассеяния назад, усредненный по объему, 1/(см · ср)
 $\mu_{\text{eff}} = [3\mu_a(\mu_s' + \mu_a)]^{1/2}$ — эффективный коэффициент ослабления или обратная длина диффузии, 1/см
 μ_{ge} — изменение дипольного момента при переходе между основным и возбужденным состояниями
 μ_n — статистический момент n -го порядка ($n = 1, 2, 3 \dots$)
 $\mu_s' = (1 - g)\mu_s$ — приведенный (транспортный) коэффициент рассеяния, 1/см
 μ_s — коэффициент рассеяния, 1/см
 μ_s^{ex} — коэффициент рассеяния возбуждающего света, 1/см
 μ_s^{em} — коэффициент рассеяния испускаемого света, 1/см
 $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ — коэффициент экстинкции (коэффициент взаимодействия или коэффициент полного ослабления), 1/см
 $\mu_t' = \mu_a + \mu_s'$ — транспортный коэффициент
 $|\mu(z)|$ — модуль коэффициента поперечной корреляции комплексной амплитуды рассеянного света
 ν_I — экспоненциальный фактор пространственных флуктуаций интенсивности

- $\xi \equiv x$ или t — пространственная или временная переменная
 ξ_i — характеристическая деполаризация для линейно ($i = L$) и циркулярно ($i = C$) поляризованного света
 ρ — плотность среды, кг/м³
 ρ — азимут поляризации
 ρ_a — объемная плотность рассеивателей, 1/см³
 ρ_b — плотность крови, кг/м³
 ρ_G — плотность газа, кг/м³
 ρ_s — объемная плотность рассеивателей, 1/см³
 $\rho(s)$ функция плотности вероятности оптических длин пути
 σ — полуширина распределения частиц по размерам
 $\sigma = -(L_{pd}/L_p)$ — коэффициент молекулярного отражения
 $(\sigma_1 - \sigma_2)$ — разность главных напряжений в плоскости
 σ_{abs} — сечение поглощения частицы, см²
 $\bar{\sigma}_{abs}$ — удельный коэффициент поглощения, см⁻¹
 σ_{ext} — сечение экстинкции частицы, см²
 σ_f — сечение поглощения фотона
 σ_h — стандартное отклонение высоты (глубины) неоднородностей
 σ_I — стандартное отклонение флуктуаций интенсивности
 σ_L — стандартное отклонение изменений рельефа (в оптических длинах)
 σ_m — ширина асимметричного логарифмического распределения для объемной доли частиц диаметра $2a$
 $\sigma_s(2a_i)$ — оптическое сечение отдельной частицы диаметра $2a_i$ и объема v_i , см²
 σ_{sca} — сечение рассеяния частицы, см²
 $\bar{\sigma}_{sca}$ — удельный коэффициент рассеяния, см⁻¹
 Σ_{sca} — сечение рассеяния для системы частиц, см²
 σ_ϕ — стандартное отклонение фазовых флуктуаций рассеянного поля
 σ_I^2 — дисперсия флуктуаций интенсивности
 σ_s^2 — пространственная дисперсия флуктуаций интенсивности в спекл-картине
 σ_U^2 — дисперсия выходного сигнала гомодинного интерферометра
 τ — время задержки, с
 τ — время жизни возбужденного состояния, с
 $\tau = \int_0^s \mu_t ds$ — оптическая толщина
 $\tau_a = 1/(\mu_a c)$ — среднее время жизни мигрирующего фотона до его поглощения, с
 τ_c — время корреляции флуктуаций интенсивности в рассеянном поле, с
 τ_d — время задержки между оптическим и акустическим импульсами, с
 τ_L — длительность лазерного импульса, с
 τ_p — длительность импульса, с
 τ_T — постоянная времени вращательной диффузии, с

-
- τ_{th} — время задержки в методе тепловой линзы, с
 τ_T — время тепловой релаксации оптико-акустической ячейки, с
 $\tau_B^{-1} \equiv \Gamma_T$ — величина, характеризующая случайный (броуновский) поток
 $\tau_S^{-1} \approx 0,18G_V |\bar{q}| l_t$ — величина, характеризующая направленный поток
 $\Phi(x, y)$ — случайный сдвиг фазы, вносимый случайным фазовым экраном в точке (x, y)
 $\Phi_p(\omega)$ — фазовая задержка гармонически промодулированного давления, град
 $\phi(t)$ — фазовый сдвиг, определяемый положением рассеивателя
 φ — угол наблюдения и азимутальный угол, град
 φ_d — угол отклонения зондирующего лазерного пучка, угл. град
 Ω — телесный угол, ср
 Ω_v — частота гармонических колебаний
 $\omega = 2\pi f$ — частота модуляции, 1/с
 ω_a — основная акустическая частота
 ω_{ge} — разность энергий между основным и возбужденным состояниями
 ω_p — фактор упаковки среды, заполненной рассеивателями с объемной долей f_s
 $(\omega t - \theta)$ — фаза волны фотонной плотности
 $\chi^{(n)}$ — нелинейная восприимчивость n -го порядка

СОКРАЩЕНИЯ

АЛК — δ -аминолевулиновая кислота
АОМ — акустооптический модулятор
АОТ — акустооптическая томография
АСКР — активная спектроскопия КР
АФ — автокорреляционная функция
АФ — автофлуоресценция
АЦП — аналого-цифровой преобразователь
БВ — белое вещество (мозга)
БИК — ближний ИК
БПФ — быстрое преобразование Фурье
БФФР — буферированный фосфатом физиологический раствор
ВКД — визуализация с когерентным детектированием
ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения
ВОП — виртуальное окно прозрачности
ВОР — волоконно-оптический рефрактометр
ВР — временное разрешение
ВС — волоконный световод
ВЧ — высокая частота
ГВГ — генерация второй гармоники
ГКР — гигантское комбинационное рассеяние
ГОА — генетический обратный алгоритм
ГП — гетеродинный пучок
ГРР — гипер-рэлеевское рассеяние
ГФИ — гониофотометрические измерения
ДБС — двойной балансный смеситель
ДВС — диффузионно-волновая спектроскопия
ДИС — двойная ИС
ДКС — диффузионно-корреляционная спектроскопия
ДМСО — диметилсульфоксид
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
ДОФА — дигидроксифенилаланин
ДОФЭ — диолеилфосфатидилэтаноламин
ДТ — диффузионная теория
ДФЧ ОКТ — дифференциальная фазо-чувствительная ОКТ
ДФФ — двухфотонная флуоресценция

- ЗНТ — золотые углеродные нанотрубки
ИВ — иммерсионное вещество
ИК — инфракрасный
ИКС НПВО ФП — инфракрасная спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения с фурье-преобразованием
ИС — интегрирующая сфера
КАСКР — когерентное антистоксово комбинационное рассеяние
КМ — конфокальный микроскоп
КП ОКТ — кросс-поляризационная ОКТ
КР — комбинационное рассеяние
КМОП — комплементарный металло-оксидный полупроводник
КРС — квазиупругое рассеяние света
КТ — компьютерная томография
ЛДА — лазерный доплеровский анемометр
ЛДВ — лазерная доплеровская визуализация
ЛДМ — лазерный доплеровский микроскоп
ЛИМР — лазерный измеритель матрицы рассеяния
ЛИТТ — лазерно-индуцированная интерстициальная термическая терапия
ЛР — лазерный рефрактометр
ЛСВ — лазерная спекл-визуализация
ЛФД — лавинный фотодиод
М-КАСКР — мультиплексное когерентное антистоксово комбинационное рассеяние
МИМ — микрополяриметр
МК — Монте-Карло
МКМ — модель Кубелки–Мунка
МКО — Международная комиссия по освещению
ММР — межмолекулярное расстояние
МНЧ — магнитные наночастицы
МРВ — мультиплексирование с разделением по времени
МРДВ — мультиплексирование с разделением по длинам волн
МРС — матрица рассеяния света
МРТ — магнитно-резонансная томография
МФР — межфибрилярное расстояние
МЭД — минимальная эритемная доза
НАД — никотинамидадениндинуклеотид
НАСА — Национальное космическое агентство США (NASA)
НПВО — нарушенное полное внутреннее отражение
НЧФ — низкочастотный фильтр
ОА — оптоакустический
ОАТ — ОА-томография

ОБП — одна боковая полоса
ОДУ — обратный (метод) добавления–удвоения
ОКМ — оптическая когерентная микроскопия
ОКМ — отражательная конфокальная микроскопия
ОКМ — отражательный конфокальный микроскоп
ОКТ — оптическая когерентная томография
ОМА — оптический многоканальный анализатор
ОМК — обратный (метод) МК
ОПА — оптический просветляющий агент
ОПР — отражение с пространственным разрешением
ОТ — оптотермический
ОТР — оптотермическая радиометрия
ОТТГ — оральный тест на толерантность к глюкозе
ОФФ — однофотонная флуоресценция
ПВДФ — поливинилиденфторид
ПГ — пропиленгликоль
ПГС — параметрический генератор света
ПЗС — прибор с зарядовой связью
ПК — персональный компьютер
ПКГ — полная концентрация гемоглобина
ПМЛП — пространственно модулированный лазерный пучок
ПОА — переменный оптический аттенюатор
ПОП — потенциал оптического просветления
ПОС — полиорганосилоксан
ППГ — полипропиленгликоль
ППГО — полимеры полипропилена на гликолевой основе
ПРГ — приближение Рэлея–Ганса
ПСО — поляризационная спектроскопия отражения
ПЦМ — просвечивающая цифровая микроскопия
ПЧ — промежуточная частота
ПЧ ОКТ — поляризационно-чувствительная ОКТ
ПЭГ — полиэтиленгликоль
РАН — Российская академия наук
РНК — рибонуклеиновая кислота
РС — роговой слой
САБ — сывороточный альбумин быка
СВ — серое веществ (мозга)
СВР — спектроскопия с временным разрешением
СД — светодиод
СИК — средний ИК

СЛ — сонолюминесценция
СЛД — суперлюминесцентный диод
СЛТ — СЛ-томография
СОЭ — скорость осаждения эритроцитов
СП — сохраняющий поляризацию
СРНВ — слой ретинального нервного волокна
СРС — спектроскопия рассеяния света
СФЭ — случайный фазовый экран
ТА — термоакустический
ТГ — терагерцовый
ТГС — тепловая градиентная спектроскопия
ТМО — твердая мозговая оболочка
ТПИ — теория переноса излучения
ТЭПВ — трансэпидермальная потеря воды
УЗ — ультразвук
УЗИ — ультразвуковое исследование
УИФЗ — устройство измерения фазовой задержки
УФ — ультрафиолетовый
УФА — ультрафиолетовый А-диапазон
ФА — фотоакустический
ФАД — флавинадениндинуклеотид
ФАМ — ФА-микроскопия
ФАТ — ФА-томография
ФБР — фосфатный буферный раствор
ФДТ — фотодинамическая терапия
ФЛМА — фракционная лазерная микроабляция
ФМН — флавиномононуклеотид
ФР — физиологический раствор
ФПВ — функция плотности вероятности
ФРВ — функция распределения вероятности
ФТ — фототермический
ФТМ — фототермическая микроскопия
ФТПЦ — фототермическая поточная цитометрия
ФТР — фототермическая радиометрия
ФФХГ — фазовая функция Хенъи–Гринштейна
ФФЯГ — фазовая функция ядра Гегенбауэра
ФЭУ — фотоэлектронный умножитель
ЦК — церебральный кровоток
ЦМП — цифровая микроскопия просвечивания
ЦСЖ — цереброспинальная жидкость

- ЧЗ-ОТР — частотно-зависимая ОТР
- ЧЗ-ЛЮМ — частотно-зависимая люминесценция
- ЭМЧ — эпидермальная мембрана человека
- 3-НKG — 3-hydroxy-*L*-kynurenine-*O*- β -glucoside (3-гидрокси-*L*-кинуренин-*O*- β -глюкозид)
- ADC — analogue-digital converter (АЦП)
- АНА — alpha-hydroxy-acids (альфа-гидроксикислоты)
- ALA — 5 (δ)-aminolevulinic acid (АЛК)
- AP — aged protein (возрастной белок)
- ATR FTIR — Attenuated Total Reflectance Fourier Transform InfraRed spectroscopy (ИКС НПВО ФП)
- CARS — Coherent anti-Stokes Raman scattering (когерентное антистоксово комбинационное рассеяние)
- CBV — cerebral blood volume (церебральный объем крови)
- CFD — constant-fraction discriminator (дискриминатор следящего порога)
- CH — choroid layer (слой сосудистой оболочки)
- CIN — cervical intraepithelial neoplasia (внутриэпителиальная неоплазия шейки матки)
- CIS — carcinoma *in situ* (карцинома *in situ*)
- CMOS — complementary metal-oxide-semiconductor (комплементарный металло-оксидный полупроводник)
- DMSO — dimethyl sulfoxide (ДМСО)
- DOPA — 3,4-dihydroxy-*L*-phenylalanine (ДОФА)
- DOPE — dioleoylphosphatidylethanolamine (ДОФЭ)
- EDTA — ethylenediaminetetraacetic acid (этилендиаминтетрауксусная кислота)
- EI — erythematous index (индекс эритемы)
- FDA — Food Drug Administration (управление по контролю за пищевыми продуктами и медикаментами США)
- FDTD — Finite-Difference Time-Domain (конечно-разностный временной подход)
- FLIM — fluorescence-lifetime imaging microscopy (микроскопия на основе визуализации времени жизни двухфотонной флуоресценции)
- FS — fiber switch (волоконный переключатель)
- GCL — ganglion layer (слой ганглия)
- GHb — glycosylated hemoglobin (гликированный гемоглобин)
- GRIN — gradient refractive index (градиент показателя преломления)
- Hct — hematocrit (гематокрит)
- ILM — inner boundary layer (внутренний граничный слой)
- IQ — in-phase/quadrature (синфазный/квадратурный)
- KDP — kalium dihydrophosphate (дигидрофосфат калия)
- KLM — Kerr-lens mode-locked (синхронизация мод с помощью керровской линзы)
- LASCA — laser speckle contrast analysis (анализ контраста лазерных спеклов)
- LED — light-emitting diode (светодиод)

- LP — *lamina propria* (собственная тонкая пластинка слизистой оболочки)
- LPF — long-pass filter (фильтр, пропускающий длинноволновую часть спектра)
- LPF — low-pass filter (фильтр нижних частот)
- LVDS — low-voltage differential signaling — низковольтное дифференциальное преобразование
- MBG — mean blood glucose (средняя концентрация свободной глюкозы)
- MCA — multichannel analyzer (многоканальный анализатор)
- MCP-PMT — multi-channel plate-photomultiplier tube (ФЭУ на основе многоканальной пластинки)
- ММ — *muscularis mucosae* (мышечная ткань слизистой)
- MONSTIR — multichannel optoelectronic near-infrared system for time-resolved image reconstruction (многоканальная оптоэлектронная БИК-система для реконструкции изображений с временным разрешением)
- NA — numerical aperture (числовая апертура)
- NASA — National Aeronautics and Space Administration (НАСА)
- OD — optical density (оптическая плотность)
- PA — preamplifier (предусилитель)
- PC — personal computer (ПС)
- PD — photodiode (фотодиод)
- PF — polymer fiber (полимерное волокно)
- PI — polarization image (поляризационное изображение)
- PMT — photomultiplier tube (ФЭУ)
- PTA — picoseconds time analyzer (пикосекундный временной анализатор)
- PTD — picotiming discriminator (пикосекундный дискриминатор)
- RC — relative contrast (относительный контраст)
- RNFL — retinal nerve fiber layer (СРНВ)
- ROI — region of interest (участки наибольшего интереса)
- RPE — retinal pigment epithelium (пигментный эпителий сетчатки)
- RSODL — rapid scanning optical delay line (быстрая сканирующая оптическая линия задержки)
- SERS — surface-enhanced Raman scattering (гигантское КР)
- SHC — second harmonic convertor (преобразователь во вторую гармонику)
- SLD — superluminescence diode (СЛД)
- ST — *Staphylococcus toxin* (токсин стафилококка)
- TAC — time-to-amplitude converter (преобразователь «время-амплитуда»)
- TEWL — transepidermal water lost (ТЭПВ)
- THC — third harmonic converter (преобразователь в третью гармонику)
- TOAST — time-resolved optical absorption and scattering tomography (оптическая томография поглощения и рассеяния с временным разрешением)
- VOA — variable optical attenuator (переменный оптический аттенюатор)
- WLI — white-light image (изображение в белом свете)

ПРЕДИСЛОВИЕ К ПЕРВОМУ ИЗДАНИЮ

Многие современные медицинские технологии основаны на последних достижениях физики, включая оптику [1–102]. Важным примером, относящимся к теме настоящей книги, является компьютерная томография [1, 4]. Методы визуализации, использующие рентгеновское излучение, магнитный резонанс и испускание позитронов, интенсивно применяются в исследованиях как анатомических структур, так и локальных метаболических процессов. Другим, более безопасным и технически сравнительно простым средством, которое уже используется в настоящее время, является диффузионная оптическая томография [1, 3, 4, 6, 15, 28, 71].

С точки зрения оптики, биологические ткани и жидкости (кровь, лимфа, слюна, носовая слизь, желудочный сок, моча, внутриглазная жидкость, сперма и т. п.) можно разделить на два больших класса [1–69, 92–97, 101]. Первый класс включает сильно рассеивающие (непрозрачные) биоткани и жидкости, такие как кожа, мозг, стенки сосудов, склера глаза, кровь и лимфа. Оптические свойства таких биотканей и жидкостей могут быть описаны в рамках модели многократного рассеяния скалярных или векторных волн в случайно-неоднородной поглощающей среде. Второй класс состоит из слабоссеивающих (прозрачных) биологических тканей и жидкостей, таких как роговица, хрусталик, слезная жидкость и водянистая влага передней камеры глаза. Оптические свойства этих тканей и жидкостей можно описать в рамках модели однократного рассеяния (или рассеяния малой кратности) в упорядоченной изотропной или анизотропной среде с плотно упакованными центрами рассеяния и поглощения.

Векторная природа световых волн особенно важна для прозрачных тканей, хотя в последнее время значительное внимание было сосредоточено и на исследованиях поляризационных свойств света, распространяющегося в сильно рассеивающих средах [3, 5, 6, 8–10, 23, 28, 43, 59–64, 69, 70]. В рассеивающих средах векторная природа световых волн проявляется как поляризация первоначально неполяризованного светового пучка либо как деполяризация (в общем случае изменение характера поляризации) первоначально поляризованного пучка при его распространении в среде. Так же, как когерентные свойства света, отраженного от биологической ткани или прошедшего через нее, параметры поляризации света могут использоваться как селектор фотонов, проходящих с различных глубин внутри объекта.

Задачи оптической диагностики и спектроскопии тканей связаны с двумя режимами облучения: стационарным и нестационарным [1, 3, 4, 6, 12, 14, 15, 28, 31, 71, 92]. Последний реализуется посредством облучения рассеивающего объекта короткими лазерными импульсами (от $\sim 10^{-10}$ до 10^{-12} с) с последующей регистрацией уширенных импульсов рассеянного излучения (временной метод), либо путем облучения модулированным светом, обычно в диапазоне частот модуляции от 50 до 1000 МГц, с регистрацией глубины модуляции интенсивности рассеянного света и соответствующего фазового сдвига гармоник модуляции (модуляционный или фазовый метод). Режим с временным разрешением основан на возбуждении спектра волн фотонной плотности в сильно рассеивающей среде, который может быть описан в рамках нестационарной теории переноса излучения (ТПИ). Режим стационарного облучения описывается в рамках стационарной ТПИ.

Многие современные медицинские технологии используют лазерное излучение и волоконно-оптические устройства [1–7]. Поскольку применение лазеров в медицине

имеет как фундаментальные, так и технические цели, проблема когерентности очень важна для анализа взаимодействия света с биологическими тканями и ансамблями клеток. С одной стороны, эта проблема может рассматриваться в терминах потери когерентности из-за рассеяния света в случайно-неоднородной среде с многократным рассеянием, либо изменения статистики спеклов в рассеянном поле. С другой стороны, эта проблема может интерпретироваться в терминах возникновения усиленной когерентной остронаправленной компоненты в рассеянном назад излучении в условиях, когда ткань зондируется ультракороткими импульсами лазерного излучения [1, 3, 73, 74]. Когерентность света имеет фундаментальное значение для селекции фотонов, претерпевших малое число актов рассеяния или вообще не рассеянных, а также для генерации спекл-модулированных полей от однократно или многократно рассеивающих фазовых объектов [1, 3, 75–77]. Такие подходы важны для когерентной томографии, голографии, дифрактометрии, фотонно-корреляционной спектроскопии, лазерной доплеровской анемометрии и спекл-интерферометрии биологических тканей и потоков биологических жидкостей [1, 3, 5, 15, 22, 28, 76–83]. Использование оптических источников с малой длиной когерентности открывает новые возможности в когерентной интерферометрии и томографии тканей, органов и кровотока [1, 3, 8, 17, 18, 77, 84].

Прозрачность биологических тканей достигает своего максимума в ближней инфракрасной (БИК) области, что обусловлено тем фактом, что живые ткани не содержат сильных внутренних хромофоров, которые могли бы поглощать излучение в этой области спектра. Свет проникает в ткани на глубину нескольких сантиметров, что важно для просвечивания объемных человеческих органов (мозг, молочная железа и т. п.). Однако биологические ткани характеризуются еще достаточно сильным рассеянием БИК-излучения, что мешает получать четкие изображения локальных неоднородностей, возникающих в тканях при различных патологиях, таких как образование опухолей или локальный рост объема крови, обусловленный кровоизлиянием или разрастанием микрососудов. Сильное рассеяние БИК-излучения предъявляет также некоторые требования к мощности лазерного излучения, которая должна быть достаточной для обеспечения регистрации слабых световых потоков. Отдельное внимание в оптической томографии и спектроскопии сосредоточено на развитии методов селекции фотонов, несущих информацию об изображении или оптических параметрах рассеивающей среды в интересующей локальной области. Эти методы используют результаты фундаментальных исследований, посвященных распространению лазерных пучков в рассеивающих средах [1, 3, 4, 6, 15, 28, 31, 71, 92].

Другая важная область, в которой на практике необходимо обеспечение глубокого зондирования тканей, — это спектроскопия отражения, применяемая для оценки степени оксигенации гемоглобина в работающей мышечной ткани, мозге новорожденного при патологиях или при изучении активности мозга взрослого человека, — так называемая оптическая оксиметрия [1, 3, 4].

Настоящая книга, представляющая собой монографию с элементами учебного пособия, преимущественно описывает методы рассеяния света, которые разрабатываются для количественных исследований биологических тканей и ансамблей клеток. В книге обсуждаются результаты теоретических и экспериментальных исследований переноса фотонов в тканях и описываются методы решения прямых и обратных задач рассеяния в случайно-неоднородных средах с многократным рассеянием и частично упорядоченных средах с однократным рассеянием. Эти результаты используются для моделирования процессов распространения световых потоков в различных тканях с целью изучения их морфологического состояния и функционирования. Теоретическое рассмотрение базируется на стационарной и нестационарной теориях переноса

излучения для сильно рассеивающих тканей, теории Ми для сравнительно прозрачных тканей и численном методе Монте-Карло, который используется для решения прямых и обратных задач транспорта фотонов в многослойных средах со сложными граничными условиями.

Эти подходы являются общими и распространяются на исследование большого числа рассеивающих сред небиологического происхождения. Стоит заметить, однако, что многие известные методы оптики рассеивающих сред (например, метод интегрирующей сферы) были доведены до совершенства именно тогда, когда стали использоваться в биомедицинских исследованиях. Одновременно были разработаны новые измерительные системы и алгоритмы для решения обратных задач, полезные для оптики рассеивающих сред в целом. Более того, усовершенствование некоторых методов было предпринято только потому, что они были необходимы для исследования живых объектов; последнее особенно верно для метода диффузных волн фотонной плотности, перспективного для исследования многих физических систем: водных сред, гелей, пен, воздуха, аэрозолей и т. д.

Основываясь на таких фундаментальных оптических явлениях, как упругое и квазиупругое (статическое и динамическое) рассеяние, дифракция и интерференция оптических полей и волн фотонной плотности (волн интенсивности), в книге обсуждаются оптические методы и приборы, открывающие новые направления в биомедицинских приложениях. Среди них волоконно-оптическая быстродействующая спектрофотометрия и поляриметрия, временные и модуляционные системы для спектроскопии и визуализации, спектроскопия корреляции фотонов, спекл-интерферометрия, когерентная топография и томография, фазовая, конфокальная и гетеродинамная микроскопия, частично-когерентная интерферометрия и томография.

Я благодарен Терри Монтони, Дональду О'Ши, Александру Приезжеву, Барри Мастерсу и Рику Херманну за их ценные предложения и соображения, высказанные в процессе подготовки этой книги.

Я весьма благодарен Андре Роггану, Лихонг Вангу и Александру Ораевскому за их ценные комментарии и конструктивную критику рукописи.

Я высоко ценю сотрудничество и вклад всех моих коллег, в особенности Д. А. Зимнякова, В. П. Рябухо, С. С. Ульянова, И. Л. Максимовой, В. И. Кочубея, С. Р. Утца, И. В. Ярославского, А. Б. Правдина, Г. Г. Акчурина, И. Л. Кон, Е. И. Захаровой, А. А. Беднова, А. А. Чаусского, С. Ю. Кузьмина, К. В. Ларина, И. В. Меглинского, А. А. Мишина, И. С. Переточкина и А. Н. Ярославской.

Я благодарен всем слушателям моих кратких курсов по биомедицинской оптике, которые я читал во время Международных симпозиумов SPIE Photonics West с 1992 года, за их хорошие вопросы, плодотворные обсуждения и критические оценки представленных материалов. Их мнение было очень ценно для подготовки данной книги. Я особенно благодарен Михаилу Дела Веккиа, Хатиму Кариму, Шандору Вари, М. Паис Клементе, Хайшан Зенгу, Леону Шапиро и Захари Саксу, которые стали моими хорошими друзьями и коллегами на многие годы.

Продолжительное сотрудничество с университетом Пенсильвании, мои плодотворные дискуссии с Бриттоном Чансом, Шока Ниока, Арженом Йодом, Дэвидом Боасом и многими другими очень помогли при написании этой книги.

Весьма полезным было мое совместное председательство с Галиной Подбельска, Беном Орвином и Джо Айзаттом на конференции SPIE по когерентным оптическим методам в биомедицинской науке и клинических приложениях.

Оригинальная часть данной работы была выполнена при поддержке в рамках программы «Ведущие научные школы» Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 96-15-96389), гранта CRDF (США-РФ) RB1-230, а также

грантов ISSEP p97–372, p98–768 и p99–703 в рамках программы «Соросовские профессора».

Я хотел бы поблагодарить всех своих многочисленных коллег и друзей по всему миру, кто любезно прислал мне оттиски своих статей, использованные при написании книги, что намного облегчило мою работу, особенно И. Айзу, Дж. Д. Брайерса, Ж. Чена, Б. Деварай, А. Ф. Фершера, М. Феррари, Дж. Г. Фуджимото, М. Дж. К. ван Гемерта, Э. Граттона, Дж. Грейва, А. Х. Хильшера, С. Л. Жака, Р. Г. Джонсона, Г. В. Каттавара, М. Кайзер, С. М. Ханна, А. Я. Хайруллину, А. Кнюттеля, Дж. Р. Лаковица, М. В. Линдера, Ш. Ло, Р. Л. МакКалли, В. П. ван де Мерве, Г. Мюллера, Ф. Ф. М. де Мюла, М. С. Паттерсона, Б. Пирсионек, Г. Ринненберга, П. Рола, В. Рудольфа, Б. Рута, Дж. М. Шмитта, В. М. Стара, Р. Штайнера, Х. Дж. С. М. Стеренборга, Л. О. Сваасанда, Дж. Е. Томаса, Б. Дж. Тромберга, А. Дж. Вэлша и Дж. Р. Зипа.

Хотелось бы сказать несколько слов в память Паскаля Рола, моего доброго друга и коллеги, вместе с которым мы были организаторами многих конференций SPIE. Паскаль трагически погиб 10 января 2000 года. Читатель найдет много его превосходных результатов по оптике тканей склеры в этой книге. Он внес значительный вклад в биомедицинскую оптику, и я буду всегда помнить его как хорошего ученого и доброжелательного человека.

Я весьма благодарен Рут Хаас, Эрике Виттманн и Сью Прайс за их помощь в редактировании и издании книги, а также С. П. Черновой и Е. П. Савченко за помощь в подготовке иллюстраций.

Наконец, я выражаю благодарность своей жене Наталии и всей моей семье за их поддержку, понимание и терпение.

Валерий Тучин
Апрель 2000

ПРЕДИСЛОВИЕ КО ВТОРОМУ ИЗДАНИЮ

Это второе издание книги «Оптика биологических тканей: Методы рассеяния света для медицинской диагностики», опубликованной в 2000 году. Последние семь лет с момента издания этой книги характеризовались интенсивным развитием оптики биологических тканей, особенно в связи с разработкой новых подходов и методов биомедицинской диагностики [103–144]. Имело место дальнейшее развитие методов количественной оценки оптических свойств биологических тканей в норме и при различных патологиях. Получены новые результаты теоретических и экспериментальных исследований переноса излучения в биологических тканях, а также разработаны новые методы решения прямых и обратных задач для случайных и квазиупорядоченных сред с многократным рассеянием.

В течение нескольких последних лет чрезвычайно бурное развитие претерпели такие направления, как оптическая когерентная томография (ОКТ) [108–111, 115, 116, 126, 127, 129, 130, 136, 142] и поляризационно-чувствительные методы измерений [129, 130, 135, 136, 138, 139], весьма перспективные для оптической медицинской спектроскопии и визуализации. Исследования и применения метода оптического просветления, основанного на обратимом уменьшении рассеяния в ткани за счет согласования показателей преломления рассеивающих частиц и окружающей среды, в последнее время привлекли большой интерес исследователей [129, 132, 136, 139, 140]. Многие исследовательские группы существенно продвинулись в применении колебательной спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния [104, 105, 123, 130, 132, 136, 143, 144], а также многофотонной микроскопии [114, 119, 122, 130, 132, 136, 137] к изучению морфологии и функционирования живых клеток и тканей.

Настоящее новое издание монографии концептуально не отличается от первого. Оно также состоит из двух частей. Часть I посвящена изложению оптических основ и фундаментальных исследований, а часть II представляет оптические и лазерные методы и устройства, а также медицинские приложения. Автор исправил замеченные опечатки, обновил литературные ссылки и добавил некоторые новые результаты, большей частью по измерениям оптических свойств (гл. 2) и взаимодействию поляризованного света с рассеивающими средами (разд. 1.4). Дан обзор новых результатов по поляризационной визуализации и спектроскопическим методам (гл. 7), а также по развитию и применению ОКТ (гл. 9). Существенно обновлены и расширены материалы по управлению оптическими свойствами биологических тканей (гл. 5) и оптотермическим и оптоакустическим взаимодействиям света с тканями (разд. 1.5). Краткое описание флуоресцентной и нелинейной спектроскопии, а также спектроскопии неупругого рассеяния приведено в гл. 1.

Я благодарен Шерон Стримз за ее предложение подготовить второе издание книги и за помощь в ее редактировании. Хотелось бы также поблагодарить Мери Шнелль за помощь на заключительной стадии редактирования и издания книги.

Я благодарен слушателям моих кратких курсов «Когерентные, основанные на рассеянии света и поляризационные методы и устройства для медицинской диагностики», «Оптика и спектроскопия биологических тканей», «Оптика биологических тканей и управление их оптическими свойствами» и «Оптическое просветление биологических тканей и крови», прочитанных во время симпозиумов SPIE Photonics

West, Европейских конференций по биомедицинской оптике SPIE/OSA и конференций OSA CLEO/QELS в течение последних семи лет, за их стимулирующие вопросы, плодотворные обсуждения и критическую оценку представленных материалов. Их мнения были весьма ценны для подготовки данного издания. Очень полезным было мое сотрудничество с Джозефом А. Айзаттом и Джеймсом Г. Фуджимото в качестве сопредседателей Конференции SPIE по когерентным методам и оптической когерентной томографии в биомедицине.

Оригинальная часть настоящей монографии была выполнена при поддержке в рамках российских и международных научных программ грантами № 25.2003.2 президента РФ «Поддержка научных школ» и № 2.11.03 «Ведущие научно-образовательные коллективы», контрактом № 40.018.1.1.1314 «Биофотоника» с Министерством промышленности, науки и технологий РФ, грантом REC-006 Американского фонда гражданских исследований и развития независимых государств бывшего Советского Союза (CRDF) и Министерства образования РФ, грантами Королевского Общества на выполнение совместного проекта Крэнфилдского университета (Великобритания) и Саратовского государственного университета, грантами Национального фонда естественных наук КНР (NNSFC), грантом Федерального агентства по образованию РФ № 1.4.06, RNP.2.1.1.4473, грантами CRDF BRHE RUXO-006-SR-06 и RUB1-570-SA-04, а также компанией Palomar Medical Technologies Inc., MA, USA.

Я высоко ценю сотрудничество, вклад и поддержку со стороны всех моих коллег по кафедре оптики и биомедицинской физики физического факультета и Научно-образовательного института оптики и биофотоники Саратовского государственного университета и Института проблем точной механики и управления РАН, особенно А. Н. Башкатова, Е. И. Галанжа, Е. А. Гениной, Д. А. Зимнякова, И. Л. Максимовой, И. В. Меглинского, В. И. Кочубея, А. Б. Правдина, В. П. Рябухо, Г. В. Симоненко, Ю. П. Синичкина, С. С. Ульянова, И. В. Федосова и Д. А. Яковлева.

Я хочу поблагодарить своих многочисленных коллег и друзей по всему миру за сотрудничество и предоставленные материалы, которые были использованы в данной книге и значительно облегчили мою работу над ней, особенно П. Е. Андерсена, Дж. Ф. де Боера, Ж. Чена, П. М. В. Френча, Дж. Г. Фуджимото, В. М. Геликонова, П. Гупта, К. К. Хитценбергера, Дж. А. Айзатта, С. Л. Жака, А. Кишена, Ш. Дж. Киркпатрика, А. Кнюттеля, Дж. Р. Лаковица, К. В. Ларина, Х. В. Лукассена, Ш. Ло, Б. Р. Мастерса, К. Меека, Г. Мюллера, Ф. Ф. М. де Мюла, Л. Т. Перельмана, А. Подолеану, А. В. Приезжева, Ф. Рейла, Дж. Родригеса, Х. Шнекенбургера, А. М. Сергеева, А. Н. Серова, Н. М. Шахову, Б. Дж. Тромберга, Л. В. Ванга, Р. К. Ванга, А. Дж. Вэлша, А. Н. Ярославскую, И. В. Ярославского, П. В. Захарова, В. П. Жарова, Р. Мюллюля, С. А. Боппарта, М. Майнке, А. Махадеван-Янсен, Т. Трой, Л. Оливейра, М. Паис Клементе и К. Х. Ху.

Выражаю благодарность моей жене Наталии и все моей семье, особенно дочери Насте и внукам Даше, Жене и Степе, за их неоценимую поддержку, понимание и терпение при написании этой книги.

Валерий Тучин
Июнь 2007

ПРЕДИСЛОВИЕ К ПЕРЕВОДУ

Идея перевода на русский язык этой книги, которая с 2000 года была единственной в мире монографией с элементами учебного пособия по оптике биологических тканей, вынашивалась давно, но автор посчитал целесообразным осуществить перевод уже существенно переработанного и дополненного второго издания монографии, которое вышло в свет в 2007 году в издательстве SPIE Press.

Прежде всего, автор выражает глубокую благодарность Эрику Пепперу — директору SPIE Press, который безвозмездно передал права на переиздание книги на русском языке.

Подготовка перевода также была поддержана инновационной образовательной программой Саратовского государственного университета (ИОП СГУ) в рамках выполнения научно-образовательных программ Международного научно-образовательного центра «Фотоника» при СГУ.

Перевод книги выполнен моим другом и коллегой профессором Владимиром Леонардовичем Дербовым. Я глубоко благодарен ему за быстрый и качественный перевод и атмосферу плодотворного сотрудничества в процессе подготовки книги к изданию.

Редактирование перевода касалось в основном использования адекватной русскоязычной терминологии, исправления опечаток и стилистических погрешностей англоязычного издания, а также корректировки списка литературы, с целью его обновления и большей доступности российскому читателю. Поскольку с момента появления англоязычного издания прошло сравнительно много времени, во многие разделы монографии внесены необходимые дополнения по ряду актуальных проблем оптики биологических тканей. Кроме того, для удобства чтения изменена структура книги, материал представлен в виде 14 глав вместо 9, как это было в англоязычном издании. Существенно дополнены главы, относящиеся к оптической когерентной томографии, управлению оптическими свойствами биологических тканей, нелинейной спектроскопии и визуализации.

Со времени издания этой монографии появилось много других монографий, тематических выпусков журналов и трудов конференций по оптике биологических тканей и биофотонике, что отражает актуальность проблемы и интерес со стороны как расширяющегося рынка биомедицинской оптики, медицинских лазеров и световодов, оптических биосенсоров, быстродействующих цифровых камер и прочих устройств, предназначенных для новых оптических технологий медицинской диагностики и лечения, так и рынка услуг по подготовке квалифицированных кадров [6, 116, 118, 137, 145–210]. В этих книгах и журналах рассматриваются вопросы, близкие излагаемым в настоящей монографии, по ряду направлений они существенно ее дополняют и могут быть рекомендованы для более глубокого изучения отдельных тем.

Оригинальные материалы, вошедшие в монографию, были получены при финансовой поддержке многих грантов и научных программ, таких как гранты РФФИ и президента РФ «Поддержка научных школ» 00-15-96667, 25.2003.2, НШ-208.2008.2, НШ-1177.2012.2; программа «Ведущие научно-образовательные коллективы», гранты 2.11.03, 1.4.09 Министерства образования РФ; исследовательские и международные гранты РФФИ 98-02-17997, 03-02-17359, 05-08-50318-а,

06-02-16740-а, 08-02-92224-ГФЕН_а, 10-02-90039-Bel_а, 11-02-00560-а, 11-02-12248-офи-м, 12-02-92610-КО_а; ФНТП по приоритетным направлениям науки и технологий, контракт № 40.018.1.1.1314 Министерства промышленности, науки и технологий РФ; РНП «Развитие потенциала высшей школы» Федерального агентства по образованию РФ, 2.1.1.4473, 1.4.06, 2.1.1/4989, 2.2.1.1/2950; ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (контракты: 02.740.11.0484, 02.740.11.0770, 02.740.11.0879, 11.519.11.2035, 14.B37.21.0728, 14.B37.21.0563); CRDF REC-006; CRDF Next Step to the Market Program, RUB1-570-SA-04; CRDF BP1M06 RUX0-006-SR-06; CRDF RUB1-2932-SR-08; гранты Королевского общества (Великобритания), 2002–2006, 2012–2014; Европейский проект по программе FP-7, PHOTONICS4LIFE, Network of Excellence for Biophotonics, ICT-2007.3.5, № 224014; грант FiDiPro, TEKES, Finland (40111/11); SCOPES EC Project Swiss NSF (IZ74ZO_137423/1-2011-2014, Switzerland, Russia, and Uzbekistan).

Автор благодарен Российскому фонду фундаментальных исследований за финансовую поддержку издания монографии на русском языке.

Автор выражает глубокую благодарность Г.Б. Альтшулеру, Е.И. Галанжа, В.П. Жарову, К.В. Ларину, И.В. Меглинскому, А.В. Приезжеву, М.М. Назарову, А.П. Савицкому, А.Н. Шкуринову, И.В. Ярославскому, А.Н. Ярославской и всем своим коллегам по Саратовскому университету и Институту проблем точной механики и управления РАН, особенно Г.Г. Акчурину, А.Н. Башкатову, М.А. Виленскому, Э.А. Гениной, О.С. Жерновой, Д.А. Зимнякову, В.И. Кочубею, И.Л. Максимовой, А.Б. Правдину, В.П. Рябухо, Ю.П. Синичкину, Г.В. Симоненко, Ю.С. Скибиной, И.В. Федосову, Д.А. Яковлеву, а также многочисленным зарубежным коллегам, особенно Qingming Luo, Ricky Wang, Lihong Wang, Stoyan Tanev, Risto Myllylä за совместную работу, обсуждение результатов и ценные замечания.

Я благодарен моей жене Наталии и всей семье за исключительное терпение и понимание.

Монография предназначена научным работникам, преподавателям, аспирантам и студентам старших курсов, специализирующимся в области физики живых систем, биомедицинской оптики и биофотоники, лазерной биофизики и применения лазеров в биомедицине. Монография может быть полезна в качестве учебного пособия для студентов физических, технических, биологических и медицинских специальностей.

В. В. Тучин
Август 2012

Часть I

**ВВЕДЕНИЕ В ОПТИКУ
БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ**

Глава 1

ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ С МНОГОКРАТНЫМ РАССЕЯНИЕМ

Настоящая глава посвящена проблеме распространения света в сильно рассеивающих биологических средах, таких как кожа, молочная железа, мозг, стенки сосудов и пр. Рассматриваются принципы распространения света в среде с многократным рассеянием и соответствующие модели описания на основе теории переноса излучения и численного моделирования методом Монте-Карло (МК). Анализируется распространение непрерывного и пространственно-модулированного излучения, коротких импульсов и диффузных волн фотонной плотности в рассеивающих средах с поглощением, обсуждаются возможности соответствующих методов спектроскопии и томографии биологических тканей.

1.1. Распространение непрерывного светового излучения в биологических тканях

1.1.1. Рассеяние и поглощение. Биологические ткани являются оптически неоднородными поглощающими средами, средний показатель преломления которых выше, чем у воздуха. За счет этого часть падающего излучения отражается на границе между биотканью и воздухом (френелевское отражение), а оставшаяся часть проникает в глубь биоткани. Многократное рассеяние и поглощение отвечают за уширение лазерного пучка и его ослабление по мере распространения в биоткани, в то время как объемное рассеяние является основной причиной возникновения значительной диффузной составляющей излучения в обратном направлении. Распространение света в биоткани зависит от рассеивающих и поглощающих свойств ее компонентов: клеток, клеточных органелл и разнообразных волокнистых (фиброзных) структур [1–3, 6, 15, 129, 130, 134, 135, 138, 179, 196, 197, 199, 200]. Размеры, форма и плотность этих структур, их показатель преломления по отношению к окружающему веществу, поляризация падающего света — все это играет важную роль в распространении света через биоткани [1–3, 6, 15, 129, 130, 134, 135, 138, 179, 196, 197, 199, 200, 211–219].

Ввиду огромного разнообразия и структурной сложности биологических тканей разработка адекватных оптических моделей, учитывающих рассеяние и поглощение света, часто представляет собой наиболее сложную часть исследования. Для моделирования биотканей обычно используются два подхода. В первом из них биоткань моделируется средой со случайным непрерывным распределением оптических параметров в пространстве, а во втором биоткань рассматривается как дискретный ансамбль рассеивателей [1–3, 6, 15, 129, 130, 134, 138, 196, 197, 220–222]. Выбор подхода диктуется как структурной спецификой изучаемой биоткани, так и типом искомых характеристик светорассеяния.

Большинство биотканей состоит из структур, размеры которых изменяются в широком диапазоне от нанометров до микрометров, что можно описать как случайный континуум неоднородностей показателя преломления с переменным пространствен-

ным масштабом [220–222]. В частности, с помощью фазоконтрастной микроскопии было показано, что структура неоднородностей показателя преломления в биотканях млекопитающих во многих случаях аналогична структуре замороженной турбулентности [220]. Этот факт имеет фундаментальное значение для понимания особенностей распространения света в биоткани и может быть использован при решении обратной задачи реконструкции структуры биоткани. Данный подход применим к биотканям, у которых не имеется выраженных границ между неоднородностями. Процесс рассеяния в таких структурах при определенных условиях может быть описан с использованием модели случайного фазового экрана [75, 136, 221, 223].

Второй подход к моделированию биотканей состоит в их представлении системой дискретных рассеивающих частиц. В частности, эта модель успешно использовалась для описания угловой зависимости поляризационных характеристик света, рассеянного биотканями и кровью [150, 211, 212, 214, 216, 224]. Кровь является наиболее важным биологическим примером дисперсной системы, полностью соответствующей модели дискретных частиц [48, 101, 129, 150, 205, 225].

Биологические среды часто моделируются ансамблем однородных сферических частиц, поскольку многие клетки и микроорганизмы, в частности клетки крови, по форме близки к сферам или эллипсоидам. Система невзаимодействующих сферических частиц является простейшей моделью биоткани. Дифракция света на сферической частице строго описывается теорией Ми [214, 226]. Развитие этой модели включает учет структуры сферических частиц, а именно многослойные сферы и сферы с радиальной неоднородностью, анизотропией и оптической активностью [211, 212].

Соединительные биоткани состоят из волокнистых структур, поэтому для описания распространения света в них наиболее подходящей моделью является система длинных диэлектрических цилиндров. Мышечная ткань, дерма кожи, твердая мозговая оболочка (*dura mater*), роговица глаза и склера принадлежат к этому типу биотканей, образованному преимущественно коллагеновыми волокнами. Решение задачи дифракции света на одном однородном или многослойном цилиндре также хорошо известно [214].

Размеры клеток и структурных элементов биоткани и крови лежат в диапазоне от нескольких десятков нанометров до нескольких десятков микрометров [47, 58, 94–96, 129, 130, 135, 138, 179, 215–219, 227–270]. Клетки крови (эритроциты, лейкоциты и тромбоциты) имеют следующие параметры. Эритроцит в плазме крови в норме имеет форму вогнуто-вогнутого диска диаметром от 7,1 до 9,2 мкм, толщиной 0,9–1,2 мкм в центре и 1,7–2,4 мкм на периферии и объемом 90 мкм³. Лейкоциты по форме близки к сфере диаметром 8–22 мкм. Тромбоциты в потоке крови представляют собой двояковыпуклые дискообразные частицы диаметром от 2 до 4 мкм. В норме кровь содержит примерно в 10 раз больше эритроцитов, чем тромбоцитов, и примерно в 30 раз больше тромбоцитов, чем лейкоцитов.

Большинство других клеток млекопитающих имеют диаметры 5–75 мкм. В эпидермальном слое кожи клетки большие (со средней площадью сечения 80 мкм²) и весьма однородны по размеру. Жировые клетки, каждая из которых содержит капельку липидов, заполняющую почти всю клетку, что приводит к эксцентрическому расположению цитоплазмы и ядра, сильно различаются по диаметру, который может быть от нескольких микрометров до 50–75 мкм. При патологиях жировые клетки могут достигать в диаметре 100–200 мкм.

Внутри клеток имеются разнообразные структуры, определяющие рассеяние света биотканью (см. рис. 1.1). Ядра клеток имеют диаметр, 5–10 мкм, митохондрии ~ 1 мкм, лизосомы и пероксисомы, ~ 20 нм, а структуры внутри различных органелл могут иметь размер от нескольких сотен до единиц нанометров. Как правило, рассе-

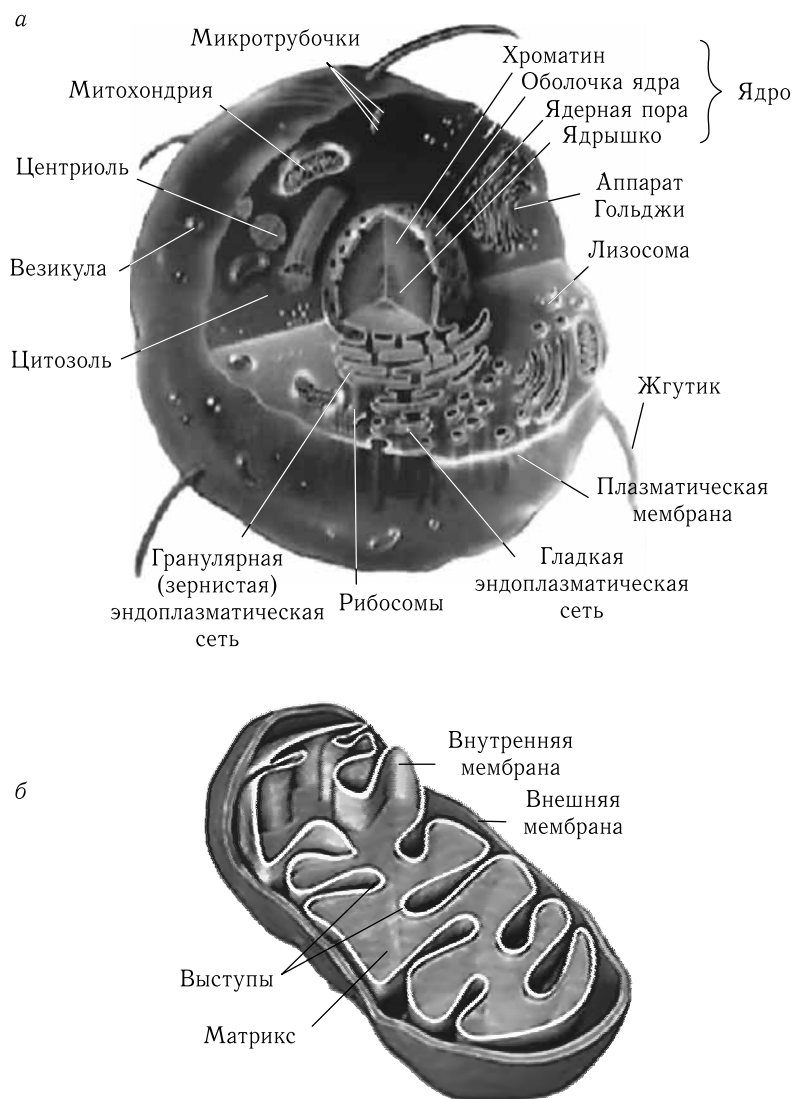


Рис. 1.1. Основные органеллы и включения клетки (а) [129]; структура митохондрии (б)

ивающие элементы внутри клеток не обладают сферической формой. Более типичной является модель вытянутых эллипсоидов с отношением осей от 2 до 10.

Полые органы тела выстланы тонким слоем эпителиальной ткани с выраженной клеточной структурой, который поддерживается нижележащим слоем относительно бесклеточной соединительной ткани. В здоровых биотканях эпителий часто состоит из одного хорошо организованного слоя клеток, у которых диаметр части, обращенной к поверхности, составляет 10–20 мкм, а высота 25 мкм (см. рис. 1.2). При дисплазии клетки эпителия пролиферируют, их ядра увеличиваются и выглядят темнее при окрашивании (гиперхроматичность) [216]. Увеличенные ядра являются главными индикаторами дисплазии, злокачественных новообразований и регенерации клеток в большинстве тканей человека.

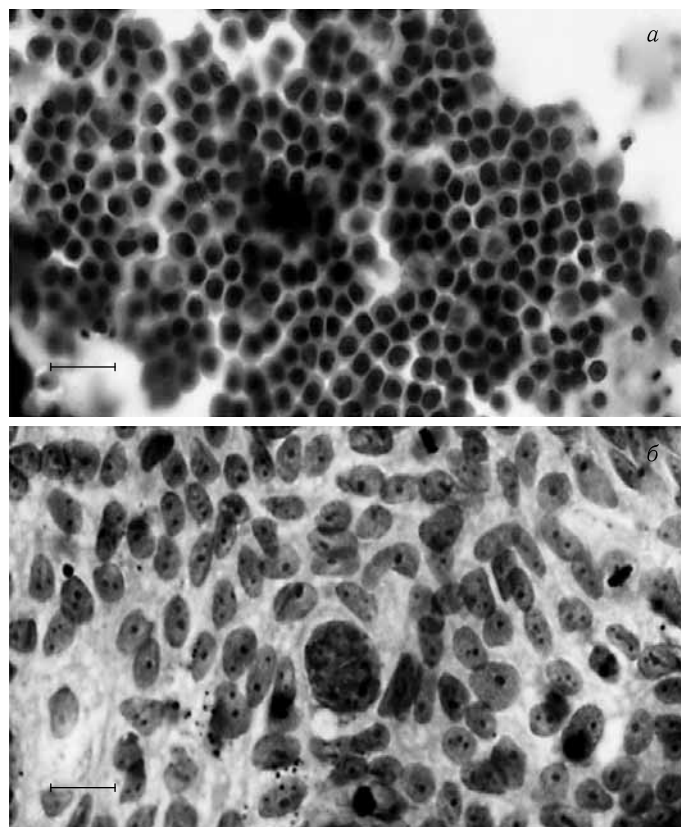


Рис. 1.2. Микрофотография изолированных нормальных клеток кишечного эпителия (а) и злокачественной кишечной клеточной линии Т84 (б). Обратите внимание на однородное распределение ядер по размеру в нормальных клетках эпителия (а) в отличие от злокачественной клеточной линии Т84, для которой при равном увеличении видны более крупные ядра с большим различием в размерах (б). На каждом снимке длина масштабного отрезка равна 20 мкм (из работы [187])

В волокнистых биотканях или биотканях, содержащих слои волокон (роговица, склера, твердая мозговая оболочка (*dura mater*), мышечная ткань, миокард, сухожилие, хрящ, стенка сосуда, слой нервных волокон сетчатки глаза и т. п.), которые состоят, в основном, из микрофибрилл и/или микротубул, типичный диаметр цилиндрических структурных элементов составляет 10–400 нм. Их длина может быть от 10–25 мкм до нескольких миллиметров.

Для артерии доминирующими в рассеянии могут быть волокна, клетки или субклеточные органеллы. Мышечные артерии имеют три основных слоя. Внутренний слой состоит из клеток эндотелия со средним диаметром менее 10 мкм. Средний слой состоит, главным образом, из плотно упакованных клеток гладкой мышцы со средним диаметром 15–20 мкм; в этом слое также содержится небольшое количество соединительной ткани, включающей эластин, коллагеновые и ретикулиновые волокна, и немного фибробластов. Наружный адвентициальный слой состоит из плотной фиброзной соединительной ткани, которая образована, главным образом, коллаген-

новыми волокнами диаметром 1–12 мкм и более тонкими эластиновыми волокнами диаметром 2–3 мкм.

Два других примера сложных рассеивающих структур — это миокард и слой нервных волокон сетчатки. Миокард состоит, в основном, из сердечной мышцы, образованной миофибриллами (мышечными волокнами диаметром около 1 мкм), которые, в свою очередь, состоят из цилиндрических миофиламентов (мышечных нитей диаметром 6–15 нм) и асферических митохондрий диаметром 1–2 мкм. Слой нервных волокон сетчатки содержит пучки немиелинизированных аксонов, которые проходят по поверхности сетчатки. Цилиндрические органеллы слоя нервных волокон сетчатки — это мембраны аксонов, микротрубулы, нервные волокна и митохондрии. Мембраны аксонов, как и все клеточные мембраны, представляют собой тонкие (6–10 нм) фосфолипидные двойные слои, которые образуют цилиндрические оболочки, заключающие в себе цитоплазму. Микротрубулы аксонов — длинные трубчатые полимеры белка тубулина с внешним диаметром ≈ 25 нм, внутренним диаметром ≈ 15 нм и длиной 10–25 мкм. Нейрофиламенты — стабильные белковые полимеры с диаметром ≈ 10 нм. Митохондрии — эллипсоидальные органеллы, которые состоят из матрикса, окруженного внутренней мембраной сложной формы с выступами внутрь, межмембранного пространства и внешней гладкой мембраны (рис. 1.1а). Мембраны состоят в основном из белков (70%) и фосфолипидов (20%). Митохондрии имеют толщину 0,1–0,2 мкм и длину 1–2 мкм.

Для некоторых биотканей распределение рассеивающих частиц по размерам может быть монодисперсным, а для других — напротив, весьма широким — полидисперсным. Примерами двух таких противоположных случаев являются прозрачная строма роговицы глаза, имеющая узкое монодисперсное распределение, и рассеивающая свет склера глаза, имеющая весьма широкое распределение коллагеновых волокон по диаметрам [129, 130]. Отсутствует универсальная функция распределения частиц по размерам, которая могла бы удовлетворительно описать структуру всех видов биотканей. В оптике дисперсных систем типичными являются гауссово-, гамма- и степенное распределение [237]. Полидисперсность случайно распределенных в пространстве рассеивателей может быть описана с помощью гамма-распределения или асимметричного логарифмического распределения их диаметров, сечений или объемов [61, 129, 220, 222, 231, 238]. В частности, для рассеивающих биотканей, таких как склера глаза, применимо гамма-распределение по радиусам частиц [61, 238].

Энергия поглощенного света превращается в тепло или испускается в виде флуоресценции, а также потребляется в фотобиохимических реакциях. Спектр поглощения зависит от типа доминирующих центров поглощения (пигментов) и содержания воды в биотканях (см. рис. 1.3–1.7). Абсолютные значения коэффициентов поглощения типичных биотканей лежат в интервале от 10^{-2} до 10^4 см $^{-1}$ [1–4, 6, 9–15, 28, 29, 31, 37–42, 56, 57, 72, 86–91]. В ультрафиолетовом (УФ) и инфракрасном (ИК) ($\lambda \geq 2000$ нм) диапазонах свет сильно поглощается, что влечет за собой невозможность излучения проникать глубоко в биоткань (только на один или два клеточных слоя) и поэтому малый вклад рассеяния в распространение света в биоткани. Видимый свет проникает в типичные биоткани на глубину 0,5–2,5 мм. В этом случае происходит как рассеяние, так и поглощение, причем 15–40% падающего излучения диффузно отражается. В диапазоне длин волн 600–1600 нм рассеяние преобладает над поглощением, и свет проникает на глубину до 8–10 мм. Одновременно интенсивность диффузно отраженного излучения возрастает до 35–70% от полной интенсивности падающего света (благодаря рассеянию назад).

Взаимодействие света с многослойной и многокомпонентной кожей — очень сложный процесс [57]. Роговой слой кожи (*stratum corneum*) отражает примерно

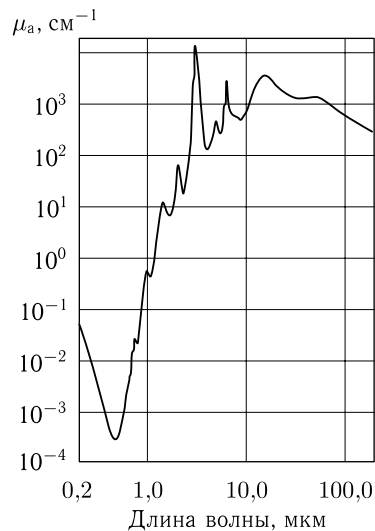
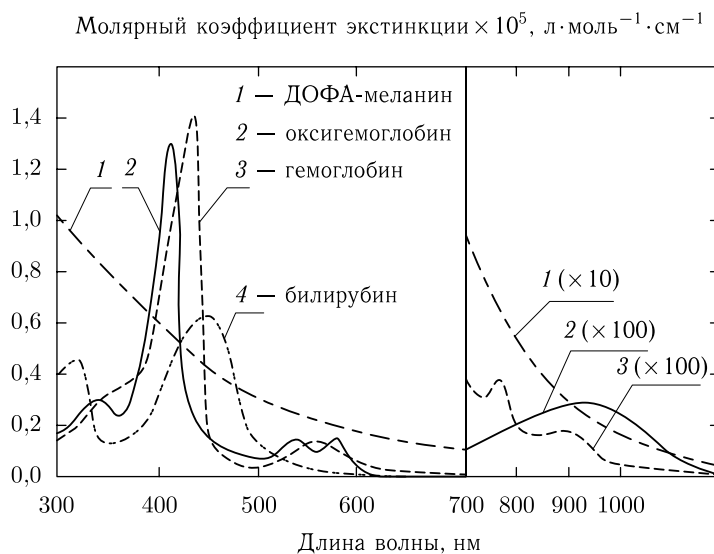


Рис. 1.3. Спектр поглощения воды [56]

Рис. 1.4. Спектры молярного ослабления для растворов основных пигментов кожи человека, поглощающих видимый свет: 1 — ДОФА (дигидроксифенилаланин)-меланин (H_2O); 2 — оксигемоглобин (H_2O); 3 — гемоглобин (H_2O); 4 — билирубин (CHCl_3) [57]

5–7% падающего света. Из-за микроскопических неоднородностей поверхности кожи падающий коллимированный пучок света превращается в частично диффузный уже на границе между воздухом и роговым слоем. Основная часть отраженного света обусловлена рассеянием назад в различных слоях кожи (роговой слой, эпидермис, дерма, кровь, подкожная жировая клетчатка). Поглощение диффузного света пигментами кожи является мерой содержания билирубина, концентрации гемоглобина и его насыщения кислородом, а также концентрации фармацевтических веществ

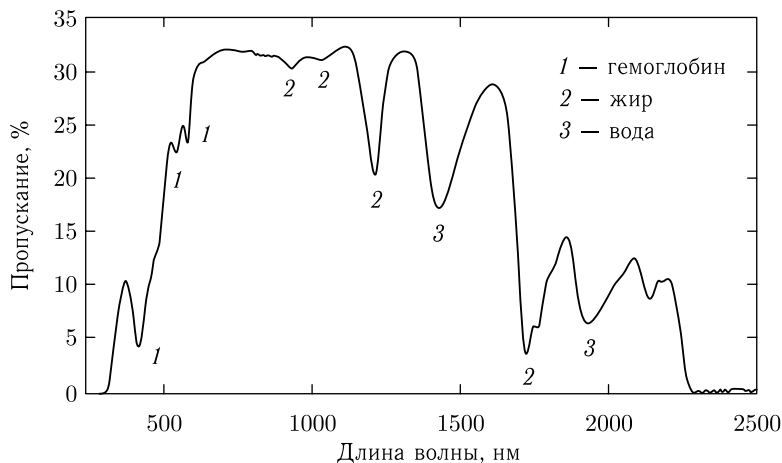


Рис. 1.5. Спектр пропускания 3-мм слоя биоткани молочной железы. Измерение на спектрометре с интегрирующей сферой. Отмечены вклады полос поглощения компонентов биоткани: 1 — гемоглобина; 2 — жира; 3 — воды [50]

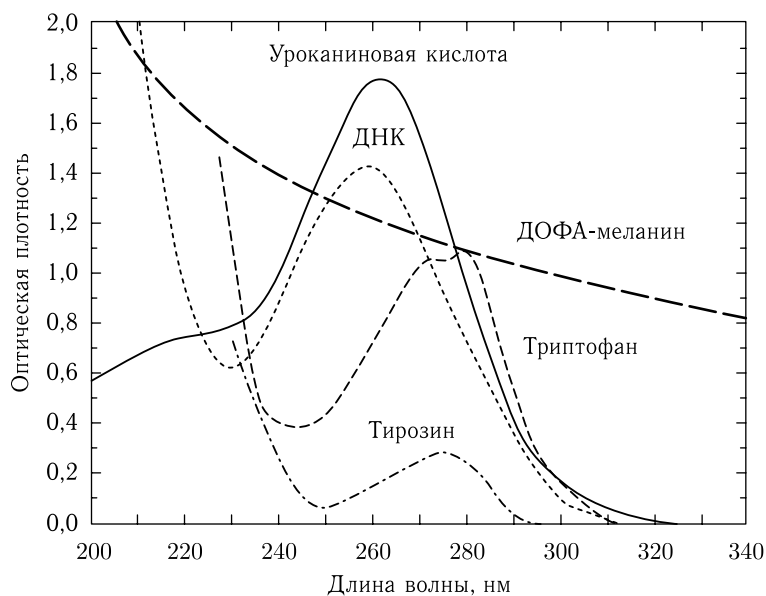


Рис. 1.6. Спектры УФ-поглощения основных хромофоров кожи человека: 1 — ДОФА-меланин, 1,5 мг % в H_2O ; 2 — уруканиновая кислота, 10^4 М в H_2O ; 3 — ДНК, тимус теленка, 10 мг % в H_2O (рН = 4,5); 4 — триптофан, $2 \cdot 10^4$ М (рН = 7); 5 — тирозин, $2 \cdot 10^4$ М (рН = 7) [57]

в крови и биотканях, что широко используется в диагностике различных заболеваний (см. рис. 1.4). Фототерапевтические и диагностические методы видимого и ближнего ИК-диапазона обладают существенными достоинствами, благодаря хорошей способности видимого и ближнего ИК-света проникать через кожу вглубь тела на длинах волн, соответствующих «терапевтическому» или «диагностическому окну» (600–1600 нм) (рис. 1.7).

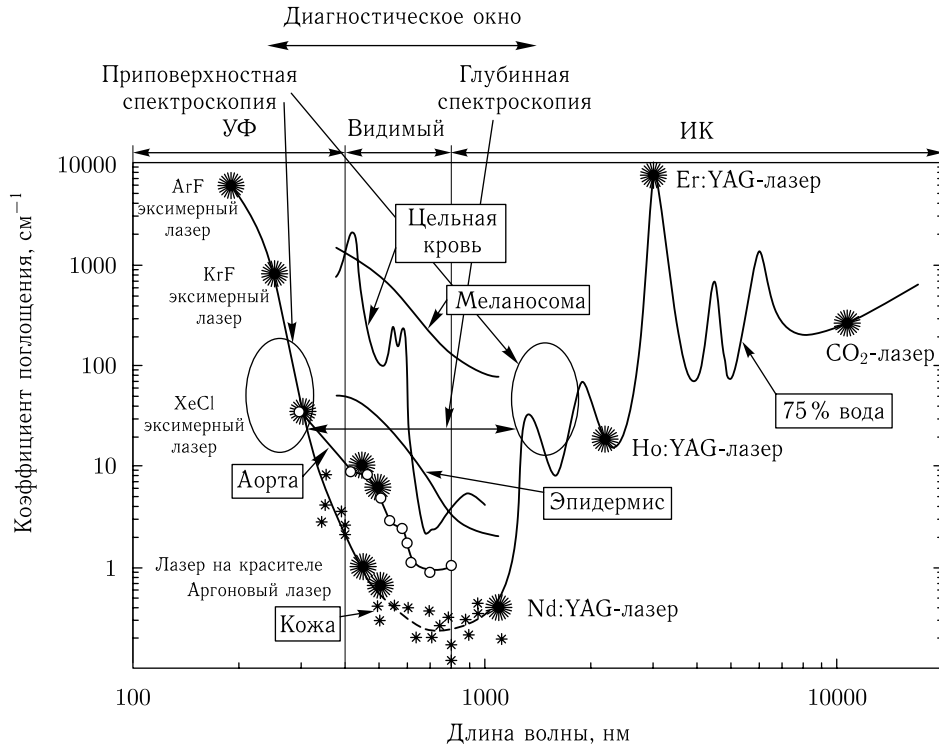


Рис. 1.7. Спектры поглощения кожи и аорты; представлены также спектры компонентов биоткани — воды (75%), эпидермиса, меланосом и цельной крови; показаны диагностические лазеры и их длины волн, а также «диагностическое/терапевтическое окно» и диапазоны длин волн, подходящие для спектроскопии приповерхностных и глуболежащих слоев (адаптировано из работы [36])

Другим примером гетерогенно многокомпонентной биоткани является молочная железа, которая, в основном, образована жировой и фиброзной тканями. Полосы поглощения гемоглобина, липидов и воды ясно видны в спектре, измеренном *in vitro* в слое ткани молочной железы толщиной 3 мм, как показано на рис. 1.5 [50]. Измерение производилось с помощью спектрометра с интегрирующей сферой. Между 700 и 1100 нм имеется широкое «оптическое окно», более узкие «окна прозрачности» — около 1300 и 1600 нм, где процент ослабления света наиболее низок.

Твердые биоткани, такие как ткани ребра и черепа, а также цельная кровь, тоже обладают высокой проницаемостью для видимого и ближнего ИК-света [1–4, 6, 9–16, 36, 91, 129, 130]. Относительно высокая прозрачность кожи для длинноволнового УФ-излучения (УФА) обусловлена спектрами поглощения ДНК, триптофана, тирозина, уроганиновой кислоты и меланина, что является основой для ряда методов фотохимиотерапии кожных заболеваний с применением УФА-облучения (см. рис. 1.4) [3, 6, 10, 57, 86, 129, 130].

Коллимированный (лазерный) пучок ослабляется в тонком слое биоткани толщиной d в соответствии с экспоненциальным законом Бугера–Ламберта–Бера [37],

$$I(d) = (1 - R_F)I_0 \exp(-\mu_t d), \quad (1.1)$$

где $I(d)$ — интенсивность прошедшего света, измеренная удаленным фотоприемником с малой апертурой (коллимированное пропускание), Вт/см²; R_F — коэффициент френелевского отражения при нормальном падении, $R_F = [(n - 1)/(n + 1)]^2$; n — относительный средний показатель преломления биоткани и окружающей среды; I_0 — интенсивность падающего света, Вт/см²;

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s \quad (1.2)$$

— коэффициент экстинкции (коэффициент взаимодействия или полный коэффициент ослабления), 1/см, где μ_a — коэффициент поглощения, 1/см, а μ_s — коэффициент рассеяния, 1/см. Строго говоря, закон, описываемый уравнением (1.1), верен только для сильно поглощающих сред, когда $\mu_a \gg \mu_s$, и отражает приближение однократного рассеяния.

Коэффициент экстинкции связан с сечением экстинкции σ_{ext} соотношением

$$\mu_t = \rho_s \sigma_{\text{ext}}, \quad (1.3)$$

где ρ_s — плотность числа частиц, составляющих биологические ткани и клетки. Для системы частиц с поглощением

$$\sigma_{\text{ext}} = \sigma_{\text{sca}} + \sigma_{\text{abs}} \quad (1.4)$$

и

$$\mu_s = \rho_s \sigma_{\text{sca}}, \quad \mu_a = \rho_s \sigma_{\text{abs}}. \quad (1.5)$$

Среднее сечение рассеяния на одну частицу можно представить в виде, удобном для экспериментальных оценок [214]:

$$\sigma_{\text{sca}} = \frac{\lambda^2}{2\pi} \frac{1}{I_0} \int_0^\pi I(\theta) \sin \theta d\theta, \quad (1.6)$$

где I_0 — интенсивность падающего света, $I(\theta)$ — угловое распределение света, рассеянного частицей, θ — угол рассеяния. Для макроскопически изотропных и однородных сред среднее сечение рассеяния не зависит от направления и поляризации падающего света. Средние сечения экстинкции, σ_{ext} , и поглощения, σ_{abs} , также не зависят от направления и состояния поляризации падающего света.

Вероятность «выживания» фотона, падающего на малый элемент объема, равна отношению сечений рассеяния и экстинкции и носит название альбеда для однократного рассеяния, Λ :

$$\Lambda = \frac{\sigma_{\text{sca}}}{\sigma_{\text{ext}}} = \frac{\mu_s}{\mu_t}. \quad (1.7)$$

Значение альбеда лежит в интервале от нуля для полностью поглощающей среды до единицы в случае полностью рассеивающей среды.

Средняя длина свободного пробега между двумя актами взаимодействия определяется как

$$l_{\text{ph}} = \mu_t^{-1}. \quad (1.8)$$

1.1.2. Теоретическое описание. Для анализа распространения света в условиях многократного рассеяния предполагается, что поглощающие и рассеивающие центры равномерно распределены по объему биоткани. УФА, видимое и ближнее ИК-излучение обычно претерпевают анизотропное рассеяние, характеризуемое выраженной направленностью распространения однократно рассеянных фотонов, которое определяется присутствием крупных клеточных органелл (митохондрий, лизосом и внутренних мембран (аппарат Гольджи)) [3, 58, 85, 95, 96, 129, 130, 135, 216–219].

Когда рассеивающая среда облучается неполяризованным светом и/или требуется определить только интенсивность многократно рассеянного света, сравнительно строгое математическое описание распространения немодулированного света в среде возможно в рамках скалярной стационарной теории переноса излучения (ТПИ) [1, 3, 6, 12–16, 129, 130, 135, 136, 196, 197, 211, 212, 273–289]. Эта теория пригодна для описания ансамбля достаточно удаленных друг от друга рассеивающих частиц и успешно используется в оптике биотканей. Стационарное уравнение ТПИ для монохроматического света имеет вид [1]

$$\frac{\partial I(\mathbf{r}, \hat{s})}{\partial s} = -\mu_t I(\mathbf{r}, \hat{s}) + \mu_s \int_{4\pi} I(\mathbf{r}, \hat{s}') p(\hat{s}, \hat{s}') d\Omega', \quad (1.9)$$

где $I(\mathbf{r}, \hat{s})$ — энергетическая яркость (или лучевая интенсивность), т. е. средняя плотность потока мощности в точке \mathbf{r} в данном направлении \hat{s} (Вт/см² ср); $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ — коэффициент экстинкции (1.2); $p(\hat{s}, \hat{s}')$ — фазовая функция рассеяния, 1/ср; а $d\Omega'$ — элемент телесного угла в направлении \hat{s}' , ср. Предполагается, что внутри среды отсутствуют источники излучения. При наличии источника в среде в правую часть необходимо добавить член $S(\mathbf{r}, \hat{s})$, характеризующий функцию источника, или учесть его при записи граничных условий.

Скалярное приближение для уравнения переноса излучения дает недостаточную точность, когда размер рассеивающих частиц намного меньше длины волны, но обеспечивает приемлемые результаты для частиц, сравнимых или больших по размеру, чем длина волны [212, 276]. Имеется обширная литература по аналитическим и численным решениям скалярного уравнения переноса излучения [1, 3, 15, 129, 130, 196, 197, 276–289].

Если перенос излучения исследуется в области $G \in R^3$ и ∂G — граница области, то граничные условия на ∂G могут быть записаны в следующей общей форме:

$$I(\mathbf{r}, \hat{s})|_{(\hat{s} \cdot \hat{n}) < 0} = (1/\mu_t)S(\mathbf{r}, \hat{s}) + \hat{R}I(\mathbf{r}, \hat{s})|_{(\hat{s} \cdot \hat{n}) > 0}, \quad (1.10)$$

где $\mathbf{r} \in \partial G$, \hat{n} — вектор внешней нормали к ∂G , $S(\mathbf{r}, \hat{s})$ — распределение падающего света на ∂G , а \hat{R} — оператор отражения.

Величина $S(\mathbf{r}, \hat{s})$ характеризует наличие источника излучения в самой среде или излучение, приходящее извне, например лазерный пучок, падающий на поверхность среды; источником может быть и флуоресценция, возбуждаемая внешним источником внутри среды. Когда в области G имеются отражающие и поглощающие поверхности, условия, аналогичные соотношению (1.10), должны быть заданы на каждой из них.

Для практических целей интегралы от функции $I(\mathbf{r}, \hat{s})$ по некоторым областям фазового пространства (\mathbf{r}, \hat{s}) часто более важны, чем сама функция. В частности, оптические зонды для исследования биотканей часто измеряют функцию распределения выходящего света на поверхности среды, которая характеризуется плотностью потока излучения или энергетической освещенностью (Вт/см²):

$$F(\mathbf{r}) = \int_{(\hat{s} \cdot \hat{n}) > 0} I(\mathbf{r}, \hat{s})(\hat{s} \cdot \hat{n}) d\Omega, \quad (1.11)$$

где $\mathbf{r} \in \partial G$.

В задачах дозиметрии оптического излучения измеряемой величиной фактически является полная освещенность $U(\mathbf{r})$. Она представляет собой сумму лучевых интенсивностей по всем телесным углам в точке \mathbf{r} и измеряется в ваттах на квадратный

сантиметр:

$$U(\mathbf{r}) = \int_{4\pi} I(\mathbf{r}, \hat{s}) d\Omega. \quad (1.12)$$

Фазовая функция $p(\hat{s}, \hat{s}')$ описывает рассеивающие свойства среды и фактически является функцией плотности вероятности рассеяния в направлении \hat{s}' для фотона, распространяющегося в направлении \hat{s} ; другими словами, она характеризует элементарный акт рассеяния. Если рассеяние симметрично относительно направления падающей волны, то фазовая функция зависит только от угла рассеяния θ (угол между направлениями \hat{s} и \hat{s}'), т. е.

$$p(\hat{s}, \hat{s}') = p(\theta). \quad (1.13)$$

Предположение о случайном распределении рассеивающих частиц в среде (т. е. об отсутствии пространственной корреляции в структуре биоткани) приводит к нормировке:

$$\int_0^\pi p(\theta) 2\pi \sin \theta d\theta = 1. \quad (1.14)$$

На практике фазовая функция обычно хорошо аппроксимируется с помощью феноменологической функции Хеньи–Гринштейна [1, 3, 12–16, 70, 129, 130, 230]:

$$p(\theta) = \frac{1}{4\pi} \cdot \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g \cos \theta)^{3/2}}, \quad (1.15)$$

где g — параметр анизотропии рассеяния (средний косинус угла рассеяния θ):

$$g \equiv \langle \cos \theta \rangle = \int_0^\pi p(\theta) \cos \theta \cdot 2\pi \sin \theta d\theta. \quad (1.16)$$

Значение g меняется в диапазоне от -1 до 1 [211, 212]: $g = 0$ соответствует изотропному (рэлеевскому) рассеянию, $g = 1$ — полному рассеянию вперед (рассеянию Ми на больших частицах), а $g = -1$ — полному рассеянию назад.

Интегродифференциальное уравнение (1.9) не имеет аналитического решения, поэтому при анализе распространения света в рассеивающих средах оно часто упрощается путем представления решения в виде сферических гармоник. Такое упрощение приводит к системе $(N + 1)^2$ связанных дифференциальных уравнений в частных производных, известное как P_N -приближение. Эта система сводится к одному дифференциальному уравнению порядка $(N + 1)$. Например, четыре связанных дифференциальных уравнения, сводящихся к одному уравнению диффузионного типа, необходимы для $N = 1$ [283–289]. Это уравнение для изотропной среды имеет следующий вид [196, 298]:

$$(\nabla^2 - \mu_{\text{eff}}^2) U(\mathbf{r}) = -Q(\mathbf{r}), \quad (1.17)$$

где

$$\mu_{\text{eff}} = \sqrt{3\mu_a (\mu_a + \mu'_s)} \quad (1.18)$$

— эффективный коэффициент ослабления, или обратная длина диффузии фотона, $\mu_{\text{eff}} = 1/l_d$, $1/\text{см}$;

$$Q(\mathbf{r}) = \frac{1}{D} S_d(\mathbf{r}). \quad (1.19)$$

Здесь

$$D = \frac{1}{3(\mu'_s + \mu_a)} \quad (1.20)$$

— коэффициент диффузии фотонов, см; для получения размерности $\text{см}^2/\text{с}$ коэффициент D необходимо умножить на скорость света в среде c , $\text{см}/\text{с}$;

$$\mu'_s = (1 - g)\mu_s \quad (1.21)$$

— приведенный (транспортный) коэффициент рассеяния, $1/\text{см}$; $S_d(\mathbf{r})$ — функция источника диффузного излучения (т. е. число фотонов, инжектируемых в единичный объем); для изотропного излучения функция источника $S(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}})$ не зависит от направления $\hat{\mathbf{s}}$:

$$S(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}) = \frac{1}{4\pi} S_d(\mathbf{r}). \quad (1.22)$$

Важно отметить, что коллимированный источник в сильно рассеивающей среде эффективно преобразуется в изотропный излучатель [196].

Транспортная длина свободного пробега фотона (см) определяется как

$$l_{tr} = \frac{1}{\mu_{tr}} = \frac{1}{\mu_a + \mu'_s}, \quad (1.23)$$

где $\mu_{tr} = \mu_a + \mu'_s$ — коэффициент переноса излучения.

Следует отметить, что транспортная длина свободного пробега фотона в среде с анизотропным однократным рассеянием существенно превосходит длину свободного пробега фотона $l_{tr} \gg l_{ph}$ (см. уравнение (1.8)). Транспортная длина свободного пробега l_{tr} представляет собой расстояние, на котором фотон полностью теряет свое первоначальное направление. На рис. 1.8 схематически показана случайная миграция фотона в многократно рассеивающей среде, а также проиллюстрировано определение длины свободного пробега фотона l_{ph} и транспортной длины свободного пробега l_{tr} .

Диффузионная теория обеспечивает хорошее приближение в случае малого фактора анизотропии рассеяния $g \leq 0,1$ и высокого альбедо $\Lambda \rightarrow 1$. Для многих биотканей $g \approx 0,6-0,9$ и может достигать $0,990-0,999$, например для крови [48, 49, 87, 129]. Это существенно ограничивает применимость диффузионного приближения. Показано, что диффузионное приближение можно использовать при $g < 0,9$, вплоть до оптических толщин объекта τ порядка 10–20:

$$\tau = \int_0^d \mu_t ds, \quad (1.24)$$

где d — глубина проникновения света в биоткань (толщина слоя) в направлении s .

Однако диффузионное приближение неприменимо для пучка вблизи входа в среду, где преобладает однократное или малократное рассеяние. Когда узкий пучок света нормально падает на полубесконечную рассеивающую среду с анизотропным рассеянием, его можно рассматривать уже как изотропный точечный источник на глубине одной транспортной средней длины свободного пробега l_{tr} (см. соотношение (1.23)) от поверхности среды. Сила этого точечного источника равна силе исходного источника, умноженной на транспортное альбедо [285]

$$\Lambda' = \frac{\mu'_s}{\mu_a + \mu'_s}. \quad (1.25)$$

Исследования подтверждают, что диффузионная теория достаточно точно описывает миграцию фотонов в бесконечных однородных рассеивающих средах [34, 46, 51, 93, 129, 196, 198, 283, 290–298]. Однако альтернативная процедура вывода

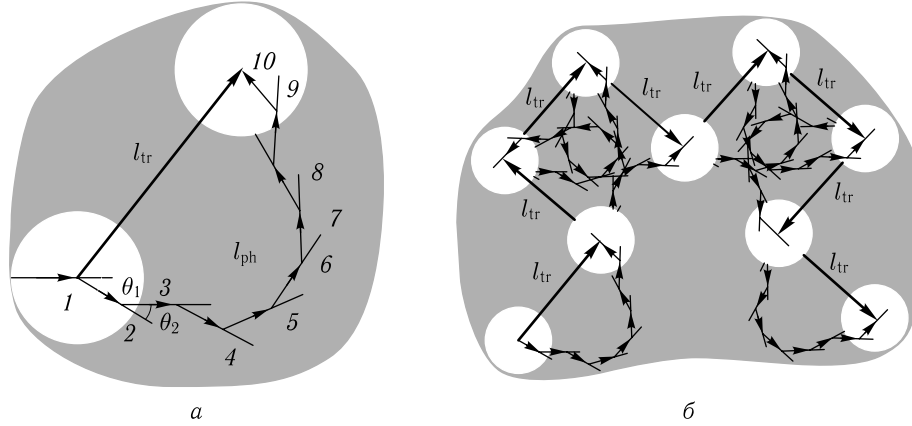


Рис. 1.8. Многократное рассеяние: *а* — определение транспортной длины свободного пробега фотона, $l_{tr} = 1/(\mu_a + \mu'_s) \approx 1/\mu'_s$ ($\mu'_s \gg \mu_a$), показан средний путь миграции (траектории) фотона при его взаимодействии (столкновении) с рассеивающими частицами (показаны только первая и последняя частицы в виде светлых кружков, маленькие стрелки показывают путь миграции фотона, большая стрелка — показывает результирующее направление транспорта фотона в результате многократного рассеяния); для выбранного значения параметра анизотропии рассеяния, типичного для многих биотканей, $g \equiv \langle \cos \theta \rangle = 0,90$, средняя длина свободного пробега фотона $l_{ph} = 1/(\mu_a + \mu_s) \approx 1/\mu_s$ ($\mu_s \gg \mu_a$) примерно в 10 раз короче, чем транспортная длина, так как $\mu'_s \equiv \mu_s(1 - g) = 0,10\mu_s$; при этом на каждом акте взаимодействия направление движения фотона изменяется на средний угол, $\langle \theta \rangle \approx \theta_1 \approx \theta_2 \approx \dots \approx \theta_{10} \approx 26^\circ$; *б* — иллюстрация случайной миграции фотона на большем числе рассеивателей (показаны только каждый первый и каждый десятый рассеиватели) с шагом l_{tr} ; для сильно анизотропной фазовой функции рассеяния ($g \rightarrow 1$) необходимо большее количество элементарных актов рассеяния, чтобы преобразовать заданное распределение зондирующих фотонов в изотропное распределение; <http://omlc.ogi.edu/classroom/ece532/class3/musp.html>

диффузионного уравнения, описанная в работах [34, 51, 283], хотя и приводит к основному уравнению (1.20), но дает более общее выражение для коэффициента диффузии фотонов:

$$D = \frac{1}{3(\mu'_s + \bar{a}\mu_a)}, \quad (1.26)$$

где \bar{a} — численный коэффициент, зависящий от вида диффузионного уравнения (от фактора анизотропии рассеяния).

Другие приближения в рамках диффузионной теории приводят к значениям $\bar{a} = 0, 1/5, 1/3, 1$ [34, 51, 283]. Любое из этих значений \bar{a} дает существенно лучшее согласие с результатами моделирования методом случайных блужданий, чем диффузионное уравнение при $\bar{a} = 0$, причем при $\bar{a} = 1/3$ это согласие несколько лучше, чем при двух других значениях [283]. Поскольку значения $\bar{a} = 1/5$ и $\bar{a} = 1$ приводят к неправильной оценке величины скорости распространения фронта импульса и только при промежуточном значении $\bar{a} = 1/3$ скорость получается правильной, коэффициент диффузии фотонов следует выбирать в виде [283]

$$D \approx \frac{1}{3\mu'_s + \mu_a}. \quad (1.27)$$

Это выражение в общем случае дает лучшее согласие между диффузионным уравнением и уравнением переноса излучения, однако на практике оно полезно

только для сравнительно сильно поглощающих биотканей или их компонентов, когда $\mu_a/\mu'_s > 0,01$ [291].

Для успешного использования диффузионной теории необходимо обеспечить условия преобразования направленного светового пучка, например от лазера, в изотропные источники фотонов, расположенные в среде на достаточной глубине, сравнимой с транспортной длиной миграции фотона, l_{tr} ; при этом коэффициент поглощения μ_a должен быть много меньше приведенного коэффициента рассеяния μ'_s [196, 290].

В случае однородной биоткани при условии, что $\mu'_s \gg \mu_a$, миграция фотонов, инжектируемых в ткань от непрерывного источника, хорошо описывается с помощью диффузионной модели, для которой полная освещенность $U(r)$ затухает экспоненциально с удалением от точечного источника [275, 299]:

$$U(r) = \frac{P}{4\pi Dr} \exp(-\mu_{\text{eff}} r), \quad (1.28)$$

где r — расстояние от источника; P — мощность источника, Вт; остальные параметры введены ранее.

При получении изображения однородной биоткани с находящимся внутри источником излучения (например, за счет возбужденной флуоресценции от эндогенных или экзогенных флуорофоров внутри ткани) освещенность, наблюдаемая на поверхности биоткани, может быть рассчитана с использованием (1.9) или (1.17) и (1.28) при соответствующих граничных условиях (см. рис. 1.9). Благодаря простоте и хорошей апробации как с помощью численных методов, так и экспериментально, часто используются граничные условия с экстраполяцией [296, 299]. Как показано на рис. 1.9, источник в области изображений формируется относительно плоскости, лежащей на расстоянии

$$z_b = 2D \frac{1 + R_{\text{eff}}}{1 - R_{\text{eff}}}, \quad (1.29)$$

от поверхности биоткани (граница экстраполяции). Здесь R_{eff} — эффективный коэффициент отражения, усредненный по всем углам падения на границу, который может быть найден путем интегрирования френелевских коэффициентов отражения по всем углам падения [296]; D — коэффициент диффузии (см. (1.20)). На границе экстраполяции вклады потоков фотонов от источника и его изображения складываются, в результате

$$U(z=0) = \frac{P}{4\pi D} \left[\frac{1}{r_1} e^{-\mu_{\text{eff}} r_1} - \frac{1}{r_2} e^{-\mu_{\text{eff}} r_2} \right]. \quad (1.30)$$

Лучевая интенсивность $I(\mathbf{r}, \hat{s})$ в биоткани в направлении единичного вектора \hat{s} дается выражением [296]

$$I(\mathbf{r}, \hat{s}) = \frac{1}{4\pi} [U(\mathbf{r}) - 3D(\nabla U(\mathbf{r})) \cdot \hat{s}]. \quad (1.31)$$

Используя выражение (1.30) и производную от него по нормали, $\partial U/\partial z_{z=0}$, из (1.31) рассчитывается интенсивность на поверхности биоткани [299]:

$$I_{z=0} = \frac{1}{4\pi} \left(\frac{P}{4\pi D} \right) \left\{ \frac{1}{r_1} e^{-\mu_{\text{eff}} r_1} - \frac{1}{r_2} e^{-\mu_{\text{eff}} r_2} + 3D \left[\frac{d}{r_1^2} \left(\mu_{\text{eff}} + \frac{1}{r_1} \right) e^{-\mu_{\text{eff}} r_1} + \frac{d + 2z_b}{r_2^2} \left(\mu_{\text{eff}} + \frac{1}{r_2} \right) e^{-\mu_{\text{eff}} r_2} \right] \right\}, \quad (1.32)$$

где $r_1 = \sqrt{\rho^2 + d^2}$, $r_2 = \sqrt{\rho^2 + (d + 2z_b)^2}$, а d — расстояние от поверхности до источника в глубине ткани (см. рис. 1.9).

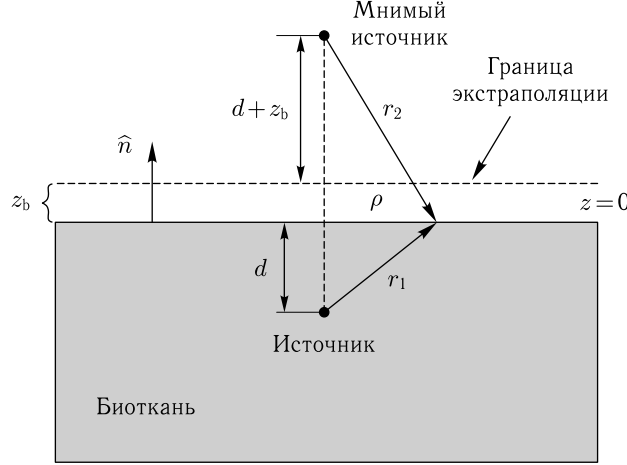


Рис. 1.9. Оптическая система, сфокусированная на поверхность биоткани, формирует изображение за счет сбора диффузного (рассеянного) света, излучаемого реальным или виртуальным источником света внутри биоткани; геометрия в диффузионной модели с границей экстраполяции, граница экстраполяции отстоит от поверхности ткани $z = 0$ на расстояние z_b [299]

Измерение диффузно отраженного света часто используется для получения сведений об оптических свойствах среды с целью спектроскопической диагностики и визуализации ткани. Для обеспечения таких измерений необходимо разработать адекватный вычислительный алгоритм. Одной из основ для такого алгоритма является решение диффузионного уравнения с граничными условиями на поверхностях раздела [46, 93, 296–298]. Как мы уже видели, эти граничные условия выводятся из формул Френеля для отражения и баланса между потоками фотонов падающего излучения и фотонов, пересекающих границу раздела. При условии, что источник моделируется как точечный излучатель на глубине, равной транспортной длине свободного пробега, l_{tr} , и при использовании экстраполированной границы для удовлетворения граничных условий пространственно зависящая отражательная способность на один падающий фотон, $R(r_{sd})$, выражается как [297, 298]:

$$R(r_{sd}) = \frac{F_U}{4\pi} \left\{ l_{tr} \left(\mu_{eff} + \frac{1}{r_1} \right) \frac{\exp(-\mu_{eff} r_1)}{r_1^2} + (l_{tr} + 2z_b) \left(\mu_{eff} + \frac{1}{r_2} \right) \frac{\exp(-\mu_{eff} r_2)}{r_2^2} \right\} + \frac{F_F}{4\pi D} \left\{ \frac{\exp(-\mu_{eff} r_1)}{r_1} - \frac{\exp(-\mu_{eff} r_2)}{r_2} \right\}, \quad (1.33)$$

где r_{sd} — расстояние между источником света и приемником на поверхности биоткани, см; $r_1 = \sqrt{l_{tr}^2 + r_{sd}^2}$; $r_2 = \sqrt{(l_{tr} + 2z_b)^2 + r_{sd}^2}$; D — коэффициент диффузии (1.20); z_b — расстояние до экстраполированной границы (1.29); параметры F_U и F_F представляют собой доли плотности потока излучения и потока, покидающего биоткань через границу поверхности. Эти значения получаются интегрированием энергетической яркости по задней полусфере [297] и зависят от величины скачка показателя преломления на границе. Для фантома биоткани (полистирол) значения F_U и F_F

равны соответственно 0,089 и 0,239 для фантома в воздухе, или 0,169 и 0,406 для фантома в воде [298].

Некоторые ограничения диффузионной теории, в частности связанные с неудовлетворительным описанием плотности потока источника, можно преодолеть путем ее модификации на основе точного, но сравнительно простого уравнения Грождана (Grosjean's equation), которое описывает распределение света в бесконечной изотропно рассеивающей среде [293]. Диффузионное приближение при решении уравнения переноса излучения в рассеивающей среде с пространственно меняющимся показателем преломления получено в работе [295].

Перейдем к краткому обзору других решений уравнения переноса. Решение первого порядка реализуется для оптически тонких и слабо рассеивающих сред ($\tau < 1$, $\Lambda < 0,5$), когда интенсивность проходящей (когерентной) волны описывается уравнением (1.1) или аналогичным выражением [284]:

$$I(s) = (1 - R_F) I_0 \exp(-\tau), \quad (1.34)$$

где интенсивность падающего света I_0 (Вт/см²) определяется плотностью потока падающего излучения или энергетической освещенностью (см. уравнение (1.11)) F_0 и зависящей от телесного угла дельта-функцией, указывающей направление $\hat{\Omega}$: $I_0 = F_0 \delta(\hat{\Omega} - \hat{\Omega}_0)$.

Для узкого пучка (например, лазера) это приближение можно применять к оптически более плотным биотканям ($\tau > 1$, $\Lambda < 0,9$). Однако некоторые биоткани имеют $\Lambda \approx 1$ в «терапевтическом/диагностическом окне» длин волн, что делает приближение первого порядка неприменимым даже при $\tau \ll 1$.

Более строгое решение уравнения переноса дает метод дискретных ординат (многопоточковая теория), в котором уравнение (1.9) преобразуется в матричное дифференциальное уравнение для освещенности вдоль множества дискретных направлений (углов) [275]. Качество аппроксимации точного решения растет с увеличением числа этих углов. Выше было показано, что плотность потока энергии можно разложить по сферическим гармоникам, что позволяет разделить уравнение переноса на отдельные уравнения для каждой гармоники. Этот подход также приводит к точному решению при условии, что число сферических гармоник достаточно велико. Например, при исследовании биотканей использовалось до 150 сферических гармоник [300], и получающиеся уравнения решались методом конечных разностей [301]. Однако этот подход требует больших затрат времени для получения решения с достаточной точностью. Более того, он почти не пригоден для дельтаобразных фазовых функций рассеяния [284].

РЗ-приближение представляет собой приближенное решение уравнения переноса излучения (см. (1.9)), при котором энергетическая яркость выражается алгебраически в виде ряда из полиномов Лежандра. Стар был первым, кто воспользовался возросшими возможностями компьютеров для сравнения РЗ-приближения с расчетом по методу Монте-Карло в плоской геометрии [302, 303]. Дальнейшее развитие РЗ-приближения для сферической геометрии, более близкой к практике исследования биотканей, описано в работе [304].

В оптике биотканей интенсивно используются более простые методы решения уравнений переноса, такие как двухпоточковая теория Кубелки–Мунка [305] или трех-, четырех- и семипоточковые модели [56, 275, 284]. Такие представления естественны и весьма плодотворны для лазерного зондирования биотканей. В частности, четырехпоточковая модель [306] в действительности представляет собой два встречных диффузных потока (модель Кубелки–Мунка) и два коллимированных лазерных

пучка, падающий и отраженный от задней границы образца. Семипотоковая модель — простейшее трехмерное представление рассеянного излучения и падающего лазерного пучка в полубесконечной среде [56]. Конечно, простота и возможность быстрого вычисления дозы излучения или быстрого определения оптических параметров биоткани (решения обратной задачи рассеяния) достигаются за счет потери точности.

1.1.3. Моделирование методом Монте-Карло. Развитие новых методов решения прямой и обратной задач переноса излучения в средах с произвольной конфигурацией и граничными условиями является решающим для надежных послойных измерений параметров лазерного излучения внутри биотканей, необходимых для таких практических целей, как диффузная оптическая томография и спектроскопия биологических объектов. Метод Монте-Карло (МК) оказался в этом смысле наиболее перспективным и широко применяется для численного решения уравнения переноса излучения в различных областях знания (астрофизика, оптика атмосферы и океана и т. п.) [307, 308]. В последнее время он нашел применение и в оптике биотканей [1–3, 12–16, 29, 33, 41, 48, 129, 135, 196, 197, 290, 306, 309–373]. Метод основан на численном моделировании движения фотона в рассеивающей среде. Случайные блуждания фотона внутри образца отслеживаются до момента его поглощения или выхода из среды. Известные алгоритмы позволяют описать несколько слоев биоткани с различными оптическими свойствами, а также конечный размер падающего пучка и отражение света на границах раздела. Типичные примеры многослойных сред — кожа, стенки сосудов, мочевого пузыря и матки.

При своей высокой точности и универсальности метод МК имеет один главный недостаток — он требует очень большого компьютерного времени для отслеживания большого числа фотонов, необходимого для достижения приемлемой дисперсии, что связано со статистической природой моделирования. Моделирование методом МК требует особенно больших затрат машинного времени, когда коэффициент поглощения много меньше коэффициента рассеяния среды, в которой фотон может блуждать очень долго, пока не будет поглощен.

В зависимости от поставленной задачи метод МК используется для расчета диффузного отражения или пропускания либо на одной длине волны, либо по всему спектру; могут быть смоделированы и другие оптические характеристики при различных геометриях эксперимента [1–3, 12–16, 29, 33, 41, 48, 129, 135, 196, 197, 290, 306, 309–373]. В задаче о распространении узкого направленного пучка фотонный пакет с начальным «весом» единица запускается перпендикулярно к поверхности биоткани вдоль направления светового пучка, а в задаче об изотропном источнике света, погруженном в толщу биоткани, фотонный пакет запускается изотропно. Возможны и другие варианты геометрии, например ввод фотонов в биоткань под некоторым углом к поверхности. После определения геометрии случайным образом выбирается величина шага моделирования при помощи выражения [290]

$$l = \frac{-\ln(\xi)}{\mu_a + \mu_s}, \quad (1.35)$$

где ξ — случайное число, равномерно распределенное в интервале от 0 до 1 ($0 < \xi \leq 1$). Поглощение в среде учитывается потерей «веса» фотона в конце каждого шага. Величина потери «веса» фотона равна его «весу» в начале шага, умноженному на $(1 - \Lambda)$, где Λ — альбеда (см. уравнение (1.7)). Фотон с оставшимся «весом» снова испытывает рассеяние. Новое направление фотона рассчитывается статистически, исходя из фазовой функции рассеяния (см. выражение (1.13)), которую в соответствии с фактором анизотропии рассеяния можно выбрать в виде феноменологической функции Хеньи–Гринштейна (см. выражение (1.15)). Затем с помощью уравнения (1.35)

генерируется новый шаг, и процесс повторяется. Когда фотон пытается покинуть среду, вероятность внутреннего отражения рассчитывается с помощью формул Френеля [296, 327]. Когда «вес» фотона становится меньше заданного порога (обычно 10^{-4}), используется процедура «русской рулетки», с помощью которой определяется, исчезнет ли фотон или будет продолжать мигрировать с увеличенным «весом». Если фотон пересекает границу с внешней средой, его «вес» вносит вклад в диффузное отражение или пропускание. Если происходит отражение, то фотонный пакет отражается в среду на соответствующую глубину и его миграция продолжается. В противном случае миграция данного фотона прекращается и в среду запускается новый фотон в точке, где находится источник. Для получения статистически значимых результатов требуется большое число фотонов, как правило, составляющее 1–100 млн. Например, программа трехмерного моделирования методом МК, разработанная для описания миграции фотонов в сложных неоднородных средах, позволяет с использованием 10^8 распространяющихся фотонов в течение 5–10 ч компьютерного моделирования на компьютере с тактовой частотой 1 ГГц достичь отношения сигнал-шум более 100, вплоть до расстояний между источником и приемником порядка 30 мм при площади приемника 1 мм^2 [342].

Хотя прогресс компьютерной техники и математического обеспечения приводят к сокращению указанных затрат времени, развитие новых методов лазерной диагностики и терапии требует разработки новых, более эффективных, простых и надежных алгоритмов для метода МК. Например, сжатый (condensed) метод МК позволяет получить решение для любого альбедо, основываясь на результатах моделирования при одном значении альбедо, что существенно облегчает вычисления [320]. Развитие очень экономичных гибридных моделей нацелено на сочетание точности метода МК с высокой эффективностью диффузионных теорий или приближенных аналитических выражений [290, 319, 326, 327].

Оригинальная программа МК, позволяющая получить информацию, необходимую для реконструкции внутренней структуры сильно рассеивающих объектов размером 1000 характерных длин рассеяния и более, была разработана на основе метода интегрирования по траекториям и алгоритма Метрополиса (Metropolis algorithm) [374, 375]. Аппарат интегрирования по траекториям, впервые предложенный Фейнманом для альтернативного описания квантовой механики, может с равным успехом использоваться для описания движения фотонов в рассеивающей среде, поскольку они представляют собой частицы, претерпевающие столкновения с заданной частотой с известным средним отклонением траектории при каждом столкновении [376–382]. Интеграл по всем возможным траекториям с использованием множества вложенных интегралов называется интегралом по траектории. Этот подход предполагает аналитическое решение уравнения переноса излучения в рамках приближения Перельмана (Perelman's approximation), которое справедливо для сравнительно слабого рассеяния [377]. Модель интегрирования по траекториям, предложенная в работе [376], выводится из первых принципов и не использует приближения Перельмана. Метод интегрирования по траекториям был применен к численному расчету в модели «случайного блуждания» фотонов на трехмерной дискретной сетке [382]. В контексте МК-подхода метод интегрирования по траекториям можно рассматривать как экстремальную форму снижения дисперсии, в которой вместо поиска наиболее вероятных траекторий путем случайного перебора используется их прямое определение [374–376]. Следовательно, исключение «неинформативных» траекторий фотонов из процедуры вычисления может обеспечить увеличение скорости расчетов на несколько порядков [374, 375].

В качестве примера рассмотрим оптику кожи человека [6, 37, 38, 57, 306, 315, 316, 318, 321–325, 333, 334, 340, 343, 383–388]. Для вычисления распределений

поверхностной плотности потока излучения $F(\mathbf{r})$ и полной плотности потока энергии $U(\mathbf{r})$ методом МК (см. уравнения (1.11) и (1.12)), представим кожу как плоскую многослойную рассеивающую и поглощающую среду (рис. 1.10), на поверхность которой нормально падает лазерный пучок. Предположим далее, что каждый i -й слой характеризуется параметрами μ_{ai} , μ_{si} , $p_i(\theta)$, толщиной d_i , и средним показателем преломления наполняющей среды n_i . Отметим, что более общий подход к моделированию методом МК учитывает границы раздела между слоями дермы в виде квазислучайных периодических поверхностей, а также спектральный отклик компонентов кожи [340, 343].

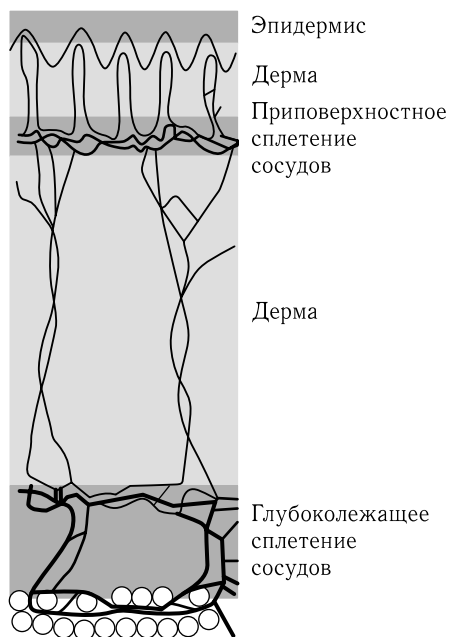


Рис. 1.10. Модель кожи человека [306]

С использованием алгоритма МК, описанного в работах [306, 318, 323–325], для моделирования распределения гауссовых световых пучков в коже (см. рис. 1.10 и табл. 1.1) были определены полная плотность потока на длинах волн 337, 577 и 633 нм, как это показано на рис. 1.11, а также зависимости максимальной полной плотности потока лучистой энергии U_m и соответствующей области ($D_{\parallel} \times D_{\perp}$) высокой освещенности от начального радиуса падающего лазерного пучка r_0 на длине волны 633 нм (рис. 1.12). Параметры D_{\parallel} и D_{\perp} определяются на уровне $1/e^2$ величины U вдоль и поперек падающего светового пучка, соответственно. Легко видеть, что максимум освещенности формируется на некоторой глубине внутри среды и полная плотность потока в точке максимума U_m может быть существенно выше, чем в центре пучка, падающего на поверхность среды (U_0). Это явление было замечено многими авторами (см., например, работы [1, 3, 6, 37, 303]), которые подчеркивали сильную связь между отношением U_m/U_0 и оптическими свойствами среды, радиусом падающего пучка и свойствами границы. Из рис. 1.12 б видно, что рост радиуса падающего пучка приводит к расширению засвеченной области внутри биоткани, причем скорость увеличения в поперечном направлении больше, чем вдоль пучка.

Таблица 1.1

Оптические параметры кожи [6, 306]

№	Слой кожи	λ , нм	μ_a , см ⁻¹	$\mu_{s,1}$, см ⁻¹	g	n	d , мкм
1	Эпидермис	337	32	165	0,72	1,5	100
		577	10,7	120	0,78	1,5	
		633	4,3	107	0,79	1,5	
2	Дерма	337	23	227	0,72	1,4	200
		577	3,0	205	0,78	1,4	
		633	2,7	187	0,82	1,4	
3	Дерма, <i>plexus superficialis</i>	337	40	246	0,72	1,4	200
		577	5,2	219	0,78	1,4	
		633	3,3	192	0,82	1,4	
4	Дерма	337	23	227	0,72	1,4	900
		577	3,0	205	0,78	1,4	
		633	2,7	187	0,82	1,4	
5	Дерма, <i>plexus profundus</i>	337	46	253	0,72	1,4	600
		577	6	225	0,78	1,4	
		633	3,4	194	0,82	1,4	

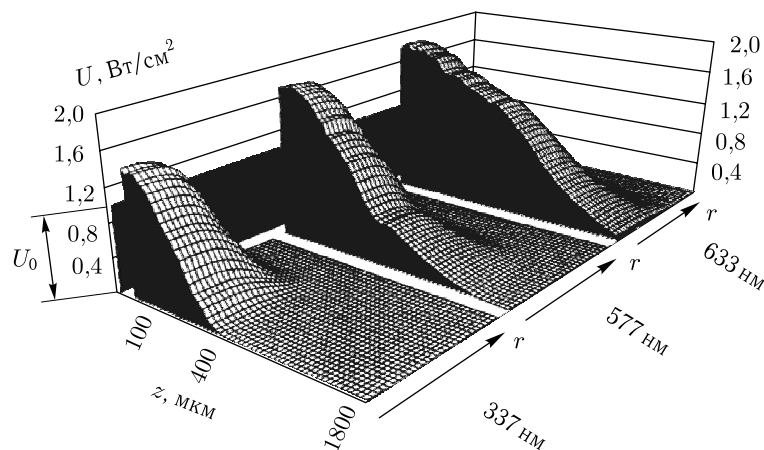


Рис. 1.11. Результаты моделирования методом Монте-Карло распределения полной плотности потока энергии излучения U (Вт/см²) в коже, облучаемой гауссовыми пучками лазерного света с различными длинами волн ($\lambda = 633, 577$ и 337 нм), одинаковыми радиусами на поверхности кожи ($r_0 = 1,0$ мм), и одинаковыми интенсивностями в центре пучка ($U_0 = 1$ Вт/см²) [6]; z — продольная координата (вдоль падающего пучка или в глубину кожи); r — поперечная координата (поперек пучка или вдоль поверхности кожи)

С практической точки зрения такие расчеты для кожи человека и других многослойных мягких биотканей необходимы для правильного подбора доз облучения при фотодинамической, фотодинамической и фототермической терапии рака и многих других заболеваний, а также лазерной коагуляции поверхностных кровеносных сосудов и транс-склеральной циклофотокоагуляции [2, 3, 6, 10–16, 22, 29, 32, 33, 37, 57, 72, 90, 91, 303, 323–325, 386–394].

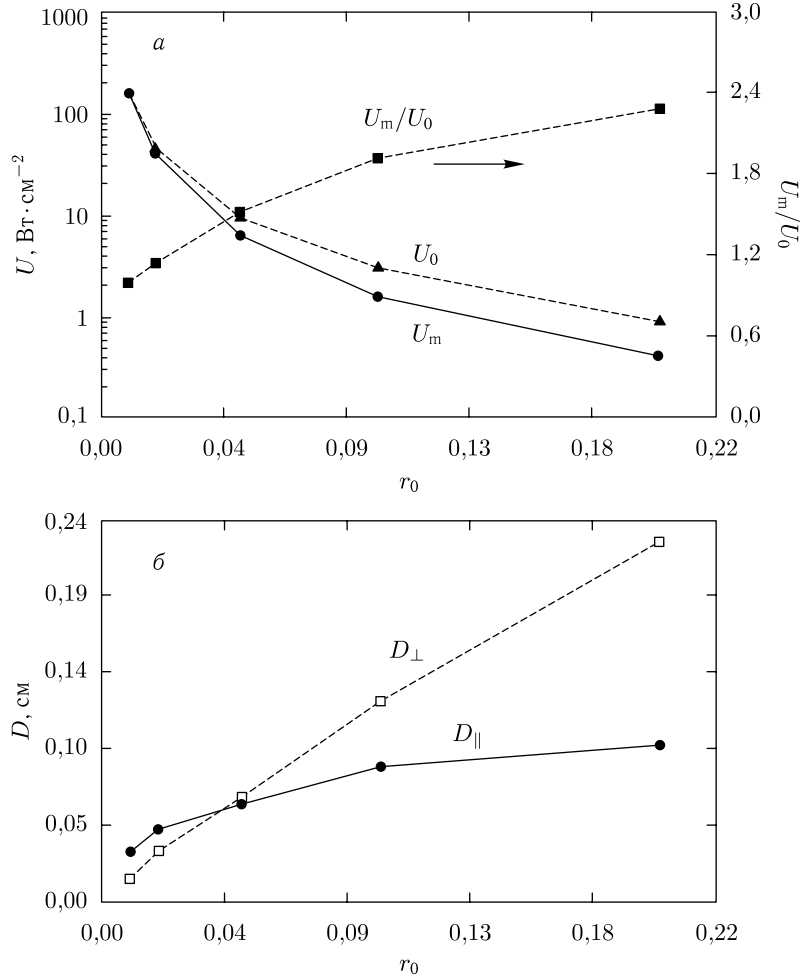


Рис. 1.12. Параметры области максимальной освещенности в зависимости от радиуса падающего пучка (пучок имеет гауссов профиль, длина волны 633 нм, мощность 25 мВт): *a* — полная освещенность в центре падающего пучка, U_0 ; максимальная полная освещенность, U_m ; отношение, U_m/U_0 ; *б* — размер максимально освещенной области (на уровне $1/e^2$) вдоль оси пучка, D_{\parallel} ; размер максимально освещенной области (на уровне $1/e^2$) поперек оси пучка, D_{\perp} [306]

В частности, на основе результатов моделирования методом МК, представленных на рис. 1.11 и 1.12, ослабление широкого лазерного пучка с интенсивностью I_0 на глубине $z > l_d = 1/\mu_{\text{eff}}$ (см. выражение (1.18)) в слое среды можно описать как

$$I(z) \approx I_0 b_s \exp(-\mu_{\text{eff}} z), \quad (1.36)$$

где b_s учитывает дополнительное облучение верхних слоев за счет рассеяния назад из глубины ткани (эффект рециркуляции фотонов). Соответственно, глубина проникновения света в биоткань есть

$$l_e = l_d [\ln b_s + 1]. \quad (1.37)$$

В типичном случае для биотканей $b_s = 1-5$ при диаметре пучка 1–20 мм [303, 391]. При использовании широких пучков для стационарного освещения сильно рассеивающих сред с низким поглощением энергия накапливается в биоткани благодаря высокой кратности хаотических миграций фотона на большие расстояния. Сильно рассеивающая среда работает как случайный резонатор, накапливающий энергию света. Плотность мощности света в поверхностных слоях биоткани может существенно (до пяти раз) превышать мощность падающего излучения и служить причиной передозировки при фотодинамической терапии или перегрева при лазерной интерстициальной термотерапии. С другой стороны, эффект рециркуляции фотонов может принести пользу для более эффективного облучения подповерхностных поражений с использованием сравнительно низких плотностей падающей мощности.

В настоящее время наиболее часто используется публично доступный МК-алгоритм, разработанный Вангом и Жаком для многослойных биотканей (MCML code) [196, 290, 319, 326, 327]. MCML-алгоритм также базируется на подсчетах уменьшения «веса» фотона, т.е. «веса» каждого пакета фотонов, который экспоненциально уменьшается в процессе распространения пакета в среде в соответствии с параметрами рассеяния и поглощения среды. Когда текущий «вес» W фотона становится достаточно малым, включается процедура «русской рулетки», которая определяет вероятность «выживания» t каждого из пакетов фотонов с весом $t \times W$. Такой алгоритм успешно применяется для расчетов распределения лучевой интенсивности в биотканях и предполагает баланс энергий падающего, поглощенного и рассеянного излучения в биоткани. Однако процедура приписывания случайно выбранному пакету фотонов дополнительного «веса» может привести к неконтролируемому увеличению числа фотонов с неоправданно длинными траекториями, что может повлиять на окончательное распределение траекторий фотонов в среде и дать некоторую неопределенность результатов моделирования.

Другой подход к МК-моделированию представляет собой комбинирование схемы статистического «веса» и моделирования эффективных траекторий фотонов [338]. Расчеты основаны на моделировании большого числа возможных траекторий пакетов фотонов при их прохождении от области их ввода в среду до области, где они покидают среду. Начальные и конечные состояния фотонов хорошо определены геометрией источников и детекторов, их числовыми апертурами, пространственным распределением интенсивности падающего пучка, чувствительностью детектора и т.п. Предположение о независимости поглощения и рассеяния вдоль траектории фотона позволяет учитывать эти процессы по отдельности. Поэтому в процессе распространения в среде «вес» каждого фотонного пакета уменьшается только за счет частичного отражения и/или преломления на границах областей среды. В рамках такого подхода можно учесть и влияние полного внутреннего отражения [348]. Таким образом, при аккумулировании достаточного количества фотонных пакетов ($\sim 10^6-10^8$) между областями источника и приемника, пересчитывается статистический вес каждого пакета путем учета экспоненциального затухания потока в соответствии с полной длиной пути фотона и величиной коэффициента поглощения среды. Это позволяет быстро пересчитывать интенсивность для набора значений коэффициента поглощения среды для определенных длин волн. Таким образом спектры отражения и флуоресценции кожи и других биологических тканей, ОКТ-изображения и прочее могут быть достаточно легко рассчитаны. Главное достоинство метода состоит в том, что время счета не зависит от поглощения среды и процедура расчетов избегает необходимости учитывать сохранение энергии в среде, как это нужно делать в МК-алгоритмах, основанных на применении «русской рулетки». Этот метод с дальнейшими усовершенствованиями был обобщен для целого ряда возможных приложений в области оптики биотканей и имеется в открытом доступе в Интернете [370, 371].

МК-моделирование широко используется в расчетах флуоресценции биотканей. Модели, предложенные в работах [347, 349], предполагают, что флуоресценция излучается равномерно из центров рассеяния в случайных направлениях. Алгоритм, описанный в работе [350], учитывает на примере кожи пространственное распределение флуорофоров в биоткани. МК-алгоритмы для расчета спектров отражения кожи можно найти в работах [338, 340], а для просветленной кожи в работе [351]. Когерентные эффекты в многократно рассеивающих средах были учтены в МК-моделировании в работах [352, 353]. МК-алгоритм для моделирования преобразования изображения в дисперсной среде представлен в работе [359]. Имитационные 2D-ОКТ-изображения с учетом поляризации, когерентности света и формирования спеклов получены авторами [362, 367]. Первый объектно-ориентированный унифицированный МК-алгоритм, использующий технологию CUDA NVIDEA GPU и подходящий для многих применений в оптике биотканей и биофотонике, включая расчет цвета кожи, спектров отражения, поляризационных характеристик, описан в работе [370]. Его также можно найти в Википедии,

Характер миграции фотонов в тканях головы человека методом МК был описан в работе [342]. В работе [354] было проведено детальное сравнение трех разных МК-моделей. Эффективный МК-алгоритм для описания лазерной доплеровской флоуметрии крови в коже представлен в работе [365]. МСМЛ-алгоритм был адаптирован к GPU параллельным вычислениям авторами работы [364] (включен в Википедию). Количественное описание оптических свойств крови с использованием инверсного алгоритма МК (ИМК) дано в работах [230, 345, 346]. Были получены данные для коэффициентов поглощения μ_a и рассеяния μ_s , а также для фактора анизотропии рассеяния g крови человека в различных физиологических состояниях. Одновременно был разработан алгоритм ИМК для анализа оптических параметров крови в потоке [48]. Наблюдаемые изменения оптических свойств крови в потоках были отнесены к деформации, распределению и ориентации эритроцитов за счет сдвиговых напряжений в потоке частиц. Однако обычные МК-алгоритмы [309–311, 318, 327, 348, 356–358], не позволяют учесть реальное взаимодействие фотонов с эритроцитами. В частности, количественно описывать наблюдаемые явления и надежно определять фактор анизотропии рассеяния. Очевидно, что из-за сложной формы эритроцита рассеяние фотона от него зависит от угла падения фотона на эритроцит. Он также деформируется в процессе движения, что дополнительно усложняет взаимодействие фотонов с клеткой. В работах [357, 358] для моделирования рассеяния фотонов на эритроцитах был предложен МСМЛ-алгоритм с использованием фазовой функции рассеяния Хенни–Гринштейна. Детальные исследования влияния фазовой функции рассеяния на МК моделирование представлено в работах [360, 361].

Для преодоления этих проблем перспективным является подход, основанный на детальном учете взаимодействия фотонов с клетками, так называемый $pcMC$ (photon-cell interactive MC) — МК-алгоритм, который отслеживает миграцию фотона как в области вне клетки, так и внутри клетки без необходимости использования макроскопической фазовой функции рассеяния и фактора анизотропии рассеяния [368]. В этом МК-алгоритме 3-мерные двояковогнутые эритроциты определяются с помощью входных параметров, включая объем, форму, гематокрит и пр. Взаимодействие фотонов на границе плазмы клетки описывается с помощью геометрической оптики, поскольку в норме гемоглобин равномерно распределен в цитоплазме эритроцита, размеры которого существенно превышают длину волны света. Таким образом этот МК-алгоритм учитывает изменения характера рассеяния фотонов, обусловленные изменением объема эритроцита, его формы и ориентации, а также содержания гемоглобина в клетке.

Инверсные алгоритмы МК, используемые для реконструкции оптических параметров биотканей и скорости движения крови в сосудах по измерениям статических и динамических спектров отражения, можно найти в обзорных работах [344, 372]. Они также представлены в гл. 7, посвященной описанию методов и алгоритмов для определения оптических параметров биотканей.

1.2. Распространение коротких импульсов в биологических тканях

1.2.1. Принципы распространения и теоретическое обоснование. На основе временной теории переноса излучения (ТПИ) можно анализировать отклик рассеивающей среды в зависимости от времени. Такой анализ важен для обеспечения неинвазивных методов оптической диагностики, использующих измерения коэффициентов отражения и пропускания биотканей с временным разрешением [1, 3, 6, 31, 42, 44, 71, 92, 129, 130, 139, 196, 197, 206, 290, 291, 294, 296, 374–382, 395–428]. В наиболее общем виде временное уравнение переноса излучения для зависящей от времени энергетической яркости (или удельной интенсивности) $I(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}, t)$, можно записать так [395, 427]:

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial S} I(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}, t) + \mu_t t_2 \frac{\partial}{\partial t} I(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}, t) = \\ = -\mu_t I(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}, t) + \mu_s \cdot \int_{4\pi} \left[\int_{-\infty}^t I(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}, t') f(t, t') dt' \right] p(\hat{\mathbf{s}}, \hat{\mathbf{s}}') d\Omega' + S(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}, t). \end{aligned} \quad (1.38)$$

По сравнению со стационарным уравнением (1.9), в уравнении (1.38) введены следующие новые обозначения: t — время, $t_2 = 1/(\mu_t c)$ — средний интервал времени между взаимодействиями, где c — скорость света в среде, $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ (см. уравнение (1.2)); функция $f(t, t')$ описывает временную деформацию δ -образного импульса, следующую за его однократным рассеянием, и может быть представлена в виде затухающей экспоненциальной функции

$$f(t, t') = \frac{1}{t_1} \exp\left(-\frac{t-t'}{t_1}\right), \quad (1.39)$$

где t_1 может зависеть от \mathbf{r} и представляет собой первый момент распределения $f(t, t')$, который описывает временной интервал индивидуального акта рассеяния при $t_1 \rightarrow 0$, $f(t, t') \rightarrow \delta(t-t')$. Энергетическая яркость $I(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}, t)$ в уравнении (1.38) содержит две компоненты: ослабляемую падающую и диффузную. Это уравнение дополняется граничными условиями (см. соотношения (1.10)) при $(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}) \rightarrow (\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}, t)$.

При зондировании плоско-параллельного слоя рассеивающей среды ультракоротким лазерным импульсом прошедший импульс состоит из баллистической (когерентной) компоненты, группы фотонов с зигзагообразными траекториями («снейк» или змеевидными траекториями) и высокоинтенсивной диффузной компоненты (см. рис. 1.13) [1, 3, 6, 31]. Как фотоны, не испытавшие рассеяния (баллистические), так и некоторая группа фотонов, претерпевших однократное рассеяние строго вперед, дают вклад в интенсивность строго направленной вперед компоненты (состоящей из фотонов, распространяющихся прямо вдоль лазерного пучка). Эта компонента подвержена экспоненциальному ослаблению с ростом толщины образца (см. уравнение (1.1)). По этой причине применимость таких фотонов для целей практической диагностики протяженных биотканей и органов ограничена, хотя они потенциально дают более контрастное изображение объекта.

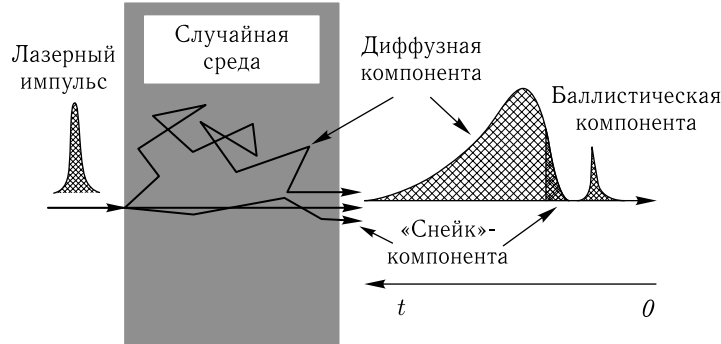


Рис. 1.13. Ультракороткий лазерный импульс, распространяясь в случайной среде, распадается на диффузную компоненту, «снейк»-компоненту с зигзагообразными траекториями фотонов и баллистическую компоненту [1]

Группа «снейк»-фотонов, т. е. фотонов с зигзагообразными траекториями, включает фотоны, каждый из которых испытал всего несколько столкновений. Они движутся вдоль траекторий, которые лишь слегка отклоняются от направления падающего пучка, и формируют часть диффузной компоненты, приходящую на приемник раньше всех. Эти фотоны несут информацию об оптических свойствах рассеивающей среды и параметрах любого чужеродного объекта, который может встретиться на их пути.

Диффузная компонента интенсивна и очень широка во временном масштабе, поскольку содержит основную часть падающих фотонов, претерпевших большое число актов рассеяния, мигрировавших в различных направлениях и прошедших различные, зачастую большие расстояния от области их влета до области детектирования. Более того, диффузная компонента несет информацию об оптических свойствах рассеивающей среды, а ее деформация может отражать присутствие в среде локальных неоднородностей. Разрешение, получаемое таким методом при большой светосиле, намного ниже, чем в методе, основанном на регистрации фотонов, распространяющихся прямолинейно. Возможны две схемы зондирования, в одной из которых регистрируются прошедшие фотоны, а в другой — рассеянные назад (см. рис. 1.14).

Если биоткань однородна и полубесконечна, размеры источника и приемника малы по сравнению с расстоянием r_{sd} между ними на поверхности биоткани, а импульс может рассматриваться как одиночный, то распределение света в диффузионном приближении (справедливом при $\mu_a \ll \mu'_s$) описывается временным уравнением диффузии [398, 399]:

$$\left(\nabla^2 - c\mu_a D^{-1} - D^{-1} \frac{\partial}{\partial t}\right) U(\mathbf{r}, t) = -Q(\mathbf{r}, t), \quad (1.40)$$

которое фактически является обобщением стационарного уравнения (1.17). Следует отметить, что уравнение диффузии эквивалентно уравнению теплопроводности [412]. Решение уравнения (1.40) приводит к следующему соотношению для числа рассеянных назад фотонов на поверхности в единицу времени и с единицы площади $R(r_{sd}, t)$ [398, 399]:

$$R(r_{sd}, t) = \frac{z_0}{(4\pi D)^{3/2}} t^{-5/2} \exp\left(-\frac{r_{sd}^2 + z_0^2}{2Dt}\right) \exp(-\mu_a ct), \quad (1.41)$$

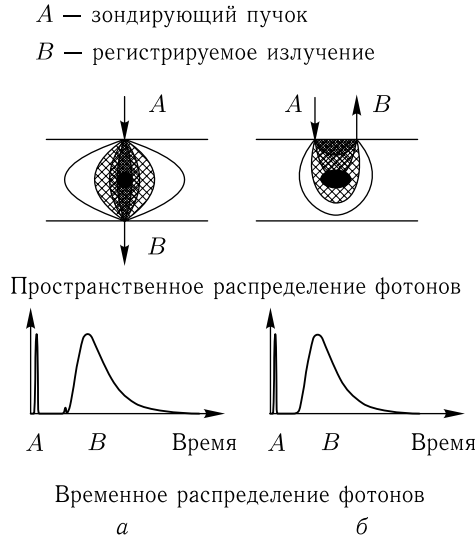


Рис. 1.14. Типичные схемы визуализации биотканей с разрешением по времени [1]: a — с регистрацией прошедших фотонов; b — режим рассеяния назад; A — зондирующий пучок; B — регистрируемое излучение. Темная область в центре рассеивающего слоя — локальная неоднородность (опухоль). Показаны пространственные и временные распределения фотонов в среде

и, соответственно, для коэффициента пропускания

$$\begin{aligned}
 T(r_{sd}, d, t) = (4\pi D)^{-3/2} t^{-5/2} \exp\left(-\frac{r_{sd}^2}{4Dt}\right) & \left\{ (d - z_0) \exp\left[-\frac{(d - z_0)^2}{4Dt}\right] - \right. \\
 - (d + z_0) \exp\left[-\frac{(d + z_0)^2}{4Dt}\right] & + (3d - z_0) \exp\left[-\frac{(3d - z_0)^2}{4Dt}\right] - \\
 - (3d + z_0) \exp\left[-\frac{(3d + z_0)^2}{4Dt}\right] & \left. \right\} \exp(-\mu_a ct), \quad (1.42)
 \end{aligned}$$

где $z_0 = (\mu'_s)^{-1}$, а d — толщина биоткани.

На практике μ_a и μ'_s определяются методом подгонки с использованием уравнений (1.41) или (1.42) на основании измерений формы отраженного или прошедшего импульсов, которые обычно осуществляются методом счета фотонов с разрешением во времени. Определенные таким образом экспериментальные значения оптических параметров многих биотканей и модельных сред можно найти в работах [1, 3, 6, 12–15, 31, 88, 89, 129, 130, 139, 206, 342, 372, 398–415, 426]. Важным достоинством импульсного метода является его применимость *in vivo* с возможностью отдельного определения μ_a и μ'_s в одном измерении в режиме рассеяния назад или при просвечивании. Уместно заметить, что поиск новых подходов к описанию оптического отклика биотканей на лазерные импульсы является актуальной задачей (см., например, работы [206, 291, 292, 295, 296, 374–382, 417–428]). Большое число публикаций посвящено передаче изображения в биотканях и оценке разрешающей способности оптических томографических схем с использованием перво-прошедших фотонов от ультракоротких импульсов [1, 3, 6, 71, 129, 130, 139, 342, 396, 397, 405–410, 420, 423–428].

1.2.2. Импульсная спектроскопия и визуализация биологических тканей с разрешением во времени. Основной принцип улучшения видимости через рассеивающую среду (биоткань) с использованием временного разрешения наглядно проиллюстрирован на рис. 1.15 [1, 31]. Контрастное изображение объекта в рассеивающей среде можно получить посредством электронной или оптической временной селекции приходящего первым минимально рассеянного света (баллистические и «снейк»-фотоны), который содержит геометрическую информацию об объекте, подобную рентгеновскому зондированию [1, 31, 71, 139]. Типичные оптические схемы с использованием селекции приходящих первыми фотонами представлены на рис. 1.16 и 1.17. Одна группа схем (см. рис. 1.16) использует электронную временную селекцию. В методе счета единичных фотонов с временной корреляцией используется пикосекундный лазер с высокой частотой повторения (например, лазер на красителе с синхронизацией мод и разгрузкой резонатора). При регистрации первых пришедших фотонов временная задержка измеряется с помощью преобразователя «время-амплитуда» (см. рис. 1.16 а) и строится гистограмма времен прихода с использованием большого числа импульсов с низкой энергией. Временное разрешение такого метода ограничено на уровне примерно 50 пс. Для импульсов с большей энергией от лазеров с меньшей частотой повторения использование стрик-камер¹⁾ позволяет улучшить временное разрешение до 1 пс (см. рис. 1.16 б). При наличии камеры с синхронной разверткой можно использовать даже источник с высокой частотой повторения и низкой энергией импульсов.

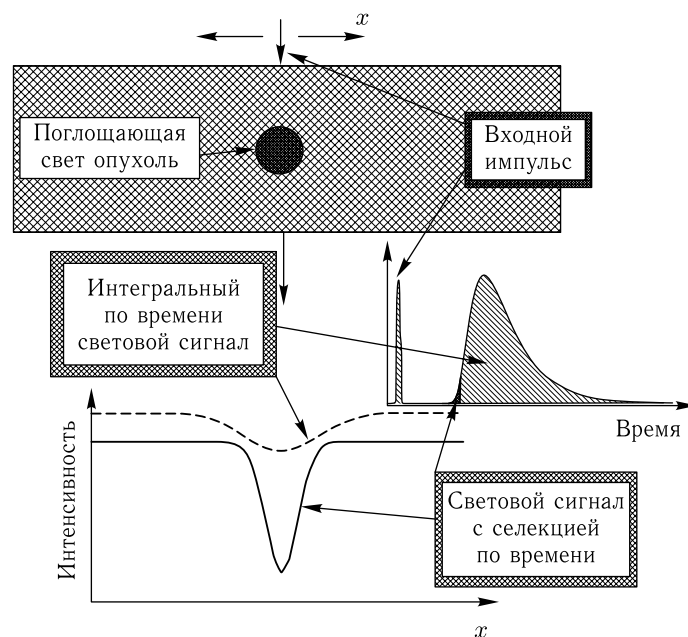


Рис. 1.15. Визуализация через биоткань при стробировании. Улучшенное пространственное разрешение получено селекцией только «первопришедших» фотонов [1]

¹⁾ Стрик-камера (streak camera) — камера с щелевой разверткой для получения хронограмм с высоким временным разрешением

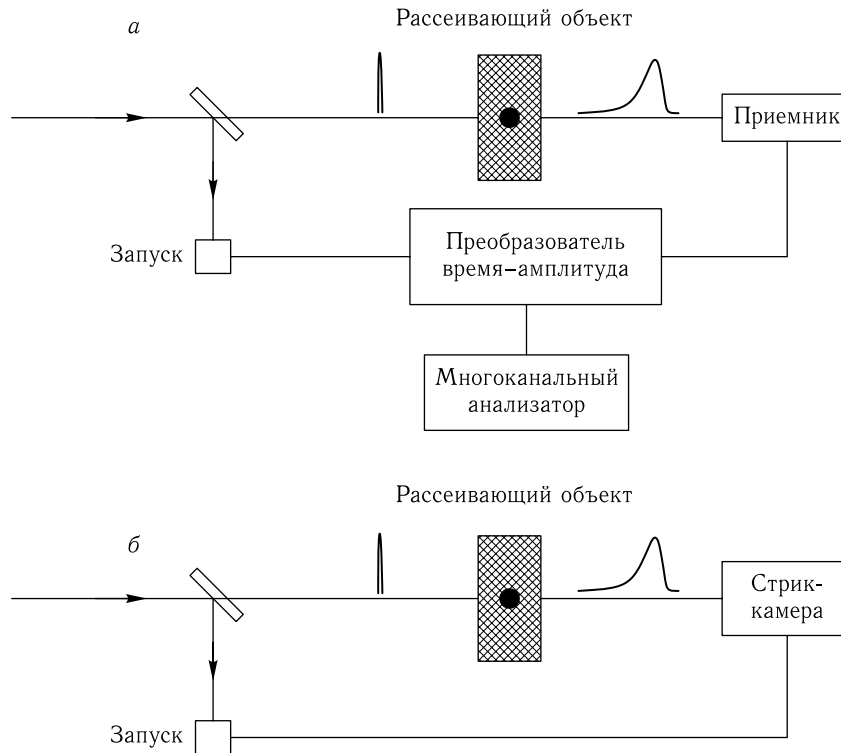


Рис. 1.16. Метод визуализации с электронным стробированием [1]

В другой группе методов для селекции фотонов используются оптические нелинейные эффекты (см. рис. 1.17). В схеме с керровским оптически затвором необходим лазер с высокой энергией излучения. Часть энергии импульса используется для зондирования биоткани, а другая часть — для открытия затвора на основе оптического эффекта Керра (ячейка с CS_2) (см. рис. 1.17 а). Поскольку время, в течение которого затвор открыт, определяется только длительностью лазерного импульса, можно достичь времен селекции в субпикосекундном диапазоне. В методе временной селекции на основе вынужденного комбинационного рассеяния (ВКР) также используются лазерные импульсы большой энергии. Стоксова волна, генерируемая при ВКР в ячейке с газом, используется для зондирования биоткани (см. рис. 1.17 б). Прошедший свет малой интенсивности усиливается в ВКР-усилителе, который, в свою очередь, накачивается ультракоротким лазерным импульсом. Этот импульс имеет необходимую длительность для стробирования желаемой части детектируемого импульса света с соответствующим временным разрешением, в том числе позволяет регистрировать сигналы от перво-пришедших фотонов. Третья схема основана на удвоении частоты с временной корреляцией и часто используется в оптических автокорреляторах при исследовании характеристик лазерного импульса (см. рис. 1.17 в). Она может быть непосредственно использована для оптической селекции сигнальных фотонов.

1.2.3. Когерентное рассеяние назад. Использование ультракоротких лазерных импульсов приводит к появлению локального пика интенсивности излучения, рассеянного назад внутри узкого телесного угла благодаря интерференции рассеянного света [31, 73, 74]. В направлении точно назад интенсивность рассеянного света, как

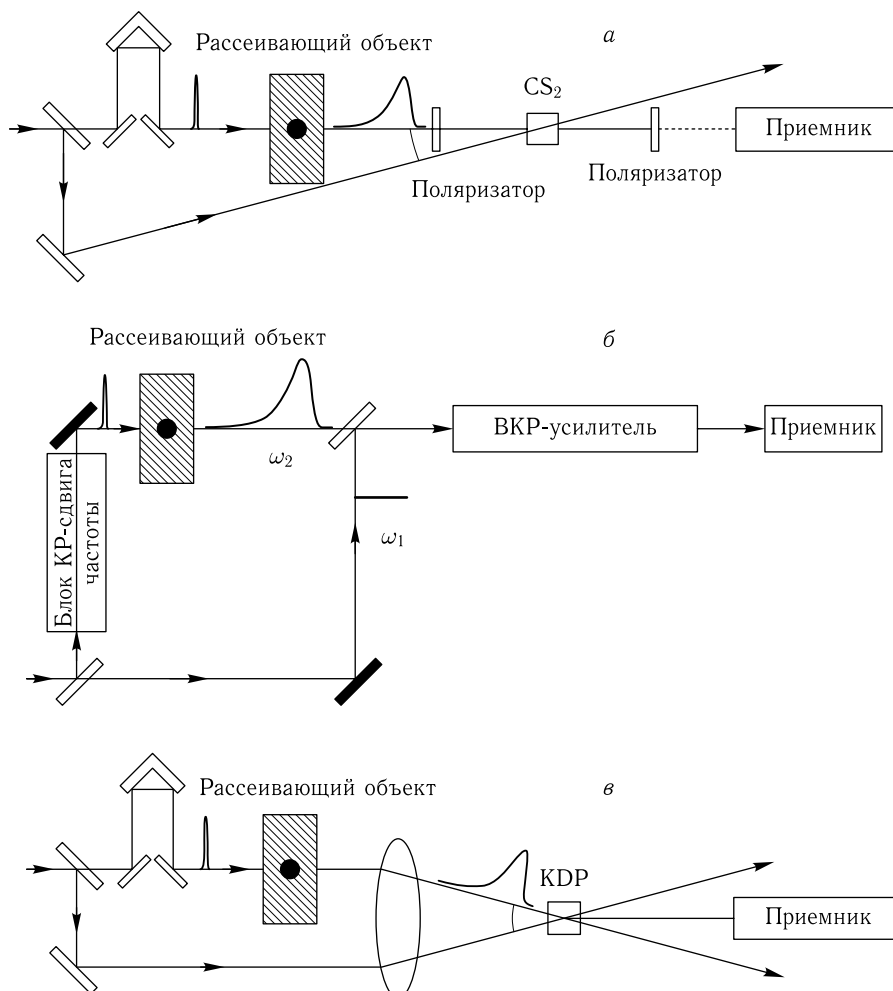


Рис. 1.17. Метод визуализации со стробированием, использующий нелинейно-оптические явления [1]: CS₂ — оптическая ячейка Керра, наполненная CS₂; KDP — нелинейный кристалл для оптического удвоения частоты

правило, вдвое больше диффузной интенсивности. Такая интерференция возникает из-за симметрии относительно обращения различных траекторий рассеянного света в направлении назад. Это явление известно как слабая локализация. Профиль углового распределения когерентного пика зависит от средней транспортной длины l_{tr} и коэффициента поглощения μ_a . Угловая ширина пика прямо связана с l_{tr} [74]:

$$\Delta\theta \approx \lambda / (2\pi l_{tr}). \quad (1.43)$$

Для многих мягких и твердых биотканей, таких как миокард, жировая ткань человека, молочная железа, раковая ткань легкого, нормальный и пораженный катарактой хрусталик, ткани зуба, когерентный пик рассеяния назад возникает при длительности зондирующего лазерного импульса менее 20 пс [74].

1.3. Диффузионные волны фотонной плотности

1.3.1. Принципы формирования и теоретические основы. Частотный (frequency-domain) или модуляционный метод был предложен для изучения миграции фотонов в рассеивающих средах. Метод разработан для оценки динамического отклика интенсивности рассеянного света на модуляцию интенсивности падающего лазерного пучка в широком диапазоне частот, который при исследовании биотканей обычно составляет от 50 до 1000 МГц [1, 3, 4, 6, 10, 52, 53, 71, 129, 130, 139, 206, 411, 412, 427–465]. В модуляционном методе измеряется глубина модуляции интенсивности рассеянного света

$$m_U \equiv AC_{\text{приемник}}/DC_{\text{приемник}}$$

(см. рис. 1.18) и соответствующий фазовый сдвиг по отношению к фазе модуляции падающего света $\Delta\Phi$ (фазовая задержка). Поэтому метод часто называют фазовым или модуляционно-фазовым. По сравнению с временными измерениями, описанными выше, этот метод более прост и надежен с точки зрения интерпретации данных и помехозащищенности. Это связано с тем, что частотно-модуляционный метод использует модуляцию интенсивности источника излучения при сравнительно низкой пиковой мощности. Более медленные по сравнению с импульсным методом изменения сигнала на одной из выбранных частот (ср. рис. 1.18 а и 1.18 б) требуют меньшей спектральной ширины приемной аппаратуры, чем у приборов для временных измерений, а, следовательно, может быть обеспечено более высокое значение отношения сигнал–шум. Медицинское оборудование, использующее модуляционные измерения, более экономично и портативно, оно может быть создано на основе измерительных приборов, используемых в оптических телекоммуникационных системах и в исследованиях дисперсии оптических волокон [4, 139, 456]. Однако из-за одновременности передачи и приема сигналов метод требует специальных мер по предотвращению перекрестных помех между передаваемым и принимаемым сигналами. Используемые в настоящее время измерительные схемы основаны на гетеродинировании оптического и преобразованного сигналов [1, 3, 4, 6, 10, 52, 53, 71, 129, 130, 139, 411–416, 427–451, 462, 463].

Развитие теории, лежащей в основе данного метода, привело к открытию нового типа волн — волн фотонной плотности или волн с быстро затухающей интенсивностью. Микроскопически отдельные фотоны совершают случайные блуждания в рассеивающей среде, однако коллективно они формируют волну фотонной плотности на частоте модуляции ω , которая распространяется от источника излучения (см. рис. 1.18 и 1.19). Диффузионные волны такого типа известны в других областях физики (например, при поглощении модулированного лазерного излучения в различных средах, включая биологические, возникают тепловые волны [5, 6, 25]). Волны фотонной плотности обладают типичными волновыми свойствами, например, они испытывают преломление, дифракцию, интерференцию, дисперсию и ослабление [1, 3, 4, 6, 71, 52, 53, 129, 130, 139, 411, 427, 429, 433–436, 439–441, 462].

В сильно рассеивающих средах со слабым поглощением вдали от стенок, источника и приемника излучения распределение света можно рассматривать как затухающий диффузионный процесс, описываемый временным уравнением диффузии для плотности фотонов (см. уравнение (1.40)). Когда точечный источник света с гармонической модуляцией интенсивности расположен в точке $\mathbf{r} = 0$,

$$I(0, t) = I_0[1 + m_I \exp(j\omega t)], \quad (1.44)$$

m_I — глубина модуляции интенсивности падающего света.

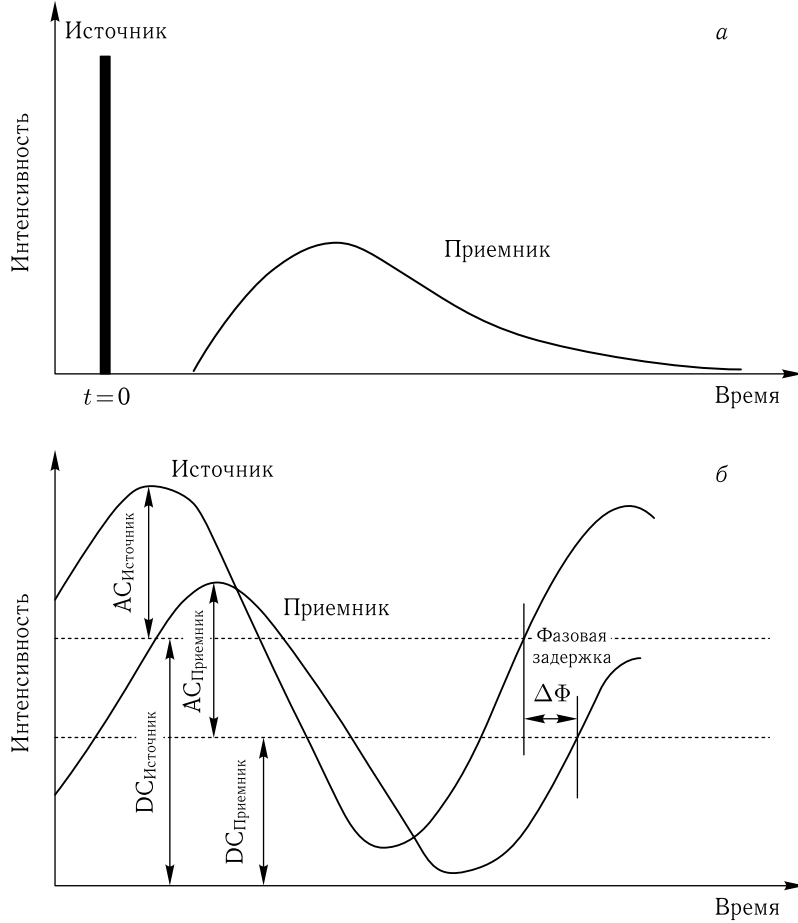


Рис. 1.18. Схематическое изображение временной эволюции интенсивности регистрируемого света в ответ на очень короткий световой импульс (а) или на свет, синусоидально промодулированный по интенсивности (б), проходящие произвольное расстояние в рассеивающей среде с поглощением. Если среда сильно рассеивающая, в прошедшем импульсе нет нерассеянных компонент (а). Прошедшая волна фотонной плотности сохраняет частоту исходной модуляции (б). Уменьшение амплитуды ($AC_{\text{приемник}}$) и сдвиг фазы модуляции (фазовая задержка $\Delta\Phi$) прошедшей волны обусловлены в основном рассеянием. Демодуляция есть отношение зарегистрированных амплитуд переменной ($AC_{\text{приемник}}$) и постоянной ($DC_{\text{приемник}}$) составляющих, нормированное на глубину модуляции интенсивности источника ($AC_{\text{источника}}/DC_{\text{источника}}$) [440]

Решение уравнения (1.40) для однородной бесконечной среды можно представить в виде [71]:

$$U(\mathbf{r}, t) = U_{\text{dc}}(\mathbf{r}) + U_{\text{ac}}(\mathbf{r}, \omega) \exp(j\omega t), \quad (1.45)$$

где

$$U_{\text{dc}} = (I_0/4\pi cD\mathbf{r}) \exp(-\mathbf{r}/l_d), \quad (1.46)$$

$$U_{\text{ac}}(\mathbf{r}, \omega) = \tilde{U}_{\text{ac}}(\mathbf{r}, \omega) \exp\{-ik_r(\omega)\mathbf{r}\}, \quad (1.47)$$

$$\tilde{U}_{\text{ac}}(\mathbf{r}, \omega) = m_I \left[\frac{I_0}{4\pi cD\mathbf{r}} \right] \exp\{-k_i(\omega)\mathbf{r}\}, \quad (1.48)$$

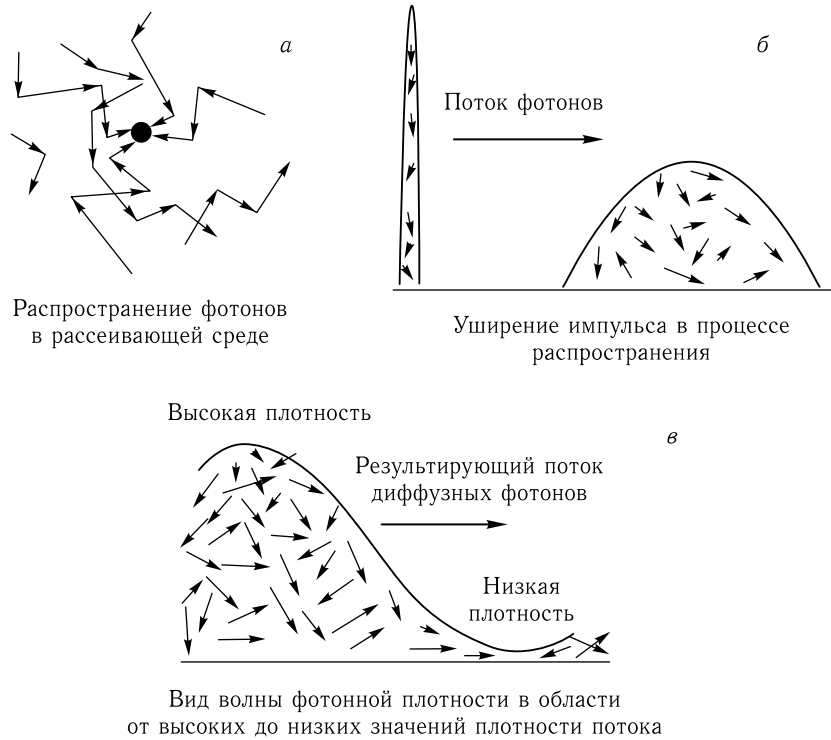


Рис. 1.19. Схематическое представление распространения фотонов в рассеивающей среде при инъекции фотонов от непрерывного источника с постоянной интенсивностью (а), импульсно-го (б), гармонически модулированного (в) по интенсивности [441]

$\omega = 2\pi\nu$ — частота модуляции, $l_d = \mu_{\text{eff}}^{-1}$ — диффузионная длина (см. уравнение (1.18)), а $k_r(\omega)$ и $k_i(\omega)$ — действительная и мнимая части волнового вектора фотонной плотности, соответственно:

$$k = k_r - ik_i = -i \left[\frac{\mu_a c + i\omega}{cD} \right]^{0,5}, \quad (1.49)$$

$$k_{r,i} = \frac{1}{l_d} \left\{ \frac{[1 + (\omega\tau_a)^2]^{0,5} \mp 1}{2} \right\}^{0,5}, \quad (1.50)$$

$$\mu_a c = \frac{1}{\tau_a}, \quad (1.51)$$

где τ_a — среднее время пробега фотона до того, как он будет поглощен.

Переменная составляющая этого решения — расходящаяся сферическая волна с центром в точке $\mathbf{r} = 0$, осциллирующая на частоте модуляции ν и приобретающая фазовый сдвиг по отношению к точке $\mathbf{r} = 0$, равный

$$\Delta\Phi = k_r(\omega)\mathbf{r}. \quad (1.52)$$

Постоянная и переменная компоненты волны фотонной плотности убывают с расстоянием как $\exp(-\mathbf{r}/l_d)$ и $\exp[-k_i(\omega)\mathbf{r}]$ соответственно. Длина волны фотонной

плотности определяется соотношением

$$\Lambda_{\Phi} = \frac{2\pi}{k_r} = \frac{2\pi}{\omega} \left\{ 2c^2 D \mu_a \left(1 + \left[1 + (\omega\tau_a)^2 \right]^{0,5} \right) \right\}^{0,5}, \quad (1.53)$$

а ее фазовая скорость есть

$$V_{\Phi} = \Lambda_{\Phi} \nu. \quad (1.54)$$

Следовательно, волны фотонной плотности обладают дисперсией.

Для биомедицинских приложений, в частности оптической маммографии, легко оценить, что при $\omega/2\pi = 500$ МГц, $\mu'_s = 15$ см⁻¹, $\mu_a = 0,035$ см⁻¹, и $c = (3 \times 10^{10}/1,33)$ см/с длина волны составляет $\Lambda_s \approx 5,0$ см, а фазовая скорость равна $V_s \approx 1,77 \cdot 10^9$ см/с.

Для слабо поглощающих сред, когда $\omega\tau_a \gg 1$,

$$\Lambda_{\Phi}^2 = 8\pi^2 \frac{cD}{\omega}, \quad (1.55)$$

$$V_{\Phi}^2 = 2cD\omega, \quad (1.56)$$

$$m_U(\mathbf{r}, \omega) \equiv \frac{\tilde{U}_{ac}(\mathbf{r}, \omega)}{U_{dc}(\mathbf{r})} = m_I \exp\left(\mathbf{r}\sqrt{\frac{\mu_a}{D}}\right) \exp\left(-\mathbf{r}\sqrt{\frac{\omega}{2cD}}\right), \quad (1.57)$$

$$\Delta\Phi(\mathbf{r}, \omega) = \mathbf{r} \left(\frac{\omega}{2cD} \right)^{0,5}. \quad (1.58)$$

Из уравнения (1.57) ясно видно, что для поддержания распространения волны фотонной плотности в среде необходимо рассеяние света (см. первый экспоненциальный член), однако сильное рассеяние приводит к затуханию волны фотонной плотности (см. второй экспоненциальный член).

Измерение $m_U(\mathbf{r}, \omega)$, $\Delta\Phi(\mathbf{r}, \omega)$ позволяет отдельно определить транспортный коэффициент рассеяния μ'_s и коэффициент поглощения μ_a , и оценить пространственное распределение этих параметров.

1.3.2. Модуляционная спектроскопия и визуализация биологических тканей. Очевидно, существует тесная связь между описанными выше двумя подходами к исследованию биологических тканей с временным разрешением. В случае импульсного зондирования рассеивающей среды приборный или компьютерный фурье-анализ рассеянных импульсов позволяет одновременно получить амплитудно-фазовый отклик среды для непрерывного множества гармоник [1, 3, 4, 71, 139, 206, 412, 427–429, 437]. Рисунок 1.20 иллюстрирует типичное поведение амплитудно-фазового отклика среды фантома биоткани (цельное или разбавленное молоко) [71]. Такие характеристики полезны для спектроскопического исследования биотканей, например для *in vivo* оценки степени оксигенации гемоглобина [449, 466] или уровня глюкозы в крови [467–469].

Пространственное разрешение, достижимое при использовании волн фотонной плотности, является решающим фактором для визуализации макронеоднородностей. Представленные на рис. 1.21 теоретические расчеты для двух поглощающих макронеоднородностей, помещенных в рассеивающую среду, свидетельствуют о том, что раздельная идентификация макронеоднородностей возможна, если точность измерения фазы и амплитуды не меньше 1,0 и 2,0% соответственно [436, 458]. Потенциально разрешающая сила диффузионной томографии с использованием волн фотонной плотности близка к 1 мм, т. е. сравнима с разрешающей силой позитрон-эмиссионной и магниторезонансной томографии [4, 411]. Важными достоинствами оптической томографии является техническая простота, более широкие возможности

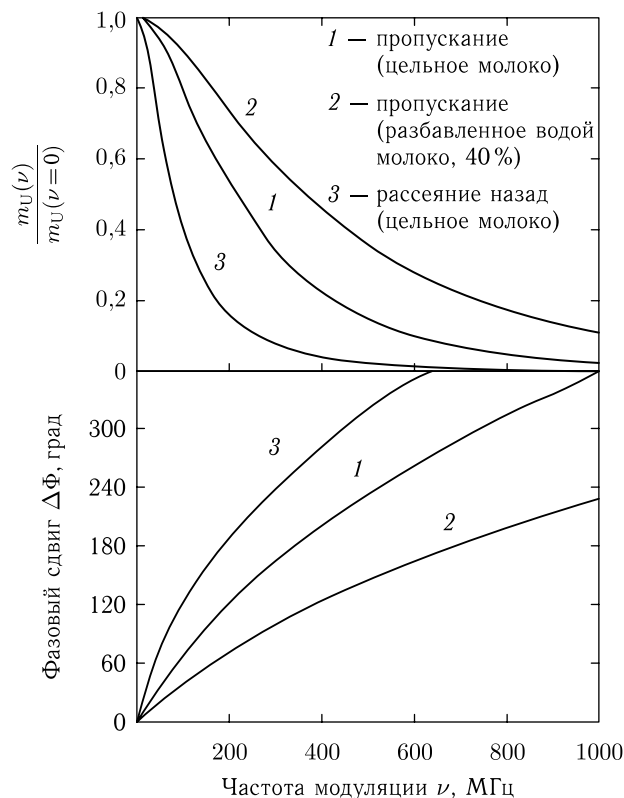


Рис. 1.20. Амплитудный (а) и фазовый (б) отклики модельной среды (цельное (1, 3) и разбавленное водой (40%) (2) молоко), полученные фурье-преобразованием экспериментальных откликов на импульсное воздействие; 1, 2 — запись прошедших импульсов, кювета 2 см толщиной; 3 — режим рассеяния назад (большой объем цельного молока). Расстояние между освещающим и приемным оптическими волокнами $r_{sd} = 2$ см [71]

для усиления контрастности объекта молекулярными красителями и визуализации локальных метаболических процессов.

На рис. 1.22 представлены изображения ткани молочной железы, содержащей опухоль, в виде изолиний значений коэффициентов поглощения μ_a и рассеяния μ'_s , полученные при облучении ткани модулированным по интенсивности излучением видимого и ближнего ИК-диапазона длин волн [71]. Опухоль хорошо локализуется благодаря высоким значениям как коэффициента поглощения, так и рассеяния в области опухоли.

В принципе, можно достичь рекордной разрешающей способности, менее 1 мм, используя интерференцию волн фотонной плотности от разнесенных источников [4, 53, 428, 458, 470]. Для получения изображения высокого качества требуется не только хорошее пространственное разрешение, но и высокий контраст, а также низкая чувствительность к движениям и геометрии объекта. Для улучшения качества изображения можно использовать иммерсионный метод [4, 53, 129, 428, 452, 456, 470]. Когда изображаемая ткань окружена средой с согласованными рассеивающими и поглощающими свойствами, получается однородное изображение в режиме просвечивания и достигается максимальный динамический диапазон для

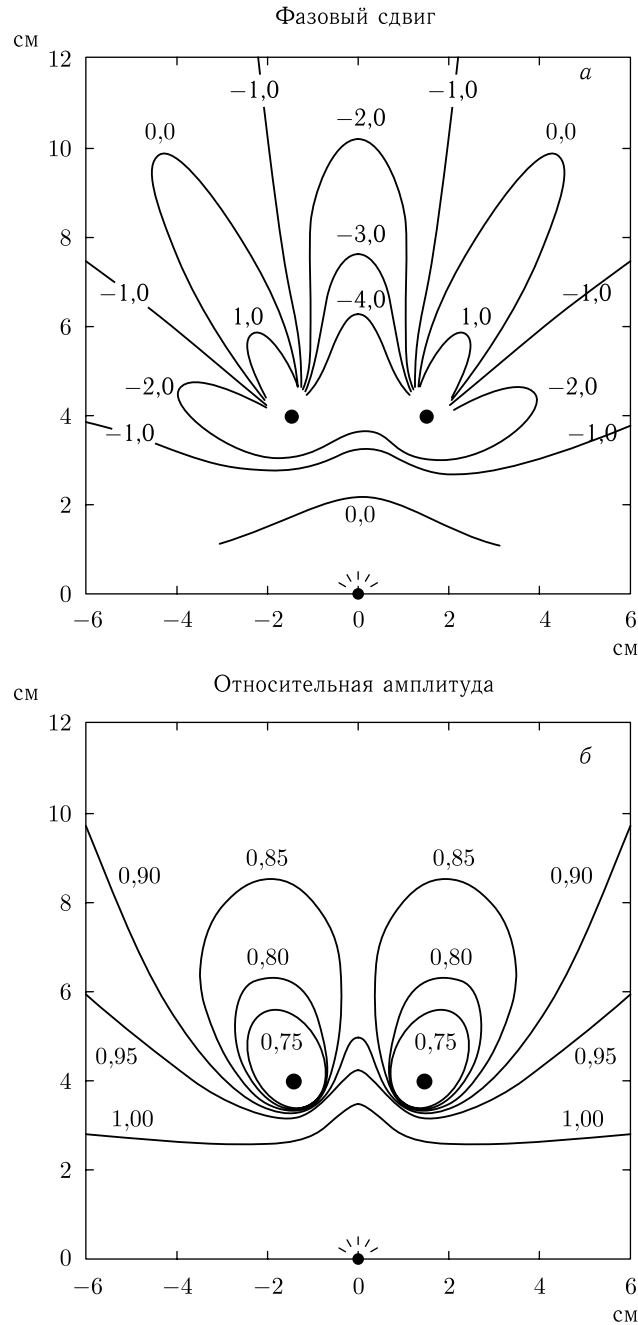


Рис. 1.21. Теоретические распределения относительного фазового сдвига и модуляции интенсивности на частоте 200 МГц при освещении системы из двух абсолютных поглотителей (шаров диаметром 0,5 см), помещенных в однородную рассеивающую среду ($\mu'_s = 10 \text{ см}^{-1}$, $\mu_a = 0,02 \text{ см}^{-1}$). Источник находится в начале координат, а поглотители в точках $(-2, 4)$ и $(2, 4)$ [436]

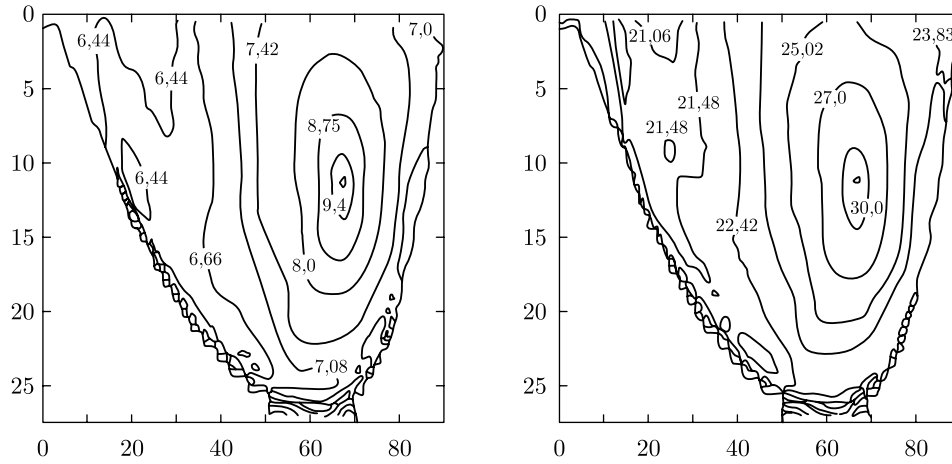


Рис. 1.22. Реконструированные оптические изображения раковой опухоли молочной железы, полученные при освещении модулированным излучением видимого и ближнего ИК-диапазона: *a* — изображение показано контурными линиями для коэффициента поглощения μ_a (10^{-2} см^{-1}); *b* — то же самое для транспортного коэффициента рассеяния μ'_s (см^{-1}). Опухоль расположена вблизи точки (70, 10); коэффициенты выражены в относительных единицах [71]

исследования изменений внутри биоткани. Кроме того, при этом можно исключить влияние граничных условий и геометрии для объектов сложной формы и структуры. Можно также достичь оптического согласования для зондирующего лазерного пучка и биоткани и значительно уменьшить влияние внешних и внутренних движений (дыхания, сердцебиения, дрожания мышц и т.п.) объекта в процессе получения изображения, а также произвести калибровку измерений с использованием хорошо известных оптических свойств иммерсионной среды. Иногда такой простой метод является хорошей альтернативой более сложным методам визуализации, основанным на многочастотном анализе.

Кроме визуализации макронеоднородностей в тканях молочной железы, модуляционный метод полезен при спектроскопических и томографических исследованиях других тканей, например мозга и легких. Он также дает понимание многих физиологических процессов, зависящих от потребления кислорода биотканями и органами и связанных с этим гемодинамических изменений. Одной из наиболее важных областей его применения является оценка распределения кислорода в функционирующем мозге [4, 411, 428, 429]. Другим примером является мониторинг роста новообразований, включая определение объема циркулирующей крови в опухоли и степени ее оксигенации, повышенного содержания внутриклеточных органелл и обызвествления биоткани, что может быть важно для дифференциации доброкачественных и злокачественных опухолей [411, 428, 429].

В заключение подчеркнем, что высокая плотность биоткани может вызвать необходимость принятия в расчет длительности отдельного акта рассеяния t_1 (см. соотношения (1.38) и (1.39)), которая может оказаться сравнимой со средним промежутком времени между взаимодействиями t_2 [427, 455]. Более того, широко используемое диффузионное приближение накладывает важные ограничения на анализ оптических свойств биоткани. Вследствие этого разработаны более универсальные модели дисперсии волн фотонной плотности с использованием алгоритмов статистического моделирования Монте-Карло [427–429, 455].

1.4. Распространение пространственно-модулированного излучения в биотканях

1.4.1. Введение. Как мы уже убедились, распространение света в биотканях является сложным процессом из-за многократного рассеяния света и его поглощения. Возможность количественной характеристики биоткани определяется способностью метода раздельно находить коэффициенты оптического поглощения и рассеяния из измерений в проходящем или отраженном свете. Как пропускание, так и отражение биоткани являются функциями времени и пространства, что ведет к соответствующему делению количественных методов определения параметров биотканей на два больших класса — с временным и пространственным разрешением (см. рис. 1.23). Как мы также уже убедились, методы с временным разрешением делятся на импульсные и модуляционные: в первом случае измеряется уширение распространяющегося импульса во времени, или временная точечная передаточная функция (temporal point-spread function, t -PSF) (см. разд. 1.2) [31, 72], а во втором — затухание и фазовая задержка периодической волны фотонной плотности, или временная функция передачи модуляции (temporal modulation transfer function, t -MTF), так называемый

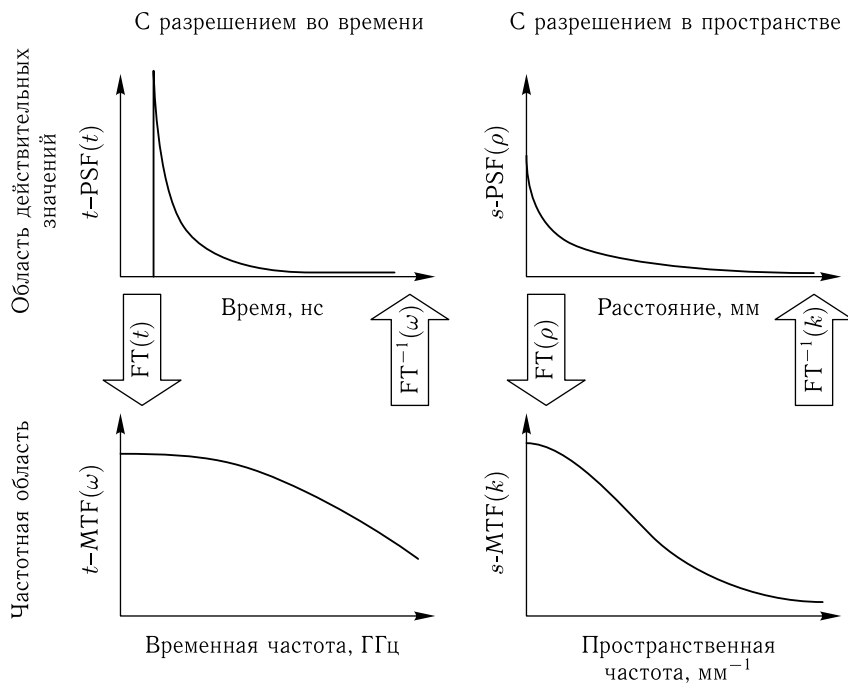


Рис. 1.23. Четыре принципиальных вида измерений для характеристики рассеивающих сред: временное (слева сверху), соответствующее частотное представление (слева внизу); пространственное (справа сверху), соответствующее частотное представление (справа внизу) [479]. FT — фурье-преобразование, t — время, ρ — расстояние, k — пространственная частота, ω — частота модуляции, t -PSF (temporal point-spread function) — временная точечная передаточная функция, t -MTF (temporal modulation transfer function) — временная функция передачи модуляции, s -PSF (spatial point-spread function) — пространственная точечная передаточная функция, s -MTF (spatial modulation transfer function) — пространственная модуляционная передаточная функция

частотный (frequency-domain) или модуляционный метод (см. разд. 1.3) [435, 437, 438, 440, 441]. Импульсный и модуляционный методы полностью эквивалентны и связаны аналитически через временное преобразование Фурье, хотя каждый из них имеет свои особенности при использовании существующей аппаратуры и алгоритмов решения прямых и обратных задач.

В диффузной оптике измерения с пространственным разрешением обычно ограничиваются так называемыми многодистантными измерениями, когда отражение или пропускание биоткани измеряется для различных расстояний между локализованными источниками света и приемниками, в качестве которых могут служить, например, волоконные световоды, непосредственно подводящие и уводящие излучение от биоткани. В данном случае пространственная точечная передаточная функция (spatial point-spread function, *s*-PSF) отслеживает пространственную зависимость отраженного или проходящего света при точечном освещении объекта (см. разд. 1.1 и уравнение (1.33)) [285, 298]. Преобразование Фурье в данном случае представляет собой спектр пространственных частот регистрируемой интенсивности (spatial-frequency-domain, SFD). В дифракционной оптике много внимания уделяется использованию структурированных освещающих пучков, которые служат для эффективной манипуляции изображениями (см., например, [471]). Пространственно-модулированные пучки также эффективно были использованы при исследовании рассеивающих объектов, включая образцы биотканей и крови (см. разд. 8.3) [472, 473]. Однако эти исследования в основном относятся к тонким или слабо рассеивающим объектам. Использование пространственно-модулированных пучков для исследования сильно рассеивающих биотканей систематически изложено в работах [474–483]. В этих работах был предложен новый метод исследования сильно рассеивающих сред — метод пространственно-модуляционной (ПМ) визуализации и спектроскопии, который позволяет количественно характеризовать рассеивающие и поглощающие свойства биоткани в терминах спектра пространственных частот регистрируемой интенсивности (spatial-frequency-domain, SFD) одновременно в широком поле зрения экспериментальной установки. Пространственная модуляционная передаточная функция (spatial modulation transfer function, *s*-MTF), рассеивающей среды кодирует информацию как о глубине, так оптических свойствах среды, позволяя получать количественную информацию об оптических параметрах среды и их пространственном распределении, т. е. решать обе задачи — спектроскопическую и томографическую [479]. Как и в случае временных методов, ПМ-метод может быть описан аналитически в рамках диффузионного приближения либо численно на основе точного решения транспортного уравнения методом Монте-Карло для диффузного отражения, но уже в виде спектра пространственных частот регистрируемой интенсивности. В то время как оптические параметры среды могут быть определены на основе решения обратной задачи с использованием аналитических выражений в рамках диффузионного приближения в виде многочастотного подгоночного алгоритма на основе метода наименьших квадратов или более быстрого двухчастотного метода с использованием номограмм.

1.4.2. Теория и измерение спектра пространственных частот

1.4.2.1. Диффузионное приближение. Концепция модулированных по времени скалярных волн фотонной плотности, возбуждаемых в рассеивающей среде, хорошо развита и имеет широкий спектр биомедицинских приложений, включая количественные измерения оптических параметров биотканей и медицинскую визуализацию — протестированы и используются на практике их дисперсионные, дифракционные и интерференционные свойства (см. разд. 1.3). В то же время концепция пространственно-модулированных «стоячих» волн фотонной плотности, в основном, рассмат-

ривалась как чисто теоретическая конструкция (например, как представление точечных источников и пространственных возмущений с использованием преобразования Фурье), в противоположность практическим измерениям с использованием пространственно-периодического освещения рассеивающего объекта. В настоящем разделе, следуя работе [479], сформулированы основные принципы создания ПМ-плоских волн фотонной плотности и использования спектра пространственных частот для описания свойств этих волн. Сначала описание дается в рамках диффузионного приближения, что позволяет получить необходимые аналитические выражения, справедливые для сравнительно больших албедо и малых пространственных частот, а затем уже в рамках статистического моделирования методом Монте-Карло на основе решения транспортного уравнения результаты распространяются на описание более широкого спектра режимов, включающих и малые албедо, и высокие пространственные частоты.

Стационарное диффузионное уравнение для однородной среды имеет вид (1.17). В предположении полубесконечной геометрии среды и падающей нормально на поверхность среды плоской периодически-модулированной волны, так как это показано на рис. 1.24, функция источника S_d из уравнения (1.17) может быть представлена в виде

$$S_d = S_{d0}(z) \cos(k_x x + \alpha) \cos(k_y y + \beta) \quad (1.59)$$

с пространственными частотами $f_x = k_x/2\pi$ и $f_y = k_y/2\pi$, пространственными фазами α и β , на бесконечных интервалах в тангенциальных направлениях, x и y , и с некоторой произвольной зависимостью в направлении в глубину среды, z .

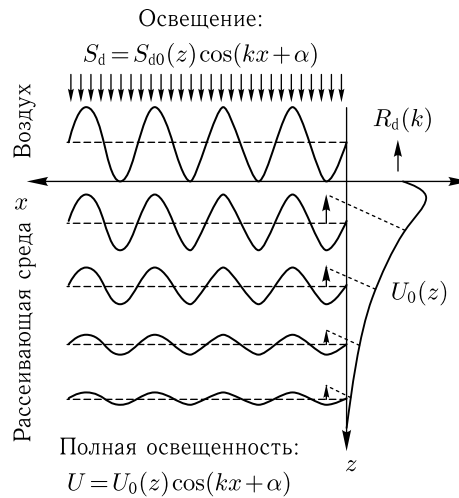


Рис. 1.24. Схематическое представление пространственно-модулированного источника освещения (только в одном направлении x) и результирующей полной освещенности внутри среды на той же частоте и с той же фазой модуляции [479]

В предположении линейности среды (т. е. отклик среды пропорционален входной интенсивности), этот гармонический источник вызовет соответствующую диффузную освещенность в среде с той же частотой и фазой:

$$U = U_0(z) \cos(k_x x + \alpha) \cos(k_y y + \beta). \quad (1.60)$$

Из соображений симметрии, для нормально падающего на однородную среду света не должно быть бокового сдвига фазы [477]. Подстановка уравнения (1.59)

и (1.60) в уравнение (1.17) дает одномерное уравнение Гельмгольца второго порядка для распределения полной освещенности по глубине z в виде

$$\frac{d^2}{dz^2} U_0(z) - \mu_{\text{eff}}'^2 U_0(z) = -\frac{S_{\text{d0}}(z)}{D}, \quad (1.61)$$

где

$$\mu_{\text{eff}}' = \sqrt{\mu_{\text{eff}}^2 + k_x^2 + k_y^2} \equiv \frac{1}{\delta_{\text{eff}}'}. \quad (1.62)$$

Здесь плоская волна с обеими модуляциями по x и y дает начало волне фотонной плотности, распространяющейся со скалярным коэффициентом затухания μ_{eff}' . Хотя пространственная анизотропия может существовать в реальных биотканях, для простоты мы рассмотрим лишь одномерную задачу, которая достаточно полно описывает затухание скалярной волны фотонной плотности в рассеивающей среде. Соответственно, последующее обсуждение будет основано на рассмотрении только одной ненулевой пространственной частоты (вдоль направления x , $k = k_x$, с постоянным освещением по другой координате y ($k_y = 0$)). Более сложная анизотропная диффузионная модель для распространения пространственно-модулированных пучков рассмотрена в работе [483], где показано, что эффекты анизотропии не зависят от величины общего объемного рассеяния и поглощения в среде и вклады изотропно и анизотропно рассеивающих структур могут быть хорошо разделены.

Для нулевой пространственной частоты ($k = 0$) эффективная глубина проникновения света в рассеивающую среду δ_{eff}' эквивалентна таковой при планарном (немодулированном) освещении, $\delta_{\text{eff}} = 1/\mu_{\text{eff}}$. В общем же случае μ_{eff}' (и δ_{eff}') являются функциями как оптических свойств среды, так и пространственной частоты источника света. В одномерной форме уравнение (1.61) показывает, что амплитуда периодической волны фотонной плотности, $U_0(z)$ не зависит от поперечных координат x и y . И поскольку это уравнение идентично диффузионному уравнению для планарного освещения, можно использовать готовые решения для уравнения (1.17) путем простой замены μ_{eff} на μ_{eff}' .

Для изучения отражения при планарном освещении можно воспользоваться выражением для функции источника, полученной в работе [484] в виде

$$S_{\text{d0}}(z) = P_0 \mu_s' \exp(-\mu_{\text{tr}} z), \quad (1.63)$$

где P_0 — падающая оптическая мощность. Концептуально, это выражение представляет собой пространственно распределенный, но изотропный по углу источник света, сформированный за счет рассеяния в среде коллимированного нормально падающего на границу среды пучка. С учетом функции источника, описываемой уравнением (1.63), решение для полной освещенности в среде имеет вид

$$U_0(z) = \frac{3P_0\Delta'}{(\mu_{\text{eff}}'/\mu_{\text{tr}})^2 - 1} \exp(-\mu_{\text{tr}} z) + C \exp(-\mu_{\text{eff}}' z), \quad (1.64)$$

где Δ' — приведенное алbedo (см. уравнение (1.25)), а C — константа, определяемая выбором граничных условий. Используем граничные условия из работы [296], когда поток, j , устанавливается пропорциональным освещенности на границе раздела $z = 0$:

$$j|_{z \rightarrow 0^+} \equiv -\frac{\nabla U|_{z \rightarrow 0^+}}{3\mu_{\text{tr}}} = -AU|_{z \rightarrow 0^+}, \quad (1.65)$$

где коэффициент пропорциональности

$$A = \frac{1 - R_{\text{eff}}}{2(1 + R_{\text{eff}})}, \quad (1.66)$$

а эффективный коэффициент отражения определяется скачком среднего показателя преломления n на границе воздух — рассеивающая среда:

$$R_{\text{eff}} \approx 0,0636n + 0,668 + \frac{0,710}{n} - \frac{1,440}{n^2}. \quad (1.67)$$

Тогда константа C становится равной

$$C = -\frac{3P_0\Lambda'(1+3A)}{((\mu'_{\text{eff}}/\mu_{\text{tr}})^2 - 1)(\mu'_{\text{eff}}/\mu_{\text{tr}} + 3A)}, \quad (1.68)$$

а диффузный коэффициент отражения, $R_d(k)$:

$$R_d(k) = -\frac{j|_{z \rightarrow 0^+}}{P_0} = \frac{3A\Lambda'}{((\mu'_{\text{eff}}/\mu_{\text{tr}}) + 1)(\mu'_{\text{eff}}/\mu_{\text{tr}} + 3A)}. \quad (1.69)$$

Несмотря на то что в данном случае рассматривается одномерная гармоническая пространственная модуляция, более сложный случай для произвольной функции источника может быть описан путем использования линейной суперпозиции гармонических процессов по обоим направлениям x и y .

Для заданного набора оптических параметров среды функция $R_d(k)$ определяет диффузную пространственно-модуляционную передаточную функцию (s -MTF) этой среды (см. рис. 1.23). Простота выражения (1.69) позволяет провести качественное обсуждение физических свойств, которые оно описывает. Во-первых, зависимость R_d от пространственной частоты является обратной полиномиальной функцией единственной положительной величины — отношения $\mu'_{\text{eff}}/\mu_{\text{tr}}$, которое полностью описывает низкочастотные свойства пространственной фильтрации однородных рассеивающих сред в рамках стационарной диффузии:

$$\frac{\mu'_{\text{eff}}}{\mu_{\text{tr}}} = \sqrt{\frac{\mu_{\text{eff}}^2 + k^2}{\mu_{\text{tr}}^2}} = \sqrt{3\frac{\mu_a}{\mu_{\text{tr}}} + \frac{k^2}{\mu_{\text{tr}}^2}}, \quad (1.70)$$

$$\text{для } k = 0 \rightarrow \frac{\mu'_{\text{eff}}}{\mu_{\text{tr}}} = \sqrt{3(1-\Lambda')}, \quad \text{а для } k \gg \mu_{\text{eff}} \rightarrow \frac{\mu'_{\text{eff}}}{\mu_{\text{tr}}} = \frac{k}{\mu_{\text{tr}}}. \quad (1.71)$$

Низкочастотные и высокочастотные режимы пространственной модуляции имеют соответственно различную чувствительность к поглощению и рассеянию. Для $k = 0$ R_d является функцией только приведенного албеда. Кроме того, в приближении нулевого поглощения, $\mu'_{\text{eff}}/\mu_{\text{tr}} \rightarrow 0$, а $R_d \rightarrow 1$, т. е. все падающие фотоны отражаются обратно от рассеивающей среды. На низких пространственных частотах ($k \ll \mu_{\text{eff}}$) поглощение имеет максимальное влияние на отражение. В случае высоких частот модуляции ($k \gg \mu_{\text{eff}}$) знаменатель μ_{tr} ($\approx \mu'_s$ в диффузионном приближении) является единственным источником, обеспечивающим оптический контраст. В обоих пределах фигурирует отношение к транспортному коэффициенту, что подчеркивает важность естественного масштаба длины транспорта света, $l_{\text{tr}} = 1/\mu_{\text{tr}}$, средней транспортной длины пробега фотона. Фактически, выражения для освещенности и отражения могут быть записаны в безразмерном виде в единицах транспортной пространственной частоты, μ_{tr} , путем подстановки $\hat{\mu}_a = (\mu_a \cdot l_{\text{tr}})$, $\hat{k} = (k \cdot l_{\text{tr}})$, и $\hat{z} = z/l_{\text{tr}}$, где $\hat{\mu}'_{\text{eff}} = (3\hat{\mu}_a + \hat{k}^2)^{1/2}$ и $\hat{\Lambda}' \approx 1 - \hat{\mu}_a$.

Диффузионное приближение для уравнения переноса излучения справедливо, когда

$$\mu'_s \gg \mu_a, \quad (1.72)$$

поэтому из-за анизотропной природы рассеяния света в биотканях диффузионное приближение справедливо для расстояний от коллимированного источника:

$$\rho \gg l_{\text{tr}}. \quad (1.73)$$

В зависимости от используемого метода (принцип работы, геометрия, метод калибровки и т. д.) и выбранной степени точности измерений, практический предельный минимум для ρ лежит примерно в диапазоне от $3l_{tr}$ до $4l_{tr}$ [288, 485]. Аналогом пространственной частоты, соответствующей транспортной длине l_{tr} , является такая пространственная частота, которая в точности равна транспортному коэффициенту $\mu_{tr} = f_{x, tr} = (k_{tr}/2\pi)$. Если обратную величину ρ взять как метрику для пространственной частоты, тогда уравнение (1.73) может быть переписано в виде:

$$f_x \ll \mu_{tr} \equiv 1/l_{tr}. \quad (1.74)$$

Таким образом, в диффузионном приближении максимальные пространственные частоты, которые могут описаны, лежат в диапазоне от $1/(3l_{tr})$ до $1/(4l_{tr})$, или от $0,25\mu_{tr}$ до $0,33\mu_{tr}$. Требования, наложенные диффузионным приближением как на альbedo, так и на минимальное расстояние до источника, ограничивают величину отношения μ'_{eff}/μ_{tr} значениями, много меньшими единицы.

1.4.2.2. Моделирование методом Монте-Карло. Для более полного описания распространения пространственно-модулированного излучения в типичных биотканях с сильным рассеянием необходимо развить более совершенные модели для решения прямых задач, справедливые для более широкого диапазона значений альbedo и пространственных частот, чем дает диффузионное приближение. Доступно несколько подходов, основанных как на прямом численном решении уравнения переноса излучения [275, 486], так и на статистическом моделировании методом Монте-Карло [41, 196, 319, 326, 327]. В работе [479] авторы использовали так называемый метод «белого» Монте-Карло («White» Monte Carlo, WMC) [487, 488] для моделирования стационарного диффузного отражения рассеивающей среды с заданными оптическими свойствами (μ_a , μ_s и g), $R_d(\rho)$ при ее освещении коллимированным точечным источником. Такая пространственная точечная передаточная функция (s -PSF) дает импульсный отклик среды, а спектр пространственных частот диффузного отражения, $R_d(k)$, находится путем фурье-преобразования функции $R_d(\rho)$. Для радиально симметричной функции, каковой является $R_d(\rho)$, двумерное фурье-преобразование в плоскости x - y сводится к одномерному преобразованию Ханкеля нулевого порядка:

$$R_d(k) = 2\pi \int \rho J_0(k\rho) R_d(\rho) d\rho, \quad (1.75)$$

где $J_0(k\rho)$ — функция Бесселя первого рода нулевого порядка. При моделировании расстояние ρ разбивается на n конечных интервалов $\Delta\rho_i$. Тогда $R_d(k)$ рассчитывается как ряд по этим разбиениям:

$$R_d(k) = 2\pi \sum_{i=1}^n \rho_i J_0(k\rho_i) R_d(\rho_i) \Delta\rho_i. \quad (1.76)$$

В работе [479] моделирование Монте-Карло было выполнено для 10^7 фотонов, детектор имел числовую апертуру 0,22. Для всех вычислений показатель преломления n и фактор анизотропии g были соответственно взяты, как 1,33 и 0,71, чтобы можно было провести прямое сравнение с экспериментами на фантомах (липосин, Liposyn). Все радиальные разбиения пространственной координаты имели интервал $\Delta\rho = 0,09$ мм, что позволяет анализировать максимальную пространственную частоту, большую чем 5 мм^{-1} .

1.4.2.3. Результаты расчетов. Расчетные кривые для диффузного отражения как функции пространственной частоты (мм^{-1}), полученные в диффузионном приближении (пунктирные линии) и методом Монте-Карло (сплошные линии), даны

на рис. 1.25 а для различных значений l_{tr} при фиксированном значении отношения $(\mu'_s/\mu_a) = 100$ ($\Lambda' = 0,99$). Хорошо видно, что по мере увеличения l_{tr} (уменьшения μ_{tr}), диффузная модуляционная передаточная функция (s -MTF) перемасштабируется в сторону пропускания низких пространственных частот, что означает потерю высоких частот модуляции в результате рассеяния. Такое масштабирование с изменением l_{tr} соответствует наблюдениям авторов [479], когда образцы с более высоким рассеянием показывают очень четкие (наличие высоких частот) границы области отражения. Например, отражение при точечном освещении оказывается более локализованным в сильно рассеивающей среде (спектралон, Spectralon), чем в среде с меньшим рассеянием (биоткань *in vivo*). Более того, спектральный состав диффузного отражения $R_d(f_x)$ изменяется непосредственно с изменением μ_{tr} (или инверсно l_{tr}). Такое масштабирование μ_{tr} и f_x прямо следует из отношения μ'_{eff}/μ_{tr} в уравнениях (1.70) и (1.71) (диффузионное приближение), поэтому все пять кривых, полученных в диффузионном приближении, хорошо совпадают друг с другом, если их представить в зависимости от нормированной пространственной частоты, $(f_x/f_{x,tr}) = (f_x/\mu_{tr}) = (f_x \cdot l_{tr})$. Такое совпадение становится еще более точным в случае моделирования методом Монте-Карло. Поэтому удобно представлять кривые диффузного отражения именно в зависимости от нормированной частоты, $(f_x/f_{x,tr})$. Удобно также что, $\mu_{tr} = 1 \text{ мм}^{-1}$ ($l_{tr} = 1 \text{ мм}$) является хорошим приближением для транспортного коэффициента для многих биотканей, поэтому для кривых с высоким альбедо, $f_{x,tr}$ может быть взята как пропространственная частота $\sim 1 \text{ мм}^{-1}$ (1-мм-ПМ-интервал).

Сравнение диффузионного приближения с Монте-Карло-моделированием показывает, что диффузионное приближение немного завышает значения диффузного отражения для низких пространственных частот и довольно сильно занижает значения для высоких частот (см. рис. 1.25). Частично это происходит за счет выбора простой одноэкспоненциальной функции источника (см. уравнение (1.63)). В литературе описаны аналитические решения, содержащие более высокие порядки пространственных моментов функции источника [489, 490]. Они могут быть учтены в расчетах для повышения точности диффузионного приближения. Определяя ошибку диффузионного приближения как выраженное в процентах отличие от значений, полученных методом Монте-Карло, имеем для случая $\mu'_s/\mu_a = 100$ ошибку, равную 12 %, для частот $f_x \leq (2l_{tr})^{-1} = 0,5\mu_{tr}$.

Данные рис. 1.25 б позволяют провести сравнение двух моделей для малых значений приведенного альбедо (отношение μ'_s/μ_a изменяется от 30 до 3). На этом рисунке диффузное отражение представлено в зависимости от нормированной частоты, $f_x/f_{x,tr}$. И в этом случае диффузионное приближение завышает величину диффузного отражения на низких частотах и занижает ее на высоких. Кроме того, в таком представлении все кривые, полученные в диффузионном приближении, практически совпадают друг с другом на высоких частотах ($f_x/f_{x,tr} \sim 1$), в то время как для точного решения кривые довольно сильно отличаются друг от друга.

Для низких частот (ниже $0,5\mu_{tr}$) ошибка диффузионного приближения остается меньше 16 % для $\mu'_s/\mu_a = 30$ ($\Lambda' = 0,97$). Для более низких значений альбедо видно, что диффузионное приближение вносит существенную ошибку в абсолютное значение диффузного отражения, завышая это значение на низких частотах и занижая на высоких. Отметим, что в экспериментальных исследованиях, для того чтобы снизить влияние такого рода ошибок, всегда используется калибровочный (эталонный) образец (с известными значениями оптических параметров, определенных с использованием точных численных расчетов). Такая калибровка при исследовании образцов, оптические свойства (μ'_s/μ_a) которых в пределах $\pm 25\%$ совпадают с оптическими свойствами используемых фантомов, позволяет существенно улучшить

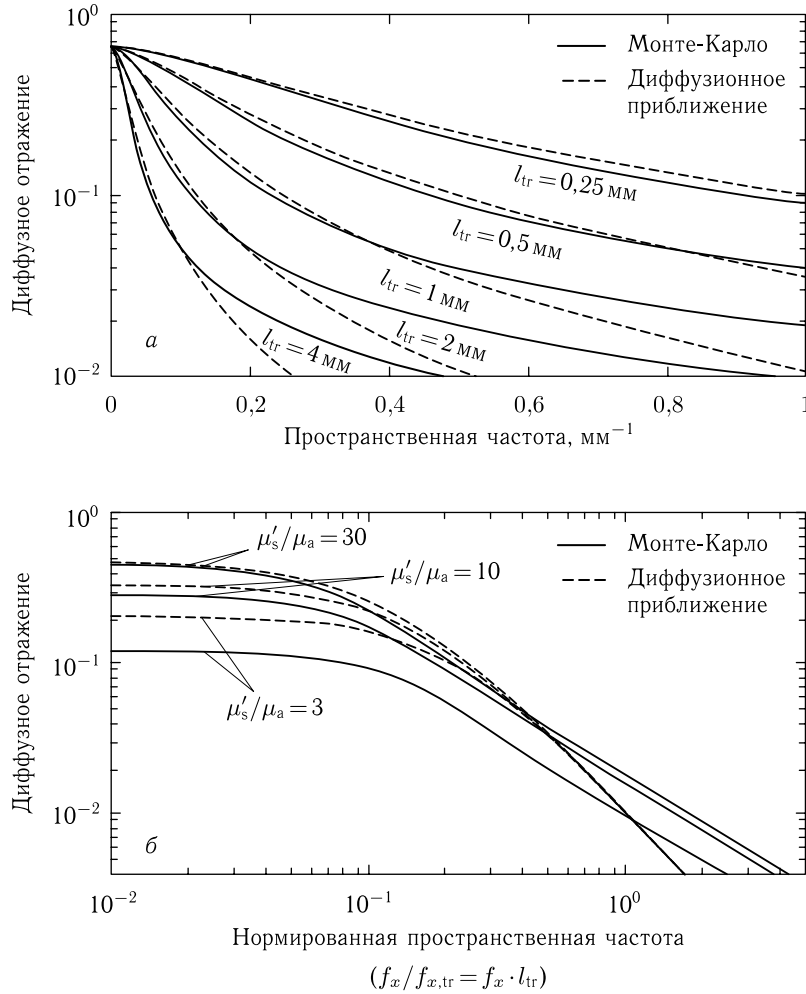


Рис. 1.25. Диффузное отражение: *a* — как функция пространственной частоты (mm^{-1}), рассчитанное в диффузионном приближении (пунктирные линии) и методом Монте-Карло (сплошные линии) для различных значений l_{tr} и $(\mu'_s/\mu_a) = 100$ ($\Lambda' = 0,99$); неточность диффузионного приближения находится в пределах 12% для $f_x \leq (2l_{tr})^{-1} = 0,5\mu_{tr}$; *б* — как функция нормированной пространственной частоты ($f_x/f_{x,tr} = f_x \cdot l_{tr}$), рассчитанное в диффузионном приближении (пунктирные линии) и методом Монте-Карло (сплошные линии) для различных значений приведенного альbedo (отношение μ'_s/μ_a); видно, что точность диффузионного приближения ухудшается с уменьшением альbedo [479]

точность диффузионного приближения, в частности довести ошибку до величины $< 10\%$ для $\mu'_s/\mu_a = 10$ на всех частотах [479]. Этот результат показывает, что можно достичь разумной точности диффузионного приближения и в случае сравнительно малых альbedo, если для калибровки использовать фантом с близким значением альbedo.

1.4.2.4. Измерение, визуализация и калибровка. Диффузная пространственно-модуляционная передаточная функция (*s*-MTF) рассеивающей среды может измеряться в геометрии пропускания или отражения. На практике освещение должно

быть в виде суперпозиции переменной (пространственно-модулированной) и постоянной (планарной) составляющих:

$$S = \frac{S_0}{2} [1 + M_0 \cos(2\pi f_x x + \alpha)], \quad (1.77)$$

где S_0 , M_0 , f_x , и α — соответственно интенсивность, глубина модуляции, пространственная частота и пространственная фаза модуляции источника излучения. В этом простейшем случае картина освещения постоянна по ортогональной координате y . В отражательной геометрии диффузно отраженная интенсивность (I) является суммой переменной (I_{AC}) и постоянной составляющих (I_{DC}):

$$I = I_{AC} + I_{DC}, \quad (1.78)$$

где измеренная переменная составляющая обратно рассеянного сигнала имеет вид

$$I_{AC} = M_{AC}(x, f_x) \cdot \cos(2\pi f_x x + \alpha). \quad (1.79)$$

Здесь $M_{AC}(x, f_x)$ представляет собой амплитуду огибающей отраженной стоячей волны фотонной плотности на частоте f_x . Отметим прежде всего, что M_{AC} может быть функцией пространственной координаты x , как это схематически показано на рис. 1.26 *a*. Кроме того, большое количество кривых для $M_{AC}(x, f_x)$ может быть зарегистрировано параллельно для каждой строки пикселей по оси y с помощью 2D-цифровой камеры, что позволяет получать одновременно миллионы значений диффузного отражения в различных точках пространства.

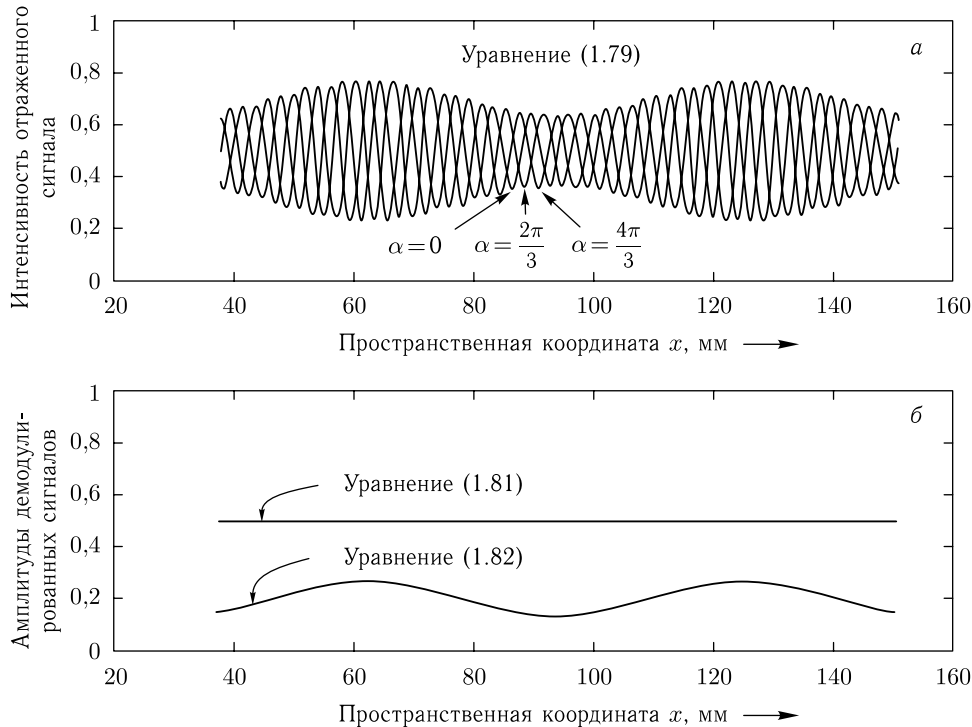


Рис. 1.26. Схематическое представление пространственно-модулированной интенсивности обратно рассеяния (*a*) и амплитуд демодулированных постоянного (DC) и переменного (AC) сигналов (*b*) [479]

Для демодуляции сигналов и получения $M_{AC}(x, f_x)$ могут быть использованы разнообразные методы, хорошо известные в радиофизике. В простейшем случае можно использовать временной демодуляционный метод [471], когда объект освещается три раза синусоидально-модулированной картиной на одной и той же частоте, но со сдвигами фазы: $\alpha = 0$, $(2/3)\pi$ и $(4/3)\pi$ радиан. Тогда $M_{AC}(x, f_x)$ может быть определено алгебраически в каждой точке x_i , с помощью

$$M_{AC}(x_i, f_x) = \frac{\sqrt{2}}{3} \left\{ [I_1(x_i) - I_2(x_i)]^2 + [I_2(x_i) - I_3(x_i)]^2 + [I_3(x_i) - I_1(x_i)]^2 \right\}^{1/2}, \quad (1.80)$$

где I_1 , I_2 , и I_3 представляют элементы изображения I_{AC} в каждой точке для трех сдвигов пространственной фазы. Такой дифференциальный подход удобен по следующим причинам: 1) автоматически убираются все общие для трех картин неоднородности, включая средний шум изображения и погрешности оцифровки; 2) метод не требует знания пространственной частоты, что исключает необходимость дополнительной калибровки, которая потенциально всегда вносит свои погрешности; 3) автоматически исключается постоянная засветка, присутствующая на каждом зарегистрированном изображении. Амплитуда пространственно-зависимой постоянной составляющей, $M_{DC}(x)$, может быть рассчитана, как и ранее, из измерений на нулевой частоте, $f_x = 0$, или на любой другой частоте модуляции интенсивности источника:

$$M_{DC}(x_i) = \frac{1}{3} [I_1(x_i) + I_2(x_i) + I_3(x_i)]. \quad (1.81)$$

На рис. 1.26 схематически показаны как пространственно-зависимая модулированная интенсивность обратного рассеянного сигнала (*а*), так и амплитуды демодулированных составляющих (AC и DC) этого сигнала (*б*).

В частотном представлении измерение $M_{AC}(x_i, f_x)$ представляет собой произведение 1) интенсивности света, I_0 ; 2) пространственной модуляционной передаточной функции (*s*-MTF) освещающей и изображающей оптических систем, $s\text{-MTF}_{\text{system}}$ и 3) *s*-MTF исследуемой рассеивающей среды, $R_d(x_i, f_x)$:

$$M_{AC}(x_i, f_x) = I_0 \cdot \text{MTF}_{\text{system}}(x_i, f_x) \cdot R_d(x_i, f_x). \quad (1.82)$$

Таким образом, можно одновременно проводить калибровку абсолютной интенсивности источника и $s\text{-MTF}_{\text{system}}$ оптической системы с помощью калибровки $M_{AC, \text{ref}}(x, f_x)$, на фантомах с известными оптическими свойствами. Используя измеренное калибровочное значение для диффузного отражения на фантоме, $R_{d, \text{ref}, \text{pred}}(f_x)$, можно записать величину диффузного отражения в каждой точке как

$$R_d(x_i, f_x) = \frac{M_{AC}(x_i, f_x)}{M_{AC, \text{ref}}(x_i, f_x)} \cdot R_{d, \text{ref}, \text{pred}}(f_x). \quad (1.83)$$

Такая отдельная корректировка частотного отклика системы является достоинством измерений спектра пространственных частот (spatial-frequency-domain, SFD), которые исключают необходимость деконволюции пространственной точечной передаточной функции (*s*-PSF) оптической системы, что обычно вносит дополнительный шум и неопределенность в измерения. В идеале, при проведении сравнительных измерений с фантомом, поверхности исследуемого образца ткани и фантома должны быть идентичны или их различия должны быть скомпенсированы численно на основе дополнительных измерений с помощью профилометра [479].

Для заданной частоты модуляции в уравнении (1.69) содержится два неизвестных параметра μ_a и μ'_s , которые необходимо определять как для спектроскопических, так и томографических целей. Для отдельного определения этих двух параметров

необходимо провести измерения, по крайней мере, на двух пространственных частотах. Это принцип хорошо иллюстрируется номограммой, представленной на рис. 1.27, где $R_d(\text{DC})$ и $R_d(\text{AC})$ соответствуют измерениям диффузного отражения на нулевой и ненулевой пространственных частотах f_1 и f_2 . Линии соответствуют постоянным значениям коэффициента поглощения и приведенного коэффициента рассеяния. В качестве примера на рис. 1.27 показаны пунктирные линии, которые показывают, что если измерения дают $R_d(0 \text{ мм}^{-1}) = 0,55$ и $R_d(0,5 \text{ мм}^{-1}) = 0,06$, то $\mu_a \approx 0,03$ и $\mu'_s \approx 1,4 \text{ мм}^{-1}$. Следует обратить внимание на ортогональность контурных линий для поглощения и рассеяния, что означает возможность раздельного определения этих коэффициентов с максимальной чувствительностью. Это обусловлено выбором частот модуляции далеко отстоящих друг от друга: $f_1 = 0 \text{ мм}^{-1}$ и $f_2 = 0,5 \text{ мм}^{-1}$ (DC и AC). Соответственно, по мере того как x - и y -пространственные частоты становятся ближе друг к другу, эти линии будут менее ортогональными и связь между определяемыми коэффициентами поглощения и рассеяния будет нарастать. Отметим еще раз, что измерения AC и DC могут быть легко реализованы с использованием только трех фазовых проекций на одной и той же пространственной частоте модуляции (см. уравнения (1.80) и (1.81)), что позволяет быстро и с хорошим разрешением получать изображения с контрастированием по поглощению и рассеянию.

1.4.3. Пространственно-модуляционная спектроскопия и визуализация биотканей

1.4.3.1. Решение обратной задачи. Спектроскопия и визуализация биологических тканей с контрастом по поглощению или рассеянию определяется решением обратной задачи по восстановлению оптических свойств объекта по измеренным характеристикам отражения или пропускания света. В работе [479] рассмотрены два метода решения обратной задачи для восстановления оптических параметров (коэффициентов поглощения и рассеяния) из измерений диффузного отражения. Первый из них использует «сви́пирование» (перестройку) по пространственным частотам, по аналогии с хорошо разработанным широкополосным временным частотным методом [491] (см. разд. 1.3), для получения переопределенного набора экспериментальных данных, которые удовлетворяют уравнению (1.69) при использовании процедуры минимизации методом наименьших квадратов. Второй, более быстрый метод, уже описанный выше, использует поисковую номограмму (см. рис. 1.27) и кубическую сплайн-интерполяцию (метод «griddata» в MATLAB) данных для решения прямой задачи на двух пространственных частотах. При использовании персональных компьютеров этот метод позволяет обеспечить миллионы поисковых расчетов в секунду.

На рис. 1.28 представлена схема получения данных на примере пространственно-модуляционных измерений, выполненных *in vivo*. Данные для интенсивности, измеренные на каждой частоте (три фазовых изображения для каждой частоты), демодулируются, калибруются и последовательно обрабатываются с помощью уравнений (1.80), (1.83) и (1.69). Данные обрабатываются отдельно для каждого пикселя, в результате генерируются карты распределения оптических свойств (коэффициентов поглощения и рассеяния).

В отличие от других методов с пространственным разрешением, ПМ-метод дает совпадающие аксиальные «проекционные» измерения оптического контраста для количественного определения оптических свойства для каждой точки на плоскости x - y , что позволяет обеспечить удобные измерения усредненных по оси z оптических свойств биотканей. По сравнению измерениями, использующими «точечное» освещение, ПМ-метод анализирует лишь сравнительно низкочастотные моменты пространственной передаточной функции. Зондирования объекта на этих частотах ($<1 \text{ мм}^{-1}$) вполне достаточно для раздельного определения поглощающих и рассеивающих оп-

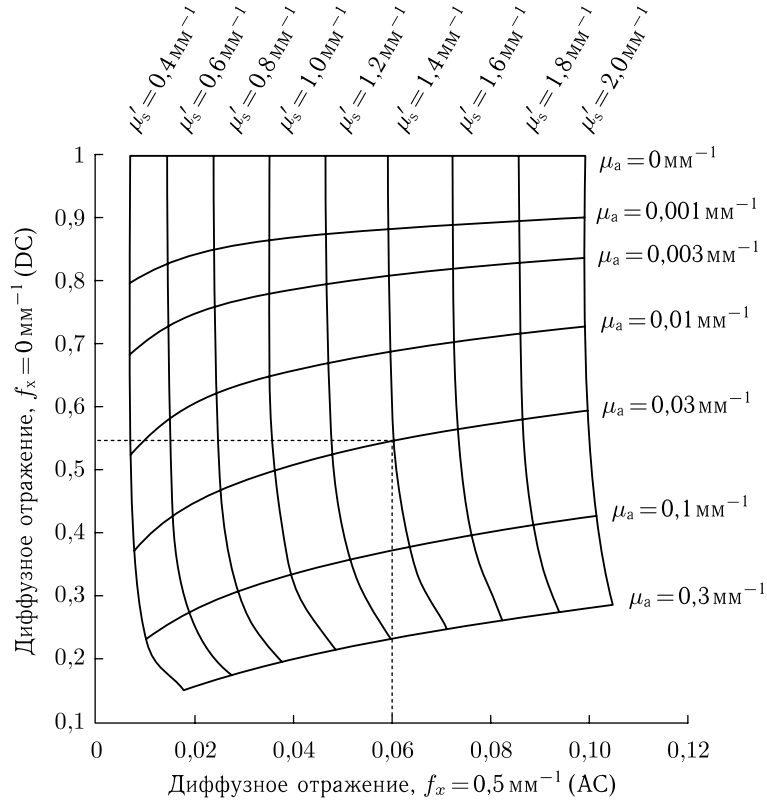


Рис. 1.27. Номограмма, рассчитанная на основе решения прямой задачи в рамках диффузионной модели для двух пространственных частот (DC и AC) Она служит для быстрого подсчета оптических параметров. Показаны линии постоянных значений коэффициента поглощения и приведенного коэффициента рассеяния. Пунктирные линии иллюстрируют работу метода номограмм при решении обратных задач рассеяния, когда по измеренным значениям постоянной (DC) и переменной (AC) составляющих диффузного отражения определяют значения оптических параметров μ_a и μ'_s [479]

тических свойств среды, исключая при этом неопределенность, которая свойственна измерениям на высоких пространственных частотах (например, измерение отражения вблизи источника).

1.4.3.2. Экспериментальные исследования фантомов биотканей. Для проверки точности ПМ-метода были изготовлены 16 рассеивающих фантомов с использованием жировой эмульсии (Liposyn) из одной партии изготовления и базового водного раствора красителя нигрозина (pigrosin) для получения соответственно необходимых рассеивающих и поглощающих свойств фантомов. В первых 8 фантомах коэффициент поглощения, μ_a , изменялся в пределах двух порядков (в логарифмическом масштабе в диапазоне $0,002 \text{ мм}^{-1} \leq \mu_a \leq 0,12 \text{ мм}^{-1}$) при постоянном коэффициенте рассеяния $\mu'_s = 0,97 \text{ мм}^{-1}$. Во второй группе фантомов μ'_s линейно изменялся в интервале $0,32 \text{ мм}^{-1} \leq \mu'_s \leq 1,8 \text{ мм}^{-1}$ при постоянном коэффициенте поглощения $\mu_a = 0,0046 \text{ мм}^{-1}$. Эти значения были рассчитаны на основе измерений в бесконечной геометрии с помощью многочастотного (от 50 до 500 МГц) много-дистантного (от 10 до 25 мм) временного частотного метода [296] для одного из этих фантомов.

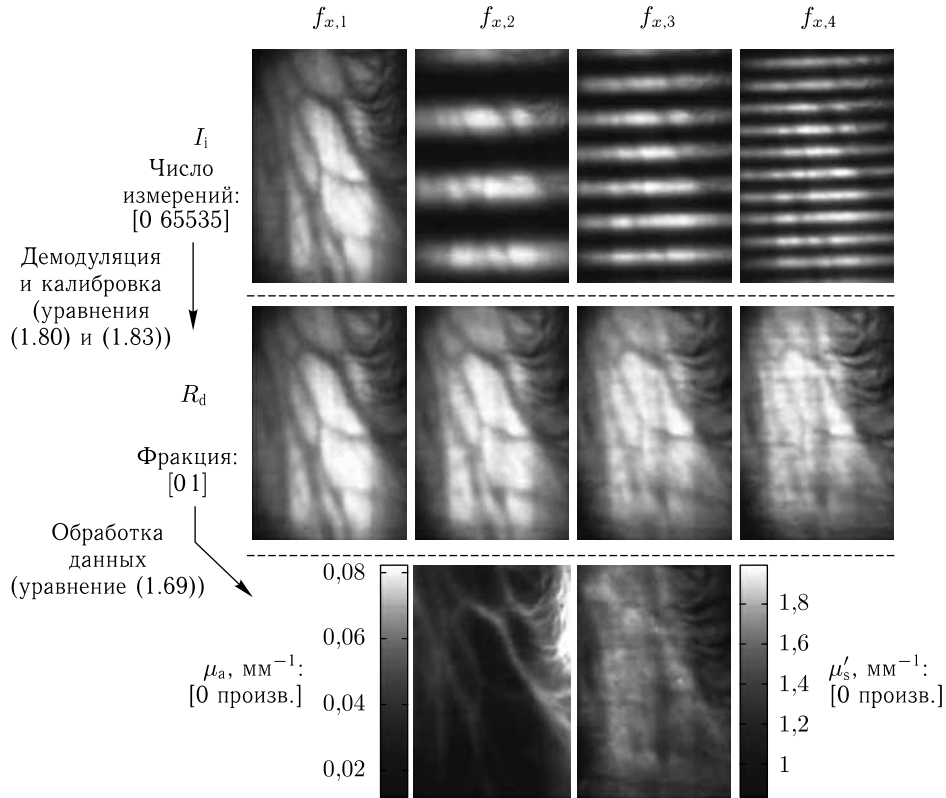


Рис. 1.28. Схематическое представление последовательности операций при обработке данных по визуализации методом пространственной модуляции. Данные для интенсивности на каждой их четырех пространственных частот $f_{x,1}$, $f_{x,2}$, $f_{x,3}$, $f_{x,4}$ (три фазовых изображения для каждой частоты) демодулируются, калибруются и последовательно обрабатываются с использованием уравнений (1.80), (1.83) и (1.69). Данные обрабатываются отдельно для каждого пикселя, в результате генерируются карты распределения оптических свойств. Для того, чтобы сделать изображения визуально сравнимыми, они строятся по точкам в пределах трех стандартных отклонений от среднего для каждого индивидуального изображения. Отметим, что дифференциальный контраст для диффузного отражения (R_d) на разных частотах (f_x), является основой для раздельного определения поглощения и рассеяния [479]

Для модуляции падающей интенсивности были выбраны 30 пространственных частот, лежащих в диапазоне от 0 мм^{-1} до $0,13 \text{ мм}^{-1}$, что соответствовало получению 90 изображений для каждого фантома (три пространственные фазы для каждой частоты). Расстояния между частотами были выбраны так, чтобы максимально точно характеризовать пространственно-модуляционную передаточную функцию для всех фантомов, а именно с более узким интервалом в области низких частот и с более широким в области высоких. Все измерения были проведены на длине волны 660 нм с освещающей областью на фантоме примерно $75 \times 75 \text{ мм}$, полем зрения камеры $50 \times 50 \text{ мм}$ и временем интегрирования в 100 мс . Отдельные фантомы были исследованы в случайно выбранном порядке, и все измерения были повторены три раза для проведения статистического усреднения.

Модуляционные изображения для переменной составляющей (АС) диффузного отражения для каждой частоты были получены с использованием уравнения (1.80).

При использовании полного разрешения ПЗС-камеры попиксельный подход для демодуляции дает примерно 250 000 отдельных измерений отражения на каждую пространственную частоту, что подчеркивает возможности метода для статистического анализа результатов таких измерений. Поскольку фантомы на основе жировой эмульсии являются однородными, для ускорения расчетов на каждом изображении было сделано объединение 20×20 пикселей, в результате были получены модуляционные изображения с низким разрешением (15×15 пикселей). Результирующие 30 изображений дают количественные измерения амплитуды АС в каждой из 100 пространственных локализаций в пределах поля зрения. Для калибровки выбирался один из 16 фантомов. Используя данные измерений оптических свойств выбранного фантома временным частотным методом, рассчитывали диффузное отражение, $R_{d,ref,pred}(f_x)$. А затем для каждой пространственной частоты и локализации с помощью уравнения (1.83) рассчитывается $R_d(f_x)$ образца.

Диффузионная модель (см. уравнение (1.69)) использовалась для реконструкции значений μ_a и μ'_s как с помощью процедуры минимизации методом наименьших квадратов с использованием алгоритма («fminsearch» MATLAB), так и на основе двухчастотных номограмм с наименьшей пространственной частотой (0 мм^{-1}) и наивысшей ($0,13 \text{ мм}^{-1}$). Для каждого фантома значения коэффициентов поглощения и рассеяния восстанавливались для каждой пространственной точки изображения отдельно. Поскольку фантомы однородны, они дают возможность исследовать точность метода путем вычисления среднего значения и стандартного отклонения для каждого изображения реконструированных оптических свойств.

Результаты усредненных измерений для диффузного отражения в зависимости от пространственной частоты представлены на рис. 1.29. Здесь также приведен набор экспериментальных данных для вариации поглощения и рассеяния, соответственно на рис. 1.29 а и рис. 1.29 б (точки). Сплошные линии представляют соответствующие расчетные данные (фиттинг) на основе диффузионной модели для расчета диффузного отражения (см. уравнение (1.69)). Экспериментальные данные для поглощения демонстрируют, что рост поглощения способствует уменьшению отражения. При этом чувствительность к изменениям поглощения (контраст по поглощению) наибольшая на низких пространственных частотах. Напротив, увеличение рассеяния приводит к росту амплитуды диффузного отражения с некоторым перераспределением в сторону больших пространственных частот (уменьшение l_{tr}). При этом чувствительность к изменению рассеяния (l_{tr}) (контраст по рассеянию) примерно одинаковая для всех пространственных частот. Все модельные расчетные данные, на рис. 1.29 (сплошные линии), показывают отличное согласование с экспериментом с типичной ошибкой, меньше 0,02, что вполне удовлетворительно, поскольку все измерения калибровались только по единственному контрольному образцу. Наибольшие расхождения между экспериментом и моделью имеют место на высоких частотах для наиболее слабо рассеивающего фантома ($\mu'_s = 0,32 \text{ мм}^{-1}$, $l_{tr} \approx 3 \text{ мм}$). Это находится в соответствии с зависимостями для l_{tr} на рис. 1.25, где ожидаемое нарушение работы модели приходится на $f_x = 1/(2l_{tr}) \approx 0,16 \text{ мм}^{-1}$.

В эксперименте по вариациям поглощения восстановленные значения поглощения по отношению к ожидаемым показывают высокую линейность в пределах двух порядков величины при изменении альбедо от высоких до малых значений (от $\mu'_s/\mu_a = 500$ до $\mu'_s/\mu_a = 8$). Аналогичная линейность наблюдается и для эксперимента по вариациям рассеяния, однако с несколько большими флуктуациями. Восстановленные значения поглощения в этом случае показывают менее чем 15%-отклонение от ожидаемого значения. Стандартное отклонение для восстановленных оптических параметров по полю в 15×15 пикселей в основном оказывается меньше 1%, что

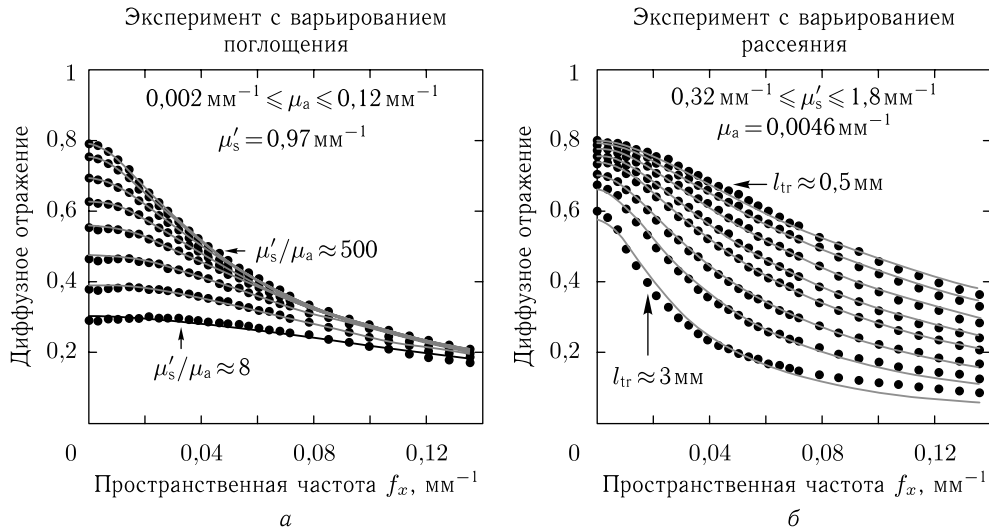


Рис. 1.29. ПМ-измерения на фантомах (Liposyn/nigrosin) [479]. Экспериментальные данные представлены точками, а результаты фиттинга в рамках диффузионной модели (уравнение (1.69)) — сплошными линиями. По мере увеличения поглощения диффузное отражение на низких пространственных частотах существенно уменьшается, в то время как высокие частоты мало чувствительны к контрастированию за счет поглощения (а). Рост рассеяния приводит к увеличению диффузного отражения на всех пространственных частотах (б). Имеет место хорошее согласование экспериментальных данных с теоретическими расчетами в рамках диффузионного приближения

означает как высокую точность измерений, так и пространственную однородность фантомов в пределах поля зрения.

В табл. 1.2 приведены значения средних ошибок при восстановлении оптических параметров фантомов (Liposyn/nigrosin) в экспериментах по вариации поглощения и рассеяния для двух моделей восстановления параметров — многочастотной (30-частотный фиттинг) и с использованием номограмм (2-частотный фиттинг). Усредненная ошибка при восстановлении коэффициента поглощения составляет примерно 6%, а приведенного коэффициента рассеяния — примерно 3%. В общем случае двухчастотный номограммный метод решения обратной задачи дает сравнимую ошибку с многочастотным методом. Для биологических тканей с их пространственной неоднородностью ожидается, что многочастотный метод окажется более надежным при определении оптических параметров. Тем не менее, в тех ситуациях, когда нужна скорость анализа и возможность быстрой обратной связи при измерениях, несмотря на некоторую потерю точности, двухчастотный номограммный метод может оказаться полезным.

Наибольшие ошибки при решении обратной задачи возникают при малых значениях как поглощения, так и рассеяния. Поскольку ПМ-метод является планарным, то это означает, что фотоны с короткими длинами путей миграции зондируют относительно поверхностные объемы среды, т. е. они менее чувствительны к малым величинам поглощения и рассеяния, поскольку длина пути взаимодействия очень большая в этом случае.

Для понимания объемных эффектов, связанных с миграцией фотонов как в глубину, так и вдоль поверхности среды, что важно при интерпретации изображений биотканей, авторы работы [479] исследовали пространственное разрешение неодно-

Таблица 1.2

Значения средних ошибок при восстановлении оптических параметров фантомов (Liposyn/nigrosin) в экспериментах по вариации поглощения и рассеяния. Усредненная ошибка при восстановлении коэффициента поглощения составляет примерно 6%, а приведенного коэффициента рассеяния — примерно 3% [479]

Эксперимент по поглощению			Эксперимент по рассеянию		
Средняя ошибка (%)	30-частотный фиттинг	2-частотный фиттинг	Средняя ошибка (%)	30-частотный фиттинг	2-частотный фиттинг
μ_a ошибка	4,74	4,85	μ_a ошибка	7,51	11,4
μ'_s ошибка	2,98	2,29	μ'_s ошибка	3,05	10,2

родных (гетерогенных) оптических фантомов. Было изготовлено восемь однородных твердых фантомов на основе желатина, в которых краситель нигрозин (nigrosin) использовался как поглотитель, а жировая липосиновая эмульсия (Liposyn) — как рассеивающий агент. Гетерогенные фантомы собирались при размещении образцов фантомов с разными оптическими свойствами плотно, рядом друг с другом. Таким образом, были получены фантомы со ступенчатым изменением в 300% по поглощению ($\mu_{a1} = 0,01 \text{ мм}^{-1}$, $\mu_{a2} = 0,03 \text{ мм}^{-1}$; $\mu'_{s1,2} = 1,0 \text{ мм}^{-1}$) или по рассеянию ($\mu_{a1,2} = 0,02 \text{ мм}^{-1}$; $\mu'_{s1} = 0,5 \text{ мм}^{-1}$, $\mu'_{s2} = 1,5 \text{ мм}^{-1}$) на длине волны 660 нм. Этот гетерогенный фантом был исследован непосредственно, а также при наложении на него сверху 2-мм однородного слоя с оптическими свойствами: $\mu_a = 0,01 \text{ мм}^{-1}$, $\mu'_s = 0,5 \text{ мм}^{-1}$. Калибровка была осуществлена с помощью однородного фантома с параметрами $\mu_a = 0,02 \text{ мм}^{-1}$, $\mu'_s = 1,0 \text{ мм}^{-1}$. ПМ-измерения были проведены для девяти пространственных частот между 0 мм^{-1} и $0,11 \text{ мм}^{-1}$ и далее обработаны с помощью регрессионного метода наименьших квадратов в рамках диффузионной модели для получения карт распределения оптических свойств — коэффициента поглощения и приведенного коэффициента рассеяния.

Пространственные профили для восстановленных оптических свойств усреднялись по вертикальному направлению. В результате получали краевую функцию отклика, которая зависит как от глубины, так и оптических свойств. Для обоих экспериментов с вариацией поглощения и рассеяния наблюдалась деградация пространственного разрешения и контраста при наблюдении через 2-мм однородный рассеивающий слой по сравнению с непосредственными исследованиями поверхности гетерогенного фантома. В частности, измеренный контраст через рассеивающий однородный слой составляет примерно 15% и 5% от измеренного без слоя соответственно для поглощения и рассеяния. При определении пространственного разрешения как расстояния, на котором контраст краевого отклика уменьшается на 90%, было найдено что пространственное разрешение по поглощению составило 0,3 мм, а по рассеянию — 0,05 для самого фантома и соответственно 0,5 мм и 0,25 мм для фантома, покрытого 2-мм слоем однородного рассеивателя.

Хотя обсуждаемые характеристики предполагают возможность получения высокого оптического контраста на малых пространственных масштабах, реальная ситуация должна, кроме того, зависеть от пространственной частоты освещения и шума в измерительной системе. В общем случае для заданной глубины можно ожидать разрешение по глубине тем больше, чем выше точность измерений и число используемых частот (число источников), а для разрешения по x - y чем больше число точек пространственного зондирования (число детекторов) [492].

1.4.3.3. Заключение. Таким образом показано, что ПМ-метод на основе пространственно-частотных измерений диффузного отражения от рассеивающей среды,

аналитического решения в рамках диффузионной модели или численного решения прямой транспортной задачи в рамках статистического моделирования методом Монте-Карло позволяет обеспечить количественные измерения оптических параметров среды как для фантомов, так и биотканей *in vivo*. Важно отметить, что это принципиально бесконтактный метод, который не требует волоконных источников и приемников излучения. На основе многочастотного зондирования [494] ПМ-метод может быть распространен на количественное картирование эндогенных или экзогенных хромофоров [476, 481, 482, 493], отвечающих за функциональное состояние биоткани, с разрешением по глубине и с учетом многослойности ткани. Пространственная анизотропия оптических свойств биотканей, например кожи [495], также может быть успешно исследована с помощью ПМ-метода. В работе [483] показано, что ПМ-метод позволяет разделить вклады изотропно и анизотропно рассеивающих структур, что дает новые диагностические возможности.

1.5. Заключение

Итак, в результате описания взаимодействия сравнительно низкоинтенсивного (не вызывающего заметные тепловые эффекты) непрерывного, импульсного, модулированного по интенсивности во времени и пространстве оптического излучения с биологическими тканями, которое в основном сводится к рассеянию и поглощению излучения различными структурами биоткани, что, в свою очередь, отражается на характеристиках прошедшего или отраженного света, оказывается возможным построить практические оптические измерительные схемы для количественного раздельного определения оптических параметров биоткани и пространственной визуализации макронеоднородностей, ассоциированных с пространственными вариациями значений оптических параметров. При восстановлении истинных БИК-спектров поглощения биотканей на фоне сильного рассеяния оказывается возможным осуществлять мониторинг метаболических процессов живого организма, включая определение степени оксигенации крови, полного гемоглобина, содержания воды в тканях, что дает возможность изучать активность головного мозга, работу мышц, оценивать состояние опухоли, в том числе и при фотодинамической терапии.

Томографические схемы для визуализации патологических включений в биоткань используют контрастирование как по поглощению, так и по рассеянию. Поскольку поглощение непосредственно связано с протеканием метаболических реакций в ткани, то возможна так называемая функциональная визуализация с разрешением как в пространстве, так и во времени.

Кроме представленных выше в этой главе спектроскопических методов и устройств, а также методов визуализации, следует отметить еще целый ряд публикаций, в которых описаны как непрерывные методы, в том числе и с пространственным разрешением [496–511], импульсные методы [511–542], методы на основе временных волн фотонной плотности [484, 485, 491, 511, 543–554], а также стоячих волн фотонной плотности при пространственной модуляции освещающего пучка [474, 476, 478, 479, 481, 493]. Некоторые методы и устройства для спектроскопии и визуализации биотканей, описанные в этих работах, будут представлены в главах 10 и 11.

Глава 2

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ПОЛЯРИЗОВАННОГО СВЕТА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЯХ

Описываются структура и анизотропия биологических тканей, особенности рассеяния света отдельной частицей, поляризационные явления. Представлены основные характеристики поляризованного света, методы его регистрации, а также взаимодействия со случайной однократно рассеивающей средой, являющейся моделью биоткани. Обсуждается векторное уравнение теории переноса излучения и моделирование поляризационных характеристик биотканей методом Монте-Карло. Представлены поляризационные характеристики сильно рассеивающих биотканей, цельной крови и фантомов.

2.1. Введение

До сих пор мы игнорировали векторную природу переноса излучения в рассеивающих средах, таких как биоткани, поскольку мы предполагали, что оно быстро деполяризуется при распространении в случайно-неоднородной среде. Распространенным мнением является то, что случайный характер структуры биоткани ведет к быстрой деполяризации распространяющегося в ней света и, следовательно, поляризационными эффектами можно пренебречь. Однако в некоторых биотканях (например, прозрачных тканях глаза — роговице и хрусталике, монослоях клеток, слизистой оболочке и поверхностных слоях кожи) степень поляризации прошедшего или отраженного света остается доступной для измерения, даже если биоткань имеет значительную толщину. В таком случае информацию о структуре биотканей и клеточных ансамблей можно извлечь из измерений степени деполяризации первоначально поляризованного света, из преобразования поляризационного состояния, или из появления поляризованной компоненты в рассеянном излучении [3, 5, 6, 59, 67–70, 105, 129, 135, 138, 150, 153, 166, 176, 211, 212, 214, 215, 221, 224, 225, 232, 278, 555–749].

Что касается практических приложений, поляризационные методы, как ожидается, могут послужить основой для более простых схем оптической медицинской томографии по сравнению с временными методами, а также дать дополнительную информацию о структуре биотканей [555–749].

2.2. Структура и анизотропия биотканей

Многие биологические ткани обладают оптической анизотропией [3, 9, 6, 10, 24, 29, 43, 59–70, 97, 127–130, 135, 138, 153, 166, 176, 216, 217, 323, 234, 246, 247, 609–663, 666–671, 680, 684–687, 690, 691–732, 737, 738]. Двулучепреломление биотканей обусловлено главным образом линейной анизотропией волокнистых структур, которые образуют внеклеточные среды. Показатель преломления имеет большую величину вдоль волокон, чем поперек. Для таких биотканей характерна структура,

состоящая из параллельных цилиндров, образующих одноосную двулучепреломляющую среду с оптической осью, параллельной оси цилиндров. Это называется двулучепреломлением формы. Такой тип двулучепреломления характерен для множества разнообразных биотканей, таких как роговица глаза, хрящ, сухожилие, склера глаза, твердая мозговая оболочка (*dura mater*), ткань яичка, мышца, нерв, сетчатка глаза, кость, зубы, миелин и др. Все эти биоткани содержат одноосные и/или двуосные двулучепреломляющие структуры. Например, в костях и зубах это минерализованные структуры, происходящие из кристаллов гидроксиапатита, которые играют важную роль в двулучепреломлении твердых биотканей. В частности, зубная эмаль является упорядоченным набором таких кристаллов, окруженных белково-водно-липидным матриксом [65, 66, 97, 153, 635, 637, 638]. Хорошо ориентированные гексагональные кристаллы гидроксиапатита диаметром приблизительно 30–40 нм и длиной до 10 мкм упакованы в органический матрикс и образуют эмалевые призмы (или стержни) с полным поперечным сечением 4–6 мкм. Призмы эмали ориентированы приблизительно перпендикулярно поверхности зуба. Дентин зуба — сложная структура, пронизанная дентиновыми тубулами, которые представляют собой полые органические цилиндры с сильно минерализованной оболочкой. Диаметры тубул 1–5 мкм, а их число лежит в диапазоне $(3-7) \cdot 10^6 \text{ см}^{-2}$ [65, 66, 97, 153, 635, 750, 751].

Сухожилие состоит в основном из параллельных плотно упакованных коллагеновых волокон, образующих параллельные пучки с вкраплением длинных эллипсоидальных фибробластов. В общем случае волокна сухожилия имеют цилиндрическую форму с диаметром от 20 до 400 нм [246, 247]. Упорядоченная структура коллагеновых волокон, идущих вдоль одной оси, делает сухожилие сильно двулучепреломляющей тканью.

Артерии имеют более сложную структуру, чем сухожилия. Медиальный слой состоит главным образом из плотно упакованных клеток гладкой мышцы со средним диаметром 15–20 мкм. Наружный адвентициальный слой состоит из плотной фиброзной соединительной ткани. Адвентициальная оболочка образована, в основном, коллагеновыми волокнами диаметром 1–12 мкм и более тонкими эластиновыми волокнами диаметром 2–3 мкм. Как и у сухожилия, цилиндрические коллагеновые и эластиновые волокна ориентированы преимущественно вдоль одной оси, что обуславливает двулучепреломление.

С другой стороны, миокард содержит волокна, ориентированные вдоль двух различных осей. Миокард состоит преимущественно из волокон сердечной мышцы, образующих ленты, выходящие вокруг желудочков и предсердия. У свиней сердечная мышца миокарда содержит в себе миофибриллы (около 1 мкм в диаметре), которые, в свою очередь, состоят из цилиндрических миофиламентов (5–15 нм в диаметре) и асферических митохондрий (1–2 мкм в диаметре). Для миокарда типично двулучепреломление, поскольку показатель преломления вдоль оси мышечного волокна отличается от показателя преломления в поперечном направлении [246, 247].

Двулучепреломление формы возникает, когда оптическая разность фаз между двумя ортогонально поляризованными компонентами отлична от нуля для света, рассеянного вперед. После многократных актов рассеяния вперед накапливается относительная разность фаз и между ортогонально поляризованными компонентами образуется запаздывание (δ_{oe}), аналогичное тому, которое возникает в двулучепреломляющих кристаллических средах. Для упорядоченных линейных структур рост фазовой задержки можно характеризовать разностью эффективных показателей преломления для света, поляризованного вдоль и поперек длинной оси линейной структуры (Δn_{oe}). Влияние двулучепреломления биоткани на распространение линейно поляризованного света зависит от угла между направлением поляризации падающего света и оптической осью вещества биоткани. Фазовая задержка δ_{oe} между

ортогонально поляризованными компонентами пропорциональна расстоянию d , пройденному в двулучепреломляющей среде [628]:

$$\delta_{oe} = \frac{2\pi d \Delta n_{oe}}{\lambda_0}. \quad (2.1)$$

Среда из параллельных цилиндров является положительной одноосной двулучепреломляющей средой ($\Delta n_{oe} = (n_e - n_o) > 0$) с оптической осью, параллельной осям цилиндров (см. рис. 2.1 *a*). Поэтому луч, у которого электрический вектор направлен параллельно осям цилиндров, будет называться «необыкновенным», а луч, у которого электрический вектор перпендикулярен осям цилиндров, — «обыкновенным». Электрический вектор необыкновенного луча лежит в главной плоскости, т. е. в той же плоскости, что и оптическая ось. Разность $(n_e - n_o)$ между показателями преломления необыкновенной и обыкновенной волн является мерой двулучепреломления среды, состоящей из цилиндров. В рэлеевском пределе ($\lambda \gg$ диаметра цилиндра) двулучепреломление формы определяется соотношением [611, 614]

$$\Delta n_{oe} = (n_e - n_o) = \frac{f_1 f_2 (n_1 - n_2)^2}{f_1 n_1 + f_2 n_2}, \quad (2.2)$$

где f_1 — объемная доля цилиндров; f_2 — объемная доля базового вещества, а n_1 , n_2 — соответствующие показатели преломления. При заданной разности показателей преломления максимальное двулучепреломление ожидается для примерно равных объемных долей тонких цилиндров и базового материала. Для систем с большими диаметрами цилиндров ($\lambda \ll$ диаметра цилиндров) двулучепреломление стремится к нулю [614].

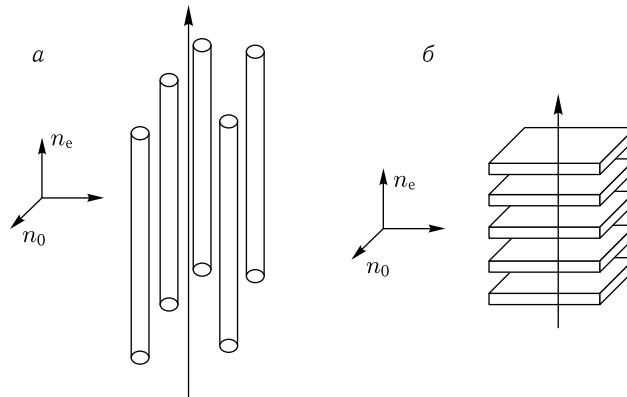


Рис. 2.1. Модели двулучепреломления ткани: *a* — система длинных диэлектрических цилиндров; *b* — система тонких диэлектрических пластин [654]

Для системы тонких пластин (см. рис. 2.1 *b*) имеет место следующее выражение [226]:

$$n_e^2 - n_o^2 = -\frac{f_1 f_2 (n_1 - n_2)}{f_1 n_1^2 + f_2 n_2^2}, \quad (2.3)$$

где f_1 — объемная доля, занимаемая пластинами, f_2 — доля объема, занятого базовым веществом, n_1 , n_2 — соответствующие показатели преломления. Это подразумевает, что система ведет себя как отрицательный одноосный двулучепреломляющий кристалл с оптической осью, перпендикулярной поверхности пластин.

Двулучепреломление формы используется в микроскопии биообъектов как средство изучения клеточной структуры. Знак наблюдаемой разности показателей преломления указывает на форму частиц, близкую к стержням или пластинам, и если n_1 и n_2 известны, можно оценить долю объема, занятого частицами. Для разделения двулучепреломления формы и материала частиц показатели преломления частиц и окружающего вещества должны быть сделаны равными, поскольку двулучепреломление формы исчезает при $n_1 = n_2$.

Линейный дихроизм (двойное поглощение или ослабление, diattenuation), т. е. различное поглощение (ослабление) для двух ортогональных поляризаций, в системах, образованных длинными цилиндрами или пластинами, определяется разностью между мнимыми частями соответствующих эффективных показателей преломления. В зависимости от соотношения между размерами и оптическими константами материала цилиндров или пластин, эта разность может принимать как положительные, так и отрицательные значения [226].

Известные из литературы значения двулучепреломления для сухожилий, мышц, коронарной артерии, миокарда, склеры, хряща и кожи имеют порядок 10^{-3} (см., например, работы [612, 621, 622, 624–628]). Измеренные вариации показателя преломления для быстрой и медленной осей роговицы кролика показывают, что ее двулучепреломление меняется в пределах от 0 в вершинной точке роговицы до $5,5 \cdot 10^{-4}$ в основании, где она присоединяется к склере [610, 616]. Преобладающая ориентация коллагеновых волокон приводит к двулучепреломлению и дихроизму [615]. На основании экспериментальных результатов было сделано предположение, что все двулучепреломляющие участки поверхности роговицы имеют приблизительно одинаковую быструю ось, расположенную под углом примерно 160 градусов к вертикальной оси, которая определяется как прямая, проходящая через вершину роговицы сквозь зрачок [616].

Поляризационно-чувствительная оптическая когерентная томография позволяет измерять линейное двулучепреломление в рассеивающей биоткани с высокой точностью [624–628, 630]. Этим методом были получены следующие данные: для мышечной ткани грызуна $1,4 \cdot 10^{-3}$ [627, 628]; для нормального сухожилия поросенка $(4,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-3}$, а для термически обработанного (90 °C, 20 с) — $(2,24 \pm 0,07) \cdot 10^{-3}$ [630]; для свиной кожи $1,5 \cdot 10^{-3}$ – $3,5 \cdot 10^{-3}$ [630]; для бычьего хряща $3,0 \cdot 10^{-3}$ [630]; для бычьего сухожилия $(3,7 \pm 0,4) \cdot 10^{-3}$ [625]. Такое двулучепреломление обеспечивает 90 % фазовую задержку на глубине порядка нескольких сот микрометров.

Для образцов ткани сердечной мышцы крысы, толщиной 1 мм, измерения *ex vivo* на лазерном измерителе матрицы Мюллера (633/635 нм) с последующей декомпозицией измеренной матрицы, необходимой для отдельного определения двулучепреломления, оптической активности и дихроизма, фазовая задержка δ_{oe} (см. формулу (2.1)) оказалась равной $\sim 1,5$ рад для здоровой ткани, всего $\sim 0,1$ рад для ткани в области инфаркта и почти 0,5 при лечении инфаркта стволовыми клетками [669, 721, 731].

Величина двулучепреломления и дихроизма связана с плотностью и другими свойствами коллагеновых волокон ткани, тогда как ориентация быстрой оси отражает ориентацию коллагеновых волокон. Амплитуда и ориентация двулучепреломления кожи и хряща не так равномерно распределены, как в сухожилии. Другими словами, упаковка коллагеновых волокон в коже и хряще не так однородна, как в сухожилии, и распределение ориентаций коллагеновых волокон не столь упорядочено [630].

Кроме линейного двулучепреломления и дихроизма, многие биоткани проявляют оптическую активность. В поляризационных исследованиях хиральность молекулы, возникающая из-за несимметричной структуры, приводит к ряду характерных оптических эффектов под общим названием оптическая активность [642, 646]. Хоро-

шо известным проявлением оптической активности является способность вращать плоскость поляризации линейно поляризованного света вокруг направления его распространения. Угол поворота зависит от концентрации хиральных молекул, толщины слоя среды и длины волны света. Например, хиральная асимметрия молекул, проявляющаяся в поляризационных свойствах света, прошедшего через прозрачную среду, содержащую глюкозу, служит основой для весьма чувствительного и точного определения концентрации глюкозы. Биологические ткани, содержащие хиральные компоненты, демонстрируют оптическую активность [616, 640, 641, 713–723, 731]. Интерес к хиральным рассеивающим средам стимулируется возможностью неинвазивного *in situ* оптического мониторинга глюкозы у больных диабетом [105, 138, 713–723, 731]. Однако в рассеивающих средах, где преобладают эффекты рассеяния, потеря поляризационной информации значительна и хиральные эффекты, обусловленные сравнительно малыми изменениями количества глюкозы на физиологическом уровне, трудно обнаружить.

В сложных тканевых структурах хиральные агрегаты частиц, в частности сферических частиц, могут быть ответственными за оптическую активность биоткани (см. рис. 2.2). Можно построить и более сложные модели анизотропных биотканей. Например, роговица глаза может быть представлена как система плоских анизотропных слоев (пластинок или ламелл), каждый из которых образован плотно упакованными длинными цилиндрами (фибриллами) (см. рис. 2.1 *a*), оптические оси которых ориентированы по спирали (см. рис. 3.3). Такая волокнисто-слоистая структура роговицы отвечает за линейный и круговой дихроизм и его зависимость от угла между пластинками [615].

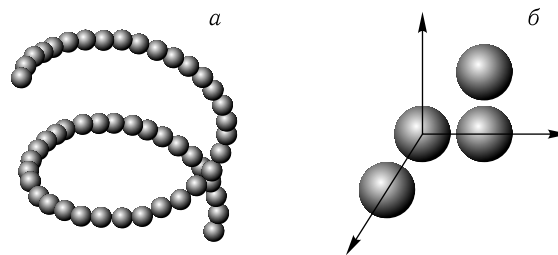


Рис. 2.2. Примеры хиральных агрегатов сферических частиц

2.3. Рассеяние света частицей

Рассмотрим теперь преобразование любого типа поляризации (линейной, круговой или эллиптической) в рассеивающей среде с параметрами, типичными для биотканей, и сравним глубину проникновения света с круговой и линейной поляризацией в различные среды. Для этого рассмотрим монохроматическую плоскую волну, падающую на изолированную рассеивающую частицу [43, 135, 214, 215]. Необходимая для описания рассеяния света частицей геометрия показана на рис. 2.3. Монохроматическая плоская волна падает снизу и распространяется в положительном направлении оси z . Часть света рассеивается частицей в направлении вектора \mathbf{S}_1 на приемник, расположенный на расстоянии r от частицы. Направление рассеяния определяется углом рассеяния θ и азимутальным углом φ . Плоскость рассеяния образована вектором \mathbf{S}_1 и осью z . Электрическое поле падающей волны лежит

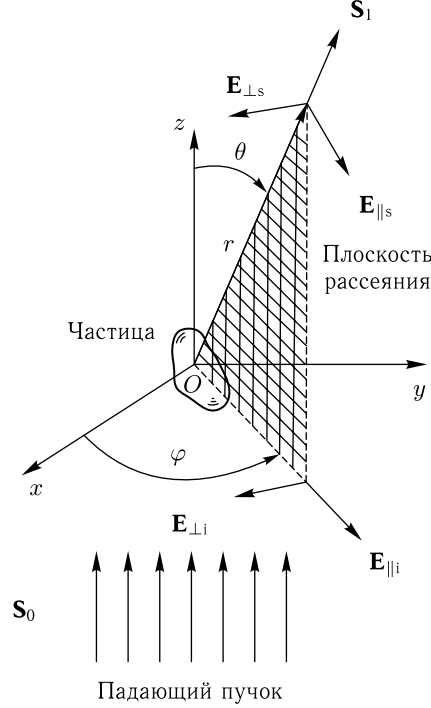


Рис. 2.3. Геометрия рассеяния света частицей, расположенной в начале координат [214]. Падающий пучок света параллелен оси z . Приемник расположен на расстоянии r в направлении вектора \mathbf{S}_1

в плоскости x – y и может быть разложено на составляющие, параллельную $\mathbf{E}_{\parallel i}$ и перпендикулярную $\mathbf{E}_{\perp i}$ по отношению к плоскости рассеяния. Вектор электрического поля и интенсивность падающего светового пучка даются выражениями

$$\mathbf{E}_i = \mathbf{E}_{\parallel i} + \mathbf{E}_{\perp i}, \quad (2.4)$$

$$I_i = \langle E_{\parallel i} E_{\parallel i}^* + E_{\perp i} E_{\perp i}^* \rangle, \quad (2.5)$$

где звездочка обозначает комплексное сопряжение, а угловые скобки — усреднение по времени.

Электрическое поле рассеянной световой волны перпендикулярно \mathbf{S}_1 и может быть разложено на составляющие $\mathbf{E}_{\parallel s}$ и $\mathbf{E}_{\perp s}$, которые, соответственно, параллельны и перпендикулярны плоскости рассеяния. Электрический вектор рассеянного света задается выражением

$$\mathbf{E}_s = \mathbf{E}_{\parallel s} + \mathbf{E}_{\perp s}. \quad (2.6)$$

Между компонентами падающего и рассеянного поля, определенными выражениями (2.4) и (2.6), существует линейная связь [43, 135, 214, 215]:

$$\begin{bmatrix} E_{\parallel s} \\ E_{\perp s} \end{bmatrix} = \frac{e^{ik(r-z)}}{-ikr} \begin{bmatrix} S_2 & S_3 \\ S_4 & S_1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_{\parallel i} \\ E_{\perp i} \end{bmatrix}, \quad (2.7)$$

где $k = 2\pi/\lambda$ — волновое число, $\lambda = \lambda_0/\bar{n}$ — длина волны в рассеивающей среде, \bar{n} — средний показатель преломления рассеивающей среды, λ_0 — длина волны света в вакууме, $i = \sqrt{-1}$, r — расстояние от рассеивающей частицы до приемника и z —

координата рассеивающей частицы. Комплексные числа S_{1-4} являются элементами амплитудной матрицы рассеяния (S -матрицы) или матрицы Джонса [43, 135, 214, 215, 226, 655–661]. Каждое из них зависит от угла рассеяния θ и азимутального угла φ и содержит информацию о рассеивающей частице. Для вычисления амплитудной матрицы рассеяния необходимы измерения как амплитуды, так и фазы. Прямые измерения матричных элементов можно выполнить, используя двухчастотный зеемановский лазер, который дает две узкие спектральные линии с малой разностью частот (около 250 кГц) и ортогональными линейными поляризациями, одна из которых служит гетеродином [215], или с помощью метода оптической когерентной томографии (ОКТ) [135, 630].

2.4. Описание и регистрация поляризованного света

Поляризованный свет, его свойства, получение и регистрация хорошо описаны в литературе [135, 211, 212, 214, 215, 226, 280, 655–660, 665–670, 731, 740–748]. Поляризация определяется характером изменения вектора напряженности электрического поля световой волны в зависимости от времени в фиксированной точке пространства. Если электрический вектор колеблется в одной фиксированной плоскости вдоль всего пучка, свет называется линейно поляризованным. Такая линейно поляризованная волна может быть разложена на две составляющие, параллельную и перпендикулярную по отношению к плоскости рассеяния (см. выражения (2.4) и (2.6), а также рис. 2.3). Если плоскость электрического поля вращается, свет называется эллиптически поляризованным, поскольку конец электрического вектора с течением времени описывает эллипс в фиксированной точке пространства. Если эллипс оказывается окружностью, свет называется поляризованным по кругу (циркулярно). Связь между фазой и поляризацией может быть понята следующим образом: свет с круговой поляризацией состоит из равных по величине ортогональных друг другу линейно поляризованных компонент, сдвиг фаз между колебаниями которых равен точно 90° . В общем случае свет произвольной эллиптической поляризации состоит из линейно поляризованных ортогональных компонент с неравной амплитудой, колеблющихся на одной частоте, но с некоторым постоянным сдвигом по фазе.

Свет произвольной поляризации можно представить с помощью четырех чисел, известных как параметры Стокса, I , Q , U и V . Параметр I относится к энергетической освещенности или интенсивности света, параметры Q , U и V представляют меру горизонтальной линейной, линейной под углом 45° и круговой поляризации соответственно [135, 211, 212, 214, 215, 226, 655–660, 665–670, 731, 740–748].

В поляриметрии вектор Стокса \mathbf{S} светового пучка строится на основании шести измерений светового потока, полученных при различных анализаторах, расположенных перед приемником:

$$\mathbf{s} = \begin{pmatrix} I \\ Q \\ U \\ V \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} I_H + I_V \\ I_H - I_V \\ I_{+45^\circ} - I_{-45^\circ} \\ I_R - I_L \end{pmatrix}, \quad (2.8)$$

где I_H , I_V , I_{+45° , I_{-45° , I_R , и I_L — интенсивности света, измеренные с помощью горизонтального линейного поляризатора, вертикального линейного поляризатора, линейного поляризатора, повернутого на угол $+45^\circ$, линейного поляризатора, повернутого на угол -45° , правовращающего кругового анализатора и левовращающего кругового анализатора соответственно. Благодаря соотношению $I_H + I_V = I_{+45^\circ} + I_{-45^\circ} = I_R + I_L = I$, где I — интенсивность светового пучка,

измеренная без какого-либо анализатора перед приемником (с учетом потерь света на самих анализаторах), вектор Стокса можно определить по четырем независимым измерениям, например I_H , I_V , I_{+45° и I_R :

$$\mathbf{S} = \begin{pmatrix} I_H + I_V \\ I_H - I_V \\ 2I_{+45^\circ} - (I_H + I_V) \\ 2I_R - (I_H + I_V) \end{pmatrix}. \quad (2.9)$$

На основании вектора Стокса можно определить степень поляризации (P), степень линейной поляризации (P_L) и степень круговой поляризации (P_C) как

$$P = \frac{\sqrt{Q^2 + U^2 + V^2}}{I}, \quad (2.10)$$

$$P_L = \frac{\sqrt{Q^2 + U^2}}{I}, \quad (2.11)$$

$$P_C = \frac{\sqrt{V^2}}{I}. \quad (2.12)$$

Если степень поляризации света остается равной единице после преобразования оптической системой, то система является недеполяризующей, в противном случае — деполяризующей.

Значения нормированных параметров Стокса, соответствующие некоторым типам поляризации, представлены в табл. 2.1.

Таблица 2.1

Типы поляризации [6, 215]

Параметр Стокса	Горизонтальная (линейная)	Вертикальная (линейная)	+45° (линейная)	-45° (линейная)	Правая (круговая)	Левая (круговая)
I	1	1	1	1	1	1
Q	1	-1	0	0	0	0
U	0	0	1	-1	0	0
V	0	0	0	0	1	-1

Матрица Мюллера \mathbf{M} исследуемого образца преобразует вектор Стокса падающего света \mathbf{S}_{in} в соответствующий вектор Стокса на выходе \mathbf{S}_{out} :

$$\mathbf{S}_{out} = \mathbf{M}\mathbf{S}_{in}. \quad (2.13)$$

Очевидно, что вектор Стокса на выходе меняется в зависимости от состояния падающего пучка, однако матрица Мюллера определяется только самим образцом и длиной оптического пути. И наоборот, матрица Мюллера полностью характеризует оптические поляризационные свойства образца. Матрицу Мюллера можно получить экспериментально из измерений с различными комбинациями поляризаторов для источника и анализатора для приемника. В наиболее общем случае 4×4 -матрица Мюллера имеет 16 независимых элементов, поэтому по крайней мере 16 независимых измерений необходимы для ее полного определения.

Нормированные векторы Стокса для четырех состояний поляризации, H, V, +45° и R, падающего света на входе суть соответственно

$$\mathbf{s}_{\text{Hi}} = \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}, \quad \mathbf{s}_{\text{Vi}} = \begin{pmatrix} 1 \\ -1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}, \quad \mathbf{s}_{+45^\circ\text{i}} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 1 \\ 0 \end{pmatrix}, \quad \mathbf{s}_{\text{Ri}} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \end{pmatrix}, \quad (2.14)$$

где H, V, +45° и R представляют горизонтальную линейную поляризацию, вертикальную линейную поляризацию, линейную поляризацию под углом +45° и правую круговую поляризацию, соответственно. Можно выразить 4 × 4-матрицу Мюллера как $\mathbf{M} = [\mathbf{M}_1 \ \mathbf{M}_2 \ \mathbf{M}_3 \ \mathbf{M}_4]$, где \mathbf{M}_1 , \mathbf{M}_2 , \mathbf{M}_3 и \mathbf{M}_4 — четыре вектора-столбца из четырех элементов каждый. Четыре вектора Стокса на выходе, соответствующие четырем начальным состояниям поляризации H, V, +45° и R, обозначим соответственно как \mathbf{S}_{Ho} , \mathbf{S}_{Vo} , $\mathbf{S}_{+45^\circ\text{o}}$ и \mathbf{S}_{Ro} . Эти четыре выходных вектора Стокса определяются на основе измерений соответствующих интенсивностей с помощью уравнения (2.9) и могут быть выражены как

$$\begin{aligned} \mathbf{S}_{\text{Ho}} &= \mathbf{M}\mathbf{s}_{\text{Hi}} = \mathbf{M}_1 + \mathbf{M}_2, \\ \mathbf{S}_{\text{Vo}} &= \mathbf{M}\mathbf{s}_{\text{Vi}} = \mathbf{M}_1 - \mathbf{M}_2, \\ \mathbf{S}_{+45^\circ\text{o}} &= \mathbf{M}\mathbf{s}_{+45^\circ\text{i}} = \mathbf{M}_1 + \mathbf{M}_3, \\ \mathbf{S}_{\text{Ro}} &= \mathbf{M}\mathbf{s}_{\text{Ri}} = \mathbf{M}_1 + \mathbf{M}_4. \end{aligned} \quad (2.15)$$

Матрицу Мюллера можно вычислить по четырем выходным векторам Стокса [661]:

$$\mathbf{M} = \frac{1}{2} \cdot [\mathbf{S}_{\text{Ho}} + \mathbf{S}_{\text{Vo}}, \ \mathbf{S}_{\text{Ho}} - \mathbf{S}_{\text{Vo}}, \ -2\mathbf{S}_{+45^\circ\text{o}}(\mathbf{S}_{\text{Ho}} + \mathbf{S}_{\text{Vo}}), \ 2\mathbf{S}_{\text{Ro}} - (\mathbf{S}_{\text{Ho}} + \mathbf{S}_{\text{Vo}})]. \quad (2.16)$$

Другими словами, по крайней мере четыре независимых вектора Стокса должны быть измерены для определения полной матрицы Мюллера, а каждый вектор Стокса требует четырех независимых измерений интенсивности с различными анализаторами.

2.5. Взаимодействие света со случайной однократно рассеивающей средой

Согласно (2.8) и (2.9), параметры Стокса можно выразить через компоненты электрического поля

$$\begin{aligned} I &= \langle E_{\parallel} E_{\parallel}^* + E_{\perp} E_{\perp}^* \rangle, \\ Q &= \langle E_{\parallel} E_{\parallel}^* - E_{\perp} E_{\perp}^* \rangle, \\ U &= \langle E_{\parallel} E_{\perp}^* + E_{\perp} E_{\parallel}^* \rangle, \\ V &= \langle i(E_{\parallel} E_{\perp}^* - E_{\perp} E_{\parallel}^*) \rangle. \end{aligned} \quad (2.17)$$

Все параметры Стокса имеют одинаковую размерность — энергия в единицу времени на единицу поверхности и на единицу длины волны. Для элементарной монохроматической плоской или сферической электромагнитной волны [211]

$$I^2 \equiv Q^2 + U^2 + V^2. \quad (2.18)$$

Для произвольного светового пучка, как, например, в случае частично поляризованного квазимонохроматического света, согласно фундаментальному свойству

аддитивности, параметры Стокса для смеси элементарных волн являются суммами соответствующих параметров Стокса этих волн. Тогда равенство (2.18) заменяется неравенством [211, 214]

$$I^2 \geq Q^2 + U^2 + V^2. \quad (2.19)$$

Степень поляризации (P), степень линейной поляризации (P_L) и степень круговой поляризации (P_C) для падающего и рассеянного света определяются соотношениями (2.10)–(2.12). В частности, для P_L и P_C рассеянного света имеем:

$$P_L = \frac{(I_{\parallel} - I_{\perp})}{(I_{\parallel} + I_{\perp})} = \frac{\sqrt{Q_s^2 + U_s^2}}{I_s}, \quad (2.20)$$

$$P_C = \frac{\sqrt{V_s^2}}{I_s}. \quad (2.21)$$

В дальней зоне поляризация рассеянного света описывается вектором Стокса \mathbf{S}_s , связанным с вектором Стокса падающего света \mathbf{S}_i (см. выражение (2.13)) матричным соотношением [214]

$$\mathbf{S}_s = \mathbf{M} \cdot \mathbf{S}_i, \quad (2.22)$$

где \mathbf{M} — нормированная 4×4 -матрица рассеяния (матрица интенсивности или матрица Мюллера):

$$\mathbf{M} = \begin{bmatrix} M_{11} & M_{12} & M_{13} & M_{14} \\ M_{21} & M_{22} & M_{23} & M_{24} \\ M_{31} & M_{32} & M_{33} & M_{34} \\ M_{41} & M_{42} & M_{43} & M_{44} \end{bmatrix}. \quad (2.23)$$

Элементы матрицы рассеяния света (МРС) зависят от угла рассеяния θ , длины волны и геометрических и оптических параметров рассеивающих частиц. M_{11} — это величина, которая измеряется, когда падающий свет не поляризован, ее зависимость от угла рассеяния есть фазовая функция рассеянного света. Она обеспечивает только часть информации, теоретически доступной из экспериментов по рассеянию. Величина M_{11} намного менее чувствительна к хиральности и структуре дальнего порядка, чем другие матричные элементы [214, 215]. M_{12} характеризует степень линейной поляризации рассеянного света; M_{22} показывает долю деполаризованного света в полном рассеянном излучении (хорошая мера несферичности рассеивающих частиц); M_{34} характеризует преобразование падающего света, поляризованного наклонно под углом 45° , в рассеянный свет круговой поляризации (которое уникальным образом присуще различным биологическим системам); разность между M_{33} и M_{44} — хорошая мера несферичности рассеивающих частиц.

В дополнение к степени поляризации, определенной соотношениями (2.10)–(2.12), (2.20) и (2.21), вводится линейный дихроизм исследуемой среды как

$$D_A = \frac{P_1^2 - P_2^2}{P_1^2 + P_2^2} = \frac{\sqrt{M_{12}^2 + M_{13}^2 + M_{14}^2}}{M_{11}}, \quad (2.24)$$

где P_1 и P_2 — амплитудные коэффициенты пропускания для двух ортогональных собственных поляризационных состояний.

В общем случае все 16 элементов МРС не равны нулю. Однако существует только 7 независимых элементов матрицы рассеяния из 16 для одной частицы с фиксированной ориентацией и 9 соотношений, связывающих остальные элементы между собой [211, 212]. Для рассеяния ансамблем случайно ориентированных частиц имеется 10 независимых элементов.

МРС для макроскопически изотропной и симметричной среды имеет хорошо известную блочно-диагональную структуру [274]:

$$\mathbf{M}(\theta) = \begin{bmatrix} M_{11}(\theta) & M_{12}(\theta) & 0 & 0 \\ M_{12}(\theta) & M_{22}(\theta) & 0 & 0 \\ 0 & 0 & M_{33}(\theta) & M_{34}(\theta) \\ 0 & 0 & -M_{34}(\theta) & M_{44}(\theta) \end{bmatrix}. \quad (2.25)$$

Следовательно, только восемь элементов МРС отличны от нуля и только шесть из них независимы. Более того, имеют место специальные соотношения для двух особых углов рассеяния 0 и π [211]:

$$\begin{aligned} M_{22}(0) &= M_{33}(0), & M_{22}(\pi) &= -M_{33}(\pi), \\ M_{12}(0) &= M_{34}(0) = M_{12}(\pi) = M_{34}(\pi) = 0, \\ M_{44}(\pi) &= M_{11}(\pi) - 2M_{22}(\pi). \end{aligned} \quad (2.26)$$

Частицы, обладающие симметрией вращения, имеют дополнительное свойство [211]:

$$M_{44}(0) = 2M_{22}(0) - M_{11}(0). \quad (2.27)$$

Структура МРС еще более упрощается для сферически симметричных частиц, однородных или неоднородных только вдоль радиуса (т. е. состоящих из изотропного материала с показателем преломления, зависящим только от расстояния до центра частицы), поскольку в этом случае [211]

$$M_{11}(\theta) \equiv M_{22}(\theta), \quad M_{33}(\theta) \equiv M_{44}(\theta). \quad (2.28)$$

Фазовая функция, т. е. элемент M_{11} для рассеяния, симметричного по отношению к направлению падающей волны, зависит только от угла рассеяния θ и удовлетворяет условию нормировки (см. уравнение (1.14)) [211, 214]:

$$2\pi \int_0^\pi M_{11}(\theta) \sin \theta d\theta = 1, \quad (2.29)$$

которое соответствует предположению о случайном распределении рассеивающих частиц в среде.

Параметр анизотропии рассеяния (средний косинус угла рассеяния θ) или параметр асимметрии фазовой функции (см. соотношение (1.16)) теперь можно выразить как

$$g \equiv \langle \cos \theta \rangle = 2\pi \int_0^\pi M_{11}(\theta) \cos \theta \sin \theta d\theta. \quad (2.30)$$

Если частица мала по сравнению с длиной волны падающего света, рассеяние на ней можно рассматривать как вторичное излучение одного диполя. Эта рэлеевская теория применима при условии, что $m(2\pi a/\lambda) \ll 1$, где m — относительный показатель преломления рассеивающих частиц; $2\pi a/\lambda$ — параметр, характеризующий относительный размер частиц, a — радиус частицы, λ — длина волны падающего света в среде [214]. Для видимого и ближнего ИК-света и рассеивающих частиц с типичным (для биологической ткани) показателем преломления относительно окружающей среды $m = 1,05$ – $1,11$ максимальный размер частиц должен быть около

12–14 нм, чтобы теория Рэлея оставалась справедливой. В этой теории интенсивность рассеянного излучения обратно пропорциональна λ^4 и растет как a^6 , а угловое распределение рассеянного света изотропно.

Теория Рэлея–Ганса или Рэлея–Дебая рассматривает задачу рассеяния особым классом частиц произвольной формы. Она требует выполнения условий $|m - 1| \ll 1$ и $(2\pi a'/\lambda)|m - 1| \ll 1$, где a' — наибольший размер частицы [129, 211, 212, 215]. Эти условия означают, что электрическое поле внутри частицы близко к полю падающей волны, а частица может рассматриваться как набор независимых диполей, находящихся в одном и том же возбуждающем поле падающей волны. Биологическая клетка может быть промоделирована сферой из цитоплазмы с большим ($n_{cp} = 1,37$) показателем преломления, чем у окружающей межклеточной среды ($n_{is} = 1,35$); тогда $m = 1,015$ и для ближнего ИК-света эта теория верна вплоть до размеров частиц $a' = 0,8–1,0$ мкм. Данное приближение применялось для вычисления рассеяния света суспензиями бактерий [215]. Оно может быть использовано для описания рассеяния света компонентами клетки (митохондриями, лизосомами, пероксисомами и др.) в биотканях, поскольку они имеют малые размеры и сравнительно низкую рефракцию [58, 96, 216–219, 229, 232].

Для описания рассеяния вперед, вызванного крупными частицами (порядка 10 мкм), полезно приближение дифракции Фраунгофера [215]. Согласно этой теории, рассеянный свет имеет ту же поляризацию, что и падающий, а рассеивающие свойства частицы не зависят от показателя преломления. Для малых углов рассеяния приближение дифракции Фраунгофера точно воспроизводит изменение интенсивности в зависимости от размера частиц. Вот почему этот подход применим в лазерной проточной цитометрии. Структурные элементы биологической клетки, такие как клеточная мембрана, ядерная текстура и гранулы в цитоплазме, могут быть обнаружены по изменениям оптической плотности. Оптическое преобразование Фурье дифракционной картины может быть выполнено при помощи линзы. Пространственные изменения оптической плотности в предметной плоскости в результате преобразования Фурье превращаются в пространственные изменения частоты в задней фокальной плоскости линзы (плоскости фурье-образа) [215]. Если оптическая плотность медленно меняется по сечению объекта, то фурье-преобразование направляет большую часть рассеянного света под углами, близкими к нулю (низкая пространственная частота) в плоскости фурье-образа. Это хорошая модель для клетки с прозрачной цитоплазмой (постоянная оптическая плотность). Если оптическая плотность меняется быстро по сечению объекта, то преобразование Фурье смещает большую часть энергии в сторону больших углов рассеяния (более высокая пространственная частота) в плоскости фурье-образа. Это хорошая модель для клетки с сильно гранулированной цитоплазмой (резкие изменения оптической плотности). Показано, что для фурье-образов аномальных клеток типичны существенно более высокие пространственные частоты, чем для нормальных клеток, например для отдельных клеток мазка из шейки матки. Для таких исследований были разработаны оптические фурье-микроскопы. Метод можно применять к позитивной фотографии клетки на прозрачной пленке, отдельным клеткам на предметном стекле и клеткам в потоке жидкости [215].

Теория рассеяния Ми или Лоренца–Ми основана на точном решении уравнений Максвелла для электромагнитного поля для однородной сферы [214, 226]. В общем случае свет, рассеянный на частице, становится эллиптически поляризованным. Для сферически симметричных частиц из оптически неактивного материала матрица рассеяния Мюллера дается формулами (2.25) и (2.28). Теория Ми была обобщена на сферы, покрытые оболочками, и на цилиндры произвольных размеров [211, 212, 215]. В теории Ми электромагнитные поля падающей, внутренней и рассеянной

волн раскладываются в ряды [226]. Поля в каждой из областей связаны линейными преобразованиями. Этот подход можно использовать также для несферических объектов, таких как сфериды [211, 212]. Линейное преобразование осуществляется с помощью матрицы перехода (Т-матрицы). Для сферических частиц Т-матрица диагональна.

До сих пор в нашем изложении векторы Стокса были определены для случая монохроматической плоской волны, а матрица Мюллера — для однократного рассеяния. Эти понятия требуют обобщения на более сложные случаи. Вектор Стокса был определен для квазимонохроматической волны [273], для которой в случае частично поляризованного света неравенство (2.19) остается справедливым [214]. При некогерентном сложении матриц Мюллера для ансамбля частиц, различающихся размером, ориентацией, морфологией или оптическими свойствами, шесть из упомянутых выше равенств становятся неравенствами [593]. Для ансамбля взаимодействующих частиц в приближении однократного рассеяния [5, 6, 10, 654] элементы МРС имеют вид

$$M_{ij}(\theta) = M_{ij}^0(\theta)NF_{\text{int}}(\theta), \quad (2.31)$$

где M_{ij}^0 — элементы МРС изолированной частицы, N — число рассеивающих частиц, а $F_{\text{int}}(\theta)$ — интерференционный член, учитывающий пространственную корреляцию частиц. Заметим, что нормированные элементы (M_{ij}/M_{11}) в монодисперсной системе слабо зависят от учета пространственной корреляции и остаются примерно такими же, как для изолированных частиц [654].

2.6. Векторное уравнение переноса излучения

Как уже было показано, большинство биотканей представляют собой среды с сильным рассеянием и намного более слабым поглощением (до двух порядков меньше, чем рассеяние, в видимом и ближнем ИК-диапазонах). Кроме того, в естественном состоянии (не в виде препарата) слои биоткани достаточно толстые. Следовательно, для широкого класса биотканей типичным является многократное рассеяние [1–3, 6, 24, 31, 129, 130].

Поляризационные эффекты при распространении света через различные многократно рассеивающие среды, включая биоткани, полностью описываются векторным уравнением переноса излучения [59, 211, 212, 556–578]. Теория переноса излучения (ТПИ) возникла как феноменологический подход, основанный на рассмотрении транспорта энергии через среду, заполненную большим числом частиц, и обеспечивающий сохранение энергии [274–277]. Эта среда, состоящая из дискретных частиц, распределенных в пространстве редко и по случайному закону, рассматривается как непрерывная и локально однородная. Понятия однократного рассеяния и поглощения индивидуальными частицами при этом заменяются понятиями однократного рассеяния и поглощения малыми однородными элементами объема среды. В рамках ТПИ рассеяние и поглощение малым элементом объема получается из уравнений Максвелла и дается некогерентной суммой соответствующих характеристик составляющих частиц. Результатом рассеяния является не преобразование плоской падающей волны в сферическую рассеянную волну, а преобразование вектора плотности потока энергии (вектора Стокса) падающего света в соответствующий вектор рассеянного света [212].

Для макроскопически изотропных и симметричных плоскопараллельных рассеивающих сред векторное уравнение переноса излучения может быть упрощено,

и сведено к виду [212]

$$\frac{d\mathbf{S}(\mathbf{r}, \vartheta, \varphi)}{d\tau(\mathbf{r})} = -\mathbf{S}(\mathbf{r}, \vartheta, \varphi) + \frac{\Lambda(\mathbf{r})}{4\pi} \int_{-1}^{+1} d(\cos \vartheta') \int_0^{2\pi} d\varphi' \mathbf{Z}(\mathbf{r}, \vartheta, \vartheta', \varphi - \varphi') \mathbf{S}(\mathbf{r}, \vartheta', \varphi'), \quad (2.32)$$

где \mathbf{S} — вектор Стокса, определенный формулой (2.8); \mathbf{r} — радиус-вектор точки; ϑ, φ — полярный и азимутальный углы, характеризующие направление падающего света;

$$d\tau(\mathbf{r}) = \rho(\mathbf{r}) \langle \sigma_{\text{ext}}(\mathbf{r}) \rangle ds \quad (2.33)$$

— элемент длины оптического пути, ρ — локальная плотность числа частиц, $\langle \sigma_{\text{ext}} \rangle$ — локальный усредненный по ансамблю коэффициент экстинкции, ds — элемент длины пути, измеренный вдоль единичного вектора направления распространения света; Λ — альбеда однократного рассеяния; ϑ' и φ' — полярный и азимутальный углы, характеризующие направление рассеяния; \mathbf{Z} — нормированная фазовая матрица:

$$\mathbf{Z}(\mathbf{r}, \vartheta, \vartheta', \varphi - \varphi') = \mathbf{R}(\Phi) \mathbf{M}(\theta) \mathbf{R}(\Psi), \quad (2.34)$$

где $\mathbf{M}(\theta)$ — матрица Мюллера однократного рассеяния, определенная формулой (2.13); θ — угол рассеяния, а $\mathbf{R}(\phi)$ — матрица вращения Стокса для угла ϕ :

$$\mathbf{R}(\phi) = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos 2\phi & -\sin 2\phi & 0 \\ 0 & \sin 2\phi & \cos 2\phi & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}. \quad (2.35)$$

Каждый вектор Стокса и матрица Мюллера связаны со своей плоскостью отсчета и координатами. В теории Ми матрица Мюллера одного акта рассеяния определяется в плоскости рассеяния, образованной векторами падающего и рассеянного света (см. рис. 2.3). Для произвольной системы координат, связанной с этой плоскостью рассеяния, ось z направлена вдоль распространения фотона. Ось x лежит в плоскости отсчета и перпендикулярна оси z . Ось y перпендикулярна как оси z , так и плоскости отсчета.

С каждым падающим фотонным пакетом связана локальная система координат, и его вектор Стокса \mathbf{S}_{in} связан с этой локальной системой. Локальную систему координат фотона до рассеяния обозначим (x, y, z) . После акта рассеяния фотон распространяется вдоль оси z' с полярным углом θ и азимутальным углом φ . Плоскость рассеяния проходит через оси z и z' и является новой плоскостью отсчета.

Для вычисления вектора Стокса рассеянного света используется выражение (2.8). Поскольку матрица Мюллера для акта рассеяния определена относительно плоскости отсчета (см. уравнение (2.13)), необходимо сначала преобразовать вектор Стокса падающего света в координатную систему, связанную с плоскостью отсчета. Это преобразование осуществляется посредством поворота локальной координатной системы (x, y, z) на угол ϕ вокруг оси z , где матрица поворота определяется выражением (2.35). Новый вектор Стокса получается как

$$\mathbf{S}'_{\text{in}} = \mathbf{R}(\phi) \mathbf{S}_{\text{in}}. \quad (2.36)$$

Локальная система координат фотонного пакета меняется в ходе процесса рассеяния. Преобразование можно разделить на два шага. Первый шаг — поворот системы (x, y, z) на угол ϕ вокруг оси z , а второй — поворот на угол θ вокруг повернутой оси y , в результате чего получается система (x', y', z') . После преобразования ось

z' указывает новое направление распространения света. Матрица преобразования имеет вид

$$\begin{bmatrix} x' \\ y' \\ z' \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos \theta & 0 & -\sin \theta \\ 0 & 1 & 0 \\ \sin \theta & 0 & \cos \theta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \cos \phi & \sin \phi & 0 \\ -\sin \phi & \cos \phi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x \\ y \\ y \end{bmatrix}. \quad (2.37)$$

После прохождения фотонным пакетом слоя рассеивающей среды его вектор Стокса записывается и сохраняется. Локальная система координат отслеживается в процессе моделирования. Для записи вектора Стокса локальная система координат каждого фотонного пакета должна быть преобразована в лабораторную систему координат. В лабораторной системе (e_1, e_2, e_3) локальные координаты фотона можно записать как

$$\begin{bmatrix} x \\ y \\ z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} e_{1x} & e_{2x} & e_{3x} \\ e_{1y} & e_{2y} & e_{3y} \\ e_{1z} & e_{2z} & e_{3z} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ e_3 \end{bmatrix}. \quad (2.38)$$

Для преобразования вектора Стокса из локальной системы в лабораторную локальная система координат поворачивается вокруг своей оси z таким образом, чтобы новая ось x оказалась в плоскости (e_2, e_3) лабораторной системы координат. Угол поворота определяется как

$$\phi = \arctg(e_{1x}/e_{1y}). \quad (2.39)$$

Матрица поворота и новый вектор Стокса можно получить из (2.35) и (2.36).

Фазовая матрица (2.34) связывает векторы Стокса падающего и рассеянного света, записанные относительно их соответственных меридиональных плоскостей. Для вычисления вектора Стокса рассеянного пучка относительно его меридиональной плоскости нужно вычислить вектор Стокса падающего пучка относительно плоскости рассеяния, умножить его на матрицу рассеяния (чтобы получить вектор Стокса рассеянного пучка относительно плоскости рассеяния), а затем вычислить вектор Стокса рассеянного пучка относительно его меридиональной плоскости. Такая процедура включает два поворота плоскости отсчета: $\Phi = -\phi$; $\Psi = \pi - \phi$ и $\Phi = \pi + \phi$; $\Psi = \phi$. Угол рассеяния θ и углы Φ и Ψ выражаются через полярные и азимутальные углы для падающего и рассеянного света:

$$\cos \theta = \cos \vartheta' \cos \vartheta + \sin \vartheta' \sin \vartheta \cos(\varphi' - \varphi), \quad (2.40)$$

$$\cos \Phi = \frac{\cos \vartheta - \cos \vartheta' \cos \theta}{\sin \vartheta' \sin \theta}, \quad (2.41)$$

$$\cos \Psi = \frac{\cos \vartheta' - \cos \vartheta \cos \theta}{\sin \vartheta \sin \theta}. \quad (2.42)$$

Первый член в правой части векторного уравнения переноса излучения (уравнение (2.32)) описывает изменение вектора удельной интенсивности на расстоянии ds за счет экстинкции и дихроизма, второй член описывает вклад света, освещающего малый элемент объема с центром в точке \mathbf{r} со всех направлений и рассеиваемого в данном направлении. Для реальных систем вид векторного уравнения переноса излучения очень сложен. Поэтому для его решения был разработан обширный набор аналитических и численных методов. Из-за важного свойства нормированной фазовой матрицы (2.34), которая зависит только от разности азимутальных углов направлений рассеяния и падения, а не от их абсолютных значений [212], возможно аналитическое рассмотрение азимутальной зависимости многократно рассеянного света с применением разложения Фурье к уравнению переноса. Для решения можно использовать следующие методы и их комбинации: метод матрицы передачи, метод

сингулярной собственной функции, метод возмущений, приближение малых углов, метод добавления–удвоения, метод матричного оператора, метод инвариантного погружения и метод Монте-Карло [129, 135, 138, 211, 212, 279, 280, 556–580].

Когда среда освещается неполяризованным светом и/или нужно вычислить только интенсивность многократно рассеянного света, векторное уравнение переноса излучения можно заменить его приближенным скалярным вариантом. В этом случае в уравнении (2.32) вектор Стокса заменяется своим первым элементом (т.е. энергетической яркостью) (см. уравнение (1.9)), а нормированная фазовая матрица — своим элементом (1, 1) (т.е. фазовой функцией) (см. соотношение (1.13)). Скалярное приближение дает плохую точность, когда размер рассеивающих частиц много меньше длины волны, но обеспечивает приемлемые результаты для частиц, сравнимых с длиной волны или больше нее [212, 276]. Существует обширная литература [1, 3, 15, 129, 130, 277, 280–282] по аналитическим и численным решениям скалярного уравнения переноса излучения (уравнение (1.9)).

2.7. Моделирование методом Монте-Карло

Метод Монте-Карло (МК), широко применяемый для численного решения уравнения ТПИ [306–309] в различных областях (астрофизика, оптика атмосферы и океана и т.д.) оказывается перспективным для решения прямой и обратной задач переноса излучения для сред с произвольной конфигурацией и граничными условиями, в частности для целей медицинской поляризационной томографии и спектроскопии [1, 3, 15, 41, 129, 135, 306–309, 362, 370, 561, 569, 573–581, 669, 716, 718, 723, 731]. Метод основан на численном моделировании переноса фотонов в рассеивающих средах. Случайные блуждания фотона в образце можно отследить от входа в среду до поглощения или выхода из среды.

Прямое моделирование на основе метода МК имеет следующие достоинства: 1) можно использовать любую матрицу рассеяния; 2) нет препятствий для использования фазовых функций, сильно направленных вперед, а также экспериментально найденных матриц однократного рассеяния; 3) вычисление поляризации требует всего лишь вдвое большего времени, чем вычисление только интенсивности; 4) любое разумное число приемников можно учесть без заметного увеличения затрат компьютерного времени; 5) не существует трудностей с определением параметров излучения внутри среды; 6) можно моделировать среды со сложной геометрией, где интенсивность зависит не только от оптической глубины, но и от поперечных координат.

Подверженность полученных результатов статистическим вариациям порядка нескольких процентов при приемлемых затратах компьютерного времени является главным недостатком метода МК. Для двукратного увеличения точности требуется четырехкратное увеличение компьютерного времени. Метод МК также непрактичен для расчетов на больших оптических глубинах ($\tau > 100$).

Несколько программ для моделирования распространения поляризованного света через рассеивающий слой доступны из литературы (см. например, работы [561, 569, 573–579, 669, 716, 718, 723, 731]). Для иллюстрации моделирования методом МК рассмотрим алгоритм, описанный в работе [578] и использованный для моделирования угловой зависимости элементов матрицы рассеяния. Пусть поток фотонов в виде бесконечно тонкого пучка падает точно на центр сферического объема, заполненного рассеивающими частицами. В процессе моделирования учитывается миграция каждого отдельного фотона внутри среды. В этом случае фотоны рассматриваются как баллистические частицы. Различные события, которые могут произойти в процессе миграции фотона, описываются соответствующими распределениями вероятностей.

В исследуемой модели фотоны либо упруго рассеиваются, либо поглощаются при столкновениях с частицами среды. Исход каждого события определяется с помощью набора равномерно распределенных случайных чисел. Вероятность рассеяния в данном направлении определяется в соответствии с законами рассеяния на отдельной частице. Можно определить сечение рассеяния и элементы матрицы рассеяния для каждого акта взаимодействия фотона с рассеивающей частицей.

Когда падающий фотон входит в рассеивающий слой, он может пройти длину свободного пробега l . Значение l зависит от концентрации частиц ρ и сечения экстинкции σ_{ext} . Длина свободного пробега l является случайной величиной, принимающей любые положительные значения с плотностью вероятности $p(l)$:

$$p(l) = \rho\sigma_{\text{ext}}e^{-\rho\sigma_{\text{ext}}l}. \quad (2.43)$$

Частная реализация длины свободного пробега l диктуется значением случайного числа ξ , равномерно распределенного в интервале $[0, 1]$:

$$\int_0^l p(l) dl = \xi. \quad (2.44)$$

Подстановка уравнения (2.43) в (2.44) дает значение l для некоторой реализации в виде

$$l = -\frac{1}{\rho\sigma_{\text{ext}}} \ln \xi. \quad (2.45)$$

Если расстояние l больше, чем толщина рассеивающей системы, тогда данный фотон регистрируется как прошедший без рассеяния. Если же, пройдя расстояние l , фотон остался внутри среды, возможные акты его взаимодействия с частицами (рассеяние или поглощение) выбираются случайным образом.

В сферической системе координат плотность вероятности рассеяния фотона в направлении, определяемом углом рассеяния θ между направлениями падающего и рассеянного фотонов и углом ϕ между старой и новой плоскостями рассеяния, дается выражением

$$p(\theta, \phi) = \frac{I_s(\theta, \phi) \sin \theta}{\int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} I_s(\theta, \phi) \sin \theta d\theta d\phi}, \quad (2.46)$$

где $I_s(\theta, \phi)$ — интенсивность света, рассеянного в направлении (θ, ϕ) относительно предыдущего направления фотона, определенного углами ϑ и φ (см. соотношения (2.32) и (2.33)). Для сферических частиц эта интенсивность дается формулами Ми с учетом состояния поляризации каждого фотона. Интеграл $I_s(\theta, \phi)$ по всем направлениям рассеяния, аналогичный выражению (1.6), определяет сечение рассеяния

$$\sigma_{\text{sca}} = \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} I_s(\theta, \phi) \sin \theta d\theta d\phi. \quad (2.47)$$

Плотность вероятности рассеяния фотона в заданном направлении, $p(\theta, \phi)$, зависит от матрицы Мюллера рассеивающей частицы $\mathbf{M}(\theta, \phi)$ (матрицы однократного рассеяния) и вектора Стокса \mathbf{S} , связанного с фотоном (формулы (2.8) и (2.22)). Матрица Мюллера однократного рассеяния $\mathbf{M}(\theta, \phi)$ связывает векторы Стокса падающего ($\mathbf{S}_i(0, 0)$) и рассеянного ($\mathbf{S}_s(\theta, \phi)$) света. Для сферических частиц эта матрица факторизуется:

$$\mathbf{M}(\theta, \phi) = \mathbf{M}(\theta)\mathbf{R}(\phi). \quad (2.48)$$

Матрица однократного рассеяния $\mathbf{M}(\theta)$ для сферической частицы имеет вид, описываемый выражениями (2.25) и (2.28). Элементы этой матрицы даются формулами M_i [214, 226] и являются функциями угла рассеяния θ и параметра дифракции $x = 2\pi a/\lambda$, где a — радиус сферической частицы, а λ — длина волны света в среде.

Матрица $\mathbf{R}(\phi)$ описывает преобразование вектора Стокса при повороте плоскости рассеяния на угол ϕ и определяется выражением (2.35). Таким образом, интенсивность света, рассеянного сферическими частицами, определяется выражением

$$I_s(\theta, \phi) = [M_{11}(\theta)I_i + (Q_i \cos 2\phi + U_i \sin 2\phi)M_{12}(\theta)], \quad (2.49)$$

где Q_i и U_i — компоненты вектора Стокса падающего света (см. соотношения (2.8) и (2.17)). Как следует из этого выражения, вероятность $p(\theta, \phi)$, описываемая соотношением (2.46), в отличие от матрицы рассеяния, данной выражением (2.48), не факторизуется, а параметризуется вектором Стокса, ассоциированным с рассеянным фотоном, что существенно усложняет проблему. В этом случае для вычисления $p(\theta, \phi)$ можно воспользоваться результатами работы [578], где для генерации пар случайных чисел с плотностью вероятности $p(\theta, \phi)$ применялся следующий метод моделирования. На первом шаге моделирования (1) выбирается случайное направление (θ_ξ, ϕ_ξ) с равномерным распределением в пространстве, причем значения случайных величин θ_ξ , и ϕ_ξ , распределенных в интервалах $(0, \pi)$ и $(0, 2\pi)$, соответственно, находятся из уравнений

$$\cos \theta_\xi = 2\xi - 1, \quad \phi_\xi = 2\pi\xi, \quad (2.50)$$

где ξ — случайное число, равномерно распределенное в интервале $(0, 1)$; на втором шаге (2) поверхность, заданная функцией $p(\theta, \phi)$ окружается сферой радиуса \widehat{R} , равного максимальному значению функции $p(\theta, \phi)$, и генерируется случайная величина $r_\xi = \xi\widehat{R}$; на третьем шаге (3) направление (θ_ξ, ϕ_ξ) принимается за случайное направление рассеяния фотона в данном элементарном акте, если выполняется условие $r_\xi \leq p(\theta_\xi, \phi_\xi)$. В противном случае шаги 1 и 2 повторяются.

Миграция фотона в рассеивающей среде описывается последовательностью преобразований связанной с ним координатной системы. Каждый акт рассеяния сопровождается изменением вектора Стокса фотона. Новый вектор Стокса \mathbf{S}_{n+1} представляет собой произведение предыдущего вектора Стокса, преобразованного к новой плоскости рассеяния, и матрицы Мюллера рассеивающей частицы $\mathbf{M}_k(\theta)$:

$$\mathbf{S}_{n+1} = \mathbf{M}_k(\theta)\mathbf{R}_n(\phi)\mathbf{S}_n, \quad (2.51)$$

где матрица $\mathbf{R}_n(\phi)$ (см. соотношение (2.35)) описывает поворот вектора Стокса вокруг оси, определяющей направление фотона до взаимодействия.

Для выбранного направления рассеяния вектор Стокса пересчитывается с использованием формул (2.22), (2.25), (2.28), (2.51) и выражений для элементов матрицы Мюллера однократного рассеяния для однородной сферы из оптически неактивного материала [135, 214, 226]. Полученное таким образом значение перенормируется так, чтобы интенсивность оставалась равной единице. При этом вектор Стокса, ассоциированный с фотоном, содержит информацию только об изменении состояния поляризации рассеянного фотона. Действительная же интенсивность определяется числом детектируемых фотонов в данном направлении в пределах апертуры приемника.

Описанная процедура повторяется, пока фотон не окажется вне рассеивающей среды. В последнем случае, если направление распространения фотона пересекает поверхность приемника, фотон регистрируется. При регистрации вектор Стокса преобразуется от текущей плоскости последнего рассеяния к лабораторной системе координат. Получаемые значения накапливаются в соответствующих ячейках при-

емника, номера которых определяются направлениями миграции фотонов. Кроме того, при регистрации фотоны классифицируются по кратности рассеяния и полной длине пройденного пути. Для каждого непоглощенного фотона также регистрируется направление и координаты точки вылета из рассеивающего объема, а также число испытанных им актов рассеяния. Пространственное распределение поляризации излучения, рассеянного всем объемом среды, получается путем анализа упомянутых выше данных для достаточно большого числа фотонов.

Для нахождения полной МРС объекта нужно зарегистрировать рассеяние света для четырех линейно независимых состояний поляризации падающего света \mathbf{S}_{1i} , \mathbf{S}_{2i} , \mathbf{S}_{3i} и \mathbf{S}_{4i} . Это позволяет построить следующую систему линейных уравнений:

$$\mathbf{C}\mathbf{M}' = \mathbf{S}', \quad (2.52)$$

где \mathbf{M}' — матрица-столбец, составленная из искомого матричных элементов МРС объекта, а \mathbf{S}' — вектор из 16 элементов, которые представляют собой компоненты четырех векторов Стокса, зарегистрированных для 4 независимых состояний поляризации падающего света. Матрица преобразования \mathbf{C} определяется выбором начального набора векторов Стокса падающего света. Решив систему (2.52) для набора: $\mathbf{S}_{1i} = (1, 1, 0, 0)$, $\mathbf{S}_{2i} = (1, -1, 0, 0)$, $\mathbf{S}_{3i} = (1, 0, 1, 0)$ и $\mathbf{S}_{4i} = (1, 0, 0, 1)$, получают искомую МРС объекта $\mathbf{M}' = \mathbf{M}$:

$$\mathbf{M} = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} I_1 + I_2 & I_1 - I_2 & 2I_3 - (I_1 + I_2) & 2I_4 - (I_1 + I_2) \\ Q_1 + Q_2 & Q_1 - Q_2 & 2Q_3 - (Q_1 + Q_2) & 2Q_4 - (Q_1 + Q_2) \\ U_1 + U_2 & U_1 - U_2 & 2U_3 - (U_1 + U_2) & 2U_4 - (U_1 + U_2) \\ V_1 + V_2 & V_1 - V_2 & 2V_3 - (V_1 + V_2) & 2V_4 - (V_1 + V_2) \end{bmatrix}, \quad (2.53)$$

где элементы векторов Стокса рассеянного света, полученные для каждого из этих четырех случаев, обозначены как $\mathbf{S}_n = (I_n, Q_n, U_n, V_n)$, $n = 1, 2, 3, 4$. В результате можно рассчитать угловые зависимости всех элементов МРС с учетом вклада многократного рассеяния.

Моделирование было выполнено для систем сферических частиц с относительным показателем преломления $m = 1,2$, равномерно распределенных в сферическом объеме с объемной долей $f = 0,01$ [578]. При расчетах предполагалось, что освещающий пучок бесконечно узкий и падает точно в центр рассеивающего объема, а рассеянное излучение регистрируется под различными углами в дальней зоне приемником с полной угловой апертурой в 1 град в плоскости рассеяния и 5 град в перпендикулярной плоскости.

Рассчитанные угловые распределения полной интенсивности для различных рассеивающих систем сферических частиц малого радиуса, $a = 50$ нм, или большого радиуса, $a = 300$ нм, представлены на рис. 2.4. Средняя кратность рассеяния регистрируемого излучения возрастает с ростом размера рассеивающей системы. Для систем малых частиц при освещении видимым светом (633 нм) применимо приближение рэлеевского рассеяния. Для достаточно малых размеров рассеивающего объема (~ 1 мкм в диаметре) преобладает вклад однократного рассеяния. Это видно из угловой зависимости интенсивности, которая почти изотропна (рис. 2.4 а). По мере роста размеров рассеивающей системы растет вклад многократного рассеяния. Для системы диаметром 20 мкм регистрируемый свет содержит заметный вклад рассеяния кратностью 10–20. С дальнейшим ростом размеров системы большая часть падающего света рассеивается в обратном направлении, а рассеяние в переднюю полуплоскость исчезает. По этой причине, начиная с некоторого значения, размеры рассеивающей системы перестают влиять на форму диаграммы распределения рассеяния по кратности.

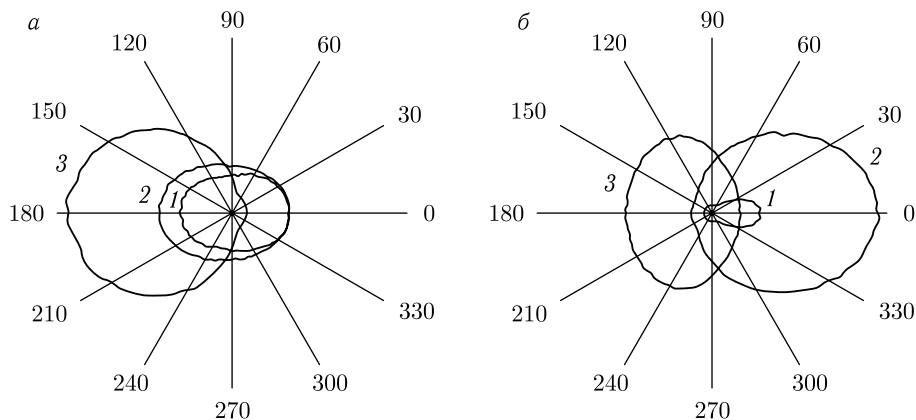


Рис. 2.4. Угловые распределения полной интенсивности рассеяния для многократно рассеивающих систем сферических частиц с относительным показателем преломления $m = 1,2$, равномерно распределенных внутри сферического объема с объемной долей $f = 0,01$: *а* — частицы малого радиуса, $a = 50$ нм, диаметр системы равен 1 мм (1), 2 мм (2) и 20 мм (3); *б* — частицы большого радиуса, $a = 300$ нм, диаметр системы равен 0,002 мм (1), 0,2 мм (2) и 2 мм (3); бесконечно тонкий пучок неполяризованного света (не показан) падает точно в центр рассеивающего объема в направлении, от которого отсчитываются углы, длина волны равна 633 нм [578]

Системы, образованные частицами с размерами порядка длины волны (рис. 2.4 б) также демонстрируют увеличение вклада многократного рассеяния с увеличением размеров рассеивающей системы. Переход от рассеяния вперед к рассеянию назад наступает при довольно малых диаметрах системы, около 2 мм.

Как видно, интенсивность неполяризованного света при больших кратностях рассеяния слабо зависит от угла рассеяния и почти не несет информации о размере рассеивающих частиц. Заметим, что системы малых частиц при трехкратном рассеянии уже могут рассматриваться как почти изотропные, в то время как угловые распределения для крупных частиц, сильно вытянутые вперед при однократном рассеянии, остаются анизотропными для достаточно высоких кратностей рассеяния (от четырех до шести актов рассеяния для системы диаметром 0,2 мм, рис. 2.4 б).

Вид угловой зависимости элементов МРС в условиях многократного рассеяния существенно иной, чем в случае однократно рассеивающей системы. Из рис. 2.5 и 2.6 видно, что многократное рассеяние выравнивает угловые зависимости элементов МРС. Сплошной линией показан результат расчета нормированной МРС для изолированной сферической частицы с тем же радиусом и показателем преломления. Все элементы МРС нормированы на элемент M_{11} (полную интенсивность рассеяния) в данном направлении, а элемент M_{11} представлен на графике в виде, приведенном к единице при рассеянии в прямом направлении; действительное распределение интенсивности представлено на рис. 2.4.

Поскольку угловое распределение однократного рассеяния для частиц с размерами, существенно превышающими рэлеевский предел, сильно асимметрично, интенсивность рассеяния на большие углы очень мала. По этой причине требуется отследить весьма большое число фотонных траекторий, чтобы достичь приемлемой точности в этом диапазоне углов. Для демонстрации тонкой структуры угловой зависимости матричных элементов нужно промоделировать миграцию 10^7 – 10^8 фотонов [575, 578].

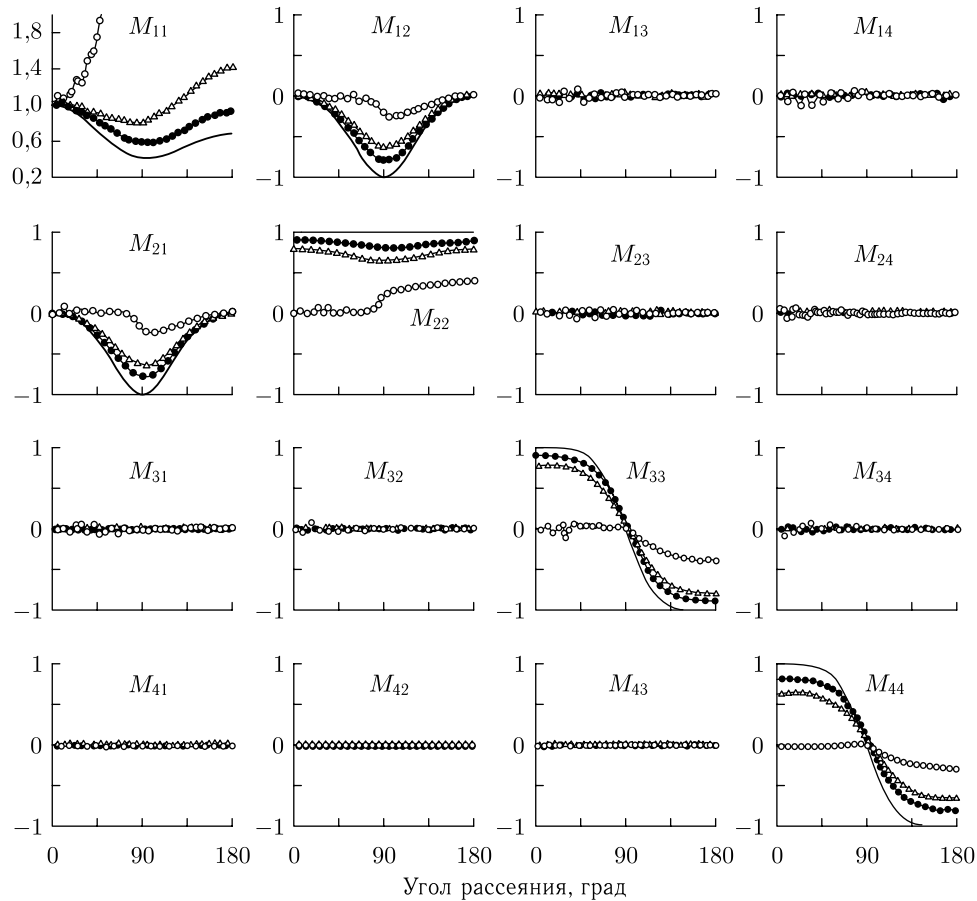


Рис. 2.5. Моделирование методом Монте-Карло: угловые распределения элементов МРС для многократно рассеивающих систем малых сферических частиц ($a = 50$ нм, $m = 1,2$), равномерно распределенных в сферическом объеме ($f = 0,01$); диаметр системы равен 1 мм (\bullet —), 2 мм (\triangle —) и 20 мм (\circ —); сплошной линией показаны результаты расчета в приближении однократного рассеяния; бесконечно тонкий пучок неполяризованного света падает точно в центр рассеивающего объема в направлении, от которого отсчитываются углы, длина волны равна 633 нм [578]

Для рассеяния суспензиями частиц в сферическом объеме малого диаметра почти все детектируемые фотоны рассеиваются однократно. Увеличение оптической толщины заметно усиливает вклад многократного рассеяния. Угловые зависимости элементов МРС имеют форму, близкую к МРС для однократного рассеяния, при условии, что оптическая толщина рассеивающей системы τ не превышает единицы для систем крупных частиц и десяти и более для систем малых частиц.

Интенсивность при многократном рассеянии (элемент M_{11}) для объема большого диаметра убывает с ростом угла рассеяния медленнее, чем интенсивность при однократном рассеянии. При дальнейшем росте диаметра системы обратное рассеяние становится преобладающим (см. рис. 2.4–2.6). В системах малых частиц (см. рис. 2.5) рост вклада многократного рассеяния сопровождается постепенным снижением величины всех элементов, кроме M_{11} ; т. е. форма МРС становится такой

же, как у идеального деполяризатора. В частности, величина элементов M_{12} и M_{21} убывает примерно одинаковым образом, элементы M_{33} и M_{44} также убывают по величине, но M_{44} убывает быстрее. В результате многократное рассеяние порождает разницу между регистрируемыми значениями элементов M_{33} и M_{44} даже для систем сферических частиц. Значения элемента M_{22} становятся меньшими единицы, причем это убывание более существенно в области углов рассеяния, близких к 90° . Таким образом, проявление эффекта многократного рассеяния в монодисперсных системах сферических частиц, заключающееся в возникновении ненулевых значений $|M_{33} - M_{44}|$ и $|1 - M_{22}|$, аналогично проявлению эффекта несферичности частиц в условиях однократного рассеяния [224].

Для систем крупных частиц многократное рассеяние также снижает величину и сглаживает угловое распределение нормированных элементов МРС (см. рис. 2.6). По сравнению с МРС для систем малых частиц соответствующие угловые зависимости обнаруживают следующие специфические особенности: минимальное значение элемента M_{22} достигается не при 90° , а при больших углах рассеяния, тонкая структура угловых зависимостей всех элементов смазана даже при наличии небольшой части многократного рассеянного света, и, наконец, что очень важно, элемент M_{44} , в отличие от других элементов, в пределе высоких кратностей рассеяния стремится к 0,5, а не к нулю при всех углах рассеяния. Такой вид МРС означает, что излучение, рассеянное крупными частицами, имеет преимущественно круговую поляризацию при больших кратностях рассеяния. Этот результат может служить подтверждением преимущественного сохранения определенного типа поляризации в условиях многократного рассеяния для определенных размеров рассеивающих частиц, составляющих биоткань [59, 557, 560, 650].

Процесс многократного рассеяния фотонов в процессе их миграции рассматривается как последовательность поворотов их координатных систем, определенных плоскостями рассеяния и направлениями распространения. Поскольку эти повороты являются случайными, регистрируемые фотоны будут случайно поляризованы и, следовательно, рассеянный свет в целом будет частично деполяризован. Деполяризация будет увеличиваться с ростом кратности рассеяния. При умеренной оптической толщине (диаметр рассеивающей системы 0,2 мм, объемная плотность частиц $f = 0,01$) способность к деполяризации сильно различается для разных направлений. Рассеянный свет может быть почти полностью поляризован в области малых углов рассеяния, полностью деполяризован при больших углах ($\theta = 120^\circ$) и частично поляризован в обратном направлении. Угловая область наиболее сильной деполяризации соответствует углу, вблизи которого матричный элемент M_{22} приобретает наименьшие значения (см. рис. 2.6).

Моделируемые зависимости позволяют оценить пределы применимости приближения однократного рассеяния при интерпретации результатов экспериментальных исследований дисперсных рассеивающих систем. Из результатов моделирования следует, что изменения МРС монодисперсных систем сферических частиц из-за многократного рассеяния во многом похожи на изменения МРС однократно рассеивающих систем при отклонении формы частиц от сферической. Этот факт накладывает серьезные ограничения на использование измеренных МРС биологических объектов для решения обратной задачи с целью определения несферичности частиц. Необходима разработка соответствующих критериев для дифференцирования эффектов многократного рассеяния и несферичности частиц.

Важно отметить, что сравнение моделирования методом МК, учитывающим рассеяние любой кратности, с аналитической моделью двукратного рассеяния не выявило существенных различий в картине поляризации света, отраженного назад [562, 563]. Это происходит из-за того, что из всех траекторий многократного рассеяния

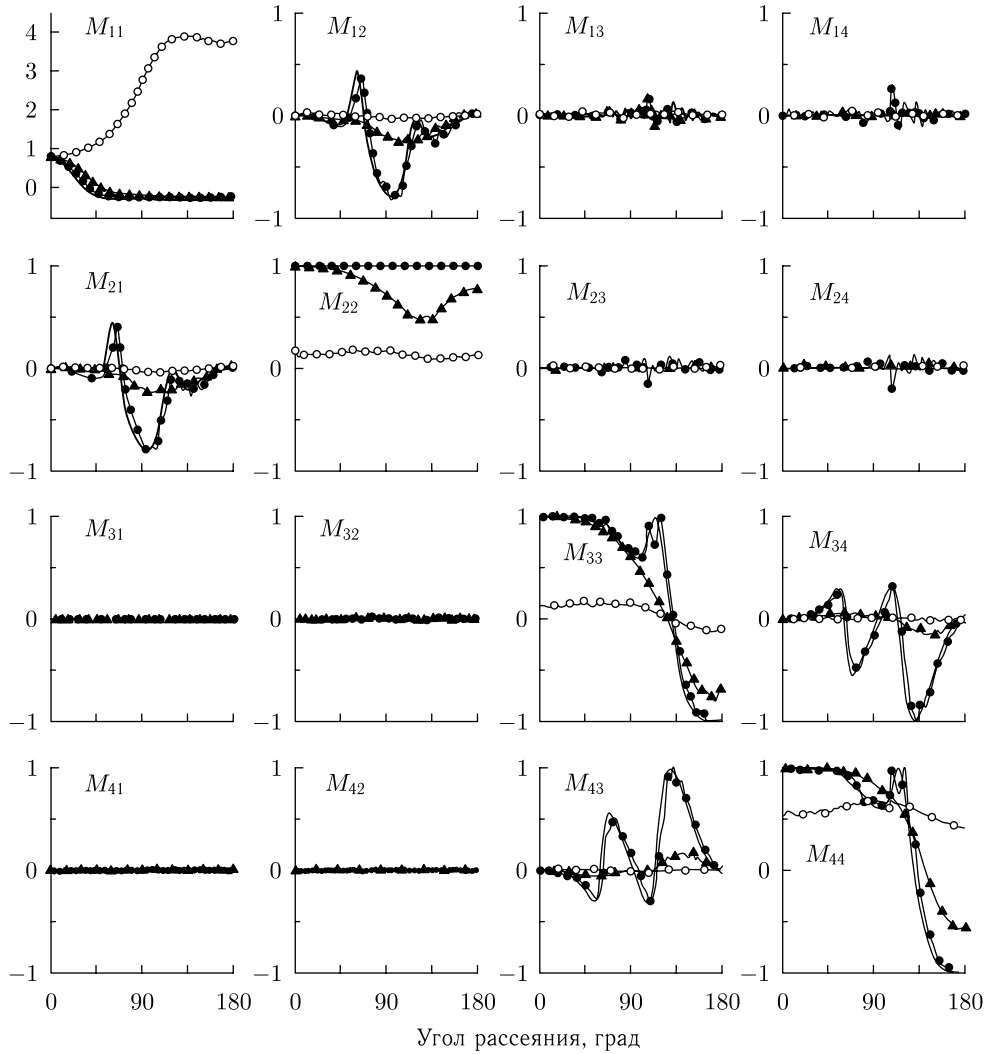


Рис. 2.6. Моделирование методом Монте-Карло: угловые распределения элементов МРС для многократно рассеивающих систем больших сферических частиц ($a = 300$ нм, $m = 1,2$), равномерно распределенных в сферическом объеме ($f = 0,01$); диаметр системы равен 0,002 мм (—●—), 0,2 мм (—△—) и 2 мм (—○—); сплошной линией показаны результаты расчета в приближении однократного рассеяния; бесконечно тонкий пучок неполяризованного света падает точно в центр рассеивающего объема в направлении, от которого отсчитываются углы, длина волны равна 633 нм [578]

основной вклад получается от траекторий, близких к двукратному рассеянию, когда фотон испытывает два акта рассеяния на большие углы и множество актов рассеяния почти без изменения направления. Очевидно, что вклад фотонов с такими траекториями хорошо аппроксимируется вкладом фотонов с траекториями при двукратном рассеянии.

Описанная выше техника МК-моделирования траекторий фотонов хорошо подходит для описания эффектов многократного рассеяния в системе случайно расположенных частиц. Более того, эта схема позволяет применить приближенный подход для описания интерференционных эффектов, обусловленных пространственной упорядоченностью частиц. Для этого нужно включить интерференцию рассеянных полей в расчет матрицы Мюллера однократного рассеяния и интегральных сечений для частицы. Другими словами, на первой стадии интерференционные эффекты учитываются при описании свойств *однократного рассеяния*, а затем эти свойства используются при моделировании методом МК *многократного рассеяния*. Такой подход допустим, если размер области локального упорядочения частиц намного меньше, чем средняя длина свободного пробега фотона.

В общем случае поляризованного света, распространяющегося в сильно рассеивающей среде, многократное рассеяние уменьшает величину и сглаживает угловую зависимость нормированных элементов МРС, характеризующих взаимодействие поляризованного света со средой. Для сред, состоящих из крупных частиц, характеризующихся высокой степенью анизотропии однократного рассеяния или значительной транспортной длиной фотона, рассеянное излучение сохраняет преимущественно круговую поляризацию при высоких кратностях рассеяния.

2.8. Сильно рассеивающие биоткани и фантомы

Зная характер преобразования вектора Стокса при каждом акте рассеяния, можно найти состояние поляризации после многократного рассеяния в сильно рассеивающей среде, используя различные приближения теории многократного рассеяния или метод МК. Для малых частиц эффекты многократного рассеяния проявляются в нарушении соотношений симметрии между элементами МРС (см. соотношения (2.25)–(2.28)), $M_{12}(\theta) \neq M_{21}(\theta)$, $M_{33}(\theta) \neq M_{44}(\theta)$, а также в существенном снижении доли линейно поляризованного света при рассеянии на углы, близкие к $\pi/2$ [662].

Для системы малых пространственно некоррелированных частиц степень линейной ($i = L$) и круговой ($i = C$) поляризации в дальней зоне изначально поляризованного (линейно или по кругу) света, прошедшего через слой толщины d , определяется соотношением [557]

$$P_i \approx \frac{2d}{l_s} \operatorname{sh}(l_s/\xi_i) \cdot \exp(-d/\xi_i), \quad (2.54)$$

где $l_s = 1/\mu_s$ — длина рассеяния,

$$\xi_i = (\zeta_i \cdot l_s/3)^{0,5} \quad (2.55)$$

— характерная длина деполяризации для слоя рассеивающих частиц, $d \gg \xi_i$, $\zeta_L = l_s/[\ln(10/7)]$, $\zeta_C = l_s/(\ln 2)$.

Как видно из уравнения (2.54), характерная длина деполяризации для линейно поляризованного света в биотканях, которые можно представить как ансамбли рэлеевских частиц, примерно в 1,4 раза больше, чем соответствующая длина деполяризации для света с круговой поляризацией. Можно использовать уравнение (2.54) для оценки деполяризации света, распространяющегося сквозь ансамбль крупных сферических частиц, размеры которых сравнимы с длиной волны падающего света (рассеяние Ми). С этой целью нужно заменить l_s транспортной длиной $l_{tr} \approx 1/\mu'_s$ (см. соотношение (1.23)) и принять во внимание зависимость ζ_L и ζ_C от размера рассеивающих частиц. С ростом этого размера отношение ζ_L/ζ_C меняется. Оно убывает от $\sim 1,4$ до $0,5$ при возрастании $2\pi a/\lambda$ от 0 до ~ 4 , где a — радиус рассеивающих

частиц, а λ — длина волны света в среде, и остается практически постоянным на уровне 0,5 при возрастании $2\pi a/\lambda$ от ~ 4 до 15.

Численное моделирование методом Монте-Карло и модельные эксперименты в водных суспензиях латексных частиц различного диаметра показывают, что существуют три режима зависимости отношения степени линейной поляризации к степени круговой поляризации для прошедшего света, P_L/P_C , от d/l_{tr} (рис. 1.33) [557]. В рэлеевском диапазоне P_L/P_C растет линейно с увеличением d/l_{tr} . В промежуточной области это отношение остается постоянным. В области рассеяния Ми эта величина линейно убывает. Такое поведение связано с переходом исследуемой системы из области изотропного однократного рассеяния к области анизотропного. В случае изотропного рассеяния механизм изменения деполяризации связан с тем фактом, что значительная вероятность обратного рассеяния при каждом акте взаимодействия света со средой не искажает линейную поляризацию, в то время как рассеяние назад для круговой поляризации эквивалентно обращению направления поляризации (как при отражении от зеркала), т. е. оно эквивалентно деполяризации. По этой же причине в случае сильно вытянутой фазовой функции рассеяния степень круговой поляризации в отдельном акте рассеяния (анизотропное рассеяние) для света, распространяющегося в слое, должна оставаться отличной от нуля для больших длин, чем степень линейной поляризации.

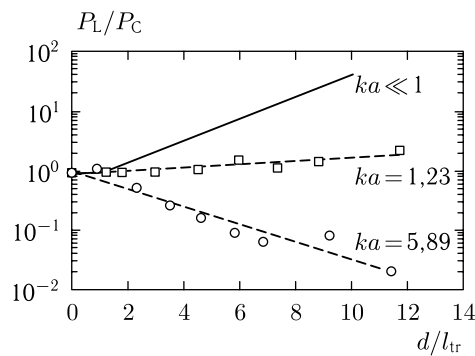


Рис. 2.7. Полулогарифмические зависимости отношения степеней поляризации P_L/P_C от d/l_{tr} для трех значений ka , $k = 2\pi/\lambda$. Сплошная линия соответствует рэлеевскому рассеянию ($ka \ll 1$), а штриховые линии отражают соответствие между экспериментальными наблюдениями и формулой (2.48) при $l_s = l_{tr}$. Экспериментальные точки получены для водных суспензий полистироловых латексных сферических частиц с диаметрами 0,22 (\square) и 1,05 (\circ) мкм, $\lambda_0 = 670$ нм [557]

Эти соображения вытекают также из вышеописанного моделирования взаимодействия поляризованного света с многократно рассеивающими системами методом МК [578] и из экспериментальных работ [641, 650]. Например, при высоких кратностях рассеяния излучение, рассеянное крупными частицами, сохраняет преимущественно циркулярную поляризацию (элемент МРС M_{44} далек от нуля для всех углов рассеяния) (рис. 2.6). При многократном рассеянии МРС для монодисперсной системы случайно распределенных сферических частиц модифицируется к виду, почти идентичному МРС однократного рассеяния в системе, содержащей несферические частицы или оптически активные сферы [578].

Таким образом, различные биоткани или одна и та же биоткань, но в разных патологических или функциональных состояниях, должны демонстрировать различный отклик при зондировании светом с линейной либо круговой поляризацией. Этот

эффект можно использовать как в медицинской оптической томографии, так и для определения оптических и спектроскопических параметров биотканей. Как следует из уравнения (2.54), длина деполяризации в биотканях должна быть близка к средней транспортной длине l_{tr} фотона, поскольку эта длина характеризует расстояние, на котором направление распространения света и, следовательно, плоскость поляризации линейно поляризованного света становятся полностью случайными после множества последовательных актов рассеяния.

Поскольку длина l_{tr} определяется параметром g , характеризующим анизотропию рассеяния, длина деполяризации также должна существенно зависеть от этого параметра. В самом деле, экспериментальные данные работы [583] показывают, что длина деполяризации l_p линейно поляризованного света, которая определяется как длина, на которой отношение I_{\parallel}/I_{\perp} падает до 2, демонстрирует такую зависимость. Упомянутое отношение изменяется от 300 до 1 в зависимости от толщины образца и типа биоткани (рис. 2.8). Эти измерения были выполнены в узком телесном угле ($\sim 10^{-4}$ ср) в направлении падающего лазерного пучка. Значения l_p существенно различались для белого вещества и ткани коры головного мозга: 0,19 и 1,0 мм для $\lambda = 476\text{--}514$ нм и 0,23 и 1,3 мм для $\lambda = 633$ нм соответственно. Дерма кожи человека (без крови) имеет длину деполяризации 0,43 мм ($\lambda = 476\text{--}514$ нм) и 0,46 мм ($\lambda = 633$ нм). Длина деполяризации при $\lambda = 476\text{--}514$ нм убывает в ответ на патологические изменения в ткани стенки аорты: 0,54 мм для нормальной биоткани, 0,39 мм на стадии обызвествления и 0,33 мм на стадии некротической язвы. Цельная кровь с низким гематокритом характеризуется значительной длиной деполяризации (около 4 мм) при $\lambda = 633$ нм, что свидетельствует о сильной зависимости этого параметра от фактора анизотропии рассеяния среды g , значение которого для крови превышает значения этого параметра для биотканей многих других типов и может быть оценено как 0,966–0,997 [2, 40, 48, 230].

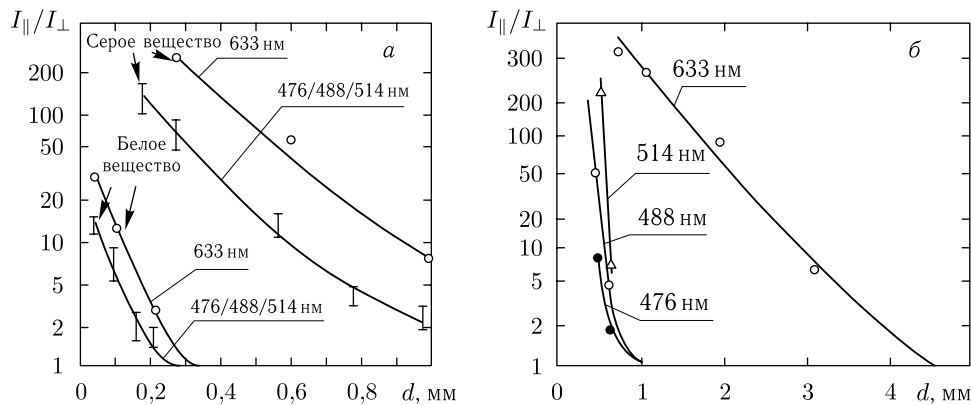


Рис. 2.8. Зависимость степени деполяризации (I_{\parallel}/I_{\perp}) лазерного излучения (He:Ne-лазер, $\lambda = 633$ нм; Ar-лазер, $\lambda = 476/488/514$ нм) от глубины проникновения для ткани мозга (серое и белое вещество) (а) и цельной крови (с низким гематокритом) (б) [583]. Измерения производились внутри малого телесного угла (10^{-4} ср) вдоль оси лазерного пучка диаметром 1 мм. Видно сильное влияние флуоресценции в крови, облучаемой Ar-лазером

В отличие от деполяризации, ослабление коллимированного света определяется полным коэффициентом ослабления μ_t (см. уравнение (1.1)). Для многих биотканей μ_t много больше μ'_s . Поэтому в определенных ситуациях невозможно зарегистрировать чисто баллистические фотоны (фотоны, не испытавшие рассеяния),

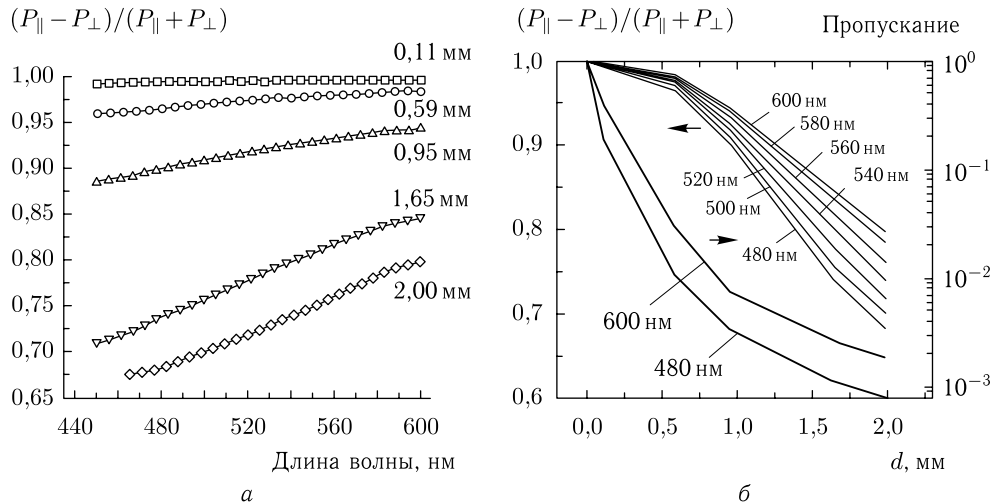


Рис. 2.9. Поляризационные спектры света, прошедшего в направлении вперед (а), и соответствующие зависимости от толщины слоя d для фантома из желатинового геля (20%) и молока (б) [586]

однако фотоны, рассеянные вперед, сохраняют свою начальную поляризацию и могут быть использованы для получения изображения [584, 585]. Это иллюстрируется рисунками 2.9 и 2.10, представляющими экспериментальные данные по спаду степени линейной поляризации P_L (см. уравнение (2.20)), полученные в фантоме из желатинового геля и молока (модель дермы без крови) в широком диапазоне длин волн [77, 586] и для различных биотканей и крови, в зависимости от пропускания света этими объектами [650]. Резкий перегиб характеристик спада поляризации (рис. 2.9 б), который можно наблюдать при малых толщинах 0,6 мм, можно отнести к переходу среды в режим многократного рассеяния.

Авторы работы [587] экспериментально показали, что лазерное излучение сохраняет линейную поляризацию на уровне $P_L \leq 0,1$ в пределах $2,5l_{tr}$. В частности, для кожи, облучаемой красным или ближним ИК-светом, имеем $\mu_a \approx 0,4 \text{ см}^{-1}$, $\mu'_s \approx 20 \text{ см}^{-1}$ и $l_{tr} \approx 0,48 \text{ мм}$. Следовательно, свет, распространяющийся в коже, сохраняет линейную поляризацию на расстоянии около 1,2 мм. Такая оптическая длина в биоткани соответствует временной задержке светового импульса, равной 5,3 пс, что дает возможность получать поляризационные изображения макронеоднородностей в биоткани с таким же пространственным разрешением, как и в более сложных методах на основе временного разрешения. Кроме селекции диффузно рассеянных фотонов поляризационная визуализация позволяет исключить зеркальное отражение от поверхности биоткани, что дает возможность использовать этот метод для изображения микрососудов в поверхностных слоях кожи и регистрировать двулучепреломление и оптическую активность этих слоев [138, 588–590, 594, 595].

Поляризационная визуализация — сравнительно новое направление в оптике биотканей, однако оно интенсивно развивается [36, 129, 135, 138, 556–580, 583–636, 640, 641, 647–654, 662, 663, 666, 670–673, 675–678, 680, 684, 687–695, 701, 709–712, 721, 726, 728, 731, 737, 749]. Наиболее перспективные подходы к получению поляризационных изображений, в частности картирование распределения степени линейной поляризации, измерение двумерных распределений матрицы Мюллера при рассеянии назад, поляризационно-чувствительная оптическая когерентная томогра-

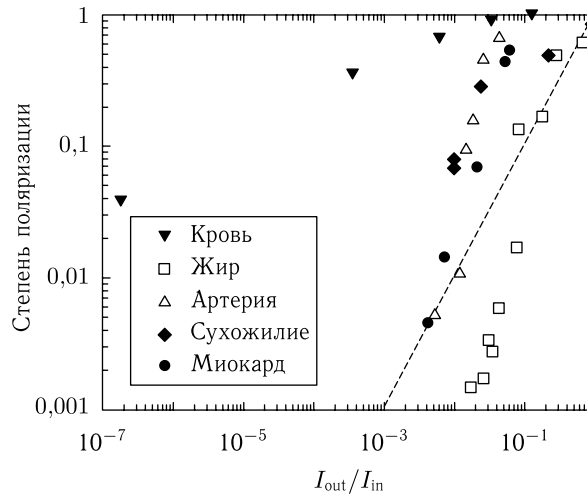


Рис. 2.10. Степень линейной поляризации в различных тканях как функция оптического пропускания образца, $I_{out}/I_{in} \equiv T$, на длине волны 633 нм. Каждая точка получена усреднением по трем измерениям [650]. Величина ошибки, определенная по стандартному отклонению, меньше размера использованных символов

фия (ПЧ-ОКТ) и метод поляризационных спеклов полного поля, будут рассмотрены в данной и последующих главах.

Регистрация двумерных отображений степени поляризации для рассеянного в обратном направлении изначально поляризованного узкого лазерного пучка лежит в основе одного из методов поляризационной визуализации [587, 594, 595]. Наиболее информативные изображения в обратном рассеянии получаются при использовании матрицы Мюллера для описания и регистрации поляризованного света [563, 573–579, 592, 593, 597–599]. Для получения изображений для каждого из 16 матричных элементов матрицы измерения должны быть проведены при различных комбинациях исходного (источник) и конечного (детектор) поляризационных состояний.

Схема экспериментальной установки для получения изображений при диффузном рассеянии назад показана на рис. 2.11 [563, 593]. Коллимированный пучок лазерного света поляризуется различными оптическими устройствами (PO1) (линейные и круговые поляризаторы) для получения желаемой поляризации на входе. Поляризованный таким образом свет фокусируется на отверстии (около 2 мм в диаметре) в зеркале (M1), установленном на образце под углом 45° . Свет, диффузно рассеянный от образца в обратном направлении, проходит через анализатор (PO2) и дает изображение, регистрируемое с помощью охлаждаемой 12-битной ПЗС-камеры. Анализатор состоит из набора оптических устройств, которые меняются для регистрации разных состояний поляризации (линейной вертикальной, горизонтальной, под углом $\pm 45^\circ$, также правой и левой круговой), необходимых для получения соответствующего изображения, используемого далее для реконструкции элементов матрицы Мюллера.

Для определения каждого из 16 матричных элементов снималось 49 изображений (из них $49 - 16 = 33$ независимых) при различных комбинациях входного поляризатора и выходного анализатора [563, 593]. Каждый из 16 экспериментально определяемых элементов вычислялся путем сложения или вычитания ряда изображений. Каждое изображение снималось с временем экспозиции 1,7 с для устранения спекл-струк-

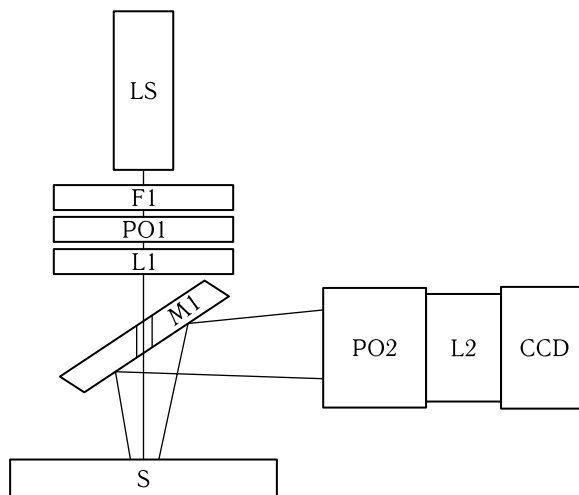


Рис. 2.11. Схема экспериментальной установки для поляризационной визуализации [563, 593]: LS — 10 мВт-й He:Ne-лазер (633 нм); F1 — 10%-й нейтральный светофильтр; PO1 — поляризующая оптика (набор 1); L1 — фокусирующая линза ($f = 10$ см); M1 — зеркало; S — образец; PO2 — анализирующая поляризационная оптика (набор 2); L2 — изображающая линзовая система; CCD — ПЗС-камера для записи изображений

туры за счет усреднения (время корреляции лазерно-индуцированных спеклов по оценке составляло примерно 10 мс).

Сравнение результатов измерения элементов матрицы Мюллера с результатами моделирования методом МК представлено на рис. 2.12 [563, 593]. Для МК-моделирования среднее число актов рассеяния на одну траекторию было равно десяти. Можно видеть хорошее согласие между экспериментальной и рассчитанной картинками, в особенности это касается азимутальной зависимости. Для исследованных суспензий частиц средняя транспортная длина свободного пробега l_{tr} составляла около 1 см. Оказалось, что на вдвое больших расстояниях азимутальная зависимость изображений становится менее выраженной, поскольку многократное рассеяние стремится разрушить поляризационное состояние света. Было показано теоретически и экспериментально, что только семь матричных элементов независимы, а остальные могут быть получены с помощью простых поворотов. Природа такой симметрии имеет достаточно общий характер: рассеивающая среда должна быть инвариантна по отношению к вращениям вокруг направления падающего лазерного пучка и должна содержать ансамбль (или конечное число различных ансамблей) идентичных (возможно, асимметричных) рассеивающих частиц со случайными ориентациями [563, 593]. Поляризационные изображения фантомов биотканей, суспензий раковых и нормальных клеток, а также биотканей в норме и некоторых патологиях, включая дисплазию, предрак и рак (роговица, ретина, хрусталик, эпителиальная ткань, ткани шейки матки, кожа, миокард, скелетная мышца, сухожилие, кость и др.) представлены во многих работах, см., например, [563, 565–569, 574, 587–592, 677, 680, 684, 689–693, 696, 703, 704, 710–712, 726, 728, 731, 737].

Нужно заметить, что в средах, содержащих крупномасштабные рассеивающие частицы (обычная модель биоткани), деполаризация является эффектом более высокого порядка в зависимости от угла рассеяния ($\sim \theta^4$, $\theta < 1$), чем поляризация ($\sim \theta^2$) [70]. В литературе поляризационное состояние многократно рассеянного света анализируется либо в условиях пространственной диффузии фотонов, когда угловой

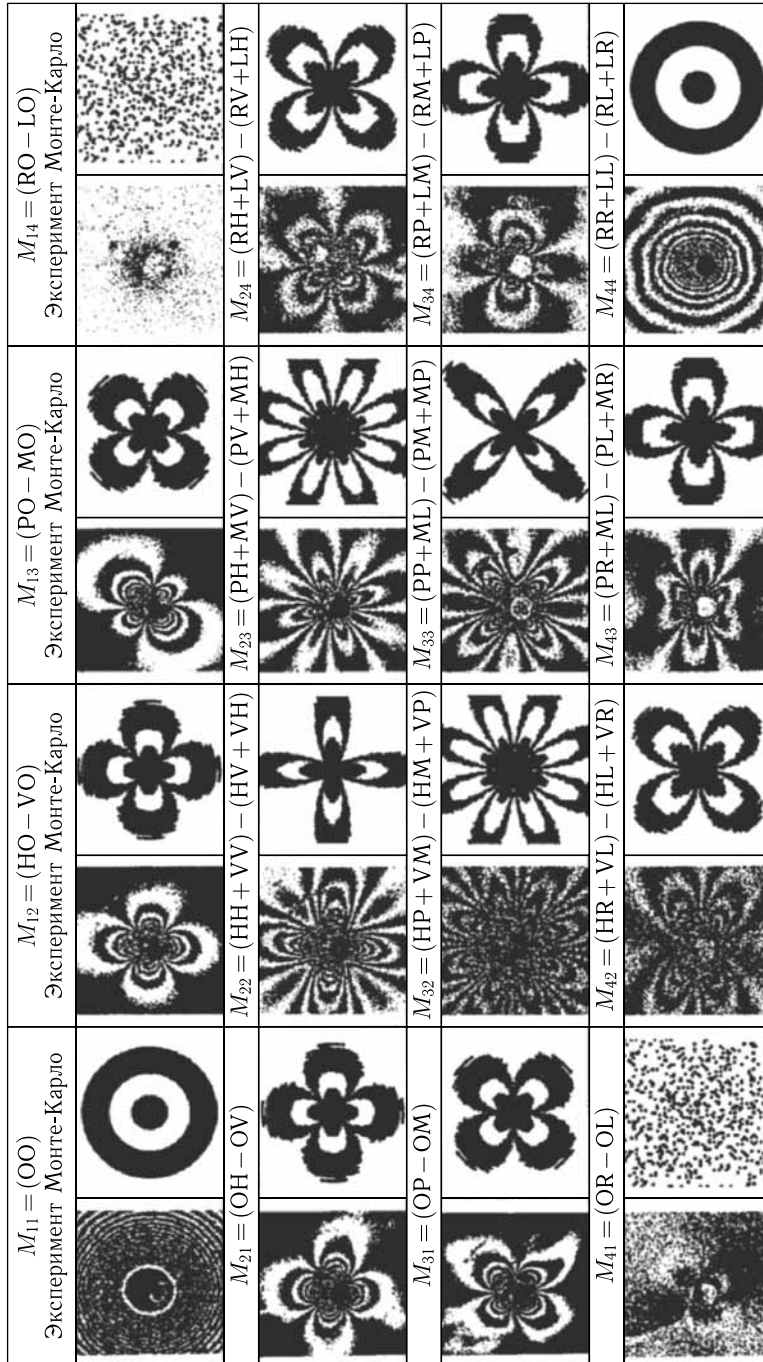


Рис. 2.12. Экспериментальная и рассчитанная методом Монте-Карло матрица Мюллера обратного рассеяния [563, 593]. Отдельные изображения помечены комбинациями из двух букв, обозначающими ориентацию поляризатора на входе и анализатора на выходе (см. рис. 2.11). HV означает горизонтально поляризованный свет на входе и вертикально расположенный анализатор; V — вертикально; H — горизонтально; P — +45°; M — -45°; R — вправо; L — влево; O — отсутствие поляризационной оптики. Примерный размер каждого изображения $1,6 \times 1,6 \text{ см}^2$. Фантом ткани состоял из водной суспензии полистироловых сфер диаметром $2,02 \text{ мкм}$, $\mu_s \approx 12 \text{ см}^{-1}$, $g = 0,912$, $\mu_a \approx 0$

спектр излучения практически изотропен (см., например, работы [276, 605, 662]), либо в случае рассеяния на малые углы в средах с крупномасштабными неоднородностями [70, 278, 557, 662]. Нужно подчеркнуть, следуя работе [70], что анализ поляризационного состояния в случае многократного рассеяния на малые углы важен для многих задач, относящихся к оптической диагностике биологических сред, которые можно представить как случайные системы с большой длиной корреляции флуктуаций диэлектрической проницаемости. Такие системы демонстрируют эффекты когерентного рассеяния [73, 74, 603], в них можно ожидать также проявления флуктуаций поляризации, аналогичные тем, которые происходят в неупорядоченных средах с крупномасштабными неоднородностями [604–608]. Когерентные эффекты при многократном рассеянии поляризованного света теоретически исследованы в работах [733, 739, 752].

В слабо поглощающих средах с многократным рассеянием на малые углы степень линейной поляризации для фазовой функции Хеньи–Гринштейна (см. соотношение (1.15)) описывается следующей формулой [70]:

$$P_L = -\frac{(\mu'_s z)^4}{2\theta^2} \cdot \left[\sqrt{1 + \left(\frac{\theta}{\mu'_s z}\right)^2} - 1 \right]^2 \cdot \left[1 + \left(\frac{\theta}{\mu'_s z}\right)^2 \right]. \quad (2.56)$$

Это означает, что для очень малых углов ($\theta \ll \mu'_s z$) степень поляризации не зависит от глубины (z):

$$P_L = -\theta^2/8. \quad (2.57)$$

На крыльях зависимости от угла рассеяния ($\theta \gg \mu'_s z$) она стремится к

$$P_L = -\theta^2/2, \quad (2.58)$$

что равно степени поляризации однократно рассеянного света.

Глава 3

ДИСКРЕТНЫЕ МОДЕЛИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ

В данной главе представлены дискретные модели биологических тканей. Анализируются оптические модели биотканей с однократным или многократным рассеянием, с упорядоченными и случайно распределенными рассеивающими частицами. В качестве примеров представлены три типа тканей глаза с различной структурой и степенью мутности, такие как роговица, здоровый, или пораженный катарактой хрусталик, и склера. Обсуждаются основные принципы формирования спектров пропускания, отражения и рассеяния тканей глаза. Представлены примеры измерения элементов матрицы Мюллера для диагностики и мониторинга патологических изменений биотканей.

3.1. Введение

Из предыдущих глав следует, что оптические свойства биотканей связаны с их микроструктурой и распределением показателя преломления, однако природа этой связи требует более детального обсуждения. Было показано, что вклад в рассеивающие свойства среды от митохондрий и пространственных вариаций показателя преломления клеток и других компонентов биоткани, таких как коллагеновые и эластиновые волокна, можно оценить теоретически и экспериментально [58, 85, 96, 220, 222]. Однако количественная модель, связывающая микроскопические свойства клеток и других компонентов биоткани с коэффициентом рассеяния объемной биоткани, до сих пор не является полной. В идеале такая модель должна давать абсолютную величину оптического коэффициента рассеяния, а также его зависимости от угла рассеяния и длины волны [222]. Она также должна обеспечивать описание связи рассеивающих свойства с числом, размерами и расположением компонентов биоткани, что необходимо для решения обратной задачи. В данном разделе представлена схема корпускулярной модели мягкой биоткани, которая удовлетворяет хотя бы нескольким из этих требований. Модель построена авторами работы [222]. Перейдем к обсуждению этой работы.

3.2. Вариации показателя преломления

Мягкая биоткань состоит из плотно упакованных групп клеток и сети из волокон, через которую просачивается межтканевая (межклеточная) или интерстициальная жидкость. В микроскопическом масштабе компоненты биоткани не имеют четких границ. Они сливаются в непрерывную структуру с пространственно меняющимся показателем преломления. Для моделирования такой сложной структуры набором частиц необходимо обратиться к статистическому подходу.

Показано, что компонентами биоткани, вносящими наибольший вклад в локальные изменения показателя преломления, являются волокна соединительной ткани (пучки эластина и коллагена), органеллы цитоплазмы (митохондрии, лизосомы,

пероксисомы), ядра клеток и гранулы меланина [58, 220, 222]. На рис. 3.1 показан гипотетический профиль показателя преломления, который можно получить при измерении показателя преломления вдоль некоторой линии в произвольном направлении через объем биоткани. Ширина пиков профиля показателя преломления пропорциональна диаметру структурных элементов, а их высота зависит от величины показателя преломления каждого элемента по отношению к окружающей среде. В соответствии с рассматриваемой моделью вариации показателя преломления представляются статистически эквивалентным объемом дискретных частиц, имеющих одинаковый показатель преломления, но разные размеры.

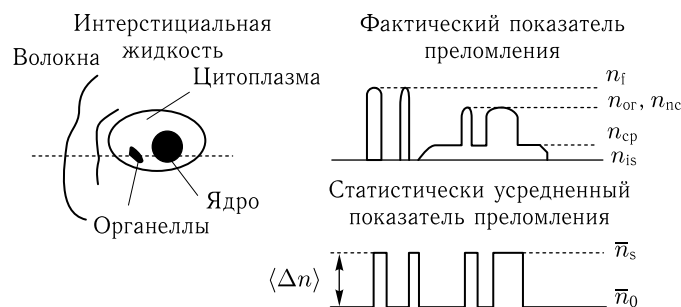


Рис. 3.1. Пространственные изменения показателя преломления биологической ткани. Показан гипотетический профиль показателя преломления для нескольких компонентов ткани, а также профиль для статистически эквивалентного объема однородных частиц. Показатели преломления, указанные на профиле, определены в тексте [222]

Показатели преломления структурных элементов биоткани, таких как фибриллы, интерстициальная среда, ядра клеток, их цитоплазма и органеллы, а также самой биоткани, могут быть рассчитаны по закону Глэдстоуна и Дейла, который утверждает, что если компоненты среды не взаимодействуют химически между собой, то результирующий показатель преломления есть среднее от показателей преломления компонентов с их объемными долями в качестве весовых множителей, т. е. [654, 753]

$$\bar{n} = \sum_{i=1}^N n_i f_i, \quad \sum_i f_i = 1, \quad (3.1)$$

где n_i и f_i — показатель преломления и объемная доля отдельных компонентов, соответственно, а N — число компонентов.

Статистически усредненный профиль показателя преломления, представленный на рис. 3.1, иллюстрирует данную модель. Средний показатель преломления базового (основного) вещества определяется как взвешенное среднее показателей преломления цитоплазмы (cp) и интерстициальной жидкости (is), n_{cp} и n_{is} :

$$\bar{n}_0 = f_{cp} n_{cp} + (1 - f_{cp}) n_{is}, \quad (3.2)$$

где f_{cp} — объемная доля жидкости, содержащейся внутри клеток в биоткани. Представленные в работе [58] данные позволяют оценить: $n_{cp} = 1,367$ и $n_{is} = 1,355$. Поскольку примерно 60% всей жидкости в мягкой биоткани содержится в межклеточном пространстве, то из соотношения (3.2) следует, что $\bar{n}_0 = 0,6 \cdot (1,367) + 0,4 \cdot (1,355) = 1,362$. Показатель преломления рассеивающей свет частицы (неоднородности) можно определить как сумму значения показателя преломления базового

вещества и среднего значения вариации показателя преломления биоткани $\langle \Delta n \rangle$,

$$\bar{n}_s = \bar{n}_0 + \langle \Delta n \rangle. \quad (3.3)$$

Среднее значение вариации показателя преломления $\langle \Delta n \rangle$ определяется другим объемнозвешенным средним, зависящим от содержания основных твердых компонентов биоткани:

$$\langle \Delta n \rangle = f_i(n_i - n_{is}) + f_{nc}(n_{nc} - n_{cp}) + f_{or}(n_{or} - n_{cp}). \quad (3.4)$$

Здесь нижние индексы относятся к волокнам (i), интерстициальной жидкости (is), ядрам клеток (nc), цитоплазме (cp) и органеллам (or), которые, как отмечалось выше, вносят основной вклад в изменения показателя преломления. Члены в круглых скобках в этом выражении представляют собой разности между показателями преломления этих компонентов биоткани и их окружения, множители — объемные доли компонентов сухой части образца биоткани. Показатель преломления волокон соединительной ткани составляет около 1,47 (см. табл. 7.2), что соответствует примерно 55% гидратации коллагена, их основного компонента. Ядра и органеллы цитоплазмы в клетках млекопитающих, такие как митохондрии и рибосомы, содержат белки и нуклеиновые кислоты примерно в одинаковых концентрациях и поэтому имеют показатели преломления, лежащие в сравнительно узком интервале (1,38–1,41) [58]. Принимая это во внимание и предполагая, что $n_{nc} = n_{or} = 1,40$, можно выразить среднее значение вариации показателя преломления только через объемную долю фиброзной ткани f_i :

$$\langle \Delta n \rangle = f_i(n_i - n_{is}) + (1 - f_i)(n_{nc} - n_{cp}). \quad (3.5)$$

Коллаген и эластин составляют примерно 70% сухого веса обезжиренной кожи, 45% ткани сердца и 2–3% немышечных внутренних органов (см. [222]). Поэтому, в зависимости от типа биоткани, f_i может быть и малой величиной около 0,02, и большой около 0,7. Для $n_i - n_{is} = 1,470 - 1,355 = 0,115$ и $n_{nc} - n_{cp} = n_{or} - n_{cp} = 1,400 - 1,367 = 0,033$ вариации среднего показателя преломления, соответствующие этим двум предельным случаям, равны $\langle \Delta n \rangle = 0,02 \cdot (0,115) + (1 - 0,02) \times (0,033) = 0,035$ и $\langle \Delta n \rangle = 0,7 \cdot (0,115) + (1 - 0,7) \cdot (0,033) = 0,09$.

3.3. Распределение частиц по размерам

Для некоторых биотканей распределение частиц по размерам может быть существенно монодисперсным, а для других — весьма широким. Два противоположных примера — прозрачная строма роговицы глаза, которая имеет узкое монодисперсное распределение, и мутная (рассеивающая) склера глаза, имеющая весьма широкое распределение коллагеновых волокон по диаметрам [129]. Не существует универсальной функции распределения частиц по размерам, которая могла бы описывать все биоткани в равной степени адекватно. В оптике дисперсных систем типичными являются гауссово, гамма- или степенное распределения [237]. Полидисперсность случайно распределенных рассеивающих частиц можно учесть с помощью гамма-распределения либо асимметричного логарифмического распределения рассеивающих частиц по диаметрам, сечениям или объемам [61, 129, 220, 222, 231, 238]. В частности, для рассеивающих сред, таких как склера глаза, применимо гамма-распределение по радиусам волокон [61, 238]:

$$\eta(a) = a^\mu \exp(-\mu\beta), \quad (3.6)$$

где $\sigma/a_m = 2,35\mu^{-0,5}$, $\beta = a/a_m$, σ — полуширина распределения, а a_m — наиболее вероятный радиус рассеивающей частицы.

Двухфазная система, состоящая из ансамбля малых частиц одинакового размера с примесью небольшого числа более крупных частиц, представляет собой хорошую модель патологической биоткани, например хрусталика, пораженного катарактой [239].

Для эпителиальных тканей, у которых основными рассеивающими структурами являются структуры клеточных ядер, характерно логарифмически-нормальное распределение по размерам сферических или слегка вытянутых эллипсоидальных частиц [232]:

$$\eta(a) = \frac{1}{a\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left\{-\frac{[\ln(a) - \ln(a_m)]^2}{2\sigma^2}\right\}. \quad (3.7)$$

В частности, для клеток эпителия и компонентов их ядер при исследовании карциномы простаты крысы были найдены два логарифмически-нормальных распределения для мелких и крупных сферических рассеивающих частиц со следующими параметрами [232]: $a_{m1} = 0,012$ мкм, $\sigma_1 = 1,15$ мкм и $a_{m2} = 0,59$ мкм, $\sigma_2 = 0,43$ мкм.

Для описания рассеивающих свойств частицы со сложной формой, отличной от сферы или длинного цилиндра, можно применить некоторые специальные процедуры, например метод Т-матриц [211, 212, 232]. Рассеивающие частицы сложной формы, например сами клетки, можно моделировать как агрегаты сферических частиц.

Рассеивающие центры в биоткани имеют широкий диапазон размеров и тенденцию к образованию агрегатов сложной формы, напоминающих фрактальные объекты. Функция асимметричного логарифмического распределения широко используется в анализе размеров частиц как наиболее правдоподобная с точки зрения физического обоснования. Функция асимметричного логарифмического распределения для объемной доли частиц с диаметром $2a$ имеет вид [222]

$$\eta(2a) = \frac{F_V}{C_m} (2a)^{3-D_f} \exp\left[-\frac{\{\ln(2a) - \ln(2a_m)\}^2}{2\sigma^2}\right], \quad (3.8)$$

где

$$C_m = \sigma\sqrt{2\pi} (2a_m)^{4-D_f} \exp\left[\frac{(4-D_f)^2\sigma^2}{2}\right]$$

— нормирующий множитель;

$$F_V = \int_0^{\infty} \eta(2a) d(2a)$$

— полная объемная доля частиц, а величины $2a_m$ и σ определяют центр и ширину распределения соответственно; D_f — фрактальная (объемная) размерность.

В пределе бесконечно широкого распределения частиц по размерам

$$\eta(2a) \approx (2a)^{3-D_f}. \quad (3.9)$$

Для $3 < D_f < 4$ это степенное соотношение описывает зависимость объемных долей субъединиц идеального массового фрактала от их диаметра $2a$. Эти распределения размеров дополняют распределения, описываемые формулами (3.6) и (3.7), и позволяют учесть фрактальные свойства биотканей.

Рассеивающие элементы эпидермального слоя кожи также обладают логарифмически-нормальным распределением по размерам, в то время как пространственные флуктуации показателя преломления плотных фиброзных биотканей, таких как дерма, и многих других биотканей подчиняются степенному закону [107, 231].

3.4. Пространственная упорядоченность частиц

Ансамбль дискретных частиц характеризуется плотностью упаковки или, другими словами, долей объема, занимаемой частицами. Очевидно, что в дополнение к размеру частиц их объемная доля также существенна для оптических свойств ансамбля из-за влияния на распределение показателя преломления (см. соотношения (3.1)–(3.5)), оптическую анизотропию (см. соотношения (2.2) и (2.3)) и другие структурные характеристики. Объемная доля частиц, содержащихся в конкретной биоткани, может быть найдена экспериментально с использованием электронных изображений ее тонких срезов. Оценка доли объема, занимаемой рассеивающими частицами, может быть также получена путем взвешивания нативной биоткани и ее сухого остатка.

Доля объема, занятая частицами в таких биотканях, как мышцы, роговица, склера и хрусталик глаза, составляет от 20 до 40%. Цельная кровь обычно содержит $(4-5) \cdot 10^6$ эритроцитов, $(4-9) \cdot 10^3$ лейкоцитов и $(2-3) \cdot 10^5$ тромбоцитов в 1 мм^3 . Клетки занимают 35–45% объема крови. Объемная доля f эритроцитов в крови называется гематокритом и обозначается Hct . Для нормальной крови $Hct = 0,4$. Оставшиеся 60% объема крови занимает, в основном, плазма — чрезвычайно прозрачный водный раствор солей.

Большинство биотканей имеют в своем составе клеточные и субклеточные структуры, расположенные близко друг к другу. Вообще говоря, в плотно упакованных структурах может проявляться коррелированное рассеяние — эффект, наблюдаемый, например, в строме роговицы глаза [63, 129, 644, 645, 647, 648]. Роговица образована отдельными коллагеновыми волокнами, которые плотно упакованы параллельно друг другу в тонкой пластинке. Если бы каждое волокно в пластинке рассеивало свет независимо, сечение рассеяния пластинки было бы произведением сечения рассеяния отдельного волокна и числа волокон в пластинке. Если бы все волокна роговицы рассеивали свет независимо, роговица рассеивала бы 90% падающего на нее света и мы не видели бы практически ничего. Однако волокна рассеивают не независимо, и эффектами когерентного рассеяния (интерференции) нельзя пренебречь. Соответственно этому, можно наблюдать и коррелированные поляризационные эффекты [63, 129, 647–650]. Например, в суспензиях сферических частиц, по мере того как концентрация частиц превосходит значения, при которых рассеяние можно считать независимым, степень поляризации начинает увеличиваться, а не уменьшаться с ростом концентрации частиц [649, 650].

Таким образом, пространственная организация частиц, образующих биоткань, играет существенную роль в распространении света. Как упоминалось выше, при очень малых плотностях упаковки имеет место некогерентное рассеяние независимыми частицами. Если доля объема, занимаемая частицами, равна или больше 0,01–0,1, появляются когерентные концентрационные эффекты. Концентрация рассеивающих частиц в большинстве биотканей такова, что расстояния между отдельными частицами сравнимы с размерами самих частиц. Если распределение частиц по размерам достаточно узкое, то плотная упаковка вносит в расположение частиц определенную степень упорядоченности.

Пространственная упорядоченность исключительно важна для оптических тканей глаза роговицы, хрусталика и стекловидного тела [63, 64, 129, 615, 644, 645, 647, 648]. Пространственный порядок в той или иной степени присущ и другим биотканям, в частности таким как сухожилие, хрящ, твердая мозговая оболочка (*dura mater*), кожа и мышцы. Высокая степень упорядоченности плотно упакованных рассеивающих свет частиц гарантирует прозрачность роговицы и хрусталика глаза. Эти тканевые структуры со статистически упорядоченными периодическими

изменениями показателя преломления с масштабом порядка длины волны, как у фотонных кристаллов [652], в одних спектральных областях демонстрируют высокое пропускание, а в других — полосы, в которых распространение электромагнитных волн запрещено. Положение и глубина этих полос зависит от размера, показателя преломления и пространственной упорядоченности рассеивающих частиц.

Для учета эффектов корреляции между частицами, что важно в системах с объемной долей рассеивающих частиц выше 1–10% (в зависимости от размера частиц), коэффициент упаковки среды, заполненной частицами различной формы с объемной долей f_s , выражается следующей формулой [214]:

$$\omega_p = \frac{(1 - f_s)^{p+1}}{[1 + f_s(p - 1)]^{p-1}}, \quad (3.10)$$

где p — упаковочная размерность, описывающая скорость, с которой пустое пространство между частицами сокращается по мере роста полной плотности числа частиц. Упаковка сферических частиц хорошо описывается упаковочной размерностью $p = 3$. Упаковка частиц в виде плоских листов или стержней характеризуется размерностями, приближающимися к 1 и 2 соответственно. Элементы биоткани имеют все эти формы и могут одновременно проявлять цилиндрическую и сферическую симметрию, поэтому упаковочная размерность может принимать любые значения между 1 и 5. При расчете оптических коэффициентов для высокой концентрации частиц распределение по размерам $\eta(2a)$ (формулы (3.6)–(3.9)) следует заменить на распределение с поправкой на учет корреляции [222]:

$$\eta'(2a) = \frac{[1 - \eta(2a)]^{p+1}}{[1 + \eta(2a)(p - 1)]^{p-1}} \eta(2a). \quad (3.11)$$

Большинство наблюдаемых рассеивающих свойств мягких биотканей описывается в рамках данной модели, когда биоткань рассматривается как набор рассеивающих частиц, объемные доли которых подчиняются асимметричному логарифмически-нормальному распределению, модифицированному коэффициентом упаковки для учета коррелированного рассеяния света плотно упакованными частицами [222].

3.5. Рассеяние системами плотно упакованных частиц

Пространственная корреляция отдельных рассеивателей приводит к необходимости рассматривать интерференцию многократно рассеянных волн. Вторичное излучение света частицами в плотно упакованной дисперсной системе приводит к отличию эффективного оптического поля в среде от падающего. В этих условиях статистическая теория многократного рассеяния волн представляется наиболее подходящей для описания коллективного взаимодействия между ансамблем частиц и электромагнитным излучением [75, 654, 754].

Строгая теория многократного рассеяния волн строится на основе фундаментальных дифференциальных уравнений для полей с последующим статистическим рассмотрением [75]. Полное поле $\mathbf{E}(\mathbf{r})$ в точке \mathbf{r} есть сумма поля падающей волны $\mathbf{E}_i(\mathbf{r})$ и рассеянных волн от всех частиц с соответствующими фазами,

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}) = \mathbf{E}_i(\mathbf{r}) + \sum_{j=1}^N \mathbf{E}_j^s(\mathbf{r}), \quad (3.12)$$

где $\mathbf{E}_j^s(\mathbf{r})$ — поле, рассеянное j -й частицей. Поле, рассеянное j -й частицей, определяется параметрами этой частицы и эффективным полем, действующим на нее.

Тверски вывел замкнутую систему интегральных уравнений, описывающих процесс многократного рассеяния [755]. Строгое решение этой задачи в общем виде, однако, еще не найдено. В существующих расчетах используются различные приближения для усреднения уравнения (3.12) по статистическому ансамблю частиц. Например, квази-кристаллическое приближение, предложенное для плотно упакованных сред Лаксом [756], эффективно используется в оптике биотканей [654]. Усреднение уравнения (3.12) по статистическому ансамблю частиц приводит к бесконечной системе уравнений, которая обрывается на втором шаге путем применения квазикристаллического приближения. Полученная замкнутая система уравнений для эффективного поля сводится к системе линейных уравнений путем разложения по векторным сферическим или цилиндрическим гармоникам. Явные выражения для коэффициентов разложения включают радиальные функции распределения, а также коэффициенты M_i для отдельной частицы [757, 758]. Равенство нулю детерминанта этой системы линейных уравнений дает дисперсионное соотношение для эффективной постоянной распространения k_{eff} данной среды [759]. Для систем частиц, размеры которых малы по сравнению с длиной волны, выражение для k_{eff} , полученное таким образом, имеет вид [654, 757]

$$k_{\text{eff}}^2 = k^2 + \frac{3fy}{D} k^2 \left[1 + i \frac{2}{3} \frac{k^2 a^2 y}{D} S_3(\theta = 0) \right], \quad (3.13)$$

где

$$y = \frac{n_1^2 - n_0^2}{n_1^2 + 2n_0^2}, \quad D = 1 - fy, \quad S_3(\theta = 0) = \frac{1}{1 - H_3}, \quad H_3 = -24f \left(\frac{\alpha}{3} + \frac{\beta}{4} + \frac{\delta}{6} \right), \quad (3.14)$$

f — доля объема, занятая частицами радиуса a с показателем преломления n_1 , а величины α , β , и δ определяются в соответствии с приближением твердых сфер:

$$\alpha = \frac{(1 + 2f)^2}{(1 - f)^4}, \quad \beta = -6f \frac{(1 + 0,5f)^2}{(1 - f)^4}, \quad \delta = \frac{1}{2} f \frac{(1 + 2f)^2}{(1 - f)^4}. \quad (3.15)$$

Рассчитанный эффективный показатель преломления [654]

$$n_{\text{eff}} = n'_{\text{eff}} + i n''_{\text{eff}} \quad (3.16)$$

является комплексной величиной, даже если частицы и окружающее их вещество не обладают собственным поглощением. Мнимая часть эффективного показателя преломления n''_{eff} описывает уменьшение энергии падающей плоской волны из-за рассеяния во всех направлениях. Коэффициент пропускания слоя толщины z определяется выражением

$$T = \exp \left(-\frac{4\pi}{\lambda} n''_{\text{eff}} z \right). \quad (3.17)$$

Величина $\frac{4\pi}{\lambda} n''_{\text{eff}}$ представляет собой коэффициент экстинкции μ_t . Для рассматриваемых систем значение мнимой части эффективного показателя преломления растет с увеличением частоты и немонотонно зависит от концентрации частиц в слое. В результате коэффициент пропускания дисперсного слоя при малых значениях концентрации частиц убывает с ее ростом, а начиная с объемной плотности частиц $f \approx 0,1$ растет, и имеет место так называемый эффект «просветления». Действительная часть эффективного показателя преломления в данном приближении не зависит существенно от длины волны и меняется монотонно с ростом концентрации частиц, приближаясь к их собственному показателю преломления. Ближний порядок в расположении рассеивающих частиц при большой их концентрации не только

обеспечивает условия для проявления интерференции вторичных рассеянных волн, но также меняет режим распространения многократно рассеянного света [760]. Это может сопровождаться так называемыми концентрационными эффектами просветления и затемнения.

Оптическая мягкость (слабая рефракция) частиц, составляющих биоткани, дает возможность использовать при вычислениях разложение по кратности рассеяния с ограничением низшими порядками. В работе [761] было получено выражение для эффективного показателя преломления роговицы глаза, моделируемой системой цилиндрических рассеивателей, в виде разложения по кратности рассеяния и эффекты поляризационной анизотропии анализировались по вкладу двукратного рассеяния.

Используя теорию многократного рассеяния, Тверски [762] удалось вывести приближенные выражения для коэффициентов поглощения μ_a и рассеяния μ_s , описывающих распространение света в крови. Гематокрит крови Hct связан с концентрацией эритроцитов ρ и объемом эритроцита V_e следующим отношением [275, 762]

$$\rho = \frac{\text{Hct}}{V_e}. \quad (3.18)$$

Тогда коэффициент поглощения оказывается равным:

$$\mu_a = \frac{\text{Hct}}{V_e} \sigma_a. \quad (3.19)$$

Для достаточно малых значений Hct ($\text{Hct} < 0,2$) коэффициент рассеяния дается выражением

$$\mu_s = \frac{\text{Hct}}{V_e} \sigma_s. \quad (3.20)$$

Для $\text{Hct} > 0,5$ частицы становятся плотно упакованными, а среда — почти однородной. В этом случае кровь можно считать однородной средой, содержащей гемоглобин, в которую погружены рассеивающие частицы, образованные окружающей эритроциты плазмой. В пределе, $\text{Hct} \rightarrow 1$, «плазменные частицы» исчезают, и коэффициент рассеяния должен стремиться к нулю. Это приводит к следующему приближенному выражению для μ_s [275, 763]:

$$\mu_s \approx \frac{\text{Hct}(1 - \text{Hct})}{V_e} \sigma_s, \quad (3.21)$$

где коэффициент $(1 - \text{Hct})$ отвечает за подавление рассеяния при $\text{Hct} \rightarrow 1$. Однако абсолютно плотная упаковка ($\text{Hct} = 1$) реально не достижима; например, для приближения твердых сфер Hct не может превышать 0,64. С учетом этого факта и физиологических условий необходимо описывать влияние упаковки клеток на рассеяние света более сложной функцией

$$\mu_s = \frac{\text{Hct}}{V_e} \sigma_s F(\text{Hct}), \quad (3.22)$$

где функция упаковки $F(\text{Hct})$ учитывает физиологические условия для эритроцитов, в частности деформируемость клеток при высоких концентрациях.

Хотя теория рассеяния волн Тверски [755, 762] разумно согласуется с данными измерений оптической плотности для слоя цельной крови [763], однако для оценки входящих в уравнения Тверски параметров необходимо использовать технику подгонки кривых. Эта теория также не описывает пространственное распределение отраженного и прошедшего света и потому не позволяет использовать ее при других взаимных расположениях источника и приемника, кроме как на одной оптической оси. Напротив, теория переноса излучения, обсуждавшаяся выше, в частности ее

упрощенное диффузионное приближение, преодолевает эти ограничения теории рассеяния волн, однако для ее применения к описанию плотно упакованных биотканей необходимо учитывать эффекты взаимодействия частиц и распределения их по размерам. Комбинацию с другими теориями, описывающими взаимодействие частиц, а также использование эмпирических данных можно рассматривать как плодотворный и практичный подход к моделированию оптических свойств биотканей.

Например, при расчетах в рамках диффузионной теории Штайнке и Шеферд [763] скорректировали зависимость коэффициента рассеяния μ_s для тонкого слоя крови от гематокрита (3.21) и взяли ее в виде

$$\mu_s \approx \frac{Hct}{V_e} \sigma_s (1 - Hct)(1,4 - Hct). \quad (3.23)$$

На основе сочетания фотонно-диффузионной теории с представлением биоткани как системы частиц была разработана микрооптическая модель, объясняющая большинство наблюдаемых свойств рассеяния мягких биотканей [222]. В этой модели биоткань рассматривается как набор рассеивающих частиц, объемные доли которых подчиняются асимметричному логарифмически-нормальному распределению, модифицированному упаковочным множителем p для учета коррелированного рассеяния света плотно упакованными частицами (см. формулы (3.8), (3.9) и (3.11)). Предполагая, что волны, рассеянные отдельными частицами в тонком слое моделируемой биоткани складываются случайно, можно аппроксимировать объемный коэффициент рассеяния суммой коэффициентов рассеяния частиц данного диаметра, а именно

$$\mu_s = \sum_{i=1}^{N_p} \mu_s(2a_i), \quad (3.24)$$

где

$$\mu_s(2a_i) = \frac{\eta(2a_i)}{v_i} \sigma_s(2a_i), \quad (3.25)$$

N_p — число групп частиц с разными диаметрами; $\eta(2a_i)$ — объемная доля частиц с диаметром $2a_i$ (см. формулы (3.8), (3.9) и (3.11)); $\sigma_s(2a_i)$ — сечение рассеяния отдельной частицы диаметра $2a_i$ и объема v_i . Усредненная по объему фазовая функция $p(\theta)$ (и параметр анизотропии рассеяния g) слоя биоткани есть взвешенная сумма угловых функций рассеяния $p_i(\theta)$ (и параметров анизотропии g_i) отдельных частиц, где в качестве весовых множителей берутся соответствующие коэффициенты рассеяния:

$$p(\theta) = \frac{\sum_{i=1}^{N_p} \mu_s(2a_i) p_i(\theta)}{\sum_{i=1}^{N_p} \mu_s(2a_i)}; \quad (3.26)$$

$$g = \frac{\sum_{i=1}^{N_p} \mu_s(2a_i) g_i(2a_i)}{\sum_{i=1}^{N_p} \mu_s(2a_i)}. \quad (3.27)$$

Приведенный коэффициент рассеяния, определяется как обычно, $\mu'_s = \mu_s(1 - g)$. Усредненный по объему коэффициент рассеяния назад можно определить как сумму

сечений частиц с весовыми множителями, в качестве которых берутся значения угловых функций рассеяния при 180° ,

$$\mu_b = \sum_{i=1}^{N_p} \frac{\eta(2a_i)}{v_i} \sigma_s(2a_i) p_i(180^\circ). \quad (3.28)$$

Произведение μ_b ($\text{см}^{-1} \cdot \text{ср}^{-1}$) и толщины слоя биоткани дает отраженную долю падающей плотности энергии на единицу телесного угла в направлении, противоположном направлению падающего света.

Расчет по данной модели с применением теории Ми к ансамблю сфер с широким разбросом диаметров дал набор параметров распределения и упаковки частиц: объемную фрактальную размерность $D_f = 3,7$, средний показатель преломления основной среды биоткани $\bar{n}_0 = 1,352$, средний показатель преломления рассеивающих частиц $\bar{n}_s = 1,420$, полную объемную долю частиц $F_v = 0,2$, центр распределения частиц по размерам $2a_m = 1,13$ мкм, ширину этого распределения $\sigma = 2$ мкм и коэффициент упаковки $p = 3$ (см. формулы (3.3), (3.8)–(3.11)), которые приводят к статистически достоверным оценкам коэффициентов рассеяния и параметров анизотропии рассеяния типичных мягких биотканей. В табл. 3.1 приведены величины коэффициентов μ_s , μ'_s , μ_b и параметра g на трех длинах волн (633, 800 и 1300 нм), рассчитанные в рамках этой модели для соединительной биоткани, содержащей различные доли сухого веса волокон ($f_f = 0,03; 0,3$ и $0,7$). В целом эти расчеты хорошо согласуются с данными экспериментальных исследований оптических параметров мягких биотканей *in vitro* и даже *in vivo*.

Таблица 3.1

Оптические коэффициенты модельной биологической ткани с тремя различными весовыми долями сухого волокна (f_f), при фрактальной (объемной) размерности $D_f = 3,7$ [222]

Длина волны, нм	633			800			1300		
f_f	0,03	0,3	0,7	0,03	0,3	0,7	0,03	0,3	0,7
μ_s (см^{-1})	105	224	402	69	146	274	29	63	119
μ'_s (см^{-1})	8,0	20	45	5,7	14	32	3,0	7,5	16,5
μ_b ($\text{см}^{-1} \cdot \text{ср}^{-1}$)	0,8	2,2	5,0	0,5	1,3	3,1	0,3	0,9	2,0
g	0,92	0,91	0,89	0,92	0,90	0,88	0,90	0,88	0,86

При условии, что ансамбль рассеивающих частиц имеет широкое распределение по размерам, рассмотренная модель [222] достаточно полно описывает оптические свойства сильнорассеивающих биотканей, а именно: 1) объемная доля частиц и их показатель преломления определяют верхнюю и нижнюю границы для величины коэффициента рассеяния; 2) коэффициент рассеяния убывает с длиной волны примерно как $\mu_s \sim \lambda^{2-D_f}$ при $600 \leq \lambda \leq 1400$ нм, где D_f — ограничивающая фрактальная размерность; 3) частицы в биоткани с диаметрами между $\lambda/4$ и $\lambda/2$ являются основными источниками рассеяния назад, а частицы, ответственные за наибольшую экстинкцию света, рассеянного вперед, имеют диаметр между 3λ и 4λ .

Как следует из работы [107], фрактальная размерность D_f сильно зависит от того, как проводится дискретизация непрерывного распределения частиц по размерам. В модели десяти сфер Шмитта и Кумара [222] была получена фрактальная размерность $3 < D_f < 4$. Это отличается от описанной Вангом [107] модели сфер, размер которых менялся от 5 нм до 30000 нм с шагом 5 нм, где диапазон фрактальной

размерности был определен как $4 < D_f < 5$. В модели Ванга коэффициент рассеяния убывает с длиной волны как $\mu_s \sim \lambda^{3-D_f}$ при $600 \leq \lambda \leq 1500$ нм; следовательно, обе модели дают одинаковый степенной закон зависимости коэффициента рассеяния от длины волны, лежащий между $\mu_s \sim \lambda^{-1}$ и $\mu_s \sim \lambda^{-2}$. Величина коэффициента рассеяния возрастает с уменьшением фрактальной размерности, поскольку более крупные частицы, имеющие большие сечения рассеяния, дают относительно больший вклад в полное сечение рассеяния среды. Модель Ванга также подтверждает то, что частицы с диаметрами между $\lambda/4$ и $\lambda/2$ доминируют в рассеянии назад, но, по сравнению с моделью Шмитта и Кумара, она предсказывает более широкий разброс рассеивающих частиц по диаметрам, для которого характерна наибольшая экстинкция, а именно между λ и 10λ .

Приведенный коэффициент рассеяния убывает с ростом длины волны в соответствии со степенным законом, что было продемонстрировано экспериментально для нормальной, обезвоженной и коагулированной аорты человека *in vitro*, а именно [764, 765]

$$\mu'_s \propto \lambda^{-h}. \quad (3.29)$$

Экспериментальные данные для нормальных (контрольных) и нагреваемых образцов аорты человека представлены в табл. 3.2. При прямом нагреве (100°C) наблюдалось уменьшение h от 1,38 для образца биоткани в норме до 1,06 для нагретой. Исследование *in vitro* кожи крысы, пропитанной глицерином, также подтвердило степенную зависимость приведенного коэффициента рассеяния от длины волны в диапазоне 500–1200 нм с $h = 1,12$ для кожи в норме с последующим уменьшением h по мере выдержки в глицерине (главным образом, за счет эффекта дегидратации) [766]. Значения h составляли 1,09 через 5 мин, 0,85 через 10 мин, 0,52 через 20 мин и 0,9 для повторно гидратированного образца.

Таблица 3.2

Значения показателя h степенной зависимости приведенного коэффициента рассеяния от длины волны (см. уравнение (3.29)) и уровней значимости h по критерию Стьюдента для контрольных и экспериментальных спектров приведенного коэффициента рассеяния (400–1300 нм) аорты человека (в скобках приведены среднеквадратичные отклонения) [764, 765]

Условия	h_{control}	h_{exp}	Значимость, %
Дегидратация	1,15 (0,10)	1,22 (0,13)	~ 15
Нагрев до 60°C	1,21 (0,12)	1,28 (0,04)	~ 25
Нагрев до 70°C	1,30 (0,01)	1,10 (0,10)	< 5
Нагрев до 100°C (прямой нагрев)	1,38 (0,11)	1,06 (0,07)	< 5
Нагрев до 100°C (в металлической фольге)	1,26 (0,08)	1,03 (0,05)	< 5

Измерения *in vivo* рассеяния назад для кожи человека и нижележащих биотканей также продемонстрировали степенной закон зависимости приведенного коэффициента рассеяния от длины волны [767]:

$$\mu'_s = q\lambda^{-h} \quad (\text{см}^{-1}, \lambda \text{ в микрометрах}). \quad (3.30)$$

В частности, для спектров отражения от предплечья человека в диапазоне длин волн 700–900 нм постоянные q и h оказались равными $5,50 \pm 0,11$ и $1,11 \pm 0,08$ соответственно. Из теории Ми следует, что показатель степени h связан со средним

размером рассеивающих частиц — эквивалентным радиусом M_i и a_M . Определив h , можно найти радиус из соотношений [767]

$$h = -1109,5a_M^3 + 341,67a_M^2 - 9,36961a_M - 3,9359 \quad (a_M < 0,23 \text{ мкм}), \quad (3.31)$$

$$h = 23,909a_M^3 - 37,218a_M^2 + 19,534a_M - 3,965 \quad (0,23 < a_M < 0,60 \text{ мкм}). \quad (3.32)$$

Эти соотношения были записаны для показателя преломления частиц относительно окружающей среды $m = 1,037$. Измеренная *in vivo* постоянная $h = 1,11$ приводит к значению a_M в 0,30 мкм, что примерно в 2 раза меньше, чем средний радиус (0,57 мкм), использованный в обсуждавшейся выше модели упакованных сфер с большим разбросом размеров [222].

3.6. Оптические свойства тканей глаза

3.6.1. Оптические модели

3.6.1.1. Структура тканей глаза. Здоровые биоткани передней камеры глаза человека (см. рис. 3.2, цветная вклейка) (например, роговица и хрусталик) в высокой степени прозрачны для видимого света из-за их упорядоченной структуры и отсутствия сильно поглощающих хромофоров. Важной особенностью распространения света в тканях глаза является рассеяние. Размеры рассеивающих элементов и расстояние между ними меньше или сравнимы с длиной волны видимого света, а относительный показатель преломления невелик (оптически «мягкие» частицы). Типичные модели тканей глаза представляют собой длинные круглые диэлектрические цилиндры (коллагеновые волокна роговицы и склеры), имеющие показатель преломления n_s ; они хаотично или квазиупорядоченно (склера, помутневший хрусталик) или регулярно (прозрачная роговица и хрусталик) распределены в изотропном базовом веществе с показателем преломления $n_0 < n_s$ [3, 10, 24, 61, 63, 64, 77, 129, 238, 609, 611, 614, 615, 644, 645, 647, 648, 651, 652, 768–801]. Благодаря малости сечений рассеяния (оптически «мягкие» частицы), анализ рассеяния света в тканях глаза часто можно провести с использованием простой модели однократного рассеяния.

Рассмотрим вначале более детально структуру роговицы и склеры как примеры биотканей с различным распределением рассеивающих частиц по размерам и различной степени их пространственного упорядочения [3, 129, 644, 768–780]. Роговица представляет собой передний отдел фиброзной капсулы глаза, ее диаметр около 10 мм. Склера — мутная непрозрачная биоткань, которая покрывает около 80% глаза и служит защитной оболочкой, которая вместе с роговицей обеспечивает противодействие внутренним и внешним силам и сохранение формы глаза. Обе биоткани состоят из коллагеновых волокон, погруженных в базовое вещество [644, 768–773, 777–780]. Волокна имеют форму цилиндра. Отдельные волокна сгруппированы в пучки, имеющие вид тонких пластинок. Внутри каждой пластинки все волокна примерно параллельны друг другу и плоскости пластинки. Волокна и образованные ими пластинки погружены в аморфное базовое (интерстициальное) вещество, содержащее воду, глюкозаминогликаны, белки, протеоглики и различные соли. Глюкозаминогликаны играют ключевую роль в регуляции структурирования ансамбля коллагеновых волокон, а также в проницаемости биоткани для воды и других молекул [779]. Показатели преломления волокон и базового вещества заметно различаются.

Структурные элементы, обеспечивающие поддержание нужной кривизны роговицы, выдерживающей внутриглазное давление (14–18 мм рт. ст.), расположены внутри слоя ее стромы, который составляет 0,9 толщины роговицы [644, 645, 657, 770,

774–776]. Строма состоит из нескольких сотен уложенных друг на друга слоев пластинок (ламелей) (см рис. 3.3), которые различаются по ширине (0,5–250 мкм) и толщине (0,2–0,5 мкм) в зависимости от области биоткани [770] (три соседние пластинки показаны на рис. 3.4). Небольшое количество плоских клеток (кератоцитов) рассеяно между пластинками, занимая всего лишь 0,03–0,05 объема стромы. Каждая пластинка состоит из набора параллельных коллагеновых волокон. Средняя толщина роговицы человека составляет 0,52 мм.

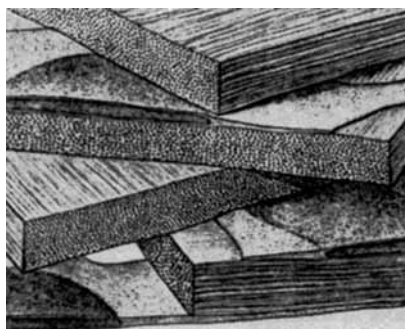


Рис. 3.3. Схематическая иллюстрация пластинчатой организации стромы роговицы глаза. На схеме также показано, как кератоциты расположены между пластинками [645]

Хотя диаметры волокон роговицы варьируют от 25 до 39 нм у различных млекопитающих, волокна практически одинаковы по диаметру у каждого из них [770, 771, 779]. Расстояние между центрами волокон равно 45–65 нм; межмолекулярные расстояния внутри волокон лежат в интервале 1,56–1,63 нм [771]. Волокна роговицы человека имеют почти одинаковый диаметр $30,8 \pm 0,8$ нм и расположены с периодом, близким к удвоенному диаметру, $55,3 \pm 4,0$ нм, и высокой степенью регулярности в ориентации осей волокон друг относительно друга (см. рис. 3.4). Межмолекулярное расстояние составляет $1,63 \pm 0,10$ нм [771]. Таким образом, строма имеет по крайней мере три уровня структурной организации: пластинки, уложенные параллельно поверхности роговицы, фибриллярную структуру внутри каждой пластинки, состоящую из тонких параллельных коллагеновых волокон одинакового диаметра, имеющих определенный порядок расположения в пространстве, и внутреннюю молекулярную структуру коллагена.

Склера состоит из трех слоев: эписклеры, стромы и супрахороида, или темной пластинки (*lamina fusca*) [769]. Строма — наиболее толстый слой склеры. Толщина склеры и упорядочение коллагеновых волокон меняется в зависимости от положения (передняя часть, экваториальная область и область заднего полюса) и возраста. В строме склеры коллагеновые волокна имеют широкий диапазон диаметров, от 25 до 230 нм (см. рис. 3.5) [770]. Средний диаметр коллагенового волокна постепенно растет примерно от 65 нм в наиболее глубоком слое до 125 нм в самом наружном [778]; среднее расстояние между центрами волокон составляет примерно 285 нм [780]. Межмолекулярное расстояние внутри волокон такое же, как в роговице; например, в склере быка оно равно $1,61 \pm 0,02$ нм [779].

Волокна параллельным образом организованы в отдельные пучки, однако более неупорядоченно, чем в роговице; более того, внутри каждого пучка группы волокон отделены друг от друга большими пустыми лакунами, случайным образом распределенными в пространстве [770]. Коллагеновые пучки имеют широкий разброс по ширине (от 1 до 50 мкм) и толщине (от 0,5 до 6 мкм) и демонстрируют

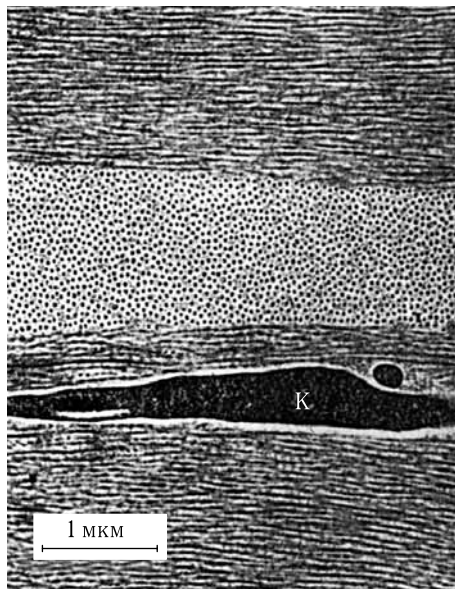


Рис. 3.4. Коллагеновые волокна в роговице глаза человека имеют однородный диаметр и ориентированы в одном направлении в пределах каждой пластинки [770]: К — кератоцит ($\times 32\,000$, сканирующая электронная микроскопия)

тенденцию к росту ширины и толщины в направлении к более глубоким слоям. Эти лентообразные структуры многократно пересекаются, а их длина может достигать нескольких миллиметров [769]. Они пересекают друг друга во всех направлениях, но остаются параллельными поверхности склеры. Эписклера имеет аналогичную структуру, но с более случайно распределенными и менее компактными пучками, чем у стромы. Супрахороид (темная пластинка) содержит большее количество пигментов, в основном меланина, гранулы которых расположены между пучками. Сама склера не содержит кровеносных сосудов, но имеет множество каналов, по которым артерии, вены и нервы проходят внутрь глаза или обратно [769].

Толщина склеры неодинакова. Она толще в области заднего полюса (от 0,9 до 1,8 мм), самая тонкая на экваторе (от 0,3 до 0,9 мм) и от 0,5 до 0,8 мм в передней части. Гидратация склеры человека порядка 68%. Около 75% ее сухого веса составляет коллаген, 10% — другие белки и 1% — мукополисахариды [769].

При разработке оптической модели биоткани, кроме формы, размеров и плотности рассеивающих элементов (волокон) и толщины биоткани, важно иметь информацию о показателе преломления компонентов. Следуя работам [238, 769, 771, 773], можно оценить показатель преломления волокон роговицы и склеры (гидратированный коллаген) n_c с использованием формулы (3.2), которая была записана для среднего показателя преломления биоткани \bar{n}_t :

$$n_c = \frac{\bar{n}_t - (1 - f_c)n_{is}}{f_c}, \quad (3.33)$$

где f_c — объемная доля гидратированного коллагена, а n_{is} — показатель преломления интерстициальной жидкости. Показатели преломления, измеренные для сухого коллагена роговицы и интерстициальной жидкости, равны $n_c^{\text{dry}} = 1,547$ и $n_{is} = 1,345\text{--}1,357$ [644, 645, 647, 769, 771, 773]. Показатель преломления стромы

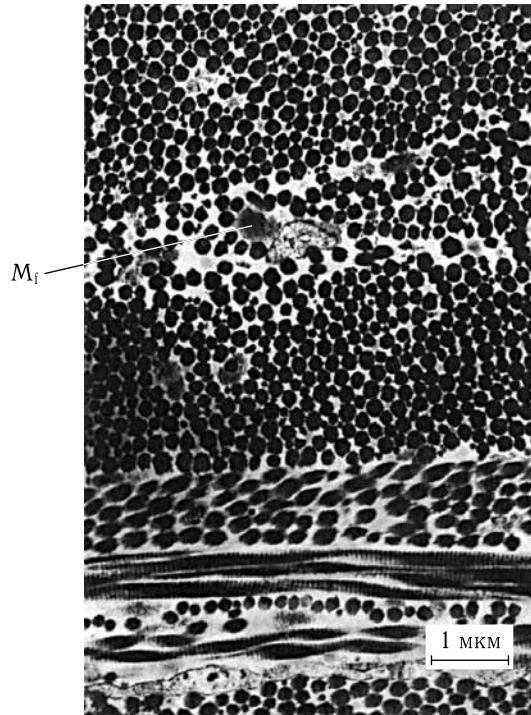


Рис. 3.5. Коллагеновые волокна в склере глаза человека [770]. Коллагеновые волокна имеют различные диаметры. Они намного больше, чем в роговице: M_f — микрофибрилла ($\times 18\,000$, сканирующая электронная микроскопия)

роговицы, измеренный для многих образцов, составляет $\bar{n}_t = 1,375 \pm 0,005$ [771]. Следовательно, для $n_{is} = 1,356$ и $f_c = 0,32$, что соответствует гидратации биоткани 76,2% и содержанию коллагена 61,3% сухого веса [771], на основании соотношения (3.33) легко получить показатель преломления гидратированных волокон $n_c = 1,415$. Прямое измерение среднего показателя преломления склеры с использованием рефрактометра Аббе дает $\bar{n}_t = 1,385 \pm 0,005$ для $\lambda = 589$ нм. Ввиду сходства фиброзной природы роговицы и склеры можно ожидать, что при одинаковой гидратации показатели преломления коллагена склеры и ее интерстициальной жидкости будут равны этим же величинам в роговице. Для $\bar{n}_t = 1,385$, $n_{is} = 1,345$ и $f_c = 0,31$, соответствующих гидратации биоткани 68% и содержанию коллагена 75% сухого веса, из формулы (3.33) следует, что показатель преломления волокон склеры равен $n_c = 1,474$. Изменения n_c и f_c при гидратации можно оценить из измерений показателя преломления и толщины коллагеновых пленок [802].

Хотя обе биоткани состоят из одинаковых молекулярных компонентов, они имеют различные микроструктуры и, следовательно, очень разные физиологические функции. Роговица прозрачна, она пропускает более 90% падающего на нее света. Коллагеновые волокна роговицы намного более однородны по размеру и расстоянию между ними, чем у склеры, в результате чего степень пространственной упорядоченности волокон в роговице намного выше, чем в склере. Склера непрозрачна для света, она рассеивает почти все длины волн видимого света и поэтому выглядит белой.

Распространение света в плотно упакованной дисперсной системе можно анализировать с использованием радиальной функции распределения $g(r)$, которая

статистически описывает пространственное упорядочение частиц в системе. Функция $g(r)$ представляет собой отношение локальной плотности числа центров волокон на расстоянии r от опорного волокна с $r = 0$ к объемной плотности числа центров волокон [645]. Она выражает относительную вероятность нахождения двух центров волокон, разделенных расстоянием r ; таким образом, $g(r)$ должна быть равна нулю для значений $r \leq 2a$ (a — радиус, ближе которого центры волокон не могут подходить друг к другу из-за соприкосновения). Радиальная функция распределения рассеивающих центров $g(r)$ для конкретной биоткани может быть вычислена на основе данных электронной микроскопии (см. рис. 3.4 и 3.5).

Метод экспериментального определения $g(r)$ включает подсчет числа частиц, расположенных на данном расстоянии от произвольно выбранной начальной частицы, за которым следует статистическое усреднение по всему ансамблю. В двумерном случае число частиц ΔN на расстоянии от r до $r + \Delta r$ связано с функцией $g(r)$ следующим соотношением:

$$\Delta N = 2\pi\rho g(r) r \Delta r, \quad (3.34)$$

где ρ — среднее число частиц на единицу площади.

Радиальная функция распределения $g(r)$ была впервые найдена для роговицы кролика Фаррелом и др. [645]. На рис. 3.6а показан типичный результат для одного из участков роговицы, который был получен путем определения отношения локальной средней плотности центров как функции радиусов, взятой для 700 центров волокон. Функция $g(r) = 0$ для $r \leq 25$ нм, что согласуется с радиусом волокна 14 ± 2 нм. Первый пик распределения дает наиболее вероятное расстояние между волокнами, составляющее примерно 50 нм. Значение $g(r)$ равно единице для $r \geq 170$ нм, что отражает тот факт, что положения волокон коррелированы только для нескольких ближайших соседей. Следовательно, в системе существует только так называемый ближний порядок.

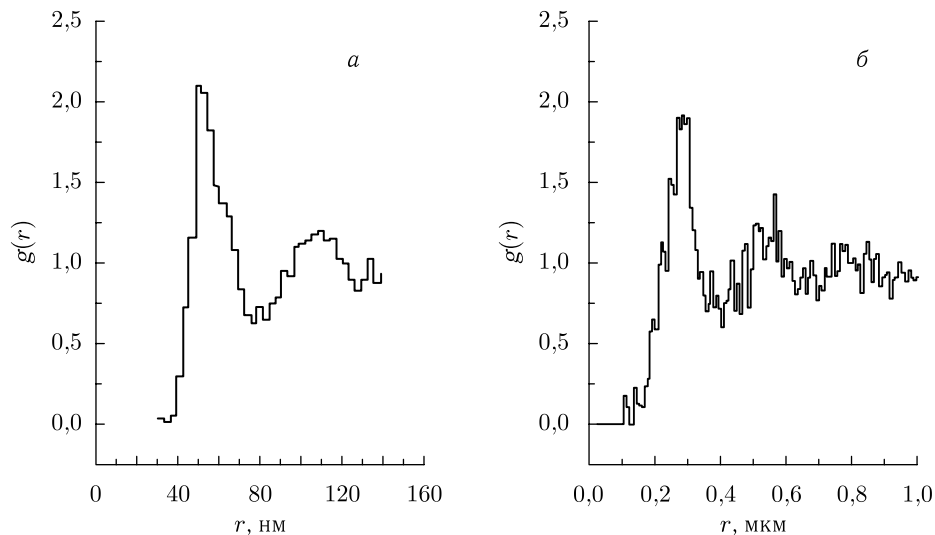


Рис. 3.6. Гистограммы функции радиального распределения $g(r)$, полученные из электронных микрофотографий роговицы кролика (а) [645] и склеры человека (б) [651, 791]

Аналогичные расчеты для нескольких участков склеры глаза человека [651, 791] проиллюстрированы на рис. 3.6 б. Были обработаны электронные микрофотографии

из работы [770], усредненные для 100 центров волокон (см. рис. 3.5). Функция $g(r)$ для склеры была получена на основе пространственного распределения центров волокон в пренебрежении разброса их диаметров. Некоторые флуктуации кривой обусловлены малым объемом выборки для статистического усреднения. Полученные результаты свидетельствуют о наличии ближнего порядка также и в склере, хотя степень упорядоченности менее выражена, чем в роговице. Функция $g(r) = 0$ для $r \leq 100$ нм, что согласуется со средним диаметром волокна ≈ 100 нм, полученным из электронной микрофотографии (см. рис. 3.5) [770]. Первый пик в распределении дает наиболее вероятное расстояние между волокнами, составляющее примерно 285 нм. Значение $g(r)$ равно единице для $r \geq 750$ нм, что отражает наличие ближнего порядка в системе рассеивателей. Ближний порядок характеризуется отношением этого специфического расстояния (длины пространственной корреляции) к наиболее вероятному расстоянию между частицами, $750/285 \approx 2,7$, что меньше аналогичного отношения для роговицы, $170/50 = 3,4$.

Флуктуации пространственной плотности (показателя преломления) биоткани также можно проанализировать, раскладывая двумерные профили вариаций показателя преломления на фурье-составляющие, что дает основу для детального и количественного описания микроструктуры [772, 780]. Эти фурье-составляющие представляют преобладающую частоту пространственных флуктуаций и структурного упорядочения. Сравнительное исследование роговицы и склеры глаза человека этим методом также показали, что роговице присущи намного меньшее среднее расстояние между волокнами и более высокая степень упорядоченности по сравнению со склерой.

Хрусталик глаза также представляет собой пример биоткани, для которой ближний пространственный порядок имеет принципиальную важность. Благодаря своему высокому показателю преломления и прозрачности хрусталик фокусирует свет и формирует изображение на сетчатке (см. рис. 3.2). Материал хрусталика обладает определенной вязкостью, что дает возможность менять радиус кривизны и фокусное расстояние хрусталика за счет действия аккомодационных мышц. Здоровый хрусталик человека представляет собой когерентную (упорядоченную) структуру, содержащую 60% воды и 38% белковых молекул [782–790]. Хрусталик состоит из множества волоконных клеток. Преобладающими сухими компонентами хрусталика млекопитающих являются три вида структурных белков, называемых α -, β - и γ -кристаллинами, их общий вес отвечает за 33% полного веса хрусталика [793]. Хрусталик растет в течение жизни и вдобавок претерпевает различные биохимические изменения с возрастом. Эти изменения включают возможность формирования возрастной катаракты, ведущей к резкому увеличению рассеяния света и окраски и, в конце концов, к непрозрачности хрусталика. Фотоокисление белков хрусталика при постоянном действии УФ, УФА или видимого света приводит к возникновению окисленных форм этих белков, образующих поперечные связи с другими белками, вызывая формирование очагов непрозрачности или пигментов [794]. При импульсном или непрерывном УФА излучении возможна также агрегация кристаллинов через бимолекулярное взаимодействие фотоактивированных молекул белка [799–801].

Рассеяние света обусловлено случайными флуктуациями показателя преломления. Это могут быть флуктуации плотности или анизотропии [64, 609, 613, 614, 621, 782, 784, 788]. Флуктуации показателя преломления, связанные с изменениями плотности, могут возникать из-за 1) агрегации белков хрусталика, 2) разделения микрофаз (катаракта, индуцированная холодом), 3) синерезиса (явления, при котором вода в слое гидратации белков хрусталика переходит из связанного в свободное состояние, что увеличивает разность показателей преломления между белками хрусталика и межтканевой жидкостью). Анализ рассеяния поляризованного света

хрусталиком человека с катарактой показал, что от 15 до 30 % мутности возникает из-за флуктуаций оптической анизотропии.

Прозрачность хрусталика глаза можно объяснить ближним порядком в структуре упаковки белков хрусталика. Эта идея была впервые предложена Бенедекком [794]. Главную роль среди белков хрусталика играет растворимый в воде α -кристаллин, имеющий форму, близкую к сферической с диаметром примерно 17 нм. Исследования прозрачности хрусталика, двулучепреломления и оптической активности важны для ранней диагностики катаракты [704, 782–790, 793–798].

Типы деструкции волоконных клеток, связанные с образованием катаракты, включают межклеточные глобулы, кластеры глобул, вакуоли, содержимое которых полностью или частично удалено, кластеры сильно закрученных клеточных мембран и неправильной формы области высокой или низкой плотности [790]. Эти объекты, близкие к сферическим по форме и переменные по размерам (часто в диапазоне от 100 до 250 нм), создают потенциальные центры рассеяния.

Оптические модели тканей глаза имеют следующие специфические черты:

- оптическая неоднородность порождает рассеяние света;
- среднее расстояние между рассеивающими элементами и их размеры меньше длины волны или сравнимы с ней;
- рассеивающие частицы оптически «мягкие», т. е. показатель преломления их материала n_s близок к показателю преломления базового (интерстициального) вещества n_0 ($n_s \geq n_0$);
- в основной массе случаев поглощение мало;
- прозрачные биоткани имеют приблизительно монодисперсную и упорядоченную структуру.

Основные структурные характеристики тканей глаза человека собраны в табл. 3.3.

Таблица 3.3
Структурные и оптические свойства тканей глаза человека (показатель преломления базового вещества $n_0 = 1,345$)

Ткань	Модель	Толщина ткани, мм	Диаметр рассеивателей, нм	Показатель преломления рассеивателей, n_s	Кратность рассеяния
Роговица	Монодисперсная система регулярно уложенных длинных диэлектрических цилиндров	0,46–0,52	$30,8 \pm 0,8$	1,470	Однократное или малократное
Склера	Полидисперсная система случайно уложенных длинных диэлектрических цилиндров	0,3–1,8	25–230	1,474	Множественное
Хрусталик в норме	Монодисперсная система регулярно уложенных диэлектрических шаров	5,0	от 20 до 200	1,380	Однократное или малократное
Катаракта хрусталика	Двухфазная система случайно уложенных диэлектрических шаров	5,0	от 200 до 2000	1,40–1,48	Малократное или множественное

3.6.1.2. Упорядоченность структуры тканей глаза. Существует определенная корреляция между волнами, рассеянными соседними частицами в плотно упакованной среде, которая имеет характерный размер порядка длины волны. Следовательно, необходимо суммировать рассеянные волны с учетом фазовых соотношений между ними. Интерференционные взаимодействия могут приводить к существенным изменениям полной интенсивности рассеянного света, угловой зависимости или поляризационных характеристик рассеянного света по сравнению с этими величинами для системы невзаимодействующих частиц.

Для описания рассеяния света в коррелированной дисперсной системе мы будем использовать радиальную функцию распределения $g(r)$, которая является статистической характеристикой пространственного расположения рассеивающих частиц [129, 645] (см. рис. 3.6). Рассмотрим N сферических частиц в конечном объеме. Парная функция распределения $g_{ij}(r)$ пропорциональна условной вероятности найти частицу типа j на расстоянии r от начала координат при условии, что в нем находится частица типа i (рис. 3.7) [803]. В модели непроникающих друг в друга (твердых) сфер силы взаимодействия между частицами равны нулю, за исключением сил, препятствующих проникновению сфер друг в друга при соприкосновении.

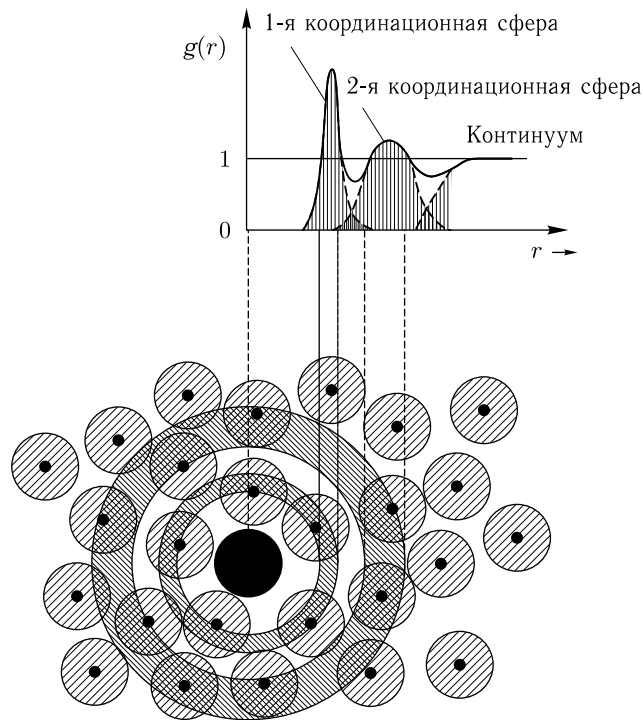


Рис. 3.7. Диаграмма функции радиального распределения $g(r)$, пропорциональной вероятности смещения частицы на некоторое расстояние r от произвольно фиксированной частицы [651, 791]

Расположение частиц в плотно упакованной системе не вполне случайно. По мере того как плотность рассеивающих центров растет, а ширина их распределения по размерам убывает, начинает наблюдаться ближний порядок в их расположении. В окрестности начала координат, радиус которой равен диаметру частицы, $g(r) = 0$,

что указывает на взаимную непроницаемость частиц. Функция $g(r)$ имеет несколько максимумов, положение которых соответствует расстояниям до первой, второй и т. д. соседней частицы. Ненулевые значения минимумов отражают распределение частиц между различными координационными сферами. Очевидно, что корреляция между парами частиц должна спадать с ростом r ; поэтому $\lim_{r \rightarrow \infty} g(r) = 1$. Функция $g(r)$ есть отношение локальной плотности числа рассеивающих центров на расстоянии r от произвольного центра к объемной плотности числа частиц.

Среда, состоящая из N рассеивателей, рассматриваемая здесь, аналогична ансамблю смеси L типов частиц в статистической механике при описании посредством задания положений частиц и их динамики с учетом сил взаимодействия между частицами. Были проведены исследования по получению парной функции распределения на основе различных приближенных теорий. Один из важных результатов основан на приближении Перкуса–Йефика. В применении к модели твердых сфер в трехмерном пространстве соответствующее уравнение имеет аналитическое решение. Для нахождения радиальной функции распределения также используется метод Монте-Карло. Решение уравнения Орнштейна–Цернике для случая одного вида частиц было получено Вертхаймом [804]. Для случая частиц двух видов решение найдено в работе [805]. Для общего случая частиц L видов решение, основанное на обобщенном методе Винера–Хопфа, получено Бакстером [806]. Полидисперсность реальной системы аппроксимируется L -шаговой функцией распределения.

Для монодисперсных систем сферических частиц диаметра $2a$, $g(r)$ представляется в приближении твердых сфер следующим образом [807]:

$$g(r) = 1 + \frac{1}{4\pi f} \int_0^{\infty} \frac{H_3^2(z)}{1 - H_3(z)} \frac{\sin zx}{zx} z^2 dz \quad \text{для } x > 1, \quad (3.35)$$

где $x = r/2a$,

$$H_3(z) = 24f \int_0^1 c_3(x) \frac{\sin zx}{zx} x^2 dx, \quad c_3(x) = -\alpha - \beta x - \delta x^3, \quad (3.36)$$

$$\alpha = \frac{(1+2f)^2}{(1-f)^4}, \beta = -6f \frac{(1+0,5f)^2}{(1-f)^4}, \delta = \frac{1}{2} f \frac{(1+2f)^2}{(1-f)^4}, \quad (3.37)$$

f — объемная доля частиц.

Рассмотрим рассеяние света системой N сферических частиц [654]. В общем случае поле, действующее на частицу, отличается от поля падающей волны E_i , поскольку оно также содержит полное поле соседних рассеивателей. В приближении однократного рассеяния (борновском приближении) поле, действующее на частицу, не отличается существенно от поля первоначальной волны. В случае, когда на частицу действует поле двукратного рассеяния, нужно брать сумму падающего поля и однократно рассеянного поля и так далее [75]. Для прозрачных биотканей, состоящих из оптически мягких регулярно упакованных частиц, использование приближения однократного рассеяния дает вполне удовлетворительные результаты [10, 24, 63, 64, 77, 129, 199, 611, 614, 615, 645, 647, 648, 652, 773, 782, 784, 795, 796].

Поле, рассеянное частицей с центром в точке \mathbf{r}_j , отличается от поля, рассеянного частицей, находящейся в начале координат, фазовым множителем, характеризующим фазовый сдвиг волн. Разность фаз равна $(2\pi/\lambda)(\mathbf{S}_0 - \mathbf{S}_1)\mathbf{r}_j$, где \mathbf{S}_0 и \mathbf{S}_1 — единичные

векторы в направлении падающей и рассеянной волн (см. рис. 2.3). Разность этих векторов называется вектором рассеяния \mathbf{q} :

$$\mathbf{q} = \frac{2\pi}{\lambda} (\mathbf{S}_0 - \mathbf{S}_1). \quad (3.38)$$

Учитывая, что модуль волнового вектора не меняется при упругом рассеянии, модуль вектора рассеяния можно найти как:

$$|\mathbf{q}| \equiv q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta/2), \quad (3.39)$$

где θ — угол между направлениями \mathbf{S}_0 и \mathbf{S}_1 , т. е. угол рассеяния. Амплитуда волны, рассеянной системой из N частиц, будет равна

$$E_s = \sum_{j=1}^N E_{sj} = \sum_{j=1}^N E_{0j} e^{i\mathbf{q}\mathbf{r}_j}, \quad (3.40)$$

где E_{0j} — амплитуда волны, рассеянной изолированной частицей. Для заданной реализации расположения N частиц в пространстве интенсивность однократного рассеяния определяется выражением

$$I = |E_s|^2 = \sum_{j=1}^N E_{0j} \sum_{i=1}^N E_{0i}^* e^{i\mathbf{q}(\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_i)}. \quad (3.41)$$

Для реальной системы регистрируется только средняя интенсивность рассеяния ансамбля частиц, естественное усреднение обусловлено тепловым движением частиц, конечным временем измерения и конечной площадью фотоприемника:

$$\langle I \rangle = \left\langle \sum_{j=1}^N \sum_{i=1}^N E_{0j} E_{0i}^* e^{i\mathbf{q}(\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_i)} \right\rangle. \quad (3.42)$$

Угловые скобки обозначают усреднение по всем возможным конфигурациям расположения частиц системы. Это выражение представляет собой сумму двух вкладов в интенсивность некогерентного рассеяния. Один определяет распределение света в предположении отсутствия интерференции света, рассеянного различными частицами. Другой член относится к интерференционному влиянию на структуру светового поля и зависит от степени порядка в расположении частиц, которая характеризуется радиальной функцией распределения $g(r)$. Для анизотропной системы идентичных сферических частиц можно записать [648]

$$\langle I \rangle = |E_0|^2 N S_3(\theta), \quad (3.43)$$

$$S_3(\theta) = \left\{ 1 + 4\pi\rho \int_0^R r^2 [g(r) - 1] \frac{\sin qr}{qr} dr \right\}, \quad (3.44)$$

где q определяется выражением (3.39), ρ — средняя плотность частиц, а R — расстояние, для которого $g(r) \rightarrow 1$. Величина $S_3(\theta)$ представляет собой трехмерный (3D) структурный фактор. Этот фактор описывает изменение угловой зависимости интенсивности рассеянного света при высоких концентрациях частиц (рис. 3.8). При аппроксимации ансамбля частиц в приближении твердых сфер, использованной для вывода (3.44), структурный фактор определяется как

$$S_3(\theta) = \frac{1}{1 - H_3(q)}, \quad (3.45)$$

где $H_3(q)$ определяется соотношением (3.36).

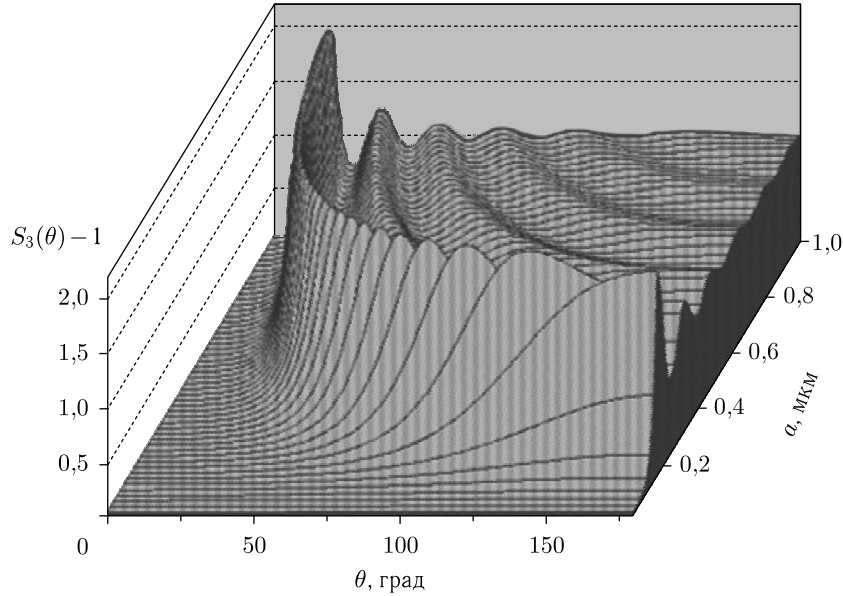


Рис. 3.8. Структурный фактор ($S_3(\theta) - 1$) (формула (3.44)) как функция угла рассеяния θ и радиуса частицы a ; длина волны 633 нм; объемная доля $f = 0,4$; относительный показатель преломления $m = 1,105$ (рассчитано И. Л. Максимовой)

Для малых концентраций частиц применимо приближение исключенного объема: $g(r) = 0$ для r меньше диаметра частицы и $g(r) = 1$ на больших расстояниях. В этом приближении структурный фактор для системы сферических частиц принимает вид, впервые предложенный Дираком [654]:

$$S_3(\theta) = 1 - f\Phi(qa), \quad (3.46)$$

где a — радиус частицы, а $\Phi(qa)$ — функция, определяемая следующей формулой:

$$\Phi(qa) = \frac{3(\sin qa - qa \cos qa)}{(qa)^3}. \quad (3.47)$$

Функция $\Phi(qa)$ модулирует угловую зависимость интенсивности рассеяния, уменьшая ее значения при малых углах и генерируя диффузное кольцо при углах рассеяния ~ 10 град для размеров частиц, сравнимых с длиной волны.

Для случая бесконечно длинных одинаково ориентированных цилиндров радиуса a и света, падающего по нормали к их осям, двумерный структурный фактор определяется в рамках приближения однократного рассеяния как:

$$S_2(\theta) = \left\{ 1 + 8\pi a^2 \rho \int_0^R [g(r) - 1] J_0\left(\frac{2\pi a}{\lambda} r \sin \frac{\theta}{2}\right) dr \right\}, \quad (3.48)$$

где R — расстояние, для которого $g(r) \rightarrow 1$. Поскольку свет падает перпендикулярно оси цилиндров, рассеянный свет распространяется только в направлении, перпендикулярном оси.

Для очень малых концентраций частиц структурный фактор примерно единица, а интенсивность рассеянного дисперсной системой света представляет собой сумму вкладов от независимых рассеивателей. Для систем мелких оптически мягких частиц

структурный фактор лишь слегка меняется как функция угла рассеяния. Следовательно, взаимодействие частиц проявляется прежде всего в виде равномерного снижения интенсивности рассеяния во всех направлениях для линейно поляризованного и неполяризованного падающего света (см. рис. 3.9 и 3.10). Для систем крупных частиц структурный фактор заметно меньше единицы только в области малых углов рассеяния (см. рис. 3.11 и 3.12). Интерференционное взаимодействие рассеивателей в некоторых угловых полосах снижает интенсивность рассеяния, а в других — повышает по сравнению с распределением интенсивности от эквивалентного числа невзаимодействующих частиц (рис. 3.12). В общем случае взаимодействие частиц

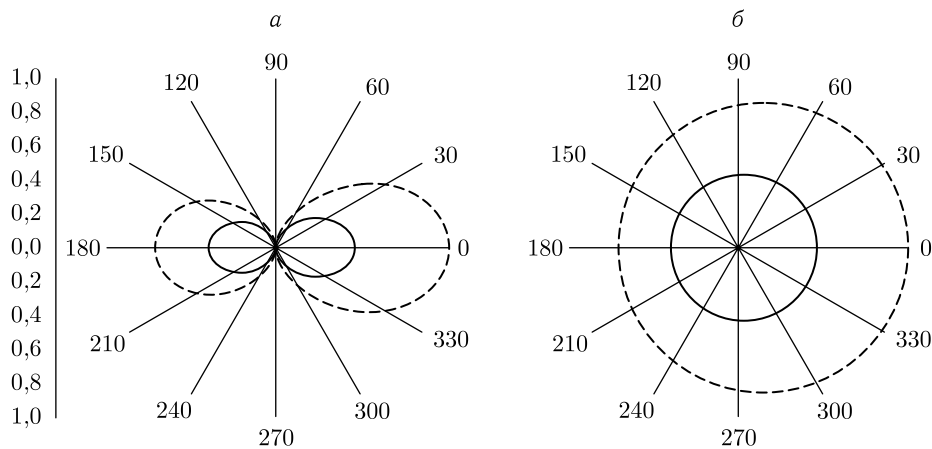


Рис. 3.9. Рассчитанные угловые зависимости интенсивности рассеяния для системы малых сферических частиц радиусом 20 нм; падающая волна линейно поляризована параллельно (а) или перпендикулярно (б) плоскости рассеяния; пунктирная линия — независимые частицы; длина волны 633 нм; объемная доля $f = 0,1$; относительный показатель преломления $m = 1,105$ (рассчитано И. Л. Максимовой)

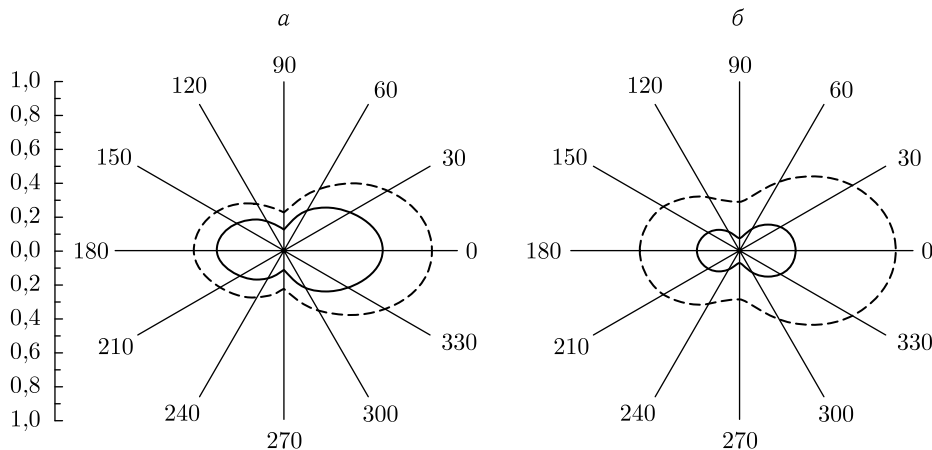


Рис. 3.10. Рассчитанные угловые зависимости интенсивности рассеяния для системы малых сферических частиц радиусом 50 нм; падающая волна не поляризована; пунктирная линия — независимые частицы; длина волны 633 нм; объемные доли $f = 0,04$ (а) и $f = 0,1$ (б); относительный показатель преломления $m = 1,105$ [654]

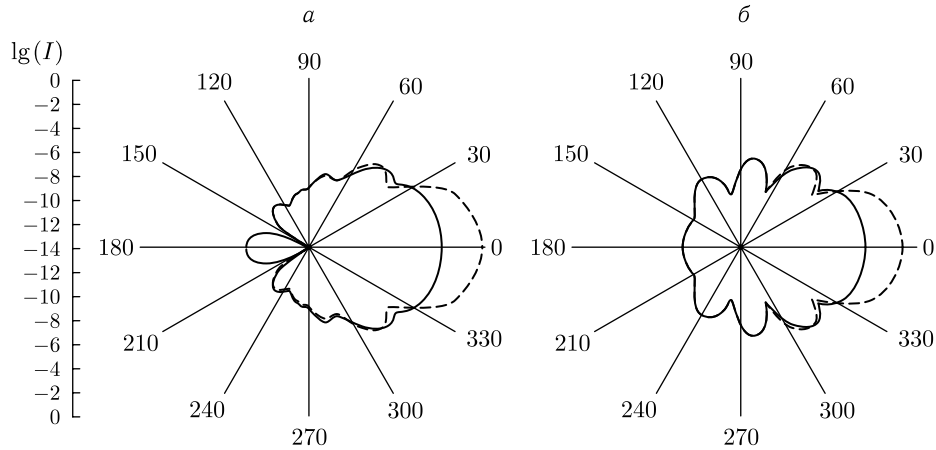


Рис. 3.11. Рассчитанные угловые зависимости интенсивности рассеяния для системы больших сферических частиц радиусом 500 нм; падающая волна линейно поляризована параллельно (а) или перпендикулярно (б) плоскости рассеяния; пунктирная линия — независимые частицы; длина волны 633 нм; объемная доля $f = 0,4$; относительный показатель преломления $m = 1,105$ (рассчитано И. Л. Максимовой)

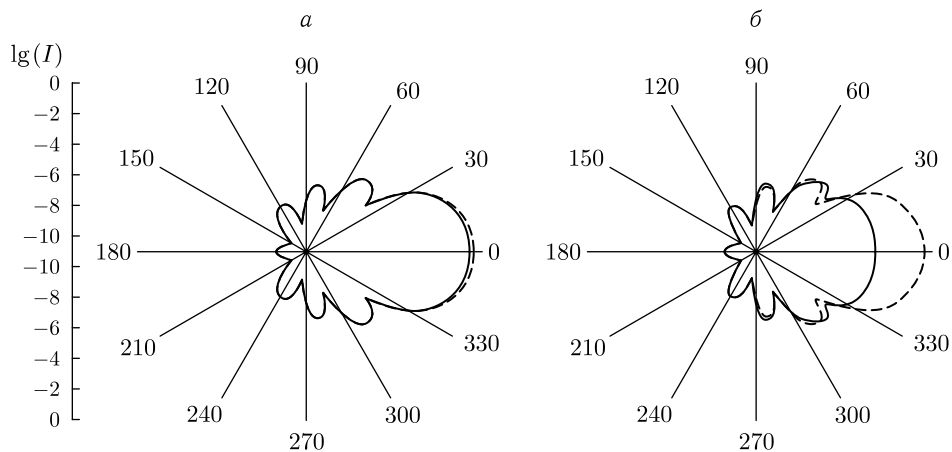


Рис. 3.12. Рассчитанные угловые зависимости интенсивности рассеяния для системы больших сферических частиц радиусом 500 нм; падающая волна не поляризована; пунктирная линия — независимые частицы; длина волны 633 нм; объемные доли $f = 0,04$ (а) и $f = 0,4$ (б); относительный показатель преломления $m = 1,105$ [654]

делает угловую зависимость интенсивности рассеяния более симметричной, понижая полную интенсивность, и, таким образом, увеличивает коллимированное пропускание как в случае мелких, так и крупных оптически мягких частиц.

Рассеяние сильно деформирует спектральные характеристики биоткани, поскольку экстинкция проходящего света определяется не только коэффициентом поглощения, зависящим от длины волны, но и долей света, изымаемой из пучка в результате рассеяния. Последний процесс сложным образом зависит от длины волны, структуры и размеров частиц.

Спектр коллимированного пропускания дисперсного слоя интерпретируется как спектральная зависимость более слабой когерентной составляющей света. Выделение когерентной составляющей света, рассеиваемого на системе коррелированных в пространстве неоднородностей, представляет собой сложную задачу со всеми трудностями, присущими задаче распространения света через систему многих тел [807]. Предполагая, что интенсивность когерентной составляющей света I_{coh} ослабляется с расстоянием d по экспоненциальному закону за счет рассеяния и поглощения, коллимированное пропускание через дисперсный слой описывается законом Бугера–Ламберта–Бера (см. уравнение (1.1)):

$$T_{\text{coh}}(\lambda_0, d) \equiv \frac{I_{\text{coh}}(\lambda_0, d)}{I_0(\lambda_0)} \propto \exp[-\rho_s \sigma_{\text{ext}}(\lambda_0) d], \quad (3.49)$$

где σ_{ext} — сечение экстинкции отдельной частицы из слоя (см. формулу (1.4)). Для малых объемных концентраций (ρ_s) оно эквивалентно сечению экстинкции невзаимодействующей частицы. Для более высоких значений f величина σ_{ext} определяется не только свойствами одной частицы, но и их концентрацией. В предположении, что сечение поглощения σ_{abs} не зависит от плотности упаковки, σ_{ext} можно выразить как сумму σ_{abs} , рассчитанного для невзаимодействующей частицы, и сечения рассеяния σ_{sca} , полученного с учетом корреляции рассеивающих частиц.

Измеряя угловое распределение интенсивности рассеяния для системы частиц, можно вычислить сечение рассеяния для отдельной частицы системы. Путем интегрирования интенсивности рассеянного света по всем направлениям определяется полная энергия, рассеянная системой. Сечение рассеяния для системы сферических частиц получается аналогично соотношению (1.6); однако для вычисления сечения рассеяния отдельной частицы системы интенсивность рассеянного света нужно разделить на число частиц N и скорректировать, используя 3D- или 2D-структурный фактор, соответственно S_3 (формула (3.44)) или S_2 (формула (3.48)).

Сечение рассеяния системы стержней (цилиндрических частиц) Σ_{sca} , освещаемых плоской падающей волной интенсивности I_0 в направлении нормали к оси цилиндров, определяется путем численного интегрирования по всем возможным направлениям рассеяния в плоскости, перпендикулярной оси цилиндров [214]:

$$\Sigma_{\text{sca}} = \frac{2\pi}{\lambda I_0} \int_0^{2\pi} I_{\Sigma}(\theta) d\theta, \quad (3.50)$$

где $I_{\Sigma}(\theta)$ — угловое распределение интенсивности рассеянного света для системы N частиц. Деля Σ_{sca} на число частиц N , можно найти сечение рассеяния σ_{sca} для одной частицы системы. Для системы взаимодействующих частиц полученный результат может существенно отличаться от сечения рассеяния свободной частицы.

Даже для свободной частицы с размерами порядка длины волны сечение рассеяния имеет очень сильную немонотонную зависимость от длины волны. Эффекты, связанные с плотной упаковкой, также имеют существенную зависимость от длины волны. В результате спектры пропускания для системы тождественных частиц могут сильно различаться в зависимости от плотности упаковки и степени упорядоченности. Хорошими примерами являются спектры пропускания роговицы в норме и с помутнением, вызванным нарушением пространственного порядка и появлением участков, лишенных волокон [647].

Экстинкция коллимированного падающего пучка, даже в системах из непоглощающих частиц, приводит к существенному различию пропускания в различных спектральных областях. Значения действительной и мнимой частей комплексного показателя преломления слабо зависят от длины волны вдали от полос поглощения

и при расчетах могут считаться постоянными. В системах мелких непоглощающих частиц интерференционное взаимодействие вызывает сдвиг коротковолновой границы спектра пропускания в сторону более коротких длин волн и слегка увеличивает крутизну спектра [654]. Если рассеивающая система образована частицами, размеры которых сравнимы с длиной волны света, то спектр такой системы будет немонотонным даже в отсутствие поглощения. В окрестности полос поглощения действительная и мнимая части показателя преломления вещества рассеивающей частицы имеют выраженную спектральную зависимость, которая определяет специфичность спектров пропускания для систем частиц разного размера, при этом мнимая часть относительного показателя преломления обычно описывается контуром Лоренца [654]. Рассеяние деформирует симметричный контур линии поглощения, и спектры получаются существенно разными для систем мелких и крупных частиц с различной плотностью упаковки.

Вообще говоря, для спектроскопии биотканей и крови типично, когда на фоне спектра, обусловленного рассеянием, наблюдается полоса поглощения хромофора (гемоглобина). Например, оценка насыщения гемоглобина кислородом в биотканях основана на восстановлении истинного спектра поглощения гемоглобина путем исключения части измеренного спектра, обусловленного рассеянием. Влияние рассеяния хорошо видно при исследовании спектров пропускания слоя крови в процессе ее гемолиза, когда наблюдается существенная разница между спектрами цельной и гемолизированной крови. Спектр цельной крови определяется поглощением гемоглобина и сильным рассеянием на эритроцитах крови, поскольку гемоглобин, имеющий высокий показатель преломления и сильное поглощение в видимой и ближней ИК-области, сосредоточен в эритроцитах (система крупных частиц с поглощением). В то же время спектр крови, подвергнутой гемолизу, определяется в основном поглощением равномерно распределенного в объеме гемоглобина, а рассеяние на мелких частицах (остаточные компоненты крови — клеточные мембраны и т. п.) дает малый вклад в спектр пропускания. Кроме того, уменьшение рассеяния в целом снижает и величину поглощенной энергии, поскольку эффективная длина миграции фотонов в случае слабого рассеяния сравнима с толщиной слоя. По этим двум причинам слой гемолизированной крови существенно прозрачнее цельной крови.

Для плотно упакованной системы крупных слабо преломляющих частиц в работе [754] в рамках приближения твердых сфер и в пренебрежении взаимным переизлучением частиц было получено следующее выражение для когерентного пропускания через слой толщины d :

$$T_{\text{coh}} = \left[1 - \frac{2b}{(1+b)} \frac{\sigma_{\text{ext}}}{\pi \cdot a^2} + \frac{b^2}{(1+b)^2} \frac{2\lambda}{\pi \cdot a^3} \sigma_{\text{sca}} I_1(0) \right]^{d/2a}, \quad (3.51)$$

где $b = 1,5f \cdot \exp(1,5f)$ и $I_1(0)$ — интенсивность рассеяния вперед отдельной частицей радиуса a . Эта формула превращается в закон Бугера–Ламберта–Бера (см. уравнение (3.49)) для рассеивающих систем невзаимодействующих частиц при разрежении рассеивающего слоя.

В реальных экспериментах благодаря конечной угловой апертуре приемника света регистрируется не только ослабляемая в слое среды когерентная составляющая, но и часть некогерентно рассеянного света. По этой причине экспериментально определяемое пропускание, называемое инструментальной прозрачностью, несколько отличается от когерентного пропускания T_{coh} .

Впервые приближение, учитывающее ближний порядок в расположении элементов биоткани, было использовано авторами работ [644, 645, 647] при описании

распространения света в роговице. Расчеты спектров пропускания роговицы и хрусталика глаза человека показали, что ближний порядок в расположении рассеивающих частиц и связанные с ним интерференционные взаимодействия рассеянного света являются причиной высокой прозрачности этих тканей в их нормальном состоянии [63, 64, 796].

Угловые зависимости интенсивности рассеянного света для систем сферических и цилиндрических частиц в приближении однократного рассеяния описываются формулами (3.43), (3.44) и (3.48). Структурный фактор, преобразующий эти зависимости, определяется пространственным расположением частиц и не зависит от поляризационного состояния света. Следовательно, для систем идентичных частиц в условиях применимости приближения однократного рассеяния угловые зависимости всех элементов матрицы рассеянного света (МРС) умножаются на одну и ту же величину, учитывающую интерференционные взаимодействия (см. формулу (3.43)):

$$M_{ij}(\theta) = M_{ij}^0(\theta)NS_3(\theta), \quad (3.52)$$

где $M_{ij}^0(\theta)$ — элемент МРС для изолированной частицы. Следовательно, МРС для системы монодисперсных взаимодействующих частиц совпадает с МРС изолированной частицы (см. формулу (2.25)) при условии нормирования МРС на величину ее первого элемента M_{11} .

В отличие от монодисперсных систем, в системах плотно упакованных частиц различного размера нормировка матричных элементов на M_{11} не исключает влияния структурного фактора на угловую зависимость матричных элементов. В простейшем случае бимодальной системы рассеивателей выражения, аналогичные формулам (3.44) и (3.48), могут быть найдены с использованием четырех структурных функций $g_{11}(r)$, $g_{22}(r)$, $g_{12}(r)$ и $g_{21}(r)$, которые характеризуют взаимодействие между частицами одинаковых и разных размеров [648]. Отметим, что бимодальная система, образованная большим числом одинаковых мелких частиц и малой добавкой крупных, дает хорошую модель патологической биоткани, например пораженного катарактой хрусталика.

На рис. 3.13 показаны рассчитанные элементы МРС бинарной системы сферических частиц с двумя различными диаметрами, 60 и 500 нм, и соответствующими объемными долями, $f_1 = 0,3$ и $f_2 = 0,02$ [648]. Для сравнения рассчитывались также угловые зависимости элементов МРС для такой же бинарной смеси, но в пренебрежении кооперативными эффектами. Из рисунка видно, что нормированные элементы МРС плотной бинарной смеси существенно меняются из-за интерференционного взаимодействия. Как следствие этого, результаты решения обратной задачи на основе экспериментальной МРС для плотной смеси частиц при пренебрежении кооперативными эффектами должны давать завышенные значения относительной доли крупных частиц. Изменения МРС, связанные с кооперативными эффектами, имеют более сложную природу для бинарных систем, у которых оба компонента имеют размеры порядка длины волны зондирующего света и не могут интерпретироваться столь однозначно, как в предыдущем примере. Численные оценки для бинарных систем различного состава показывают [648], что рассматриваемые эффекты принципиально важны при расчетах МРС в видимом диапазоне для смесей частиц с $2a_1 < 200$ нм и $2a_2 > 250$ нм.

В отличие от спектров пропускания, спектральные зависимости интенсивности света, рассеянного в различных направлениях, изучены недостаточно. С одной стороны, это связано с экспериментальными трудностями из-за необходимости модернизировать стандартные спектральные приборы. С другой стороны, возникает дополнительная проблема корректного сравнения результатов различных экспериментов по

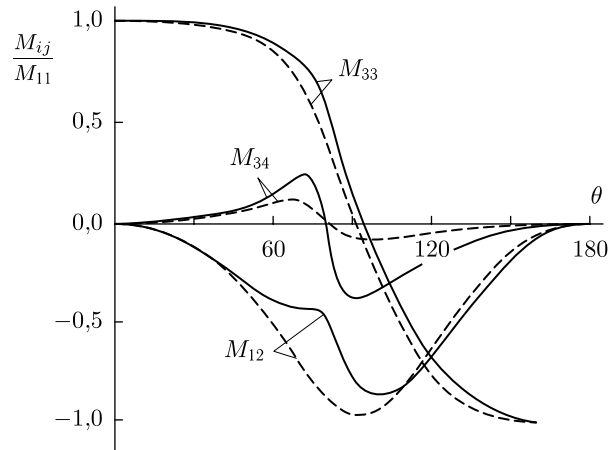


Рис. 3.13. Угловые зависимости элементов МРС для бинарной смеси сферических частиц [648]. Рассчитано с учетом взаимодействия частиц (сплошные линии) и пренебрегая кооперативными эффектами (штриховые линии). Диаметры частиц $2a_1 = 60$ нм и $2a_2 = 500$ нм; объемные доли $f_1 = 0,3$ и $f_2 = 0,02$; относительный показатель преломления $m = 1,07$; длина волны 633 нм

исследованию спектров рассеяния, поскольку форма последних существенно зависит от геометрии образца и измерительной системы. Тем не менее, спектры рассеяния представляют большой интерес [47, 58, 94–96, 216–219, 229, 232, 236, 239, 272, 783, 808]. Авторы работы [808] изучали спектры поглощения и рассеяния мышечной ткани грудной клетки цыпленка в видимом диапазоне. Спектры рассеяния визуально определяют наблюдаемый цвет биоткани и могут быть использованы для экспресс-оценки ее состояния. Например, один из традиционных методов диагностики хрусталика глаза предполагает наблюдение изменяющихся цветовых характеристик света, рассеянного под различными углами. Теоретические основы количественного анализа спектров рассеяния и формирования цвета в хрусталике глаза (представленном как модель дисперсной системы сферических частиц с низким поглощением) и измеренные *in vitro* спектры рассеяния хрусталика глаза человека приведены в работе [809]. Возрастные изменения состава частиц хрусталика глаза и соответствующие изменения пропускания и рассеяния света промоделированы в работе [239] и сравнены с экспериментальными данными работы [783]. Спектральные характеристики изменяются сильнее при большой плотности упаковки, когда объемная доля частиц превышает 50%. Для таких плотных систем рассматриваемое приближение однократного рассеяния неприменимо и нужно учитывать эффекты переизлучения света частицами.

3.6.2. Спектральные характеристики. Спектр коллимированного пропускания слоя биоткани толщиной d со средней плотностью ρ_s рассеивающих частиц с поглощением определяется формулой (3.49), где $I_{\text{coh}}(\lambda_0)$ — спектр интенсивности прошедшего света, регистрируемый в дальней зоне с использованием диафрагмы очень малого диаметра; сечение рассеяния σ_{sca} для данной модели можно рассчитать с использованием формулы (1.6) для соответствующей угловой зависимости интенсивности света, рассеянного частицей, $I(\theta)$.

В рамках теории Ми сечения рассеяния и поглощения, а также средний косинус угла рассеяния θ (фактор анизотропии рассеяния $g = \langle \cos \theta \rangle$) для одной частицы

могут быть рассчитаны с использованием формул [214]:

$$\sigma_{\text{sca}} = \frac{\lambda_0^2}{2\pi n_0^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1)(|a_n|^2 + |b_n|^2), \quad (3.53)$$

$$\sigma_{\text{abs}} = \frac{\lambda_0^2}{2\pi n_0^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1)[\text{Re}(a_n + b_n) - (|a_n|^2 + |b_n|^2)], \quad (3.54)$$

$$g = \frac{\lambda_0^2}{\pi n_0^2 \sigma_{\text{sca}}} \left\{ \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} \text{Re}(a_n b_n^*) + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+2)}{n+1} \text{Re}(a_n a_{n+1}^* + b_n b_{n+1}^*) \right\}. \quad (3.55)$$

Здесь a_n и b_n — коэффициенты Ми, являющиеся функциями относительного комплексного показателя преломления частиц,

$$m = \frac{n_s(\lambda_0)}{n_0(\lambda_0)}, \quad (3.56)$$

$$n_s(\lambda_0) = n'_s(\lambda_0) + i n''_s(\lambda_0), \quad (3.57)$$

$n_0(\lambda_0)$ — показатель преломления основной среды, в которую погружены рассеивающие частицы с показателем преломления $n_s(\lambda_0)$; мнимая часть комплексного показателя преломления материала характеризует потери из-за поглощения; λ_0 — длина волны света в вакууме; и параметра

$$\alpha = \frac{2\pi a n_0}{\lambda_0}, \quad (3.58)$$

a — радиус частицы (звездочка в (3.55) обозначает комплексное сопряжение);

$$a_n = \frac{\psi_n(\alpha)\psi'_n(m\alpha) - m\psi_n(m\alpha)\psi'_n(\alpha)}{\xi(\alpha)\psi'_n(m\alpha) - m\psi_n(m\alpha)\xi'_n(\alpha)}, \quad (3.59)$$

$$b_n = \frac{m\psi'_n(m\alpha)\psi_n(\alpha) - \psi_n(m\alpha)\psi'_n(\alpha)}{m\psi'_n(m\alpha)\xi_n(\alpha) - \psi_n(m\alpha)\xi'_n(\alpha)}, \quad (3.60)$$

где ψ_n , ξ_n , ψ'_n , ξ'_n — функции Риккати–Бесселя первого и второго рода.

Например, для неполяризованного коллимированного света, падающего на систему частиц Ми, интенсивность рассеяния определяется как

$$I_{\Sigma}(\theta, \lambda_0) \approx N(|S_1|^2 + |S_2|^2). \quad (3.61)$$

Здесь N — число сферических частиц, S_1 и S_2 — функции полярного угла рассеяния θ , которые можно получить из теории Ми в виде

$$S_1(\theta) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} \{a_n \pi_n(\cos \theta) + b_n \tau_n(\cos \theta)\}, \quad (3.62)$$

$$S_2(\theta) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} \{b_n \pi_n(\cos \theta) + a_n \tau_n(\cos \theta)\},$$

параметры π_n и τ_n выражаются как

$$\begin{aligned} \pi_n(\cos \theta) &= \frac{1}{\sin \theta} P_n^1(\cos \theta), \\ \tau_n(\cos \theta) &= \frac{d}{d\theta} P_n^1(\cos \theta), \end{aligned} \quad (3.63)$$

где $P_n^1(\cos \theta)$ — присоединенный полином Лежандра; для вычисления π_n и τ_n применяются следующие рекуррентные соотношения:

$$\begin{aligned}\pi_n &= \frac{2n-1}{n-1} \pi_{n-1} \cos \theta - \frac{n}{n-1} \pi_{n-2}, \\ \tau_n &= n\pi_n \cos \theta - (n+1)\pi_{n-1},\end{aligned}\quad (3.64)$$

для которых начальными значениями являются:

$$\begin{aligned}\pi_1 &= 1, & \pi_2 &= \cos \theta, \\ \tau_1 &= \cos \theta, & \tau_2 &= 3 \cos 2\theta;\end{aligned}\quad (3.65)$$

коэффициенты a_n и b_n определяются формулами (3.59) и (3.60). Взаимодействие частиц можно учесть с использованием формул (3.43), (3.44) и (3.48). Можно также использовать более простое соотношение (3.51).

В свою очередь, спектр пропускания при использовании приемника с конечным углом зрения, равным θ , когда регистрируется коллимированный пучок света с добавкой рассеянного вперед света в интервале углов от 0 до θ , определяется следующим образом:

$$T_\theta(\lambda_0) = T_{\text{coh}}(\lambda_0) + \frac{1}{I_0(\lambda_0)} \int_{\theta} I_\Sigma(\theta, \lambda_0) d\Omega, \quad (3.66)$$

где Ω — телесный угол встерадианах.

Спектр полного пропускания $T_t(\lambda_0)$ и рассеяния $R_\theta(\lambda_0)$ в интервале углов $(\theta + d\theta)$ можно рассчитать с помощью следующих соотношений:

$$T_t(\lambda_0) = T_{\text{coh}}(\lambda_0) + \frac{1}{I_0(\lambda_0)} \int_{2\pi} I_\Sigma(\theta, \lambda_0) d\Omega, \quad (3.67)$$

$$R_\theta(\lambda_0) = \frac{1}{I_0(\lambda_0)} \int_{\theta}^{\theta+d\theta} I_\Sigma(\theta, \lambda_0) d\Omega. \quad (3.68)$$

Рисунок 3.14 демонстрирует анизотропию пропускания для линейно поляризованного излучения и заметное влияние рассеяния на пропускание роговицы в коротковолновой области спектра. Пропускание роговицы было рассчитано с использованием модельной монодисперсной системы длинных диэлектрических непоглощающих цилиндров (волокон) диаметром 26 нм с показателем преломления $n_c = 1,470$. Цилиндры были ориентированы параллельно поверхности роговицы в базовом веществе с $n_0 = 1,345$. Прозрачность роговицы в видимой области объясняется высокой степенью упорядоченности ее волокон, которая влечет за собой снижение интенсивности диффузно рассеянного света за счет деструктивной интерференции во всех направлениях за исключением направления падающего света, для которого имеет место конструктивная интерференция волн, рассеянных на отдельных упорядоченных волокнах биоткани за счет их сфазированности. Влияние диффузной составляющей рассеяния наиболее существенно в коротковолновой области и определяет малое пропускание УФ-излучения роговицей, составляющее примерно 50% на длине волны 320 нм. Следует отметить, что в УФ-диапазоне экстинкция света определяется не только рассеянием, но и полосами поглощения воды и белков, также дающими большой вклад в ослабление света (см. рис. 1.3 и 1.5).

Разупорядочение в расположении волокон (например, после кератотомии) приводит к уменьшению пропускания роговицы, особенно для коротких длин волн, что может накладываться на эффект Пуркинье, который заключается в сдвиге максимума световой чувствительности сетчатки в сторону более коротких длин волн при

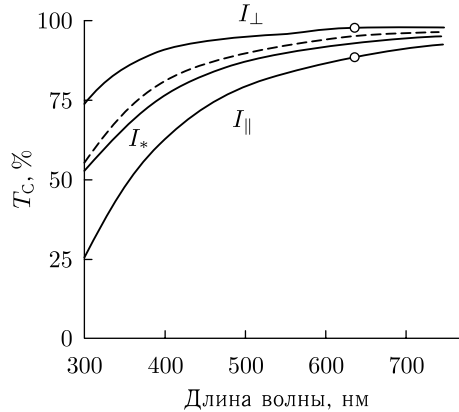


Рис. 3.14. Спектры коллимированного пропускания роговицы глаза человека: I_{\parallel} , I_{\perp} и I_{*} — рассчитанные спектры для двух ортогональных состояний линейной поляризации и для неполяризованного света. Поляризация света параллельна волокнам, I_{\parallel} (вычисления производились для нормального падения света на поверхность роговицы, они верны для периферической конической части роговицы, где волокна одинаково ориентированы в слоях ткани). Роговица имеет 0,46 мм в толщину; плотность числа рассеивающих частиц $\rho_s = 3 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$. Пунктирная линия показывает экспериментальные данные для неполяризованного света. Кружками показаны результаты измерений для двух ортогональных состояний поляризации при $\lambda = 633$ нм [63]

переходе от дневного к сумеречному освещению [63]. Другая существенная особенность роговицы — наличие преимущественного направления ориентации волокон. Результатом такой анизотропии является двулучепреломление формы и дихроизм роговицы [63]. Спектр пропускания существенно зависит от ориентации вектора поляризации линейно поляризованного света относительно коллагеновых волокон; свет, поляризованный вдоль волокон, рассеивается более эффективно. Как следует из расчетов и измерений, представленных на рис. 3.14, периферическая поляризационная чувствительность роговицы в УФ-диапазоне (320 нм) примерно в 5 раз выше, чем в красной области (633 нм). В рэлеевском пределе ($\lambda \gg 2a$) двулучепреломление формы определяется формулой (2.2). Двулучепреломление может быть сильным для цилиндров малого диаметра и стремится к нулю для системы, состоящей из параллельных цилиндров большого диаметра ($2a \geq \lambda$) [614].

Сравнительные исследования пространственных распределений параметров поляризации по зрачку здоровых добровольцев и пациентов после операции лазерной коррекции зрения (LASIK) показали, что степень деполяризации неравномерно распределена по зрачку и уровень ее выше у пациентов после операции, чем у здоровых добровольцев [706]. Кроме того, для нормальных глаз двулучепреломление монотонно возрастает вдоль радиуса роговицы (от центра к периферии), а послеоперационные глаза показывают нерегулярности в этой зависимости. Эти изменения оптических поляризационных свойств показывают существенную послеоперационную модификацию структуры роговицы глаза.

Экспериментальные спектры полного и коллимированного (аксиального) пропускания для роговицы человека представлены на рис. 3.15. Они хорошо показывают, что в целом роговица рассеивает некоторое количество света, поскольку полное и аксиальное пропускание не одинаковы. Пики поглощения воды видны на 300, 980, 1180, 1450, 1900 и 2940 нм (см. рис. 1.3) [810]; они являются причиной малого пропускания роговицы в УФ- и ИК-областях спектра.

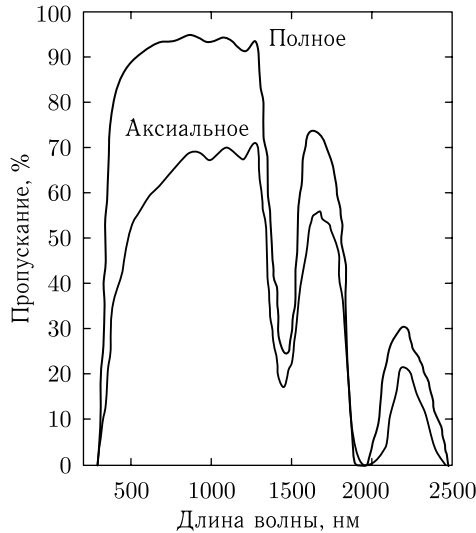


Рис. 3.15. Полное и аксиальное (коллимированное) пропускание роговицы глаза человека [810]

При измерении пропускания роговицы в спектральной области от 320 до 700 нм у 10 пациентов разных возрастных категорий (от 14 до 75 лет) с отсутствующим хрусталиком не было отмечено особых возрастных изменений [811]. Среднее спектральное пропускание, полученное из этих измерений, моделировалось следующими функциями для полного пропускания T_t (полный угол регистрации близок к 180°) и аксиального пропускания T_c (угол регистрации порядка 1°):

$$\log T_t(\lambda_0) = -0,016 - 21 \cdot 10^8 \lambda_0^{-4}, \quad (3.69)$$

$$\log T_c(\lambda_0) = -0,016 - 85 \cdot 10^8 \lambda_0^{-4}, \quad (3.70)$$

где λ_0 — длина волны в нанометрах.

Исследование спектров пропускания стромы роговицы быка в диапазоне 400–750 нм в различных физиологических состояниях, управляемых изменением концентрации NaCl в диапазоне от 10 до 1000 мМ и добавлением сорбитола (300 мМ), показало, что спектры пропускания определяются изменением характера рассеяния в ткани [812]. В частности, образцы стромы, будучи стабилизированными для растворов NaCl в диапазоне от 10 до 100 мМ и изотоническими по отношению к исходному стабилизированному состоянию в буфере (154 мМ NaCl, pH = 7,4, степень гидратации 3,2), в присутствии сорбитола были мало прозрачными для 10 мМ, а далее по мере повышения концентрации NaCl их прозрачность увеличивалась до нормальной при 154 мМ NaCl. С другой стороны, гипертонические растворы (300–1000 мМ NaCl) приводили к потере прозрачности с ростом концентрации по сравнению со случаем 154 мМ NaCl. Интенсивность рассеяния света в зависимости от длины волны хорошо описывается функцией $\sim \lambda^{-3}$ для всех малых концентраций NaCl от 10 до 154 мМ в диапазоне от 450 до 650 нм, но не для больших длин волн. В то время как в случае использования гипертонических сред (300–1000 мМ) имела место более слабая зависимость от длины волны, $\sim \lambda^{-2}$, но уже в более широком диапазоне длин волн 450–750 нм. Полученные результаты могут быть обусловлены изменением межмолекулярных сил, отвечающих за упорядоченность коллагеновых волокон в строме, которые

изменяются за счет связывания ионов хлора с матриksom роговицы [812], а также иммерсионными свойствами сорбитола (см. гл. 9) и временной агрегацией–деагрегацией частиц.

Спектры пропускания тканей глаза, включая роговицу, можно найти в монографии [813].

Хрусталик менее прозрачен, чем роговица. Видимый свет, проходящий через хрусталик человека, претерпевает ощутимое поглощение и рассеяние различными хромофорами и белковыми структурами, включая триптофан белка, 3-гидрокси-L-кинурунин-О-β-гликозид (3-НKG) и особый связанный с возрастными изменениями белок, ответственный за пожелтение хрусталика у пожилых лиц (рис. 3.16) [794]. Содержание 3-НKG слегка убывает с возрастом. В исследуемой модели однократного рассеяния поглощение учитывается посредством введения комплексного показателя преломления рассеивающих частиц [24] (см. формулу (3.57)):

$$n_s(\lambda_0) = n'_s + in''_s = n'_s + i [tn''_t(\lambda_0) + kn''_k(\lambda_0) + pn''_p(\lambda_0)], \quad (3.71)$$

где коэффициенты t , k и p характеризуют относительный вклад каждого хромофора в поглощение.

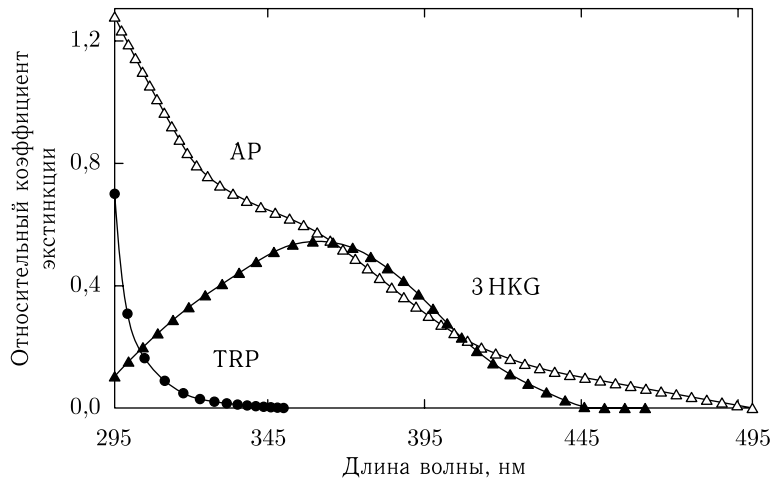


Рис. 3.16. Основные химические компоненты хрусталика человека, которые поглощают свет, проходящий через роговицу: триптофан белков (TRP), 3-гидрокси-L-кинурунин-О-β-гликозид (3-НKG) и возрастной белок хрусталика (AP) [794]

Возрастные изменения оптических свойств хрусталика, как правило, связаны с появлением рассеивателей с повышенным диаметром и показателем преломления, а также с увеличенным содержанием возрастного белка [24, 64]. На рис. 3.17 представлены спектры коллимированного пропускания, рассчитанные с использованием моделей «молодого» и «старого» хрусталика. Бросается в глаза существенное различие между коротковолновыми частями двух профилей. Экспериментально полученные спектры полного пропускания для старческих и пораженных катарактой хрусталиков показаны на рис. 3.18 [24]. Возрастные изменения в составе рассеивающих и поглощающих частиц приводят к существенным различиям в спектрах рассеяния. Существует качественная корреляция между экспериментально найденными и вычисленными значениями рассеяния как назад, так и под углом 90° (см., например, рис. 3.19) [24, 239, 783].

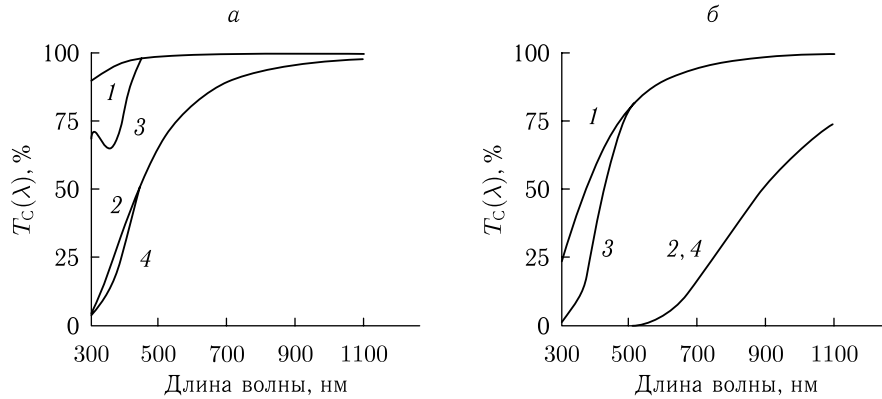


Рис. 3.17. Спектры коллимированного пропускания хрусталика глаза человека, рассчитанные для упорядоченных (1, 3) и разупорядоченных (2, 4) рассеивателей: 1, 2 — в отсутствии поглощения; 3, 4 — с поглощением. Модель «молодого» хрусталика (а) (диаметр рассеивателей $2a = 20$ нм, $n' = 1,43$, $t = 0,003$, $k = 0,005$, $p = 0$). Модель «старого» хрусталика (б) ($2a = 40$ нм, $n' = 1,47$, $t = 0,003$, $k = 0,002$, $p = 0,015$). Объемная доля рассеивающих частиц $f_s = 0,3$, $n_0 = 1,345$, толщина хрусталика 5 мм [24, 239]

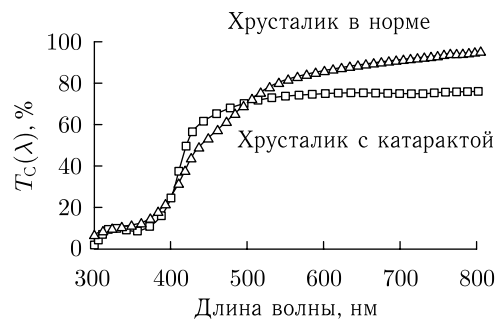


Рис. 3.18. Экспериментальные спектры полного пропускания изолированного хрусталика глаза человека: нормальный хрусталик человека (56 лет) и хрусталик с катарактой (88 лет). Измерения производились на спектрофотометре с интегрирующей сферой [24]

Расчеты спектров рассеяния для модели хрусталика глаза, основанной на первом порядке теории многократного рассеяния (см. рис. 3.20), которая учитывает дополнительное ослабление интенсивности однократно рассеянного света за счет вторичного рассеяния, и измеренные *in vitro* спектры рассеяния в цельном хрусталике человека, пораженном катарактой, для некоторого угла рассеяния и различных положений измерительного объема также демонстрируют привлекательность исследований спектров рассеяния для предсказания патологий хрусталика [809].

Анализ обширной литературы по исследованиям поглощения и рассеяния тканей глаза молодых людей и людей в возрасте позволил авторам работы [814] выявить пять основных вкладов в формирование спектра пропускания в диапазоне 300–700 нм прозрачных тканей глаза: роговицы, хрусталика, водянистой влаги передней камеры глаза и стекловидного тела. Два вклада характерны для всех типов тканей — это рэлеевское рассеяние и поглощение триптофана. Три дополнительных вклада характерны только для хрусталика, они определяются поглощением производных кинуренина (в основном ЗНКГ) и двух компонентов, найденных только в возрастных

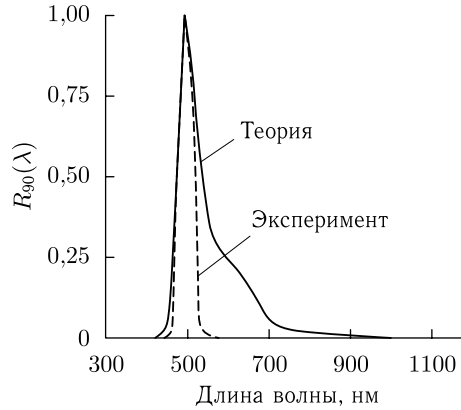


Рис. 3.19. Рассчитанные и экспериментальные спектры рассеяния хрусталика под углом 90 град (относительные единицы, экспериментальные данные из работы [783]). Вычисления производились для смеси упорядоченных малых частиц (99%) с диаметром $2a = 60$ нм ($t = 0,003$, $k = p = 0,03$, $n_0 = 1,345$, $n' = 1,47$) и больших неупорядоченных частиц (1%) ($2a = 600$ нм, $t = 0,003$, $k = 0$, $p = 0,1$) [239]

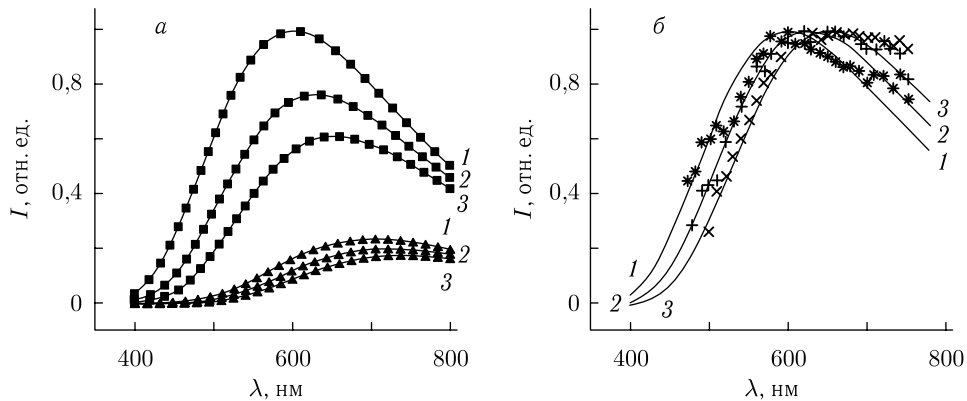


Рис. 3.20. Спектры рассеяния (а), рассчитанные в первом порядке теории многократного рассеяния (с учетом ослабления интенсивности однократно рассеянного света за счет последующего рассеяния в образце) для различных углов: $\theta = 149$ град (■) и 90 град (▲). Радиус частиц 25 нм, радиус системы 5 мм, относительный объем частиц 0,3. Рассеивающий элемент объема в 1 мм^3 расположен на расстоянии $l = 1,0$ мм (1), 1,1 мм (2) и 1,2 мм (3). Экспериментальные (показаны значками) и соответствующие рассчитанные (1–3) спектры рассеяния под углом 149 град для хрусталика глаза человека с катарактой для трех различных положений рассеивающего объема (б): *, 1 — вблизи передней поверхности; +, 2 — в центральной части и ×, 3 — вблизи задней части хрусталика [809]

хрусталиках. Все вклады, кроме рэлеевского рассеяния, описываются спектральными кривыми гауссовой формы. Оптическая плотность $D_{\text{media}}(\lambda)$ для всех сред глаза и рассеивающих и поглощающих компонентов (пять спектрально зависимых и один не зависимый от длины волны) может быть представлена в виде

$$D_{\text{media}}(\lambda) = d_{\text{RL}}(\text{age}) \cdot F_{\text{RL}}(\lambda) + d_{\text{TP}}(\text{age}) \cdot F_{\text{TP}}(\lambda) + d_{\text{LY}}(\text{age}) \cdot F_{\text{LY}}(\lambda) + d_{\text{LOUV}}(\text{age}) \cdot F_{\text{LOUV}}(\lambda) + d_{\text{LO}}(\text{age}) \cdot F_{\text{LO}}(\lambda) + d_{\text{neutral}}, \quad (3.72)$$

где F_i — спектральные зависимости для каждого компонента среды, а d_i — зависящие от возраста скалярные коэффициенты, определяющие оптическую плотность; индексы RL, TP, LY, LOUV, LO означают соответственно рэлеевское рассеяние, триптофан, молодой хрусталик, возрастной хрусталик (узкая полоса поглощения с максимумом в УФ), возрастной хрусталик (широкая полоса поглощения с длинным крылом поглощения в видимой области); d_{neutral} — учитывает не зависящие от длины волны вклады поглощения и рассеяния. Полосы воды, в рассматриваемом диапазоне длин волн не играют существенной роли, поэтому их вклад не учитывается в виде спектральной зависимости, хотя она должна проявляться в величине подставки d_{neutral} .

Найденные в результате анализа возрастные зависимости для оптической плотности $D_{\text{media}}(\lambda)$ показывают ее квадратичную зависимость от возраста для всех прозрачных сред глаза:

$$\begin{aligned}
 D_{\text{media}}(\lambda) = & (0,446 + 0,000031 \cdot \text{age}^2) \cdot (400/\lambda)^4 + \\
 & + 14,19 \cdot 10,68 \cdot \exp \left\{ - [0,057 \cdot (\lambda - 273)]^2 \right\} + \\
 & + (0,998 - 0,000063 \cdot \text{age}^2) \cdot 2,13 \cdot \exp \left\{ - [0,029 \cdot (\lambda - 370)]^2 \right\} + \\
 & + (0,059 + 0,000186 \cdot \text{age}^2) \cdot 11,95 \cdot \exp \left\{ - [0,021 \cdot (\lambda - 325)]^2 \right\} + \\
 & + (0,016 + 0,000132 \cdot \text{age}^2) \cdot 1,43 \cdot \exp \left\{ - [0,008 \cdot (\lambda - 325)]^2 \right\} + 0,111. \quad (3.73)
 \end{aligned}$$

Для более широких полей зрения $d_{\text{RL}} = 0,446$ должно быть заменено на $d_{\text{RL}} = 0,225$ [814].

Детальное изучение кинетики УФ-индуцированной агрегации основных белков хрусталика глаза α -, β - и γ -кристаллинов как в смеси, так и по отдельности, представлено в работах [799–801]. На рис. 3.21 представлена экспериментальная установка для исследования УФ-лазерной фотоагрегации кристаллинов в хрусталике и модельных средах [800, 801]. Источником фотовоздействия служил ХеСl-лазер, работающий на длине волны 308 нм. Одновременно измерялась энергия прошедшего излучения на длине волны 308 нм с помощью детектора, который располагался в непосредственной близости от кюветы с хрусталиком или раствором кристаллинов. В этом случае изменение детектируемого сигнала было обусловлено как наведенным поглощением, так и рассеянием на длине волны 308 нм. Измерения проводились при температуре 22 °С. Для исследования динамики агрегации кристаллинов под действием УФ-излучения измерялась интенсивность рассеянного света методом темного поля при зондировании растворов белков пробным пучком однододового (TEM₀₀) He-Ne-лазера с длиной волны 633 нм, мощностью 10 мВт и расходимостью $1,1 \times 10^{-3}$ рад.

На рис. 3.22 представлены характерные зависимости для пропускания хрусталика свиньи на длине волны 633 нм от дозы облучения на длине волны 308 нм при двух значениях плотности энергии лазерных импульсов [799]. Хорошо видно, что пропускание хрусталика может деградировать до 50% за счет наведенного рассеяния света на исследуемой длине волны.

Исследование наведенного рассеяния на длине волны 633 нм от дозы УФ-облучения (308 нм) для растворов полного набора кристаллинов хрусталика ($\alpha + \beta + \gamma$), только β -кристаллина и смеси α - и β -кристаллинов, продемонстрировали различную

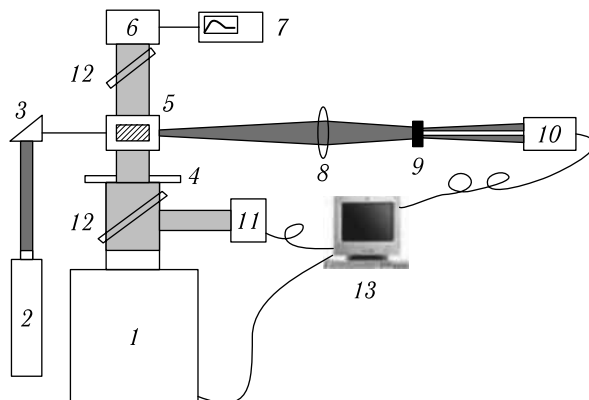


Рис. 3.21. Автоматизированная установка для исследования УФ-лазерной фотоагрегации кристаллинов в хрусталике и модельных средах [800, 801]: источник УФ-излучения — ХеСl-лазер LPX-200 (Lambda Physik) (308 нм) с энергией в импульсе до 450 мДж и частотой повторения импульсов до 80 Гц (1); одномодовый (TEM₀₀) He-Ne-лазер (633 нм) мощностью 10 мВт и расходямостью $1,1 \cdot 10^{-3}$ рад (2) для измерения наведенного рассеяния методом темного поля (за счет блокирования непрозрачным экраном (9) основного пучка); призма (3); диафрагма (4); кварцевая кювета (5); УФ детектор «Gentec» ED-200 для измерения энергии прошедшего излучения на длине волны 308 нм (6); осциллограф (7); линза (8); фотодиод (633 нм) (10); фотодиод (308 нм) (11); сапфировая пластина (12); система автоматизации (13)

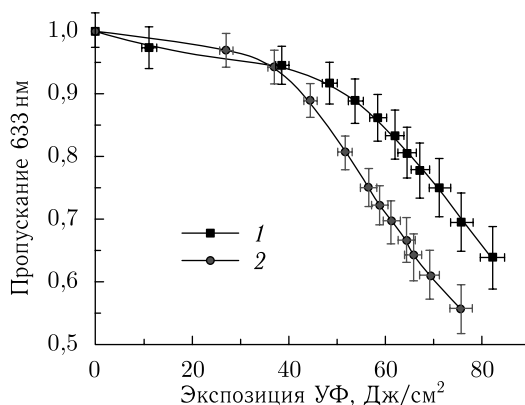


Рис. 3.22. Изменение оптического пропускания хрусталика свиньи на длине волны 633 нм, вызванного наведенным рассеянием в процессе воздействия излучения эксимерного лазера (308 нм), от дозы облучения при двух значениях плотности энергии лазерных импульсов: 1 — 4,5 мДж/см²; 2 — 11 мДж/см², и частоте следования импульсов 10 Гц [799]

резистентность кристаллинов к воздействию УФ-излучения и шаперонную функцию α -кристаллинов, которые обладают также самой большой устойчивостью к воздействию УФ-излучения.

Исследования фотоагрегации водных растворов β -кристаллинов позволили авторам [800–801] предложить физическую модель начальной стадии агрегации кристаллинов, индуцированной мягким УФ (308 нм), и описать возможность образования крупных агрегатов. Как следует из экспериментальных результатов [799–801], такие характеристики, как частота следования и плотность энергии УФ-лазерных

импульсов, являются ключевыми факторами, определяющими кинетику агрегации. А именно, было обнаружено, что доза УФ-облучения, необходимая для агрегации кристаллинов, зависит от плотности энергии и частоты следования лазерных импульсов таким образом, что эта доза значительно падает с увеличением интенсивности, выходя на константу при дальнейшем ее увеличении (см. рис. 3.23). Для объяснения этого эффекта принято, что начальный процесс фотоагрегации происходит при взаимодействии двух активированных светом молекул белка между собой. При этом фотоактивированное состояние обладает конечным временем жизни.

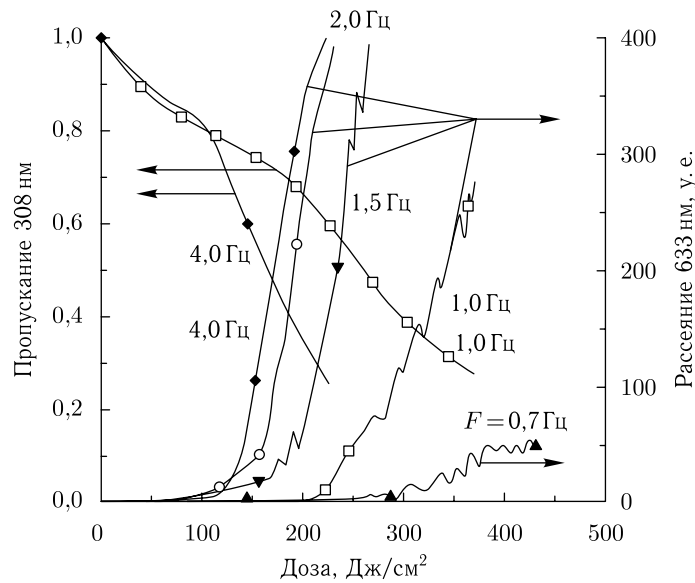


Рис. 3.23. Дозовые зависимости интенсивности рассеянного излучения на длине волны 633 нм для раствора β_L -кристаллина при фиксированной плотности энергии 75 мДж/см^2 и разных частотах повторения F лазерных импульсов эксимерного лазера (308 нм). На рисунке показаны также кривые пропускания излучения 308 нм кюветы с раствором белка [800]

Как обсуждалось выше, склера глаза является непрозрачной мутной средой, по крайней мере в видимом диапазоне. Рисунок 3.24 демонстрирует экспериментальные спектры, полученные для трех образцов склеры человека с различной толщиной, на которых видна ее непрозрачность для видимого света и сравнительно высокая прозрачность в ближнем ИК-диапазоне между полосами поглощения воды [768, 769]. Добавим, что образец обезвоженной склеры имеет высокое пропускание в очень широкой спектральной полосе, включая видимый и ИК-диапазоны. Характер спектров склеры можно понять на основе анализа рассеяния света системой полидисперсных нерегулярно расположенных коллагеновых цилиндров, погруженных в базовое вещество с более низким показателем преломления [791, 792]. Для своей натуральной толщины $0,7\text{--}0,8 \text{ мм}$ эта биоткань демонстрирует многократное рассеяние (рис. 3.24 а и 3.24 б), однако переход к рассеянию малой кратности или даже к однократному рассеянию можно обеспечить не только для тонких гистологических срезов ткани, но и при обезвоживании цельного образца (рис. 3.24 в) или его пропитывании иммерсионной жидкостью [238, 791, 792]. Такое управление рассеивающими свойствами сравнительно толстых слоев биоткани можно осуществлять *in vivo*, поэтому данная технология весьма привлекательна для многих биомедицинских приложений (см. гл. 9).

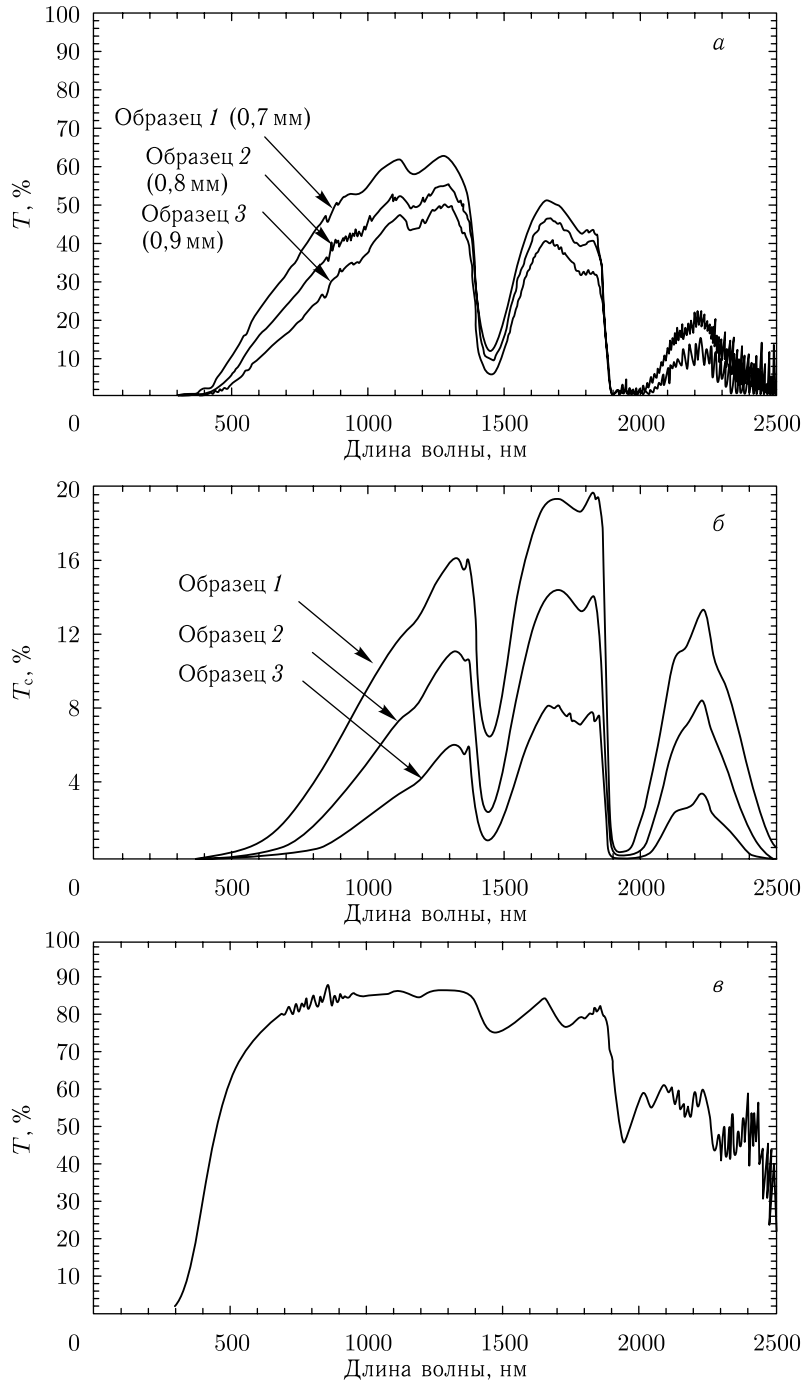


Рис. 3.24. Спектры пропускания склеры глаза человека [768, 769]: *a* — полное пропускание для трех образцов; *б* — аксиальное (коллимированное) пропускание для тех же образцов; *в* — полное пропускание для образца обезвоженной склеры

3.6.3. Поляризационные свойства. Было уже показано, что распространение света в биологической ткани зависит не только от коэффициентов рассеяния и поглощения и фазовой функции рассеяния биоткани, но и от ее поляризационных свойств. Поляризационные свойства, в свою очередь, определяются размерами рассеивающих частиц, морфологией, показателем преломления, внутренней структурой и оптической активностью материала [5, 6, 10, 43, 215, 273, 274, 815]. Поляризационные характеристики упруго рассеянного света наиболее полно описываются 16-элементной матрицей рассеяния света (МРС), каждый элемент которой зависит от длины волны, размера, формы и материала рассеивателей (см. формулы (2.22) и (2.23)).

Для измерений элементов МРС прозрачных биологических тканей и жидкостей были разработаны управляемые компьютером лазерные измерители матрицы рассеяния (ЛИМР) [3, 5, 6, 10, 43, 64, 135, 215, 592, 662, 663, 666–670, 684, 689, 693, 695, 701, 712, 715, 717, 731, 740–746, 816–820]. Принцип действия одного из ЛИМР [5, 10, 816] (рис. 3.25) состоит в модуляции поляризации падающего пучка света с последующей демодуляцией рассеянного света (преобразовании модуляции поляризации в модуляцию интенсивности) и описывается следующим матричным уравнением:

$$\mathbf{S} = \mathbf{A}\mathbf{F}'\mathbf{M}\mathbf{F}\mathbf{P}\mathbf{S}_0, \quad (3.74)$$

где \mathbf{S} и \mathbf{S}_0 — векторы Стокса регистрируемого и падающего излучения соответственно; \mathbf{P} , \mathbf{A} и \mathbf{F} , \mathbf{F}' — матрицы Мюллера для линейных поляризаторов и фазовых пластинок, помещенных, соответственно, до и после рассеивающей среды. При вращении фазовых пластинок интенсивность, регистрируемая фотоприемником, т. е. первый элемент вектора Стокса \mathbf{S} , зависит от времени. Путем перемножения матриц в выражении (3.74) и выполнения соответствующих тригонометрических преобразований можно показать, что выходная интенсивность может быть представлена в виде ряда Фурье, а именно [821]

$$I = a_0 + \sum_{k=1}^K (a_{2k} \cos 2k\varphi + b_{2k} \sin 2k\varphi), \quad (3.75)$$

где

$$a_{2k} = \sum_{i=1}^N I(\varphi_i) \cos 2k\varphi_i, \quad b_{2k} = \sum_{i=1}^N I(\varphi_i) \sin 2k\varphi_i, \quad (3.76)$$

$I(\varphi_i)$ — интенсивность рассеянного света, регистрируемая фотоприемником при некоторой ориентации быстрой оси первой фазовой пластинки φ_i ; а N — число измерений за один ее полный поворот.

Коэффициенты ряда, описываемого уравнением (3.75), определяются значениями элементов матрицы \mathbf{M} исследуемого объекта, и их измерение дает систему линейных уравнений для определения матрицы \mathbf{M} . Число уравнений и степень обусловленности этой системы уравнений зависят от выбора отношения между скоростями вращения фазовых пластинок. Оптимальный выбор соотношения скоростей вращения 1:5 дает оптимально обусловленную систему линейных уравнений ($K = 12$, т. е. 12 уравнений должны быть выведены для нахождения полной матрицы \mathbf{M} исследуемого объекта с использованием выражения (3.75)) [821].

Показанная на рис. 3.25 экспериментальная установка с вращающимися фазовыми пластинками $\lambda/4$, имеющая сравнительно простое математическое обеспечение, позволяет избежать многих экспериментальных артефактов, присущих измерениям в стационарном режиме и системам, использующим электрооптические модуляторы [43]. Этот ЛИМР имеет фиксированный поляризатор \mathbf{P} и анализатор \mathbf{A} , а также две вращающиеся фазовые пластинки \mathbf{F} и \mathbf{F}' , расположенные до и после образца.

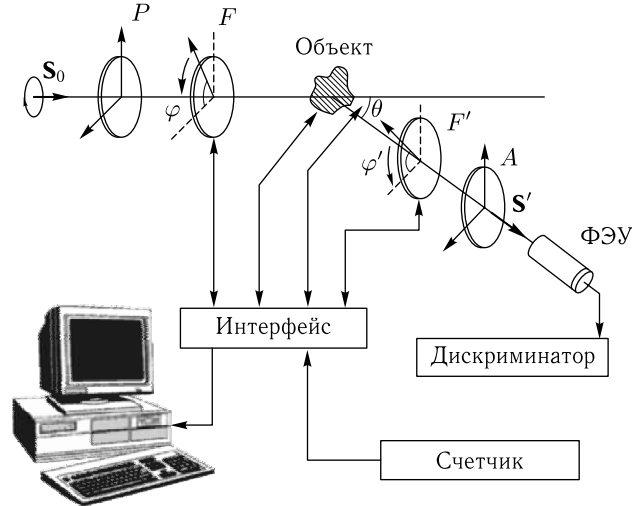


Рис. 3.25. Схема лазерного измерителя матрицы рассеяния (детали в тексте) [5, 10, 816]

Поляризатор и анализатор сориентированы параллельно друг другу, и их плоскости пропускания ортогональны плоскости рассеяния; быстрые оптические оси фазовых пластинок F и F' образуют углы φ и φ' с плоскостью рассеяния, в результате чего создаются соответствующие фазовые сдвиги δ и δ' . Отношение скоростей вращения фазовых пластинок было выбрано равным $1 : 5$, т. е. $\varphi' = 5\varphi$, поскольку в этом случае однозначно определяются все 16 матричных элементов. Управляемый компьютером ЛИМР обеспечивает автоматическое сканирование по углу рассеяния в диапазоне $0 \pm 175^\circ$ с шагом $4'$ и точностью $5''$. В качестве источника света использовался одномодовый (TEM₀₀) стабилизированный He-Ne-лазер (633 нм). Система обеспечивала съем $N = 256$ показаний за один оборот первой фазовой пластинки F (см. (3.76)). Система счета фотонов состояла из фотоумножителя (ФЭУ), амплитудного дискриминатора (усилителя-ограничителя) и счетчика. Анализ с помощью быстрого преобразования Фурье (БПФ) позволял измерять и вычислять все 16 элементов матрицы рассеяния для фиксированного угла рассеяния с точностью 3–5%.

Измерение угловых зависимостей элементов МРС для хрусталика глаза человека выявляет их существенное различие в случае прозрачности и непрозрачности (поражение катарактой) (см. рис. 3.26). Это различие может быть обусловлено появлением крупных несферических рассеивающих частиц из-за агрегации белков с большим молекулярным весом.

Сравнение оптического пропускания (см. рис. 3.18) и угловых зависимостей элементов МРС, измеренных на одной и той же длине волны, показывает, что последние более чувствительны к изменениям структуры рассеивающей среды. Это позволяет использовать измеренные элементы МРС для ранней диагностики структурных изменений в биоткани, например вызванных развитием катаракты.

Этот вывод можно проиллюстрировать результатами прямых модельных экспериментов, показанных на рис. 3.27 (см. [24, 463]). Измерения производились в растворах α -кристаллина (квазимонодисперсная фракция частиц около 20 нм в диаметре), выделенная из свежезлытого хрусталика телят, и в растворах высокомолекулярных белков (средний диаметр 800 нм), выделенных из непрозрачных хрусталиков. Рисунок показывает, что измерения угловых характеристик рассеяния элементов МРС позволяет идентифицировать грубодисперсную фракцию рассеивающих частиц,

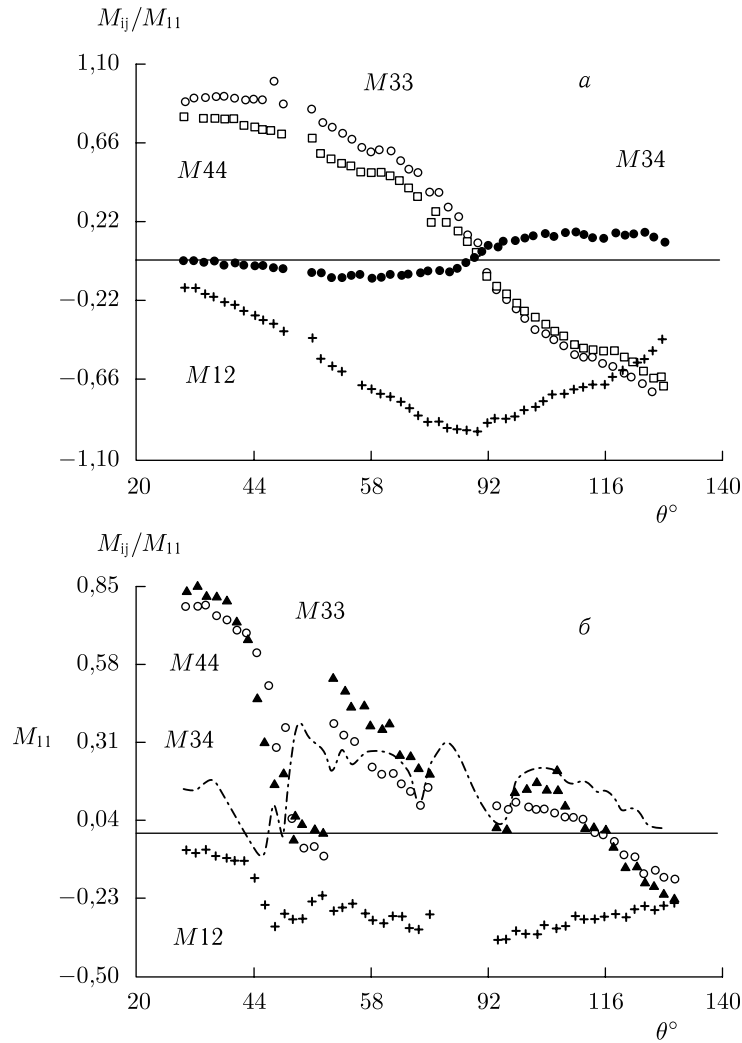


Рис. 3.26. Экспериментальные угловые зависимости элементов МРС нормального хрусталика (а) (5 ч спустя после смерти 56-летнего человека) и хрусталика с катарактой (б) (5 ч спустя после смерти 88-летнего человека) [24]

чего трудно достичь в спектрофотометрии, поскольку соответствующее уменьшение оптического пропускания образца не превышает 1%.

Лазерные измерения МРС можно использовать для исследований *in vitro* различных тканей глаза, от роговицы до сетчатки. Измерения *in vivo* также вполне возможны, при условии использования быстродействующего ЛИМР для исключения сенсомоторного отклика глазного яблока. В этом случае может быть получена структурная информация об исследуемых биотканях глаза, необходимая, например, для ранней диагностики катаракты и других офтальмологических заболеваний.

Измерение МРС глаза кролика показывает, что водянистая влага в передней камере глаза фактически представляет собой прозрачное изотропное вещество со слабыми рассеивающими свойствами, обусловленными присутствием растворенных

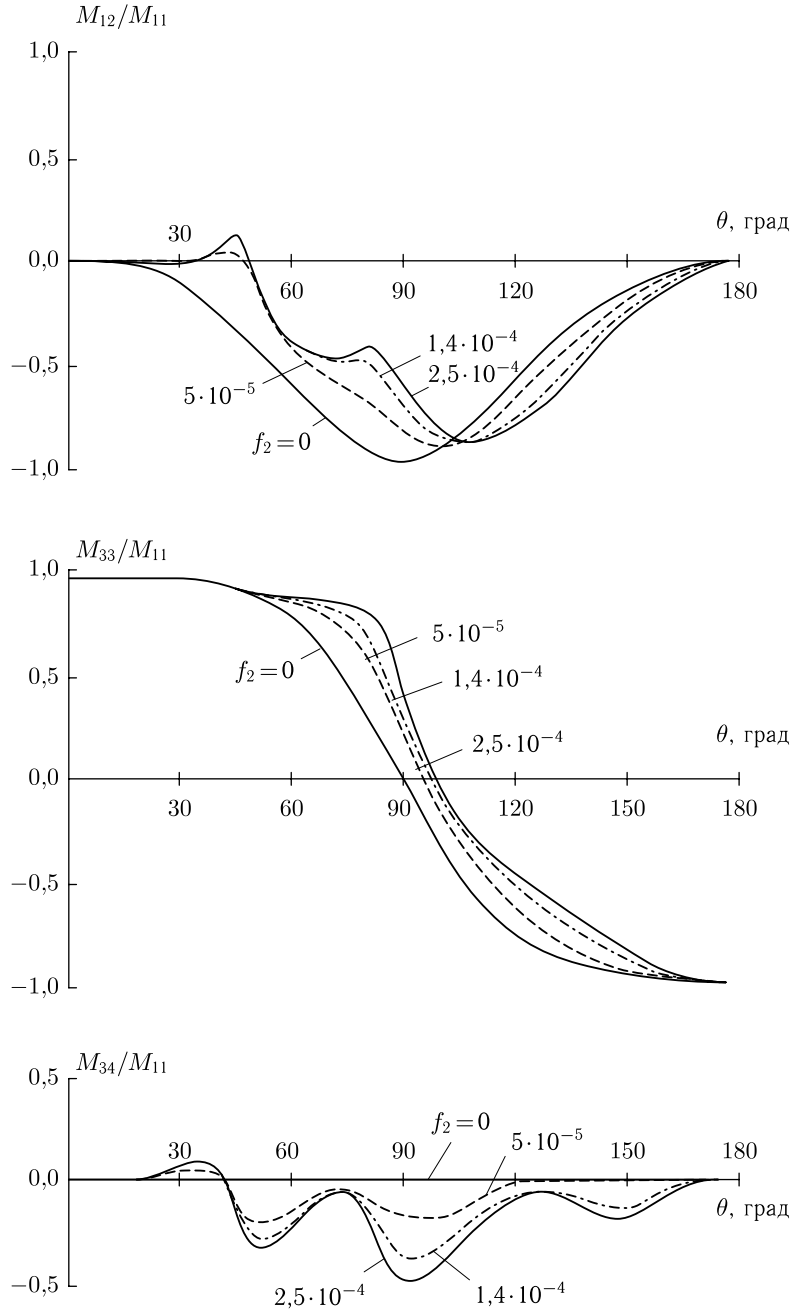


Рис. 3.27. Индикатрисы элементов МРС растворов α -кристаллина и фракции крупных рассеивающих частиц, изолированных из хрусталика с катарактой. Относительные объемные концентрации α -кристаллина $f_p = 0,3$ и фракции крупных частиц $f_2 = 0$ ($\tau = 99\%$), $5 \cdot 10^{-5}$ ($\tau = 98\%$); $1,4 \cdot 10^{-4}$ ($\tau = 94\%$) и $2,5 \cdot 10^{-4}$ ($\tau = 90\%$), τ — пропускание слоя раствора толщины 5 мм на $\lambda = 633$ нм [24, 463]

органических компонентов (интенсивность рассеянного света не превышает 1,5–2% интенсивности падающего). Результаты исследования МРС стекловидного тела показывают, что его аморфная биоткань не влияет на поляризацию света, распространяющегося в прямом направлении, что открывает возможность исследования глазного дна и получения изображения структуры зрительного нерва, что важно для ранней диагностики глаукомы [234, 589, 600]. С другой стороны, некоторые патологические изменения в стекловидном теле могут отвечать за изменение элементов МРС. Особенно легко идентифицировать мелкие внутриглазные кровоизлияния по хорошо заметному рассеянию света от эритроцитов. Угловые зависимости элементов МРС монослоя дисковидных или сфероидальных эритроцитов для различной плотности их упаковки (концентрации) были исследованы в работе [69] (рис. 3.28). Угловая зависимость матричного элемента M_{11} в клетках обоих типов оказалась зависящей от плотности упаковки в интервале углов рассеяния $\theta = 15\text{--}16^\circ$. Было обнаружено, что на угловые зависимости элементов M_{11} , M_{22} , M_{33} и M_{21} при $\theta = 110\text{--}170^\circ$ гораздо сильнее влияет форма рассеивающих частиц, чем их концентрация. Из результатов измерений величины M_{12} при углах рассеяния $\theta \approx 140\text{--}160^\circ$ удалось получить значения показателя преломления эритроцитов. Исследования, представленные в работе [815] выявили высокую чувствительность угловых зависимостей элементов МРС (M_{11} и M_{12}) к степени агрегации эритроцитов в плазме крови.

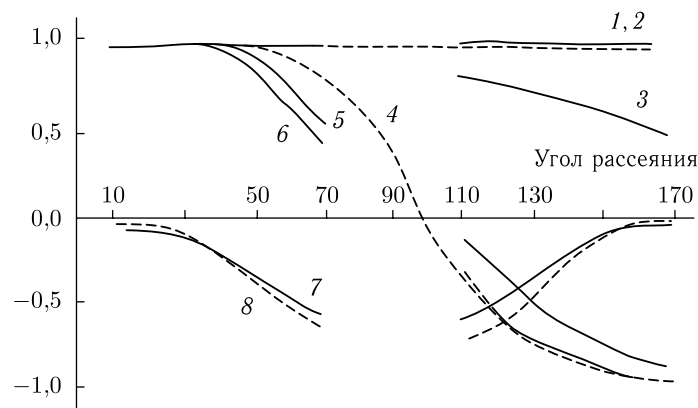


Рис. 3.28. Угловые распределения нормированных на M_{11} элементов МРС для монослоя эритроцитов: экспериментальные: M_{22} (1, 3), M_{33} (5, 6), M_{12} (7), M_{21} (8); теоретические (теория Ми): M_{22} (2), M_{33} (4); для дископодобных эритроцитов (3, 5, 7, 8) и сфероцитов (1, 2, 4, 6) (из работы [69] с поправками)

Визуализирующий поляриметр на основе жидкокристаллических переменных фазовых пластинок был использован в режиме двойного прохода при отражении от ретины или в проходящем свете для исследований *in vivo* и *in vitro* поляризационных свойств глаза и отдельно роговицы и хрусталика [701–706]. При исследованиях *in vivo* глаз добровольцев фазовые задержки, обусловленные двулучепреломляющими структурами глаза рассчитываются на основании набора пространственно разрешенных матриц Мюллера, полученных из серии 16 изображений ретины при двойном проходе [701, 702, 704]. Результаты исследований для диаметра зрачка в 2 мм показали, что, несмотря на то что фазовая задержка, вносимая глазом при двойном проходе всех сред, меняется от человека к человеку, в целом для центральной области роговицы имеет место такая закономерность, что медленная ось направлена вдоль линии от верхне-височной области к нижне-носовой, а эллиптичность близка к нулю,

что указывает на наличие линейного двулучепреломления [701]. При увеличении размера зрачка фазовая задержка увеличивается, двулучепреломление глаза остается линейным, а азимутальный угол изменяется без какой-либо явной тенденции.

Исследования *in vivo* деполяризации на таком же поляриметре [702] показали, что для центральной части изображений степень поляризации равна 0,85 и 0,70, соответственно для зрачка размером 2 мм и 5 мм. Степень поляризации уменьшается к краям изображения. Было обнаружено, что глаз обладает несильными поляризующими свойствами (в среднем $\sim 0,25$ в центральной части), что связано с наличием небольшого циркулярного двулучепреломления и дихроизма. Было также показано, что отражение от ретинального слоя, который дает основной вклад в отражение света, не зависит от состояния поляризации. В то же время исследования *in vitro* [703] на отдельных роговицах млекопитающих с помощью такого же поляриметра-визуализатора матрицы Мюллера, но в проходящем свете показали, что двулучепреломление роговицы близко к линейному. Несмотря на то что сама величина фазовой задержки меняется от образца к образцу, ее величина постоянна в центре и увеличивается к периферии роговицы. Дихроизм и поляризующая сила незначительны по величине. Пространственные карты для степени поляризации показывают, что роговица в основном не деполяризует полностью поляризованный падающий свет.

В работе [705] показано, что эффект деполяризации света в нормальных глазах молодых людей, как правило, мал, однако увеличивается с возрастом, а также при наличии некоторых патологий и после рефрактивной хирургии [706]. Деполяризация существенно влияет на оценки степени двулучепреломления сред глаза (роговицы и ретины).

Исследования *in vitro* интактных возрастных хрусталиков человека (от 56 до 88 лет) [704] показали, что общая фазовая задержка мала и она уменьшается от центра хрусталика к его периферии. Двулучепреломление линейное, уменьшается от центра вдоль радиуса. Дихроизм и поляризующая силы малы, однако степень деполяризации для исследуемых хрусталиков была на уровне 35%.

В работах [822, 823] методом матрицы Мюллера исследуется линейный дихроизм ретинального нервного волоконного слоя и из этих измерений определяется его толщина. Измерения дихроизма роговицы этой же группы представлены в работе [824].

Глава 4

ОПТОТЕРМИЧЕСКОЕ, ОПТОАКУСТИЧЕСКОЕ И АКУСТООПТИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СВЕТА С БИОТКАНЯМИ

Описываются оптотермическое, оптоакустическое и акустооптическое взаимодействия, включая сонолюминесценцию, в сильно рассеивающих средах и биологических тканях. Обсуждаются основные механизмы взаимодействия и классификация эффектов. Представлены оптотермический (фототермический) и оптоакустический (фотоакустический) методы. Изложены основы оптотермической и оптоакустической спектроскопии, томографии и микроскопии. Обсуждаются перспективные приложения и методы измерений.

4.1. Основные принципы и классификация

Оптотермический (ОТ) метод регистрирует зависящую от времени тепловую энергию, выделяющуюся в ткани в процессе ее взаимодействия с импульсным или модулированным по интенсивности оптическим излучением [5, 6, 25, 196, 204, 825–913]. Такое взаимодействие вызывает ряд термоупругих эффектов в биоткани, в частности генерацию акустических волн. Регистрация акустических волн является основой оптоакустических (или фотоакустических) методов [5, 6, 25, 196, 204, 828–862, 884, 885, 887–913]. Информативные возможности этого метода позволяют оценивать тепловые, оптические и акустические свойства биоткани, зависящие от особенностей ее структуры.

Для возбуждения теплового отклика биоткани можно использовать три режима [5, 6, 25, 196, 828].

В первом из них импульс света (обычно от импульсного лазера) возбуждает образец и сигнал регистрируется во времени с помощью датчика с малой инерционностью, соединенного с широкополосным усилителем. В этом случае для увеличения отношения сигнал–шум используется усреднение сигнала и техника стробирования.

Во втором режиме используется источник света с модулированной (как правило, по гармоническому закону) интенсивностью (мощная лампа или лазер непрерывного действия) и низкочастотный датчик. Измерения производятся в зависимости от частоты, а для подавления шумов применяется фазовое детектирование (синхронное усиление сигнала на частоте модуляции).

В третьем режиме непрерывное возбуждение вызывает фотохимические реакции и тепло, выделяемое в процессе каждой из них, регистрируется по повышению температуры.

В любом случае тепловые волны, возникающие из-за выделения тепла, приводят к различным эффектам, дающим основу для ряда методов [5, 6, 25, 196, 828]:

— оптоакустический (ОА) или фотоакустический (ФА) метод (прямая или непрямая генерация звуковой волны);

- оптотермическая радиометрия (ОТР) или фототермическая радиометрия (ФТР) (регистрация инфракрасного теплового излучения);
- фоторефрактивные методы: термическое расплывание показателя преломления среды, термический линзовый эффект, преломление зондирующего пучка, интерферометрия и дефлектометрия (регистрация пространственных вариаций показателя преломления биоткани или окружающей среды);
- оптогеометрические методы (измерение деформации поверхности твердых тел или изменения объема жидкостей);
- оптическая или лазерная калориметрия (измерение температуры).

Термин «оптоакустика» относится, прежде всего, к методам с временным разрешением с использованием импульсных лазеров и измерений профиля давления в биоткани [5, 25, 829, 831, 832]. Исторически термин «фотоакустика» был введен для описания, в первую очередь, спектроскопических экспериментов с использованием модулированного непрерывного излучения и фотоакустической ячейки [5, 828, 830, 833]. Однако в последние годы в связи с интенсивным развитием метода и его распространением не только на решение спектроскопических задач, но и на получение изображений поглощающих неоднородностей в биотканях, термин «фотоакустика» получает более широкое распространение в литературе [196, 204, 893–897, 899].

Схематическое представление некоторых методов ОТ и ОА/ФА, применяемых для исследования биотканей, дано на рис. 4.1 [892]. Возбуждающий лазерный пучок падает на поверхность образца, длина волны света настроена в резонанс с полосой поглощения интересующего компонента биоткани, соответственно, оптическая энергия поглощается средой. В конденсированной среде скорость распада возбужденных состояний из-за столкновений гораздо выше, чем из-за радиационных процессов, поэтому большая часть энергии превращается в тепло. Нагрев, зависящий от времени, приводит ко всем упомянутым выше тепловым и термоупругим эффектам. В ОА- или ФА-методах (см. 1 на рис. 4.1) микрофон или пьезоэлектрический датчик, находящийся в акустическом контакте с образцом, используется в качестве приемника для измерения амплитуды или фазы результирующей акустической волны [5, 25, 196, 828–832]. В методе ОТР (см. 2 на рис. 4.1), удаленные ИК-приемники и ИК ПЗС-камеры используются для оценки температуры поверхности образца и получения его термического изображения [5, 6, 25, 827, 828, 863–874]. Нагрев среды меняет ее показатель преломления. Изменение показателя преломления материала исследуемого образца или окружающей его газа можно зарегистрировать с помощью интерферометра, измерения степени фокусировки или расфокусировки зондирующего пробного лазерного пучка (метод «тепловой линзы», см. 3 на рис. 4.1) или его отклонения (метод «дефлекции», см. 4 на рис. 4.1) при прохождении области, возбуждаемой пучком лазера накачки [875–881].

Величины ОТ- и ОА/ФА-сигналов зависят от количества поглощенной и преобразованной в тепло энергии, а также от термодиффузионных и термоупругих свойств образца биоткани и его окружения. Предполагая, что безызлучательная релаксация является основным процессом распада возбужденных состояний атомов и молекул среды и что коэффициент экстинкции не очень велик, $\mu_a d \ll 1$ (d — длина цилиндра внутри образца, занимаемого лазерным пучком), поглощенную энергию E_T можно оценить на основании закона Бера [5, 25]:

$$E_T \approx E \mu_a d, \quad (4.1)$$

где E — энергия падающего импульсного излучения, μ_a — коэффициент поглощения.

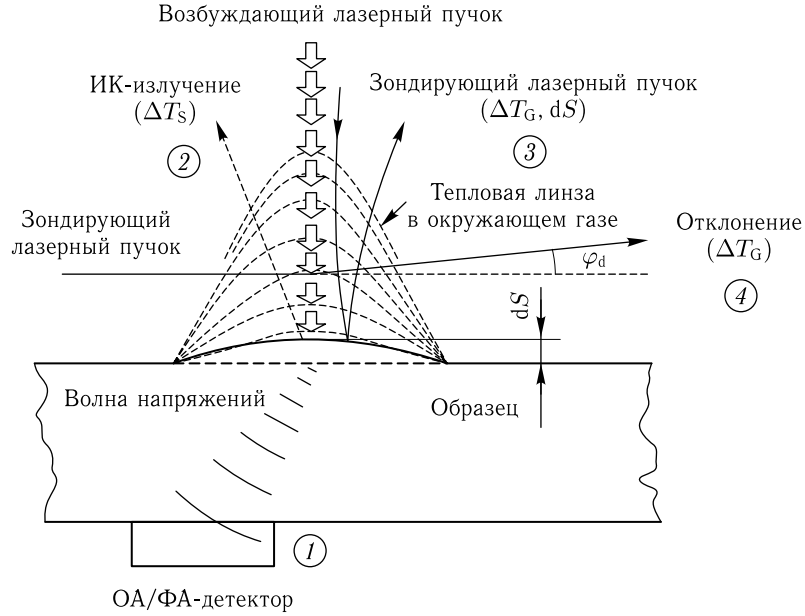


Рис. 4.1. Схема некоторых оптотермических методов, применяемых для исследования биологических тканей [892]: ΔT_S — изменение температуры образца; ΔT_G — изменение температуры окружающего газа; dS — термоупругая деформация; φ_d — угол отклонения зондирующего лазерного пучка. 1 — ОА-метод; 2 — ОТР-метод; 3 — метод «тепловой линзы»; 4 — метод «дефлексии»

Поглощение энергии вызывает рост локальной температуры ΔT , определяемый соотношением [5, 25]

$$\Delta T = \frac{E_T}{c_P V \rho} \approx \frac{E \mu_a d}{c_P V \rho} = \frac{E \mu_a}{\pi w_b^2 c_P \rho}, \quad (4.2)$$

где c_P — удельная теплоемкость при постоянном давлении, $V = \pi w_b^2 d$ — освещаемый объем, w_b — радиус лазерного пучка, а ρ — плотность среды. Предполагая, что освещаемый (нагреваемый) объем среды расширяется адиабатически при постоянном давлении, можно вычислить изменение объема по формуле

$$\Delta V = \pi (w_b + \Delta w_b)^2 d - \pi w_b^2 d = \beta V \Delta T \approx \beta \frac{E \mu_a d}{c_P \rho}, \quad (4.3)$$

где Δw_b — изменение радиуса нагреваемой лазерным пучком цилиндрической области среды, а β — коэффициент объемного расширения.

Указанное расширение индуцирует волну, распространяющуюся в радиальном направлении со скоростью звука. Соответствующее изменение давления Δp пропорционально амплитуде механических колебаний $\Delta x_T \sim \Delta w_b$:

$$\Delta p = 2\pi f_{ac} v_{ac} \rho \Delta x_T \sim f_{ac} v_{ac} \rho \Delta w_b, \quad (4.4)$$

где f_{ac} — частота акустических колебаний, а v_{ac} — скорость акустических волн в среде.

Используя формулу (4.4) и принимая во внимание, что $\Delta w_b \ll w_b$, окончательно находим:

$$\Delta p \sim \frac{f_{ac}}{w_b} \cdot \frac{\beta v_{ac}}{c_P} \mu_a E. \quad (4.5)$$

Формулы (4.2)–(4.5) описывают принципы работы разнообразных ОТ- и ОА/ФА-методов. Информация о коэффициенте поглощения μ_a на данной длине волны может быть получена из прямых измерений изменения температуры ΔT (оптическая калориметрия), изменения объема ΔV (оптогеометрический метод) или изменения давления Δp (ОА- или ФА-методы). Используя связь фокусного расстояния «тепловой линзы» f_T , угла отклонения пробного лазерного пучка φ_d и фазового сдвига в измерительном интерферометре $\Delta\psi$ с изменением температуры образца ΔT , можно записать приближенные выражения, характеризующие фоторефрактивные методы, в виде [5, 25]

$$\frac{1}{f_T} \approx d_p \frac{dn}{dT} \cdot \frac{\Delta T}{w_b^2} \quad (4.6)$$

для метода «тепловой линзы»,

$$\varphi_d \approx \frac{1}{n} \cdot \frac{dn}{dT} \cdot \Delta T \quad (4.7)$$

для метода «дефлексии»,

$$\Delta\psi \approx \frac{2\pi d_p}{\lambda_p} \cdot \frac{dn}{dT} \cdot \Delta T \quad (4.8)$$

для метода «фазового сдвига» (интерферометрия), где dn/dT — температурный градиент показателя преломления среды (биоткани), d_p — длина области перекрытия пучков лазера накачки и пробного лазера, λ_p — длина волны пробного пучка.

Рассматриваемые эффекты возможны в газах, жидкостях и твердых телах. Обычно исследуемая биоткань окружена газом (смесью газов, например воздухом) или жидкостью (кровь, цереброспинальная жидкость, внутриглазная жидкость и т. д.), следовательно, существует возможность одновременного наблюдения разнообразных ОТ- и ОА-эффектов, связанных с переносом оптической интенсивности и распространением тепловых и акустических волн в биоткани и окружающей ее среде [5, 25].

Время задержки между оптическим и тепловым (акустическим) импульсами является важным параметром ОТ- (или ОА-) методов, определяющим отношение сигнал-шум. Например, импульсный ОА-метод характеризуется временем задержки между оптическим и акустическим импульсами, равным [828]

$$\tau_{OA} \approx \frac{R_{bd}}{v_{ac}}, \quad (4.9)$$

где R_{bd} — расстояние между осью возбуждающего лазерного пучка и акустическим приемником, а v_{ac} — скорость акустических волн в среде.

Временная задержка для метода «тепловой линзы» определяется временем распространения тепловой волны поперек пробного лазерного пучка радиуса w_p [828]:

$$\tau_{OT} \approx \frac{(w_p/2,4)^2}{a_T}, \quad (4.10)$$

где

$$a_T = \frac{k_T}{\rho c_P} \quad (4.11)$$

— температуропроводность среды, k_T — коэффициент теплопроводности, а ρ — плотность среды. Когда длительность лазерного импульса τ_L много меньше τ_{OT} , фокусировка пробного лазерного пучка позволяет увеличить время задержки между оптическим и тепловым импульсами и тем самым улучшить характеристики метода.

Значения тепловых параметров (коэффициент теплопроводности k_T и удельная теплоемкость c_P при постоянном давлении) и плотность ρ для многих биотканей приведены в работах [2, 87].

4.2. Метод ОА (ФА) газовой ячейки

Метод ОА (ФА) газовой ячейки был разработан еще в 30–80 годы прошлого столетия для целей высокочувствительной спектроскопии газов, для которой нет необходимости в длинных ячейках, как это требуется в обычной спектроскопии поглощения при низких величинах поглощения, поскольку в ОА- (ФА-) методе измеряемый сигнал определяется непосредственно коэффициентом поглощения μ_a , а не произведением $\mu_a l_{\text{cell}}$, где l_{cell} — длина ячейки, как в обычной [25, 825]. В приложении к биомедицинским исследованиям метод газовой ячейки может быть полезен при анализе состава выдыхаемого воздуха пациента. Для молекулярных газов, когда преобладает безызлучательная релаксация возбужденных состояний, зависящий от времени ОА- (ФА-) сигнал при возбуждении импульсом с энергией E имеет вид [5, 6]

$$\delta P(t) \approx (\gamma - 1) \frac{E\mu_a}{\pi R_G^2} \exp\left(-\frac{t}{\tau_T}\right), \quad (4.12)$$

где $\delta P(t)$ — зависящее от времени t изменение давления; $\gamma = c_P/c_V$, а c_P и c_V , — соответственно удельные теплоемкости при постоянном давлении и объеме; R_G — радиус газовой цилиндрической ячейки;

$$\tau_T \approx \frac{(R_G/2,4)^2}{a_T} \quad (4.13)$$

— время тепловой релаксации ячейки, а температуропроводность среды

$$a_T = \frac{k_G}{\rho_G c_V}, \quad (4.14)$$

где ρ_G — плотность газа, а k_G — теплопроводность газа. Для конденсированного вещества a_T определяется выражением (4.11).

Характеристическая длина температуропроводности (тепловая длина) является важным параметром, который для импульсного возбуждения оценивается как [5, 6]

$$l_T \approx (4a_T\tau_L)^{1/2}, \quad (4.15)$$

где τ_L — длительность лазерного импульса.

4.3. Модуляционный (фазовый) ОА- (ФА-) метод

Частотный метод, в котором лазерный пучок мощности P , модулированный по интенсивности с частотой ω , освещает образец, а акустический приемник регистрирует амплитуду модуляции $\delta p(\omega)$ и фазовую задержку $\Phi_p(\omega)$ акустического сигнала, позволяет провести количественные исследования биологических тканей [5, 6, 25, 828, 833]. В этом случае можно получить следующие выражения для $\delta p(\omega)$ и $\Phi_p(\omega)$ [5, 6, 25]

$$\delta p(\omega) \approx \frac{(\sqrt{2}/2)(\gamma - 1) \frac{P\mu_a}{\pi R_G^2} \tau_T}{[1 + (\omega\tau_T)^2]^{1/2}}, \quad (4.16)$$

$$\Phi_p(\omega) \approx -\arctg(\omega\tau_T), \quad (4.17)$$

где τ_T определяется выражением (4.13). Эти выражения применимы в тех же пределах, что и формула (4.12); обозначения также совпадают с использованными в выражении (4.12).

ФА-метод с газовой ячейкой широко применяется в исследованиях оптических и тепловых свойств конденсированных сред (жидкостей и твердых тел) [5, 6, 25, 828, 830]. Свет с интенсивностью, модулированной на частоте ω , поглощается конденсированной средой и частично преобразуется в тепло, вызывая изменение давления окружающего газа, которое, в свою очередь, регистрируется микрофоном. Для описания ФА-сигнала используются три характерные длины: геометрическая d , средняя длина свободного пробега фотона $l_{ph} \approx 1/\mu_a$ (когда $\mu_a \gg \mu_s$) и «тепловая» (термодиффузионная) l_T ,

$$l_T = (2a_T/\omega)^{1/2}, \quad (4.18)$$

где a_T определяется соотношениями (4.11) или (4.14), в зависимости от используемого метода измерения. Существует шесть режимов газо-микрофонного метода, основанных на различных соотношениях между тремя указанными длинами. Очевидно, что для оптически и термически толстых образцов ($d > l_T \approx l_{ph}$) генерируемый ФА-сигнал подвержен насыщению, и таких ситуаций следует избегать [25]. Для данного образца l_T определяется частотой модуляции ω или длительностью импульса (см. соотношение (4.15)). Для оптически и термически прозрачных образцов ($d \approx l_{ph} + l_T$) ФА-отклик также включает влияние задней поверхности образца, следовательно, кроме шести упомянутых режимов возможны и некоторые другие.

В предположении, что свет поглощается в основном на поверхности образца, а тепловой поток описывается одномерной моделью, фазовая задержка имеет вид [833]

$$\text{tg } \Phi_p = \text{tg } (d/l_T) \frac{1 + R_b \exp(-2d/l_T)}{1 - R_b \exp(-2d/l_T)}, \quad (4.19)$$

где $R_b = \frac{1-b}{1+b}$; $b = \left(\frac{k_{Tb} \rho_b c_{pb}}{k_{Tpcp}} \right)^{1/2}$; l_T — длина диффузии тепла в биоткани (см. соотношение (4.18)), а d — геометрическая длина образца (параметры материала подложки помечены индексом b).

Выражение (4.19) показывает, что Φ_p линейно зависит от $\omega^{1/2}$, при условии что $R_b \exp(-2d/l_T) \ll 1$. Это условие обычно выполняется для термически толстых объектов ($d \gg l_T$). Однако оно верно и для термически тонких объектов, если эффузионные свойства образца и материала подложки близки друг к другу ($b \approx 1$)

$$\Phi_p \approx d/l_T \sim \omega^{1/2}. \quad (4.20)$$

В этом случае изображения отражают только распределение температуропроводности образцов. Описанная в работе [833] ФА-ячейка использовалась в системе лазерной визуализации биологических образцов. Она имела два плоских стеклянных окна, разделенных 1 мм силиконовой прокладкой. Для обеспечения поглощения на поверхности образец покрывался медной фольгой толщиной 5 мкм и помещался на заднее окно ячейки. Модулированный по интенсивности (970 Гц) пучок света от аргонового лазера (200 мВт) освещал образец со стороны фольги и поглощался на поверхности. Образующаяся при этом акустическая волна распространялась по образцу и с некоторой фазовой задержкой достигала границы образца с воздухом, где ФА-сигнал детектировался микрофоном. Пространство между образцом и задним окном заливалось прозрачным жидким парафином для предотвращения генерации ФА-сигнала на поверхности фольги. Парафин служил также материалом подложки. Наблюдаемая поверхность образца сканировалась с шагом в 25 мкм в пределах 100×100 точек поперек лазерного пучка, сфокусированного до 40 мкм.

Было исследовано несколько типов биотканей: срез глаза собаки и почка мыши. Из фазовых изображений можно получить температуропроводность для каждой точки. Например, температуропроводность зрительного нерва составила $1,9 \cdot 10^{-7} \text{ м}^2/\text{с}$.

Точность этих измерений составляла несколько десятков процентов, главным образом из-за трудности точного определения толщины образца. Рассчитанная длина диффузии тепла составила около 8 мкм. Поэтому поперечное разрешение было ограничено только диаметром лазерного пучка и минимальным шагом сканирования. Данный метод может представлять интерес для изучения связи между тепловыми свойствами и физиологическими функциями естественных биологических микроструктур, поскольку, в принципе, он не требует фиксации ткани. Метод относится к ФА-микроскопии (ФАМ).

Основные принципы ФАМ весьма просты [25, 834, 897, 904–908]. Пространственно когерентное лазерное излучение служит пробным пучком, который можно сфокусировать по крайней мере до 1 мкм. Сканирование сфокусированного лазерного пучка по поверхности объекта и регистрация ФА-сигнала микрофоном или пьезодатчиком дают распределение оптических, тепловых и акустических свойств объекта.

ФАМ позволяет профилировать объект по глубине. При изменении длины волны источника излучения меняется глубина проникновения света и ФА-сигнал генерируется на различной глубине. Метод в принципе позволяет анализировать и спектральные свойства поглотителей и их распределение внутри биоткани. Другой способ профилирования по глубине состоит в перестройке частоты модуляции. Это свойство специфическое и характерно только для ФАМ. Глубина профилирования определяется длиной диффузии тепла в среде (см. соотношение (4.18)) на данной частоте модуляции. Например, для сильно поглощающего образца ($\mu_a \approx 10^6 \text{ см}^{-1}$) ФА-сигнал может генерироваться на различных глубинах от 10^{-1} до 10^3 мкм при изменении частоты модуляции от 100 МГц до 1 Гц.

4.4. ОА- (ФА-) метод с временным разрешением

Измерение профиля и амплитуды волны напряжения с использованием ОА/ФА-спектрометра (см. рис. 4.2) в сочетании с измерением полного диффузного отражения позволяет определить по отдельности коэффициент поглощения и коэффициент рассеяния образца биоткани. Коэффициент поглощения в рассеивающей среде можно вычислить по профилю акустического сигнала только в том случае, когда известна подповерхностная энергетическая освещенность. Для рассеивающих сред, освещаемых широкими лазерными пучками ($> 0,1$ мм), эффект обратного рассеяния приводит к подповерхностной плотности потока большей, чем у падающего пучка (см., например, рис. 1.11 и 1.12 для кожи). Поэтому распределение амплитуды исходного механического напряжения в биоткани по оси z (вглубь) имеет сложный профиль с максимумом в подповерхностном слое, в полном соответствии с распределением света по этой оси. Однако амплитуду напряжения в области, прилегающей к освещаемой поверхности $\delta p(0)$, и в области экспоненциального «хвоста», спадающего в глубь образца биоткани, можно выразить как [829, 830, 840] (см. также соотношение (1.36))

$$\delta p(0) = \Gamma \mu_a E(0) \quad \text{на поверхности } (z = 0), \quad (4.21)$$

$$\delta p(z) = \Gamma \mu_a b_s E_0 \exp(-\mu_{\text{eff}} z) \quad \text{при } z > 1/\mu_{\text{eff}}, \quad (4.22)$$

где

$$\Gamma = \beta(v_{\text{ac}})^2 / c_T \quad (4.23)$$

— безразмерный параметр Грюнайзена, c_T — удельная теплоемкость ткани; b_s — фактор, учитывающий эффект дополнительной освещенности верхних слоев ткани

за счет рассеяния назад, который увеличивает эффективную энергию, поглощаемую внутри среды; множитель $\exp(-\mu_{\text{eff}}z)$ описывает экспоненциальное ослабление оптического излучения в среде, μ_{eff} определяется выражением (1.18); $E(0)$ — энергетическая освещенность в непосредственной близости к поверхности внутри среды, а E_0 — плотность энергии лазерного импульса, падающего на поверхность образца ($\text{Дж}/\text{см}^2$); остальные параметры даются формулами (4.2)–(4.5). Таким образом, амплитуда ОА-давления зависит от плотности энергии лазерного импульса и оптических параметров среды.

Для оптически толстых образцов [831, 840]

$$E(0) \approx (1 + 7,1R_d)E_0, \quad (4.24)$$

где R_d — полное диффузное отражение.

Зависящий от температуры безразмерный параметр Грюнайзена Γ пропорционален доле тепловой энергии, конвертируемой в механическое напряжение. Для воды он может быть выражен эмпирической формулой (см. работу [840])

$$\Gamma = 0,0043 + 0,0053T, \quad (4.25)$$

где температура T измерена в градусах Цельсия; для $T = 37^\circ\text{C}$ $\Gamma \approx 0,2$.

Уравнения (4.21) и (4.22) справедливы при условии, что процесс нагрева происходит намного быстрее, чем распространение механического напряжения в среде. Действительно, благодаря высокой скорости света тепло под действием лазерного импульса выделяется почти мгновенно и одновременно во всем освещаемом объеме биоткани. Такой режим согласованного механического напряжения хорошо выполняется при использовании наносекундных импульсов и позволяет эффективно и с наименьшими искажениями генерировать волну давления [831, 832, 840].

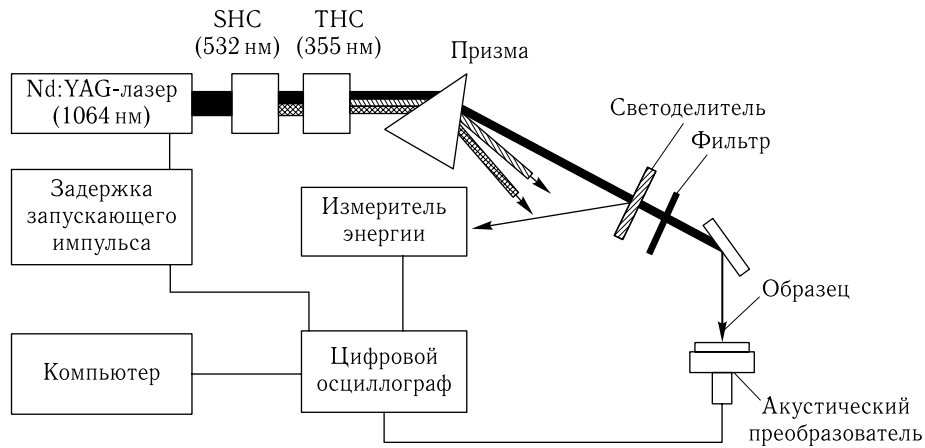


Рис. 4.2. Опто/фотоакустический спектрометр для измерений *in vitro* оптических параметров тканей [840]: SHC — преобразователь во вторую гармонику (532 нм); THC — преобразователь в третью гармонику (355 нм)

Представленные на рис. 4.2 и 4.3 ОА/ФА-метод и аппаратура были успешно использованы для измерения оптических параметров некоторых биотканей [840, 841]. Основные преимущества данного трехволнового лазерного ОА/ФА-спектрометра для измерения оптических свойств биотканей — использование акустического приемника на LiNbO_3 (рис. 4.3), который обеспечивает высокую чувствитель-

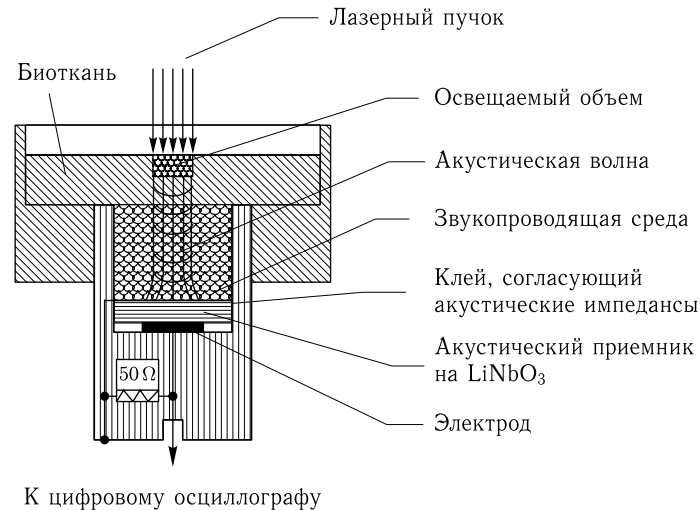


Рис. 4.3. Схема акустического преобразователя [840]

ность (~ 100 нВ/Па) в сочетании с широким диапазоном ультразвуковых частот (до 300 МГц), долговременной стабильностью и, следовательно, точной абсолютной калибровкой [840]. По данным ОА/ФА-измерений для образцов аорты человека (развитая фиброзная атеросклеротическая бляшка) были рассчитаны оптические параметры, а именно: $\mu_a = 16,5; 3,53$ и $0,15$ см⁻¹, и $\mu'_s = 72,1; 36,5$ и $4,85$ см⁻¹, соответственно на длинах волн 355, 532 и 1064 нм при толщинах образцов $\sim 3, 7$ и 12 мм и среднеквадратичных отклонениях измерений соответственно $\sim 10, 15$ и 50% . Можно измерять коэффициенты поглощения и рассеяния, комбинируя диффузное отражение и ОА/ФА-метод [841]. Эти измерения на длине волны 1064 нм дали $\mu_a = 0,53 \pm 0,03$ см⁻¹ и $\mu'_s = 7,56 \pm 0,92$ см⁻¹ для нормальной печени собаки. Для коагулированной ткани наблюдался рост в 1,3 раза коэффициента поглощения ($\mu_a = 0,71 \pm 0,30$ см⁻¹) и в 2,6 раза коэффициента рассеяния ($\mu'_s = 19,9 \pm 6,2$ см⁻¹). Определение оптических свойств мягких биотканей в ближнем ИК-диапазоне с использованием ОА/ФА-спектроскопии описано также в работе [845]. Некоторые данные по оптическим параметрам биотканей, полученные ОА/ФА-методом, приведены в табл. 7.1.

Систематическое описание ОА/ФА-метода, генерации ОА/ФА-волн, их распространения и регистрации представлено в работе [887]. Основное внимание уделено получению акустических волн с максимальной амплитудой и минимальными искажениями. Получение максимальной амплитуды важно для ОА/ФА-спектроскопии, а минимальные искажения сигнала — основа для определения реального пространственного распределения оптических свойств и получения неискаженных изображений биоткани.

4.5. Основы ОА/ФА-томографии и микроскопии

Концепция ОА/ФА-томографии (ОАТ/ФАТ) [196, 204, 831, 832, 838, 839, 843, 846, 848–857, 858, 860, 890, 891, 893–898, 904–951] иллюстрируется рис. 4.4 и 4.5. Использование коротких лазерных импульсов определяет временную ограниченность отклика исследуемой среды в виде изменения давления, получаемого в результате лазерного нагрева. Это означает, что за время лазерного нагрева облучаемого

объема биоткани индуцированные этим нагревом акустические волны не успевают распространиться на заметное расстояние. В результате значительная часть энергии, запасенная в объеме исследуемой неоднородности (опухоли, например), успевает сформировать акустическую волну до того, как она начнет распространяться со скоростью звука. В этом случае профиль индуцированного лазером давления точно воспроизводит распределение поглощенной лазерной энергии.

Если длительность импульса лазерной накачки намного меньше, чем время термодиффузии, последним можно пренебречь, что известно как приближение локального нагрева. В этом случае акустическая волна $p(\mathbf{r}, \bar{t})$, достигающая приемника в точке \mathbf{r} в момент времени \bar{t} , связана с локальным поглощением энергии $H(\mathbf{r}, \bar{t})$ следующим волновым уравнением [196, 829, 890]:

$$\frac{\partial^2 p(\mathbf{r}, \bar{t})}{\partial \bar{t}^2} - \nabla^2 p(\mathbf{r}, \bar{t}) = \frac{\beta v_{\text{ac}}}{c_T} \frac{\partial H(\mathbf{r}, \bar{t})}{\partial \bar{t}}, \quad (4.26)$$

где $\bar{t} = tv_{\text{ac}}$; скорость звука v_{ac} предполагается постоянной; $H(\mathbf{r}, \bar{t})$ — функция источника тепла, определяемая как отнесенная к единице времени и объема тепловая энергия, полученная от источника света и почти пропорциональная искомому оптическому коэффициенту поглощения. Другие параметры были определены выше. Решение уравнения (4.26) можно записать в виде интеграла от функции источника $H(\mathbf{r}, \bar{t})$:

$$p(\mathbf{r}, \bar{t}) = \frac{\beta v_{\text{ac}}}{4\pi c_T} \iiint \frac{\partial H(\mathbf{r}', t')}{\partial t'} \frac{d\mathbf{r}'}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|}, \quad (4.27)$$

где $t' = \bar{t} - |\mathbf{r} - \mathbf{r}'|$. Функцию источника $H(\mathbf{r}, \bar{t})$ можно переписать как произведение чисто пространственной части (оптическое поглощение) на чисто временную (энергия лазерного возбуждения), т. е.

$$H(\mathbf{r}, \bar{t}) = I_0 A(\mathbf{r}) S(\bar{t}), \quad (4.28)$$

где I_0 — масштабный множитель, пропорциональный интенсивности падающего излучения; $A(\mathbf{r})$ описывает оптические поглощающие свойства среды в точке \mathbf{r} , а $S(\bar{t})$ описывает форму падающего импульса. Подстановка выражения (4.28) в (4.27) дает

$$p(\mathbf{r}, \bar{t}) = \frac{I_0 \beta v_{\text{ac}}}{4\pi c_T} \iiint A(\mathbf{r}') \frac{dS(t')}{dt'} \frac{d\mathbf{r}'}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|}. \quad (4.29)$$

Это равенство определяет решение прямой задачи — расчета величины давления вне биоткани по известным поглощающим свойствам среды и профилю лазерного импульса.

Для получения изображения поглощающей неоднородности необходимо решение обратной задачи. Известны ее решения для планарной, сферической и цилиндрической геометрий (см. ссылки в работе [890]). Эти точные решения требуют больших вычислительных затрат и в большинстве случаев сводятся к более эффективным аппроксимациям [890]. На практике расстояние между ОА/ФА-источниками и приемником намного превышает длину волны высокочастотных ОА/ФА-волн, которые используются для получения изображений. При этом условии хорошим приближением для решения обратной задачи является следующий алгоритм обратной проекции [890]:

$$A(r) = C \iint_{S_D} dS_D \cos(\varphi_D) \frac{1}{t} \left. \frac{\partial p(\mathbf{r}_0, t)}{\partial t} \right|_{t=|\mathbf{r}_0 - \mathbf{r}|/v_{\text{ac}}}, \quad (4.30)$$

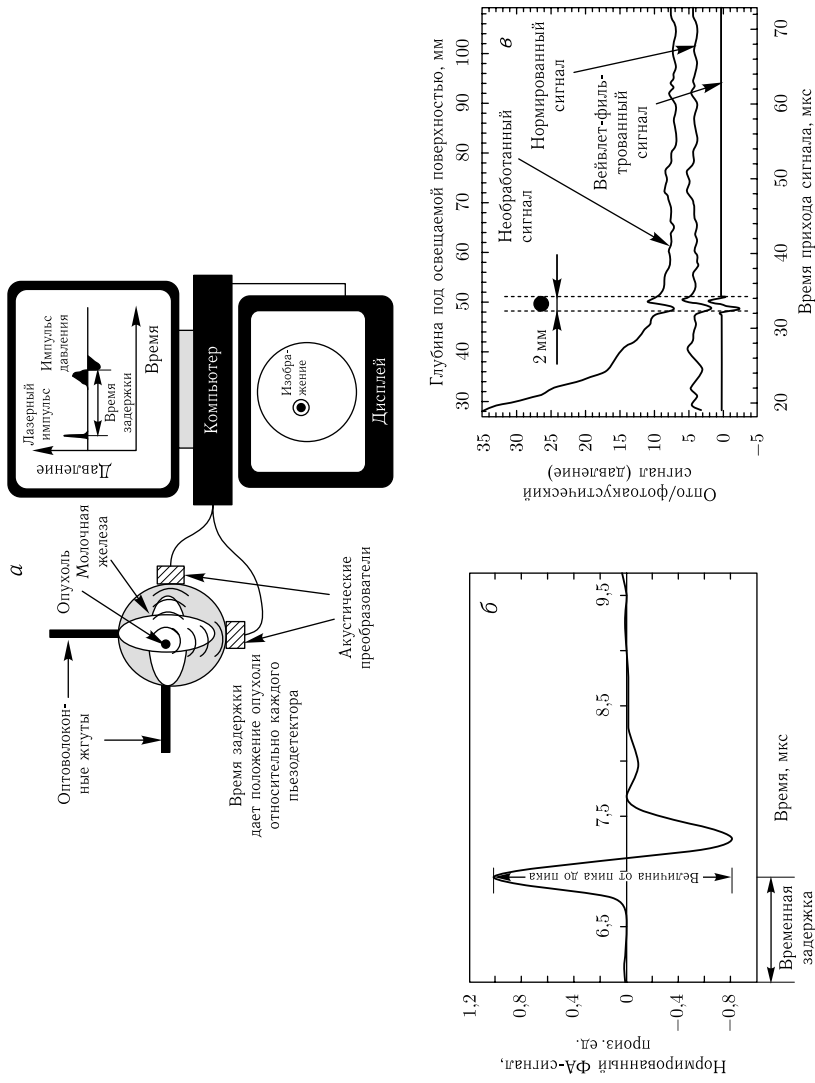


Рис. 4.4. Принципиальная схема лазерной ОА/ФА-системы визуализации для диагностики рака груди: *a* — режим пропускания [832, 838]; *b* — нормированный временной сигнал ФА-давления, полученный от фантома биоткани на основе Интралипида; представлен зарегистрированный ФА-сигнал от пика до пика [887]; *в* — временной профиль давления, зарегистрированный при лазерном облучении фантома груди с наибольшей «опухолью» (верхний профиль) и тот же профиль, отфильтрованный с использованием вейвлетного преобразования в среде MatLab [832, 838]; по оси абсцисс показано время прихода акустической волны к преобразователю; временную ось легко проградуировать в единицах глубины, поскольку глубина равна времени прихода сигнала, умноженному на скорость звука (1,5 мм/мкс)

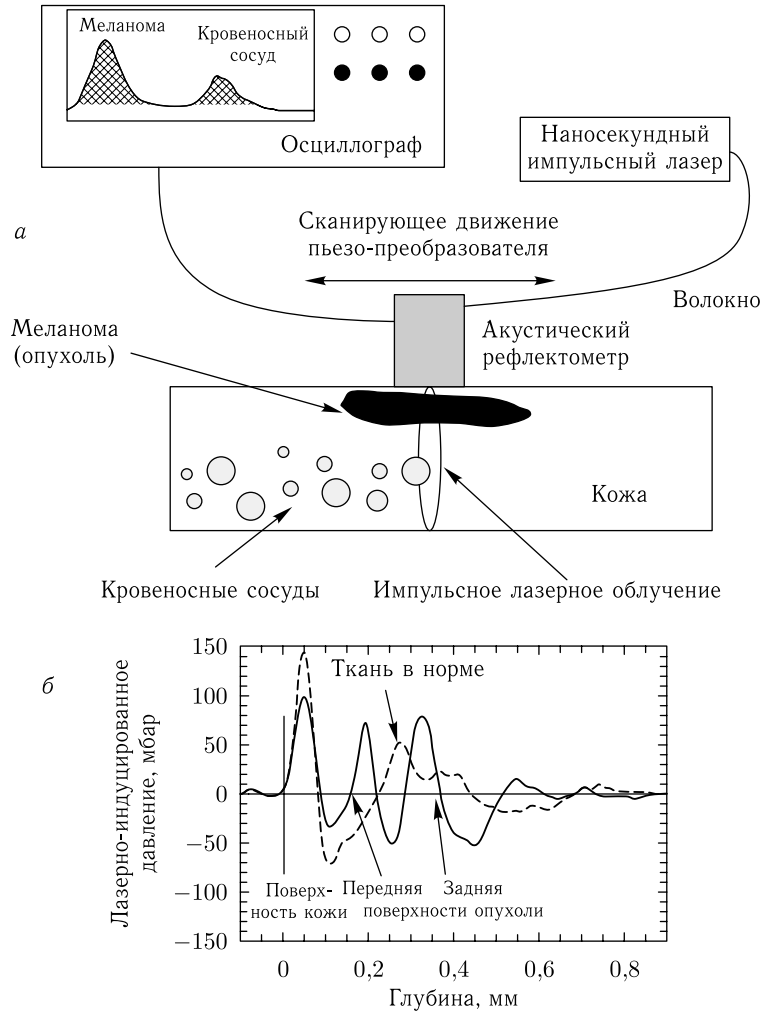


Рис. 4.5. Принципиальная схема лазерной ОА/ФА-системы визуализации для диагностики раковой опухоли кожи: *а* — режим отражения и *б* — ОА/ФА-сигналы (переменное давление), измеренные *in vivo* в опухолевой ткани (сплошная линия) и нормальной ткани (штриховая линия) для модели карциномы молочной железы мыши [832, 838]. Во время эксперимента акустический преобразователь несколько сдавливал ткань, поэтому все глубины кажутся немного меньшими, чем они были на самом деле

где C — постоянная, S_D — поверхность детектирования, а φ_D — угол между нормалью к dS_D и вектором $\mathbf{r} - \mathbf{r}_0$ (вектором, направленным из точки детектирования в точку реконструкции).

Подчеркнем, что это модифицированная обратная проекция величины $\frac{1}{t} \frac{\partial p(\mathbf{r}_0 t)}{\partial t}$. Эта обратная проекция аналогична используемой в рентгеновской компьютерной томографии (КТ). В рентгеновской КТ обратная проекция строится по траекториям лучей, тогда как в ОАТ/ФАТ — по сферическим поверхностям с центрами на приемнике и с радиусами, определяемыми временем распространения акустического возмущения.

В отличие от волн фотонной плотности, акустические волны, благодаря значительно меньшему (на два–три порядка) рассеянию этих волн в биотканях по сравнению с оптическими волнами, обеспечивают доставку минимально искаженной диагностической информации со значительных глубин внутри биоткани до поверхности органа человека [890]. Это ключевое положение лазерной ОА/ФА-визуализации, связанное с независимостью пространственного разрешения метода от рассеяния света. Кроме того, низкая чувствительность к светорассеянию помогает искусственно создавать более однородное распределение света в объеме, представляющем диагностический интерес, что важно для равномерной засветки всех поглощающих неоднородностей. Свет как носитель информации о структуре биоткани заменяется бегущей акустической волной, которая имеет профиль, сходный с профилем распределения света, и доносит его до акустического приемника без изменения. Контраст изображения зависит, в первую очередь, от оптических свойств биоткани, а именно коэффициента поглощения, а разрешение определяется свойствами акустических волн. Широкополосная регистрация ультразвука позволяет точно воспроизвести исходное распределение давления в облучаемом объеме. Профили давления, регистрируемые в момент их прихода, несут информацию о размерах, оптических свойствах и локализации макронеоднородностей биотканей, например таких как опухоли. Высокая чувствительность приемников акустических волн (типичное значение ~ 5 В/бар) позволяет регистрировать повышение температуры всего на 0,1 мК в опухоли размером 2 мм, расположенной на глубине 5 см, поскольку такое изменение температуры достаточно для генерации сигнала давления с амплитудой, в 10 раз превышающей уровень шума [831, 832, 838].

На рис. 4.4 и 4.5 представлены два типа ОАТ/ФАТ, работающие в режиме пропускания и в режиме отражения. Первый из них может применяться для диагностики рака молочной железы, а второй — для обнаружения рака кожи. Матрица из волоконно-оптических жгутов доставляет энергию ближнего ИК-излучения импульсного Nd:YAG-лазера на поверхность груди (см. рис. 4.4а) [832, 838]. Матрица из пьезоэлектрических приемников считывает временные профили индуцированных лазером акустических волн. Электронная система оцифровывает профили зарегистрированных сигналов, усиливает, фильтрует и передает на компьютер для дальнейшей обработки данных и реконструкции изображения. В качестве примеров на рис. 4.4б и 4.4в показаны профили давления, записанные для однородного фантома биоткани на основе Интралипида [887] и фантома молочной железы (рассеивающий коллагеновый гель с «опухолью» в виде 2-мм сферы из геля, окрашенного гемоглобином) [832, 838]. Биполярный сигнал, приходящий с глубины около 5 см, представляет 2-мм сферическую «опухоль». Наклон общего профиля давления обусловлен экспоненциальным уменьшением лазерной энергии, поглощенной средой фантома. Нормированный и отфильтрованный выходной сигнал свободен от высокочастотных шумов и других искажений и может быть использован для реконструкции изображения. Реконструированные трехмерные изображения можно получить после записи как минимум двух матриц сигналов, измеренных под углом 90 град по отношению друг к другу.

Отражательная ОАТ/ФАТ-система содержит волоконно-оптическую систему доставки света с одним пьезоэлектрическим датчиком и сконструирована так, что акустическую волну можно регистрировать в месте лазерного облучения (см. рис. 4.5а) [831, 832, 838]. Особенностью этой системы получения изображений является ее высокое пространственное разрешение (до нескольких микрометров), поэтому ширина полосы акустического приемника должна быть как можно большей (около 300 МГц в данном случае). Соответственно, длина волны лазера и длительность импульса должны быть выбраны таким образом, чтобы профили давления получались

с максимальным контрастом на границах слоев биоткани. На рис. 4.5 б показаны профили сигналов переменного давления по оси z , полученные на мыши *in vivo*. Одна молочная железа мыши имела опухоль (карциному протока), локализованную под кожей, диаметром около 5–6 мм и толщиной около 0,5 мм (гистологическое исследование было проведено после завершения экспериментов). Опухоль была окружена сферической областью усиленного кровообращения. Две поверхности опухоли — передняя и задняя, изображаются как два максимума ОА/ФА-сигнала на аксиальном профиле. Для получения трехмерных изображений нужно сканировать ОА/ФА-рефлектометр по области, представляющей диагностический интерес. В литературе описаны разнообразные ОА/ФА-томографические и микроскопические системы [834, 837, 839, 843, 846, 848–860, 890, 891, 893–898, 904–946], включая эндоскопические [947–952].

Одна из схем ОА/ФА-маммографа, разработанного в университете Твенте (Нидерланды), представлена на рис. 4.6 [932, 933]. На рис. 4.7 (цветная вклейка) показаны ОА/ФА-послойные изображения (рис. 4.7 в) правой груди 57-летней женщины с инвазивной карциномой протоков с нейроэндокринной дифференциацией, полученные с помощью этого ОА/ФА-маммографа. Для сравнения показаны также рентгеновская маммограмма (рис. 4.7 а) и изображение, полученное при ультразвуковом исследовании (рис. 4.7 б). Представленный на этих изображениях общий вид опухоли указывает на ее доброкачественность. ОА/ФА-послойные изображения (рис. 4.7 в) показывают, что наиболее интенсивный ОА/ФА-сигнал распределен в форме кольца. Такое распределение можно отнести к сильному поглощению за счет высокой плотности сосудов на периферии опухоли. Расстояние между соседними слоями изображения составляет 1 мм, при этом первый слой отстоит на 9,5 мм вниз от освещаемой поверхности груди.

Фотоакустическая микроскопия (ФАМ) темного поля с ультразвуковым разрешением была предложена для минимизации помех из-за сильного ФА-сигнала, генерируемого поверхностными структурами биоткани при ее освещении прямым лазерным пучком [6, 891, 897]. Однако главное ограничение ФАМ темного поля связано с низкой освещенностью объекта. Напротив, для ФАМ с оптическим разрешением (ОР-ФАМ) (см. рис. 4.8), которая использует дифракционно ограниченные сфокусированные лазерные пучки, значительное рассеяние и поглощение света в биологических тканях ограничивает проникновение излучения в биоткань примерно в пределах одной оптической транспортной длины свободного пробега, $l_{tr} \sim 1$ мм. В этом смысле ОР-ФАМ базируется на режимах с большой долей баллистических и квазibalлистических фотонов, для которых наличие сигналов от поверхности не так критично. Поэтому ОР-ФАМ-метод позволяет использовать коммерческие микроскопы светлого поля, обеспечивающие дифракционно ограниченную фокусировку оптического излучения.

Как показано на рис. 4.8 а, в качестве источника возбуждения ОР-ФАМ используется лазер на красителе с накачкой от Nd:YLF-лазера [897]. Длительность лазерного импульса составляет 7 нс, а частота повторения импульсов, управляемая внешним триггером, может достигать 5 кГц. Пучок света от лазера на красителе предварительно ослабляется перед прохождением через пространственный фильтр (ПФ) (диафрагма диаметром 25 мкм), а затем фокусируется объективом RMS4X Thorlabs с числовой апертурой $NA = 0,1$, эффективным фокусным расстоянием 45 мм и рабочим расстоянием 18,5 мм. Расстояние между ПФ и линзой объектива составляет примерно 400 мм. Оптический светоделитель, расположенный между ПФ и линзой объектива, позволяет регулировать фокус и настраивать оптическую систему через окуляр. Две прямоугольные призмы образуют кубик с зазором 0,1 мм между ними. Этот зазор заполняется силиконовым маслом, которое имеет показа-

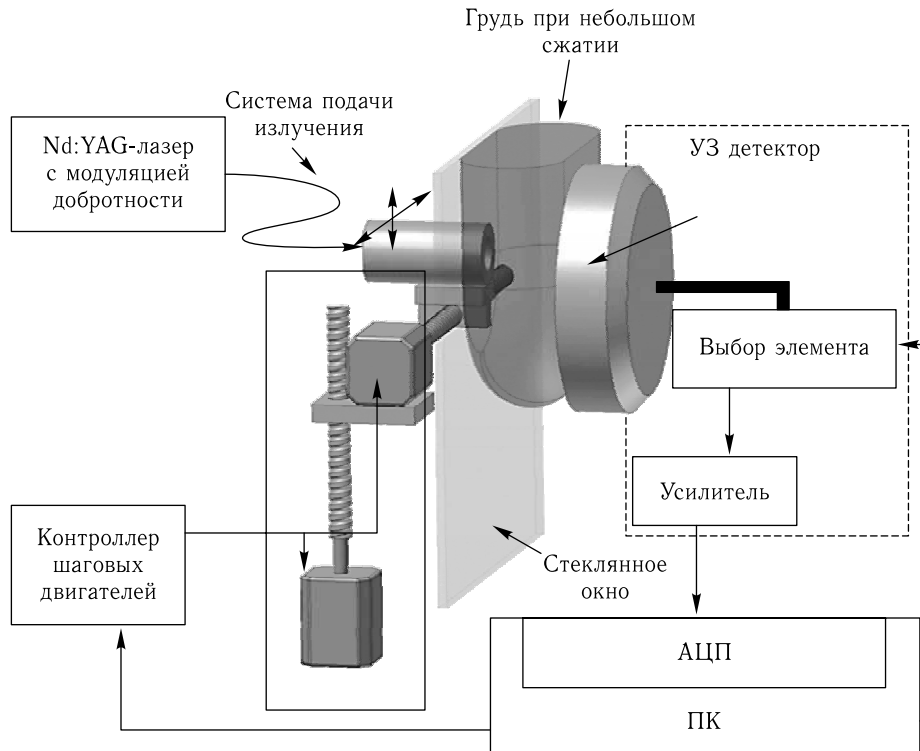


Рис. 4.6. Схематическое представление ОА/ФА-маммографа [932]

тель преломления, близкий к показателю преломления стекла (соответственно 1,4 и 1,5), но имеет существенно меньший акустический импеданс по сравнению со стеклом (соответственно $0,95 \cdot 10^6 \text{ Н} \cdot \text{с}/\text{м}^3$ и $12,1 \cdot 10^6 \text{ Н} \cdot \text{с}/\text{м}^3$). Таким образом, слой силиконового масла оптически прозрачен, но обладает акустическим отражением и действует как делитель оптических и акустических пучков. Ультразвуковой преобразователь (V2022-BC, Olympus-NDT) с центральной частотой 75 МГц, полосой пропускания 80 % и активным элементом диаметром 6,4 мм крепится к вертикальной части нижней призмы. Плоско-вогнутая линза с 5,2-мм радиусом кривизны и 6,4-мм апертурой крепится к нижней части кубика и служит акустической линзой (NA равно 0,46 в воде, а диаметр фокуса 27 мкм). Поскольку эта линза также функционирует как отрицательная оптическая линза, то ее действие на оптический пучок компенсируется положительной оптической линзой, размещенной в верхней части кубика. Линза с высокой акустической числовой апертурой погружена в резервуар с водой. Окошко в нижней части емкости для воды закрыто пластинкой из оптически и акустически прозрачного полиэтилена. Подопытное животное располагается под резервуаром с водой так, чтобы исследуемая область была непосредственно под прозрачным окном. Ультразвуковой гель (Clear Image, SonoTech) накладывается на исследуемую область для обеспечения акустической связи.

ФА-сигнал, регистрируемый ультразвуковым преобразователем, сначала усиливается на 48 дБ с помощью двух последовательных усилителей ZFL 500LN (Mini-Circuits), а затем оцифровывается с помощью 14-битной цифровой платы сбора данных CompuScore 14200 (Gage Applied Sciences). Двумерное (2D) растровое сканирование ($x-y$) в сочетании с разрешенным во времени ультразвуковым сигналом

дает 3D-информацию. 2D-сканер управляется с помощью отдельного компьютера, который также запускает компьютер для сбора данных и лазер накачки. Сигнал запуска синхронизирован с генератором тактовой частоты платы сбора данных. Для простоты растровое сканирование осуществляется перемещением вместе резервуара с водой и животного в горизонтальной плоскости ($x-y$). Одномерный ФА-сигнал (А-скан) для каждой горизонтальной точки регистрируется в течение 1 мкс при частоте дискретизации 200 МС/с.

Изображение, полученное с помощью ОР-ФАМ, формируется путем объединения различных А-сканов для ФА-сигнала с разрешением во времени, которое может быть представлено как 3D-изображение, или 2D-изображение поперечного сечения (В-скан), или изображение проекции максимальной амплитуды сигнала.

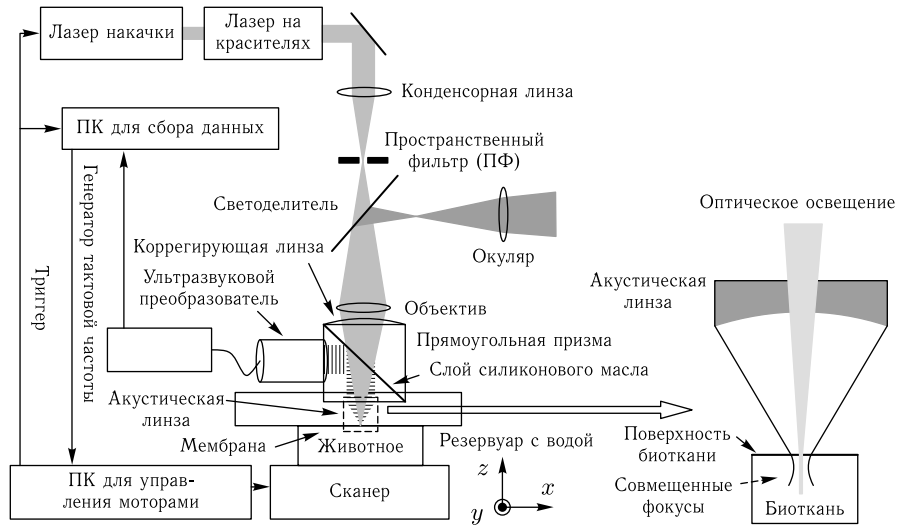


Рис. 4.8. Схематическое представление фотоакустического микроскопа (ФАМ) светлого поля — ФАМ с оптическим разрешением (ОР-ФАМ) (а) и увеличенный фрагмент схемы, демонстрирующий, как организовано освещение биоткани сфокусированным лазерным пучком с фокусом, совмещенным с фокусом конфокальной приемной акустической системы (б) [897]

Благодаря использованию в ОР-ФАМ перестраиваемого лазера на красителе оказывается возможным проводить спектральные измерения, что важно для визуализации сосудистой системы и количественной оценки относительной концентрации оксигемоглобина (HbO_2) и дезоксигемоглобина (HbR) в отдельных микрососудах, поскольку спектр поглощения гемоглобина зависит от степени его оксигенации. При условии, что в видимой области спектра HbR и HbO_2 являются двумя доминирующими поглотителями в крови, коэффициент поглощения крови может быть рассчитан по формуле [939]

$$\mu_a(\lambda_i) = \varepsilon_{\text{HbR}}(\lambda_i) \cdot [\text{HbR}] + \varepsilon_{\text{HbO}_2}(\lambda_i) \cdot [\text{HbO}_2], \quad (4.31)$$

где $\mu_a(\lambda_i)$ — коэффициент поглощения крови на длине волны λ_i ; $\varepsilon_{\text{HbR}}(\lambda_i)$ и $\varepsilon_{\text{HbO}_2}(\lambda_i)$ — коэффициенты молярной экстинкции, а $[\text{HbR}]$ и $[\text{HbO}_2]$ — концентрации HbR и HbO_2 соответственно.

Кроме того, коэффициент поглощения $\mu_a(\lambda_i)$ может быть определен из ФА-измерений, поскольку ФА-сигнал $p(\lambda_i, x, y, z)$ пропорционален произведению $\mu_a(\lambda_i)$ и локальной плотности оптической энергии $E(\lambda_i, x, y, z)$ (см. (4.22)). Предполагая, что плотность оптической энергии не зависит от длины волны, в уравнении (4.31) $\mu_a(\lambda_i)$ можно заменить на $p(\lambda_i, x, y, z)$ и рассчитать $[\text{HbR}]$ и $[\text{HbO}_2]$ в относительных единицах. Поскольку $\varepsilon_{\text{HbR}}(\lambda_i)$ и $\varepsilon_{\text{HbO}_2}(\lambda_i)$ хорошо известны [953], то достаточны измерения только на двух длинах волн, чтобы определить концентрации $[\text{HbR}]$ и $[\text{HbO}_2]$. Тем не менее, измерения для большего количества длин волн позволяют повысить точность измерений. На основании измеренных концентраций $[\text{HbR}]$ и $[\text{HbO}_2]$ можно рассчитать степень насыщения крови кислородом $s\text{O}_2$:

$$s\text{O}_2 = \frac{[\text{HbO}_2]}{[\text{HbR}] + [\text{HbO}_2]}. \quad (4.32)$$

Для демонстрации возможности определения и визуализации в сосудах $s\text{O}_2$ *in vivo* бестимусная безволосая мышь (Hsd: Athymic Nude-Foxn1^{NU}, Harlan Co.; масса тела ~ 20 г) снабжалась чистым кислородом, а также были обеспечены измерения на двух длинах волн: 586 нм (изобестическая точка — одинаковое поглощение окси- и дезоксигемоглобина) и 606 нм (доминирующее поглощение дезоксигемоглобина). На рис. 4.9 (цветная вклейка) представлено изображение микрососудистой сети уха мыши в виде псевдоцветов от синего до красного, отображающих степень насыщения крови кислородом $s\text{O}_2$. При этом амплитуда ФА-сигнала, измеренная для изобестической точки, показана в виде яркости пикселей. В этом случае ОР-ФАМ позволяет получить картины пространственного распределения $s\text{O}_2$, в том числе выявить поведение степени оксигенации при переходе от артерий к венам. Как правило, $s\text{O}_2$ монотонно уменьшается с уменьшением диаметра сосуда в прекапиллярной артерии. Для артериол, обозначенных на рис. 4.9 как a1–a3, значения $s\text{O}_2$ равны $0,97 \pm 0,01$, $0,92 \pm 0,01$ и $0,91 \pm 0,01$ соответственно для сосудов диаметром > 20 мкм, $10\text{--}20$ мкм и < 10 мкм. Затем $s\text{O}_2$ продолжает снижаться с увеличением диаметра сосуда в посткапиллярных венулах. Для венул, обозначенных на рис. 4.9 как v3–v1, значения $s\text{O}_2$ равны $0,85 \pm 0,01$, $0,82 \pm 0,01$ и $0,73 \pm 0,02$, соответственно для сосудов диаметром < 10 мкм, $30\text{--}40$ мкм и > 50 мкм. Следует отметить, что измеренные величины $s\text{O}_2$ несколько выше значений в норме, так как подопытные животные находились под системной гипероксией.

Итак, многоспектральная оптоакустическая томография (МСОАТ) позволяет получать изображения биотканей, дающие информацию о функциональных состояниях этой ткани на молекулярном уровне. В рамках МСОАТ получают изображения для нескольких длин волн возбуждения и в результате спектральной обработки изображения находят биораспределение различных эндогенных молекул по их специфическим спектрам.

Другим примером приложения МСОАТ является ее использование для контрастирования экзогенных красителей [922, 923, 940–942]. Часто необходимость дополнительного контрастирования за счет введения экзогенных красителей является принципиально важной, например при диагностике заболеваний, когда поглощение естественных хромофоров оказывается недостаточным или их поглощение лежит вдали от окна прозрачности биоткани, или многие хромофоры имеют сильно перекрывающиеся линии поглощения. С технической точки зрения для успешной реализации МСОАТ необходимо использовать контрастирующие вещества с высоким поглощением в ближней ИК-области и с узкими линиями поглощения. Кроме того, важна скорость распространения агента по организму и время его задержки в отдельных тканях и органах. Все эти параметры определяют качество полученных изображений, динамический характер диагностики и токсичность препарата. Идеальным с этих

точек зрения является краситель индоцианиновый зеленый (ИЦЗ) [954]. На рис. 4.10 (цветная вклейка) представлены динамические *in vivo* МСОАТ-изображения ИЦЗ, транспортируемого в почки мыши [924, 955]. На ОА-«срезах» в области почек хорошо видны структуры биоткани — полая и воротная вены, обе почки и позвоночник, что соответствует изображениям криосрезов ткани в этой области. На избранных изображениях ОА-«срезах», полученных для одиночных лазерных импульсов на одной длине волны 800 нм, близкой к максимуму поглощения ИЦЗ, хорошо видно повышение контраста изображений по мере поступления красителя (рис. 4.10 в). Представление изображений в виде дифференциального контраста еще больше выделяет контрастирующее действие ИЦЗ (рис. 4.10 г). Суммарная карта, представляющая распределение ИЦЗ в одном и том же животном, полученная методом спектрального разделения после регистрации изображений на нескольких длинах волн (750, 770, 790, 810, 830, 850, 870, 890 и 910 нм) (рис. 4.10 д), хорошо согласуется с областями повышенного контраста для изображений на рис. 4.10 г [924, 955].

4.6. Оптотермическая радиометрия

Импульсный лазерный нагрев биоткани вызывает изменение температуры и соответствующую модуляцию ее теплового (инфракрасного) излучения. Это составляет основу импульсной оптотермической/фототермической радиометрии (ОТР/ФТР) [153, 826–828, 864–874, 886, 956–959]. Максимум интенсивности теплового излучения живых объектов попадает в область длин волн вблизи 10 мкм. Детальный анализ формирования ОТР/ФТР-сигнала требует знания распределения температуры внутри образца, температуропроводности биоткани, ее коэффициентов поглощения на длинах волн возбуждения μ_a и испускания μ'_a (~ 10 мкм). В то же время, знание некоторых параметров, упомянутых выше, позволяет использовать измеренный сигнал ОТР/ФТР для реконструкции, например, распределения по глубине величины коэффициента поглощения μ_a [864, 870].

Характерное время теплового отклика биообъекта определяется его размером R_0 (для цилиндрической формы — радиусом) и температуропроводностью материала a_T (см. уравнения (4.10) и (4.13)):

$$\tau_T \sim \frac{(R_0)^2}{a_T}. \quad (4.33)$$

Экспериментальные значения температуропроводности a_T некоторых биотканей человека представлены в табл. 4.1. Для многих мягких биотканей эти значения лежат в достаточно узких пределах, определяемых температуропроводностью компонентов биоткани: гидратированный коллаген типа I (50% воды), $1,03 \cdot 10^{-7}$ м²/с и чистая вода, $1,46 \cdot 10^{-7}$ м²/с [867, 868]. Поэтому характерное время термического отклика для различных органов обусловлено, главным образом, их размерами и может быть оценено как 10^{-3} с для клетки, $3 \cdot 10^{-2}$ с для малого кровеносного сосуда, 10^2 с для пальца и более чем 10^4 с для цельной руки.

Для длительности лазерного импульса, много меньшей времени тепловой релаксации образца τ_T , нормированный к энергетической экспозиции и начальной температуре (нормированная температура поверхности) сигнал ОТР/ФТР, наведенный в однородном, поглощающем и рассеивающем, образце определяется следующими выражениями, выведенными, соответственно, из закона Бугера–Ламберта–Бера и диффузионного приближения [870]:

$$S_r(t) = \frac{\delta}{1 - \delta^2} [\exp(\delta^2 at) \operatorname{erfc}(\delta\sqrt{at}) - \delta \exp(at) \operatorname{erfc}(\sqrt{at})], \quad (4.34)$$

Таблица 4.1
Экспериментальные значения коэффициента температуропроводности a_T биологических тканей человека [2]

Биоткань	a_T , $10^{-7} \text{ м}^2/\text{с}$	Примечания
Мышца, подмышка	0,60	<i>In vivo</i> ; 0,45 мм
	1,00	<i>In vivo</i> ; 0,90 мм
	1,30	<i>In vivo</i> ; 0,90 мм
Мышца, бедро	0,545	<i>In vivo</i> ; 0–1 мм
	0,963	<i>In vivo</i> ; 1–2 мм
Кожа	0,4–1,6	<i>In vivo</i>
	0,82–1,2	<i>In vitro</i> , от комнатной температуры до температуры тела
Почка	1,32	<i>In vitro</i> , 5 °С, 84 % воды
Сердце	1,48	<i>In vitro</i> , 5 °С, 81 % воды
Селезенка	1,38	<i>In vitro</i> , 5 °С, 80 % воды
Печень	1,50	<i>In vitro</i> , 5 °С, 77 % воды
Мозг	0,44–1,4	<i>In vitro</i> , от комнатной температуры до температуры тела
Мозг, белое вещество	1,35	<i>In vitro</i> , 5 °С, 71 % воды
Мозг, серое вещество	1,43	<i>In vitro</i> , 5 °С, 83 % воды
Мозг, цельный	1,37	<i>In vitro</i> , 5 °С, 78 % воды
Кровь, гемолизованная Кровь, плазма	1,19	Измерения мощности, использовалась тепловая модель
	1,21	
Зубы	4,09	—

$$S_r(t) = \delta \left\{ \frac{A}{1 - \delta_d^2} [\exp(\delta_d^2 \alpha t) \operatorname{erfc}(\delta_d \sqrt{\alpha t}) - \delta_d \exp(\alpha t) \operatorname{erfc}(\sqrt{\alpha t})] + \frac{B}{1 - \delta_t^2} [\exp(\delta_t^2 \alpha t) \operatorname{erfc}(\delta_t \sqrt{\alpha t}) - \delta_t \exp(\alpha t) \operatorname{erfc}(\sqrt{\alpha t})] \right\}. \quad (4.35)$$

Здесь $\delta = \mu_a / \mu'_a$, $\alpha = (\mu'_a)^2 a_T$, $\delta_d = \mu_d / \mu'_a$, $\delta_t = (\mu_a + \mu'_s) / \mu'_a$,

$$\operatorname{erfc}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-\xi^2} d\xi$$

— дополнительная функция ошибок, A и B определены в диффузионной теории. Соответствующие распределения температуры в однородных и слоистых образцах приведены в работе [870].

Поверхностный радиометрический сигнал $S_r(t)$ в некоторый момент времени t есть сумма вкладов со всех глубин в биоткани в этот момент t . Излучение с больших глубин ослабляется из-за поглощения инфракрасного излучения в образце до того, как оно достигнет приемника. Поскольку начальная температура поверхности известна, распределение температуры по глубине образца можно извлечь из измерений $S_r(t)$. Обратный ОТР/ФТР-метод, осуществляющий преобразование температуры поверхности как функции времени в распределение температуры по глубине, описан в работе [870].

На рис. 4.11 показаны результаты ОТР/ФТР-экспериментов, выполненных на коже с использованием импульсного лазера на красителе с длиной волны 577 нм и длительностью импульса 1 мс [870]. Радиометрические сигналы регистрировали от здоровых на вид участков кожи запястья белокожего добровольца, а также от области на запястье, занятой капиллярной гемангиомой. Энергия лазерного импульса поддерживалась равной 100 мДж на площади около 20 мм². Инфракрасный тепловой сигнал от освещаемой области регистрировался HgCdTe-фотоприемником, имеющим чувствительную площадку в 1 мм² в спектральном диапазоне от 8 до 12 мкм. Сигнал приемника через согласующий усилитель с частотным диапазоном от 0 до 1,5 МГц поступал на цифровой осциллограф, где и записывался. Время дискретизации составляло от 10 до 50 мкс на одно измеренное значение, после каждого лазерного импульса накапливалось 10000 значений измеренных данных. Чувствительность приемника составляла около 50 мВ/°С. Для снижения шума производилось усреднение по 20 импульсам.

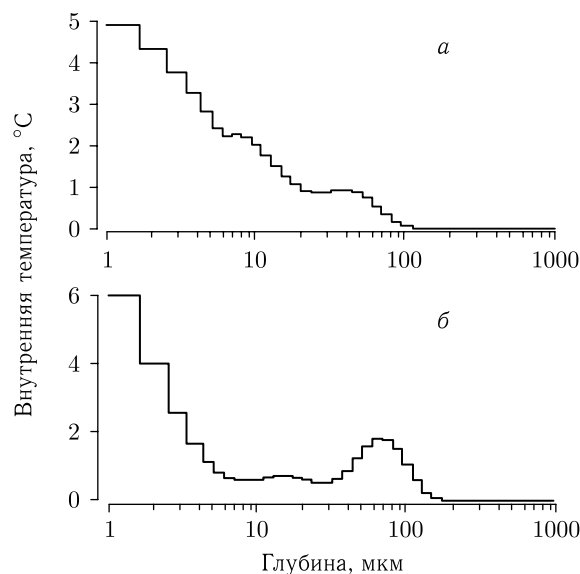


Рис. 4.11. ОТР/ФТР-профилирование кожи по глубине [870]. Графики показывают распределение температуры для здорового участка кожи (а) и пещеристой гемангиомы (б). Виден пик температуры на глубине 80 мкм, отражающий присутствие подповерхностного поглотителя

Рассчитанные распределения внутренней температуры для здоровых участков запястья и капиллярной гемангиомы показаны на рис. 4.11 а и 4.11 б. На глубине близки 80 мкм имеется заметный пик температурного профиля, свидетельствующий о присутствии поглотителя под поверхностью. Ограничение возможностей этого

метода связано с тем, что профили поглощения можно снимать только до глубины 500 мкм из-за слишком сильного затухания сигнала. К счастью, наиболее интересные структуры кожи находятся от ее поверхности до глубины примерно в 600 мкм.

С одной стороны, неопределенность в определении положения внутренних температурных слоев увеличивается с глубиной залегания слоя и, теоретически, чем выше расположена поглощающая неоднородность, тем точнее ее локализация [870]. Однако из-за близости или перекрытия сосудов гемангиомы с меланиновым слоем эпидермиса, который также дает сильное поглощение и, соответственно, сильный тепловой отклик, одноволновый импульсный метод ОТР применим для точного определения глубины залегания капиллярной гемангиомы только в том случае, если кровеносные сосуды находятся глубже 100 мкм [871]. Когда кровеносные сосуды находятся близко к слою эпидермального меланина или перекрываются с ним, для определения глубины локализации гемангиомы следует пользоваться двухволновым методом (585 и 600 нм). Теоретически и экспериментально при измерениях *in vivo* было показано, что двухволновый метод применим для диагностики разнообразных капиллярных гемангиом, имеющих различия в объеме крови, размерах кровеносных сосудов и их распределении по глубине [871, 872]. Это обусловлено использованием прямого разностного подхода, в котором глубина залегания сосуда определяется из взвешенной разности температурных профилей, независимо реконструированных по двум измерениям на разных длинах волн.

При помощи импульсной ОТР/ФТР-визуализации в сочетании с последующим многомерным анализом данных была показана возможность получения морфологической информации из упрощенной двумерной модели кровеносного сосуда [886].

Импульсный ОТР/ФТР-метод имеет хорошие перспективы в исследовании оптических и тепловых свойств биотканей *in vitro* и *in vivo* [863–870]. Например, последовательности (пары) инфракрасных эмиссионных изображений, зарегистрированных после импульсного лазерного облучения, были использованы для определения температуропроводности биоматериала с высокой точностью [868]. В результате была определена средняя температуропроводность пленочной структуры гидратированного (50 % воды) коллагена типа I (модельный фантом кожи) при комнатной температуре (22 °C), полученная из 60 пар записанных инфракрасных эмиссионных изображений, которая оказалась равной $a_T = (1,03 \pm 0,07) \cdot 10^{-7} \text{ м}^2/\text{с}$ (ср. табл. 4.1).

ОТР/ФТР-метод с временным разрешением использовался для определения коэффициентов поглощения зубной эмали и дентина на длинах волн 2,79; 2,94; 9,6 и 10,6 мкм [827]. Эти данные приведены в табл. 7.1. Знание коэффициентов поглощения на этих длинах волн принципиально важно для разработки эффективных технологий абляции твердой зубной ткани с использованием эрбиевых [Er:YSGG (2,79 мкм) и Er:YAG (2,94 мкм)] и CO₂ (9,6 и 10,6 мкм) лазеров. С другой стороны, метод ОТР может быть использован и в диагностических целях. Например, при зондировании зубной ткани лазерным излучением видимой и ближней ИК-области спектра можно обеспечить профилометрию ткани с целью выявления скрытых кариозных полостей или осуществить мониторинг процесса абляции твердых тканей зуба при лечении кариеса.

В частотном ОТР/ФТР-методе модулированное по интенсивности на определенной частоте лазерное излучение используется для получения частотно-зависимых ОТР/ФТР- (ЧЗ-ОТР/ФТР-) сигналов от поглощающих ИК-свет дефектов биоткани [873, 874, 956–959] (рис. 4.12 и 4.13). Важность этого метода для стоматологии обусловлена его потенциальными возможностями при выявлении поражений зубной ткани на ранних стадиях развития кариеса, когда требуется высокое пространственное разрешение, порядка размеров трещин и небольших лунок, и глубина зондирования внутрь твердой ткани порядка 100–300 мкм. ЧЗ-ОТР/ФТР обладает гораздо

более высоким отношением сигнал–шум, чем его импульсный аналог, и фиксированной глубиной зондирования для одной частоты модуляции. Для формирования изображения либо источник, либо приемник должен быть локализован. Фототермическая визуализация обычно реализуется в виде сканирующей микроскопии с локализованным источником. Модуляция температуры дает возможность тепловой энергии диффузно достигать поверхности с глубины, примерно равной тепловой длине, описываемой выражением (4.15). Рассеивающие частицы, находящиеся в пределах долей тепловой длины от источника, в основном определяют контраст радиометрических изображений. При изменении тепловой длины, например путем перестройки частоты модуляции лазерного пучка, область образца, дающая вклад в изображение, также меняется, а именно уменьшается с ростом частоты.

Комбинация методов ЧЗ-ОТР/ФТР и ЧЗ-ЛЮМ (люминесцентного) в качестве средства быстрой диагностики обеспечивает количественное определение глубоких трещин эмали, дентина и подповерхностных слоев зубов человека с высоким пространственным разрешением, а также степени деминерализации и кариеса [873, 874, 956–959]. Для частот модуляции лазерного излучения в диапазоне от 10 Гц до 10 кГц было обнаружено, что ОТР/ФТР-изображения дополнены по отношению к ЛЮМ-изображениям, что является следствием дополняющей природы безызлучательных (тепловых) и радиационных (люминесцентных) процессов распада возбужденных состояний, ответственных за генерацию ОТР/ФТР- и ЛЮМ-сигналов соответственно. Измерения производились на длинах волн 488, 659, и 830 нм.

Схематически ЧЗ-ФТР-ЛЮМ-метод представлен на рис. 4.12а. Когда модулированное по интенсивности лазерное излучение падает на поверхность зуба, то свет преобразуется в тепло (изменение температуры < 1 °С), которое движется в глубь ткани в виде волны тепловой энергии и генерирует ФТР-сигнал. Этот же свет возбуждает модулированную по интенсивности флуоресценцию (люминесценцию) на больших, чем длина волны лазера, длинах волн. Эта волна интенсивности люминесценции (ЛЮМ) исходит от приповерхностных структур зубной ткани и определяется оптическими характеристиками ткани. Изменения в микроструктуре зуба, например из-за кариеса, вызывают соответствующие изменения оптических и тепловых свойств зубной ткани и, как следствие, частотно-зависимых ФТР-ЛЮМ-откликов. Амплитуды и фазы этих откликов различны для здоровой, деминерализованной и кариозной эмали.

На рис. 4.12б представлена экспериментальная установка, реализующая ЧЗ-ФТР-ЛЮМ-метод [956]. Полупроводниковый лазер на длине волны 659 нм с выходной мощностью 130 мВт и размером пучка $\sim 5,6$ мм используется в качестве источника света. Модуляция интенсивности лазера через источник его питания осуществляется от внутреннего генератора синхронного усилителя, используемого в цепи детектирования сигнала. Интенсивность излучения лазера модулируется по гармоническому закону. Исходящий от зуба переменный инфракрасный ФТР-сигнал собирается с помощью параболического зеркала с родиевым покрытием и передается на HgCdTe-детектор, спектральный диапазон которого при температурах жидкого азота составляет 2–12 мкм с пиковой обнаружительной способностью $\sim 5 \cdot 10^{10}$ см \cdot Гц $^{1/2}$ \cdot Вт $^{-1}$. Его активная площадка равна 1 мм 2 . ФТР-сигнал предварительно усиливается и затем поступает на синхронный усилитель, и далее на компьютер. Модулированный по интенсивности сигнал флуоресценции (люминесценции) от зуба поступает через отрезающий оптический фильтр (715 нм) на кремниевый фотодиод. Фильтр из цветного стекла блокирует лазерное излучение, отраженное и рассеянное от зуба. Для контроля модулированного сигнала люминесценции используется второй синхронный усилитель. Оба синхронных усилителя управляются от компьютера.

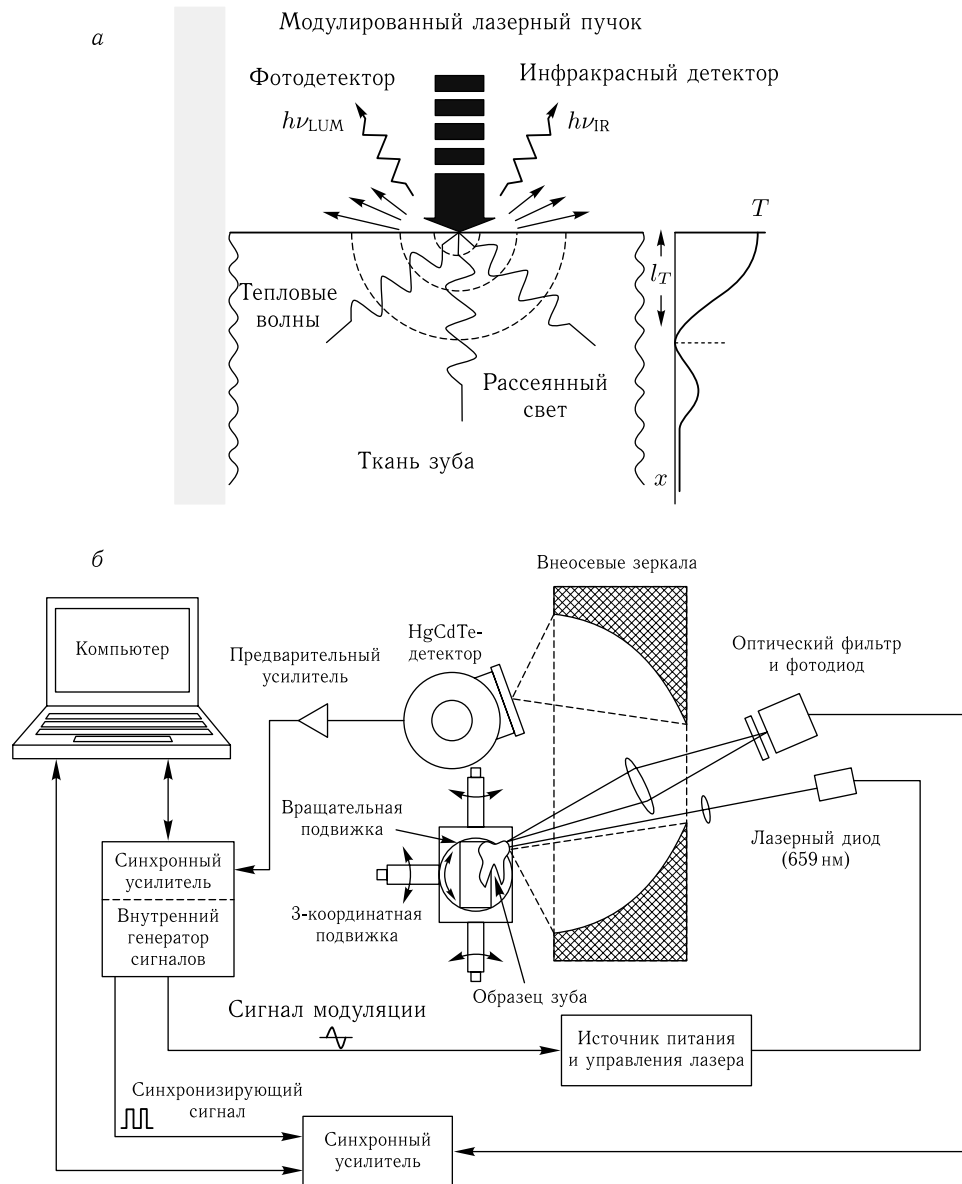


Рис. 4.12. Схематическое представление ЧЗ-ФТР-ЛЮМ метода (а), l_T — тепловая длина; и вид экспериментальной установки для комбинированного мониторинга состояния тканей зуба (б) [956]

В работе [956] с использованием описанной установки исследовалась эффективность ЧЗ-ФТР-ЛЮМ-метода для мониторинга и количественной оценки кариеса зубов. Искусственный кариес создавался в извлеченных молярах человека ($n = 15$) с использованием подкисленного геля (рН 4,5), который применялся в течение 10 или 40 дней. ФТР-ЛЮМ-сигналы до деминерализации ткани и во время ее деминерализации измерялись при сканировании частоты модуляции в пределах

1 Гц–1 кГц. В качестве «золотого стандарта» определения степени деминерализации материала использовали поперечный микрорадиографический анализ, который позволял делать надежное заключение о потере минеральной составляющей биоткани и глубине залегания искусственно деминерализованных поражений. Для обработки ФТР экспериментальных данных по получению зависящих от времени изменений теплофизических параметров в процессе деминерализации использовалась соответствующая теоретическая модель. Рост деминерализации сопровождался увеличением рассеивающих свойств и ухудшением теплопроводности. Увеличение коэффициента рассеяния света проявлялось в уменьшении сигнала люминесценции за счет увеличенного рассеяния как падающего, так и конвертируемого излучения. Зависимости амплитуды и фазы ФТР- и ЛЮМ-сигналов от частоты модуляции для образца зуба до и после 5- или 10-дневной деминерализации представлены на рис. 4.13. Там же даны результаты денситометрии соответствующих микрорадиографических изображений эмали зуба, которые позволяют визуализировать область поражения и количественно определить потери минеральной составляющей биоткани. Таким образом, была продемонстрирована достаточно высокая чувствительность ЧЗ-ФТР-ЛЮМ-метода к изменению степени минерализации биоткани, которая обусловлена соответствующими изменениями оптико-теплофизических свойств ткани, что открывает возможность эффективной ранней диагностики кариеса [958, 959].

4.7. Оптотермическая спектроскопия и визуализация

Метод отклонения пробного лазерного пучка, основанный на определении термически индуцированного градиента показателя преломления внутри образца (см. уравнение (4.7)), описан в работе [875]. По измерениям отклонения пучка пробного He:Ne-лазера и оценкам изменения показателя преломления установлено, что пучок от диодного лазера (1480 нм) перегревает воду до ~ 200 °С. Найдена зависимость профиля температуры внутри пучка диодного лазера и вокруг него от длительности и мощности лазерного импульса. Определен оптимальный (безопасный) режим рассеяния оболочки *zona pellucid* преэмбриона сфокусированным лазерным пучком (1480 нм), а именно, длительность импульса ≤ 5 мс при мощности лазера ~ 100 мВт.

Как и в обычной абсорбционной спектроскопии, основной информацией, получаемой с помощью лазерной оптотермической (ОТ) (или фототермической, ФТ) спектроскопии, является зависимость коэффициента поглощения от длины волны $\mu_a(\lambda)$. Однако существенная разница заключается в том, что, в отличие от абсорбционной спектроскопии, где для измерения малых величин поглощения требуются большие длины пути света в исследуемом материале, поскольку интенсивность прошедшего света определяется произведением $\mu_a(\lambda) \cdot l$, где l длина образца, в ФТ-спектроскопии регистрируется сигнал, прямо пропорциональный коэффициенту поглощения $\mu_a(\lambda)$, аналогично как и в ФА-спектроскопии (см. формулы (4.2), (4.6)–(4.8)). Например, в обычной абсорбционной спектроскопии для измерения поглощения на длине оптического пути в 300 нм (типичный размер вытянутой митохондрии) при точности измерения интенсивности света порядка 0,5 %, минимальный регистрируемый коэффициент поглощения $(\mu_a)_{\min} \approx 1,5 \cdot 10^2 \text{ см}^{-1}$ [25]. Такая чувствительность недостаточна для изучения клеточных структур, которые обычно имеют существенно более низкий коэффициент поглощения.

ФТ-спектроскопия на основе перестраиваемых лазерных источников обеспечивает чувствительность к поглощению по меньшей мере на четыре–пять порядков выше, чем обычная абсорбционная спектроскопия, и тем самым — возможность измерения локальных спектров поглощения субклеточных структур с разрешением 0,1–1 нм [5, 6, 25, 826–828]. В частности, ФТ-спектральное определение только трех основных

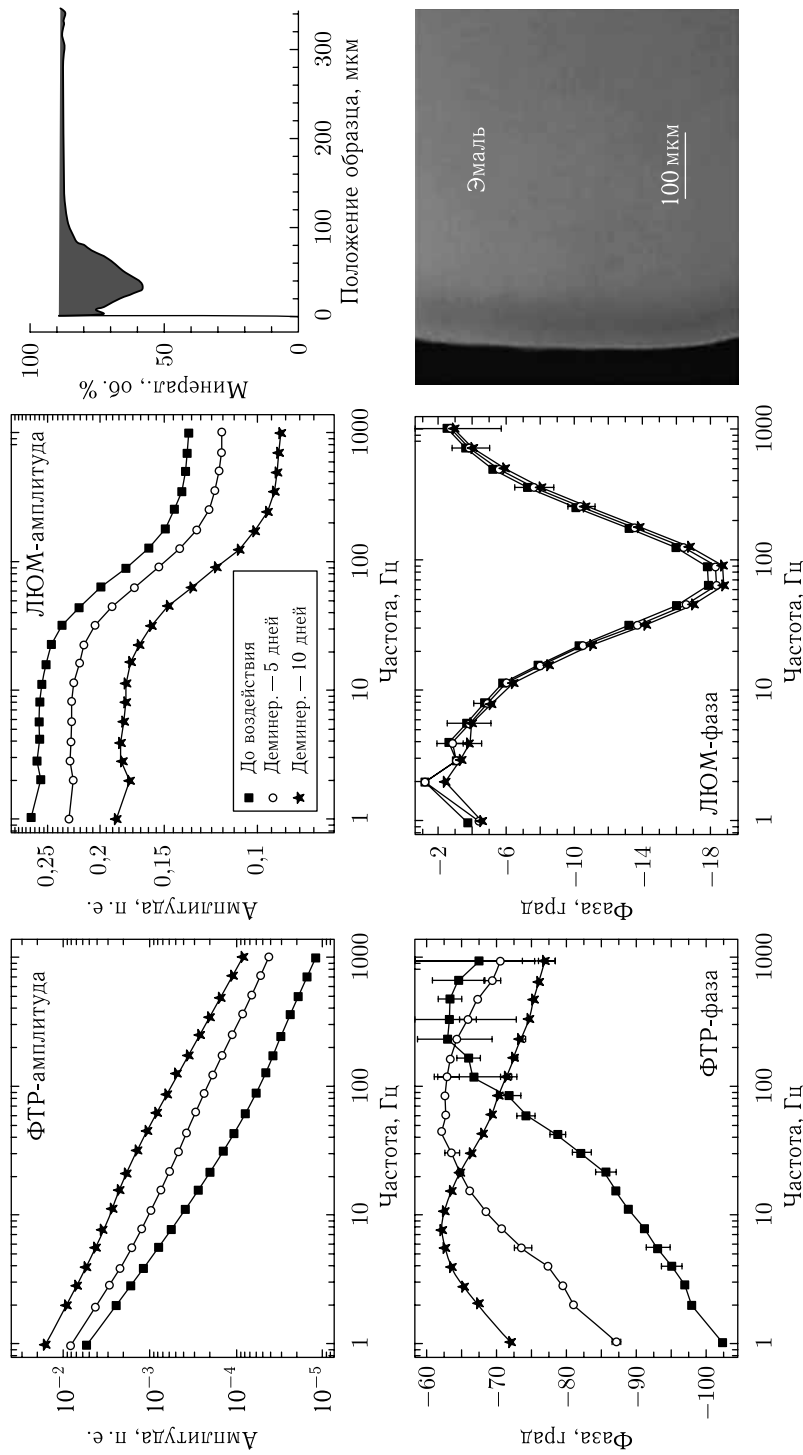


Рис. 4.13. Зависимости амплитуды и фазы сигналов ФТР и ЛЮМ от частоты модуляции для образца зуба до и после 5- или 10-дневной деминерализации [956]. Бары, обозначающие ошибку измерений, не показаны, когда они имеют размер символов. Результаты денситометрического трассирования (справа вверху) и соответствующее микрорадиографическое изображение (внизу справа) области поражения эмали зуба представлены на смежных рисунках. Из анализа микрорадиографического исследования следует, что минеральные потери составляют 1310 об. % × мкм, толщина поверхностного слоя равна 3,6 мкм, а ширина поражения — 85,0 мкм

поглощающих компонентов биологических клеток, таких как цитохром-с (Cyt-c), P450, и цитохром-с-оксидаза (Cyt-c-оксидаза), с различными полосами поглощения вблизи 450 нм, 550 нм и 700–900 нм соответственно [960] может дать много потенциальных применений ФТ-спектроскопии в биохимии клетки, так как эти компоненты участвуют в таких важных клеточных процессах, как апоптоз, кинетика лекарственных препаратов и преобразование энергии. Наличие перестраиваемых лазеров в видимой и ближней ИК-области спектра дает возможность исследовать и другие клеточные компоненты, такие как Cyt-a (605 нм) и Cyt-c-оксидаза с медным А-центром (Cu_A) в восстановленной (620 нм) и окисленной (820 нм) формах, так и с медным В-центром (Cu_B) в окисленной (680 нм) и восстановленной (760 нм) формах.

Измерение ФТ-отклика различных форм гемоглобина позволяет оценивать биохимические процессы, происходящие в кровеносных сосудах, на уровне отдельного эритроцита. Как и в обычной спектроскопии, возможно использование специфических полос поглощения эритроцитов: полосы Sore на 415 нм (окси-) и 425 нм (дезокси-), полос на 542 нм и 578 нм (окси-), а также полос 554 и 760 нм (дезокси-), с максимальной разницей в поглощении между окси- и дезоксигемоглобином на 675 нм и минимальной на 760 нм. В то же время поглощение на изобестической длине волны 805 нм не зависит от степени оксигенации гемоглобина, а только от количества в крови эритроцитов и белых кровяных клеток (лейкоцитов). Лейкоциты поглощают на длинах волн 525–565 нм и 750–830 нм за счет поглощения цитохрома-с и цитохрома-с-оксидазы соответственно. Все эти различия в спектрах позволяют регистрировать отдельные эритроциты среди белых кровяных телец в лимфоходе, например [961]. Возможно также детектирование патологических клеток (например, раковых клеток среди нормальных лейкоцитов), которые существенно не отличаются по поглощению от окружающих клеток, но специфичны по ФТ-отклику, обусловленному формой клетки и ее структурой.

Технической платформой для получения ФТ-изображений (ФТИ) клеток является хорошо разработанная оптическая микроскопия, которая позволяет обеспечить значительную гибкость в выборе алгоритма получения сигнала и существенно упрощает процедуру исследования клеток и тканей этим методом. Тем не менее, большинство описанных ФТИ-методов использует сканирование сфокусированного лазерного пучка поперек клеток, что требует значительных затрат времени. Например, для ФТИ одной клетки методом тепловой линзы с хорошим разрешением, порядка 1 мкм, потребовалось сканирование сфокусированного лазерного пучка примерно в течение часа [962]. Очевидно, что метод сканирования подходит только для обеспечения высокого пространственного разрешения в неподвижных живых клетках. Чтобы избежать трудоемкой процедуры сканирования и сделать возможным исследование динамических процессов в клетке, метод широкопольной ФТИ [963, 964] был адаптирован для использования в цитометрии *in vivo* непосредственно в сосудах [961]. В этой схеме ФТ-изображение от одной клетки получают в течение 0,1 с после ее облучения одиночным импульсом лазера с длительностью 8 нс и широким пучком (диаметром 15–25 мкм), покрывающим всю клетку.

ФТИ высокого разрешения с высокой чувствительностью можно реализовать путем регистрации индуцируемой лазерным излучением температурнозависимых изменений показателя преломления среды вокруг поглощающих микро- и нановключений ткани или клетки (см. рис. 4.14). Например, ФТИ-системы цитометрии *in vivo* основаны на облучении поглощающих наноразмерных структур, которые перемещаются в сосудистом русле отдельно или в составе клеток, сфокусированным излучением лазера накачки с коротким импульсом и регистрации тепловых эффектов методом визуализации фазового контраста (рис. 4.15) [961, 963, 965], тепловой линзы [877,

966] или конфокальной термолинзы [967] с помощью коллинеарного второго лазерного импульса, который зондирует уже нагретые первым импульсом клетки.

Взаимодействие лазерного излучения с поглощающими микро- и наноструктурами клетки (маломасштабные вариации гемоглобина и меланина, соответственно в эритроцитах или клетках меланомы, и/или экзогенные маркирующие наночастицы) может сопровождаться различными ОТ- (ФТ-) явлениями (см. рис. 4.14) [966]. Поглощение лазерного пучка поглощающей неоднородностью вызывает следующие явления: нагрев (повышение температуры ΔT), вторичное инфракрасное излучение (ОТР/ФТР-метод, см. разд. 4.6); фотомеханическое напряжение (ΔF); тепловое расширение (ΔL); акустические и ударные волны (Δp , см. разд. 4.4 и 4.5); испарение, образование пузырьков и кавитацию (при высокой энергии импульса), а также изменения показателя преломления (Δn). В общем, все эти явления могут быть использованы для обнаружения поглощающих включений клеток и тканей.

В основном, два опто-термических метода хорошо подходят для анализа клеток — это уже описанный ранее ФА-метод (см. разд. 4.1–4.5) и ФТИ-метод, который может быть реализован в виде техники «тепловой линзы» или других модификаций. Принцип работы ФТ фазово-контрастной микроскопии, подходящей для регистрации микро- или наномасштабных поглощающих включений клетки или биоткани, представлен на рис. 4.15. Он основан на использовании двух лазерных пучков: от лазера накачки, селективно нагревающего включение, и от измерительного лазера, считывающего информацию о неоднородностях показателя преломления среды, окружающей поглощающую неоднородность [877]. Соответственно рис. 4.16. иллюстрирует временную динамику тепловых полей, образующихся вокруг нанообъекта цилиндрической формы при поглощении короткого лазерного импульса для трех интервалов времени после импульса лазера, $t_3 > t_2 > t_1$ [877].

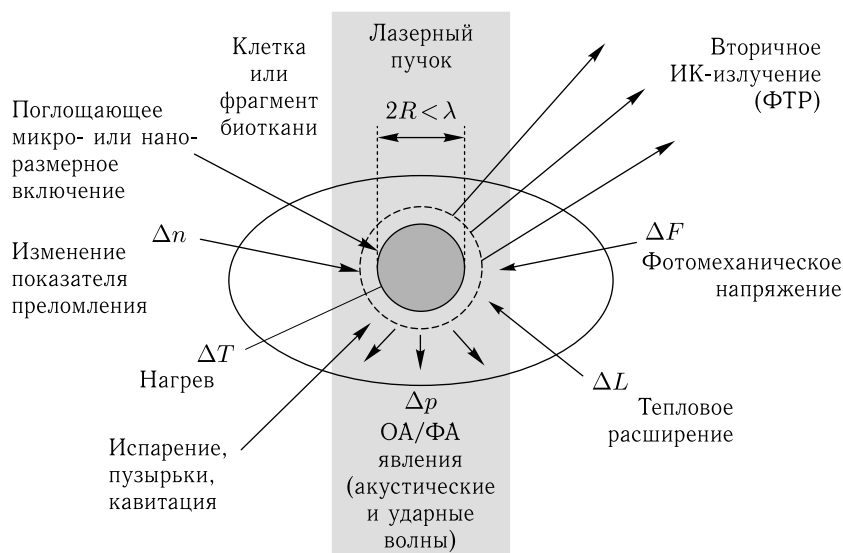


Рис. 4.14. Лазерно-индуцированные фототермические (ФТ) и связанные с ними явления, возникающие вокруг поглощающих микро- или наноразмерных клеточных или тканевых включений (эндогенных или экзогенных) диаметра $2R \leq \lambda$, λ — длина волны лазерного излучения [966]

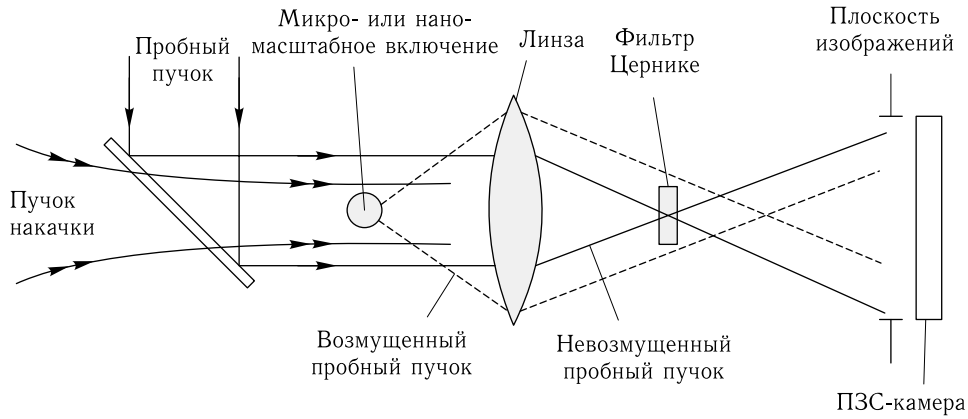


Рис. 4.15. Принцип работы ФТ фазово-контрастной микроскопии микро- или наномасштабных поглощающих включений клетки или биоткани на основе двух лазерных пучков — от лазера накачки, селективно нагревающего включение, и от измерительного лазера, считывающего информацию о неоднородностях показателя преломления окружающей среды [877]

Согласно принципу Аббе, свет не позволяет получать адекватное изображение объекта, структурные элементы которого меньше, чем дифракционный предел $R_D \sim 0,61\lambda/NA$ в дальнем поле [226]. Однако при получении изображения, основанного не на взаимодействии света с самим объектом, а на генерации лазерно-индуцированного теплового поля вокруг объекта (рис. 4.16), позволяет преодолеть ограничение Аббе [877]. Это происходит потому, что тепловое поле содержит информацию о размерах и форме поглощающих микро- и нано-включений клетки или

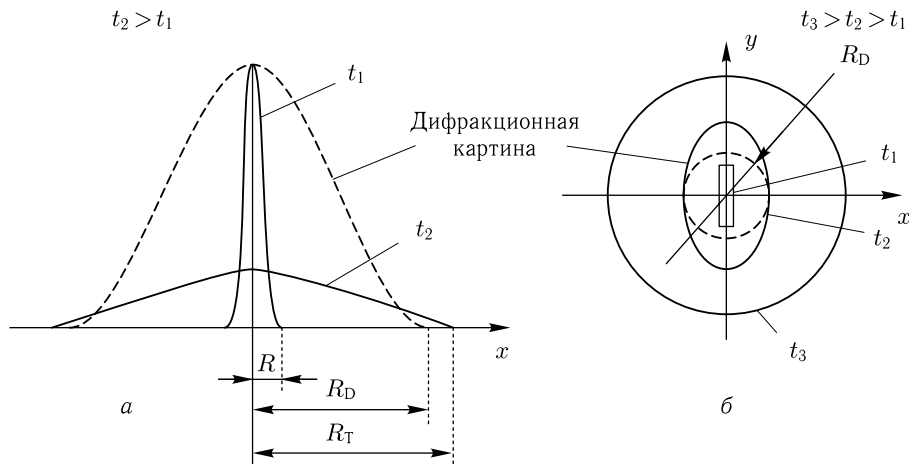


Рис. 4.16. Временная динамика тепловых полей, образованных вокруг нанобъекта радиуса R при поглощении короткого лазерного импульса: а — температурные профили вдоль оси x (сплошные линии, R_T — радиус расплывания теплового поля за время t за время, прошедшее после импульса лазера (t_1 и t_2), и дифракционно-ограниченное оптическое изображение нанобъекта (пунктирная кривая), дифракционный предел $R_D \sim 0,61\lambda/NA$; б — границы распространения тепловых полей от нагретого лазером нанобъекта цилиндрической формы для трех интервалов времени после импульса лазера, $t_3 > t_2 > t_1$ [877]

биоткани даже при его расширении в результате диффузии тепла. Таким образом, анализ пространственной структуры теплового поля, когда оно сформировалось настолько, чтобы быть зарегистрированным оптически, позволяет реализовать ФТИ наномасштабных включений и получать действительную информацию об их размерах [877].

Если длительность лазерного импульса τ_L значительно короче, чем время тепловой релаксации наномасштабных объектов τ_T (т.е. $\tau_L \ll \tau_T$), то начальная граница вызванного лазерным излучением распределения температуры $\Delta T(r, t)$ совпадает с геометрией поглощающего включения. Например, для включений с тремя основными формами: сферы с радиусом $R \ll \lambda$, цилиндра с радиусом $R_c \ll \lambda$ и длиной l ($l \gg R_c$), а также плоской круговой пластины с радиусом R_p и толщиной d ($d \ll \lambda, R_p$) — время тепловой релаксации τ_T можно оценить следующим образом [877] (см. также формулы (4.10) и (4.11)):

$$\tau_T = R^2/6,75a_T - \text{сфера}, \quad (4.36)$$

$$\tau_T = (R_c)^2/4a_T - \text{цилиндр}, \quad (4.37)$$

$$\tau_T = d^2/8a_T - \text{круговая пластина}. \quad (4.38)$$

Используя формулы (4.36)–(4.38) и измерение τ_T путем мониторинга тепловой волны, исходящей от объекта, можно реконструировать сам объект, размеры которого меньше, чем λ , если известен коэффициент диффузии тепла в окружающей среде a_T . Например, для сферических объектов с $R = 50$ нм, 500 нм и 5 мкм, оценки величины τ_T для параметров воды, окружающей объект ($a_T = 1,44 \cdot 10^{-3}$ см²/с) (см. формулу (4.11)), дают примерно 4 нс, 0,4 мкс и 40 мкс соответственно. Теоретический предел для этого метода характеризуется временем преобразования поглощенной световой энергии в тепловую (т.е. $\tau_T = \tau_{NR}$), который для типичных параметров биологических сред соответствует минимально определяемому размеру поглощающей неоднородности, $\sim 0,1$ –1 нм.

Важно, что время акустической релаксации τ_{OA} (уравнение (4.9)) всегда короче, чем время тепловой релаксации τ_T (см. уравнения (4.10), (4.11), (4.36)–(4.38)), кроме случая очень малых размеров поглощающей неоднородности, определяемых соотношениями (4.36)–(4.38) при $\tau_{OA} = \tau_T$. Поэтому размеры порядка 0,1–1 нм, когда эти два характеристических времени равны, можно считать предельными для использования ФТ-метода.

Поскольку тепловое поле сохраняет информацию о форме и размерах поглощающей неоднородности, анализ формы теплового поля позволяет восстановить размер и форму этой неоднородности (см. рис. 4.6 б). Такой подход можно использовать при регистрации сравнительно больших частиц в ближнем поле $R > R_D/5$ (> 50 нм). В частности, если длина цилиндра l или радиус плоской структуры R_p превышают λ , такие объекты могут быть частично видны в оптическом микроскопе с дифракционным ограничением. Измерение времени охлаждения этих частиц вместе с использованием соотношений (4.37) и (4.38) дает дополнительную информацию о об их невидимых в микроскоп наноразмерных параметрах, таких как диаметр цилиндра или толщина плоской структуры. В частности, при переходе от моделей к реальным биологическим объектам такая информация может иметь важное значение для исследования тромбоцитов, хроматина ядер клеток, филаментов в клетках и мышечной ткани, или митохондрий, имеющих форму эллипсоида. Особенно это важно для мониторинга таких процессов, как рост или изменение пространственной структуры клеточных и тканевых структур при различных внешних воздействиях (например, радиации, лекарственных препаратов и пр.).

Лазерно-индуцированные термические эффекты в области нанобъектов могут быть зарегистрированы при измерениях температурно-зависимых изменений показателя преломления окружающей их среды Δn с помощью широкопальной фазовокогерентной визуализации с использованием второго коаксиального пробного лазерного пучка (рис. 4.5). При прохождении расстояния d_p в этой нагреваемой среде пробный пучок приобретает фазовый сдвиг [876, 965] (см. основное уравнение (4.8)):

$$\Delta\psi = 2\pi d_p(r) \frac{\Delta n(r, t)}{\lambda_p} = 2\pi \frac{dn}{dT} d_p(r) \frac{\Delta T(r, t)}{\lambda_p}. \quad (4.39)$$

Первый пучок накачки (нагрева) после прохождения объекта фильтруется с помощью фильтра Цернике, имеющего круглую форму, что хорошо подходит для лазерных измерений (рис. 4.15). После фильтрации интерференция невозмущенной и возмущенной компонент зондирующего пучка обеспечивает преобразование фазовых изменений, которые обусловлены тепловыми полями в плоскости объекта, в пространственное распределение интенсивности, которое уже регистрируется с помощью ПЗС-камеры в виде изображения. Такое изображение называют ФТ-изображением. Оно получается без лазерного сканирования с помощью лишь одного импульса зондирующего лазера с относительно широким диаметром пучка [963, 966]. С помощью аналогичной схемы может быть реализован мультиплексный термолинзовый метод получения изображения без сканирования пучка на ПЗС-камере, в которой каждый пространственно ограниченный пиксель эквивалентен отдельному фотоприемнику с малым отверстием [877, 964].

Зондирующий пучок дифрагирует на сравнительно больших неоднородностях, сравнимых с длиной волны ($R \sim \lambda$), или пространственно перераспределяется в широком спектре углов при взаимодействии с наноразмерными структурами ($R \ll \lambda$), что при малой числовой апертуре (NA) объектива может привести к потере информации, поскольку часть фотонов, рассеянных неоднородностью, не доходит до фотоприемника. Изначально, сразу после действия лазера накачки, распределение температуры совпадает с геометрией поглощающей неоднородности. Затем диффузия тепла приводит к увеличению размера теплового отклика среды, R_T (эффект «размытия»), который становится больше размера неоднородности R . Максимальная чувствительность ФТИ ожидается для $R_T = R_D$, когда большая часть дифрагированной энергии попадает в объектив. Размер исходной неоднородности может быть восстановлен с помощью формул (4.36)–(4.38) путем измерения эволюции температуры вне дифракционного пятна по крайней мере для двух различных моментов времени в той же точке пространства или одновременно в различных пространственных точках. При $R_T \ll R_D$ потери энергии дифрагированного света можно скомпенсировать увеличением энергии пробного пучка. Иммерсионные объективы с высокой числовой апертурой позволяют собирать дифрагированную (перераспределенную) энергию в пределах угловой апертуры, близкой к оптимальной [877] и, следовательно, контролировать изначально высокий уровень температуры вокруг объекта сразу после лазерного импульса накачки. Такой ФТИ-режим может дать самую высокую чувствительность (для объектов размером порядка 1 нм) на основе мониторинга усредненных временных изменений интенсивности света в дифракционном пятне, которое сохраняет размер в процессе быстрого охлаждения.

Временная форма сигнала ФТ представляет собой высокой начальной пик, за счет быстрого нагрева мишени, и намного более низкий экспоненциальный хвост, соответствующий времени охлаждения нагретой поглощающей неоднородности (рис. 4.17). Температура повышается практически мгновенно и в первый момент повторяет пространственное распределение поглощенной энергии, определяемое пространственны-

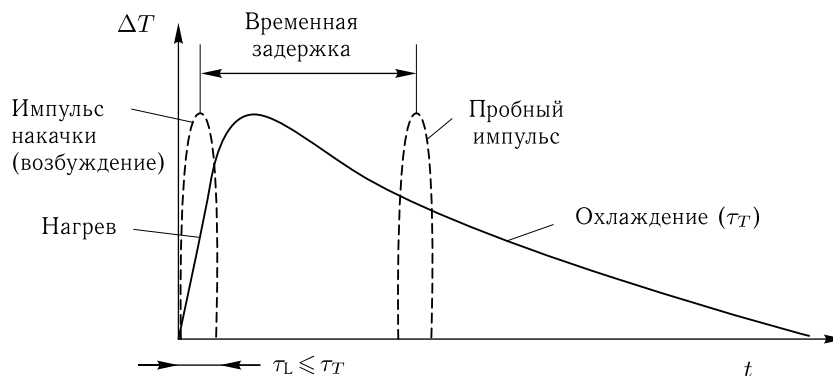


Рис. 4.17. Типичная форма временного импульсного ФТ-отклика [966]

ми распределениями пучка лазера накачки и коэффициента поглощения неоднородности.

Например, ФТИ-метод с разрешением во времени, не требующий сканирования лазерного пучка, был использован в фототермической проточной цитометрии (ФТПЦ) [961, 966, 968]. В методе ФТПЦ отдельные клетки, движущиеся в потоке и представляющие интерес для исследователя, облучаются пучком импульсного лазера накачки, в качестве которого часто используется перестраиваемый по длине волны параметрический генератор света (ПГС) с типичными параметрами: диапазон длин волн 410–2300 нм, длительность импульса 8 нс, энергия в импульсе 0,1–1000 мкДж, частота повторения импульсов 10 Гц. Лазерно-индуцированные температурно-зависимые изменения показателя преломления клетки преобразуются в ФТ-изображение с помощью коллинеарного зондирующего лазерного пучка, получаемого от генератора сдвига на комбинационном рассеянии с длиной волны 639 нм, длительностью импульса 13 нс и энергией в импульсе 10 нДж. Для регистрации изображения используется ПЗС-камера с типичными параметрами: размер пикселя 20 мкм, светочувствительная площадка 512 × 512 пикселей, кадровая скорость 12 кадров в секунду (FPS) и скорость оцифровки 14 бит на частоте 1,3 МГц. Профили интенсивности пучков лазера накачки и зондирования должны быть достаточно гладкими, что контролируется ПЗС-камерой. Для цитометрии пределы регулирования размеров пучков составляют 10–50 мкм. Поскольку лазерные пучки практически целиком покрывают исследуемую клетку, то для формирования ФТ-изображения требуется лишь один импульс накачки. Обычно запуск импульса накачки осуществляется от сигнала фотодиода, который в свою очередь получает сигнал от непрерывного He-Ne-лазера малой интенсивности в момент пересечения его пучка исследуемой клеткой в потоке [881].

В частности, в режиме фазового контраста для получения изображений зондирующего лазерного пучка могут быть использованы коммерческие фазово-контрастные микрообъективы (20×) и коаксиальный четверть-волновый фильтр Цернике (см. рис. 4.15) [966]. В зависимости от решаемой задачи диаметры пучков лазеров накачки и зондирования могут регулироваться в пределах 20–40 мкм и 15–25 мкм, соответственно. При наличии достаточных расстояний между соседними движущимися клетками могут быть использованы круговые лазерные пучки (рис. 4.18, цветная вклейка, левый и средний). При малых расстояниях между клетками (более плотные потоки клеток) эксперименты могут быть выполнены с помощью зондирующего пучка линейной или эллиптической конфигурации (рис. 4.18, справа). Важно отметить, что ФТ-метод позволяет *in vivo* детектировать и визуализировать клетки с малым

поглощением (например, нормальные и апоптозные лейкоциты или раковые клетки), а также измерять скорость движения клеток в кровеносных и лимфатических сосудах на основе различия в их интегральном и локальном поглощении, обусловленном конкретными хромофорами и пигментами [876–881, 963, 966, 970, 971].

В проточном режиме разрешение ФТ-изображений (δ_{PT}) клеток и других структур, движущихся в сосудах, зависит в основном от разрешения объектива микроскопа, $\delta_{\text{OPT}} = 0,61\lambda/\text{NA}$, где λ — длина волны, а NA — числовая апертура; температурного разрешения, $\delta_T \equiv l_T = (4a_T\tau_L)^{1/2}$ [877] (см. формулу (4.15)); искажений за счет движения, $\delta_F = V_F\tau_L$, которые происходят из-за перемещения клетки за время экспозиции или за время между двумя зондирующими импульсами [971]; и от разрешения системы регистрации, в частности ПЗС-камеры, $\delta_{\text{CCD}} = P/M$ (где P — размер пикселя, а M — оптическое увеличение) в плоскости анализа:

$$\begin{aligned} \delta_{\text{PT}} &= \{(\delta_{\text{OPT}})^2 + (\delta_T)^2 + (\delta_F)^2 + (\delta_{\text{CCD}})^2\}^{1/2} = \\ &= \{(0,61\lambda/\text{NA})^2 + 4a_T\tau_L + (V_F\tau_L)^2 + (\delta_{\text{CCD}})^2\}^{1/2}, \quad (4.40) \end{aligned}$$

где a_T — температуропроводность, τ_L — длительность лазерного импульса, V_F — скорость потока. Для типичных параметров, используемых в экспериментах: $\tau_L = 8$ нс, $\lambda \approx 500$ нм, $a_T = 1,44 \cdot 10^{-3}$ см²/с (вода), $\text{NA} = 0,4$ (20-кратное увеличение), $P = 20$ мкм, $M = 100$, $\delta_{\text{OPT}} \approx 760$ нм, $\delta_{\text{CCD}} = 200$ нм (т. е. $\delta_{\text{CCD}} < \delta_{\text{OPT}}$), $\delta_T \approx 69$ нм, тогда без влияния потока (т. е. $V_F = 0$) ФТ-разрешение $\delta_{\text{PT}} \approx 763$ нм (т. е. главным образом зависит от оптического разрешения). Даже для максимально возможного оптического разрешения, $\delta_{\text{OPT}} \approx 250$ нм (при $\text{NA} = 1,25$), влияние диффузии тепла на разрешение по-прежнему незначительно, $\leq 4\%$ ($\delta_{\text{PT}} \approx 259$ нм), что связано с использованием очень короткого лазерного импульса.

Максимальное значение скорости потока клеток, которое еще не искажает ФТ-изображение в процессе лазерной экспозиции, можно оценить исходя из значения наихудшего разрешения по другим параметрам (т. е. оптического разрешения, $\delta_F \leq \delta_{\text{OPT}}$ и $\delta_T < \delta_{\text{OPT}}$):

$$(V_F)_{\text{max}} \leq \delta_{\text{OPT}}/\tau_L. \quad (4.41)$$

Тогда для представленных выше параметров $(V_F)_{\text{max}} \leq 31$ м/с при разрешении порядка 259 нм. Таким образом, при достаточно коротком времени воздействия можно получать изображения с высоким разрешением без снижения этого разрешения на высоких скоростях потоков клеток. Это справедливо и для получения изображений методом одного пробного пучка, алгоритм которого подходит для сравнительно сильно поглощающих клеток, таких как эритроциты и клетки меланомы. Однако использование дифференциального алгоритма получения ФТ-изображений со значительной временной задержкой между двумя зондирующими импульсами может ухудшить разрешение при исследованиях в потоке. Чтобы избежать этой проблемы, могут быть использованы лазеры с высокой частотой следования импульсов (до 100 кГц), а также высокоскоростные ПЗС-камеры (до 10^4 кадров в секунду) [971].

В термолинзовой модификации ФТПЦ лазерно-индуцированные неоднородности показателя преломления вокруг клеток вызывают дефокусировку коллинеарного зондирующего лазерного пучка. Как правило, это высокостабилизированный по интенсивности лазер непрерывного действия. Временной интегральный ФТ-отклик всей клетки регистрируется благодаря дефокусировке этого маломощного пучка. Степень дефокусировки детектируется фотодиодом, стоящим за малым отверстием [966]. Этот режим обеспечивает мониторинг интегрального ФТ-отклика клетки $\Delta T(t)$ с времен-

ным разрешением (~ 3 нс). В первом приближении ФТ-отклик клетки может быть описан как [877, 966]

$$\Delta T(t) \approx \Delta T_{\max} \left[\exp\left(-\frac{t}{\tau_T}\right) - \exp\left(-\frac{t}{\tau_{RT}}\right) \right], \quad (4.42)$$

где ΔT_{\max} — максимальный подъем температуры облученной клетки, τ_T — время тепловой релаксации (для сферической частицы радиуса R τ_T определяется соотношением (4.36)), а τ_{RT} — характерное время подъема температуры [877]. Для небольших клеток (например, эритроцитов мелких животных) с радиусом $R = 2,5$ мкм, τ_T оценивается как, равное 10 мкс. Время подъема температуры (τ_{RT}) в основном определяется самым длинным временем в следующем ряду: время безизлучательной релаксации (τ_{NR}), время отклика фотодетектора (τ_{PH}), длительность лазерного импульса (τ_L) и время усреднения температуры самой клетки (τ_{TA}), которое определяется скоростью диффузии тепла от нагретых локальных поглощающих структур клетки [966]. Для относительно однородных клеток (например, эритроцитов) $\tau_{TA} \approx 0$ и поскольку $\tau_{NR} \approx 0,01$ нс, $\tau_{PH} \approx 3$ нс, то $\tau_{RT} \approx \tau_L \approx 8$ нс; для неоднородных клеток (например, лейкоцитов) $\tau_{TA} \approx 200\text{--}400$ нс [966] и тогда $\tau_{RT} \approx \tau_{TA}$. Во многих случаях $\tau_{RT} < \tau_T$ и ФТ-отклик демонстрирует крутой начальный пик нагревания поглощающей неоднородности и длинный экспоненциальный «хвост», характеризующий ее остывание с характерным временем $\tau_T \approx 10\text{--}30$ мкс в зависимости от размера включения (см. рис. 4.17). Этот результат соответствует теоретически возможной максимальной скорости ФТ-анализа клеток: $f_{\text{cell}} \approx 1/\tau_T \approx 10^4\text{--}10^5$ кл/с. Для достижения предельной скорости анализа клеток необходимо использовать лазеры с высокой скоростью повторения импульсов. Наличие длинного «хвоста» у ФТ-отклика (например, для больших клеток, см. рис. 4.17) может повлиять на перекрытие откликов от последовательно движущихся клеток, однако в пролетной цитометрии это не так важно, поскольку клетки за счет своего движения покидают область лазерного возбуждения после однократной экспозиции.

В условиях *in vivo* клетки могут очень быстро проходить через измерительный объем, поэтому одновременное получение ФТ-изображения и измерение методом «тепловой линзы», которые дополняют друг друга и вместе дают более полную информацию о типе клеток, является ключевым моментом в ФТПЦ. Комбинированный режим осуществляется при направлении двух зондирующих пучков различных длин волн отдельно на ПЗС-камеру (ФТИ, импульсное излучение на 639 нм) или на фотоприемник с малым отверстием (ФТ-линза, непрерывное излучение на 633 нм). Взаимное влияние излучения различных длин волн, особенно непрерывного He-Ne-лазера (633 нм) на ПЗС-камеру и импульса лазера накачки на фотоприемник, можно предотвратить с помощью спектральной фильтрации.

Рисунок 4.19, слева (а-в), демонстрирует полученные методом «термолинзы» типичные линии развертки для ФТ-сигнала от клеток в зависимости от интервала времени, которое им требуется для пересечения зоны облучения [880, 961]. ФТ-сигналы от эритроцитов в потоке представлены исключительно положительными компонентами (рис. 4.19, слева), что указывает на стандартный линейный ФТ-отклик от клеток при низком уровне энергии лазерного излучения накачки. Разница в амплитудах сигналов указывает на разницу в среднем поглощении и показывает естественную вариабельность параметров эритроцитов. Рисунок 4.19, слева (б), демонстрирует возможность детектирования одиночных эритроцитов в потоке лимфы при низкой энергии лазерного излучения накачки, когда из-за низкого поглощения лимфоциты не дают заметных ФТ-сигналов. Лазерно-индуцированное повреждение кровеносных сосудов приводит к быстро растущему числу эритроцитов, попадающих в лимфатические сосуды, что легко регистрируется методом «тепловой линзы»

(рис. 4.19, слева (е)) [880]. Следующая развертка для ФТ-сигналов от эритроцитов в том же лимфатическом сосуде, но при относительно более высоком уровне энергии лазера накачки, показывает наличие поврежденных эритроцитов (рис. 4.19, слева (з)). Наличие только негативного ФТ-сигнала говорит о развитии сильных доминирующих нелинейных эффектов (например, микропузырьков вокруг сильно поглощающих зон клетки). Наличие положительных и отрицательных компонентов в развертке ФТ-сигнала (рис. 4.19, слева (д)) указывает на неинвазивные условия для лимфоцитов (которые имеют более высокий порог фотоповреждения) и инвазивные условия для эритроцитов (которые имеют низкий порог фотоповреждения) для одинакового уровня энергии лазера накачки. Различия в оптических свойствах нормальных и раковых клеток, в особенности связанные с митохондриальным распределением, которые могут быть визуализированы с помощью ФТИ-метода, должны позволить использовать ФТПЦ для распознавания этих клеток.

ФТ-идентификация клеток с близкими поглощающими свойствами и размерами, таких как субпопуляции лейкоцитов, может быть затруднена. Высокая чувствительность ФТ-метода к поглощению позволяет использовать наночастицы золота в качестве нового типа маркера, поглощающего в видимой и ИК-области, что особенно важно для ФТПЦ [170, 878, 966, 970]. Такие частицы обладают уникальными свойствами для ФТ-исследований клетки, потому что они сильные поглотители с настраиваемым спектральным максимумом поглощения, обладают низкой токсичностью, биосовместимы, фотостабильны и легко могут быть связаны с белками и антителами. ФТПЦ может обеспечить ФТ-мониторинг меченых клеток в кровеносных и лимфатических сосудах с высоким временным и пространственным разрешением, а также получение количественной информации о числе меченых клеток, циркулирующих в организме в течение определенного отрезка времени. В частности, ФТ-сигналы меченых золотыми наночастицами клеток имеют отрицательные пики за счет их нелинейного ФТ-отклика, связанного с формированием нано- и микропузырьков вокруг перегретых наночастиц. В то же время ФТ-сигналы немаркированных клеток при том же уровне энергии лазера накачки являются линейными с положительными пиками на временной развертке (рис. 4.19, справа (б)). Одновременный мониторинг ФТ-изображения тех же клеток подтвердил это явление: ФТ-изображения меченых золотом клеток (рис. 4.19, справа: а — левое изображение и в — изображение в центре) имеют явно выраженный локализованный контраст по сравнению с изображениями немаркированных клеток, которые имеют относительно слабо выраженный локализованный контраст, обусловленный эндогенными поглощающими структурами (рис. 4.19, справа: а — центральное и правое изображения и в — левое и правое изображения). В данном модельном эксперименте *in vitro* при постоянной скорости потока оказалось возможным детектировать клетки со скоростью до 10 кл/с, что примерно на два порядка лучше, чем при обычных ФТ-методах [966]. Помимо этих двух приложений существует множество других приложений, где нужно характеризовать и дифференцировать нормальные и патологические клетки крови, а также выявлять раковые клетки и патогенные микроорганизмы в кровеносных или лимфатических сосудах или сторожевых узлах.

Никаких существенных изменений не было найдено в процессе нагрева–охлаждения клеток при формировании ФТ-отклика при скоростях потока до 0,05 м/с в лабораторных исследованиях [961, 970]. При дальнейшем увеличении скорости потока до 0,1 м/с, появляются небольшие отклонения на «хвосте» ФТ-отклика, а более серьезные искажения развиваются на скоростях порядка 2 м/с. Однако не наблюдаются никакие существенные изменения амплитуды ФТ-сигнала в области его максимального значения даже при высокой скорости потоков, порядка 10–20 м/с.

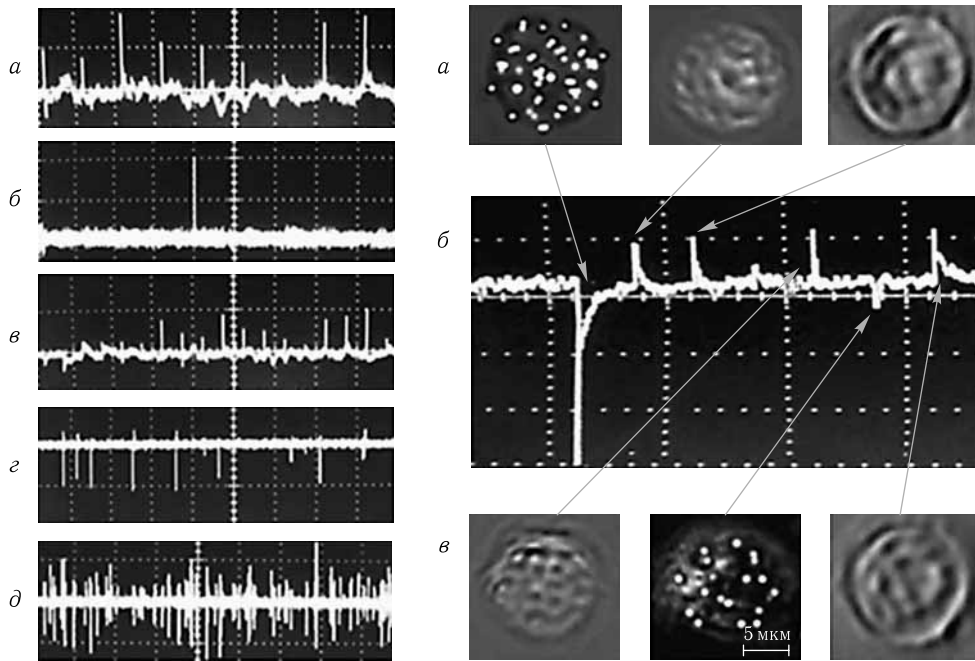


Рис. 4.19. Типичные временные развертки ФТ-сигнала от клеток крови в кровеносных и лимфатических сосудах брызжейки крысы *in vivo* (левая панель) [880, 961] и ФТ-идентификация K562-клеток, маркированных 40-нм золотыми наночастицами, в модельных потоках *in vitro* (правая панель) [970]. Левая панель ($\lambda_p = 525$ нм, сверху вниз: энергия/амплитуда/время/деление: 0,3 мкДж/50 мВ/100 мс/дел (а), 0,5 мкДж/20 мВ/1 с/дел (б), 0,6 мкДж/100 мВ/200 мс/дел (в), 5 мкДж/500 мВ/4 с/дел (г) и 145 мкДж /100 мВ/10 с/дел (д)): а — эритроциты в кровеносном капилляре (см. рис. 4.18 слева); б — редкие эритроциты в лимфатическом потоке при нормальных условиях; в — растущее число эритроцитов в лимфатическом сосуде в процессе лазерно-индуцированного кровотока; г — лазерно-индуцированное повреждение эритроцитов в лимфотоке; д — лимфоциты и эритроциты в лимфотоке. Правая панель: а и в — ФТ-изображения; б — временная развертка ФТ сигнала (стрелки показывают отклики конкретных клеток) (шкала по горизонтальной оси, 200 мс/дел); параметры лазера накачки: $\lambda_p = 525$ нм, длительность импульса 8 нс, энергия 35 мкДж

Так, без заметных искажений были получены ФТ-изображения эритроцитов при высокой скорости потока (2–10 м/с) [970].

Общая схема комплексного мультиспектрального проточного цитометра для исследований *in vivo*, сочетающего фототермический метод, а также оптическую просвечивающую и флуоресцентную микроскопию, представлена на рис. 4.20 [880, 899, 900, 963, 969]. Детектирование клеток осуществляется в приповерхностных микрососудах кожи или в сосудах сравнительно тонких и прозрачных тканей и органов, таких как ухо животного или брызжейка, которые достаточно прозрачны, чтобы проводить измерения света, прошедшего через сосуды. Для освещения выбранных сосудов могут быть использованы различные источники оптического излучения, начиная от обычных ламп с фильтрами до импульсных или непрерывных лазеров. Световые пучки фокусируются на небольшую область микрососудов (место анализа). Чтобы зарегистрировать все клетки, движущиеся в сосуде, диаметр лазерного пучка должен покрывать весь сосуд в поперечном направлении. Чтобы свести к минимуму

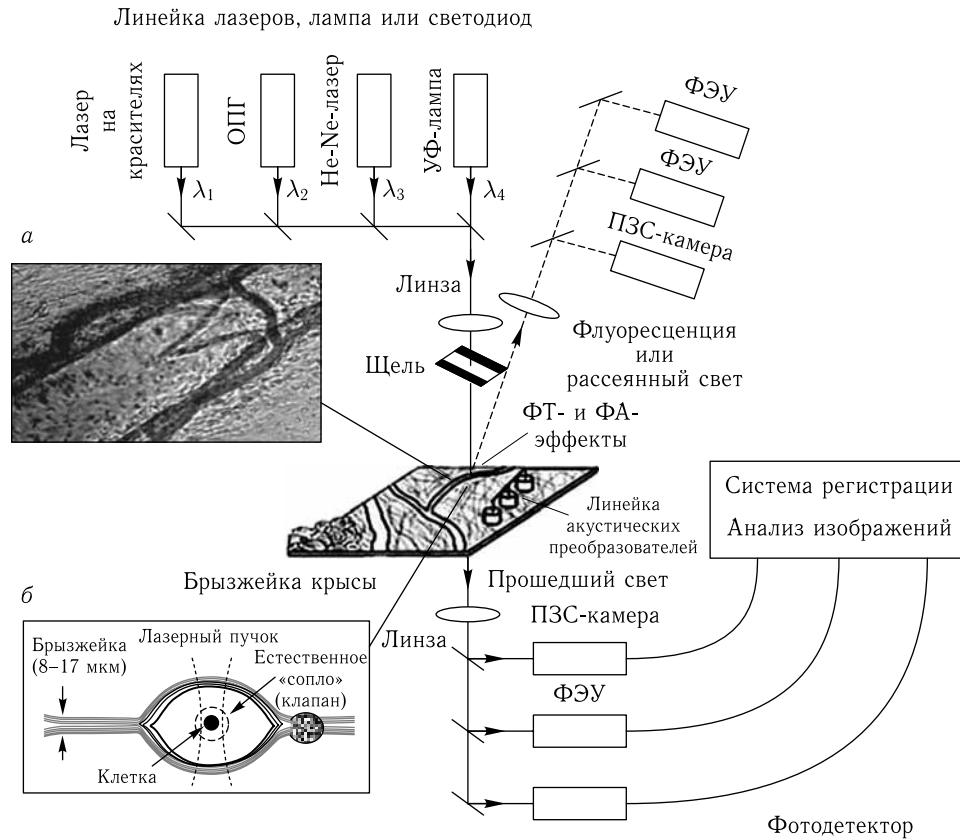


Рис. 4.20. Оптическая схема комплексного мультиспектрального проточного цитометра для исследований *in vivo*, сочетающего фототермический метод, а также оптическую просвечивающую и флуоресцентную микроскопию; в качестве животной модели для цитометрии *in vivo* показана брызжейка крысы с кровеносными и лимфатическими сосудами (см. также две вставки с просвечивающим изображением (а) и структурой ткани брызжейки (б)); хорошо виден клапан лимфатического сосуда, который при периодическом открывании служит в качестве естественного «сопла», как природный аналог гидродинамической ячейки цитометра (а) [961, 969]; ОПГ — оптический параметрический генератор, ФЭУ — фотоэлектронный умножитель, фотодетектор — позиционно-чувствительный фотодетектор или фотодетектор с малой апертурой

одновременное облучение нескольких клеток вдоль оси сосуда, можно использовать вытянутую в поперечном направлении линейную или эллиптическую конфигурацию пучка, ориентированную перпендикулярно к оси сосуда (см. рис. 4.18, справа).

Оптическое поглощение нефлуоресцирующих клеточных структур можно измерять с помощью ФТ и ФА-методов. В частности, ФТ-модуль на основе метода «тепловой линзы» обычно включается в экспериментальную установку для измерения интегрированного по пространству ФТ-сигнала с временным разрешением от движущихся клеток, а также модуль для получения ФТ-изображений движущихся немеченых клеток или специально помеченных ФТ-метками (например, наночастицами золота) [961, 969]. ФТ-модуль для измерения отклонения (дефлексии) пробного пучка с помощью позиционно-чувствительного фотоприемника добавляется, когда

необходимо измерять скорость клеток в потоке; такой модуль использует принцип времяпролетной ФТ-велосиметрии [971]. Кроме того, ФА-преобразователь или линейка таких преобразователей обеспечивают измерение ФА-сигналов от одиночных клеток в потоке как не меченных, так и меченных наночастицами или сильнопоглощающими красителями, а также измерение ФА-сигналов от клеток, накопленных в определенных местах (стенки сосуда, окружающие ткани или конкретный орган), при использовании томографических схем с относительно широкими лазерными пучками (см. разд. 4.5) [832, 839, 843, 848, 850, 854–857, 890, 891, 893–898, 904–915, 918–952, 955].

Метод фототермической микроскопии (ФТМ) показал способность визуализировать поглощающие клеточные структуры в живых непомеченных клетках *in vitro* [876–879], а также изображать клетки, движущиеся в реальном времени *in vivo*, при исследовании циркулирующих эритроцитов и лейкоцитов в капиллярах и лимфатических микрососудах брыжейки крысы [880, 881]. Визуализация отдельных клеток *in vivo* потенциально важна для ранней диагностики заболеваний (например, рака и диабета) или для исследования влияния различных факторов (например, лекарств, курения, ионизирующих излучений) на отдельные клетки.

Для реализации ФТПЦ в работе [881] использовалась несканирующая ФТМ-система с необходимой высокой скоростью анализа данных, поскольку клетки проходят область детектирования за 0,1–0,01 с даже для сравнительно медленного капиллярного кровотока. Такая система была построена на основе возбуждаемого импульсным лазером перестраиваемого параметрического генератора (длины волн 420–570 нм, ширина импульса 8 нс, энергия импульса 0,1–400 мкДж; Lotis Ltd.). Индуцированные лазером зависящие от температуры изменения показателя преломления в клетке регистрировались с использованием техники фазоконтрастной визуализации (микроскоп Olympus BX51 с ПЗС-камерой; АЕ-260Е, Argee Inc.) с освещением низкоэнергетическим коллинеарным зондирующим импульсом (рамановский преобразователь частоты, длина волны 639 нм, длительность импульса 13 нс, энергия импульса 2 нДж). Диаметр пучка для накачки и пробного излучения, имевших стабильный и гладкий профиль распределения интенсивности, варьировался от 20 до 50 мкм и от 15 до 50 мкм соответственно, что обеспечивало полное покрытие не только отдельных клеток, но и целых микрососудов. Обеспечивалось пространственное разрешение 0,7 мкм. Сбор данных включал облучение клетки тремя импульсами: импульсом накачки, первым пробным импульсом, следующим за импульсом накачки, и вторым пробным импульсом, временная задержка которого относительно первого пробного импульса варьировалась в пределах от 0 до 5000 нс. ФТ-изображение, получаемое как разность изображений от двух пробных импульсов, зависит только от контраста постоянной поглощения, преобразованного лазерным импульсом накачки в контраст показателя преломления [881].

Для экспериментального подтверждения концепции ФТПЦ *in vivo* из всех экспериментальных моделей на животных (например, брыжейка, ухо, губа и т. п.) была выбрана брыжейка крысы по причине своего уникального анатомического строения. Она состоит из тонкой прозрачной двойной соединительной ткани с одним слоем кровеносных и лимфатических микрососудов. С использованием цифровой микроскопии просвечивания (ЦМП) были получены изображения эритроцитов и лимфоцитов, движущихся по кровеносным и/или лимфатическим сосудам, а также других структур брыжейки (рис. 4.21). Было обнаружено, что в большинстве интактных лимфатических сосудов (диаметром 50–150 мкм) лимфоциты в потоке имели среднюю скорость $\sim (211 \pm 11)$ мкм/с. Для сравнения, скорость эритроцитов была существенно выше, до 2 мм/с в кровеносных сосудах диаметром 20–30 мкм и от 100 до 500 мкм/с в капиллярах диаметром менее 10 мкм. Пространственное разрешение

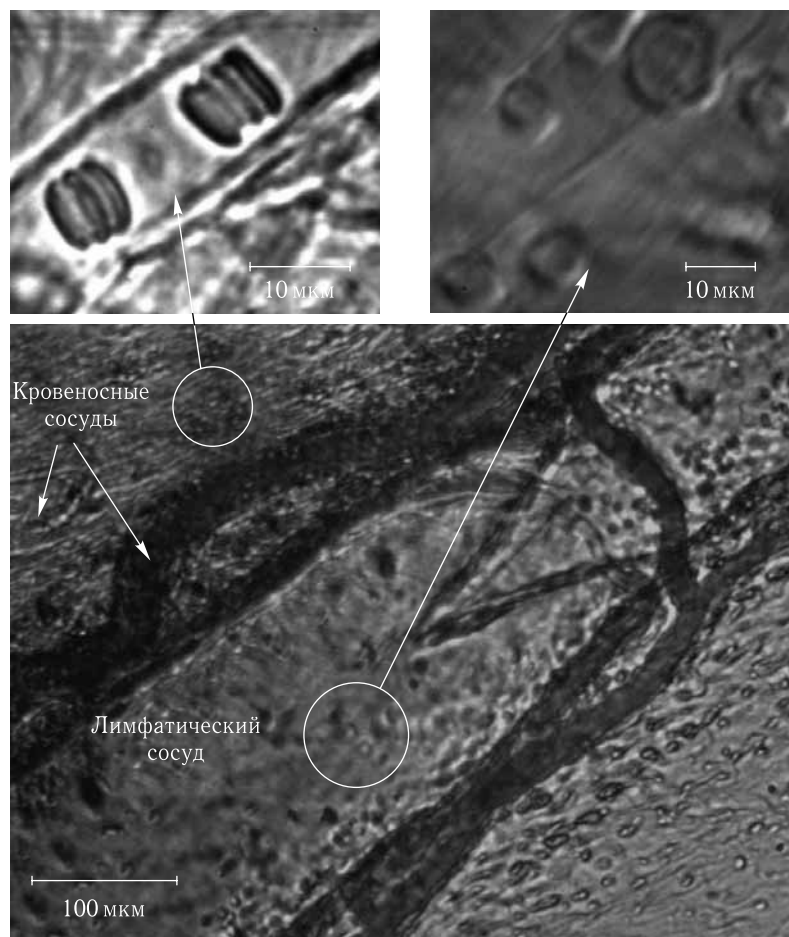


Рис. 4.21. Типичное оптическое изображение лимфатического микрососуда брыжейки крысы с кровеносными микрососудами вдоль лимфатических стенок (внизу), эритроциты в капилляре (вверху слева) и отдельные клетки в лимфатическом потоке (вверху справа) [881]

ЦМП (300 нм при увеличении $100\times$, $NA = 1,25$, объектив с иммерсией) позволяло грубо оценить размеры клеток и даже их форму (рис. 4.22, слева). Однако из-за своей низкой чувствительности по поглощению ЦМП не подходит для визуализации поглощающих клеточных структур. Напротив, ФТПЦ (интегрированная с ЦМП) позволяет получать изображения внутренней структуры движущихся лимфоцитов и эритроцитов (рис. 4.22, справа). Вид этих структур типичен для ФТ-изображений клеток и в данном случае связан с пространственным распределением поглощающих клеточных хромофоров (гемоглобина в эритроцитах или цитохромов в лимфоцитах). Скорость анализа числа клеток ФТПЦ на уровне ~ 10 кл/с была ограничена частотой повторения лазера накачки (10 Гц).

Потенциальные применения ФТПЦ для исследований *in vivo* могут включать: 1) идентификацию клеток, различающихся своими естественными поглощающими свойствами (например, счет лейкоцитов в потоке крови или редких эритроцитов среди лимфоцитов в лимфатических микрососудах); 2) мониторинг циркуляции

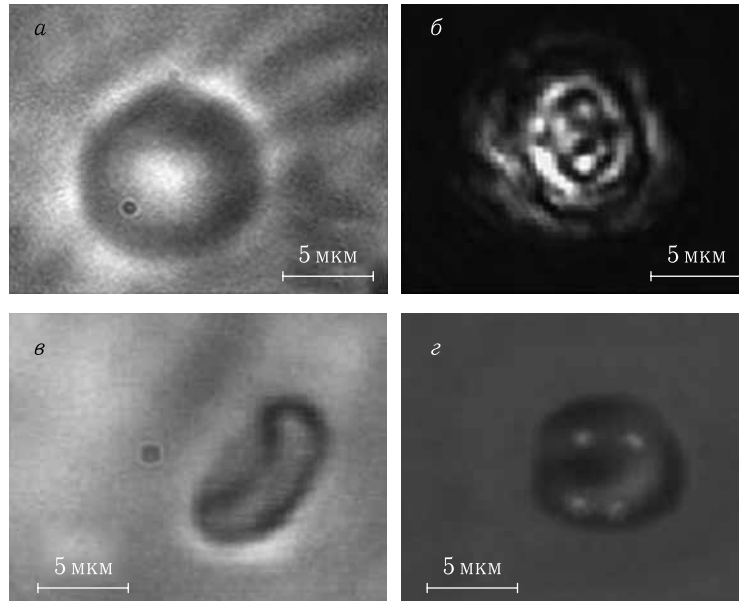


Рис. 4.22. Изображения *in vivo*, полученные методом оптического просвечивания (левый столбец) и фототермическим методом (правый столбец), для одиночного движущегося лимфоцита (верхний ряд) и эритроцита (нижний ряд) в потоке лимфы в брыжейке крысы (диаметр сосуда 105 мкм, скорость около 120 мкм/с). Параметры импульса накачки: длина волны 525 нм, длительность импульса 8 нс, энергия импульса 30 мкДж и 0,5 мкДж (правый столбец, верх и низ соответственно); временная задержка между импульсом накачки и зондирующим импульсом 10 нс [881]

и распределения поглощающих наночастиц, используемых для ФТ-зондирования или фотосенсибилизации; 3) исследование взаимодействия клеток с лазерным излучением; 4) исследование влияния на клетку со стороны различных факторов окружающей среды.

4.8. Акустооптические взаимодействия

Акустооптическая томография (АОТ) или оптическая томография с модуляцией ультразвуком основана на акустической (ультразвуковой) модуляции когерентного лазерного света, распространяющегося в биоткани [196, 204, 890, 974–981]. Акустическая волна фокусируется в биоткань, а лазерный свет облучает тот же объем внутри биоткани, например, так, как показано на рис. 4.23. Все потоки фотонов, модулированные ультразвуком, включая как однократно, так и многократно рассеянные фотоны, вносят вклад в сигнал, дающий изображение. Аксиальное разрешение вдоль акустической оси достигается с помощью развертки по ультразвуковой частоте с последующим фурье-преобразованием [890, 976], в то время как поперечное разрешение можно обеспечить фокусировкой акустической волны. Установлены три возможных механизма акустической модуляции света в рассеивающих биотканях [890, 975, 979] (см. рис. 4.24). Первый механизм обусловлен изменениями оптических свойств биоткани за счет зависящих от координат и времени сжатий и разрежений биоткани при распространении в ней акустической волны. Эти изменения плотности

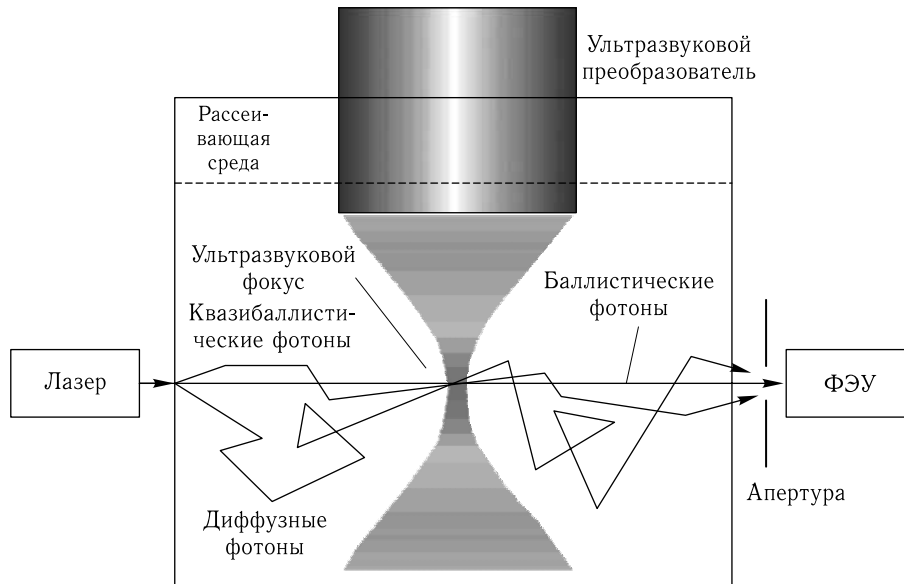


Рис. 4.23. Иллюстрация принципа оптической томографии с акустической модуляцией [975]



Рис. 4.24. Возможные механизмы акустической модуляции свет в биологических тканях [975]

биоткани вызывают соответствующую модуляцию коэффициентов поглощения, рассеяния и показателя преломления среды, поэтому регистрируемая интенсивность зондирующего излучения изменяется вместе с акустической волной. В принципе, такой эффект может наблюдаться и для обычных источников света, однако ультразвуковая модуляция некогерентного света оказалась слишком слабой, чтобы ее можно было наблюдать экспериментально.

Второй механизм основан на изменениях оптических свойств в ответ на вызванное ультразвуком смещение рассеивающих частиц. Колебания рассеивающих частиц при прохождении акустической волны модулируют длину свободного пробега фотонов, распространяющихся в акустическом поле. Многократно рассеянный свет накапливает эту модуляцию вдоль своей траектории. В результате интенсивность спеклов, формируемых пучками многократно рассеянного света, флуктуирует вместе с акустической волной. Модуляционная компонента спекл-картины несет пространственную информацию, проявляемую ультразвуковой волной, и может быть использована для томографии.

Третий механизм обусловлен фотон-фононными взаимодействиями, когда свет рассматривается как ансамбль фотонов, а звук — как ансамбль фононов. Фотон-фононные взаимодействия в классическом смысле вызывают доплеровский сдвиг частоты фотонов на величину акустической частоты и ее гармоник. Оптический приемник работает как гетеродинирующее устройство между светом на частоте с доплеровским сдвигом и без него и вырабатывает сигнал интенсивности, модулированный на разностных частотах, т. е. на акустической частоте и ее гармониках.

Второй и третий механизмы требуют использования когерентного света и оба могут быть связаны с эффектом формирования спеклов. Модуляция спеклов во втором механизме обусловлена акустической модуляцией смещения рассеивающих частиц, в то время как в третьем механизме она происходит из-за акустической модуляции показателя преломления биоткани. Модуляция показателя преломления также возникает в первом механизме. Однако в первом механизме изменение показателя преломления приводит к флуктуациям интенсивности света, который может быть как когерентным, так и некогерентным, в то время как во втором оно вызывает флуктуации фазы когерентного света, которые преобразуются во флуктуации интенсивности уже на квадратичном детекторе. Таким образом, в результате акустической модуляции показателя преломления оптическая фаза между двумя последовательными актами рассеяния модулируется, многократно рассеянный свет аккумулирует сдвиги фазы вдоль своей траектории и окончательная модулированная фаза определяет характер модуляции интенсивности спеклов, формируемых многократно рассеянным светом.

Глубина модуляции интенсивности M определяется как отношение интенсивности на основной частоте I_1 к интенсивности постоянной составляющей I_0

$$M = I_1/I_0. \quad (4.43)$$

Спектральная интенсивность I_1 на основной акустической частоте ω_{ac} вычисляется по формуле [890]

$$I_n = \frac{1}{T_{ac}} \int_0^{T_{ac}} \cos(n\omega_{ac}\tau) G_1(\tau) d\tau \quad (4.44)$$

при $n = 1$; здесь T_{ac} — период акустической волны. В формуле (4.44) автокорреляционная функция скалярного электрического поля $E(t)$ рассеянного света, рассчитанная в приближении слабого рассеяния (средняя оптическая длина свободного пробега много больше оптической длины волны) и слабой модуляции (акустическая амплитуда много меньше оптической длины волны), имеет вид [890]

$$G_1(\tau) = 1 - \frac{1}{6} \frac{L}{l_{tr}} \varepsilon [1 - \cos(\omega_{ac}\tau)], \quad (4.45)$$

где

$$\varepsilon = 6(\delta_n + \delta_d)(n_0 k_0 A)^2, \quad \delta_n = (\alpha_{n1} + \alpha_{n2})\eta^2, \quad \delta_d = \frac{1}{6},$$

$$\alpha_{n1} = \frac{1}{2} k_{ac} l_{tr} \cdot \operatorname{arctg}(k_{ac} l_{tr}), \quad \alpha_{n2} = \frac{\alpha_{n1}}{k_{ac} l_{tr} / \operatorname{arctg}(k_{ac} l_{tr}) - 1},$$

L — толщина слоя биоткани, n_0 — показатель преломления окружающей среды, k_0 — оптический волновой вектор в вакууме, A — акустическая амплитуда, k_{ac} — акустический волновой вектор, l_{tr} — средняя транспортная длина свободного пробега фотона. Параметр η связан с адиабатическим пьезо-оптическим коэффициентом биоткани $\partial n / \partial p$, плотностью ρ и скоростью звука v_{ac} : $\eta = (\partial n / \partial p) \rho (v_{ac})^2$. Значения параметров δ_n и δ_d обусловлены средними вкладами в модуляцию интенсивности света на пути одного свободного пробега фотона (или в результате одного акта рассеяния) за счет, соответственно, модуляции показателя преломления (δ_n) и смещения рассеивателей (δ_d) при ультразвуковой модуляции.

Вклад от показателя преломления δ_n растет с $k_{ac} l_{tr}$, поскольку на более длинном участке свободного пробега относительно акустической длины волны фотон накапливает большую модуляцию фазы. Напротив, вклад от смещения δ_d остается постоянным и равным $1/6$, независимо от k_{ac} и l_{tr} . Вклад от показателя преломления выше критической точки $k_{ac} l_{tr} = 0,559$, когда вклады от показателя преломления и смещения становятся равными, растет с ростом $k_{ac} l_{tr}$ и существенно превосходит вклад от смещения. Для простоты возможная корреляция между двумя этими механизмами модуляции не учитывалась.

Учитывая уравнение (4.45), глубину модуляции флуктуаций интенсивности можно представить как

$$M = \frac{1}{12} \left(\frac{L}{l_{tr}} \right)^2 \varepsilon \propto A^2. \quad (4.46)$$

Это равенство указывает на квадратичную связь между глубиной модуляции интенсивности M и акустической амплитудой A . При многократном рассеянии только нелинейные члены в выражении для накопленной фазы вносят вклад в акустическую модуляцию когерентного света. Линейный член пропадает в результате случайных блужданий фотонов в рассеивающей среде. В баллистическом (без рассеяния) режиме величина M пропорциональна A из-за неусредняемых вкладов от линейного члена накапливаемой фазы. В почти баллистическом (с минимальным рассеянием) режиме M может иметь смешанный закон зависимости от A .

Важно заметить, что квадратичную связь, описываемую выражением (4.46), можно наблюдать экспериментально, если в качестве приемника использовать спектрометр, такой как, например, интерферометр Фабри–Перо. Во многих случаях измеренная глубина модуляции M' определяется как отношение наблюдаемых переменного и постоянного сигналов, где переменный сигнал возникает за счет биений между электрическим полем на основной частоте модулированного света ($\omega_0 \pm \omega_{ac}$) и электрическим полем на исходной частоте немодулированного света (ω_0). В результате измеренная глубина модуляции приближенно описывается выражением

$$M' \propto (I_1 / I_0)^{1/2} = M^{1/2} \propto A, \quad (4.47)$$

означающим, что измеренная глубина модуляции пропорциональна акустической амплитуде.

В акустооптической томографии (АОТ) для кодирования лазерного пучка, пересекающего акустическую ось ультразвукового датчика, используется акустическая волна с изменяемой частотой (чирпом) [890]. Декодирование прошедшего света в частотной области позволяет получать изображение объектов, скрытых внутри рассеивающей среды. Данная схема аналогична получению изображений с помощью магнитного резонанса.

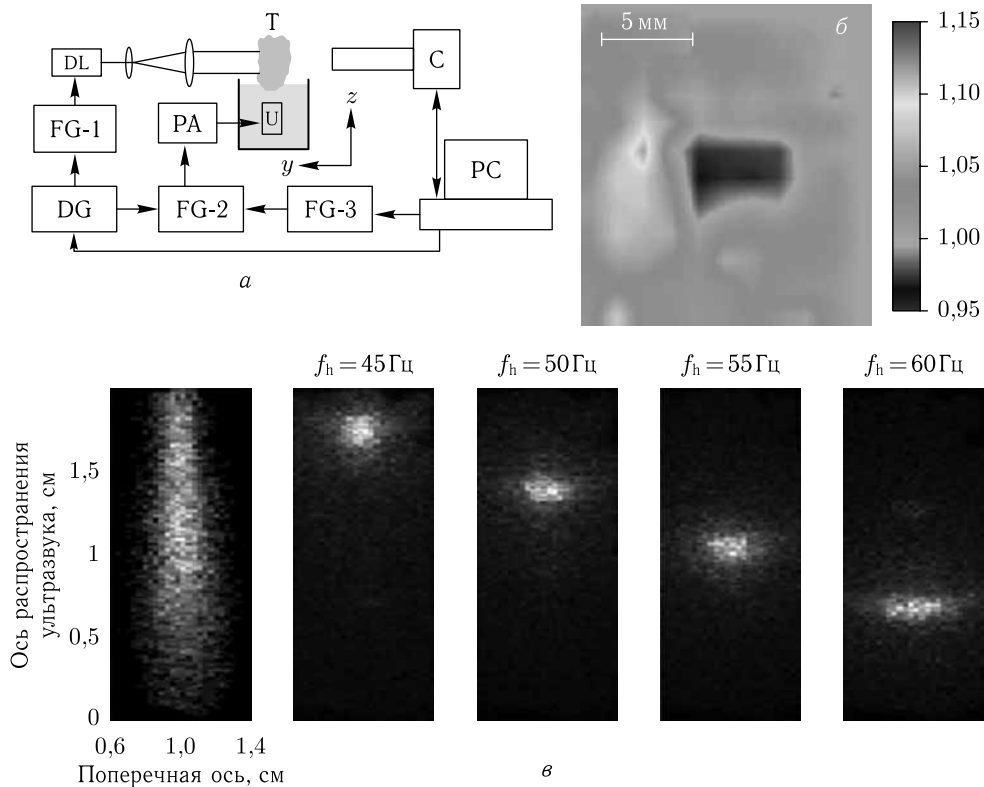


Рис. 4.25. Параллельная АОТ [890]: *a* — схема экспериментальной установки (DL — диодный лазер; С — ПЗС-камера; U — ультразвуковой преобразователь; FG-1, FG-2 и FG-3 — генераторы функций; DG — генератор задержки; PA — усилитель мощности; T — образец ткани); *б* — экспериментальное двумерное изображение образца грудки цыпленка толщиной 1,2 см, содержащего скрытый объект; горизонтальная и вертикальная оси направлены вдоль осей x и z соответственно; *в* — демонстрация виртуального источника света, модулированного ультразвуком; на левом кадре весь виртуальный источник, на последующих кадрах — виртуальные источники, соответствующие разным значениям z , полученные перестройкой частоты f_h

В АОТ с параллельным детектированием для попиксельной регистрации модулированного ультразвуком оптического сигнала используется ПЗС-камера [890]. Схема экспериментальной установки показана на рис. 4.25 *a*. Ось z совпадает с акустической осью, направленной от ультразвукового преобразователя к образцу, ось y направлена по оптической оси в направлении диодного лазера, ось x перпендикулярна обеим осям — оптической и акустической. Описываемая система АОТ состоит из ультразвукового преобразователя с фокусным расстоянием 2,54 см в воде, центральной частотой отклика 1 МГц и пиковым давлением в фокусе $\sim 2 \cdot 10^5$ Па (что намного ниже порога разрушения биоткани) и диодного лазера с длиной волны 690 нм, средней мощностью 12 мВт и длиной когерентности ~ 7 см. Лазерный пучок расширялся до $1,6 \times 0,3$ см и проектировался на образец биоткани. Использовалась высокоскоростная 12-битная цифровая ПЗС-камера. Образец биоткани частично погружался в воду для обеспечения хорошей акустической связи. Свет, пропущенный через образец, создавал спекл-структуру, которая регистрировалась ПЗС-камерой. Три функциональных генератора FG-1, FG-2 и FG-3 имели общий генератор раз-

вертки для обеспечения синхронизации. Генераторы FG-1 и FG-2 генерировали функции чирпа для модуляции лазера и возбуждения ультразвукового преобразователя соответственно. Генератор задержки (DG) управлял временем задержки между триггерными сигналами на FG-1 и FG-2.

В отсутствии амплитудной модуляции, обеспечиваемой генератором FG-3, частота гетеродинного сигнала, пришедшего из точки z вдоль ультразвуковой оси, определяется формулой

$$f_h(z, \tau) = b \left(\tau - \frac{z}{v_{ac}} \right), \quad (4.48)$$

где b — скорость развертки частоты, а τ — время задержки между двумя чирпами от генераторов FG-2 и FG-1. Путем создания опорной синусоидальной волны с частотой, равной $f_h(z, \tau)$, которая модулирует амплитуду чирпа, генератор FG-3 реализует синхронные измерения. Сигнал на одном пикселе ПЗС-камеры можно представить как

$$I_i(\phi_i) \propto I_b + I_m \cos(\phi_s + \phi_r), \quad (4.49)$$

где I_b — интенсивность немодулированного сигнала, I_m — интенсивность сигнала, относящаяся к модулированной УЗ составляющей, ϕ_i — случайно распределенная начальная фаза спекла, которая не несет полезной информации в данном методе получения изображения, ϕ_r — начальная фаза опорной синусоидальной волны от генератора FG-3. Глубина модуляции $M' = I_m/I_b$, которая отражает локальные оптические и акустические свойства, может быть вычислена из четырех последовательных кадров ПЗС-камеры, снятых при ϕ_r , равной 0, 90, 180 и 270 град, с использованием следующего выражения [890]:

$$M' = \frac{1}{2I_b} \sqrt{[I_i(90^\circ) - I_i(270^\circ)]^2 + [I_i(0^\circ) - I_i(180^\circ)]^2}. \quad (4.50)$$

Для восстановления значения M' вычисления нужно произвести для каждого пикселя, затем все $N \times N$ измеренных точек нужно усреднить для получения одной точки изображения.

Для фиксированной опорной (синхронизирующей) частоты f_r от генератора FG-3 возможна регистрация модулированного ультразвуком света с определенного расстояния z_0 , соответствующего гетеродинной частоте f_r и временной задержке τ , где z_0 следует из (4.48):

$$z_0 = v_{ac} \left(\tau - \frac{f_r}{b} \right). \quad (4.51)$$

Модулированный ультразвуком свет с других расстояний будет иметь другие частоты и, следовательно, не будет воспринят ПЗС-камерой. Одномерные изображения в направлении УЗ-оси получают электронным сканированием временной задержки τ , а двумерные томографические изображения — дополнительным механическим сканированием УЗ-преобразователя вдоль оси x .

Рисунок 4.25 б иллюстрирует 2D-изображение объекта, скрытого внутри образца биоткани — грудки цыпленка. Скрытый объект, имеющий малое акустическое поглощение, четко виден на фоне изображения самого образца. Разрешение изображения по оси x составляет ~ 2 мм, что определяется двухмиллиметровым фокальным диаметром УЗ-преобразователя. Пространственное разрешение по ультразвуковой оси (оси z) Δz выражается через частотный диапазон Δf функции чирпа и скорость ультразвука v_{ac} следующим образом:

$$\Delta z \approx \frac{v_{ac}}{\Delta f}, \quad (4.52)$$

где $v_{ac} \approx 1500$ м/с, и для $\Delta f = 800$ кГц Δz составляет ~ 2 мм.

Специальные измерения с лазерным пучком, освещающим образец наклонно под углом 10° к оси z дали те же результаты, что и в случае нормального падения [890]. Следовательно, АОТ зависит в первую очередь от рассеянных фотонов, а баллистические фотоны не дают большого вклада в сигнал.

На рис. 4.25 *в* показан ряд изображений виртуальных источников света, создаваемых ультразвуком. Как следует из уравнения (4.48), частота гетеродинного сигнала связана с положением источника на оси z ; таким образом, эти изображения соответствуют различным значениям z , получаемым путем установки частоты f_h . Когда свет от виртуального источника распространяется через рассеивающую среду, прямое изображение его расплывается. Однако, если виртуальный источник детектируется непосредственно без дальнейшего распространения, можно получить его четкое изображение. Это является яркой демонстрацией того, как свет, помеченный ультразвуком, обеспечивает повышение пространственного разрешения при визуализации.

4.9. Тепловые эффекты

Тепловая визуализация основана на восприятии ИК-излучения, испускаемого всеми объектами при любой температуре выше абсолютного нуля [982]. Такое излучение обусловлено молекулярными переходами из состояний с более высокой энергией в состояния с более низкой энергией, и для конденсированных сред распределение его энергии по длине волны описывается кривой Планка. При нормальной температуре человеческого тела пик кривой Планка попадает в средний ИК-диапазон длин волн между 9 и 10 мкм.

Функция Планка экспоненциально нелинейная по температуре, из нее следует, что низкотемпературные объекты излучают на порядки меньше энергии, чем высокотемпературные. Тело человека принадлежит к низкотемпературным объектам, поэтому точное измерение его ИК-излучения — непростая задача. Более того, обычно тело человека и его окружение излучают сравнимые количества энергии, что приводит к дополнительным трудностям при измерениях. Отношение сигнал-шум, как правило, невелико, и для детектирования сигнала требуется специальное оборудование для коррекции фона, методы синхронизации при обработке измерений и тщательный анализ полученных данных [982]. За последние годы технология матричных ИК-приемников, связанная с ними электроника, техника обработки изображений и снижения шумов были существенно усовершенствованы. Обзор инфракрасных камер, подходящих для получения тепловых изображений в медицине, приведен в работе [982]. В настоящее время точность экспериментального определения изменений температуры достигла 10^{-3} К.

Стационарная форма так называемого биотеплового уравнения получается из баланса энергии и описывает изменение температуры биоткани $T(\mathbf{r})$ в точке \mathbf{r} [2, 3, 42, 982–987]:

$$\nabla[k_T \nabla T(\mathbf{r})] + S(\mathbf{r}) + \rho_b c_b q_b [T_a - T(\mathbf{r})] = 0, \quad (4.53)$$

где k_T — коэффициент теплопроводности биоткани (Вт/К); S — член, описывающий источник тепла (Вт/м³), определяемый скоростью метаболического выделения тепла в точке \mathbf{r} ; ρ_b — плотность крови (кг/м³); c_b — удельная теплоемкость крови (Дж/кг·К); q_b — скорость перфузии крови (1/с), определяемая как объем крови, протекающей через единицу объема биоткани в секунду; T_a — температура артериальной крови (К), а $T(\mathbf{r})$ — локальная температура биоткани в точке \mathbf{r} . Первый член описывает поступление тепла (обычно из точки \mathbf{r}), источник тепла отвечает за ее выделение в процессе метаболизма, а последний член описывает перенос тепла

за счет перфузии крови. Температура артериальной крови приближенно считается равной внутренней температуре тела.

Во многих практических случаях достаточно учесть перенос тепла в направлении нормали к поверхности, что приводит к одномерной задаче [987],

$$\frac{1}{r^n} \frac{\partial}{\partial r} \left(k_T r^n \frac{\partial T}{\partial r} \right) + S + \rho_b c_b q_b (T_a - T) = 0, \quad (4.54)$$

где $n = 0, 1, 2$ для плоского слоя, цилиндра и сферы соответственно.

Для решения этого уравнения необходимо учесть граничные условия. Граничные условия зависят от состояния биоткани и ее окружения. Биоткань обменивается энергией (и массой) с окружением посредством комбинации явлений конвекции, излучения, испарения и теплопроводности. Движущими силами такого обмена являются различия в температуре и парциальном давлении водяного пара между биотканью и окружением. Граничное условие для теплообмена на поверхности биоткани имеет общий вид [987]:

$$-k_T \frac{\partial T}{\partial r} \Big|_s = h(T_s - T_e), \quad (4.55)$$

где h — эффективный коэффициент переноса энергии, который может зависеть от температуры, давления, относительной влажности, изолированности биоткани и т. п.; T_s и T_e — температуры поверхности биоткани и окружения соответственно. Граничное условие в глубине биоткани в предположении постоянства температуры на глубине R_0 и ее равенства внутренней температуре тела (или температуре артериальной крови T_a) имеет вид

$$T|_{R_0} = T_a. \quad (4.56)$$

Уравнения общего вида (4.53) и (4.54) можно применять к любой биоткани и слою окружающего материала, что приводит к системе дифференциальных уравнений в частных производных, связанных условиями, обеспечивающими непрерывность температуры и тепловых потоков на границах раздела соседних слоев. Методы решения биотеплового уравнения можно найти в работах [2, 3, 42, 323–325, 982–987].

Скорость метаболического выделения тепла может существенно различаться у нормальной биоткани и опухоли. Например, для нормальной ткани молочной железы интенсивность источника тепла $S(\mathbf{r})$ была оценена как 450 Вт/м^3 , а для опухоли 29000 Вт/м^3 ; соответствующие значения скорости перфузии крови q_b составили $0,00018 \text{ с}^{-1}$ для нормальной биоткани и $0,00900 \text{ с}^{-1}$ для патологической [982]. С использованием этих данных и уравнения (4.53) было проведено теоретическое моделирование тепловых характеристик ткани молочной железы в норме и с опухолью в виде сферического включения радиусом $1,1 \text{ см}$ с центром на глубине $2,1 \text{ см}$ от поверхности кожи. Было показано, что наличие опухоли приводит к повышению температуры поверхности кожи примерно на $2 \text{ }^\circ\text{C}$, от $\sim 32 \text{ }^\circ\text{C}$ для ткани молочной железы в норме до $\sim 34 \text{ }^\circ\text{C}$ при опухоли. Этот результат исключительно важен, поскольку опухоль вызывает локальное повышение температуры на поверхности груди, уверенно регистрируемое современными ИК-камерами. Более того, решение обратной задачи распространения тепла в биоткани может дать возможность определения местоположения опухоли по термограммам поверхности [982].

Скорость перфузии крови q_b оценивается как наибольшая для сосудистых оболочек и почек, $0,05\text{--}0,10 \text{ с}^{-1}$; средняя для коры головного мозга, $0,007\text{--}0,02 \text{ с}^{-1}$, кожи, $0,002\text{--}0,007 \text{ с}^{-1}$, мышечной ткани, $0,0003\text{--}0,002 \text{ с}^{-1}$, и наименьшая для жировой ткани, $0,0001\text{--}0,0003 \text{ с}^{-1}$ [983].

Упрощенное трехмерное биотепловое уравнение, описывающее влияние кровотока на перенос тепла в системе «кровь–биоткань», было предложено в работе [986]. Это уравнение содержит простое выражение для тензорной проводимости биоткани как

функции локальной сосудистой геометрии и скорости кровотока в термически значимых противоточных сосудах, которое было выведено с использованием концепции анизотропного переноса тепла. Эта концепция основана на утверждении, что основным механизмом энергообмена между кровью и биотканью является не полностью скомпенсированный приток и отток крови в исследуемую область биоткани за счет противоточных термически значимых микрососудов.

В литературе имеются сведения о многочисленных применениях ИК тепловой визуализации, обзор некоторых из них приведен в работе [982]. Основные измерения включают распределение температуры в биоткани, получающееся в результате действия разнообразных внешних и внутренних условий, влияющих на микроциркуляцию крови и метаболические процессы. Тепловая визуализация использовалась для обнаружения рака молочной железы, мониторинга воспалительных процессов в деснах, распознавания состояния щитовидной железы, обнаружения признаков эктодермальной дисплазии, измерения глубины ожогов, мониторинга болевых ощущений и послеоперационного восстановления сухожилий, измерения активности мозга, визуализации атеросклеротических бляшек, обнаружения состояний страха и т. д. Рост температуры теплоизолированной кожи, измеренный с помощью ИК радиометрии, дает полезную информацию о скорости кровотока и о температуре крови [987, 988].

Основными недостатками тепловой визуализации для мониторинга любого патологического состояния, включая рак молочной железы, является ее неспецифическая природа, связанная с откликом кровоснабжения биоткани и ее метаболической активностью и обеспечивающая только возможность измерения температуры поверхности. Поэтому данный метод должен использоваться как дополнительный по отношению к другим диагностическим методам в сочетании с разрабатываемыми новыми приборами, аналитическими и численными расчетными методами [982].

4.10. Сонолюминесценция

Сигнал сонолюминесценции (СЛ) или акустолуминесценции, генерируемый внутри среды под действием непрерывного ультразвука с частотой 1 МГц, можно использовать для получения двумерных изображений объектов, погруженных в рассеивающую среду [989, 990]. Этот метод основан на испускании света, связанном с поведением малых пузырьков в процессе ультразвукового коллапса. Пузырьки с начальным радиусом в несколько микрометров расширяются до ~ 50 мкм из-за уменьшения акустического давления в течение отрицательной половины синусоидального периода акустической волны, затем наступает положительный полупериод и перепад давления приводит к быстрому сжатию пузырьков, сопровождающемуся широкополосным испусканием света — СЛ. Такое испускание происходит в течение очень короткого промежутка времени (десять пикосекунд), повторяется на каждом периоде звуковой волны и имеет спектр, содержащий полосы молекулярного испускания (с пиками в области 300–500 нм) жидкости, как правило воды, в которой происходит СЛ.

СЛ томография (СЛТ) — новый подход к оптическому отображению плотных рассеивающих сред (биологических тканей) — описана в работах [989, 990]. Основные преимущества СЛТ включают: 1) высокое отношение сигнал–шум благодаря внутренней генерации зондирующего сигнала; 2) высокий контраст изображения; 3) хорошее пространственное разрешение, ограниченное размером области фокусировки ультразвука; 4) низкую стоимость оборудования. Экспериментально было показано, что существует порог СЛ-генерации по приложенному ультразвуковому давлению, когда пиковое давление в фокусе ультразвукового пучка составляет ~ 2 бар (~ 100 В, см. рис. 4.26). Быстрый рост интенсивности СЛ с увеличением акустического давления

выше порога показывает, что сигнал СЛ является чувствительной мерой локального акустического давления. Из рис. 4.26 видно также, что на генерацию СЛ не влияет добавление рассеивающего вещества на основе липидных сфер Интралипида или поглощающего красителя трипанового синего, но существенно влияет добавление полистироловых сфер. Поскольку излучение СЛ широкополосное, в алгоритмах построения изображений необходимо учитывать спектры рассеяния и поглощения биотканей и иммерсионных жидкостей [990]. Рассеивающая среда (биоткань) действует как фильтр, изменяющий спектр и интенсивность сигнала СЛ. Оценка мощности источника СЛ, создаваемого в фантоме на основе полистироловых сфер, проведенная с учетом коэффициента диффузного пропускания фантома, на длине волны 400 нм оказалась больше 1 пВт. Для кубического объекта, изготовленного из резины и погруженного в Интралипид, пространственное разрешение краев было оценено в 2–3 мм при отличном контрасте наблюдаемого изображения [990].

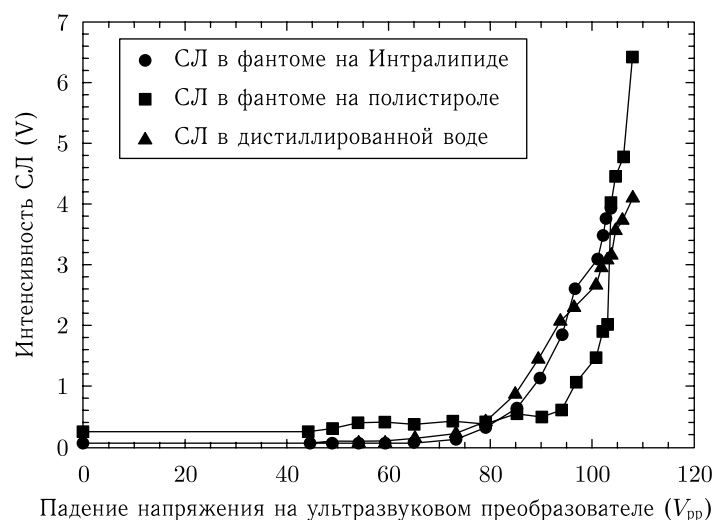


Рис. 4.26. Интенсивность сонолюминесценции (СЛ) в зависимости от возбуждающего напряжения на УЗ-преобразователе [990]

В основе СЛТ лежит несколько механизмов получения контраста [990]: 1) для объектов с ультразвуковым контрастом сигнал СЛ от объекта отличается от сигнала от окружающей среды; на генерацию СЛ влияет локальная интенсивность ультразвука (см. рис. 4.26); 2) для объектов с контрастом в оптических свойствах сигнал СЛ от объекта ослабляется не так, как сигнал от окружения, поскольку излучение СЛ должно пройти сквозь объект; 3) для объектов, способных генерировать СЛ, сигнал СЛ отличается от окружающей среды, даже если локальные ультразвуковые давления одинаковы.

Следует заметить, что пиковое давление в ультразвуковом фокусе в типичном случае меньше ~ 2 бар ($1,3 \text{ Вт/см}^2$ по пиковой мощности), что на порядок меньше предела безопасности, установленного Управлением по контролю за продуктами и медикаментами США (FDA) (23 бар) и на два порядка меньше порога повреждения биоткани (400 и 900 Вт/см^2 на частоте 1 МГц для мозга и мышечной ткани, соответственно) [990].

4.11. Перспективные приложения и методы измерений

4.11.1. Визуализация сосудов. Уже сравнительно давно было показано, что ОА/ФА-визуализация позволяет получать трехмерные изображения искусственных кровеносных сосудов в фантоме биоткани с высоким разрешением около 20 мкм по глубине и около 200 мкм в поперечном направлении [850]. Разработанная измерительная техника и алгоритм реконструкции были использованы для получения изображений сосудистой системы крысы Уистара (Wistar) *in vitro* [853] и сосудов кожи запястья человека *in vivo* [854]. В работе [854] для обеспечения узкой угловой апертуры системы использовался двухкольцевой ОА-датчик с измерением кросс-корреляции сигналов, детектируемых двумя кольцами. Наблюдаемые сосуды запястья человека находились на глубине от 1,5 до 2 мм под поверхностью кожи. Было показано, что кроме кожи и поверхностных кровеносных сосудов можно было увидеть также кость, расположенную на большей глубине около 3 мм от кожной поверхности. Полное время сбора данных для получения двумерного изображения со 101 измерительной позицией (А-проходами развертки) составило около 5 мин для лазера с частотой повторения импульсов в 10 Гц. Максимальная глубина, на которой можно было обнаружить сосуды, зависит от таких параметров, как интенсивность облучающего света, используемая длина волны и чувствительность ОА-датчика.

Применение ФА-устройства с использованием ультразвукового датчика Фабри–Перо на основе полимерной пленки для визуализации *in vivo* поверхностной сосудистой системы описано в работах [920, 921]. Исследования для кожи человека и модели рака мыши показали, что система может обеспечить получение 3D-изображений сосудистых структур с высоким пространственным разрешением на глубине до 5 мм. Такое устройство и методика исследований важны для клинической оценки состояний, характеризующихся изменениями в сосудистой системе при развитии опухоли кожи и поверхностных поражениях мягких тканей (ожоги, раны или язвы). Метод также может найти применение для характеристики моделей раковых опухолей мелких животных путем исследования сосудистой системы опухоли в течение долгого времени, что необходимо для изучения развития опухоли и/или ее ответа на терапию.

Эти работы находят дальнейшее развитие, в том числе в виде разработанного фотоакустического микроскопа светлого поля с оптическим разрешением (ОР-ФАМ) (см. рис. 4.8 и 4.9) [897] и многоволновой ОА/ФА-ангиографии с использованием красителей (см. рис. 4.10) [924, 955].

4.11.2. Мониторинг глюкозы в тканях. ОА-методы с временным разрешением и другие оптометрические методы перспективны для неинвазивного мониторинга глюкозы в тканях [887, 991–1003]. В режиме слабого рассеяния при освещении водных растворов глюкозы импульсами лазера ближнего ИК-диапазона на длинах волн, соответствующих ИК-поглощению глюкозы (1,0–1,8 мкм), генерация ОА-сигнала была отнесена к поглощению падающего света молекулами глюкозы [993]. Было выявлено линейное соотношение между ОА-сигналом и концентрацией глюкозы. Было также показано, что ОА-сигнал отслеживает изменения концентрации глюкозы при измерениях на человеке. В этом случае не ожидается особых преимуществ ОА-спектроскопии по сравнению с измерениями глюкозы непосредственно по поглощению ближнего ИК-излучения [991].

Другой подход к ОА-определению глюкозы основан на детектировании параметров рассеяния биотканей [238, 467–469, 887, 991, 1006–1008]. Как следует из уравнения (4.22), ОА-сигнал из глубины биоткани определяется оптическим ослаблением μ_{eff} , которое связано с изменениями показателя преломления среды при измене-

нии концентрации глюкозы. Уменьшение рассеяния увеличивает плотность энергии в ОА-источнике звука и тем самым вызывает повышение уровня ОА-сигнала [998]. Временные ОА-профили, индуцированные лазерными импульсами на длине волны 355 нм в склере кролика *in vivo* при внутривенном введении глюкозы, показали, что увеличение концентрации глюкозы на 1 мМ приводит к спаду μ_{eff} на 5% [994]. УФ излучение, использованное в этом эксперименте, позволило увеличить абсолютную величину ОА-сигнала и его чувствительность к изменениям рассеяния благодаря намного более сильному поглощению и рассеянию в биотканях в УФ-диапазоне по сравнению с видимым и ближним ИК (см. соотношение (4.22)).

Тем не менее, и в ближнем ИК-диапазоне ОА-методами можно зарегистрировать влияние глюкозы на рассеивающие свойства фантомов биотканей [997, 998]. На длине волны 905 нм изменение концентрации глюкозы в 1% ($1 \text{ г} \cdot \text{дл}^{-1}$) увеличивало ОА-сигнал в дистиллированной воде на 2,0%, в трехпроцентном молоке на 5,4% и в обескровленной биоткани на 2,5%, а на длине волны 1064 нм такое же изменение концентрации глюкозы увеличивало ОА-сигнал на 2,7% в 1-% Интралипиде. Было также обнаружено, что вызванные глюкозой изменения ОА-сигнала оказываются большими в крови, чем в Интралипиде, достигая 6,0%/0,5 $\text{г} \cdot \text{дл}^{-1}$ добавленной глюкозы на длине волны 532 нм и 11,4%/0,5 $\text{г} \cdot \text{дл}^{-1}$ добавленной глюкозы на 1064 нм [997]. Индуцированные глюкозой изменения в 1-% Интралипиде можно объяснить выравниванием показателей преломления фосфолипидных мицелл и воды при добавлении глюкозы, в то время как наблюдаемые изменения в крови могут дополнительно вызываться изменениями размеров и формы эритроцитов из-за изменений осмолярности раствора плазмы [48, 995, 997, 1009, 1010].

Помимо роста полной амплитуды ОА-сигнала в зависимости от концентрации глюкозы, был обнаружен соответствующий сдвиг положения максимума ОА-сигнала в сторону меньших времен при больших концентрациях глюкозы, связанный с изменением скорости звука в образце при добавлении глюкозы [997, 1000]. Два других параметра в уравнении (4.22), коэффициент теплового расширения β и удельная теплоемкость биоткани или крови c_p , также могут меняться при изменении концентрации глюкозы. Оценки показали, что изменения этих двух параметров не особенно велики и не влияют серьезно на ОА-сигнал в пределах физиологических концентраций глюкозы [998]. Что касается зависимости скорости звука от концентрации глюкозы, то она, с одной стороны, легко может быть исключена из измерений временного профиля, а с другой стороны, может быть использована для получения дополнительной информации о концентрации глюкозы.

Одним из недостатков ОА-метода является то, что измерение распространения звука в биоткани зависит от механической связи между биотканью и измерительным зондом и от давления зонда на поверхность биоткани. Аналогичный эффект имеет место и при ультразвуковом зондировании, где для уменьшения отражения звука используются специальные звукопроводящие гели.

Для понимания природы возникновения и распространения ОА-сигнала в биоткани и его применения для определения глюкозы требуются дополнительные исследования. В настоящее время ОА-методы, основанные на измерении рассеяния, пока не дают заметных преимуществ по сравнению с другими методами, использующими рассеяние [991]. Однако несколько групп и компаний разрабатывают различные новые подходы к ОА-определению глюкозы [999], включая методы, основанные на комбинировании ультразвукового и ОА-методов [991].

Тепловая градиентная спектроскопия (ТГС) основана на измерении фундаментальных полос поглощения глюкозы на длинах волн 9,1–10,5 мкм с использованием естественного ИК-излучения тела в качестве внутреннего источника излучения [991, 1001–1003]. Индуцированная охлаждением прозрачность кожи позволяет

регистрировать ИК-излучение от интерстициальной жидкости и кожных слоев [1001, 1002]. Сообщалось о линейной связи между содержанием глюкозы, измеренным *in vivo* с помощью ТГС, и значением содержания глюкозы в крови, измеренным обычным способом, при клинических исследованиях для нескольких лиц с диабетом первого типа [1001]. В литературе описаны различные модификации данного метода и соответствующее оборудование для более точного количественного определения глюкозы в биотканях человека [991, 1002, 1003]. Простота данного метода делает его весьма привлекательным, однако перекрывание эффектов действия глюкозы и изменений температуры тела, обусловленных суточной периодичностью (циркадный ритм), на сигнал, а также отклик температуры и кровотока на изменения содержания глюкозы необходимо исключать или учитывать [991].

4.11.3. Определения содержания гемоглобина и степени оксигенации.

ОА/ФА-метод также перспективен для определения содержания гемоглобина в крови и степени его оксигенации [889, 897, 901, 939, 1004, 1005, 1011–1018]. Определение степени оксигенации крови и биотканей *in vivo* важно для мониторинга состояния многих заболеваний, включая рак, а также для отслеживания эффективности лечения. Базовые соотношения метода представлены уравнениями (4.31) и (4.32), а пример визуализации *in vivo* микрососудистой сети уха бестимусной безволосой мыши и степени насыщения крови кислородом sO_2 показаны на рис. 4.9.

Была также разработана ОА-лазерная система для неинвазивного мониторинга церебральной венозной оксигенации верхнего сагиттального синуса с использованием Nd:YAG-лазера с модуляцией добротности (длина волны 1064 нм, частота повторений импульсов 1 Гц) [889]. Авторы показали, что амплитудный и временной профили ОА-волн линейно зависят от степени оксигенации крови в широком диапазоне ее значений от 24 до 92%. С помощью разработанной системы можно производить непрерывные измерения оксигенации крови в реальном масштабе времени, несмотря на поглощение оптических и акустических волн объемной костью.

ОА-метод используется также для неинвазивного непрерывного мониторинга полной концентрации гемоглобина (ПКГ) (величина, характеризующая объем крови в исследуемой биоткани) в реальном масштабе времени [1004, 1005]. Показано, что ОА-метод обеспечивает точные измерения ПКГ посредством детектирования и анализа временных профилей ОА-сигнала, индуцированных короткими оптическими импульсами в крови, циркулирующей по артериям и венам. Портативная ОА-система на основе Nd:YAG-лазера с длительностью импульса 10 нс и длиной волны 1064 нм была разработана для мониторинга ПКГ в лучевой артерии. Результаты исследований *in vitro* и *in vivo* показали, что: 1) крутизна ОА-волн, индуцированных в крови в режиме пропускания, линейно зависит от ПКГ в диапазоне от 6,2 до 12,4 г/дл; 2) ОА-сигнал регистрируется, несмотря на оптическое ослабление в рассеивающих фантомах биотканей толщиной до 1 см; 3) ОА-система регистрирует сигналы, индуцированные в крови, циркулирующей в лучевой артерии. Клинические исследования здоровых добровольцев, описанные в работе [1005], показали, что амплитуда ОА-сигнала, генерируемого в лучевой артерии, хорошо следует за изменениями ПКГ. Концентрация гемоглобина (ПКГ) измерялась непосредственно в одновременно забираемых образцах крови и изменялась при внутривенном введении физиологического раствора.

Оптоакустический метод используется для характеристики многослойных тканевых структур в ближнем и дальнем поле [844], что важно для обеспечения исследований капиллярной гемангиомы кожи человека по глубине ее залегания [847]. ОА/ФА-метод может также использоваться при получении *in vivo* томографических изображений мелких животных. Сообщалось о получении двумерных ОА-изображе-

ний [848] и слоев трехмерных изображений [849] мышей *ex vivo*. Была разработана система, пригодная для структурного и функционального отображения мозга крысы [856, 857].

Исследования и разработки ведутся в направлении неинвазивного мониторинга венозной оксигенации [1015, 1016]. В этих работах описана разработанная и построенная авторами новая ОА-система для мониторинга степени оксигенации крови верхнего сагиттального синуса, большой мозговой вены средней линии. Экспериментальная установка позволяет детектировать сигналы от этой вены *in vivo* на длинах волн возбуждения 700, 800, и 1064 нм через достаточно толстый (5–6 мм) череп овцы, благодаря высокому (на уровне долей миллиметра) разрешению по глубине. Эти результаты показывают новые возможности и перспективы неинвазивных и точных измерений степени оксигенации венозной крови мозга у человека.

Теоретическая модель, описывающая зависимость ОА/ФА-сигнала от степени насыщения гемоглобина крови кислородом (sO_2), представлена в работе [1017]. Полный ОА-сигнал, генерируемый многими эритроцитами, рассчитывался путем суммирования ОА-сигналов (полей) от каждого эритроцита, представляемого как сферическая капля жидкости. Для генерирования двумерного пространственного распределения эритроцитов использовался метод Монте-Карло. Предполагалось, что все эритроциты имеют одинаковый уровень sO_2 для данного распределения. Доля молекул оксигемоглобина в каждом эритроците определяла степень оксигенации клетки и, соответственно, крови. Было найдено удовлетворительное качественное совпадение расчетных данных с данными опубликованных экспериментальных исследований [1017].

Для надежного количественного определения степени оксигенации могут оказаться полезными различные комбинированные методы, например сочетание ОА-метода детектирования поглощения с экзогенными красителями, время жизни которых в промежуточном триплетном состоянии чувствительно к концентрации кислорода [1018]. Такой метод предполагает возбуждение молекул красителя на длине волны накачки в максимуме их поглощения, например, для G2-красителя — это 630 нм, а затем зондирование пробным пучком на большей длине волны (950 нм для G2-красителя) для ОА-детектирования изменяющегося во времени поглощения в возбужденном триплетном состоянии. Изменяя время задержки между пучком накачки и пробным пучком, можно получить экспоненциально затухающую кривую амплитуды ОА-сигнала, которая определяется концентрацией кислорода в ткани. Поскольку это временной метод, он мало зависит от неоднородности оптических свойств биоткани и распределения световой энергии в ней.

4.11.4. Измерение температуры. Лазерные ОА/ФА-методы позволяют реализовать неинвазивный мониторинг распределения температуры и тепловых повреждений в биотканях по глубине и в реальном времени [888, 1019–1022]. Возможность измерения температуры основана на фундаментальном явлении, связанном с зависимостью параметра Грюнайзена G (см. формулу (4.23)) от температуры. Линейная зависимость амплитуды ОА-сигнала от температуры в биотканях была показана в работе [888], поэтому она может быть выражена в виде эмпирической формулы:

$$G = A + BT, \quad (4.57)$$

где A и B являются константами, а T — температура. В случае чисто поглощающей среды уравнение (4.22) можно переписать в виде

$$\delta p(z) = [A + BT(z)]\mu_a E_0 \exp(-\mu_a z), \quad (4.58)$$

а в случае сильно рассеивающей среды в глубинном режиме (не под поверхностью) как

$$\delta p(z) = [A + BT(z)]\mu_a b_s E_0 \exp(-\mu_{\text{eff}} z), \quad (4.59)$$

где $T(z)$ представляет распределение температуры в биоткани, b_s — параметр, учитывающий многократное рассеяние в биоткани и зависящий от коэффициентов поглощения и рассеяния, а μ_{eff} является эффективным коэффициентом затухания (см. формулу (1.18)). Преобразуя уравнение (4.59), можно получить

$$T(z) = C + D \frac{\delta p(z)}{\delta p(z)_{T=T_0}}, \quad (4.60)$$

где $\delta p(z)_{T=T_0}$ — ОА-профиль давления, измеренный при начальной температуре T_0 ; C и D являются параметрами, которые зависят от свойств биоткани. Таким образом, путем измерения и анализа временного ОА-профиля давления можно восстановить распределение температуры во время гипертермии, при условии, что оптические свойства остаются неизменными.

В работе [888] с помощью чувствительных широкополосных акустических преобразователей было проведено исследование в реальном времени термически индуцированных изменений оптических свойств биотканей путем измерения и анализа амплитудных и временных характеристик ОА/ФА-сигналов, а также измерения диффузного отражения. Экспериментальная установка частично представлена на рис. 4.27. В эксперименте коагуляция образцов печени, миокарда и простаты осуществлялась с помощью интерстициального облучения излучением непрерывного АИГ:Nd-лазера или контактного нагрева. Было установлено, что оптические свойства постоянны до температуры коагуляции (около 53 °С) и ОА-отклик резко возрастает при нагреве от температуры коагуляции до 70 °С (см. рис. 4.28 и 4.29). Резкое изменение отклика

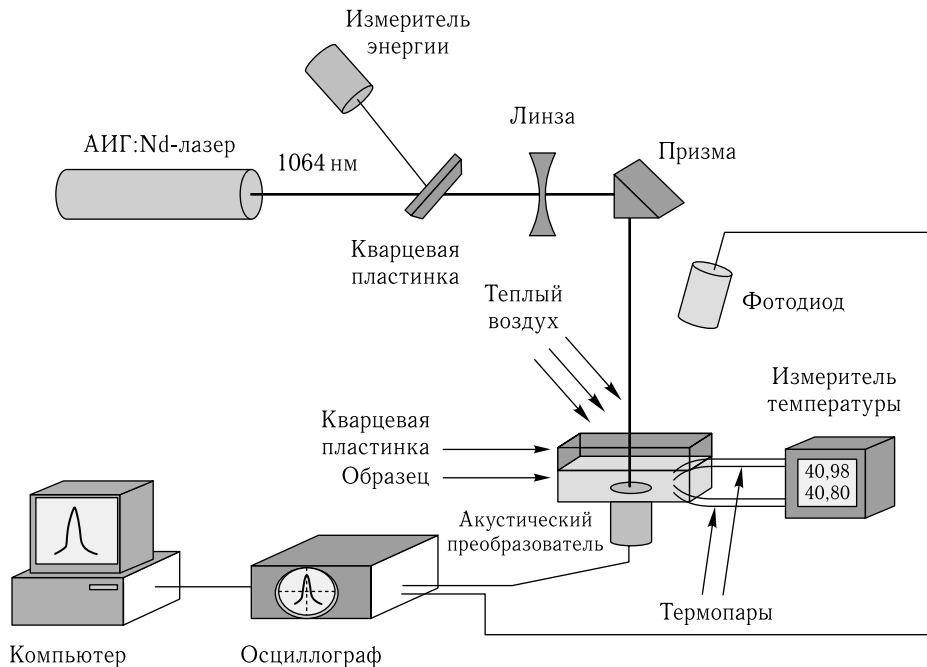


Рис. 4.27. Экспериментальная установка для ОА/ФА-измерений температуры биотканей [888]

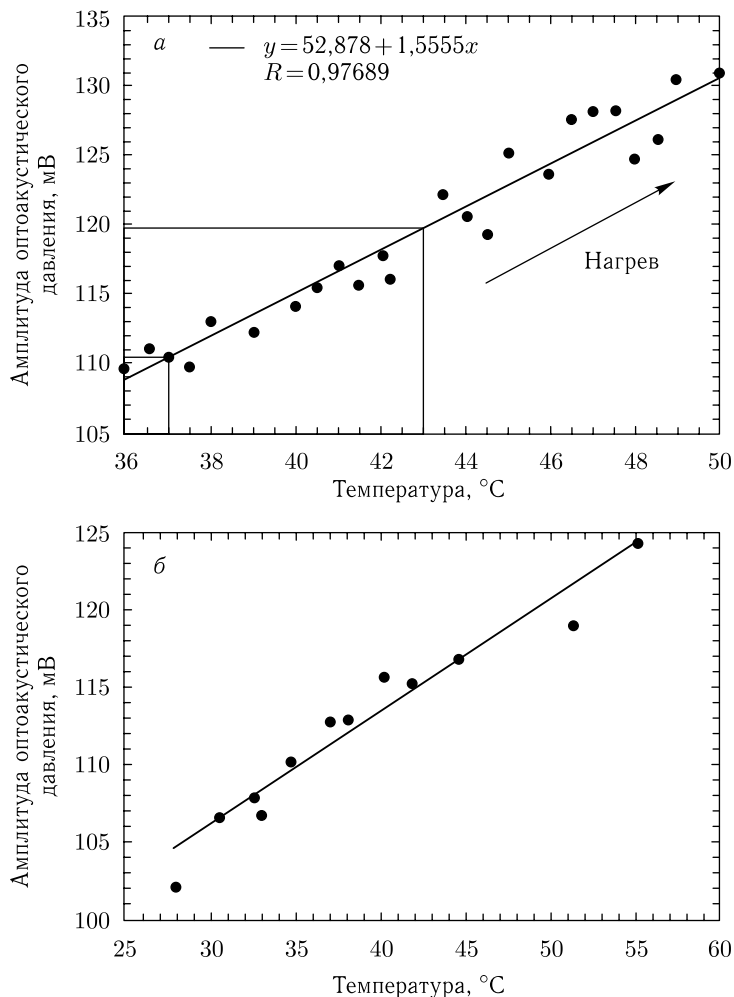


Рис. 4.28. Температурная зависимость амплитуды ОА-сигнала, возбуждаемого в печени (а) и миокарде (б) собаки. Вертикальными и горизонтальными линиями на рисунке (а) отмечены типичные температурные режимы, обычно используемые в гипертермии опухолей [888]

связано с изменением коэффициентов поглощения и рассеяния коагулированной биоткани (параметры C и D в уравнении (4.60)). Мониторинг движения фронта интерстициальной коагуляции в свежих образцах биотканей собаки продемонстрировал хорошее пространственное разрешение метода, ~ 600 мкм. Результаты этого исследования в целом показывают, что ОА/ФА-метод потенциально может быть использован для точного управления в реальном времени процессом термотерапии злокачественных и доброкачественных новообразований на глубине до нескольких сантиметров.

Возможность сопровождения фототермической терапии рака с использованием ОА/ФА-визуализации для локализации поглотителей и мониторинга степени повышения температуры была показана в работе [1019]. Фототермическая терапия проводилась с использованием непрерывного лазерного излучения и металлических

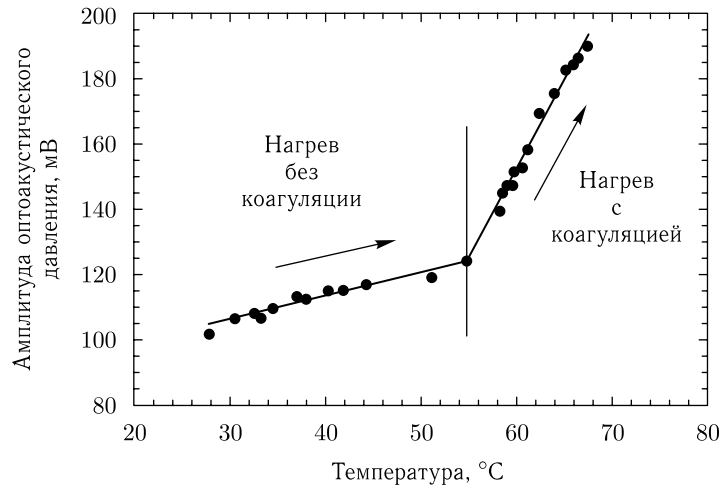


Рис. 4.29. Температурная зависимость амплитуды ОА-сигнала, возбуждаемого в образцах миокарда собаки, при контактном нагреве [888]

нанокомпозитов с широкой полосой поглощения в ближнем ИК-диапазоне. Система визуализации на основе линейки ультразвуковых преобразователей, сопряженная с наносекундным импульсным лазером, позволяла получать изображения как фантомов биотканей, так и тканей животных *ex vivo*, до и во время фототермической терапии. Полученные карты распределения тепла, рассчитанные по данным мониторинга температурно-зависимых изменений ФА-сигнала во время терапевтического лазерного воздействия, и их сравнение с картами ультразвуковой визуализации температуры позволили сделать вывод о том, что комбинация этих двух методов визуализации будет полезна для сопровождения фототермической терапии с использованием наночастиц.

При одновременных термоакустических и ФА-измерений была получена температурная чувствительность на уровне $0,15\text{ }^{\circ}\text{C}$ при временном разрешении порядка 2 с , необходимом для усреднения 20 сигналов [1020]. Возможность получения изображений на глубине биоткани важно для мониторинга *in vivo* температуры при тепловых или криогенных воздействиях на биоткань.

Как мы уже видели, восстановление распределения температуры внутри биоткани может быть сделано на основе регистрации ОА/ФА-сигналов, возбуждаемых в биоткани при поглощении импульсного лазерного излучения, матрицей приемников и последующим решением обратной задачи ОА/ФА-томографии, если калибровочная зависимость $\mu_a \Gamma$ (см. уравнения (4.57)–(4.59)) от температуры для исследуемого типа ткани известна [1021, 1022]. При использовании узкого лазерного пучка и конечной длительности лазерного импульса амплитуда ОА-сигнала пропорциональна коэффициенту поглощения света μ_a и практически не зависит от приведенного коэффициента рассеяния μ'_s (см. уравнения (1.36) и (1.37)).

В работах [1021, 1022] в качестве источника возбуждения ОА-сигналов использовалось излучение основной гармоники ($\lambda = 1064\text{ нм}$, $\tau_L = 12\text{ нс}$) импульсного АИГ:Nd-лазера с модуляцией добротности и частотой повторения импульсов 50 Гц (см. рис. 4.30). Энергия импульсов на поверхности биоткани составляла $2\text{--}3\text{ мДж}$ при диаметре пучка $2,5\text{ мм}$. Нагрев среды за один лазерный импульс не превышал сотой доли градуса, а за весь цикл измерений при усреднении по 128 реализациям — одного градуса. Были приняты меры для минимизации пироэффектов в пьезоэлек-

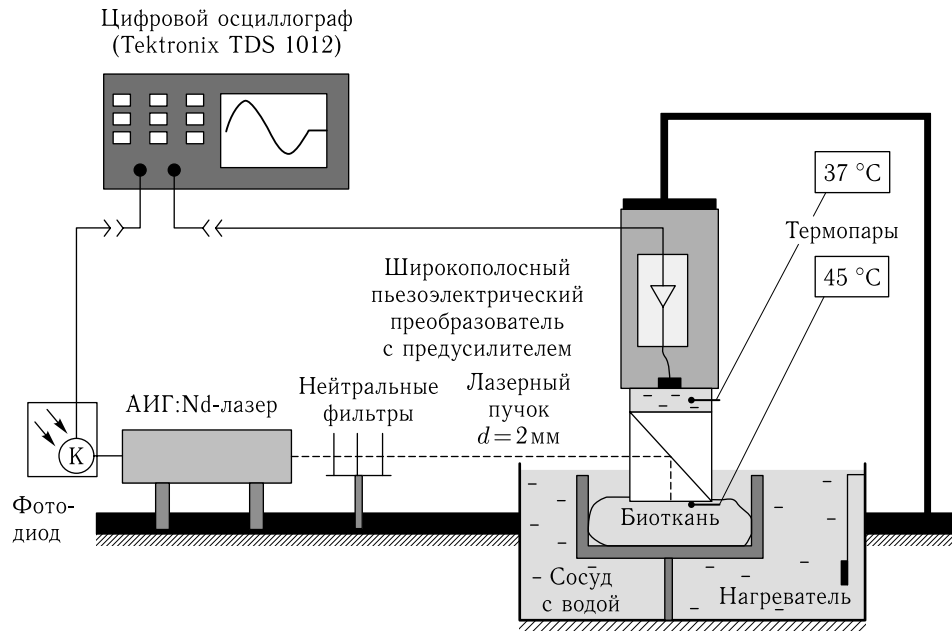


Рис. 4.30. Схема экспериментальной установки для ОА/ФА-контроля температуры биологических тканей при нагревании [1022]

трическом преобразователе и изменения его чувствительности в зависимости от температуры. Преобразователь с плавной переходной характеристикой в диапазоне частот 0,05–12 МГц и низкочастотной чувствительностью 845 мкВ/Па (с учетом 50-кратного усиления) был изготовлен из пленки ПВДФ толщиной 110 мкм. Зарегистрированный преобразователем сигнал записывался цифровым осциллографом (частота дискретизации — 1 ГГц, аналоговая частота — 100 МГц). Синхронизация работы системы осуществлялась с помощью фотодиода, расположенного за глубоким зеркалом лазера. После процедуры дегазации образцы биоткани закреплялись в держателе, который затем помещался в термостат с дистиллированной водой. Чтобы распределение температуры в образце было равномерным, нагрев образцов происходил достаточно медленно (примерно на $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 5–10 мин) при ее контроле термопарой.

Измеренные зависимости амплитуды ОА-сигнала от температуры для свиной печени, куриной мышечной ткани и свиного жира представлены на рис. 4.31. При остывании образцов мышечной ткани (рис. 4.31 а) от температуры, большей $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, амплитуда ОА-сигнала не возвращается в исходное значение, демонстрируя происходящие необратимые изменения в структуре ткани. Отличие температурных зависимостей для свиного жира (рис. 4.31 б) состоит в том, что амплитуда ОА-сигнала падает с увеличением температуры от $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. В случае охлаждения образцов от температуры выше $\sim 36\text{ }^{\circ}\text{C}$, наклон зависимостей становился более пологим по сравнению с тем, который наблюдается при нагреве. Это может свидетельствовать о модификации жировой ткани, по-видимому, при любых температурах, превышающих температуру живого организма, и может быть связано с температурно-индуцированным липолизом жировых клеток [1023]. Аналогично случаю мышечной ткани при остывании образцов печени (рис. 4.31 в) от температуры $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, характер зависимости повторял кривую нагрева в обратном направлении. При остывании образцов

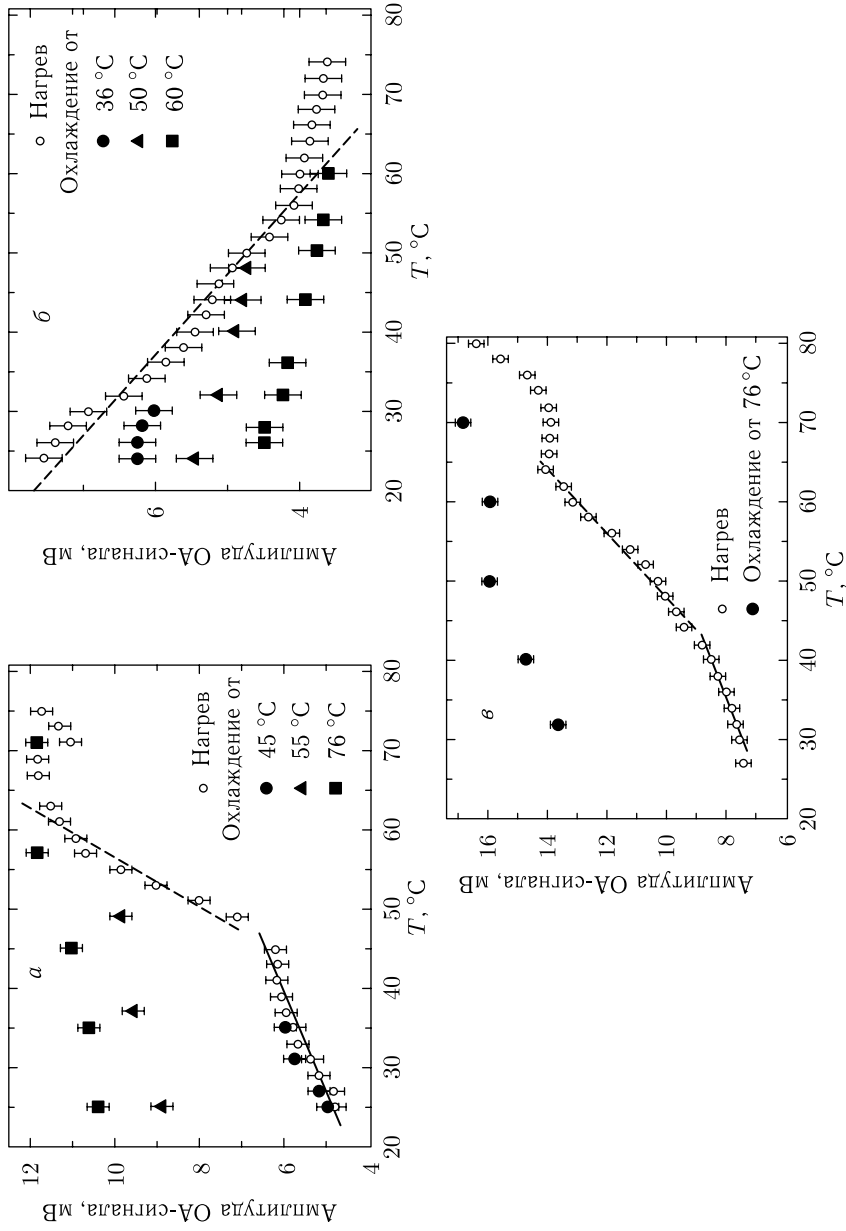


Рис. 4.31. Зависимость амплитуды ОА-сигнала от температуры для образцов куриной мышечной ткани (грудка) (а), свиной жировой ткани (б) и печени (в) при нагревании (незаполненные значки) и остывании (заполненные значки). Однако же заполненные значки показывают кривые остывания одного и того же образца от разных исходных температур. Для режима нагревания данные были аппроксимированы методом наименьших квадратов в виде одной или двух линейных функций в следующих температурных диапазонах: а — 25–45 °С и 46–63 °С; б — 25–65 °С; в — 25–42 °С (сплошная линия) и 42–62 °С (пунктирная линия) [1022]

от температуры больше 45 °С, зависимость амплитуды ОА-сигнала от температуры была линейной, причем коэффициент наклона прямой был меньше, чем при нагреве ткани.

Лазерный ОА/ФА-метод используется также для мониторинга охлаждения и замораживания биоткани [1024], что важно, например, для получения воспроизводимых результатов измерений оптических характеристик биоткани при определенном способе подготовки образцов (см. гл. 7), а также в некоторых терапевтических технологиях, например, для редукции жировых отложений.

4.11.5. Мониторинг лазерной абляции ткани. Еще одним важным применением ОА-метода с временным разрешением является мониторинг механического отклика и абляции биоткани под действием лазерных импульсов [884, 861, 862, 1025]. Была показана возможность использования ОА/ФА-метода для мониторинга лечения глаукомы методом лазерной циклофотокоагуляции [861]. Из описанных результатов следует, что ОА-метод является перспективным средством локализации ресничного тела и мониторинга процесса коагуляции. Для оптимизации лазерного лечения глазного дна была разработана неинвазивная ОА-методика мониторинга температуры глазного дна в реальном масштабе времени [862]. Было показано, что ОА-метод может быть использован для неинвазивного определения ретинальной температуры во время импульсного лазерного воздействия на глаза. Этот метод также может быть адаптирован для стационарной фотокоагуляции, фотодинамической терапии и транспупиллярной терапии, а также других офтальмологических методик, в которых происходит лазерный нагрев биоткани.

4.11.6. Цитометрия и визуализация *in vivo* сторожевых лимфоузлов. ОА/ФА-методы с использованием эндогенных хромофоров (например, меланина или гемоглобина) или синтетических наночастиц в качестве ФА-контрастных агентов демонстрируют исключительные возможности для визуализации опухолей *in vivo* с высоким разрешением в более глубоких тканях (до 3–5 см) по сравнению с существующими чисто оптическими методами [968, 897–898, 904, 1026–1047]. Кроме того, применение углеродных нанотрубок [1029], квантовых точек [1030], а также золотых углеродных нанотрубок (ЗНТ) [1031] и их кластеров с эффектом красного сдвига [971], успешно используется в проточной цитометрии *in vivo* на основе ОА/ФА-метода.

Возможности ОА/ФА-метода для оценки состояния сторожевых лимфатических узлов [936, 968, 1029, 1031, 1033–1035], а также многоцветного ФА-метода для обнаружения опухолевых клеток, распространяющихся по лимфатической системе [968], и количественного определения числа метастатических клеток, транспортируемых по лимфатическим сосудам в сторожевые лимфоузлы, были продемонстрированы с помощью модельных опухолей на животных [1033]. Было показано, что ФА-обнаружение метастазов в сторожевых лимфоузлах может быть интегрировано с уничтожением метастатических клеток на основе волоконно-оптической мультимодальной диагностическо-терапевтической платформы, использующей многоцветную ФА-лимфографию с временным разрешением, ФА-цитометрию лимфотока и фототермическую (ФТ) терапию [1033]. Микроскопическая ФА-визуализация на моделях животных с использованием красителя метиленового синего и наночастиц в качестве контрастных агентов была успешно применена для отображения лимфатических узлов, находящихся на глубине до ~3 см [936, 1034, 1035].

ОА/ФА-экспериментальная установка, как правило, собирается на основе микроскопа, например, такого как Olympus VX51, со встроенными модулями: ФА-волоконный модуль, ФТ-модуль, флуоресцентный модуль и модуль просвечивающей цифровой микроскопии (ПЦМ) [961, 968, 1026, 1031, 1033]. Импульсный параметрический

генератор света (ПГС) с длиной волны, перестраиваемой в диапазоне 420–2300 нм, длительностью импульсов ~ 8 нс и частотой повторения импульсов 10–50 Гц, диаметром пучка 10–100 мкм и плотностью энергии в диапазоне $1\text{--}10^4$ мДж/см² часто используется в качестве источника света. Диодные лазеры также применяются, например, лазер с длиной волны 905 нм, длительность импульса 15 нс, частотой повторения импульсов 10 кГц и плотностью энергии в диапазоне 0,01–0,7 Дж/см² был использован для обнаружения клеток меланомы. ФА-волны детектируются с помощью ультразвуковых преобразователей, например такого как модель 6528 101 (Imasonic Inc, Безансон, Франция) с частотой 3,5 МГц и диаметром 5,5 мм, затем усиливаются и регистрируются спомощью бокскар устройства и цифрового осциллографа (например, Tektronix TDS 3032B). Для обеспечения акустической и оптической связи между биотканью и преобразователем, как правило, используются УЗИ-гель или теплая вода.

В работе [968] с помощью двух последовательных лазерных импульсов разных длин волн: 850 нм (ПГС) и 639 нм (КР-лазер), с 10 мкс-задержкой между импульсами получали отображение лимфатического сосуда и идентифицировали наночастицы путем регистрации соответствующих ФА-волн. Доставка лазерного излучения к объекту исследования обычно осуществляется с помощью микроскопа или оптического волокна с диаметром сердцевины 400 мкм и фокусирующим наконечником, закрепленным в специальном держателе (см. рис. 4.32, цветная вклейка). Для расширения экспериментальных возможностей ФА-микроскоп комбинируют с ФТ-модулем [961]. В ФТ-модуле на основе эффекта тепловой линзы дефокусировка коллинеарного пробного пучка He-Ne-лазера измеряется с помощью точечной диафрагмы. Для проверки ФА/ФТ-данных и получения дополнительной информации используют также флуоресцентный модуль на основе цветной ПЗС-камеры (например, Nikon DXM1200). Для навигации лазерных пучков, а также распознавания анатомических микроструктур лимфоузлов служит ПЦМ-модуль высокого разрешения (~ 300 нм). ФА-отображения получают в условиях *ex vivo* и *in vivo* путем пространственного сканирования сфокусированного лазерного пучка или торца волокна по поверхности биоткани с помощью компьютерно управляемого столика микроскопа с общим временем сканирования 1–10 мин в зависимости от размера выборки.

Магнитные наночастицы (МНЧ), как хорошо известные лимфографические метки, так и новые золотые углеродные нанотрубки [1031], были использованы авторами работы [1033] в качестве ФА-контрастных агентов. Сферические МНЧ имели средний диаметр ~ 30 нм, покрытие из полиэтиленгликоля (ПЭГ) и ядро из Fe₂O₃. Специально разработанные полые однослойные углеродные наночастицы были покрыты тонким слоем золота, их средний размер составлял 12,8 нм (диаметр) \times 91,7 нм (длина). Такие частицы обладают высокой растворимостью в воде и биосовместимостью, низкой цитотоксичностью за счет наличия защитного слоя инертного золота вокруг частицы, а также имеют высокое плазмонное поглощение в ближнем ИК-диапазоне на длине волны 850 нм [1031]. Золотые наночастицы часто сопрягают с фолиевой кислотой, тогда они преимущественно накапливаются в опухолях молочной железы человека, а не в нормальных клетках эндотелия лимфатических сосудов.

В работе [1033] модельные опухоли меланомы прививались на ухо мыши путем инъекции 10^6 V16F10 клеток меланомы, растворенных в 50 мкл фосфатного буферного раствора (ФБР). Развитие заболевания в направлении метастатической фазы оценивалось по измерениям размера первичной опухоли, ФА-отображениям и гистологии. В ряде экспериментов, для того чтобы имитировать метастазы, клетки рака молочной железы вводили с помощью микрошприца непосредственно в лимфатические узлы.

ФА, микроскопические и гистологические Н&Е (гемаксилин-эозин) исследования лимфатических узлов проводились *in vivo* и *ex vivo* на первой и второй неделях после прививки опухолевых клеток меланомы (см. рис. 4.33 и 4.34, цветная вклейка) [1033]. Исследование сторожевых лимфоузлов и лимфатических сосудов *in vivo* выполнялось либо через неповрежденную кожу (неинвазивно), либо через небольшой разрез кожи, в проекции лимфоузла. При этом обеспечивался непосредственный контакт держателя волоконного световода с кожей или лимфатическим узлом. Для изучения лимфоузлов *ex vivo* они аккуратно вырезались из тела мыши и освобождались от жира и других окружающих тканей. Для уменьшения размытия лазерного пучка из-за рассеяния света в тканях лимфоузлов узлы на 5 мин помещались в гипертонические оптические просветляющие агенты (ОПА), такие как 40%-я глюкоза, 100%-й ДМСО, или 80%-й глицерин, которые существенно снижают рассеяние света в биотканях [6, 162, 163, 178, 200] (см. гл. 9).

Сочетание ФА-отображения метастазов сторожевого лимфоузла с просвечивающей цифровой микроскопией (ПЦМ) в режиме высокого разрешения (до 300 нм) позволяет оценить точное распределение и количество метастазов меланомы и область их лазерного разрушения [1033]. Чтобы оценить действие двух лимфатических бассейнов, суспензии наночастиц МНЧ и ЗНТ (каждая суспензия концентрации $\sim 10^{11}$ НЧ/мл в 5 мкл ФБР) вводили внутрикожно на кончике левого и правого ушей здоровых мышей ($n = 4$). Предварительные измерения ФА-спектров НЧ показали, что длина волны 639 нм является оптимальной для обеспечения лучшего ФА-контраста МНЧ в тканях и минимальной интерференции с ЗНТ, которые имеют максимум поглощения на 850 нм [1031]. Двухцветное ФА-отображение получали с помощью двух лазерных импульсов на 639 нм и 850 нм сначала сразу после инъекции, а затем периодически через каждые 10 мин в течение 5 ч. Совместная инъекция ЗНТ с красителем синий Эванса (Т-1824) (5 мкл) обеспечивала дополнительные возможности для визуализации лимфатических сосудов и лимфоузлов. Этот краситель с поглощением в видимой области спектра (~ 660 нм) был выбран, чтобы избежать помех от ЗНТ с максимумом поглощения в ближней ИК-области. Это исследование показало, что наночастицы быстро входят в лимфатические сосуды и мигрируют менее, чем за 3–5 мин, в левый и правый шейные лимфатические узлы на глубину 1–3 мм, что хорошо согласуется с наблюдением быстрого поглощения наночастиц лимфатической системой.

Амплитуда ФА-сигнала, возбуждаемая излучением с длиной волны 850 нм на поверхности в проекции лимфоузла до и после введения ЗНТ, увеличивалась от $1,5 \pm 0,2$ о. е. до $30,1 \pm 3,2$ о. е. (10 мин после инъекции, $p = 0,05$). В то же время амплитуда ФА-сигнала на длине волны возбуждения 639 нм увеличивалась от $2,2 \pm 0,3$ о. е. только до $8,7 \pm 0,9$ о. е. при введении МНЧ ($p = 0,01$). Это приводило к увеличению ФА-контраста (как отношение сигналов до и после введения в кожу над лимфоузлом) порядка ~ 20 для ЗНТ и ~ 4 для МНЧ на длинах волн 850 нм и 639 нм соответственно.

Возможности интегрированной ФА-платформы для оценки скорости распространения опухолевых клеток в лимфосистеме и состояния сторожевых лимфоузлов были впервые опробованы в модели опухоли меланомы [1033]. Меланома является злокачественным образованием, которое может быстро перейти в неизлечимую форму с метастазами. Обычные средства диагностики имеют высокую степень ложноотрицательных результатов ($\sim 25\%$) при выявлении положительных сторожевых лимфоузлов. С клинической точки зрения меланин является очень перспективным эндогенным ФА-контрастным агентом и обеспечивает в ближнем ИК-диапазоне ФА-сигналы от отдельных пигментных клеток меланомы выше фона от крови [968, 1026]. Мониторинг ФТ-сигналов от отдельных клеток В16F10 в суспензии (всего

300 клеток) продемонстрировал высокий уровень их неоднородности: 5–10% клеток с повышенной пигментацией давали ФТ-сигналы с амплитудой гораздо большей, чем все остальные клетки с меньшей пигментацией [1026]. Около $82 \pm 3,8\%$ опухолевых клеток обнаруживаются с помощью комбинированной ФТ/ФА-техники.

Инъекция красителя синий Эванса также используется для визуального различия афферентного лимфатического сосуда, который исключительно обеспечивает сбор лимфы из опухоли (рис. 4.33 *a*, сверху, выноски). Многочисленные (20–50) ФА-сигналы, индуцированные диодным лазером от одной и той же клетки меланомы, движущейся в потоке, регистрируются с помощью бокскар-системы и преобразуются в сигналы с шириной, определяемой временем пролета клетки через лазерный пучок. ФА-мониторинг пренодальных лимфатических сосудов и сторожевого лимфоузла в режиме реального времени показал, что количество метастатических клеток, продуцирующих редкие всплески ФА-сигнала, увеличивалось от $0,26 \pm 0,05$ кл/мин на первой неделе до $2,13 \pm 0,3$ кл/мин на второй неделе после прививки меланомы. По состоянию на первую неделю после прививки размер опухоли был равен $1,0 \pm 0,2$ мм² (рис. 4.33, верхний ряд, слева), при этом надежно определялись 493 ФА-сигнала, обусловленные отдельными меланомными клетками (отдельные пятна на изображении охватывают 6% от исследуемой области), которые образовывали три микрометастаза (раздельные скопления клеток) с ФА-контрастом $10,6 \pm 1,2$ (рис. 4.33, средний ряд, слева). Через две недели основной размер опухоли увеличился до $3,6 \pm 0,5$ мм² (рис. 4.33, верхний ряд, справа) и было обнаружено гораздо большее количество ФА-сигналов (3188 отдельных пятен на изображении охватывают уже 39% от исследуемой области) со средним контрастом $22,5 \pm 0,9$, в том числе 7–10 сигналов высокой интенсивности, которые свидетельствуют о наличии множественных метастазов (рис. 4.33, средний ряд, справа). Гистология этих узлов показала отсутствие метастазов на первой неделе (рис. 4.33, нижний ряд, слева), но только единичные метастазы были обнаружены на гистологии через две недели после прививки (рис. 4.33, нижний ряд, справа). Этот результат показывает уникальные возможности ФА-метода по выявлению метастазов на уровне единичных клеток с существенно улучшенной чувствительностью по сравнению с традиционной гистологией [968, 1026, 1033].

Селективное лазерное удаление метастазов в сторожевых лимфоузлах можно обеспечить при оптическом мониторинге с помощью просвечивающей цифровой микроскопии изображений раковых клеток молочной железы, помеченных конъюгатами ЗНТ/фолиевая кислота в процессе лазерной абляции путем детектирования линейного/нелинейного ФТ-отклика от живых/поврежденных клеток, и пропадания ФТ-сигнала после распада клетки под воздействием лазерного импульса высокой энергии [1033].

Также в качестве примера селективного лазерного воздействия на раковые клетки рис. 4.34 иллюстрирует лазерно-индуцированное локализованное повреждение сторожевого лимфоузла, содержащего микрометастазы меланомы, при различной плотности энергии излучения лазера, управляемой величиной генерируемого ФА-сигнала [1033].

4.11.7. ОА/ФА-датчики. Измерение скачка давления или смещения на поверхности биоткани чаще всего обеспечивается с помощью пьезоэлектрических датчиков [831, 832, 854]. Хотя пьезоэлектрические датчики обладают важными преимуществами — широкой полосой воспринимаемых частот и высокой чувствительностью, в ряде исследований *in vivo* предпочтительными являются оптические методы благодаря их бесконтактности (см. рис. 4.1) [846, 858–860]. В частности, описана бесконтактная оптическая интерферометрическая методика точного измере-

ния эффективной глубины ослабления оптического излучения в образце [859, 860]. Эта методика позволяет измерять с разрешением во времени смещение поверхности биоткани, возникающее из-за поглощения короткого лазерного импульса. Движение поверхности обусловлено релаксацией термоупругого напряжения, постоянная времени которой пропорциональна глубине ослабления оптического излучения в образце; величина расширения среды — функция энергетической экспозиции и термофизических свойств образца. Данная методика является дополнительной по отношению к интерферометрической фототермической спектроскопии, в которой эффективная глубина оптического затухания определяется по разрешенным во времени измерениям смещения поверхности в результате диффузии тепла, следующей за процессом релаксации термоупругого напряжения [882, 883]. В интерферометрической системе, описанной в работах [859, 860], используется высокоразрешающий интерферометр, способный регистрировать смещения на уровне нескольких ангстрем с наносекундным временным разрешением, что позволило обнаружить подповерхностные кровеносные сосуды в предплечье человека *in vivo*. Интерферометрическая система на основе фоторефрактивного кристалла описана в работе [945]. Широкополосная многоэлементная линейная волоконно-оптическая система для ФА-томографии разработана авторами [946].

Высокое разрешение и минимальные искажения изображений характерны для компьютерной ОА-томографии с круговым сканированием на полный оборот в 360 градусов, применимой к объектам с выпуклой геометрией, таким как мозг и женская молочная железа [856, 857, 890, 891]. Планарные отражательные методики [831, 832, 838, 850], хотя и не ограничены к применению формой исследуемого образца, однако страдают от довольно сильных ОА-волн, испускаемых оптическими поглотителями вблизи поверхности, такими как волосяные фолликулы или гранулы меланина в коже, акустические реверберации которых потенциально способны замаскировать значительно более слабый ОА-сигнал от структур, расположенных глубоко в биоткани. Микроскопическая отражательная ОА-визуализация с использованием темнопольного освещения предотвращает появление подобных искажений [891]. Высокое пространственное разрешение и высокая чувствительность были достигнуты при использовании высокочастотного ультразвукового преобразователя со сферической фокусировкой и большой числовой апертурой (NA), коаксиального и конфокального по отношению к оптическому облучению. Сочетание широкополосности и большой числовой апертуры обеспечивает высокое разрешение акустического приемника, однако увеличение частоты ограничено соответствующим уменьшением глубины проникновения акустической волны (затухание в биоткани составляет 0,7–3 дБ/см/МГц). Поэтому для исследований кожи крысы *in vitro* и *in vivo* авторы работы [891] использовали ОА-датчик с большой числовой апертурой (NA = 0,44) и частотным диапазоном от 32,5 до 67,5 МГц. Такие параметры ОА-датчика обеспечивают поперечное разрешение 45–120 мкм (определяемое NA) и аксиальное разрешение ~ 15 мкм (определяемое частотным диапазоном). Система может отображать контраст оптического поглощения до глубины в 3 мм.

Основная техническая трудность измерения ОА-профилей с временным разрешением связана с обеспечением приема акустических сигналов без искажений. Такой прием должен обладать одновременно высоким временным разрешением, равным или выше длительности лазерного импульса, и широкой полосой частот, простирающейся вплоть до низкочастотного ультразвука [831]. Широкополосные пьезоэлектрические преобразователи с короткозамкнутыми или незамкнутыми рабочими режимами, будучи низкошумящими приемниками, оказались наиболее подходящими для этой цели. Преобразователь, работающий в короткозамкнутом режиме, имеет значительную толщину, которая больше пространственной протяженности детекти-

руемого ультразвукового импульса. Толщина преобразователя ограничивает нижний предел детектируемых ультразвуковых частот и временную ширину окна детектирования. Чрезмерная толщина пьезоэлемента 1) приводит к более выраженной акустической дифракции на более низких ультразвуковых частотах в детектируемом сигнале; 2) снижает электрическую емкость до значений ниже электрической емкости электронной схемы. Трудно проектировать акустические преобразователи, работающие в короткозамкнутом режиме, для регистрации ОА-импульсов длительностью более 1–2 мкс. Однако эти преобразователи могут быть оптимальными для регистрации субмикросекундных и наносекундных ОА-сигналов. Верхний предел ультразвуковой частоты определяется временем разряда емкости преобразователя. Ширина полосы детектирования ультразвука может достигать нескольких сот мегагерц. Этот тип преобразователей не требует подложки для уменьшения резонансных вибраций.

Для акустических преобразователей, работающих в незамкнутом режиме, толщина пьезоэлектрического элемента обязательно должна быть меньше, чем наименьшая детектируемая акустическая длина волны [831]. Нижний предел детектируемых ультразвуковых частот определяется временем разряда электрической емкости преобразователя через входное сопротивление электронного предусилителя. Для проектирования акустических преобразователей, работающих по незамкнутой схеме с очень широкой полосой ультразвукового детектирования (≥ 100 МГц), нужно использовать пьезоэлектрические элементы толщиной несколько микрометров. Выбор соответствующего материала подложки является ключевым для расширения полосы частот. Проектирование слоя подложки, акустически согласованного с пьезоэлектрическим материалом, для эффективного подавления резонансов преобразователя является одной из наиболее важных технических проблем. Чувствительность преобразователей, работающих в незамкнутом режиме, выше, чем у работающих в короткозамкнутом режиме, благодаря более длительной задержке электрического заряда в пьезоэлементе.

Другая техническая трудность в обеспечении высокого временного разрешения при детектировании профилей ОА-импульсов состоит в необходимости точной установки лицевой поверхности детектора по отношению к волновому фронту входящего оптоакустического сигнала [831]. Очевидно, что разница во времени прихода лазерно-индуцированного импульса давления на разные края пьезоэлектрического элемента должна быть меньше, чем временное разрешение такого преобразователя. Поэтому угол между направлением распространения волнового фронта импульса давления и нормалью к пьезоэлектрическому детектору должен быть настолько мал, насколько это возможно. Например, для достижения временного разрешения $\Delta\tau \sim 10$ нс волна давления должна падать под углом менее чем ~ 3 мин при апертуре приемника ~ 3 мм.

Наибольшая пьезоэлектрическая эффективность для широкополосного пьезоэлектрического детектирования может быть достигнута с помощью пьезокерамик, например PZT-5Н [831]. Несколько более низкую чувствительность обеспечивает поливинилденефлуорид (ПВДФ) или его сополимеры. Кварц и ниобат лития имеют существенно более низкую чувствительность для широкополосного детектирования ультразвука.

Низкий акустический импеданс, такой же как у биологических тканей, делает ПВДФ подходящим материалом для зондирования в медицине и биологии [831]. Проектирование эффективных подложек для ПВДФ-преобразователей не представляет трудностей, что позволяет устранять реверберации детектируемого ОА-сигнала внутри пьезоэлемента.

Существует много схем широкополосных акустических и ОА-преобразователей, которые могут быть использованы для разнообразных приложений в биомедицине (см. рис. 4.3) [831, 840, 891]. Двумерные ОА-изображения получаются либо с применением стационарной линейки акустических преобразователей, либо путем сканирования одного преобразователя по поверхности биоткани [832]. Дугообразная линейка, состоящая из 32 сверхширокополосных пьезоэлектрических преобразователей размером $1 \times 12,5$ мм с расстоянием 3,85 мм между элементами, описана в работе [832]. Для обеспечения возможности работы в широкой полосе ультразвуковых частот использовался пьезоэлектрический полимер ПВДФ толщиной 110 мкм. Преобразователи были смонтированы вдоль дуги радиуса 60 мм. Такая геометрия обеспечивала оптимальное разрешение по всему полю зрения 60×60 мм в плоскости изображений. Форма и длина отдельных пьезоэлементов определяет пространственное разрешение этой линейки в плоскости, перпендикулярной плоскости изображений. Использованные плоские элементы обеспечивали разрешение, равное линейному размеру элемента. Данная 32-элементная линейка использовалась для получения двумерных изображений опухолей молочной железы [832]. Два изображения на двух различных длинах волн 1064 и 757 нм были последовательно получены при облучении шестьюдесятью импульсами длительностью 100 нс на каждой из длин волн на протяжении 0,8 с. Реконструкция изображения занимала около 1 с. Разрешение изображения составляло ~ 1 мм в глубину и 1,5 мм в поперечном направлении, что сравнимо с разрешением рентгеновской маммографии и УЗИ.

Трехмерное ОА-изображение можно получить с помощью системы, спроектированной LaserSonix Technologies, Inc. и основанной на бифокальной линейке из 64 пьезоэлектрических преобразователей и 64 соответствующих каналов сбора данных [832]. Эта система имеет скорость сбора данных, близкую к режиму реального времени, и обработку данных, обеспечивающую разрешение около 3 мм в плоскости, перпендикулярной плоскости изображений, так что можно визуализировать тонкие фронтальные слои молочной железы. Полные трехмерные изображения можно реконструировать путем слияния шестидесяти двумерных слоев. Была также разработана быстрая ОА-система визуализации на основе линейной матрицы из 320 преобразователей [914].

Когда требуется сверхвысокое разрешение на клеточном или субклеточном уровне, можно применить конфокальный ОА-преобразователь высокого разрешения, обеспечивающий подповерхностную визуализацию в режиме сканирования [832]. Сверхширокая полоса ультразвукового детектирования, реализуемая в преобразователях с регистрацией ОА-сигнала от передней облучаемой лазером поверхности объекта, дает разрешение по глубине, близкое к 15 мкм. При фокусировке падающего оптического пучка достигается также сравнимое по величине поперечное разрешение. Конфокальный ОА-преобразователь обеспечивает острую фокусировку оптического пучка и длинную прямую область перетяжки акустического пучка в ультразвуковой системе регистрации. Распределения сфокусированного света и акустика ультразвукового детектирования определяют измеряемый объем для конфокального преобразователя.

Другая модификация ОА-датчика, использованная в отражательной темнопольной системе визуализации, содержащей оптический волоконный световод, установленный коаксиально фокусирующему ультразвуковому преобразователю и присоединенный к вогнутой линзе, описана в работе [891]. Проблему исследования *in vivo* целиком тела мелких животных решает система ФА-томографии на основе кольцевого конфокального ФА-датчика [1048].

Следует отметить развитие ФА-технологии в направлении эндоскопии и внутрисосудистой томографии [947–951]. В частности в работе [951] описана коаксиаль-

ная система с кольцевой линейкой ФА-преобразователей. Описание разнообразных ОА/ФА-зондов, пригодных и/или уже опробованных в ОА/ФА-спектроскопии и визуализации биологических тканей и крови, можно найти в работах [885, 888, 889, 914–918, 921, 923, 925, 926, 929, 931, 932, 934, 997, 998, 1004, 1005].

4.12. Заключение

Нестационарные ОТР/ФТР-, ОТ/ФТ- и ОА/ФА-методы хорошо подходят для мониторинга оптических и тепловых свойств различных биотканей человека *in vitro* и даже *in vivo* и *in situ*. В частности, может быть измерено содержание воды, оценена поверхностная концентрация и скорость диффузии местно применяемых веществ (лекарственных и солнцезащитных препаратов, например) [833, 863–865].

Использование импульсных ОА/ФА- и ОТР/ФТР-методов хорошо подходит для экспериментов *in vivo* и *in situ*. Оптотермический и оптотермоупругий отклики живой ткани на возбуждение лазерным импульсом составляют основу нового подхода в медицинской томографии, который сочетает в себе возможности оптического, теплового и акустического зондирования биоткани и лежит в основе ОА/ФА-томографии [831, 832, 837–839, 843, 846, 848–857, 890, 894–898, 906, 909–913, 918–944], микроскопии [834, 877, 897, 904–908, 938, 939, 944, 1049, 1050] и эндоскопии [947–952].

Предложены разнообразные методы визуализации биотканей на основе взаимодействия ультразвуковых и световых пучков в неоднородной среде, возникающего из-за изменения оптических свойств биоткани при ее сжатии ультразвуком [890, 974–981]. Это так называемые акустооптические (АО) взаимодействия и технологии визуализации.

В ОА/ФА- и АО-сигналы вносят вклад любые (однократно или многократно) рассеянные фотоны, поэтому глубина, с которой можно получить изображение, увеличивается по сравнению с чисто оптическими методами, использующими детектирование только баллистических или квази-баллистических фотонов, такими как, например, ОКТ или конфокальная микроскопия.

ОА/ФА- и АО-томографии (ОАТ/ФАТ и АОТ) обеспечивают [890]: 1) сочетание высокого оптического контраста и высокого акустического разрешения; 2) возможность одновременной функциональной визуализации степени оксигенации и объема крови; 3) высокое значение отношения глубины зондирования к разрешению; 4) отсутствие искажений, связанных со спеклами; 5) возможность изменять разрешение и глубину расположения анализируемого слоя ткани путем вариации частоты звука; 6) возможность одновременно получать ОАТ/АОТ-изображения и чисто ультразвуковые изображения одних и тех же слоев биоткани для повышения диагностической значимости; 7) применение неионизирующих лазерных и ультразвуковых излучений в пределах норм безопасности для биологических тканей.

Однако ОАТ/ФАТ и АОТ имеют некоторые ограничения, по большей части связанные с использованием ультразвуковой технологии. К ним относятся: контактность измерения, которая необходима для обеспечения акустической связи, и сильные абберации волнового фронта ультразвуковой волны, индуцируемые неоднородными биотканями и органами. В случае высокой акустической однородности одновременная регистрация ультразвукового изображения может быть полезна для получения информации об акустических свойствах среды, необходимых для реконструкции изображения в ОАТ/ФАТ и АОТ.

ОА/ФА-технологии с использованием сигналов от эндогенных хромофоров (меланина и гемоглобина) или экзогенных красителей и наночастиц обеспечивают визуализацию опухолей *in vivo* с высоким разрешением на глубине до 3–5 см [968,

897–898, 904, 1026–1047]. ФА-контрастные синтетические наноматериалы, такие как, например, углеродные нанотрубки [1029], квантовые точки [1030] и золотые углеродные нанотрубки [1031] успешно используются в проточной цитометрии *in vivo*.

Потенциальные возможности ОА/ФА-метода для мониторинга сторожевых лимфоузлов и количественной характеристики миграции опухолевых клеток по лимфатической системе были успешно продемонстрированы с помощью модельных опухолей на животных [936, 968, 1029, 1031, 1033–1035].

Как отмечено в работе [895], с помощью ФАТ можно создавать многомасштабные многоконтрастные изображения живых биологических структур, начиная от органелл до органов и даже целых мелких животных. Как правило, достижимо пространственное разрешение порядка $1/200$ от желаемой глубины изображения, которое может достигать до 7 см. ФАТ обеспечивает анатомические, функциональные, метаболические, молекулярные и генетические контрасты для наблюдения сосудистой гемодинамики, кислородного обмена, биомаркеров и экспрессии генов.

В работе [1048] описана новая система кольцевой конфокальной ФА-компьютерной томографии для получения изображений целиком всего тела мелких животных, использующая конфокальное устройство кольцевого освещения в свободном пространстве и 512-элементный полнокольцевой линейный приемник ультразвуковых сигналов. Освещение через свободное пространство максимально увеличивает эффективность доставки света, а полнокольцевое детектирование ФА-сигнала обеспечивает полное двумерное поле зрения, необходимое для точной реконструкции изображения. Использование цилиндрических фокусирующих элементов линейки позволяет получать изображение тонкого поперечного сечения в плоскости с размерами от 0,10 до 0,25 мм со скоростью 1,6 с/кадр. Путем перемещения мыши в вертикальном направлении получают серию изображений различных сечений головного мозга, печени, почек и мочевого пузыря.

ФА-микроскопия (ФАМ) субмикронного разрешения в связи с техническими трудностями, обусловленными необходимостью сочетания высокой числовой апертуры (НА) оптического освещения с высокими значениями НА при акустическом детектировании, как правило, работает в режиме просвечивания. Поперечное пространственное разрешение ФАМ в режиме отражения обычно более 2 мкм для видимого диапазона длин волн. Однако новое компактное устройство на основе параболического зеркала для фокусировки и отражения ФА-волн позволило впервые обеспечить субмикронное разрешение ФАМ, работающего в режиме отражения [1049]. Таким способом был осуществлен сбор достаточного количества сигналов для обеспечения хорошей чувствительности без искажения оптической фокусировки. В результате для длины волны возбуждения, равной 532 нм, было достигнуто поперечное разрешение порядка $\sim 0,5$ мкм при оптической числовой апертуре NA 0,63. Измеренная максимальная глубина проникновения в оптически-рассеивающие мягкие биоткани составила $\sim 0,42$ мм, а осевое разрешение ~ 15 мкм. ФАМ субмикронного разрешения предназначена для получения изображений *in vivo* оптического поглощения на субклеточном уровне [1049].

Для неинвазивной визуализации клеточных ядер *in vivo* без предварительного окрашивания ткани была разработана ультрафиолетовая система ФАМ [1050]. Система была апробована в исследованиях *in vivo* биоткани ушей мыши при получении изображений *en face* кожи. Оптимальная длина волны ультрафиолетового излучения для получения контрастных ФА-изображений клеточных ядер оказалась равной 250 нм. Возбуждение на других близких длинах волн в диапазоне между 245 и 275 нм также позволяло получать ФА-изображения клеточных ядер с характерным положительным и высоким контрастом.

Новая трех-модальная система для получения изображений молочной железы человека была разработана путем интеграции ФА- и термоакустического (ТА-) методов визуализации с модифицированным коммерческим ультразвуковым сканером [1051]. В системе свет (возбуждение ФА) доставлялся с помощью оптической сборки, помещенной в микроволновую антенну (возбуждение ТА). Чередующиеся лазерные и микроволновые импульсы возбуждения обеспечивали параллельный сбор данных ФА- и ТА-сигналов со скоростью 10 кадр/с. Использование ФА-контраста за счет эндогенного гемоглобина цельной крови позволило авторам получить максимальную глубину зондирования для ФА-томографии в ткани куриной грудки порядка 6,6 см, а при использовании раствора экзогенного красителя метиленового синего — 8,4 см для 7 мм-трубки, заполненной красителем с концентрацией 30 мМ. Максимальная глубина зондирования для ТА-томографии в слое свиного жира с размещенной внутри заполненной водой трубкой диаметром 13 мм составила 4,4 см. Осевое, поперечное и вертикальное разрешение для ФАТ было соответственно равно 640 мкм, 720 мкм и 3,5 мм. Система является перспективной для клинического применения при получении изображений раковых опухолей молочной железы.

Полностью оптический ФА-сканер для получения изображений *in vivo* развивающейся сосудистой сети опухоли и мониторинга разрушающего эту сеть действия терапевтических препаратов описан в работе [1052]. Сканер использует ультразвуковой датчик Фабри–Перо на основе полимерной пленки для регистрации ФА-волн и соответствующий алгоритм реконструкции изображений. С помощью этой системы без каких-либо экзогенных меток были получены *in vivo* 3D-изображения опухолей целиком на глубине почти до 10 мм с пространственным разрешением менее 100 мкм. Это дало возможность наблюдать особенности развития сосудистой системы опухоли, такие как извилистость сосудов, их проницаемость, а также их некроз под действием терапевтических препаратов.

ФА-метод является перспективным для диагностики в офтальмологии [1053, 1054] и мониторинга абляции тканей глаза [1025]. В частности, в диагностике он может использоваться для ФА-ангиографии глаза, свободной от применения каких-либо экзогенных меток [1053], или в офтальмоскопии для получения *in vivo* изображений сетчатки [1054].

Комбинация ФА-метода с УЗИ имеет большие возможности для визуализации окружающих анатомических структур предстательной железы во время процедуры брахитерапии [1055].

В работе [1056] описана ЭКГ-синхронизированная ФАМ-система для неинвазивной количественной оценки скорости пульсовой волны в периферических сосудах живых мышей. Авторы обнаружили линейную корреляцию между скоростью пульсовой волны и диаметром сосуда, что согласуется с известными физиологическими явлениями. Скорость распространения пульсовой волны является важным физиологическим параметром, характеризующим состояние сосудистой системы.

ФА-проточная цитометрия *in vivo* для мониторинга клеток и контрастных веществ, циркулирующих в кровеносных и лимфатических сосудах, в настоящее время представляет собой хорошо отработанную технологию [899, 900, 968, 1026, 1027, 1029–1032]. Описание ее принципов и приложений для детектирования *in vivo* и анализа в режиме реального времени циркулирующих клеток (их скорость, морфология, деформируемость, взаимодействие со стенкой сосуда и между собой и т. д.), болезнетворных микроорганизмов, наночастиц и красителей можно найти во многих публикациях (см., например, работы [899, 900, 968, 1029]).

Различные типы наночастиц используются в качестве ФА-контрастных агентов в ряде биомедицинских приложений, таких как цитометрия *in vivo*, визуализация лимфатических узлов и опухолей и сердечно-сосудистая динамика [1027–1047].

В частности, квантовые точки [1030] и покрытые золотом углеродные нанотрубки используются в качестве мультимодальных ФА- и ФТ- высококонтрастных молекулярных агентов [1031]. Наночастицы также применяются для магнитного обогащения *in vivo* и мультиплексного ФА-детектирования циркулирующих опухолевых клеток [1032]. В рамках единой технологии *in vivo* ФА-обнаружение меченных наночастицами метастазов в сторожевых лимфоузлах может сопровождаться фототермическим разрушением обнаруженных небольших скоплений раковых клеток вплоть до единичных клеток [1033]. Золотые наноклетки и наностержни, чувствительные в ближней ИК-области, являются надежными маркерами для получения ФА-отображений сторожевых лимфоузлов [1034, 1035]. Многоволновая ФА-визуализация с помощью плазмонных золотых наночастиц важна для селективного обнаружения рака [1028, 1037]. Сверхвысокая чувствительность углеродных нанотрубок, используемых в качестве ФА-молекулярных агентов для визуализации в живых организмах, показана в работах [1039, 1040]. Полые золотые наносферы эффективно применяются для получения высоко-контрастных ФА-изображений сосудистой системы живого мозга мыши [1042].

Для адресной доставки наночастиц к раковым клеткам при молекулярной ФАТ *in vivo* меланомы использовали биоконъюгаты золотых наноклеток [1043]. Мульти-спектральная ФАТ позволяет в реальном времени получать динамические изображения сердечно-сосудистой системы и циркулирующих золотых наностержней [1046, 1047]. Многофункциональные нанозонды используются для повышения эффективности ОКТ в сочетании с ФА-визуализацией [1045].

Глава 5

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ И НЕУПРУГОЕ РАССЕЯНИЕ СВЕТА

Обсуждаются физические основы флуоресценции и неупругого рассеяния света, включая многофотонную флуоресценцию, колебательную спектроскопию и спектроскопию комбинационного рассеяния (КР) в приложениях к оптической биопсии и визуализации биологических тканей и клеток.

5.1. Флуоресценция

Одним из фундаментальных механизмов взаимодействия света с биологическими тканями и клетками является люминесценция, которая подразделяется на флуоресценцию, соответствующую разрешенному оптическому переходу со сравнительно большим квантовым выходом и малым (наносекунды) временем жизни, а также фосфоресценцию, соответствующую «запрещенному» переходу с низким квантовым выходом и большим временем распада порядка нескольких микро- или миллисекунд [1057–1059]. С точки зрения биомедицинских приложений флуоресценция является одним из основных явлений, используемых в оптической биопсии для неинвазивной диагностики и мониторинга состояния биотканей и клеток, обеспечивающих диагностику на молекулярном уровне, а также для получения функциональных изображений биотканей и органов [1, 6, 31, 92, 98, 129, 130, 134, 135, 141, 253, 312, 347, 349, 350, 476, 481, 493, 783, 787, 789, 1057–1069].

Поглощение света связано с электронным переходом из основного состояния в возбужденное состояние молекулы. В результате свет, проходящий через слой толщины d , ослабляется как [1058]

$$I(\lambda) = I_0 \exp(-\mu_a d) = I_0 10^{-\varepsilon_\lambda c_{ab} d}, \quad (5.1)$$

где $I(\lambda)$ — интенсивность прошедшего света, I_0 — интенсивность падающего света, ε_λ — молярный коэффициент экстинкции, а c_{ab} — концентрация поглощающих молекул. В рассеивающих образцах коэффициенты поглощения μ_a и рассеяния μ_s (опущенный в уравнении (5.1)) суммируются, обуславливая последующее ослабление проходящего света, как подробно описано в предыдущих главах.

Флуоресценция возникает после поглощения света и связана с электронным переходом из возбужденного состояния молекулы в основное состояние. Ее интенсивность (квантовый поток) дается выражением [1058]

$$I_F(\lambda) = I_0 [1 - 10^{-\varepsilon_\lambda c_{ab} d}] \eta_F \Omega / 4\pi, \quad (5.2)$$

где η_F — квантовый выход флуоресценции, а Ω — телесный угол, в котором регистрируется изотропное излучение флуоресценции (угловая апертура приемника). В случае тонких образцов, например клеточных монослоев или образцов биопсии толщиной несколько микрометров, выражение (5.2) имеет приближенный вид

$$I_F(\lambda) = I_0 \ln 10 \varepsilon_\lambda c_{ab} d \eta_F \Omega / 4\pi. \quad (5.3)$$

Видно, что интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации и квантовому выходу флуоресценции поглощающих молекул. В рассеивающих средах длина пробега рассеянных и нерассеянных фотонов внутри образца различны, и выражения (5.2) и (5.3) требуют модификации. Однако в практически однородных тонких образцах линейная связь между I_F , c_{ab} и η_F сохраняется.

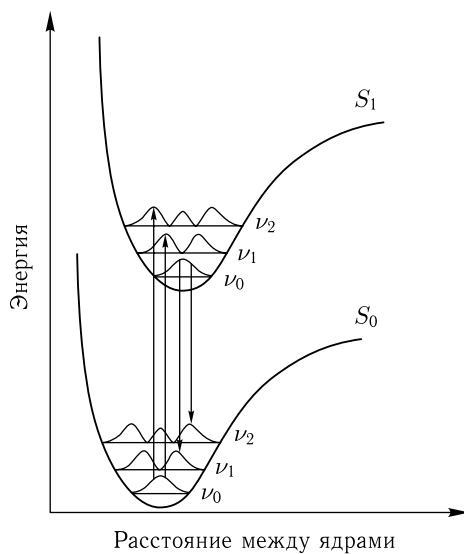


Рис. 5.1. Диаграмма потенциалов электронных состояний (S_0 , S_1) и колебательных уровней (ν_i). Показаны колебательные волновые функции и оптические переходы (возбуждение: $S_0\nu_0 \rightarrow S_1\nu_n$; флуоресценция: $S_1\nu_0 \rightarrow S_0\nu_n$) [1058]

Энергии электронных состояний молекулы являются сложными функциями межъядерных расстояний, обычно образующими «потенциальные ямы», как показано на рис. 5.1 для основного (S_0) и первого возбужденного (S_1) состояний. Каждая яма содержит большое число колебательных уровней энергии ν_i , каждый из которых расщеплен на многочисленные вращательные подуровни (не показанные на рис. 5.1). Электронный переход происходит в «вертикальном направлении», так как за его короткое время положение ядер не успевают измениться (принцип Франка-Кондона). Электронные переходы обычно происходят из основных вибронных состояний (для возбуждения S_0 и ν_0 , для флуоресценции S_1 и ν_0). Вероятность каждого перехода пропорциональна квадрату дипольного момента перехода и определяется перекрытием соответствующих колебательных волновых функций в основном и возбужденном электронных состояниях молекулы. Таким образом, спектры поглощения и флуоресценции получаются в результате наложения нескольких переходов, что часто приводит к образованию широких спектральных полос. Из рис. 5.1 можно заключить, что так называемый 0-0-переход между самыми низкими колебательными уровнями лишь слегка выражен, поскольку перекрытие соответствующих волновых функций мало. По этой причине спектр флуоресценции всегда сдвинут в сторону более низких энергий ΔW , что соответствует большим длинам волны $\lambda = \Delta W/hc$ по сравнению со спектром поглощения или возбуждения (h — постоянная Планка, c — скорость света). Это явление называется стоксовым сдвигом.

Если не рассматривать зависимость энергии электронных состояний от координат ядер, то различные состояния молекулы можно проиллюстрировать с помощью диа-

граммы Яблонского, как показано на рис. 5.2. Возбуждение обычно происходит из основного синглетного состояния S_0 на различные вибронные уровни возбужденных синглетных электронных состояний S_n , откуда быстрые безызлучательные переходы («внутренняя конверсия») за времена порядка фемтосекунд переводят молекулу в наинижнее возбужденное синглетное состояние S_1 . Из S_1 , могут произойти различные переходы: флуоресценция с переходом в основное состояние S_0 (включая его колебательные подуровни) со скоростью k_F , внутренняя конверсия в основное состояние S_0 (скорость k_{IC}), интеркомбинационный переход из синглетного в триплетное состояние T_1 (скорость k_{ISC}) и безызлучательный перенос энергии на соседнюю молекулу (скорость k_{ET}). Все эти скорости складываются

$$k = k_F + k_{IC} + k_{ISC} + k_{ET} = 1/\tau, \quad (5.4)$$

определяя время жизни τ возбужденного состояния S_1 . Отношение k_F/k соответствует квантовому выходу флуоресценции η_F . Хотя оптическая спектроскопия позволяет напрямую отслеживать только излучательные переходы, изменения k_{IC} или k_{ET} часто можно получить из результатов измерения времени жизни флуоресценции. Следует заметить, что радиационный переход $T_1 \rightarrow S_0$ запрещен по спине, и лишь у небольшого числа отдельных молекул заметно проявляется себя.

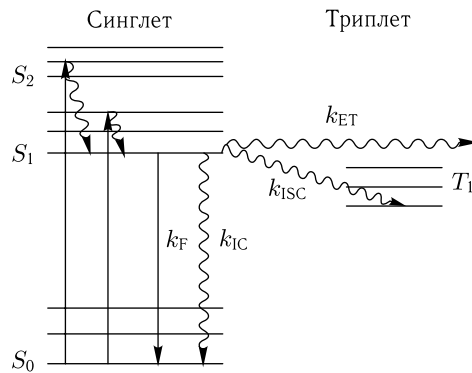


Рис. 5.2. Диаграмма Яблонского энергетических уровней молекулы и скоростей переходов. Прямые линии — радиационные переходы, волнистые линии — безызлучательные переходы [1058]

Дипольные моменты переходов имеют определенную ориентацию относительно молекулы. При возбуждении линейно поляризованным светом преимущественно возбуждаются те молекулы, у которых дипольные моменты переходов параллельны вектору электрического поля падающего света. Это селективное возбуждение определенным образом ориентированных молекул приводит к частичной поляризации флуоресценции, которая описывается степенью поляризации (см. формулу (2.20))

$$P_{FL} = \frac{I_{F\parallel} - I_{F\perp}}{I_{F\parallel} + I_{F\perp}} \quad (5.5)$$

или анизотропией флуоресценции [1057]

$$r_F = \frac{I_{F\parallel} - I_{F\perp}}{I_{F\parallel} + 2I_{F\perp}}, \quad (5.6)$$

где $I_{F\parallel}$ и $I_{F\perp}$ — интенсивности компонентов флуоресценции, поляризованных параллельно или перпендикулярно электрическому вектору возбуждающего поля, соответственно. Обычно R_{FL} и r_F зависят от интервала времени между возбуждением и регистрацией флуоресценции, поскольку за время жизни возбужденных состояний многие молекулы меняют свою ориентацию за счет вращения («вращательная диффузия»). Из измерений анизотропии флуоресценции с временным разрешением можно определить постоянную времени вращательной диффузии, связанную с объемом молекулы V_M и вязкостью окружающей среды η соотношением

$$\tau_r = \frac{\eta V_M}{k_B T}, \quad (5.7)$$

где k_B — постоянная Больцмана, а T — абсолютная температура. Постоянная времени вращательной диффузии около 13 нс соотносится с молекулярным весом белков около 50000 Да [1057], а постоянная времени около 300 пс была приписана агрегированным разновидностям фотосенсибилизирующего порфирина (протопорфирина) с диаметром 1,6 нм [1058].

При возбуждении биологических объектов ультрафиолетовым светом ($\lambda \leq 370$ нм) можно наблюдать флуоресценцию как белков, так и нуклеиновых кислот — это так называемая автофлуоресценция (АФ) или собственная флуоресценция биологического материала. Квантовый выход флуоресценции всех составляющих нуклеиновых кислот имеет величину около 10^{-4} – 10^{-5} , что соответствует временам жизни возбужденных состояний порядка пикосекунд. Автофлуоресценция белков определяется аминокислотами, фенилаланином, тирозином и триптофаном с максимумами поглощения на 257 нм, 275 нм и 280 нм соответственно и максимумами испускания между 280 нм (фенилаланин) и 350 нм (триптофан) [1057–1059]. В спектре излучения белков обычно доминирует триптофан. Флуоресценция коллагена и эластина возбуждается между 300 и 400 нм и демонстрирует широкие полосы испускания между 400 и 600 нм с максимумами около 400 нм, 430 нм и 460 нм. В частности, флуоресценция коллагена и эластина может использоваться для распознавания различных типов биотканей, например эпителиальной и соединительной [31, 92, 98, 1058, 1059, 1064–1069].

Восстановленная форма кофермента никотинамидадениндинуклеотида (НАД·Н) селективно возбуждается в диапазоне длин волн между 330 и 370 нм. Кофермент НАД·Н сконцентрирован, в основном, в митохондриях, где он окисляется внутри дыхательной цепи, локализованной во внутренней митохондриальной мембране, и поэтому его флуоресценция является подходящим параметром для обнаружения ишемических или опухолевых тканей [1058, 1069]. Было показано, что флуоресценция свободного или связанного с белком НАД·Н чувствительна к концентрации кислорода. Флавиномононуклеотид (ФМН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД) с максимумами возбуждения около 380 нм и 450 нм также дают вклад в собственную флуоресценцию клетки [1058].

Молекулы порфиринов, например протопорфирин, копропорфирин, уропорфирин или гематопорфирин имеют отношение к биосинтезу гемоглобина, миоглобина и цитохромов. Аномалии синтеза гема, возникающие в случаях порфирии и некоторых других гемолитических заболеваний, могут вызывать значительное повышение уровня порфирина в биотканях. Многие бактерии, например *Propionibacterium acnes*, или бактерии внутри зубного налета (биопленки), такие как *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* и *Prevotella nigrescens*, накапливают значительные количества эндогенного протопорфирина [1070, 1071]. Поэтому диагностика и мониторинг кожного акне (угревой сыпи) [1070], других воспалительных патологий кожи [1072,

1073], поражений ротовой полости и зубов [1071, 1074, 1075] на основе измерений собственной флуоресценции оказывается перспективным методом.

Был выполнен ряд исследований по теоретическому компьютерному моделированию и экспериментальному анализу распределения интенсивности флуоресценции с учетом эффектов рассеяния света [350, 1076–1084]. В частности, в работе [1077] описана диффузионная теоретическая модель флуоресценции биоткани, учитывающая пространственное распределение излучения и зависимость концентрации флуорофора от глубины. В работе [1078] представлены трехмерные фантомы эпителиальной ткани, предназначенные для исследований с помощью флуоресцентной спектроскопии, например изучения образования сшивок в коллагене или развития методов флуоресцентной диагностики рака. Обсуждались некоторые особенности флуоресцентной томографии ближнего ИК-диапазона, такие как реконструкция трехмерных изображений на основе разбросанных и зашумленных наборов данных [1079] и определение положения флуоресцентных объектов, глубоко погруженных в биоткань [1080]. Разработано несколько экспериментальных подходов для восстановления свободной от рассеяния флуоресценции по наблюдаемой флуоресценции [1081], а также для подтверждения результатов моделирования флуоресценции биотканей в УФ и видимой области методом Монте-Карло [1082]. Метод Монте-Карло использовался при моделировании некоторых практически важных случаев, таких как анализ влияния геометрии волоконно-оптического зонда на измерения флуоресценции эпителиальных тканей с разрешением по глубине [1083] и нахождение пространственного распределения флуоресценции в коже [350]. Семислойная модель кожи с индивидуальными оптическими характеристиками и флуорофорами рассмотрена в работе [1084]. В этой работе для решения уравнения переноса излучения был использован модифицированный метод характеристик. Представленная технология моделирования распределения интенсивности флуоресценции, возбуждающего и отраженного света должна быть полезна при разработке лазерной аппаратуры медицинского назначения в дерматологии.

В настоящее время для исследования анатомии и физиологии клеток применяют разнообразные экзогенные флуоресцирующие красители [1058, 1085–1089]. Например, субклеточная локализация сульфонируемого тетрафенилпорфина в карциноме толстой кишки была исследована с помощью флуоресцентной визуализации со спектральным разрешением [1085].

В медицинской практике такие красители, как флуоресцеин и индоцианин зеленый, применяются многие годы для флуоресцентной ангиографии, определения объема крови и сопровождения хирургических вмешательств [954]. Недавно описаны новые флуоресцентные контрастные агенты для оптической визуализации опухолей *in vivo* на основе платформ векторной доставки красителя к опухолевым клеткам, такие как связывающиеся с клеточным рецептором конъюгаты краситель-пептид [1087] и белки, флуоресцирующие в зеленой (GFP), желтой (zFP538), красной (drFP583) или ближней ИК- (eqFP650 и eqFP670) областях спектра [1088, 1090–1093]. В работе [1091] представлены коэффициенты экстинкции в максимуме линии поглощения большого количества флуоресцирующих белков со значениями от $0,05 \cdot 10^{-4}$ до $16 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ в диапазоне длин волн от 380 до 600 нм, а также соответствующие квантовые выходы флуоресценции от 0,01 до 0,9 в диапазоне длин волн флуоресценции от 440 до 660 нм. Подробный анализ структуры и функционирования флуоресцирующих белков, аналогичных GFP, а также их многочисленные применения для визуализации *in vivo* клеток и биотканей дан в работе [1092].

Исследованы флуоресцентные свойства таких красителей, как альбуминовый синий 633 и 670 в плазме и цельной крови [1086]. В работе [1089] изучены экзогенные

специфические флуоресцентные маркеры для количественного трехмерного определения локализации опухолей *in vivo*. Красители в виде нанокристаллов [1094] или конъюгаты плазмонных наночастиц с красителями [1095, 1096] начинают использоваться в качестве флуоресцентных агентов.

Для развития инновационных методов визуализации биотканей и клеток интересны так называемые обратимо переключаемые светом (photoswitchable) флуорофоры [1097, 1098]. Такие флуорофоры могут быть белками, органическими молекулами (красителями), а также изготовлены в виде наночастиц. Для синтеза переключаемых светом флуорофоров используются разные подходы, включая инженерию сочетания белков, химический синтез, полимеризацию и самосборку. Главным свойством этих флуорофоров является их возможность изменять интенсивность свечения и длину волны (цвет), что позволяет конструировать двухцветные зонды или зонды с включением/выключением флуоресценции. Такие зонды используются при функциональной визуализации сверхвысокого разрешения [1098].

Спектры флуоресценции содержат подробную информацию о флуоресцирующих молекулах, их конформации, сайтах связывания и взаимодействиях в клетках и биотканях. Интенсивность флуоресценции можно измерять либо как функцию длины волны испускаемого света, либо как функцию длины волны возбуждения. Спектр испускания флуоресценции $I_F(\lambda)$ специфичен для каждого флуорофора и обычно используется во флуоресцентной диагностике.

Для многих биомедицинских приложений в качестве приемника излучения предпочтительно использовать оптический многоканальный анализатор (ОМА) (линейку диодов или ПЗС-камеру), поскольку в этом случае спектры можно записывать очень быстро и часто в виде серий в пределах миллисекунд. Флуоресцентные спектрометры для диагностики *in vivo* обычно создаются на основе волоконно-оптических систем [133, 1058–1065, 1083]. Возбуждающий свет от лампы или лазера направляется на биоткань (например, на определенный орган) по волоконному световоду с использованием соответствующих оптических фильтров. Спектр флуоресценции снимается либо через тот же волоконный световод, либо через второй волоконный световод или волоконный жгут, находящийся в непосредственной близости от возбуждающего волоконного световода.

В настоящее время доступны разнообразные эффективные методы и средства флуоресцентной спектроскопии, такие как микроспектрофлуориметрия, спектроскопия анизотропии поляризации, спектроскопия с разрешением по времени с импульсным возбуждением или с применением модуляции, спектроскопия с временным стробированием, флуоресцентная спектроскопия и микроскопия полного внутреннего отражения, флуоресцентный метод резонансного переноса энергии, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, а также их комбинации [349, 350, 1057–1094, 1099–1101]. Эти методы позволяют обеспечить 3D-топографию в отраженном свете для морфологических исследований биологических образцов, микроскопию высокого разрешения в проходящем свете, трехмерное флуоресцентное обнаружение клеточных структур и кинетику флуоресцентного обесцвечивания, кинетику флуоресценции с разрешением во времени, исследования движения клеточных структур, визуализацию со стробированием по времени для селекции специфических молекул или молекулярных взаимодействий, визуализацию по времени жизни флуоресценции, визуализацию со спектральным разрешением.

Потенциальные возможности флуоресцентной спектроскопии с временным стробированием показаны на рис. 5.3 [1058, 1085]. Приведенные здесь спектры флуоресценции *Saccharomyces cerevisiae* очень похожи на спектры флуоресценции различных клеточных культур. Максимум испускания на 460–465 нм, соответствующий свободному НАД·Н, четко идентифицируется во временном окне 0–5 нс, в то время

как максимумы испускания около 435 нм (связанный НАД·Н) и 515 нм (флавины) разрешаются в более поздних временных окнах. В отличие от этого, спектры автофлуоресценции в стационарном режиме широкие и имеют лишь слабо выраженную структуру.

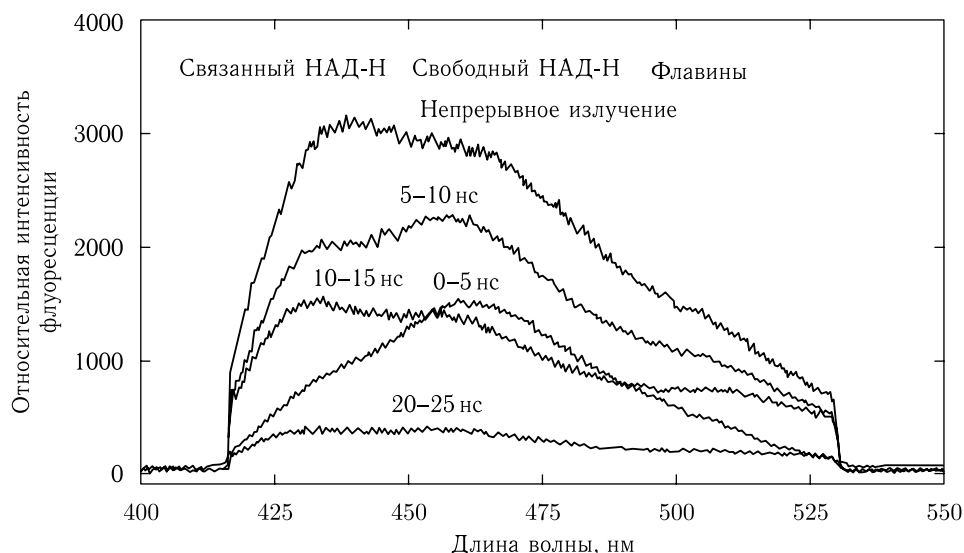


Рис. 5.3. Спектры флуоресценции *Saccharomyces cerevisiae* в стационарном режиме и с временным стробированием после возбуждения на длине волны 365 нм (верхняя кривая) и 355 нм (остальные кривые) [1085]

Регистрация флуоресценции с разрешением во времени позволяет отдельно исследовать свободный и связанный НАД·Н, флуоресцентная спектроскопия с временным стробированием включает исследования порфиринов, указывающих местоположение опухоли в биоткани с сильной автофлуоресценцией, а флуоресцентный метод переноса энергии можно использовать для селективного измерения деполяризации в митохондриях, которая может предшествовать митохондриальной автофагии, апоптозу и некротической гибели клетки [1058]. В настоящее время разработаны аналитические модели и решения для спектроскопии и визуализации биотканей с временным разрешением, в том числе на основе количественного определения времени жизни флуоресценции [349, 1099–1102].

Принципы оптического химического анализа в клинических условиях на основе регистрации изменений в интенсивности, длины волны, поляризационной анизотропии и времени жизни флуоресценции описаны в работе [1057]. В настоящее время существуют различные флуоресцентные методики селективного определения кислорода, глюкозы и газов в крови [1057].

Следует отметить несколько примеров флуоресцентной (автофлуоресцентной, АФ) визуализации и спектроскопии нормальных и патологических биотканей, таких как нормальная и злокачественная слизистая оболочка у больных раком головы и шеи [1103], каротидная атеросклеротическая бляшка [1104], предраковая ткань шейки матки [1105], нормальная и неопластическая ткань молочной железы [1106] и базально-клеточная карцинома кожи [1107]. Была реализована АФ-калиброванная методика для визуализации роста новообразований в реальном времени [1108].

Обзор АФ-методов и приборов для офтальмологической диагностики приведен в работе [1109].

Для одновременного получения информации о структуре и характере патологии *in situ* была предложена конфокальная отражательно-автофлуоресцентная томографическая система для исследования *in vivo* участков кожи [1110]. Интенсивность отраженного света в основном характеризовала структурные изменения биоткани, например изменение плотности клеток на участках с раковыми поражениями, а автофлуоресценция — биохимические изменения, связанные с кинетикой НАД·Н. Все это позволило авторам получить чувствительность и специфичность ранней диагностики рака на уровне 97,8%. Конфокальная лазерная эндоскопическая система для получения 3-D флуоресцентных изображений поверхностных и подповерхностных клеточных и тканевых структур, использованная для исследования ротовой полости человека и животных, описана в работе [1111].

Для оценки возможности многомодальной конфокальной визуализации для сопровождения хирургии мозга в работе [1112] были исследованы различные типы доброкачественных и злокачественных первичных и метастатических опухолей мозга. Послеоперационные образцы ткани быстро прокрашивались водным раствором метиленового синего с концентрацией 0,05 мг/мл. Отражение и флуоресценция от образцов возбуждались на длине волны 642 нм, а сигнал флуоресценции от метиленового синего регистрировался на длинах волн между 670 и 710 нм. Флуоресцентные изображения имели хорошую корреляцию с изображениями гистологических препаратов. В свою очередь изображения в отраженном свете дополнительно к флуоресцентным давали информацию о морфологии и васкуляризации образцов. Оптическая схема конфокальной системы и пример полученных изображений послеоперационных образцов биоткани представлены на рис. 5.4 (цветная вклейка).

Технология получения изображения *in vivo* выделительной функции печени у крыс с помощью флуоресцентной микроскопии описана в работе [1113]. Были использованы два полиметиновых красителя, индоцианиновый зеленый (ICG) с возбуждением на длине волны вблизи 800 нм и DY635 с более короткой длиной волны возбуждения. Индоцианиновый зеленый также успешно применялся для неинвазивного детектирования флуоресценции мозга взрослого человека с помощью импульсной системы визуализации с пикосекундным разрешением [1114]. В этой работе показано, что при мониторинге ICG-болюса импульсная флуоресцентная система может обеспечить более высокое отношение сигнал-шум по сравнению с импульсной системой на основе измерения диффузного отражения.

Многочастотная (от 0 до 0,3 мм^{-1}), многоволновая (633, 680, 720, 800, 820 нм) пространственно-частотная система визуализации была успешно использована для определения поглощающих, рассеивающих и флуоресцентных свойств сфероидов глиобластомы *in vivo* в модели мыши при индукции эндогенного протопорфирина IX с помощью введения 5-аминолевулиновой кислоты [1115]. Принципы работы системы описаны в разд. 1.4. Исследования авторов [1115] продемонстрировали возможность использования пространственно-частотной системы визуализации для сопровождения резекции опухолей мозга.

Активируемые флуоресцентные молекулярные зонды обычно не флуоресцируют в инактивированном состоянии из-за внутримолекулярного тушения, но способны существенно увеличить выход флуоресценции в условиях опосредованного ферментом гидролиза пептидов [1116]. С помощью использования активируемого катепсином инфракрасного зонда (PGC-800) было показано, что время жизни флуоресценции значительно увеличивается в ткани миокарда мыши после инфаркта (0,67 нс) по сравнению со здоровой тканью миокарда (0,59 нс). Это дает возможность при получении информации *in vivo* о молекулярной активности, вызывающей изменения

процесса внутримолекулярного тушения, использовать в качестве контраста изображения распределение времени жизни флуоресценции при визуализации активируемых флуорофоров в биоткане. Время жизни флуоресценции активируемых молекулярных зондов является важным параметром для *in vivo* визуализации активности ферментов.

Получение флуоресцентных изображений объектов с высоким пространственным разрешением в сильно рассеивающей среде, каковой является биоткань, представляет собой трудную задачу. Однако, как показано в работе [1117], использование заполненных индоцианиновым зеленым термочувствительных нанокапсул на основе мицеллярного полимера плуроника может решить эту проблему. Возможности метода были продемонстрированы с помощью оптической томографической системы с модуляцией интенсивности на частоте 100 МГц при локальном нагреве внедренных наночастиц сфокусированным ультразвуком. В исследованиях на фантомах биоткани оказалось возможным надежно визуализировать флуоресцирующий объект размером 3 мм на глубине до 2 см на основе использования обоих контрастов — по интенсивности и времени жизни.

Именно метод визуализации флуоресценции может дать новые представления о молекулярных механизмах зарождения и развития раковой опухоли в условиях *in vivo* [1063]. Для этого, например, имеются необходимые системы генетических репортеров, такие как eGFP и DsRed, и высокочувствительные системы детектирования флуоресценции.

В практическом плане комбинация флуоресцентного изображения и локальной спектроскопии позволяет повысить надежность флуоресцентной диагностики раннего рака гортани и бронхов [1118]. Интраоперационная флуоресцентная диагностика используется для сопровождения фотодинамической терапии у больных с метастатическими поражениями головного мозга [1119]. Диагностика пигментированных кожных новообразований успешно проводится методами лазерно-индуцированной автофлуоресцентной и диффузной отражательной спектроскопии в рамках единой методики [1120].

В настоящее время спектроскопия отражения и флуоресценции — вероятно, самые развитые из доступных оптических методов исследования кожи *in vivo*. Отражение и флуоресценция от кожи несут информацию о структуре эпидермиса и дермы, о количестве и плотности кровеносных сосудов, о концентрации и пространственном распределении хромофоров и флуорофоров в коже и о природе кожных метаболических процессов. Типичные приложения включают количественный анализ эритемы и пигментации кожи *in vivo*, определение изменений цвета кожи, мониторинг лечения кожных заболеваний, определение степени старения кожи под действием света, диагностику кожных опухолей, биофизические исследования кожи [57, 1059, 1061, 1062, 1066–1068, 1107, 1110, 1120].

Поглощающие и рассеивающие свойства кожи влияют на спектры как отражения, так и автофлуоресценции. Поэтому комбинация флуоресценции и отражения может дать дополнительную информацию для анализа кожной ткани. Потенциальные преимущества и возможные применения отражательной и флуоресцентной спектроскопии кожи для оценки индексов пигментации и эритемы, определения оксигенации и концентрации гемоглобина и исследования эффективности местных солнцезащитных препаратов обсуждаются в работе [1059].

Одной из задач флуоресцентной спектроскопии является идентификация длин волн возбуждения, подходящих для дифференцировки различных патологических состояний. Она тесно связана с идентификацией хромофоров, ответственных за такую дифференцировку. Большинство биологических компонентов, связанных со структурой кожной ткани или вовлеченных в метаболические и функциональные

процессы, флуоресцируют в видимой и ультрафиолетовой области спектра. В результате различные морфологические состояния кожи, связанные с гистологическими, биохимическими и физико-химическими изменениями, можно, в принципе, характеризовать на основе информации, содержащейся в картах возбуждения-испускания флуоресценции (см. рис. 5.5) [1059, 1065, 1067]. Максимум флуоресценции в области 320–370 нм с пиком на 340 нм возникает при возбуждении на длинах волн 250–290 нм (пик на 280 нм). В УФА-флуоресценции кожи доминируют полосы флуоресценции ароматических аминокислот, а именно тирозина и триптофана, интенсивность флуоресценции очень слабо меняется от одного участка кожи к другому. Это можно объяснить отсутствием ослабления АФ меланином, который расположен, в основном, в нижних слоях эпидермиса. Содержание тирозина и триптофана в эпидермисе более чем вдвое выше, чем в коже в целом, вот почему эпидермис обладает интенсивной АФ в УФА-области спектра.

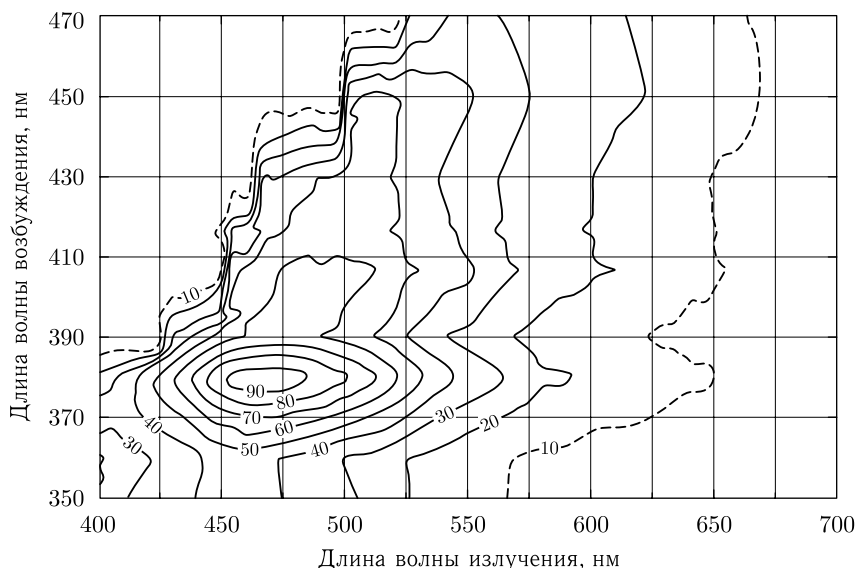


Рис. 5.5. Карта возбуждения-испускания автофлуоресценции кожи, снятая *in vivo* [1067]

К эндогенным флуорофорам кожи относятся также различные формы НАД и кератина, локализованные в эпидермисе, и коллаген дермы. Восстановленная (НАД·Н) и окисленная (НАД⁺) формы НАД участвуют в клеточном обмене веществ, и интенсивность их специфической флуоресценции (с максимумом испускания на 460 нм и 435 нм соответственно) используется не только для дифференциальной диагностики метаболических нарушений, но и для количественного определения НАД·Н [1059].

Для коллагена и эластина, локализованных преимущественно в папиллярном и ретикулярном слоях дермы, как возбуждающий, так и испущенный свет ослабляется из-за поглощения меланином, а интенсивность флуоресценции в области 400–480 нм подвержена ослаблению другими хромофорами кожи: гемоглобином, порфиринами, каротиноидами и т. п. Это влияет и на полную интенсивность, и на форму спектра. Спектр АФ кожи человека и спектр флуоресценции коллагена по существу одинаковы из-за оптической фильтрации излучения другими флуорофорами гемоглобином крови в плотной сети кровеносных сосудов дермы [1059, 1068]. На рис. 5.6

представлена временная динамика спектров АФ кожи, связанная с процессом формирования УФ-эритемы. Главным из наблюдаемых изменений является заметный спад интенсивности АФ во время формирования эритемы за счет эффекта оптической фильтрации кровью (ранняя стадия) и образующимся меланином (более поздняя стадия).



Рис. 5.6. 3D-график автофлуоресценции кожи человека после УФ-облучения, соответствующего четырем минимальным эритемным дозам (МЭД) [1059, 1068]

Простота и миниатюризация аппаратуры для флуоресцентных исследований биологических объектов — одно из важных требований медицинской диагностики. Недавно на основе мобильного телефона был разработан широкопольный флуоресцентный микроскоп для получения изображений в темном поле [1121]. Микроскоп использует компактные, легкие и недорогие оптические компоненты, которые механически крепятся на камеру мобильного телефона. Возможность устройства получать изображения в пределах широкого угла зрения чрезвычайно важна для исследования образцов сравнительно большого объема ($> 0,1$ мл), например образцов крови, мочи, мокроты или воды. В качестве демонстрации возможностей метода на такой приставке к мобильному телефону были получены флуоресцентные изображения меченых белых кровяных клеток в образцах цельной крови [1121].

В заключение этого раздела представим исключительно простой и эффективный метод, использующий биолюминесцентные изображения образцов биоткани [1122]. Биолюминесценция представляет собой собственное излучение света живыми организмами. Она включает в себя процесс окисления субстрата (люциферина) в присутствии фермента (люциферазы). Эта реакция характеризуется тем, что избыточная энергия выделяется в качестве света (а не тепла). В этом методе раствор, содержащий смесь биолюминесцентных ферментов, других ферментов и кофакторов, наносится на поверхность криосекции биоткани, помещенной в микроскоп. Например, бактериальная люцифераза вводится в раствор ферментов, используемых для определения глюкозы, гликогена, молочной и пировиноградной кислоты. Раствор вступает в реакцию с исследуемым метаболитом в криосекции. В результате такого взаимодействия излучаются фотоны в количестве, пропорциональном концентрации

метаболита. Фотоны регистрируются с помощью подключенной к микроскопу светочувствительной камеры, рассчитанной на регистрацию малых световых потоков. В результирующем изображении интенсивность света отражает распределение концентрации метаболита по образцу. Сигнал калибруется с помощью стандартных криосекций с известным содержанием метаболитов. Существенным достоинством биолюминесцентной визуализации является ее высокое пространственное разрешение, порядка 50–100 мкм. Биолюминесцентная визуализация является принципиально методом *ex vivo*, но при использовании мгновенной заморозки ткани отражает ситуацию *in vivo*. Авторы работы [1122] использовали биолюминесцентную визуализацию высокого разрешения для изучения энергетического метаболизма двух различных сосудистых патологий: открытого артериального протока и атеросклероза.

5.2. Многофотонная флуоресценция

Новое направление в лазерной спектроскопии и визуализации биологических тканей и клеток связано с многофотонной (двух- и трехфотонной) флуоресцентной сканирующей микроскопией, которая позволяет отображать функциональные состояния объекта или, в сочетании с автокорреляционным анализом сигнала флуоресценции, определять внутриклеточную подвижность в малых объемах [114, 122, 131, 137, 177, 1123–1145]. Многофотонный метод использует как баллистические, так и рассеянные фотоны флуоресценции, возбуждаемой на длине волны используемой гармоники (второй, третьей, и т. д.) падающего излучения, приходящие на широкоапертурный фотоприемник точно из фокальной области возбуждающего пучка (см. рис. 5.7)[1123]. Уникальным преимуществом многофотонной микроскопии является возможность исследования трехмерных распределений хромофоров, возбуждаемых ультрафиолетовым излучением в глубине биоткани. Такое исследование становится возможным потому, что излучение хромофоров (например, на длине волны 350 нм) возбуждается лазерным излучением, длина волны которого при двухфотонном возбуждении (700 нм) попадает в область высокой прозрачности биоткани. Возбуждающее излучение может достигать глубоко лежащих слоев и меньше повреждает биоткань, благодаря малому поглощению света. Излучение флуоресценции в этом случае лежит в видимом диапазоне (>400 нм) и сравнительно легко выходит из биоткани и достигает приемника, который регистрирует только нужный сигнал от фокального объема без какого-либо постороннего фона.

Скорость двухфотонного процесса возбуждения пропорциональна среднему квадрату плотности фотонов. Эта квадратичная зависимость вытекает из требования, чтобы флуорофор одновременно поглощал два фотона в каждом акте возбуждения. Процессы многофотонного поглощения схематически показаны на рис. 5.8. Чтобы убедиться в многофотонном характере возбуждения, нужно измерить интенсивность флуоресценции как функцию интенсивности возбуждающего света. Двухфотонный процесс возбуждения характеризуется угловым коэффициентом 2 на графике, по осям которого отложены логарифмы измеренных интенсивностей, трехфотонное возбуждение характеризуется наклоном 3 и т. д.

Итак, двухфотонная флуоресценция (ДФФ) молекул является нелинейным процессом, обусловленным одновременным поглощением двух, как правило, ИК-фотонов при условии, что их суммарная энергия достаточна для возбуждения электронного состояния молекулярного перехода. В общем случае можно использовать фотоны с длинами волн λ_1 и λ_2 , удовлетворяющих соотношению

$$\frac{1}{\lambda_{\text{ff}}} \approx \frac{1}{\lambda_1} + \frac{1}{\lambda_2}, \quad (5.8)$$

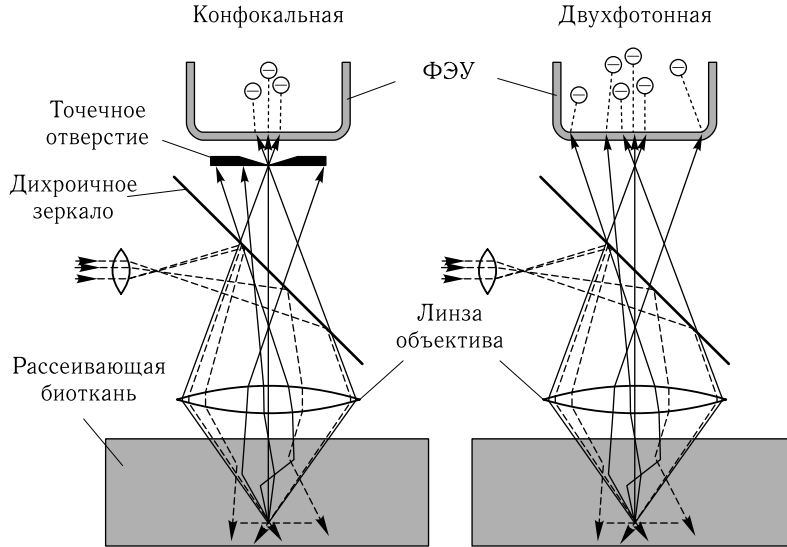


Рис. 5.7. Конфокальная визуализация с однофотонным возбуждением в сравнении с двухфотонной визуализацией в биоткани [1123]. При двухфотонном возбуждении благодаря большой длине волны падающего света он в меньшей степени ослабляется из-за рассеяния. В случае двухфотонного возбуждения используются как баллистические, так и диффузные фотоны флуоресценции, а в конфокальном случае — только баллистические

где λ_{1f} — длина волны, необходимая для возбуждения флуоресценции при однофотонном поглощении. На практике предпочтительнее использовать возбуждение от одного источника света, поэтому берут $\lambda_1 = \lambda_2$, тогда $\lambda_2 \approx 2\lambda_{1f}$.

Поскольку сечения двухфотонного поглощения для биологических молекул σ_2 обычно очень малы (порядка $1 \text{ GM} = 10^{-58} \text{ м}^4 \cdot \text{с}^{-1}$), то необходимы интенсивные потоки фотонов, порядка 10^{30} фотонов в секунду на квадратный метр ($\text{с}^{-1} \cdot \text{м}^{-2}$). Такое возбуждение можно обеспечить с помощью высокоинтенсивных лазеров непрерывного действия (CW) или импульсных лазеров с короткой длительностью импульса ($\sim 10^{-13}$ с). Импульсное возбуждение позволяет снизить тепловую нагрузку на биологический объект, а также селективно возбуждать отдельные электронные переходы. Для двухфотонных процессов характерен временной масштаб порядка

$$\tau_{2f} = 10^{-16} - 10^{-17} \text{ с}, \quad (5.9)$$

как это следует из принципа неопределенности Гейзенберга:

$$\tau_{2f} \approx \frac{\lambda_{1f}}{4\pi c} \approx 10^{-16} \text{ с}, \quad (5.10)$$

для зеленой линии видимого перехода $\lambda_{1f} = 500$ нм.

Интенсивность двухфотонного возбуждения можно выразить аналитически [137, 1128, 1137, 1143, 1146]. Интенсивность двухфотонной флуоресценции $I_{2f}(t)$ пропорциональна квадрату интенсивности возбуждения $I(t)$, поперечному сечению двухфотонного поглощения соответствующих молекул, например коллагена или гемоглобина, $\sigma_2 = \sigma_2(\lambda_{\text{exc}})$, и квантовому выходу флуоресценции, $\eta = \eta(\lambda_{\text{em}})$:

$$I_{2f}(t) = \sigma_2(\lambda_{\text{exc}}) \cdot \eta(\lambda_{\text{em}}) \cdot I^2(t). \quad (5.11)$$

Здесь λ_{exc} и λ_{em} — длины волн возбуждения и эмиссии соответственно.

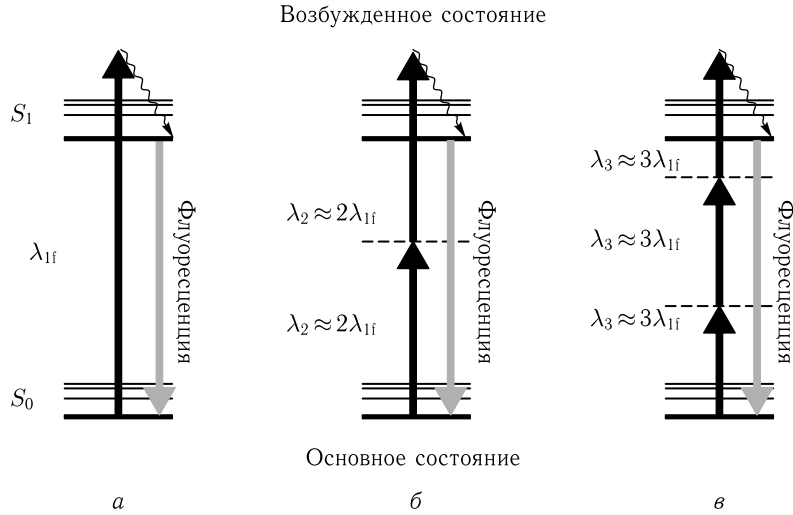


Рис. 5.8. Многофотонная флуоресценция; диаграмма Яблонского энергетических уровней молекулы показывает процессы поглощения и флуоресценции: *a* — однофотонное поглощение; *б* — двухфотонное поглощение; *в* — трехфотонное поглощение. Сплошными и штриховыми горизонтальными линиями изображены, соответственно, реальные и виртуальные молекулярные энергетические состояния; сплошные вертикальные стрелки вверх — поглощение фотона, прямые сплошные стрелки вниз — радиационные переходы (флуоресценция), волнистые линии — безызлучательные переходы; λ_{if} — длина волны, необходимая для возбуждения флуоресценции при однофотонном поглощении, $\lambda_2 \approx 2\lambda_{if}$ и $\lambda_3 \approx 3\lambda_{if}$ — длины волн для возбуждения флуоресценции при двух- и трехфотонном возбуждении соответственно

В свою очередь, мгновенная интенсивность возбуждения

$$I(t) = \frac{P(t)}{A \cdot h\nu_{exc}} = \frac{\lambda_{exc} P(t)}{A \cdot hc}, \quad (5.12)$$

где $P(t)$ — мгновенная мощность излучения в пределах освещаемой области A , $A \approx \pi[\lambda_{exc}/(2NA)]^2$ [226], NA — числовая апертура объектива микроскопа, $h\nu_{exc}$ — энергия кванта излучения возбуждения, h — постоянная Планка, c — скорость света в вакууме.

Интенсивность двухфотонной флуоресценции, собранная оптической системой, определяется соотношением

$$\hat{I}_{2f}(t) = \kappa\sigma_2\eta I^2(t) = \kappa\pi\sigma_2\eta P^2(t) \left(\frac{(NA)^2}{hc\lambda_{exc}} \right)^2, \quad (5.13)$$

где κ — коэффициент, учитывающий эффективность сбора фотонов флуоресценции.

Для непрерывного лазерного возбуждения усредненная во времени за произвольный период времени T интенсивность двухфотонной флуоресценции, приходящаяся на одну молекулу, равна

$$\langle \hat{I}_{2f} \rangle_{CW} = \kappa\pi\sigma_2\eta P_{ave}^2 \left(\frac{(NA)^2}{hc\lambda_{exc}} \right)^2, \quad (5.14)$$

Для импульсных лазеров с частотой повторения импульсов $f_p = 1/T$ и длительностью прямоугольных импульсов τ_p средняя мощность излучения P_{ave} связана

с пиковой мощностью P_{peak} соотношением $P_{\text{ave}} = (\tau_p \cdot f_p)P_{\text{peak}}$, тогда для мгновенной интенсивности двухфотонной флуоресценции получаем

$$\hat{I}_{2f}(t) = \kappa\pi\sigma_2\eta \frac{P_{\text{ave}}^2}{(\tau_p f_p)^2} \left(\frac{(NA)^2}{hc\lambda_{\text{exc}}} \right)^2, \quad (5.15)$$

а для усредненной во времени интенсивности двухфотонной флуоресценции вместо уравнения (5.14) имеем

$$\langle \hat{I}_{2f} \rangle_p = \kappa\pi\sigma_2\eta \frac{P_{\text{ave}}^2}{\tau_p f_p} \left(\frac{(NA)^2}{hc\lambda_{\text{exc}}} \right)^2. \quad (5.16)$$

Вывод этих уравнений предполагает пренебрежимо малое насыщение флуорофора и справедливость параксиального приближения.

Из приведенных соотношений следует, что эффективность возбуждения двухфотонной флуоресценции при одинаковой средней мощности в непрерывном и импульсном режимах и независимости сечения двухфотонного поглощения от длительности импульса для непрерывного излучения в $(\tau_p \cdot f_p)^{1/2}$ раз меньше, чем для импульсного. Например, возбуждение флуоресценции излучением 300 мВ лазера непрерывного действия приблизительно эквивалентно возбуждению излучением импульсного лазера со средней мощностью 1 мВт при частоте повторения 80 МГц и длительности импульсов 100 фс. Излучение такого 1 мВт импульсного лазера с длиной волны $\lambda = 1000$ нм, сфокусированное объективом с числовой апертурой $NA = 1,4$ на биоткань с типичным сечением двухфотонного поглощения биологических молекул $\sigma_2 = 10 \text{ GM} = 10^{-57} \text{ м}^4 \cdot \text{с}^{-1}$, дает в соответствии с уравнением (5.16) скорость счета фотонов флуоресценции 10^5 Гц. Следует однако отметить, что сечение двухфотонного поглощения для непрерывного и пикосекундного излучения, как правило, на порядок больше, чем для фемтосекундного. Это дает возможность использовать пикосекундное излучение при работе с биотканями, хотя тепловые эффекты могут оказаться существенными.

Лазерный свет в микроскопе с двухфотонным возбуждением фокусируется объективом микроскопа в фокальный объем. Только в этом объеме интенсивность сфокусированного излучения достаточна для существенного возбуждения. Низкая плотность потока фотонов вне фокального объема приводит к пренебрежимо малой величине сигнала флуоресценции от этих областей биоткани. Способность микроскопа с двухфотонным возбуждением оптически выделять тонкие слои обусловлена нелинейной квадратичной зависимостью процесса возбуждения от интенсивности и сильной фокусирующей способностью объектива микроскопа. Большинство биотканей сравнительно прозрачно в ближней инфракрасной области. Жесткая фокусировка объективом микроскопа излучения длинноволнового видимого/ИК-диапазона приводит к двухфотонному возбуждению в малом фокальном объеме флуорофоров с поглощением в ультрафиолетовом/коротковолновом видимом диапазоне. Для оптического секционирования объекта в трех измерениях необходимо обеспечить перемещение области фокусировки во всех трех измерениях — вдоль поверхности и в глубь биоткани. Таким образом, в двухфотонном микроскопе в процессе возбуждения флуоресценции происходит неразрушающее оптическое секционирование (аналогичное гистологическим срезам).

Итак, существенным преимуществом многофотонной микроскопии, использующей объективы с большими величинами числовой апертуры NA , по сравнению с обычной однофотонной микроскопией является очень малый (суб-фемтолитровый)

объем возбуждения. Поглощения в областях вне фокального объема удастся избежать, поскольку вероятность двухфотонного поглощения уменьшается с расстоянием r от точки фокуса по закону r^{-4} . Многочисленные исследования показали, что многофотонная микроскопия при определенных условиях может быть осуществлена без фотоповреждения биотканей и клеток. Так, живые одиночные клетки животных выдерживают без каких-либо последствий многочасовое облучение излучением фемтосекундного лазера с пиковой мощностью до 200 ГВт/см² [1134].

Исследования биотканей и клеток с помощью двухфотонной микроскопии характеризуются следующими типичными параметрами лазерных систем: длина волны от 700 до 1200 нм, длительность импульса порядка 12–150 фс, частота повторения импульсов 76–90 МГц, средняя мощность менее 10–40 мВт. Такие параметры могут быть обеспечены при использовании лазеров с синхронизацией мод: лазера на красителях или титан-сапфирового лазера. Твердотельные лазеры с диодной накачкой также перспективны для задач двухфотонной микроскопии [1123]. Практически такие же параметры лазеров требуются для трехфотонной флуоресцентной микроскопии, которая обладает теми же преимуществами, что и двухфотонная, но гарантирует несколько более высокое пространственное разрешение и обеспечивает возможность возбуждения хромофоров с более короткими длинами волн поглощения [1126].

Например, эндогенный внутриклеточный флуорофор НАД(Ф)·Н (никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный) может быть визуализирован при возбуждении на соответствующих длинах волн ближнего ИК-диапазона при средней мощности лазера менее 2 мВт с типичным временем экспозиции от 1 до 8 с на кадр [1134].

Первый коммерческий многофотонный томограф, DermaInspect™ (JenLab GmbH), используется в клинической практике для диагностики меланомы и внутрикожного обнаружения *in situ* лекарственных препаратов. Было показано, что эта фемтосекундная лазерная система является более безопасной по сравнению с обычными УФ-источниками света, используемыми в косметологии [1134].

Принципиальная схема комбинированной системы для флуоресцентной спектроскопии и визуализации показана на рис. 5.9 [1145]. Перестраиваемый фемтосекундный титан-сапфировый лазер был использован для генерации двухфотонных сигналов — двухфотонной флуоресценции (ДФФ) и второй гармоники (ГВГ). В свою очередь, излучение этого лазера на второй гармонике использовалось для возбуждения однофотонной флуоресценции (ОФФ). Выбор возбуждения для двухфотонных или однофотонных измерений обеспечивался с помощью съемного зеркала М1. Два возбуждающих пучка, виртуально объединяемые дихроичным зеркалом, направлялись на образец ткани после фокусировки объективом с водяной иммерсией ($40 \times \text{NA} = 1,15$). Однофотонные и двухфотонные сигналы возбуждаются в одном и том же месте образца ткани. Возбуждающие пучки сканируются по области выборки 100×100 мкм с помощью пары гальванических сканирующих зеркал. Бифуркационный волоконный световод (ВС) с двумя моноволоконками (ВС I и ВС II) используется для проведения обратно рассеянных сигналов ОФФ и ДФФ/ГВГ к спектрографу для их спектрального анализа. Охлаждаемая ПЗС-камера используется для записи сигналов флуоресценции и ГВГ. Другой ВС (ВС III) передает сигнал ОФФ на ФЭУ с системой счета одиночных фотонов для формирования конфокального флуоресцентного изображения биоткани из некоторой небольшой области на определенной глубине. ВС I и III с сердцевинами малого диаметра служат в качестве точечных отверстий для сбора конфокальных ОФФ сигналов, а ВС II с сердцевиной большого диаметра используется для эффективного сбора ДФФ/ГВГ-сигналов. Зеркало М2 передает ДФФ-сигналы в ВС II для проведения двухфотонных измерений и оно удаляется при ОФФ-измерениях. Зеркало М3 передает ОФФ-сигналы для получе-

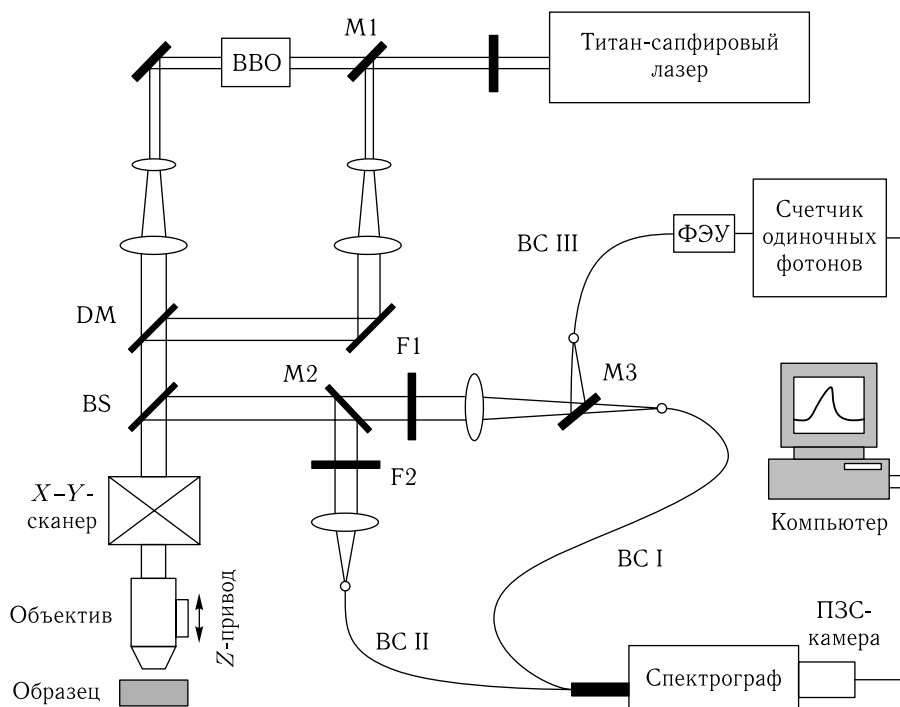


Рис. 5.9. Комбинированная система для спектроскопии и визуализации биотканей с использованием однофотонной и двухфотонной флуоресценции: M1, M2, M3 — перемещаемые зеркала; F1 — оптический фильтр, отсекающий излучение длиннее 700 нм; F2 — оптический фильтр, отсекающий излучение на длинах волн на 30 нм длиннее длины волны возбуждения однофотонной флуоресценции; DM — дихроичное зеркало; BS — делитель пучка; BC — волоконный световод [1145]

ния конфокальных флуоресцентных изображений, и оно удаляется при проведении конфокального спектрального анализа ОФФ сигнала. Оптический фильтр F1 используется для подавления ИК-излучения возбуждения, длиннее 700 нм, для всех ДФФ измерений. Другой оптический фильтр F2 отсекает излучение на длинах волн на 30 нм длиннее длины волны возбуждения однофотонной флуоресценции и всегда используется для подавления возбуждающего лазерного излучения в этих измерениях. Осевое и поперечное разрешение системы около 3,5 и 0,75 мкм для ОФФ и 3 и 0,5 мкм для ДФФ соответственно.

Рисунок 5.10 представляет ОФФ-сигналы, возбуждаемые излучением на длинах волн 355, 375, 395 и 415 нм, и ДФФ/ГВГ-сигналы, возбуждаемые излучением на четырех соответствующих длинах волн ближнего ИК-диапазона. Структура исследуемых эпителиальных тканей состояла из верхнего — ороговевшего эпителиального слоя, среднего — неороговевшего эпителиального слоя и нижележащего стромального слоя. Как показано на рис. 5.10 в и 5.10 г, ОФФ-спектры неороговевшей эпителиальной ткани, возбуждаемые излучением на длинах волн 355 и 415 нм, и ДФФ-спектры, возбуждаемые на соответствующих ИК-длинах волн 710 и 830 нм, практически идентичны, так как флуоресценция, возбуждаемая на этих длинах волн обусловлена в основном эндогенными флуорофорами, соответственно НАД·Н и ФАД. Тем не менее, ОФФ- и ДФФ-спектры, возбуждаемые на других длинах волн,

различны, поскольку сигналы представляют собой смесь сигналов флуоресценции НАД·Н и ФАД, а эффективность однофотонного возбуждения для флуоресценции НАД·Н и ФАД отличается от эффективности их двухфотонного возбуждения.

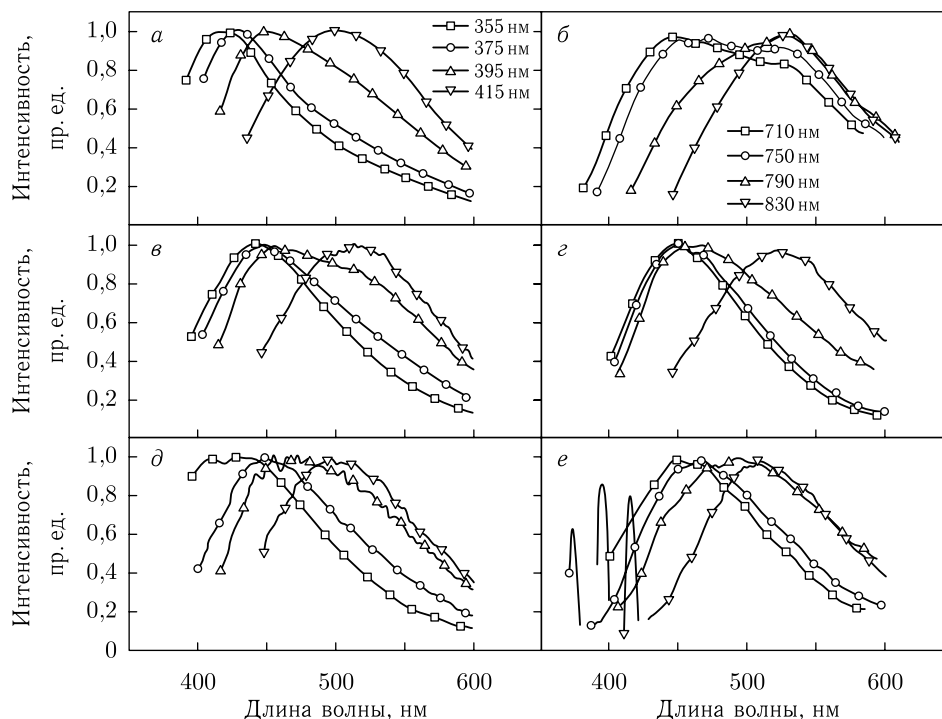


Рис. 5.10. Нормированные спектры однофотонной (левая сторона) и двухфотонной (правая сторона) флуоресценции для различных слоев биоткани: *а, б* — кератинизированный эпителий; *в, г* — некератинизированный эпителий; *д, е* — стромальный слой, хорошо видны пики генерации второй гармоники, амплитуда которых уменьшена в 20 раз. Каждая пара спектров одно- и двухфотонной флуоресценции для различных длин волн возбуждения была получена при усреднении измерений на образцах от 12 подопытных кроликов [1145]

Контрольные измерения флуоресценции для отдельных растворов НАД·Н, ФАД, кератина и коллагена, которые являются основными флуорофорами соответственно в эпителии и стромальных слоях, показали, что ОФФ- и ДФФ-спектры флуорофоров коферментов (НАД·Н, ФАД) идентичны [1145]. Тем не менее, ДФФ-спектры кератина и коллагена, структурных белков с гораздо более высокой молекулярной массой, чем у НАД·Н и ФАД, показывают значительное красное смещение и уширение спектра по сравнению со спектрами ОФФ. Механизмы, вызывающие эти различия, не ясны и требуют своего изучения.

Как известно, предраковые состояния эпителия характеризуются тем, что опухолевые клетки изменяют структуру подстилающей стромы, в том числе таких ее компонентов, как базальная мембрана, капилляры, фибробласты и внеклеточный матрикс. Параметры двухфотонной флуоресценции (ДФФ) и генерации второй гармоники (ГВГ) от коллагенового матрикса стромы существенно связаны с прогрессированием раннего канцерогенеза эпителиальных тканей [1146]. На основе исследований *in vivo* стромы защитного мешочка ротовой полости хомяка было показано, что следующие три признака: 1) отношение интенсивностей ДФФ и ГВГ,

2) распределение пространственной частоты изображений и 3) особенности текстуры ГВГ-изображения, позволяют количественно характеризовать предраковые состояния эпителия в различных патологических стадиях.

Авторы работ [1147–1149] открыли, что гемоглобин имеет сильную флуоресценцию в полосе Соре при двухфотонном поглощении излучения фемтосекундного источника света видимого диапазона (600–650 нм). Флуоресценция гемоглобина имеет спектральный пик на длине волны 438 нм и очень короткое время жизни, порядка 230 пс. Поперечное сечение двухфотонного поглощения гемоглобина падает на 2 порядка в диапазоне длин волн от 550 до 800 нм, в то время как спектральные и временные характеристики ДФФ гемоглобина не зависят от длины волны возбуждения [1149]. Тем не менее, флуоресценция гемоглобина может быть возбуждена с достаточной эффективностью при использовании обычного титан-сапфирового лазера, настроенного на длину волны около 700 нм. При детектировании флуоресценции с временным разрешением сигналы ДФФ гемоглобина могут быть четко отделены от других нелинейных сигналов, генерируемых различными компонентами биологических тканей. Тем самым стандартный ДФФ-микроскоп может стать рутинным инструментом для получения *in vivo* микроангиографических изображений ткани без введения экзогенных зондов.

Флуоресценция является одним из основных методов цитометрии *in vivo*, реализуемой непосредственно в биологических тканях [179, 900, 972, 1150–1153]. Например, для оптимальной регистрации сигнала флуоресценции от циркулирующих в кровеносных сосудах раковых клеток используется хорошо разработанная техника конфокальной микроскопии. Освещение линейным пучком всего сосуда целиком для возбуждения сигнала флуоресценции или аналогичное освещение с помощью щели дает высокую скорость сбора данных. Это необходимо для анализа движущихся по сосудам клеток. Как правило, такие системы многопараметрические и используют несколько флуоресцентных зондов и лазерных источников, что существенно повышает специфичность анализа. Однако однофотонная флуоресцентная цитометрия *in vivo* имеет ряд недостатков [1152]. Глубина зондирования ограничена рассеянием, поглощением и автофлуоресценцией биоткани. Ограничение соответствует типичной глубине зондирования конфокальных микроскопов и находится на уровне < 200 мкм. Хотя для многих моделей животных, таких как, например, ухо мыши, такая глубина вполне достаточна, поскольку огромное количество сосудов сосредоточено в ткани под поверхностью кожи в пределах глубины 70–100 мкм.

В общем случае многофотонная флуоресцентная цитометрия *in vivo* имеет более высокую скорость регистрации и чувствительность по сравнению с однофотонной флуоресценцией [1150–1155]. Ее важными преимуществами являются более высокая глубина зондирования вплоть до 500–1000 мкм. Оптическое секционирование осуществляется естественным образом без использования точечных отверстий на пути к детектору. Один лазерный источник может возбуждать одновременно несколько флуорофоров. Главные недостатки двухфотонной цитометрии сводятся к высокой стоимости оборудования и слишком малому размеру измерительного объема, что требует больших времен сбора данных.

Нелинейно-оптические свойства наночастиц используются для их визуализации в коже и других биотканях, что важно как для изучения путей миграции наночастиц в живом организме, так и для разработки новых эффективных меток для визуализации и мониторинга, например, раковых клеток [1157–1162]. В случае визуализации *in vivo* наночастиц ZnO в коже человека их главные достоинства заключаются в том, что флуоресценция ZnO приходится на длину волны 385 нм, на которой не так сильно влияние спектральных полос флуоресценции эндогенных флуорофоров кожи, таких как НАД(Ф)·Н и ФАД, а сечение их двухфотонного поглощения

достаточно высокое. Например, для наночастиц диаметром 18 нм $\sigma_2 \approx 0,26 \text{ GM}$, что примерно в 500 раз выше, чем это следует из нелинейной восприимчивости третьего порядка для объемного материала ZnO [1157]. Коммерческие наночастицы ZnO (Zinclear) со средним диаметром 21 нм и длиной волны запрещенной зоны материала $\lambda_{bg} = 370 \text{ нм}$, используемые в исследовании трансдермального транспорта, имели на единицу ZnO кристаллической ячейки сечение поглощения, равное $\sigma_2 \approx 32 \pm 6 \mu\text{GM}$ на длине волны возбуждения 770 нм и $6,2 \pm 0,8 \mu\text{GM}$ на 795 нм, а также квантовую эффективность $(0,9 \pm 0,2) \%$ [1159].

Показано, что нелинейная микроскопия ДФФ, ГВГ и гипер-рэлеевского рассеяния (ГРР) может быть использована для визуализации проницаемости наночастиц TiO_2 и ZnO в твердые ткани зуба. Наночастицы TiO_2 хорошо обнаруживаются на фоне сигнала от тканей зуба при регистрации сигнала ДФФ, в то время как наночастицы ZnO — сигнала ГВГ/ГРР [1161].

Двухфотонная флуоресценция золотых наночастиц показывает значительный потенциал для визуализации биотканей и клеток [1162] и может быть, например, использована в цитометрии *in vivo* для распознавания раковых клеток, меченных наночастицами. Кроме того, микроскопия на основе визуализации времени жизни двухфотонной флуоресценции (FLIM) с использованием золотых наностержней позволяет получать изображения с лучшим контрастом и чувствительностью, по сравнению с визуализацией на основе регистрации интенсивности флуоресценции. Характерное время жизни флуоресценции золотых наностержней с продольной плазмонной модой с центром вблизи длины волны 750 нм и более слабой поперечной плазмонной модой на 550 нм оказывается меньше, чем 100 пс [1162]. Это характерное время жизни может обеспечить необходимую селективность при визуализации и может быть использовано для обнаружения и мониторинга меченных такими наночастицами раковых клеток на фоне FLIM-сигналов от других флуоресцентных меток и эндогенных флуорофоров.

Использование FLIM-технологии возможно также и для мониторинга транспорта наночастиц ZnO в коже человека [1158]. Измеренное в этой работе характерное время жизни двухфотонной флуоресценции для частиц размером $\sim 30 \text{ нм}$ равно 289 пс.

5.3. Колебательная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния

В спектроскопии среднего и ближнего инфракрасного (ИК) диапазона и спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) оптическое возбуждение колебательных состояний молекул используется для получения информации о молекулярном составе, молекулярных структурах и молекулярных взаимодействиях в образце [30, 99, 104, 105, 115, 123, 143, 218, 793, 1163–1190]. На рис. 5.11 процессы ИК и КР показаны на схеме энергетических уровней молекулы. В ИК-спектроскопии инфракрасный свет от широкополосного источника (обычно в диапазоне длин волн 2,5–25 мкм или, в шкале волновых чисел $(1/\lambda)$, от 4000 до 400 см^{-1}) поглощается непосредственно молекулой, переводя ее в возбужденное колебательное состояние [1168]. При совпадении энергии кванта света $h\nu$ с энергией, необходимой для разрешенного перехода молекулы в возбужденное колебательное состояние, в ИК-спектре наблюдается пик поглощения.

В акте комбинационного (рамановского) рассеяния свет неупруго рассеивается молекулой, отдавая ей небольшую часть энергии падающего фотона или, наоборот, получая от молекулы часть энергии. При этом происходит либо возбуждение моле-

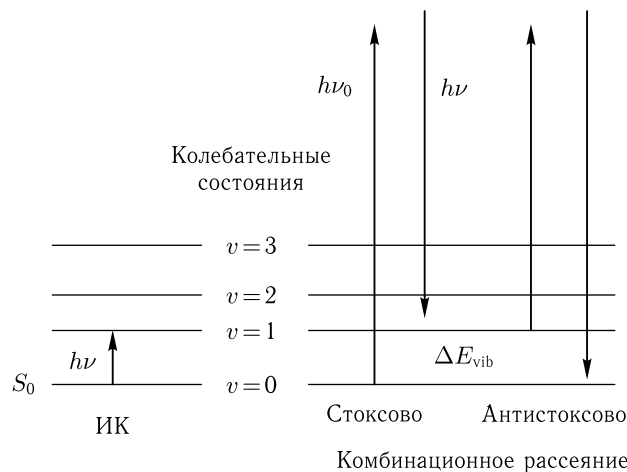


Рис. 5.11. Иллюстрация процессов ИК-поглощения и комбинационного (рамановского) рассеяния на диаграмме молекулярных уровней энергии [1168]

кулы из основного в первое возбужденное колебательное состояние одного и того же основного электронного состояния S_0 , либо обратный процесс. Спектр КР — это зависимость интенсивности рассеянного света от разности частот рассеянного и падающего света. Поскольку молекула каждого вещества имеет свой индивидуальный набор молекулярных колебаний, спектр КР данного вещества содержит последовательность пиков или полос рассеянного света, каждая из которых сдвинута относительно частоты падающего света на величину, равную одной из характеристических колебательных частот этой молекулы. Энергетическая (частотная) разность между падающим ($h\nu_0$) и рассеянным ($h\nu$) фотонами выражается как сдвиг волнового числа [1168],

$$\Delta\tilde{k} = \frac{1}{\lambda_0} - \frac{1}{\lambda}. \quad (5.17)$$

Если энергия рассеянного фотона меньше энергии падающего, процесс называется стоксовым комбинационным (рамановским) рассеянием. Если фотон взаимодействует с молекулой, находящейся в возбужденном колебательном состоянии, может произойти антистоксово КР, при котором энергия рассеянного фотона больше, чем энергия падающего (см. рис. 5.11). Отношение интенсивностей антистоксовой (I_{AS}) и стоксовой (I_S) линий КР для данного колебания дается выражением [1168]

$$\frac{I_{AS}}{I_S} = \frac{(\nu_0 + \nu_{vib})^4}{(\nu_0 - \nu_{vib})^4} \cdot \exp\left(-\frac{h\nu_{vib}}{k_B T}\right), \quad (5.18)$$

где $\Delta E_{vib} = h\nu_{vib}$ — энергия перехода между колебательными состояниями молекулы, k_B — постоянная Больцмана, T — абсолютная температура. Отсюда следует, что при комнатных температурах линии стоксова КР в наиболее информативной спектральной области ($> 400 \text{ см}^{-1}$) намного интенсивнее, чем антистоксовы. В свою очередь, сами линии стоксова КР имеют очень низкую интенсивность, в типичном случае от 10^{-7} до 10^{-15} интенсивности возбуждающего света. Регистрация спектров КР от биологических тканей и клеток в реальном времени стала практически возможной благодаря применению лазеров и новых технологий детектирования слабых световых потоков на фоне сильного рэлеевского рассеяния и автофлуоресценции.

Возбуждение колебательных состояний молекулы при ИК-поглощении и комбинационном рассеянии подчиняется разным правилам отбора [115, 123, 1164, 1168]. Некоторые колебания могут возбуждаться как при поглощении, так и при КР, другие же только при одном из этих процессов. Для центрально-симметричных молекул правила отбора в ИК- и КР-спектрах являются взаимоисключающими для всех колебаний. Колебание активно в ИК-поглощении, если оно сопровождается изменением дипольного момента молекулы. Активность колебания в КР возникает благодаря изменениям поляризуемости. Поэтому интенсивность полос в ИК- и КР-спектрах на одной и той же колебательной частоте может очень сильно различаться. Обычно симметричные колебания сильно проявляются в КР, в то время как антисимметричные — в ИК-поглощении. По поляризационному состоянию падающего и рассеянного света можно получить информацию о симметрии молекулы.

В большинстве биотканей сечение флуоресценции при возбуждении видимым или ближним УФ-светом (в пределах 300–700 нм) примерно на шесть порядков превосходит сечение стоксова КР, более того, флуоресценция представляет собой широкополосный сигнал в том же спектральном диапазоне, что и стоксово КР [143, 1168]. Важно, что при различных длинах волн возбуждающего света, УФ, видимого и ближнего ИК, КР вызывает одинаковое изменение колебательной энергии, в то время как ближний ИК-свет имеет слишком низкую частоту для возбуждения флуоресценции, а возбуждаемая УФ-светом флуоресценция имеет гораздо меньшую частоту, чем стоксова частота КР. Таким образом, использование ближнего ИК- или УФ-возбуждения позволяет уменьшить фон флуоресценции в спектрах КР [1168, 1190]. Для биотканей возбуждение в ближней ИК-области особенно предпочтительно из-за большой глубины проникновения.

Методы ИК- и КР-спектроскопии успешно применяются в различных областях клинических исследований, таких как анализ гистологических образцов биотканей на выявление злокачественности новообразований [30, 1163, 1188], неинвазивная диагностика поражений кожи по наблюдению за нормальными и злокачественными клеткам [1163, 1169], гидратация кожи в нормальных и патологических состояниях [1166, 1168, 1185], мониторинг водного обмена в хрусталике [1176, 1177] и диагностика катаракты [793], мониторинг процесса минерализации костной и зубной ткани [104], определение глюкозы в крови [105, 1187], мониторинг действия лекарств и местно наносимых на кожу веществ (например, лекарств, косметических препаратов, увлажнителей и т. п.) [1184], а также мониторинг антиоксидантов в коже [1178–1183].

Спектроскопия КР широко применяется в биологических исследованиях, начиная с изучения очищенных биологических соединений и кончая исследованиями на уровне единичной клетки или других компонентов ткани [218, 1164, 1167, 1170, 1173]. В настоящее время для локальной характеристики биотканей или клеток путем картирования распределений молекул на определенных колебательных частотах используется комбинация методов ИК- и КР-спектроскопии с методами получения микроскопических изображений [218, 1163, 1167, 1168, 1171, 1188]. Спектральная биохимическая визуализация, которая относится к так называемой молекулярной визуализации, является все более важной при постановке клинического диагноза, в частности для дифференцировки раковых и нераковых клеток. Наблюдаемые ИК-спектры зависят от различных аспектов приготовления образца, т. е. степени его увлажнения и однородности, а также от физиологического состояния клеток (экспоненциальная фаза роста или плато), необходим учет названных артефактов и состояния клетки при измерениях [218]. Как было показано, точные измерения колебательных спектров клеток млекопитающих возможны в однородных водных сус-

пензиях клеток; эти ИК-спектры хорошо аппроксимируются линейной комбинацией спектров ДНК, РНК, фосфолипидов, гликогенов и белков [218].

Поскольку глубина проникновения среднего ИК- (СИК) излучения в биоткань составляет лишь несколько микрометров, для изучения изменений в самых внешних слоях клеток наилучшим образом подходит инфракрасная спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения с фурье-преобразованием (ИКС НПВО ФП) (Attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy, ATR-FTIR) [1168]. Пример ИКС НПВО ФП-спектра рогового слоя кожи человека при гидратации во время окклюзии (изоляции поверхности кожи) показан на рис. 5.12. Спектры снимались каждую минуту в течение получаса. Гидратация кожи была вызвана прижатием предплечья к кристаллической призме полного внутреннего отражения. Во время окклюзии вода в коже не может испариться и накапливается в роговом слое.

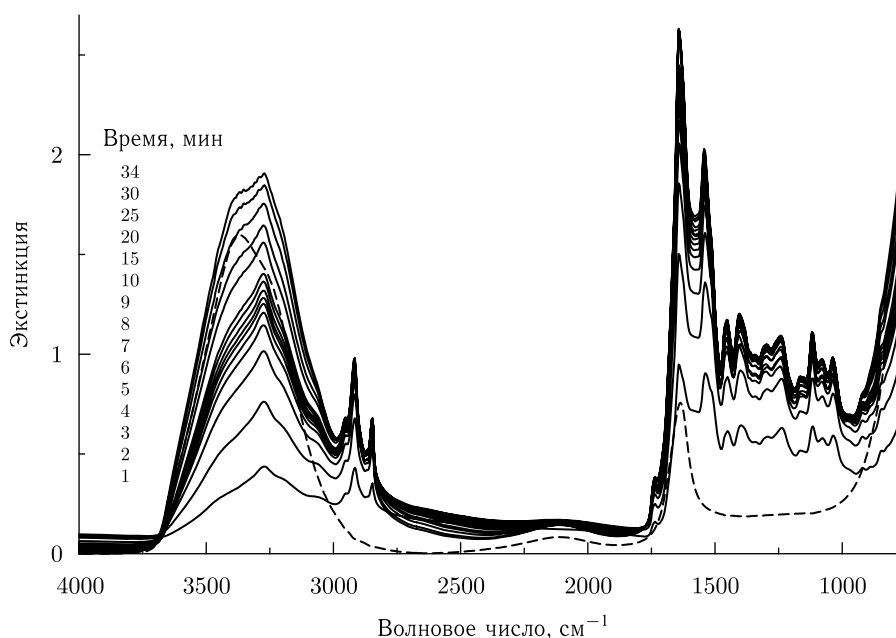


Рис. 5.12. ИКС НПВО ФП-спектры гидратированного рогового слоя кожи человека, последовательно измеренные через каждую минуту в течение получаса окклюзии [1168]. Пунктирная линия изображает спектр воды (увеличенный вдвое). Видны спектральные изменения: увеличенный вклад в полосу деформационного колебания воды на 1640 см^{-1} и заметное усиление высокочастотной полосы валентных колебаний ОН на 3300 см^{-1} . При гидратации в спектре ясно видна также комбинационная полоса воды на 2125 см^{-1} . Для записи спектров использовался спектрометр Nicolet-800 с преобразованием Фурье; НПВО осуществлялось с помощью кристалла ZnSe ($n = 2,42$) прямоугольной формы ($10 \times 80\text{ мм}$) с 45 -градусными входной и выходной гранями. Спектр НПВО ФП получался путем фурье-преобразования 64 и 128 интерферограмм. Время сбора данных для 64 проходов сканирования при разрешении 8 см^{-1} составляло около 20 с. Спектры записывались с ладонной стороны предплечья путем слабого прижатия ZnSe кристаллической призмы

Метод КР обладает некоторыми характеристиками, которые делают его особенно подходящим для исследований кожи как *in vitro*, так и *in vivo* [1166, 1168]. Конфокальные спектры КР кожи *in vivo* демонстрируют значительный спад абсолютной интенсивности сигнала при увеличении расстояния между лазерным фокусом

и поверхностью кожи. Это обусловлено, в основном, диффузным рассеянием света, которое является намного более сильным эффектом в коже, чем поглощение. Конфокальная регистрация, таким образом, особенно полезна при исследовании внешних слоев кожи, т. е. рогового слоя и живого эпидермиса. Сигнал КР от дермы *in vivo* сильно ослабляется из-за рассеяния в эпидермисе и поэтому требует значительно большего времени накопления, чем сигнал от эпидермиса. Однако, поскольку дерма намного толще эпидермиса (1–4 мм), ее легко исследовать с использованием неконфокальной схемы, в которой объем регистрации велик по сравнению с толщиной эпидермиса. В этом случае дерма будет доминирующим источником сигнала КР, что иллюстрируется рис. 5.13 [1168]. Здесь показаны спектры, снятые с использованием конфокального спектрометра и неконфокального волоконно-оптического зонда. Оба спектра нормированы на одинаковую интенсивность. Ясно, что сигнал, полученный с помощью волоконно-оптического зонда, почти полностью определяется сигналом КР от дермы. Для одинаковых времен сбора сигнала отношение сигнал–шум у спектра, снятого волоконно-оптическим зондом, значительно выше, чем у спектра, полученного по конфокальной схеме [1168].

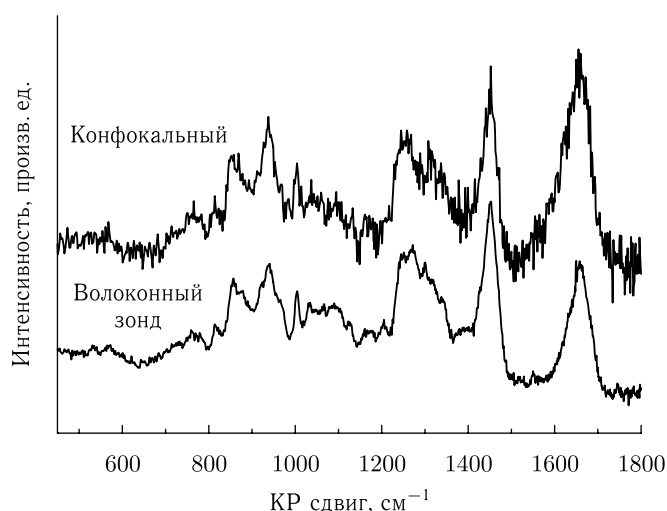


Рис. 5.13. Спектры комбинационного рассеяния дермы *in vivo*, полученные конфокальным и неконфокальным методами (с волоконно-оптическим датчиком). Время сбора сигнала 2 мин, лазерная мощность 100 мВт. Спектры нормированы на равную интенсивность [1168]

Спектроскопия КР ближнего ИК-диапазона также обладает рядом преимуществ при обнаружении патологий ткани шейки матки *in vivo*, в частности, для распознавания предраковых состояний [30, 1169].

Гигантское КР (усиленное на шероховатой поверхности) (Surface-enhanced Raman scattering, SERS), основано на значительном усилении сигнала КР молекулами при их взаимодействии с субмикронными металлическими структурами или наночастицами [1163, 1173–1175]. Считается, что в механизм усиления КР дают вклад два эффекта: электромагнитный и химический [1163, 1173]. Для гладкой металлической поверхности имеет место лишь небольшое (в десять и менее раз) усиление интенсивности по сравнению с КР при отсутствии поверхности, но если поверхность шероховатая, то благодаря возбуждению электромагнитных резонансов падающим излучением усиление достигает нескольких порядков. Эти резонансы появляются

из-за коллективного возбуждения электронов проводимости в мелкомасштабных металлических структурах и называются также плазмонными резонансами. Как возбуждающее, так и рассеянное поле вносят вклад в это усиление, и таким образом сигнал SERS оказывается пропорциональным четвертой степени фактора усиления поля [1173].

Эффект шероховатости может быть достигнут с использованием изолированных металлических частиц, решеток, ансамблей частиц на поверхностях и случайно-шероховатых поверхностей [1173–1175]. Все эти структуры обеспечивают усиление, если металл имеет узкие плазмонные резонансы на подходящих для измерений КР частотах. «Химический механизм» включает усиление, возникающее из-за взаимодействий между молекулой и металлом. Наиболее часто рассматриваемое взаимодействие, требующее перекрытия волновых функций молекулы и металла, происходит, когда перенос заряда между поверхностью и молекулой приводит к образованию возбужденных состояний, которые играют роль промежуточных резонансных состояний в комбинационном рассеянии [1163, 1173]. Взаимодействия, не требующие перекрытия волновых функций молекулы и металла, возникают благодаря электромагнитной связи между колеблющейся молекулой и металлом. Эти взаимодействия могут происходить как на колебательной частоте, так и на оптических частотах. Комбинированный фактор усиления может достигать 10^{14} , что достаточно для наблюдения спектров SERS от единичных молекул.

Глава 6

ФАНТОМЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ

Описываются структуры, технологии изготовления и характеристики тканеподобных фантомов, используемых для тестирования методов и устройств оптической диагностики, а также для дозиметрии лазерного и другого оптического излучения при проведении фототерапии.

6.1. Введение

Искусственные или виртуальные стандарты биологических тканей, известные как «фантомы», физически моделирующие распространение света в биоткани, необходимы для оценки методов измерения, калибровки оборудования, оптимизации диагностических и терапевтических процедур и гарантии их качества [31, 46, 47, 93–95, 197, 313, 314, 330, 333, 334, 389, 403, 410, 467–469, 545, 767, 840, 867, 864, 868, 870, 884, 889, 992, 993, 997, 998, 1191–1238]. Оптические медицинские устройства визуализации, диагностики и терапии должны проходить полный цикл исследований и разработок, так же как и все другие медицинские приборы и технологии, от фундаментальных исследований до практического применения в клинических условиях (рис. 6.1) [1209]. Продвижение оптических медицинских технологий в практику на всех этапах от разработки концепции до получения необходимых параметров требует калибровки и поверки методик и инструментов. Оптические медицинские приборы должны снабжаться фантомами биотканей, служащими для тестирования и оптимизации оборудования, программного обеспечения и разнообразных приложений; обучения пользователей работе на оборудовании, а также обеспечения сопоставимости результатов измерений, полученных на различном оборудовании и в различных организациях [1219, 1220].



Рис. 6.1. Типичный порядок разработки и внедрения медицинских изделий от фундаментальных исследований до практического применения в клинических условиях [1209]

6.2. Концепция построения фантомов

Для описания концепции построения фантомов мы будем опираться на результаты работ [1193–1195, 1197]. Фантомы изготавливают из материала, обеспечивающего рассеяние света, материала с поглощением, растворителя и, в случае флуоресцентного фантома, добавляют флуорофоры [1193, 1194, 1197]. Распространенными жидкими рассеивающими средами являются Интралипид (Intralipid), Нутралипид (Nutralipid) или Липозин (Liposyn). Эти применяемые внутривенно питательные вещества представляют собой жировые эмульсии, содержащие соевое масло, фосфолипиды яйца и глицерин. Иногда в качестве рассеивающей среды используют разбавленное водой молоко. Для жидкостных фантомов часто в качестве рассеивателей берут латексные (изготовленные из полистирола) сферы микронных размеров. Полистироловые микросферы слабо флуоресцируют, и их оптические параметры можно рассчитать с помощью теории Ми. Поглощающие среды включают некоторые биологические красители, такие как трипановый синий, синий Эванса, индоцианиновый зеленый, метиленовый синий и фотофрин II, а также черную тушь. Растворителем обычно является деионизированная вода, хотя используются и фосфатно-буферные изотонические соляные растворы.

Оптический фантом создается путем смешивания рассеивающего и поглощающего веществ в растворителе в правильной пропорции, так чтобы получающаяся суспензия имела оптические параметры, присущие моделируемой биоткани. Указанные оптические параметры включают коэффициент поглощения μ_a , коэффициент рассеяния μ_s и фактор анизотропии g . Для мягких биотканей типичные оптические свойства следующие: $\mu_a \approx 0,5\text{--}5,0 \text{ см}^{-1}$, $\mu_s \approx 0,2\text{--}400 \text{ см}^{-1}$, $g = 0,9$ для видимого и ближнего ИК-диапазона длин волн (см. табл. 7.1).

Жидкостный фантом очень легко приготовить, однако его нельзя использовать для создания образцов реальной сложности. Образцы твердых фантомов обычно создаются с использованием либо прозрачной среды-хозяина, такой как полимеры, силикон или желатин, либо природно-рассеивающего материала, такого как воск. Известно, что фантомы на основе ряда полимеров трескаются, если их размеры слишком велики, или сжимаются во время полимеризации, что ограничивает их применимость. Гели содержат растворитель, который испаряется, изменяя размеры и оптические свойства образца в течение короткого времени.

Моделирование сложной реальной геометрии связано с необходимостью учета слоистости биоткани, искусственного введения неоднородностей (имитирующих, например, опухоль), построения сосудистой системы, а также построением фантомов, имитирующих целые органы [46, 47, 93–95, 330, 333, 334, 403, 410, 1193–1197]. Целый ряд фантомных систем имеет вполне удовлетворительные реалистичные оптические свойства в широком диапазоне длин волн [47, 94, 95, 333, 334]. Когда задача состоит в моделировании биоткани со сложной архитектурой или даже целого органа, или в изготовлении тестового объекта для оценки метода визуализации, в фантоме должна отображаться «макроскопическая» геометрия естественного объекта. Наиболее часто приходится отображать слоистую структуру биоткани. Например, многослойные фантомы были созданы для имитации кожи [870], головы человека [466, 1207], шейки матки [1201–1203].

Фантом биоткани должен удовлетворять следующим требованиям [1193, 1194]:

- он должен моделировать геометрию и оптические параметры физиологических структур, важных для распространения света;
- все компоненты должны быть совместимы друг с другом в отношении химической стабильности и спектроскопических свойств;

- существенные параметры переноса излучения должны быть воспроизводимыми и предсказуемыми в соответствии с составом образца;
- физические параметры фантомного образца должны быть стабильными во времени (испарение, диффузия, старение) и независимыми от влияния окружающей среды;
- фантом должен позволять создавать неоднородные образцы путем наложения слоев или тщательно отработанной формовки;
- приготовление образцов должно быть простым, быстрым и безопасным.

Стратегия планомерной разработки фантомов биотканей с реалистичными оптическими свойствами в широком диапазоне длин волн основана на моделировании биоткани системой дискретных частиц [1193, 1194], что соответствует фундаментальной концепции описания оптических свойств биотканей в рамках дискретной модели (см. гл. 3).

Рассеяние и поглощение света частицами, образующими биоткань (фантом), рассчитываются по теории Ми. Существенными параметрами являются размер (радиус a) и форма частиц, их комплексный показатель преломления $n_s(\lambda_0)$ и показатель преломления диэлектрической среды-хозяина (основного материала), $n_0(\lambda_0)$,

$$n_{s,0}(\lambda_0) = n'_{s,0}(\lambda_0) + in''_{s,0}(\lambda_0), \quad (6.1)$$

или относительный показатель преломления вещества рассеивающих частиц и основного материала, $m = n_s/n_0$; λ_0 — длина волны света в вакууме. Мнимая часть комплексного показателя преломления материала рассеивающей свет частицы отвечает за потери из-за поглощения. Теория Ми дает сечения поглощения (σ_{abs}) и рассеяния (σ_{sca}), а также фазовую функцию рассеяния, из которых вычисляются коэффициенты поглощения и рассеяния, соответственно $\mu_a = \rho\sigma_{\text{abs}}$ и $\mu_s = \rho\sigma_{\text{sca}}$, и фактор анизотропии рассеяния g ; ρ — плотность рассеивающих частиц. В рамках теории Ми выражения для сечений рассеяния и поглощения, а также фактора анизотропии рассеяния даны уравнениями (3.53)–(3.55).

Введение удельных коэффициентов рассеяния и поглощения, экстраполированных к объемной доле 100% полезно для описания рассеивающих и поглощающих свойств конструируемой среды фантома [1193, 1194]. В этом случае, при условии что суспензия частиц достаточно разбавлена, чтобы предотвратить зависимое рассеяние, коэффициент рассеяния, приведенный коэффициент рассеяния и коэффициент поглощения пропорциональны безразмерной объемной доле рассеивающих частиц c_s :

$$\mu_s = c_s \bar{\sigma}_{\text{sca}}, \quad \mu'_s = c_s \bar{\sigma}_{\text{sca}} [1 - g(\lambda_0, a)], \quad \mu_a = c_s \bar{\sigma}_{\text{abs}}, \quad (6.2)$$

где удельные коэффициенты рассеяния и поглощения $\bar{\sigma}_{\text{sca}}$ и $\bar{\sigma}_{\text{abs}}$ выражены в см^{-1} . Оптические параметры систем с распределением частиц по размерам определяются как средние с объемной долей частиц каждого диаметра в качестве весовой функции. Относительная частота, с которой встречается соответствующий размер частицы, определяется по изображениям, полученным с помощью электронного микроскопа. Результирующие удельные оптические коэффициенты представляют собой усредненные значения и могут быть определены аналогично соотношениям (3.24)–(3.27). Среднее расстояние d_s между центрами тяжести частиц определяется их радиусом a и объемной долей c_s ,

$$d_s = \frac{2a}{\sqrt[3]{c_s}}. \quad (6.3)$$

Согласно теории Ми интенсивность рассеянного света сферическими частицами микрометрового размера максимальна при радиусе частицы, сравнимом с длиной волны. Теория Ми строго применима только к сферическим частицам, но ее результаты

полезны для значимых оценок и в случае частиц неправильной формы. Осцилляции коэффициента рассеяния и фактора анизотропии рассеяния в зависимости от размера частиц, имеющие место в случае сферических частиц (рис. 6.2), при этом усредняются [214]. Транспортный коэффициент рассеяния μ'_s сильно увеличивается с ростом отношения n'_s/n_0 . В свою очередь, фактор анизотропии рассеяния максимален, когда указанное отношение стремится к 1 (рис. 6.2). При конструировании фантомов часто приходится соблюдать компромисс между максимально достижимым коэффициентом рассеяния (обычно ограничение связано с появлением зависящего рассеяния) и оптимальным значением фактора анизотропии рассеяния.

Для согласованных показателей преломления рассеивающих частиц и окружающего (базового) материала коэффициент рассеяния стремится к нулю. Это означает, что за ослабление светового пучка в таком случае отвечает только поглощение (см. уравнение (1.1)). Однако, как следует из теории Ми, взвесь поглощающих частиц в среде с согласованным показателем преломления дает сильное резонансное рассеяние вперед. Поглощение света такими частицами меньше, чем можно ожидать по их объемному коэффициенту поглощения [1193, 1194]. Например, для частиц диаметром 1 мкм с $n_s = 1,6$ и объемным коэффициентом поглощения их материала, равным 10^4 см^{-1} в среде с согласованным показателем преломления коэффициент поглощения системы частиц $\mu_a = c_s \cdot 4120 \text{ см}^{-1}$.

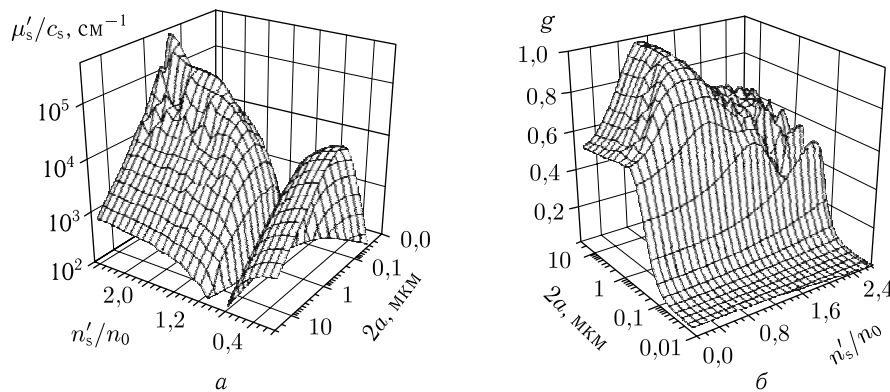


Рис. 6.2. Проектирование фантома биоткани. Рассеивающие свойства непоглощающих частиц на длине волны 633 нм рассчитаны по теории Ми [1193, 1194]. Транспортный коэффициент рассеяния (а) сильно зависит как от размера частиц, так и от относительного показателя преломления. Этот график приблизительно симметричен. Ось симметрии приходится на $n'_s/n_0 = 1$. В то время как при условии согласования показателей преломления рассеивателей и окружения коэффициент рассеяния равен нулю, фактор анизотропии рассеяния (б) максимален. В некоторых частях показанного диапазона функции не монотонны, а быстро осциллируют

Зависимости параметров рассеяния от длины волны показаны на рис. 6.3. Спектральными изменениями показателя преломления при расчетах пренебрегали, однако на практике они могут быть важны. Если размер частиц и отношение показателей преломления фиксированы, то характер зависимости параметров рассеяния от длины волны обусловлен отношением размера частиц к длине волны. Для частиц с показателем преломления, близким к показателю преломления окружающей среды (см. рис. 6.3), коэффициент рассеяния системы частиц с диаметром меньше длины волны убывает с ростом длины волны, в то время как при диаметре частиц больше длины волны он почти постоянен. Фактор анизотропии рассеяния менее зависим

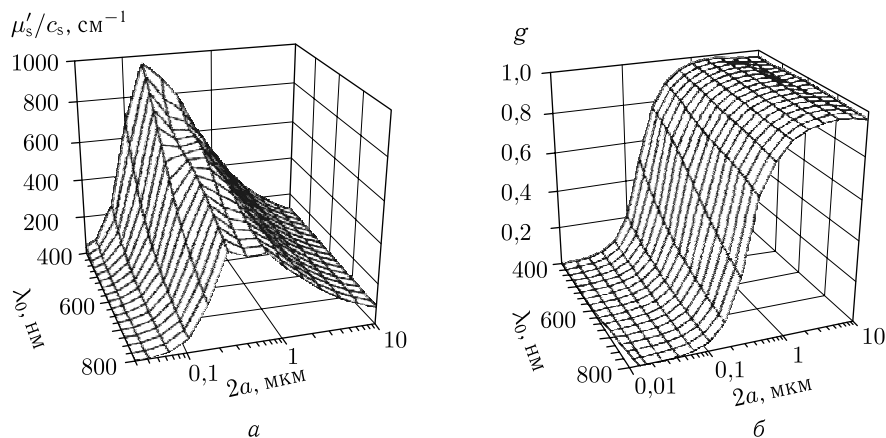


Рис. 6.3. Проектирование фантома биоткани. Зависимости параметров рассеяния для непоглощающих частиц от длины волны при $n'_s/n_0 = 1,07$ рассчитаны по теории Ми [1193, 1194]. Удельный транспортный коэффициент рассеяния (а) частиц, меньших длины волны, сильно растет в сторону коротких длин волны. Частицы с диаметром больше длины волны имеют почти постоянный удельный транспортный коэффициент рассеяния по всему видимому диапазону. Фактор анизотропии рассеяния (б) почти не зависит от длины волны, но сильно зависит от размера частиц

от длины волны. Имеются плато при размерах частиц много меньше (изотропное рассеяние) и много больше (сильно анизотропное рассеяние), чем длина волны, между которыми расположен участок крутого возрастания.

Биологические ткани демонстрируют увеличение рассеяния при переходе в область более коротких волн и высокой анизотропии рассеяния. Это нельзя реализовать с монодисперсными частицами. Следовательно, смесь крупных частиц, вносящих значительную анизотропию рассеяния, и мелких частиц, определяющих рост рассеяния в области более коротких волн, является хорошим приближением для разработки фантома биоткани [271, 1193, 1194].

Следует отметить, что фантомы могут конструироваться не только на основе искусственных компонентов, при решении ряда задач фантомами могут служить инженерные биоткани, образцы *ex vivo* биотканей [1208] или биотканей животных *in vivo* после специальных операций, моделирующих ту или иную патологию [1223].

6.3. Примеры фантомов биологических тканей

Описанные в работе [1195] фантомы на длину волны лазерного излучения 1064 нм на основе смеси Интралипида и туши были разработаны с использованием предварительно экспериментально определенных коэффициентов поглощения и рассеяния и фактора анизотропии рассеяния компонентов. Для оценки оптических параметров компонентов фантомов и самих фантомов использовался метод интегрирующей сферы в сочетании с измерениями коллимированного пропускания света и алгоритмом обратного добавления–удвоения (ОДУ) (inverse adding-doubling, IAD). Средние оптические свойства из всех данных по компонентам фантома показаны в табл. 6.1. Сравнение предсказанных, измеренных и рассчитанных оптических параметров для двух фантомов представлено в табл. 6.2. В табл. 6.3 даны предсказанные (теория Ми) и измеренные (алгоритм ОДУ) данные для двух фантомов (водные суспензии полистироловых сфер диаметром 804 нм).

Таблица 6.1
Средние значения оптических параметров в зависимости от концентрации туши, 10%-го Интралипида и воды на длине волны 1064 нм [1195]

Рассеивающая среда	$\mu_s/\%$, см ⁻¹ /%	$\mu_a/\%$, см ⁻¹ /%	g
Тушь	4,64 ± 2,07	35,99 ± 4,28	0,30 ± 0,18
Интралипид	1,30 ± 0,047	0,054 ± 0,02	0,50 ± 0,02
Вода	—	0,0018	—

Примечание. Результаты по поглощению в Интралипиде скорректированы на поглощение в воде.

Таблица 6.2
Расчетные и измеренные оптические параметры фантомов [1195]

Фантомы	μ_s , см ⁻¹	μ_a , см ⁻¹	g
Фантом 1 (Интралипид и тушь)			
Оценка	8,82	0,32	0,48
Измерение	9,69 ± 0,22	0,76 ± 0,01	0,56 ± 0,00
Расчет	8,75	0,89	0,50
Фантом 2 (Интралипид)			
Оценка	8,82	0,00	0,48
Измерение	8,84 ± 0,03	0,33 ± 0,01	0,51 ± 0,00
Расчет	8,70	0,53	0,50

Примечание. Оценочные значения для фантомов 1 и 2 предполагают, что Интралипид и вода не поглощают, а тушь не рассеивает свет на длине волны 1064 нм. Рассчитанные значения определены по концентрационным зависимостям, приведенным в табл. 6.1.

Таблица 6.3
Расчетные и измеренные оптические свойства фантомов (водная суспензия полистироловых сфер диаметром 804 нм) на длине волны 1064 нм [1195]

Фантомы	μ_s , см ⁻¹	μ_a , см ⁻¹	g
Фантом 1			
Расчет	2,23	—	0,807
Измерение	1,99 ± 0,12	0,28 ± 0,02	0,775 ± 0,04
Фантом 2			
Расчет	2,96	—	0,807
Измерение	3,15 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,811 ± 0,004

Примечание. Расчетные значения для фантомов 1 и 2 были получены на основе теории Ми. Коэффициенты поглощения не корректировались на учет поглощения воды.

Все эти данные ясно показывают, что жидкостные системы позволяют создавать фантомы биотканей с управляемыми характеристиками, и их оптические свойства, по крайней мере на одной длине волны, хорошо предсказываются теоретически. В частности, зная зависимость коэффициентов рассеяния и поглощения туши и Интралипида, можно создать фантом с наперед заданными оптическими свойствами. Однако результирующие оптические свойства созданного фантома должны быть обязательно протестированы для точного определения его оптических параметров. К сожалению, рассеивающие свойства разбавленного Интралипида соответствуют свойствам биотканей со сравнительно низким фактором анизотропии рассеяния, $g \approx 0,56$. Более реальное значение фактора анизотропии можно получить для водных суспензий полистироловых сфер с диаметром, близким к длине волны. Сравнение оптических параметров созданного фантома на длину волны 1064 нм с соответствующими параметрами реальных биотканей человека (табл. 7.1), показывает, что поглощающие свойства этих фантомов хорошо подходят для моделирования биотканей, а их рассеивающие свойства намного слабее, чем у многих биотканей.

Для проверки достоверности анализа оптических свойств кожи человека с помощью измерений отражательной способности *in vivo* применялись жидкостные фантомы, состоящие из Интралипида-10% в качестве рассеивающего вещества и красителя синего Эванса в качестве поглотителя, разведенные в фосфатно-буферном физиологическом растворе [767]. Концентрация Интралипида-10% изменялась в диапазоне от 10 до 50%, а красителя синего Эванса — от нуля до 0,01 г/л. В исследованиях *ex vivo* кожи человека в ближнем ИК-диапазоне длин волн использовались фантомы, состоящие из водных растворов полистироловых микросфер диаметром 1,27 мкм и инфракрасного красителя (S109 564 Zeneca) [333, 334]. Точность и пределы измерений экспериментальной установки для абсолютных измерений диффузного отражения с пространственным разрешением проверялись с использованием моделирующих биоткань фантомов, которые состояли из основного раствора Липозина-20% и красителя трипанового синего в качестве поглотителя [46, 93]. Для 1%-й объемной концентрации Липозина-20% (без трипанового синего) на длине волны 633 нм были получены значения $\mu'_s = 14,0 \pm 0,5 \text{ см}^{-1}$, $g = 0,8$ и $\mu_a = 0,005 \text{ см}^{-1}$.

При сравнении экспериментальных результатов для длины поглощения ($1/\mu_a$), транспортной длины ($l_{tr} = 1/\mu'_s$) и фактора анизотропии рассеяния (g) в зависимости от длины волны, полученных для 2%-го раствора Интралипида-10%, с теорией Ми, было найдено, что можно пользоваться следующими приближенными соотношениями [31, 92]:

$$\begin{aligned} \mu'_s(\lambda) &\approx 1,6 \cdot 10^3 \lambda^{-1} (\text{см}^{-1}), \\ g(\lambda) &\approx (1,1-0,58) \cdot 10^{-3} \lambda, \end{aligned} \quad (6.4)$$

для длин волн от 400 до 1100 нм. Для получения растворов с $\mu'_s = 76,9 \text{ см}^{-1}$ и $\mu'_s = 10 \text{ см}^{-1}$ на длине волны 550 нм, основной раствор Интралипид-10% был разбавлен как 1:2 и 1:15 соответственно [31, 92].

При конструировании фантомов с точными оптическими свойствами, воспроизводимыми в широком диапазоне длин волн, необходимо учитывать дисперсионные свойства материала компонентов фантома. Например, для водных суспензий полистироловых сфер зависимость показателя преломления воды (w) и полистирола (p) от длины волны учитывается с помощью известных дисперсионных функций этих веществ в видимом и ближнем ИК-диапазонах [1191]

$$n_w(\lambda) = 1,31848 + \frac{6,662}{\lambda_{[\text{нм}]} - 129,2} \approx 1,3199 + \frac{6878}{\lambda^2} - \frac{1,132 \cdot 10^9}{\lambda^4} + \frac{1,11 \cdot 10^{14}}{\lambda^6}, \quad (6.5)$$

$$n_p = 1,5626 + \frac{11690}{\lambda^2} - \frac{1,125 \cdot 10^9}{\lambda^4} + \frac{1,72 \cdot 10^{14}}{\lambda^6}, \quad (6.6)$$

где λ выражается в нанометрах.

Для изучения индуцированных импульсным лазером механических напряжений в нерассеивающей однородно поглощающей среде, для которой теоретическое описание оптоакустических явлений достаточно простое, в качестве фантома использовался водный раствор хромата калия (K_2CrO_4) [840, 884]. Этот раствор не флуоресцирует, и, следовательно, вся поглощенная энергия лазерного импульса переходит в тепло, он фотохимически стабилен, и его оптические свойства не меняются даже при больших лазерных интенсивностях. Раствор с концентрацией K_2CrO_4 35 мг/см⁻³ дает коэффициент поглощения ~ 1000 см⁻¹ на длине волны 355 нм. Разбавление исходного раствора позволяет контролировать глубину проникновения света и, следовательно, частоту индуцированной лазером акустической волны [840].

Генерацию, распространение и регистрацию индуцированного лазером напряжения в биотканях можно успешно моделировать с помощью рассеивающих и поглощающих свет гелей [840]. Для приготовления гелевых фантомов теплая вода (90 см³) смешивается с 10 г желатинового порошка. Эти гели окрашиваются хроматом калия и делаются рассеивающими с помощью полистироловых микросфер диаметром 0,9 мкм. Десятипроцентная суспензия полистироловых сфер имеет коэффициент рассеяния $\mu_s = 6090$ см⁻¹ и фактор анизотропии $g = 0,918$ на длине волны 355 нм, что дает приведенный коэффициент рассеяния, равный $\mu'_s = 499$ см⁻¹. Коэффициент поглощения на длине волны 355 нм определяется концентрацией K_2CrO_4 , и может быть очень большим (до 1000 см⁻¹). Однако область спектра, важная для биомедицинской оптики, — это видимый и ближний инфракрасный диапазоны, где осуществляются диагностика, визуализация и фотодинамическая терапия. Уменьшение концентрации полистироловых сфер в экспериментальных гелях до $\sim 2\%$, дает $\mu'_s = 99$ см⁻¹. Типичное отношение μ'_s/μ_a для биологических объектов на длинах волн 600–1000 нм составляет от 70 до 100, что можно легко реализовать для таких фантомов. Мягкие эластичные гелевые коллагеновые фантомы можно приготовить, используя в качестве рассеивающего вещества молоко, и окрасить гемоглобином или даже цельной кровью. В них легко внедрить включения, моделирующие различные патологические состояния (например, поглощающую сферу, имитирующую опухоль) или специфические структуры биоткани (например, сеть кровеносных сосудов).

Хорошей альтернативой более сложным твердым фантомам является добавление небольшой концентрации агарозы для отверждения хорошо описанных и легкодоступных водных растворов Интралипида и туши [410]. Растворы в таких фантомах состоят из 1% агарозы в дистиллированной воде с добавлением Интралипида и черной туши. Агароза продуцирует желатин, который легко обрабатывается для создания и внедрения включения различной формы. Кроме того, желатиновые (коллагеновые) гелевые фантомы с различными оптическими свойствами легко сложить стопкой друг на друга, чтобы получить модель биоткани со слоистой структурой [403, 1201–1203]. При построении желатиновых (коллагеновых) гелевых фантомов частицы диоксида титана (TiO_2) можно использовать как рассеивающие, а тушь — как поглотитель.

Частицы TiO_2 диаметром 0,3 мкм и краситель Projet 900NP (Zepesa) использовались как рассеивающие и поглощающие вещества в твердых фантомах из эпоксидной смолы Agaldite (Ciba Polymers) [333, 334]. Эти фантомы также позволяют комбинировать оптические свойства путем наложения слоев с различными оптическими параметрами. В качестве однородного твердого рассеивающего фантома для калибровки микроспектрофотометрической оптической системы использовался композит,

состоящий из мелкодисперсных частиц SiO_2 (диаметр < 10 мкм, доля заполняемого объема 43%) в органической матрице из метакрилата [389].

Стабильные во времени образцы фантомов изготавливаются на базе полиорганосилоксана (ПОС, силикон) [1193, 1194]. Сильно гидрофобный ПОС поставляется в мономерной форме как двухкомпонентная система. Он особенно пригоден для моделирования тонких структур. При добавлении связывающего компонента ПОС начинает полимеризоваться в результате реакции присоединения, что обычно занимает менее 30 мин при 80°C в сушильной печи. Не происходит ни усадки, ни растрескивания. Частицы диаметром до 40 нм иммобилизуются в сетчатой структуре этого материала. Получающаяся резина механически устойчива и прозрачна в видимом диапазоне. Ее показатель преломления равен 1,40 на длине волны 589 нм. Этот метод приготовления фантомов позволяет конструировать многослойные фантомы со ступенчатым изменением оптических свойств без зазоров между однородными слоями и включать особые детали биоткани, такие как мелко-структурированная поверхность, моделирующая, например, узорчатую поверхность кожи, или небольшие отверстия, моделирующие кровеносные сосуды. Для обеспечения необходимой величины рассеяния можно использовать различные типы частиц. Некоторые из них, имеющие пренебрежимо малое поглощение в видимом диапазоне, представлены в табл. 6.4. Эта таблица иллюстрирует область значений относительных показателей преломления, которую можно обеспечить при использовании двух рассмотренных фантомных систем.

Таблица 6.4

Относительные показатели преломления веществ, пренебрежимо мало поглощающих в видимом диапазоне [1193, 1194]

Вещество	В водном геле	В полиорганосилоксане (ПОС)
SiO_2	1,10	1,04
$\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	1,20	1,14
BaSO_4	1,23	1,17
MgO	1,31	1,24
$\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$	1,33	1,26
TiO_2	1,95	1,86

Примечание. Относительный показатель преломления приведен для водного геля ($n_0 = 1,33$) и ПОС ($n_0 = 1,40$ на 589 нм) в качестве базового вещества. Частицы предполагаются массивными.

Для достижения однородности фантома диспергирование частиц в основном веществе должно производиться с помощью ультрацентрифуги. Авторы работ [1193, 1194] использовали сферические частицы пористого оксида алюминия, частицы железа и модифицированной аминокислоты для получения нужных рассеивающих свойств. Некоторые данные, позволяющие сравнить оптические свойства, следующие из теории Ми с учетом оптических свойств изолированных частиц и их распределения по размерам и измеренные на силиконовых фантомах методом интегрирующей сферы, представлены в табл. 6.5. Эти фантомы были разработаны для моделирования флуоресценции компонентов биоткани, в частности флуоресценции протопорфирина IX.

Таблица 6.5

Сравнение результатов измерений методом интегрирующей сферы и расчета по теории Ми с учетом оптических свойств изолированных частиц [1193, 1194]

Длина волны, нм	Метод	Частицы пористого оксида алюминия		Частицы железа	
		$\bar{\sigma}_{sca}, \text{см}^{-1}$	$\bar{\sigma}_{abs}, \text{см}^{-1}$	$\bar{\sigma}_{sca}, \text{см}^{-1}$	$\bar{\sigma}_{abs}, \text{см}^{-1}$
546	Теория Ми	210 (50) ^a	—	3000 (600) ^b	4500 (900) ^b
546	Измерение	200 (10) ^b	< 0,7	3500 (900) ^a	3800 (200) ^a
633	Теория Ми	210 (50) ^a	—	3000 (600) ^b	4500 (900) ^b
633	Измерение	190 (10) ^b	< 0,7	2800 (800) ^a	3900 (200) ^a

Примечание. При оценке среднего показателя преломления частиц предполагалось, что поры в частицах полностью заполнены ПОС. Сферические частицы пористого оксида алюминия имеют симметричное распределение по размерам со средним значением $5,3 \pm 1,0$ мкм, а сферические частицы железа имеют асимметричное распределение по размерам: 16 % объемной доли составляют частицы размером до 2,0 мкм, 50 % — до 3,0 мкм и 34 % — до 3,6 мкм. Ошибки приведены в скобках в единицах последнего десятичного знака и представляют собой: ^a верхняя граница ошибки, обусловленной неопределенностью показателя преломления (состава частиц); ^b сумма ошибок измерения — ошибки, связанной с ограниченной воспроизводимостью при изготовлении образцов, ошибки измерения толщины образца и систематической ошибки диффузионной теории; ^b разброс значений, приведенных в литературе.

Фантомы биотканей используются во всех областях оптической диагностики, в частности при тестировании приборов для временной, частотно-модуляционной и пространственно-модуляционной оптической томографии и спектроскопии [410, 545, 1216, 1218–1220, 1230], измерений отражательной способности с пространственным разрешением [46, 93, 1198, 1199, 1215, 1219, 1237] и гиперспектральной визуализации [1222, 1223], в том числе с использованием многоцветных фантомов [1224]; для калибровки флуоресцентных спектроскопических методов [1193, 1194, 1197, 1201–1203] и для экспериментальной проверки теории и учета систематических погрешностей [47, 94, 95, 313, 314, 1195, 1197, 1211, 1212]. Разработаны фантомы биотканей для неинвазивного мониторинга глюкозы [467–469, 992, 993, 997–999, 1191, 1192, 1196, 1235], мониторинга степени оксигенации гемоглобина [889, 1204, 1219], тестирования оптоакустических [840, 884, 887, 889, 992, 993, 997, 998] и импульсных фототермических измерений [864, 868, 870], измерений степени деполяризации [586, 1205], калибровки отражательного конфокального микроскопа [1225] и оптических когерентных томографов [1226–1229, 1234, 1235]. С помощью жидкостных фантомов проверяется эффективность оптических просветляющих агентов [1231, 1232]. Особый класс фантомов, так называемые динамические фантомы, как правило, сочетают сложную структуру, отражающую сосудистую систему биоткани, и возможность прокачки жидкости, моделирующей кровь, или саму кровь по искусственной сети капилляров [1233–1236]. Такие фантомы часто строятся на базе технологии микрожидкостных устройств [1233, 1236] и используются для калибровки измерителей и визуализаторов скорости кровотока, включая спекл- и доплеровские системы [1233–1236]. Другой тип динамических фантомов учитывает различия в поглощении гемоглобина в поверхностных и глубоких слоях ткани и может моделировать активность мозга и других системных изменений [1237]. Разрабатываются фантомы для калибровки сигналов комбинационного рассеяния от различных типов биотканей [1189, 1235].

Тканеподобные фантомы применяются также в исследованиях, связанных с терапевтическим воздействием оптического излучения, среди которых отметим дозиметрию светового облучения [1206], лазерную абляцию [884] и фотодинамическую терапию [1200, 1206].

Достаточно полный обзор исследований по фантомам биологических тканей, проведенных до 2006 г., дан в работе [1208]. В этом обзоре представлены основные составы фантомов, описаны свойства материалов для основы (матрицы) фантомов и материалов, обеспечивающих требуемое рассеяние и поглощение, а также дано обсуждение достоинств и недостатков каждой из категорий фантомов. Основными материалами обычно являются вода, желатин, агар, полиэфирные или эпоксидные и полиуретановые смолы, силиконы, вулканизируемые при комнатной температуре, или гели поливинилового спирта. Вода и гидрогели — это материалы, которые обеспечивают создание мягких сред, биологически и биохимически совместимых с органическими молекулами, и поэтому являются оптимальными для научных исследований в лаборатории. Полиэфир, полиуретан и силикон представляют собой матрицы с фиксированной неизменяющейся (или мало изменяющейся) композицией. Фантомы на их основе пригодны для протяженной во времени периодической калибровки и тестирования оптических систем. Наиболее распространенными являются три следующих вида рассеивателей: 1) липидные эмульсии, 2) частицы диоксида титана или оксида алюминия и 3) полимерные микросферы. Используемые поглотители могут быть биологического происхождения (такие как гемоглобин и некоторые клетки, содержащие пигменты) или искусственного (такие как молекулярные красители, тушь и чернила, которые менее совместимы биологически, но являются более стабильными поглотителями). В обзоре можно найти оптимальные рецепты по созданию фантома для конкретного приложения.

В работе [1225] детально описана процедура тестирования лазерного сканирующего конфокального микроскопа, работающего на отражение на длине волны 488 нм с помощью трех типов оптических фантомов: 1) полистирольных микросфер 100 нм диаметра в геле с 2%-й объемной долей частиц, 2) твердых фантомов на основе полиуретана (INO Biomimic™) и 3) широко известных стандартов отражения (Spectralon™). По измерениям экспоненциально затухающего отраженного сигнала по мере перемещения фокуса (z_f) в глубь материала определялся коэффициент рассеяния μ_s и фактор анизотропии рассеяния g материала фантомов. Результаты показывают, что μ_s изменяется в таких пределах, как 58, 8–24 и 130–200 см^{-1} для фантомов типа 1, 2 и 3, а g -фактор как 0,112, 0,53–0,67 и 0,003–0,26 соответственно.

Обзор исследований по разработке фантомов для оптической когерентной томографии (ОКТ), имитирующих оптические, механические и структурные свойства ряда биотканей, дан авторами работы [1226]. Такие фантомы являются важным элементом в дальнейшем развитии методов ОКТ и приложений. Авторы сосредоточились на анализе фантомов из силикона, фибрина и криогелей на основе поливинилового спирта (PVA-C) как наиболее многообещающих материалов для изготовления прочных фантомов с возможностью наиболее точного воспроизведения свойств биоткани.

В работе [1227] описан дизайн и характеристики оптических фантомов на основе силиконового эластомера. Необходимое поглощение было обеспечено добавлением зеленого красителя, а рассеяние — добавлением частиц TiO_2 или SiO_2 . В отсутствие поглотителей ОКТ-измерения демонстрируют линейную зависимость коэффициента затухания от концентрации рассеивателей. При отсутствии рассеяния оптическая спектроскопия пропускания показывает также линейную зависимость коэффициента поглощения от концентрации красителя. Оба типа образцов фантомов показали хорошую стабильность в течение 6 месяцев. Исследования фантомов с помощью конфокальной микроскопии продемонстрировали равномерное распределение рассеивателей

в образцах, хотя и с некоторой их кластеризацией. Использование тонких слоев материала фантомов, размером порядка 50 мкм, позволило конструировать сложные фантомы с проточными каналами, волнистыми интерфейсами (модель папиллярного слоя кожи), а также слоистые и изогнутые фантомы, моделирующие сетчатку глаза человека. Авторы также продемонстрировали возможность включения наночастиц золота в фантомы, что важно, например, для калибровки оптических устройств и методик диагностики предраковых состояний.

Оптические свойства квантовых точек (КТ) в виде отдельных частиц и кластеров в приложении к разработке новых типов оптических фантомов молекулярной визуализации, включая калибровку по времени жизни люминесценции, детально описаны в работе [1238].

6.4. Примеры моделей органов

В литературе описаны фантомные модели отдельных органов [466, 1197, 1207]. Например, кожа человека моделировалась пленкой (от 50 до 150 мкм) гидратированного коллагена типа I [867, 868]. Эта пленка содержала различное количество подповерхностных поглотителей, расположенных на заданной глубине и имитирующих дискретные хромофоры, скрытые в многослойной структуре кожи человека. Хромофоры создавались путем окрашивания пленки трифенилметановым красителем, который поглощает на длине волны 585 нм. Дискретные поглотители приготавливались разрезанием окрашенной коллагеновой пленки толщиной 125 мкм с известным коэффициентом оптического поглощения ($\mu_a = 400 \text{ см}^{-1}$) на многие тонкие полосы шириной от 100 до 300 мкм. Фантом кожи строился путем размещения поглощающих тонких полос на переменном расстоянии друг от друга (от 50 до 700 мкм) под слоем непоглощающего коллагена с толщиной 110 мкм. Поглощающие тонкие полосы и непоглощающие слои были расположены сверху на коллагеновой губке толщиной 10 мм, имитирующей полубесконечную среду, как в живой коже.

Другим примером моделирования целого органа является моделирование головы взрослого человека [330, 466, 1207]. Модель, описанная в работе [330], состоит из трех- или четырехуровневых слоев, последние из которых включают слой прозрачной цереброспинальной жидкости (ЦСЖ). Наиболее сложная модель имеет также прорези, имитирующие борозды на поверхности мозга. С помощью этих моделей было показано, что распространение света в голове взрослого человека сильно зависит от присутствия слоя прозрачной ЦСЖ. Как оптическая длина пути, так и пространственный профиль чувствительности у моделей со слоем ЦСЖ совершенно иные, чем у моделей без этого слоя. Напротив, геометрия борозд и границы между серым и белым веществом мало влияют на регистрируемое распределение света.

Разработан, изготовлен и испытан фантом с внедренными наночастицами, который был встроен в имеющуюся в продаже искусственную модель глаза для того, чтобы охарактеризовать функцию размытия изображающей точки сетчатки в трех измерениях в реальных условиях визуализации с помощью ОКТ-устройств [1229]. Фантом представляет собой образец прозрачной отвердевшей эпоксидной смолы с распределенными в ней редкими кремнево-золотыми наноболочками с сильным обратным рассеянием.

Глава 7

МЕТОДЫ И АЛГОРИТМЫ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ОПТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ

Представлены методы и алгоритмы для решения обратной задачи нахождения оптических параметров биотканей и крови, таких как коэффициенты рассеяния и поглощения, фактор анизотропии рассеяния и показатель преломления. Анализируются достоинства и недостатки этих методов. Дан обзор широко распространенных измерительных методов, таких как метод интегрирующих сфер, методы с разрешением по времени, пространству и углам, оптическая когерентная томография (ОКТ), а также обратных методов, таких как метод Кубелки–Мунка, многопоточковый, добавления–удвоения и обратный метод Монте-Карло. Представлены полные данные по оптическим параметрам биотканей и крови человека, измеренные *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*.

7.1. Основные принципы

Методы определения оптических параметров биотканей можно разделить на две большие группы: прямые и непрямые методы [1–4, 9–16, 29, 32, 33, 37, 38, 40, 46, 48, 49, 56, 72, 87–90, 98, 129, 130, 197, 230, 271, 274, 306, 315, 316, 320–322, 328–330, 333–335, 345, 383, 389, 495, 581, 767–769, 1239–1322]. Прямые методы основаны на некоторых фундаментальных концепциях и законах, таких как закон Бугера–Ламберта–Бера (см. уравнение (1.1)), фазовая функция однократного рассеяния (см. соотношения (1.13) и (1.15)) для тонких образцов или эффективная глубина проникновения света для толстых слоев. Измеряемыми параметрами являются коллимированное пропускание света T_c и индикатриса рассеяния $I(\theta)$ (угловая зависимость интенсивности рассеянного света, Вт/(см²·ср)) для тонких образцов, либо плотность потока энергии внутри толстого слоя. Нормированная индикатриса рассеяния, определяемая как отношение интенсивности рассеянного света под углом θ к интенсивности рассеянного света строго в направлении вперед $I(\theta)/I(0)$ равна фазовой функции рассеяния $p(\theta)$, 1/ср.

Достоинством прямых методов является использование очень простых аналитических выражений для обработки данных. Их недостатки связаны с необходимостью строгого выполнения экспериментальных условий, диктуемых выбранной моделью. В тонких образцах — это однократность рассеяния, исключение эффектов поляризации света и рефракции на краях кюветы и т. п.; в толстых слоях с многократным рассеянием приемник излучения (обычно волоконный оптический световод с изотропно рассеивающим шариком на конце) должен быть расположен далеко как от источника света, так и от границ среды.

Непрямые методы позволяют найти решение обратной задачи рассеяния с использованием теоретической модели распространения света в среде. Модели, в свою очередь, делятся на итерационные и неитерационные. Первые используют уравнения, в которых оптические свойства определяются через параметры, непосредственно

связанные с вычисляемыми величинами. Последние основаны на двухпотоковой модели Кубелки–Мунка и многопотоковых моделях [40, 46, 56, 93, 275, 284, 306, 383, 1251, 1264]. В непрямых итерационных методах оптические свойства неявно определяются через измеряемые параметры. Величины, определяющие оптические свойства рассеивающей среды, пересчитываются до тех пор, пока рассчитанные и измеренные значения отражения и пропускания не совпадут с желаемой точностью. Эти методы громоздки, тем не менее, в связи с растущими возможностями компьютерной техники используемые оптические модели могут быть даже более сложными, чем лежащие в основе неитерационных методов. Примерами являются использование диффузионной теории [40, 275, 290–295], обратного метода добавления–удвоения (ОДУ) (inverse adding-doubling, IAD) [372, 392, 393, 1206, 1242, 1257, 1265–1267, 1316–1318] и обратного метода МК (ОМК) (inverse Monte Carlo, IMC) [306, 320, 333–335, 339, 341, 344, 370, 372, 383, 389, 390, 581, 723, 1240, 1245, 1246, 1252, 1255, 1268, 1274, 1277, 1278, 1308, 1309, 1316–1318].

Оптические параметры образцов биоткани (μ_a , μ_s и g) измеряются различными методами. Измерения *in vitro* и *ex vivo* чаще всего осуществляются методом двойной интегрирующей сферы в сочетании с измерениями коллимированного пропускания (см. рис. 7.1 и табл. 7.1). Этот подход подразумевает последовательное или одновременное измерение трех параметров: коллимированного пропускания $T_c = I(d)/I(0)$ (см. уравнение (1.1)), полного пропускания $T_t = T_c + T_d$ (где T_d – диффузное пропускание) и диффузного отражения R_d . Оптические параметры биоткани определяются по результатам этих измерений с использованием различных аналитических выражений или численных методов (двухпотоковых или многопотоковых моделей, методов ОКМ или ОДУ), связывающих μ_a , μ_s и g с исследуемыми параметрами.

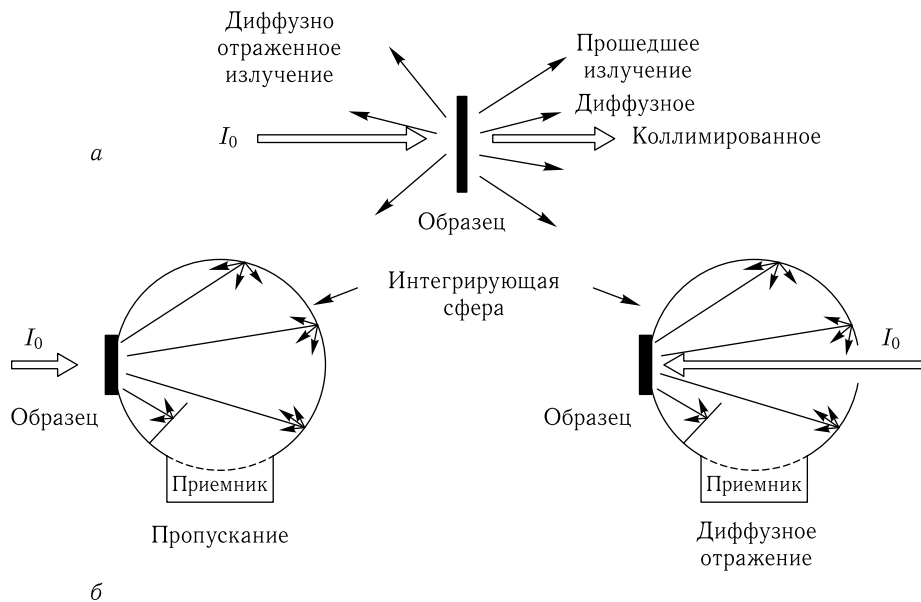


Рис. 7.1. Измерение коллимированного (а) и полного (б) пропускания и диффузного отражения с помощью интегрирующей сферы. Интегрирующая поверхность сферы покрыта BaSO_4 , MgO , или материалом Spectralon[®], которые имеют диффузное отражение в видимом и ближнем ИК-диапазоне, близкое к 100 % [6, 57]

Таблица 7.1
 Оптические свойства биологических тканей человека, измеренные *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* (в скобках указаны среднеквадратичные отклонения)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Измерения <i>in vitro</i>						
Аорта						
Норма	308	33	—	77	—	<i>Post mortem</i> , срезы ткани (6 ч)
Норма, коагуляция	308	44	—	270	—	в 4 °С-физиологическом растворе (ФР); коагуляция на водяной бане (85 °С); метод интегрирующей сферы (ИС); обратный метод добавления – удвоения (ОДУ) [40]
Фиброзная бляшка	308	24	—	81	—	
Фиброзная бляшка, коагуляция	308	34	—	272	—	
Норма	1064	0,53 (0,09)	239 (45)	23,9	0,9	<i>Post mortem</i> , срезы ткани; 70 °С
Коагуляция	1064	0,46 (0,18)	293 (73)	29,3	0,9	водяная баня, 10 мин; ИС; обратный метод Монте-Карло (ОМК); гониофотометрические измерения (ГФИ) [40]
Фиброзно-жировая	355	17,7	—	64,9	—	<i>Post mortem</i> , срезы ткани (24 ч
	532	3,6	—	24,8	—	после смерти); фотоакустический (ФА) метод [40]
	1064	0,09	—	7,7	—	
Норма	633 *	0,52	316	41	0,87	<i>Post mortem</i> , срезы ткани; ИС,
	1064 **	0,5	239	23,9	0,9	ГФИ; * диффузионная теория
	1064 *	0,7	—	22,4	—	(ДТ), ** ОМК [40]
	1320 **	2,2	233	23,3	0,9	
	1320 *	4,3	—	17,8	—	
Норма	470	5,3 (0,9)	—	42,6 (6,0)	—	Тонкие срезы (250 мкм, интима
	476	5,1 (0,9)	—	41,9 (5,9)	—	(внутренняя оболочка сосуда)
	488	4,5 (0,9)	—	39,9 (5,6)	—	и медиальная (средняя) часть стенки
	514,5	3,7 (0,9)	—	36,9 (5,4)	—	сосуда), ФР [764]; ИС; ДТ;
	580	2,8 (0,9)	—	31,1 (4,9)	—	исправленные данные (см. работу [3,
	600	2,6 (0,9)	—	29,6 (4,7)	—	с. 379])
	633	2,6 (0,9)	—	27,4 (4,4)	—	
	1064	2,7 (0,5)	—	15,5 (2,8)	—	

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Адвентициальная (наружная) оболочка	476	18,1	267	69,4	0,74	Замороженные срезы; ИС; ДТ [312]
	580	11,3	217	49,9	0,77	
	600	6,1	211	46,4	0,78	
	633	5,8	195	37,1	0,81	
Инги́ма (внутренняя оболочка)	1064	2,0	484	—	0,97	Двойная ИС (ДИС); ДТ [1281]
	476	14,8	237	45,0	0,81	Замороженные срезы; ИС; ДТ [312]
	580	8,9	183	34,8	0,81	
	600	4,0	178	33,8	0,81	
633	3,6	171	25,7	0,85		
Медиальная (средняя) часть стенки сосуда	1064	2,3	165	—	0,97	ДИС; ДТ [1281]
	476	7,3	410	45,1	0,89	Замороженные срезы; ИС; ДТ [312]
	580	4,8	331	33,1	0,90	
	600	2,5	323	35,5	0,89	
633	2,3	310	31,0	0,90		
Мочевой пузырь	1064	1,0	634	—	0,96	ДИС; ДТ [1281]
	Срезы ткани, ФР [40]					
	633	1,40	88,0	3,52	0,96	Срезы ткани, ФР [40]
	633	1,40	29,3	2,64	0,91	ДИС; ДТ [2, 1281]
1064	0,7	7,5	—	0,85		
1064	0,9	54,3	—	0,85		
1064	0,4	116	—	0,90		

Таблица 7.1 (продолжение)

Биопкань	λ , нм	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	μ'_s , см ⁻¹	g	Примечания
Кровь						
HbO ₂ (Hct = 0,41)	665	1,30	1246	6,11	0,995	Цельная кровь; измерение экстинкции и/или отражательной способности, и/или ГФИ; теория Ми, теория переноса или ОМК; данные из работ [40, 1281]
HbO ₂ (Hct = 0,41)	685	2,65	1413	14,13	0,990	
HbO ₂ (Hct = 0,41)	960	2,84	505	3,84	0,992	
HbO ₂ (Hct = 0,4)	810	4,5	—	6,6	—	
HbO ₂ (Hct = 0,4)	1064	3,0	—	3,4	—	
Hb (Hct = 0,41)	960	16,8	668	5,08	0,992	
Hb (Hct = 0,4)	810	4,5	—	3,9	—	
Hb (Hct = 0,4)	1064	0,3	—	6,6	—	
Hct = 0,47 (частичная оксигенация)	450 488 514 577 630 760	381 133 116 301 14,3 15,5	2940 3190 3320 3140 3660 2820	8,3 4,0 4,1 7,3 8,9 7,9	0,9972 0,9987 0,9988 0,9977 0,9976 0,9972	
(Hct = 0,45–0,46, оксигенация > 98 %)	633 710 765 810 865 910 965 1010 1065 1110 1165 1210	15,5 4 (0,8) 5,3 (0,6) 6,5 (0,5) 7,2 (0,3) 8,9 (0,4) 9,3 (0,6) 8,3 (0,4) 5,6 (0,3) 4,2 (0,3) 4,1 (0,7) 5,5 (0,5)	644,7 737 (75) 725 (75) 690 (80) 649 (25) 649 (25) 650 (25) 645 (25) 645 (25) 630 (20) 655 (15) 654 (20)	— — — — — — — — — — — —	0,982 0,986 (0,006) 0,991 (0,002) 0,989 (0,002) 0,990 (0,001) 0,992 (0,002) 0,991 (0,001) 0,992 (0,001) 0,992 (0,001) 0,993 (0,001) 0,993 (0,001) 0,995 (0,001)	ДИС; фазовая функция Хеньи–Гринштейна (ФФХГ), ОМК [1255, 1256]; данные из графиков работ [230, 345]; цельная кровь

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	μ'_s , см ⁻¹	g	Примечания
(Hct = 0,421, оксигенация > 99 %)	260	375,5 (9,0)	631,5 (57,6)	136,4 (28,0)	0,784 (0,030)	ИС; свежие эритроциты от здорового донора, разбавленные буферированным ФР; рН = 7,4; концентрация гемоглобина 129 г/л; температура стабилизирована на 20 °С; кювета без турбулентности с ламинарным потоком; толщина образца 116 мкм; постоянная сдвиговая скорость в потоке 600 с ⁻¹ ; при длинах волн вблизи 415 нм использовалась кювета толщиной 40 мкм; фазовая функция Рейнольдса – Мак-Кормика ($\alpha = 1,7$), ОМК; данные предоставлены авторами работы [1347]
	350	368,1	559,5	82,5	0,852	
	375	338,6 (4,2)	542,8 (66,5)	69,5 (12,7)	0,872 (0,007)	
	415	782,5 (62,9)	390,3 (61,2)	129,5 (17,0)	0,668 (0,008)	
	450	263,0	682,6	52,5	0,923	
	490	106,8	793,8	30,4	0,962	
	520	120,4 (6,9)	766,2 (42,4)	24,9 (7,6)	0,967 (0,009)	
	540	232,3	655,6	35,8	0,945	
	555	178,9	709,3	33,0	0,953	
	575	231,6	658,0	31,7	0,952	
	585	160,2 (10,3)	751,7 (46,1)	33,5 (9,7)	0,955 (0,007)	
	620	4,14	905,3	23,3	0,974	
	630	2,51 (0,09)	894,6 (28,6)	22,3 (3,3)	0,975 (0,004)	
	670	1,22	892,3	21,5	0,976	
	700	1,25	879,3	21,1	0,976	
	750	1,99	840,8	20,6	0,975	
780	285	821,5	20,5	0,975		
800	3,27 (0,12)	809,9 (66,4)	20,2 (5,4)	0,975 (0,003)		
830	4,90	798,7	20,1	0,975		
850	4,65	799,5	20,1	0,975		
870	5,10	784,4	20,1	0,974		
900	5,43	751,4	19,9	0,973		
950	6,15 (0,35)	712,0 (69,8)	20,8 (2,7)	0,971 (0,002)		
980	6,79	685,9	20,8	0,970		
1000	6,51	680,8	20,5	0,970		
1050	4,91 (0,12)	661,3 (12,8)	19,91 (0,67)	0,9699 (0,0006)		
1100	3,74	639,5	18,85	0,970		

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	μ'_s , см ⁻¹	g	Примечания
Мозг						
Астроциты (степень III ВОЗ, $n = 7$, различные места образца)	400	10*	84*	—	0,9*	Микроспектрофотометрия; ОМК; срезы ткани 600 мкм [389]; * данные из графиков
	633	6,3 (1,6)	67 (8)	—	0,883 (0,011)	
	700	4*	50*	—	0,88*	
	800	3*	50*	—	0,88*	
Глиома (мужчина, 65 лет, 4 ч <i>post mortem</i>)	415	16,6	—	6	—	Данные из графиков [39]
	488	12,5	—	3	—	
	630	3,0	—	3	—	
	800–1100	≈1,0	—	> 1–2	—	
Серое вещество (мужчина, 71 год, 24 ч <i>post mortem</i>)	514	19,5	—	85	—	
	585	14,5	—	63	—	
	630	4,3	—	52	—	
	800–1100	≈1,0	—	45–20	—	
Меланома (мужчина, 71 год, 24 ч <i>post mortem</i>)	585	2	—	158	—	
	630	20,0	—	75	—	
	800	8,0	—	40	—	
	900	4,0	—	30	—	
Белое вещество (женщина, 32 года, 24 ч <i>post mortem</i>)	1100	2,0	—	25	—	
	415	2,1	—	24	—	
	488	1,0	—	60	—	
	630	0,2	—	32	—	
Белое вещество (женщина, 63 года, 30 ч <i>post mortem</i>)	800–1100	0,2–0,3	—	40–20	—	
	488	2,7	—	25	—	
	630	0,9	—	22	—	
	800–1100	1,0–1,5	—	20–10	—	
Серое вещество	633	2,7 (2)	354 (37)	20,6 (2)	0,94 (0,004)	Свежая резекция, срезы ткани [40]
	1064	5,0 (5)	134 (14)	11,8 (9)	0,90 (0,007)	
Белое вещество	633	2,2 (2)	532 (41)	91 (5)	0,82 (0,01)	
	1064	3,2 (4)	469 (34)	60,3 (2,5)	0,87 (0,007)	

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Серое вещество Белое вещество	800	0,25	—	25	—	Работа [330]
	800	0,05	—	60	—	
Серое вещество ($n = 7$)	360	3,33 (2,19)	141,3 (42,6)	—	0,818 (0,093)	ДИС; ОМК [1255, 1256]
	640	0,17 (0,26)	90,1 (32,5)	—	0,89 (0,04)	
	1060	0,56 (0,7)	56,8 (18,0)	—	0,90 (0,05)	
Серое вещество, коагуляция ($n = 7$)	360	9,39 (1,70)	426 (122)	—	0,868 (0,031)	ДИС; ОМК; коагуляция на водяной бане (2 ч, 80 °С) [1255, 1256]
	740	0,45 (0,27)	—	—	—	
	1100	1,0 (0,45)	179,8 (32,6)	—	0,954 (0,001)	
Серое вещество	456	9	686	34,3	0,95	ИС; дельта-приближение Эддингтона [1287]; данные из работы [390]
	514	11,7	578	17,34	0,97	
	630	1,4	473	33,11	0,93	
	675	0,6	364	32,76	0,91	
	1064	1,9	267	10,7	0,96	
	—	—	—	—	—	
Белое вещество	456	8,1	923	73,84	0,92	
	514	5,0	1045	73,15	0,93	
	630	1,5	386	54,04	0,86	
	675	0,7	436	56,68	0,87	
	1064	1,6	513	25,65	0,95	
	—	—	—	—	—	
Белое вещество ($n = 7$)	360	2,53 (0,55)	402,0 (91,8)	—	0,702 (0,093)	ДИС; ОМК [1255, 1256]
	640	0,8 (0,2)	408,2 (88,5)	—	0,84 (0,05)	
	860	0,97 (0,4)	353,1 (68,1)	—	0,871 (0,028)	
	1060	1,08 (0,51)	299,5 (70,1)	—	0,889 (0,010)	
Белое вещество, коагуляция ($n = 7$)	360	8,3 (3,65)	604,2 (131,5)	—	0,800 (0,089)	ДИС; ОМК; коагуляция на водяной бане (2 ч, 80 °С) [1255, 1256]
	860	1,7 (1,3)	417,0 (272,5)	—	0,922 (0,025)	
	1060	2,15 (1,34)	363,3 (226,8)	—	0,930 (0,015)	

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Белое вещество	800	0,8 (0,16)	140 (14)	—	0,95 (0,02)	ДИС; ОМК, образцы 0,5–3 ч <i>post mortem</i> , быстрое замораживание и гомогенизация; коагуляция на водяной бане (75 °С) [1252]
	1064	0,4 (0,08)	110 (11)	—	0,95 (0,02)	
Белое вещество, коагуляция	800	0,9 (0,18)	170 (17)	10,2	0,94 (0,02)	ИС; ОМК, квазиньютоновский обратный алгоритм, ФФХГ; срезы ткани при низкой температуре без гемоглобина (< 48 ч <i>post mortem</i>); серое вещество — 100–200 мкм; белое вещество — 80–150 мкм; коагуляция: баня ФР, 80 °С, 2 ч; данные из таблицы работы [390]
	1064	0,5 (0,1)	130 (13)	9,1	0,93 (0,02)	
Серое вещество ($n = 7$)	450	0,7	117	14,04	0,88	ИС; ОМК, квазиньютоновский обратный алгоритм, ФФХГ; срезы ткани при низкой температуре без гемоглобина (< 48 ч <i>post mortem</i>); серое вещество — 100–200 мкм; белое вещество — 80–150 мкм; коагуляция: баня ФР, 80 °С, 2 ч; данные из таблицы работы [390]
	510	0,4	106	12,72	0,88	
	630	0,2	90	9,9	0,89	
	670	0,2	84	8,4	0,90	
	850	1,0	342	41	0,88	
	1064	1,0	296	32,56	0,89	
Белое вещество, коагуляция ($n = 7$)	850	0,9	300	36,0	0,88	
	1064	0,1	270	29,7	0,89	
Астроциты (степень II ВОЗ, $n = 4$)	400	18,8 (11,3)	198,4 (55,6)	—	0,93 (0,03)	ИС; ОМК, квазиньютоновский обратный алгоритм, ФФХГ; срезы ткани при низкой температуре без гемоглобина (< 48 ч <i>post mortem</i>); мозжечок, серое вещество, варолиев мост и таламус (зрительный бугор) — 100–200 мкм, белое вещество — 80–150 мкм, опухоли, удаленные у пациентов ≈ 300 мкм толщиной, коагуляция: баня ФР, 80 °С, 2 ч; данные из графиков работы [390], взятые из [1285] с поправками
	490	2,5 (0,9)	158,5 (53,7)	—	0,96 (0,02)	
	600	1,2 (0,7)	132,4 (49,0)	—	0,96 (0,02)	
	700	0,5 (0,3)	113,2 (41,8)	—	0,96 (0,02)	
	800	0,7 (0,2)	96,7 (41,8)	—	0,96 (0,01)	
	900	0,3 (0,2)	86,4 (34,6)	—	0,96 (0,01)	
	1000	0,5 (0,3)	79,0 (34,2)	—	0,96 (0,01)	
	1100	0,6 (0,2)	73,8 (29,6)	—	0,96 (0,01)	
Мозжечок ($n = 7$)	400	4,7 (0,8)	276,7 (19,1)	—	0,80 (0,03)	
	500	1,4 (0,2)	277,5 (32,6)	—	0,85 (0,02)	
	600	0,8 (0,2)	272,1 (12,3)	—	0,87 (0,02)	
	700	0,6 (0,1)	266,8 (12,1)	—	0,89 (0,01)	
	800	0,6 (0,1)	250,3 (17,2)	—	0,90 (0,01)	
	900	0,7 (0,1)	229,6 (15,8)	—	0,90 (0,01)	
	1100	0,8 (0,1)	215,4 (14,7)	—	0,90 (0,01)	
	0,7 (0,1)	202,1 (13,9)	—	0,90 (0,01)		

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	μ'_s , см ⁻¹	g	Примечания	
Мозжечок, коагуляция ($n = 7$)	400	19,3 (7,7)	560,0 (25,5)	—	0,61 (0,01)		
	500	5,1 (1,7)	512,2 (47,8)	—	0,77 (0,02)		
	600	2,9 (1,4)	458,2 (65,6)	—	0,78 (0,01)		
	700	1,7 (0,4)	489,9 (70,1)	—	0,85 (0,01)		
	800	1,1 (0,2)	458,2 (54,0)	—	0,87 (0,02)		
	900	1,1 (0,3)	458,2 (65,6)	—	0,89 (0,02)		
	1000	1,0 (0,4)	419,1 (49,4)	—	0,90 (0,03)		
	1100	1,1 (0,5)	428,5 (40,0)	—	0,91 (0,03)		
	Серое вещество ($n = 7$)	400	2,6 (0,6)	128,5 (18,4)	—	0,87 (0,02)	
		500	0,5 (0,2)	109,9 (13,0)	—	0,88 (0,01)	
600		0,3 (0,1)	94,1 (13,5)	—	0,89 (0,02)		
700		0,2 (0,1)	84,1 (12,0)	—	0,90 (0,02)		
800		0,2 (0,1)	77,0 (11,0)	—	0,90 (0,02)		
900		0,3 (0,2)	67,3 (9,6)	—	0,90 (0,02)		
1000		0,6 (0,3)	61,6 (5,7)	—	0,90 (0,02)		
1100		0,5 (0,3)	55,1 (6,5)	—	0,90 (0,02)		
Серое вещество, коагуляция ($n = 7$)		400	7,5 (0,4)	258,6 (18,8)	—	0,78 (0,04)	
		500	1,8 (0,2)	326,5 (7,7)	—	0,85 (0,03)	
	600	0,7 (0,1)	319,0 (15,2)	—	0,87 (0,03)		
	700	0,7 (0,1)	319,0 (7,5)	—	0,88 (0,03)		
	800	0,8 (0,1)	252,7 (18,3)	—	0,87 (0,02)		
	900	0,9 (0,1)	214,6 (10,3)	—	0,87 (0,02)		
	1000	1,4 (0,2)	191,0 (18,7)	—	0,88 (0,03)		
	1100	1,5 (0,2)	186,6 (13,5)	—	0,88 (0,03)		
	Менингиома ($n = 6$)	410	4,1 (0,5)	197,4 (19,8)	—	0,88 (0,02)	
		490	1,3 (0,2)	188,2 (18,8)	—	0,93 (0,01)	
590		0,7 (0,2)	171,1 (12,7)	—	0,95 (0,01)		
690		0,3 (0,1)	155,5 (15,6)	—	0,95 (0,01)		
790		0,2 (0,1)	141,3 (14,2)	—	0,96 (0,01)		
910		0,2 (0,1)	116,8 (8,6)	—	0,95 (0,01)		
990		0,4 (0,2)	163,5 (15,3)	—	0,96 (0,01)		
1100		0,6 (0,2)	133,7 (19,2)	—	0,97 (0,01)		

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	μ'_s , см ⁻¹	g	Примечания	
Варолиев мост ($n = 7$)	400	3,1 (0,7)	163,5 (15,3)	—	0,89 (0,02)		
	500	0,9 (0,3)	133,7 (19,2)	—	0,91 (0,01)		
	600	0,6 (0,2)	109,4 (18,5)	—	0,91 (0,01)		
	700	0,5 (0,2)	93,5 (20,9)	—	0,91 (0,01)		
	800	0,6 (0,3)	83,6 (21,0)	—	0,91 (0,01)		
	900	0,7 (0,3)	74,8 (18,7)	—	0,92 (0,01)		
	1000	1,0 (0,4)	69,9 (17,5)	—	0,91 (0,01)		
	1100	0,9 (0,4)	64,0 (17,8)	—	0,92 (0,01)		
	Варолиев мост, коагуляция ($n = 7$)	410	17,2 (1,6)	685,7 (63,7)	—	0,85 (0,02)	
		510	8,5 (0,8)	627,5 (73,6)	—	0,89 (0,01)	
610		7,7 (0,5)	510,5 (70,5)	—	0,89 (0,01)		
710		6,9 (0,6)	402,5 (67,7)	—	0,89 (0,01)		
810		6,5 (0,6)	329,7 (55,4)	—	0,89 (0,01)		
910		5,9 (1,0)	276,0 (46,4)	—	0,88 (0,01)		
1010		5,7 (1,0)	241,6 (34,4)	—	0,88 (0,01)		
1100		6,5 (0,9)	221,1 (31,5)	—	0,88 (0,01)		
Таламус (зрительный бугор) ($n = 7$)		410	3,2 (1,0)	146,7 (49,4)	—	0,86 (0,03)	
		510	0,9 (0,3)	188,7 (31,9)	—	0,87 (0,03)	
	610	0,6 (0,2)	176,3 (34,5)	—	0,88 (0,02)		
	710	0,5 (0,3)	169,0 (28,7)	—	0,89 (0,03)		
	810	0,7 (0,3)	158,5 (35,3)	—	0,89 (0,02)		
	910	0,7 (0,3)	155,4 (22,3)	—	0,90 (0,02)		
	1100	0,8 (0,3)	139,3 (34,9)	—	0,90 (0,02)		

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	μ'_s , см ⁻¹	g	Примечания	
Таламус (зрительный бугор), коагуляция ($n = 7$)	400	15,0 (3,3)	391,1 (56,1)	—	0,83 (0,04)		
	500	4,2 (0,9)	399,9 (67,7)	—	0,90 (0,01)		
	600	1,6 (0,6)	365,7 (43,2)	—	0,92 (0,01)		
	700	1,4 (0,3)	327,0 (30,6)	—	0,92 (0,01)		
	800	1,1 (0,3)	286,0 (33,8)	—	0,93 (0,01)		
	900	1,1 (0,3)	267,4 (31,6)	—	0,93 (0,01)		
	1000	1,4 (0,4)	233,8 (39,7)	—	0,93 (0,01)		
	1100	1,5 (0,4)	223,6 (32,1)	—	0,94 (0,01)		
	Белое вещество ($n = 7$)	400	3,1 (0,2)	413,5 (21,4)	—	0,75 (0,03)	
		500	0,9 (0,1)	413,5 (43,9)	—	0,80 (0,02)	
600		0,8 (0,1)	413,5 (21,4)	—	0,83 (0,02)		
700		0,8 (0,1)	393,1 (30,9)	—	0,85 (0,02)		
800		0,9 (0,1)	364,5 (28,6)	—	0,87 (0,01)		
900		1,0 (0,1)	329,5 (35,0)	—	0,88 (0,01)		
1000		1,2 (0,2)	305,4 (15,9)	—	0,88 (0,01)		
1100		1,0 (0,2)	283,2 (22,2)	—	0,88 (0,01)		
Белое вещество, коагуляция ($n = 7$)		410	8,7 (1,7)	568,7 (111,9)	—	0,83 (0,03)	
		510	2,9 (0,6)	513,2 (116,9)	—	0,87 (0,02)	
	610	1,7 (0,4)	500,2 (129,9)	—	0,90 (0,02)		
	710	1,4 (0,5)	475,2 (108,3)	—	0,91 (0,01)		
	810	1,5 (0,5)	440,0 (114,3)	—	0,92 (0,01)		
	910	1,7 (0,6)	407,4 (92,8)	—	0,93 (0,01)		
	1010	1,9 (0,6)	367,7 (95,5)	—	0,93 (0,01)		
	1100	2,4 (0,5)	358,4 (81,6)	—	0,93 (0,01)		

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Серое вещество ($n = 25$)	400	9,778	—	25,878	—	ИС; ОМК, фактор анизотропии $g = 0,85$ и показатель преломления $n = 1,40$ считались фиксированными для каждой длины волны и каждого образца; образцы тканей мозга были получены во время открытой краниотомии для удаления опухоли или временной лобэктомии, срезы при низкой температуре, без гемоглобина, толщиной от 0,22 до 1,25 мм; измерения проводились при 25 °С, рН = 7,4; данные были предоставлены авторами работы [1419]
	418	14,873	—	26,593	—	
	428	16,722	—	26,709	—	
	450	5,161	—	19,389	—	
	488	2,272	—	15,957	—	
	500	2,206	—	15,283	—	
	550	2,955	—	13,315	—	
	600	1,460	—	11,367	—	
	632	0,925	—	10,370	—	
	670	0,809	—	9,480	—	
	700	0,733	—	8,907	—	
	750	0,599	—	8,481	—	
	800	0,507	—	7,886	—	
	830	0,485	—	7,707	—	
	850	0,472	—	7,555	—	
	870	0,479	—	7,351	—	
	900	0,503	—	7,055	—	
950	0,521	—	6,868	—		
1000	0,585	—	6,059	—		
1064	0,502	—	5,333	—		
1100	0,502	—	5,197	—		
1150	0,815	—	5,070	—		
1200	1,010	—	4,882	—		
1250	0,865	—	4,669	—		
1300	0,894	—	4,560	—		

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	μ'_s , см ⁻¹	g	Примечания
Белое вещество ($n = 19$)	400	9,134	—	88,611	—	
	418	13,603	—	83,304	—	
	428	15,417	—	80,905	—	
	450	3,958	—	77,053	—	
	488	1,869	—	70,112	—	
	500	1,834	—	68,318	—	
	550	2,584	—	62,383	—	
	600	1,175	—	56,759	—	
	632	0,801	—	53,179	—	
	670	0,711	—	50,067	—	
	700	0,674	—	47,626	—	
	750	0,649	—	45,061	—	
	800	0,622	—	41,878	—	
	830	0,626	—	40,634	—	
	850	0,643	—	39,658	—	
	870	0,666	—	38,785	—	
900	0,684	—	37,607	—		
950	0,785	—	35,851	—		
1000	0,883	—	32,603	—		
1064	0,752	—	30,161	—		
1100	0,762	—	29,219	—		
1150	1,135	—	27,951	—		
1200	1,420	—	26,646	—		
1250	1,268	—	25,310	—		
1300	1,274	—	24,250	—		

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	μ'_s , см ⁻¹	g	Примечания
Глиома ($n = 39$)	400	12,393	—	39,009	—	
	418	17,496	—	37,867	—	
	428	16,124	—	37,076	—	
	450	4,891	—	32,340	—	
	488	2,592	—	28,933	—	
	500	2,352	—	28,057	—	
	550	2,768	—	25,300	—	
	600	1,149	—	22,514	—	
	632	0,846	—	21,068	—	
	670	0,741	—	19,608	—	
	700	0,709	—	18,543	—	
	750	0,679	—	17,343	—	
	800	0,656	—	15,969	—	
	830	0,662	—	15,481	—	
	850	0,670	—	15,133	—	
	870	0,685	—	14,749	—	
	900	0,707	—	14,138	—	
950	0,768	—	13,646	—		
1000	0,938	—	11,588	—		
1064	0,822	—	10,344	—		
1100	0,831	—	10,005	—		
1150	1,231	—	9,654	—		
1200	1,518	—	9,282	—		
1250	1,379	—	8,813	—		
1300	1,412	—	8,523	—		

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	μ'_s , см ⁻¹	g	Примечания
Женская молочная железа						
Жировая ткань в норме ($n = 23$)	749	0,18 (0,16)	8,48 (3,43)	—	—	Срезы ткани, содержание в ФР, 37 °С [329]
	789	0,08 (0,10)	7,67 (2,57)	—	—	
	836	0,11 (0,10)	7,27 (2,40)	—	—	
Фиброзная ткань в норме ($n = 35$)	749	0,13 (0,19)	9,75 (2,27)	—	—	Срезы ткани, содержание в ФР, 37 °С [329]
	789	0,06 (0,12)	8,94 (2,45)	—	—	
	836	0,05 (0,08)	8,10 (2,21)	—	—	
Инфильтрирующая карцинома ($n = 48$)	749	0,15 (0,14)	10,91 (5,59)	—	—	Срезы ткани, содержание в ФР, 37 °С [329]
	789	0,04 (0,08)	10,12 (5,05)	—	—	
	836	0,10 (0,19)	9,10 (4,54)	—	—	
Карцинома слизистой ($n = 3$)	749	0,26 (0,20)	—	6,15 (2,44)	—	Срезы ткани, содержание в ФР, 37 °С [329]
	789	0,016 (0,072)	—	5,09 (2,42)	—	
	836	0,023 (0,108)	—	4,78 (3,67)	—	
Карцинома протока <i>in situ</i> ($n = 5$)	749	0,076 (0,068)	—	13,10 (2,85)	—	Срезы ткани, содержание в ФР, 37 °С [329]
	789	0,023 (0,034)	—	12,21 (2,45)	—	
	836	0,039 (0,068)	—	10,46 (2,65)	—	

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Железистая ткань ($n = 3$)	540	3,58 (1,56)	—	24,4 (5,8)	—	Гомогенизированная ткань [1250]
	700	0,47 (0,11)	—	14,2 (3,0)	—	
	900	0,62 (0,05)	—	9,9 (2,0)	—	
Жировая ткань ($n = 7$)	540	2,27 (0,57)	—	10,3 (1,9)	—	
	700	0,70 (0,08)	—	8,6 (1,3)	—	
	900	0,75 (0,08)	—	7,9 (1,1)	—	
Фиброзно-кистозная ($n = 8$)	540	1,64 (0,66)	—	21,7 (3,3)	—	
	700	0,22 (0,09)	—	13,4 (1,9)	—	
	900	0,27 (0,11)	—	9,5 (1,7)	—	
Фиброаденома ($n = 6$)	540	4,38 (3,14)	—	11,1 (3,0)	—	
	700	0,52 (0,47)	—	7,2 (1,7)	—	
	900	0,72 (0,53)	—	5,3 (1,4)	—	
Карцинома ($n = 9$)	540	3,07 (0,99)	—	19,0 (5,1)	—	Срезы ткани толщиной 5–5,3 мм [317]
	700	0,45 (0,12)	—	11,8 (3,1)	—	
	900	0,50 (0,15)	—	8,9 (2,6)	—	
Карцинома	580	4,5 (0,8)	—	—	—	
	850	0,4 (0,5)	—	—	—	
	1300	0,5 (0,8)	—	—	—	
Смежная здоровая ткань	580	2,6 (1,1)	—	—	—	
	850	0,3 (0,2)	—	—	—	
	1300	0,8 (0,6)	—	—	—	
Жировая ткань	700	—	—	13 (5)	0,95 (0,02)	
Фиброгладулярная ткань	700	—	—	12 (5)	0,92 (0,03)	
Карцинома (центральная часть)	700	—	—	18 (5)	0,88 (0,03)	

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Жировая ткань Доброкачественная опухоль	625	0,06 (0,02)	—	14,3 (2,1)	—	Работа [31]
	625	0,33 (0,06)	—	3,8 (0,3)	—	
Инвазивная карцинома протока ($n = 10$; 9 в возрастных группах 55–65 лет и 1–35 лет)	450	2,55 (0,30)	—	31,5 (2,5)	—	Отражение с пространственным разрешением (ОПР); расстояние между источником и приемником, $r_{sd} > 1,2$ мм; волокна с диаметром сердцевины 400 мкм; срезы ткани толщиной ~ 10 мм; ДТ [1288]
	460	2,62 (0,34)	—	31,0 (2,4)	—	
	470	2,44 (0,25)	—	30,7 (2,2)	—	
	480	2,32 (0,26)	—	30,3 (2,4)	—	
	490	2,23 (0,25)	—	29,9 (2,4)	—	
	500	2,22 (0,22)	—	29,5 (2,2)	—	
	510	2,16 (0,24)	—	29,1 (2,3)	—	
	520	2,12 (0,22)	—	29,0 (2,3)	—	
	530	2,07 (0,22)	—	28,7 (2,0)	—	
	540	1,99 (0,21)	—	28,0 (2,1)	—	
	550	2,13 (0,23)	—	28,4 (2,0)	—	
	560	2,09 (0,21)	—	27,7 (2,0)	—	
	570	2,09 (0,25)	—	27,5 (1,9)	—	
	580	2,07 (0,21)	—	27,3 (2,0)	—	
	590	2,01 (0,22)	—	27,1 (1,7)	—	
	600	1,90 (0,19)	—	26,8 (1,8)	—	
	610	1,82 (0,18)	—	26,8 (1,6)	—	
620	1,71 (0,18)	—	26,4 (1,8)	—		
630	1,64 (0,17)	—	26,2 (1,5)	—		
640	1,55 (0,17)	—	25,9 (1,4)	—		
650	1,48 (0,15)	—	25,7 (1,3)	—		
633	—	—	—	0,96 (0,01)	ГФИ; срезы ткани 20 мкм; ФФХГ; $\theta = 10^\circ - 165^\circ$; радиус рассеивателя Ми — $a_M = 0,64$ (0,06) мкм [1288]	
633	—	—	—	0,86 (0,02)	ГФИ; срезы ткани 20 мкм, двойная ФФХГ ($g = f(1 - g_1) + (1 - f)g_2$); $\theta = 52^\circ - 165^\circ$; $a_M = 0,28$ (0,02) мкм [1288]	

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Смежная здоровая ткань ($n = 10$; 9 в возрастной группе 55–65 лет и 1–35 лет)	450	1,45 (0,22)	—	21,7 (2,1)	—	ОПР; $\tau_{sd} > 1,2$ мм; волокна с диаметром сердцевины 400 мкм; срезы ткани толщиной ~ 10 мм; ДТ [1288]
	460	1,48 (0,21)	—	21,3 (2,2)	—	
	470	1,42 (0,21)	—	20,8 (1,9)	—	
	480	1,35 (0,19)	—	20,3 (1,8)	—	
	490	1,26 (0,21)	—	19,9 (2,0)	—	
	500	1,24 (0,21)	—	20,1 (1,8)	—	
	510	1,23 (0,19)	—	19,1 (1,9)	—	
	520	1,19 (0,18)	—	18,7 (1,8)	—	
	530	1,14 (0,17)	—	18,4 (1,8)	—	
	540	1,19 (0,22)	—	18,0 (1,8)	—	
	550	1,16 (0,26)	—	18,2 (1,6)	—	
	560	1,14 (0,17)	—	17,4 (1,5)	—	
	570	1,13 (0,16)	—	17,2 (1,5)	—	
	580	1,17 (0,17)	—	16,9 (1,3)	—	
	590	1,07 (0,17)	—	16,6 (1,4)	—	
	600	1,00 (0,12)	—	16,4 (1,5)	—	
	610	0,95 (0,12)	—	16,2 (1,5)	—	
620	0,89 (0,11)	—	15,9 (1,3)	—		
630	0,82 (0,07)	—	15,7 (1,3)	—		
640	0,79 (0,08)	—	15,5 (1,2)	—		
650	0,74 (0,08)	—	15,3 (1,2)	—		
	633	—	—	—	0,88 (0,01)	ГФИ; срезы ткани 20 мкм; ФФХГ; $\theta = 10^\circ - 165^\circ$; $a_M = 0,32$ (0,02) мкм [1288]
	633	—	—	—	0,76 (0,01)	ГФИ; срезы ткани 20 мкм, двойная ФФХГ ($g = f(1 - g_1) + (1 - f)g_2$); $\theta = 52^\circ - 165^\circ$; $a_M = 0,19$ (0,02) мкм [1288]

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Толстая кишка						
Мышечная ткань	1064	3,3	238	—	0,93	Данные из работы [1281]
Подслизистая	1064	2,3	117	—	0,91	
Слизистая	1064	2,7	39	—	0,91	
Цельная	1064	0,4	261	—	0,94	
Пищевод	633	0,4	—	12	—	2,5-мм срез ткани [40]
Пищевод (слизистая)	1064	1,1	83	—	0,86	Данные из работы [1281]
Жир						
Брюшной	1064	3,0	37	—	0,91	Данные из работы [1281]
Подкожный	1064	2,6	29	—	0,91	
Желчные конкременты						
Пигментированные	351	102 (16)	—	—	—	Обезвоженный камень, внедрился в пластик и срезался 1-мм слой; импульсная фототермическая радиометрия [40]
	488	179 (28)	—	—	—	
	580	125 (29)	—	—	—	
	630	85 (11)	—	—	—	
	1060	121 (12)	—	—	—	
Холестериновые	351	88 (7)	—	—	—	
	488	62 (15)	—	—	—	
	580	36 (7)	—	—	—	
	630	44 (10)	—	—	—	
	1060	60 (9)	—	—	—	

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	μ'_s , см ⁻¹	g	Примечания
Голова (взрослого человека)						
Твердая мозговая оболочка (<i>dura mater</i>) ($n = 8$), меньше 24 ч <i>post mortem</i>	400	3,08 (0,15)	—	22,35 (0,89)	—	ИС; ОДУ: срезы ткани, хранимые при -12°C ; измерения при комнатной температуре; в спектральных диапазонах 480–550 и 600–700 нм: $\mu'_s = 4,54 \cdot 10^4 \lambda^{-1,23}$, $[\lambda] = \text{нм}$ [1292, 1293]
	450	1,51 (0,08)	—	22,89 (0,92)	—	
	500	1,09 (0,05)	—	21,60 (0,86)	—	
	550	1,10 (0,05)	—	18,48 (0,74)	—	
	600	0,80 (0,04)	—	17,11 (0,68)	—	
	650	0,70 (0,04)	—	15,51 (0,62)	—	
	700	0,74 (0,04)	—	13,99 (0,56)	—	
Кожа и кость черепа Цереброспинальная жидкость	800	0,4	—	20	—	Работа [330]
	800	0,01	—	0,1	—	
Кожа черепа ($n = 3$)	805	0,52 (0,04)	—	14,09 (1,74)	—	Скальп взрослого человека <i>post mortem</i> (< 12 ч), срезы ткани; ИС; ОДУ; данные усреднены по трем образцам толщиной $6 \pm 0,5$ мм; $3,5 \pm 0,15$ мм и $3,5 \pm 0,12$ мм [1342, 1343]
	900	0,40 (0,02)	—	15,66 (2,06)	—	
	950	0,39 (0,03)	—	16,44 (2,63)	—	
	1000	0,33 (0,03)	—	16,83 (2,77)	—	
	1100	0,19 (0,04)	—	17,10 (2,69)	—	
	1200	0,65 (0,04)	—	16,70 (2,89)	—	
	1300	0,50 (0,07)	—	14,70 (2,59)	—	
	1400	1,98 (0,31)	—	14,28 (3,69)	—	
	1430	2,19 (0,29)	—	13,15 (3,07)	—	
	1500	2,04 (0,35)	—	14,40 (3,75)	—	
	1600	1,43 (0,22)	—	14,16 (3,41)	—	
	1700	1,87 (0,28)	—	14,71 (3,51)	—	
	1800	1,73 (0,22)	—	13,36 (2,91)	—	
	1900	2,57 (0,28)	—	12,15 (3,05)	—	
1930	2,52 (0,25)	—	11,52 (2,57)	—		
2000	2,09 (0,29)	—	12,00 (2,91)	—		

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	μ'_s , см ⁻¹	g	Примечания
Кость черепа ($n = 8$)	801	0,11 (0,02)	—	19,48 (1,52)	—	Голова взрослого человека <i>post mortem</i> (24 ч), срезы ткани из затылочной части черепа; ИС; ОДУ; данные усреднены по 8 образцам $\mu'_s = 1,53 \cdot 10^3 \lambda^{-0,65}$, $[\lambda] = \text{нм}$ (спектральный диапазон от 1130 до 1910 нм исключен) [1342, 1343]
	900	0,15 (0,02)	—	18,03 (1,19)	—	
	980	0,23 (0,03)	—	17,38 (1,01)	—	
	1000	0,22 (0,03)	—	17,10 (0,91)	—	
	1100	0,16 (0,03)	—	15,92 (0,76)	—	
	1180	0,67 (0,07)	—	16,53 (0,83)	—	
	1200	0,67 (0,07)	—	16,77 (0,85)	—	
	1300	0,54 (0,05)	—	14,78 (0,80)	—	
	1400	2,43 (0,24)	—	17,22 (1,73)	—	
	1465	3,33 (0,31)	—	16,84 (1,88)	—	
	1500	3,13 (0,26)	—	15,96 (1,37)	—	
	1600	2,47 (0,40)	—	15,84 (3,05)	—	
	1700	2,77 (0,46)	—	16,12 (3,72)	—	
	1740	2,98 (0,54)	—	15,82 (3,79)	—	
	1800	2,97 (0,62)	—	15,42 (3,98)	—	
	1900	4,39 (1,33)	—	11,37 (2,76)	—	
	1930	4,97 (1,52)	—	10,92 (2,17)	—	
2000	4,47 (1,18)	—	11,48 (2,01)	—		
Сердце						
Эндокард	1060	0,07	136	—	0,97	Срез ткани, содержался в ФР[40]
Эпикард	1060	0,35	167	—	0,98	Данные из работы [1281]
	1060	0,3	177,5	—	0,96	
	1060	0,21	127,1	—	0,93	
	1060	0,4	137	—	0,98	
Трабекула	1064	1,4	424	—	0,97	
	1064	1,4	324	—	0,96	
Миокард	1060	0,52	—	4,48	—	Работа [581]

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	μ'_s , см ⁻¹	g	Примечания
Почка						
<i>Pars sup, Medulla ren</i>	1064	2,4	72	—	0,86	Данные из работы [1281]
	1064	2,1	77	—	0,87	
Печень	515	18,9 (1,7)	285 (20)	—	—	Замороженные срезы [1247]
	635	2,3 (1,0)	313 (136)	100	0,68	
	1064	0,7	356	—	0,95	
Легкое	630	3,2	414	—	0,95	Работа [581]
	515	25,5 (3,0)	356 (39)	—	—	Замороженные срезы [1247], данные из работы [1281]
	635	8,1 (2,8)	324 (46)	81	0,75	
1064	2,8	39	—	—	0,91	
Мышечная ткань	515	11,2 (1,8)	530 (44)	—	—	Замороженные срезы [1247], данные из работы [1281]
	1064	2,0	215	—	0,96	
Мениск	360	13	—	108	—	Замороженный и оттаявший срез ткани [40]
	400	4,6	—	67	—	
	488	1	—	30	—	
	514	0,73	—	26	—	
	630	0,36	—	11	—	
	800	0,52	—	5,1	—	
	1064	0,34	—	2,6	—	
		—	—	—	—	
Предстателезная железа						
Норма	850	0,6 (0,2)	100 (20)	—	0,94 (0,02)	Мгновенно замороженные срезы 60–500 мкм; 0,5–3 ч <i>post mortem</i> [1281]
	980	0,4 (0,2)	90 (20)	—	0,95 (0,02)	
	1064	0,3 (0,2)	80 (20)	—	0,95 (0,02)	
Коагулированная	850	7,0 (0,2)	230 (30)	—	0,94 (0,02)	Срезы 60–500 мкм; 0,5–3 ч <i>post mortem</i> , водяная баня (75 °С, 10 мин) [1281]
	980	5,0 (0,2)	190 (30)	—	0,95 (0,02)	
	1064	4,0 (0,2)	180 (30)	—	0,95 (0,02)	
Норма Коагулированная	1064	1,5 (0,2)	47 (13)	0,64	0,862	Свежий срез, водяная баня (70 °С, 10 мин) [40]
	1064	0,8 (0,2)	80 (12)	1,12	0,861	

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Норма ($n = 3$)	695	0,8	330 (30)		0,95	РЗ-приближение; толстые срезы; < 36 ч <i>post mortem</i> ; волоконный зонд [304]
Склера	650	0,08	—	25	—	Работа [441]
Склера ($n = 5$)	404	5,00 (0,50)	—	81,40 (8,14)	—	ИС; ОДУ; срезы ткани, < 24 ч <i>post mortem</i> , хранение в ФР при 4 °С; измерение при комнатной температуре; $\mu'_s = 8,95 \cdot 10^4 \lambda^{-1,16}$, $[\lambda] = \text{нм}$ [1292]
	449	3,99 (0,40)	—	73,34 (7,33)	—	
	499	2,96 (0,30)	—	65,17 (6,52)	—	
	549	2,26 (0,23)	—	58,00 (5,80)	—	
	599	1,95 (0,19)	—	53,16 (5,32)	—	
	649	1,74 (0,17)	—	48,21 (4,82)	—	
	699	1,67 (0,17)	—	44,15 (4,42)	—	
749	1,65 (0,17)	—	40,10 (4,01)	—		
799	1,58 (0,16)	—	37,64 (3,76)	—	—	
Кожа						
Роговой слой	193	6000	—	—	—	Замороженные срезы [40]
	250	1150	2600	260	—	Данные из графиков работы [37]; значения μ'_s вычислены по формуле (1.21) при $g = 0,9$
	308	600	2400	240	—	
	337	330	2300	230	—	
	351	300	2200	220	—	
	400	230	2000	200	—	
250	1000	2000	616	0,69	Данные из графиков работы [37]; μ'_s и g вычислены по формулам (1.21) и (7.26)	
308	300	1400	407	0,71		
337	120	1200	338	0,72		
351	100	1100	306	0,72		
415	66	800	206	0,74		
488	50	600	143	0,76		
514	44	600	139	0,77		
585	36	470	99	0,79		
633	35	450	88	0,80		
800	40	420	62	0,85		
Эпидермис						

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Дерма	250	35	833	257	0,69	Данные из графиков работы [37]; значения преобразованы в соответствии с данными для $\lambda = 633$ нм [1248] (обескровленная ткань, содержание воды 85%), μ'_s и g вычислены по формулам (1.21) и (7.26)
	308	12	583	170	0,71	
	337	8,2	500	141	0,72	
	351	7	458	127	0,72	
	415	4,7	320	82	0,74	
	488	3,5	250	60	0,76	
	514	3	250	58	0,77	
	585	3	196	41	0,79	
	633	2,7	187,5	37	0,80	
	800	2,3	175	30	0,85	
Эпидермис	517	19	480	—	0,787	Усреднено с использованием данных Веркрусса и др. (1993) и Ван Гемерта и др. (1992); оксигенированная кровь [387, 388]
	585	19	470	—	0,790	
	590	19	460	—	0,800	
	595	19	460	—	0,800	
	600	19	460	—	0,800	
	—	—	—	—	—	
Дерма	517	2,2	210	—	0,787	
	585	2,2	205	—	0,790	
	590	2,2	200	—	0,800	
	595	2,2	200	—	0,800	
	600	2,2	200	—	0,800	
	—	—	—	—	—	
Кровь	517	354	468	—	0,995	
	585	191	467	—	0,995	
	590	69	466	—	0,995	
	595	43	465	—	0,995	
	600	25	464	—	0,995	
Кожа (нога)	635	1,8 (0,2)	244 (21)	78	0,68	Замороженные срезы [1247]
Дерма	749	0,24 (0,19)	—	23,1 (0,75)	—	Замороженные срезы; ДИС [329]
	789	0,75 (0,06)	—	22,8 (1,29)	—	
	836	0,98 (0,15)	—	15,9 (2,16)	—	
Дерма	633	< 10	—	11,64	0,97	Тревик и Барбенель (1996) [333]

Таблица 7.1 (продолжение)

Биопкань	λ , нм	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	μ'_s , см ⁻¹	g	Примечания
Дерма	700	2,7 (1,0)	—	21,3 (3,7)	—	Анализ данных Харди и др. (1956) [322]
Дерма	633	1,9 (0,6)	—	23,8 (3,3)	—	Анализ данных работы [1248] в работе [322]
Дерма	633	1,5	—	50,2	—	Прал (1988) [333]
Кожа и нижележащие ткани, включая стенку вены (нога)	633	3,1	70,7	11,4	0,8	Срез ткани [463]
Кожа мужчины европеоидной расы (n = 3)	500 810	5,1 0,26	— —	50 15,8	— —	ИС; ОДУ; толщина образцов: 0,40; 0,23; 0,25 мм [1257]
Кожа мужчины европеоидной расы (n = 3), внешнее давление 0,1 кг/см ²	500 810	15,3 0,63	— —	167,4 52,7	— —	ИС; ОДУ; толщина образцов: 0,15; 0,05; 0,13 мм [1257]
Кожа мужчины европеоидной расы (n = 3), внешнее давление 1 кг/см ²	500 810	13,6 0,57	— —	156,7 53,4	— —	ИС; ОДУ; толщина образцов: 0,12; 0,05; 0,13 мм [1257]
Кожа женщины европеоидной расы (n = 3)	500 810	5,2 0,97	— —	23,9 8,2	— —	ИС; ОДУ; толщина образцов: 0,42; 0,50; 0,50 мм [1257]
Кожа женщины европеоидной расы (n = 3), внешнее давление 0,1 кг/см ²	500 810	7,4 1,4	— —	31,5 11,3	— —	ИС; ОДУ; толщина образцов: 0,30; 0,30; 0,34 мм [1257]

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	μ'_s , см ⁻¹	g	Примечания
Кожа женщины европеидной расы ($n = 3$), внешнее давление 1 кг/см ²	500	10,0	—	40,2	—	ИС: ОДУ; толщина образцов: 0,27; 0,20; 0,23 мм [1257]
	810	1,7	—	13,1	—	
Кожа мужчины латиноамериканской расы ($n = 3$)	500	3,8	—	24,2	—	ИС: ОДУ; толщина образцов: 0,70; 0,78; 0,63 мм [1257]
	810	0,87	—	7,5	—	
Кожа мужчины латиноамериканской расы ($n = 3$), внешнее давление 0,1 кг/см ²	500	5,1	—	37,6	—	ИС: ОДУ; толщина образцов: 0,35; 0,62; 0,48 мм [1257]
	810	0,93	—	11,4	—	
Кожа мужчины латиноамериканской расы ($n = 3$), внешнее давление 1 кг/см ²	500	6,2	—	40,4	—	ИС: ОДУ; толщина образцов: 0,28; 0,48; 0,33 мм [1257]
	810	0,87	—	10,2	—	
Кожа людей европеидной расы ($n = 21$)	400	3,76 (0,35)	—	71,79 (9,42)	—	ИС: ОДУ; срезы ткани, 1–6 мм; <i>post-mortem</i> < 24 ч; хранение при 20 °С в ФР; измерения при комнатной температуре; в спектральном диапазоне 400–2000 нм: $\mu'_s = 1,1 \times$ $\times 10^{12} \lambda^{-4} + 73,7 \lambda^{-0,22}$, [λ] = нм [1312]
	500	1,19 (0,16)	—	32,46 (4,21)	—	
	600	0,69 (0,13)	—	21,78 (2,98)	—	
	700	0,48 (0,11)	—	16,69 (2,27)	—	
	800	0,43 (0,11)	—	14,02 (1,89)	—	
	900	0,33 (0,02)	—	15,66 (2,06)	—	
	1000	0,27 (0,03)	—	16,83 (2,77)	—	
	1100	0,16 (0,04)	—	17,11 (2,69)	—	
	1200	0,54 (0,04)	—	16,71 (2,89)	—	
	1300	0,41 (0,07)	—	14,69 (2,59)	—	
	1400	1,64 (0,31)	—	14,28 (3,69)	—	
	1500	1,69 (0,35)	—	14,41 (3,75)	—	
	1600	1,19 (0,22)	—	14,16 (3,41)	—	
1700	1,55 (0,28)	—	14,71 (3,51)	—		
1800	1,44 (0,22)	—	13,36 (2,91)	—		
1900	2,14 (0,28)	—	12,15 (3,05)	—		
2000	1,74 (0,29)	—	12,01 (2,91)	—		

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Эпидермис	370	13,5 (1,6)	—	115,6 (12,5)	—	ИС; ИМК; срезы ткани [1420]; $g = 0,8$
	420	12,0 (1,2)	—	98,2 (9,9)	—	
	470	8,4 (0,6)	—	79,6 (8,2)	—	
	488	7,6 (0,7)	—	74,1 (7,4)	—	
	514	6,3 (0,7)	—	66,7 (6,6)	—	
	520	6,0 (0,7)	—	65,1 (6,4)	—	
	570	3,9 (0,8)	—	55,2 (5,5)	—	
	620	2,8 (0,7)	—	49,0 (4,7)	—	
	633	2,6 (0,7)	—	47,6 (4,5)	—	
	670	2,6 (0,8)	—	44,8 (4,3)	—	
	720	2,4 (0,7)	—	41,1 (3,9)	—	
	770	1,9 (0,6)	—	37,9 (3,7)	—	
	820	1,5 (0,6)	—	36,0 (3,5)	—	
	830	1,4 (0,6)	—	35,6 (3,5)	—	
	870	1,0 (0,5)	—	34,1 (3,4)	—	
	920	0,7 (0,4)	—	33,2 (3,4)	—	
	970	0,6 (0,3)	—	31,5 (3,4)	—	
	1020	0,4 (0,3)	—	30,2 (3,3)	—	
	1064	0,2 (0,2)	—	29,7 (3,2)	—	
	1070	0,2 (0,2)	—	29,7 (3,2)	—	
1120	0,2 (0,2)	—	28,6 (3,2)	—		
1170	0,6 (0,4)	—	27,1 (3,1)	—		
1220	0,7 (0,4)	—	26,3 (3,1)	—		
1270	0,6 (0,4)	—	26,2 (3,1)	—		
1320	1,1 (0,5)	—	25,3 (3,0)	—		
1370	5,6 (1,4)	—	25,0 (3,1)	—		
1420	23,6 (3,5)	—	30,1 (4,1)	—		
1470	29,6 (4,2)	—	30,8 (4,5)	—		
1520	18,9 (2,9)	—	26,6 (3,9)	—		
1570	10,1 (2,0)	—	23,9 (3,4)	—		

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Дерма	370	9,8 (1,4)	—	87,6 (13,6)	—	ИС; ИМК; срезы ткани [1420]; $g = 0,8$
	420	8,5 (1,1)	—	68,5 (8,9)	—	
	470	4,3 (0,6)	—	53,6 (6,0)	—	
	488	3,6 (0,5)	—	49,0 (5,1)	—	
	514	3,1 (0,4)	—	43,2 (4,1)	—	
	520	3,0 (0,4)	—	42,0 (3,9)	—	
	570	2,2 (0,3)	—	35,0 (3,1)	—	
	620	1,5 (0,2)	—	30,7 (2,8)	—	
	633	1,5 (0,2)	—	29,9 (2,7)	—	
	670	1,5 (0,2)	—	27,8 (2,6)	—	
	720	1,5 (0,2)	—	25,4 (2,4)	—	
	770	1,3 (0,2)	—	23,3 (2,4)	—	
	820	1,1 (0,2)	—	21,8 (2,3)	—	
	830	1,1 (0,2)	—	21,5 (2,3)	—	
	870	0,9 (0,2)	—	20,5 (2,2)	—	
	920	0,8 (0,2)	—	19,9 (2,3)	—	
	970	0,8 (0,2)	—	19,0 (2,2)	—	
	1020	0,7 (0,2)	—	18,4 (2,2)	—	
	1064	0,5 (0,2)	—	18,0 (2,1)	—	
	1070	0,5 (0,2)	—	17,9 (2,1)	—	
1120	0,6 (0,2)	—	17,4 (2,1)	—		
1170	1,2 (0,2)	—	16,9 (2,0)	—		
1220	1,3 (0,2)	—	16,5 (2,0)	—		
1270	1,0 (0,2)	—	16,3 (2,0)	—		
1320	1,5 (0,3)	—	16,1 (1,9)	—		
1370	4,8 (0,4)	—	16,6 (1,9)	—		
1420	17,6 (1,8)	—	20,3 (2,1)	—		
1470	21,9 (2,0)	—	21,3 (2,1)	—		
1520	14,1 (1,1)	—	18,7 (2,0)	—		
1570	8,5 (0,7)	—	16,5 (1,9)	—		

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	μ'_s , см ⁻¹	g	Примечания
Подкожный жир	370	11,8 (2,1)	—	5,27 (0,69)	—	ИС; ИМК; срезы ткани [1420]; $g = 0,8$
	420	16,5 (3,3)	—	4,59 (0,59)	—	
	470	7,5 (0,9)	—	3,92 (0,50)	—	
	488	6,3 (0,8)	—	3,69 (0,47)	—	
	514	4,7 (0,7)	—	3,37 (0,43)	—	
	520	4,4 (0,7)	—	3,31 (0,42)	—	
	570	3,1 (0,9)	—	2,89 (0,36)	—	
	620	1,5 (0,3)	—	2,59 (0,31)	—	
	633	1,4 (0,3)	—	2,54 (0,30)	—	
	670	1,3 (0,3)	—	2,40 (0,27)	—	
	720	1,2 (0,2)	—	2,22 (0,24)	—	
	770	1,1 (0,2)	—	2,07 (0,21)	—	
	820	1,0 (0,2)	—	1,98 (0,20)	—	
	830	1,0 (0,2)	—	1,96 (0,20)	—	
	870	0,9 (0,2)	—	1,89 (0,19)	—	
	920	0,9 (0,2)	—	1,81 (0,18)	—	
	970	0,9 (0,3)	—	1,76 (0,18)	—	
	1020	0,8 (0,2)	—	1,72 (0,16)	—	
	1064	0,7 (0,2)	—	1,69 (0,15)	—	
	1070	0,7 (0,2)	—	1,68 (0,15)	—	
1120	0,8 (0,2)	—	1,65 (0,15)	—		
1170	1,4 (0,3)	—	1,63 (0,15)	—		
1220	1,5 (0,3)	—	1,61 (0,15)	—		
1270	1,0 (0,3)	—	1,59 (0,14)	—		
1320	1,2 (0,3)	—	1,58 (0,14)	—		
1370	2,7 (0,4)	—	1,60 (0,15)	—		
1420	9,3 (1,4)	—	1,77 (0,18)	—		
1470	10,8 (1,8)	—	1,81 (0,19)	—		
1520	7,0 (1,2)	—	1,70 (0,17)	—		
1570	4,3 (0,7)	—	1,60 (0,16)	—		

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Инфильтрирующая базально-клеточная карцинома	370	6,8 (0,8)	—	65,2 (9,2)	—	ИС; ИМК; срезы ткани [1420]; $g = 0,8$
	420	6,7 (1,1)	—	58,9 (5,2)	—	
	470	3,3 (0,4)	—	48,8 (3,6)	—	
	488	2,9 (0,5)	—	45,0 (3,3)	—	
	514	2,6 (0,6)	—	40,4 (3,0)	—	
	520	2,5 (0,6)	—	39,5 (3,0)	—	
	570	2,0 (0,7)	—	33,3 (2,8)	—	
	620	1,5 (0,6)	—	29,0 (2,8)	—	
	633	1,5 (0,5)	—	28,1 (2,8)	—	
	670	1,4 (0,5)	—	25,9 (2,8)	—	
	720	1,3 (0,5)	—	23,5 (2,8)	—	
	770	1,1 (0,4)	—	21,2 (2,6)	—	
	820	0,9 (0,4)	—	19,6 (2,5)	—	
	830	0,9 (0,4)	—	19,2 (2,5)	—	
	870	0,7 (0,3)	—	18,0 (2,4)	—	
	920	0,6 (0,3)	—	16,6 (2,0)	—	
	970	0,8 (0,3)	—	15,0 (1,5)	—	
	1020	0,7 (0,3)	—	13,6 (1,1)	—	
	1064	0,8 (0,4)	—	12,6 (0,9)	—	
	1070	0,8 (0,4)	—	12,5 (0,9)	—	
1120	1,0 (0,6)	—	11,9 (0,9)	—		
1170	1,6 (0,7)	—	11,5 (0,9)	—		
1220	1,7 (0,9)	—	10,9 (1,0)	—		
1270	1,8 (1,2)	—	10,5 (1,1)	—		
1320	2,7 (1,5)	—	10,4 (1,0)	—		
1370	6,9 (2,7)	—	10,9 (1,0)	—		
1420	22,1 (4,6)	—	15,4 (2,5)	—		
1470	27,5 (5,4)	—	16,6 (3,2)	—		
1520	19,0 (4,7)	—	13,3 (2,7)	—		
1570	11,2 (3,1)	—	11,1 (1,6)	—		

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Узелковая базально-клеточная карцинома	370	8,7 (2,9)	—	46,2 (6,1)	—	ИС; ИМК; срезы ткани [1420]; $g = 0,8$
	420	7,3 (2,0)	—	43,6 (3,8)	—	
	470	4,0 (1,2)	—	38,5 (2,2)	—	
	488	3,4 (1,2)	—	36,0 (2,0)	—	
	514	2,8 (1,1)	—	32,7 (1,8)	—	
	520	2,7 (1,1)	—	32,0 (1,8)	—	
	570	1,8 (0,9)	—	27,1 (1,6)	—	
	620	1,3 (0,6)	—	23,4 (1,3)	—	
	633	1,2 (0,6)	—	22,7 (1,2)	—	
	670	0,9 (0,5)	—	20,7 (1,1)	—	
	720	0,7 (0,4)	—	18,4 (1,0)	—	
	770	0,4 (0,3)	—	16,6 (0,9)	—	
	820	0,2 (0,2)	—	15,2 (0,7)	—	
	830	0,2 (0,1)	—	14,9 (0,7)	—	
	870	0,1 (0,1)	—	14,0 (0,7)	—	
	920	0,1 (0,0)	—	13,1 (0,6)	—	
	970	0,1 (0,1)	—	12,5 (0,6)	—	
	1020	0,0 (0,0)	—	12,0 (0,6)	—	
	1064	0,0 (0,0)	—	11,6 (0,6)	—	
	1070	0,0 (0,0)	—	11,5 (0,6)	—	
1120	0,0 (0,0)	—	10,9 (0,5)	—		
1170	0,1 (0,1)	—	10,4 (0,4)	—		
1220	0,2 (0,1)	—	10,1 (0,4)	—		
1270	0,1 (0,1)	—	10,0 (0,4)	—		
1320	0,5 (0,1)	—	9,7 (0,4)	—		
1370	3,2 (0,3)	—	10,3 (0,6)	—		
1420	14,6 (2,0)	—	14,4 (1,3)	—		
1470	18,6 (1,6)	—	15,9 (1,5)	—		
1520	11,9 (0,7)	—	13,1 (1,0)	—		
1570	6,7 (0,04)	—	10,6 (0,8)	—		

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Плоско-клеточный рак	370	9,4 (2,0)	—	43,6 (6,1)	—	ИС; ИМК; срезы ткани [1420]; $g = 0,8$
	420	12,1 (2,3)	—	42,1 (5,0)	—	
	470	4,1 (0,6)	—	33,8 (4,7)	—	
	488	3,4 (0,5)	—	31,3 (4,3)	—	
	514	3,2 (0,4)	—	28,0 (3,9)	—	
	520	3,2 (0,4)	—	27,4 (3,8)	—	
	570	2,9 (0,4)	—	23,5 (3,2)	—	
	620	1,4 (0,2)	—	19,5 (2,6)	—	
	633	1,3 (0,2)	—	18,8 (2,5)	—	
	670	1,1 (0,2)	—	17,1 (2,3)	—	
	720	0,9 (0,2)	—	15,2 (2,0)	—	
	770	0,7 (0,2)	—	13,5 (1,8)	—	
	820	0,5 (0,2)	—	12,4 (1,6)	—	
	830	0,5 (0,2)	—	12,2 (1,5)	—	
	870	0,4 (0,1)	—	11,6 (1,4)	—	
	920	0,3 (0,1)	—	10,9 (1,3)	—	
	970	0,4 (0,2)	—	10,2 (1,2)	—	
	1020	0,4 (0,2)	—	9,4 (1,2)	—	
	1064	0,4 (0,2)	—	8,8 (1,2)	—	
	1070	0,4 (0,2)	—	8,8 (1,2)	—	
1120	0,4 (0,2)	—	8,5 (1,2)	—		
1170	1,0 (0,3)	—	8,4 (1,1)	—		
1220	1,1 (0,3)	—	8,1 (1,1)	—		
1270	1,1 (0,3)	—	7,8 (1,1)	—		
1320	1,7 (0,4)	—	7,7 (1,1)	—		
1370	4,3 (0,5)	—	8,5 (1,1)	—		
1420	17,0 (1,2)	—	12,9 (1,8)	—		
1470	23,5 (2,1)	—	14,4 (2,3)	—		
1520	15,0 (1,5)	—	11,6 (1,6)	—		
1570	9,2 (1,2)	—	9,2 (1,3)	—		

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	μ'_s , см ⁻¹	g	Примечания
Селезенка	1064	6,0	137	—	0,90	Данные работы [1281]
Желудок						
Мышечная ткань	1064	3,3	29,5	—	0,87	Данные работы [1281]
Слизистая	1064	2,8	732	—	0,91	
Цельная ткань	1064	0,8	128	—	0,91	
Зуб						
Дентин	543	4	180	—	—	ИС, ГФИ *, работы [66, 97], см. также работу [638]
	633	4	130	—	—	
	633	6,0 *	1200 *	672 *	0,44 *	
	543	< 1	45	—	—	
	633	< 1	25	—	—	
Эмаль	543	3-4	280 (84)	—	0,93 (0,02)	ГФИ, двойная ФФХГ, доли изотропных рассеивателей составляют 0-2 % для дентина и 60-35 % для эмали; полированные плоско-параллельные срезы 30-2000 мкм [638]
	633	3-4	280 (84)	—	0,93 (0,02)	
	1053	3-4	260 (78)	—	0,93 (0,02)	
	543	< 1	105 (30)	—	0,96 (0,02)	
	633	< 1	60 (18)	—	0,96 (0,02)	
Эмаль	1053	< 1	15 (5)	—	0,96 (0,02)	Компилированные данные нескольких работ, из графиков работы [827]
	200	≈ 10	≈ 450	—	—	
	300	≈ 5	≈ 270	—	—	
	400	≈ 1	≈ 150	—	—	
	500	< 1	≈ 73	—	—	
600	< 1	≈ 64	—	—		
700	< 1	≈ 50	—	—		
800	< 1	≈ 33	—	—		
1000	< 1	≈ 16	—	—		

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Дентин	2940	2200	—	—	—	Радиометрия с временным разрешением, данные из графиков работы [827]
	2790	1500	—	—	—	
	9600	6500	—	—	—	
Эмаль	10600	800	—	—	—	
	2940	800	—	—	—	
	2790	400	—	—	—	
	9600	8000	—	—	—	
Дентин	10600	800	—	—	—	
	2790	988 (111)	—	—	—	
Эмаль	10300	1198 (104)	—	—	—	Измерения пропускания [827]
	10600	813 (63)	—	—	—	
	2940	768 (27)	—	—	—	
	2790	451 (29)	—	—	—	
	10300	1168 (49)	—	—	—	
	10600	819 (62)	—	—	—	
Матка	635	0,35 (0,1)	394 (91)	122	0,69	Замороженные срезы [1247]
Вена (бедренная)	1064	3,2	487	—	0,97	Данные работы [1281]

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Аорта						
Норма ($n = 4$)	1300	—	150–360	—	0,9–1	Оптическая когерентная томография (ОКТ) [1300]; 4 ч после вскрытия; $g_{\text{eff}} = \cos\theta_{\text{rms}}$, θ_{rms} — среднеквадратичный угол рассеяния, $g_{\text{eff}} \geq g$
Богатая жиром ($n = 4$)	1300	—	0–200	—	0,6–1	
Фиброзная ($n = 3$)	1300	—	50–400	—	0,6–1	
Фиброзно-обызвествленная ($n = 3$)	1300	—	0–200	—	0,8–1	
Жир						
Брюшной ($n = 2$)	360	3,12 (0,78)	—	32,59 (3,26)	—	ИС; ОДУ; срезы ткани, < 12 ч после хирургической операции, хранение при 4 °С в ФР; измерения при комнатной температуре; в спектральном диапазоне 600–1600 нм: $\mu'_s = 1,23 \cdot 10^3 \lambda^{-0,59}$, $[\lambda] = \text{нм}$ [1294]
	400	3,97 (0,99)	—	25,62 (2,56)	—	
	500	2,37 (0,59)	—	28,23 (2,82)	—	
	600	1,90 (0,47)	—	28,58 (2,86)	—	
	700	1,84 (0,46)	—	26,27 (2,63)	—	
	800	1,87 (0,47)	—	25,74 (2,57)	—	
	900	1,80 (0,45)	—	21,21 (2,12)	—	
	1000	1,77 (0,44)	—	20,14 (2,01)	—	
	1100	1,68 (0,42)	—	19,05 (1,90)	—	
	1200	1,79 (0,45)	—	17,55 (1,76)	—	
	1300	1,52 (0,38)	—	17,42 (1,74)	—	
	1400	1,75 (0,44)	—	17,15 (1,71)	—	
	1500	1,63 (0,41)	—	17,08 (1,71)	—	
	1600	1,47 (0,37)	—	16,41 (1,64)	—	
	1700	2,11 (0,53)	—	17,21 (1,72)	—	
	1800	1,92 (0,48)	—	17,40 (1,74)	—	
1900	2,48 (0,62)	—	20,38 (2,04)	—		
2000	2,12 (0,53)	—	19,44 (1,94)	—		
2100	1,74 (0,43)	—	18,72 (1,87)	—		
2200	1,65 (0,41)	—	18,95 (1,89)	—		

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Подкожный ($n = 6$)	400	2,26 (0,24)	—	13,39 (2,78)	—	ИС; ОДУ; срезы ткани, 1–3 мм; < 6 ч после хирургической операции; хранение при 20 °С в ФР; измерения при комнатной температуре; в спектральном диапазоне 600–1500 нм: $\mu'_s = 1,05 \cdot 10^3 \lambda^{-0,68}$, $[\lambda] = \text{нм}$ [1312]
	500	1,49 (0,06)	—	13,82 (4,00)	—	
	600	1,18 (0,02)	—	13,39 (4,65)	—	
	700	1,11 (0,05)	—	12,17 (4,41)	—	
	800	1,07 (0,11)	—	11,62 (4,63)	—	
	900	1,07 (0,07)	—	9,97 (3,42)	—	
	1000	1,06 (0,06)	—	9,39 (3,32)	—	
	1100	1,01 (0,05)	—	8,74 (3,28)	—	
	1200	1,06 (0,07)	—	7,91 (3,17)	—	
	1300	0,89 (0,07)	—	7,81 (3,19)	—	
	1400	1,08 (0,03)	—	7,51 (3,31)	—	
	1500	1,05 (0,02)	—	7,36 (3,42)	—	
	1600	0,89 (0,04)	—	7,16 (3,21)	—	
	1700	1,26 (0,07)	—	7,53 (3,33)	—	
	1800	1,21 (0,01)	—	7,50 (3,48)	—	
1900	1,62 (0,06)	—	8,72 (4,15)	—		
2000	1,43 (0,09)	—	8,24 (4,03)	—		

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	μ'_s , см ⁻¹	g	Примечания
Предплечье						
Жировая ткань	633	0,026	—	12,0	0,9*	ОПР; * из литературы [388]
Мышечная ткань	633	0,96	—	5,3	0,9*	
Слизистая верхнечелюстной полости при антриите ($n = 10$)	400	4,89 (0,92)	—	36,01 (6,41)	—	ИС; ОДУ; срезы ткани 1–2 мм; < 6 ч после хирургической операции; хранение при 20 °С в ФР; измерения при комнатной температуре; в спектральном диапазоне 600–1300 нм; $\mu'_s = 4,4 \cdot 10^5 \lambda^{-1,62}$, [λ] = нм [1312]
	500	1,13 (0,18)	—	17,69 (2,84)	—	
	600	0,45 (0,23)	—	13,81 (2,43)	—	
	700	0,16 (0,24)	—	11,53 (2,02)	—	
	800	0,13 (0,16)	—	9,79 (1,68)	—	
	900	0,12 (0,09)	—	7,62 (0,92)	—	
	1000	0,27 (0,21)	—	6,14 (0,74)	—	
	1100	0,16 (0,14)	—	5,19 (0,58)	—	
	1200	0,57 (0,31)	—	4,43 (0,43)	—	
	1300	0,67 (0,35)	—	3,89 (0,38)	—	
	1400	4,84 (1,79)	—	5,07 (0,71)	—	
	1500	6,06 (2,38)	—	4,95 (1,21)	—	
	1600	2,83 (1,01)	—	3,13 (0,55)	—	
	1700	2,26 (0,79)	—	2,83 (0,51)	—	
	1800	3,04 (1,15)	—	3,04 (0,57)	—	
	1900	9,23 (2,69)	—	7,01 (3,57)	—	
	2000	9,31 (2,28)	—	6,26 (3,56)	—	

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	μ'_s , см ⁻¹	g	Примечания
Слизистая полости рта						
Норма	855	—	27 (11)	—	—	Оптическая когерентная микроскопия [1421]
Дисплазия	855	—	39 (6)	—	—	
Плоскоклеточный рак	855	—	60 (9)	—	—	
Кожа						
Европеоидная дерма ($n = 12$)	633	0,33 (0,09)	—	27,3 (5,4)	—	Метод «сравнения» с одной интегрирующей сферой; ОМК; образцы из брюшной и грудной области получены после пластической хирургии или <i>post mortem</i> ; при вычислениях предполагалось $g = 0,9$ [333, 334]
	700	0,19 (0,06)	—	23,2 (4,1)	—	
	900	0,13 (0,07)	—	16,3 (2,5)	—	
	633	2,41 (1,53)	—	32,1 (20,4)	—	
	700	1,49 (0,88)	—	26,8 (14,1)	—	
	900	0,45 (0,18)	—	18,1 (0,4)	—	
	633	0,13 (0,05)	—	12,6 (3,4)	—	
	700	0,09 (0,03)	—	12,1 (3,2)	—	
	900	0,12 (0,04)	—	10,8 (2,7)	—	
	633	1,21	—	8,9	—	
700	0,46	—	8,3	—		
900	0,32	—	5,9	—		
Образец/субъект — 01/01; женщина (Ж), возраст 51 год; задняя сторона колена; левая нога; умеренное воспаление в дерме; РС = 40–70 мкм; Э = 40–150 мкм; Д = 300 мкм	1460	17,88 (1,12)	—	10,74 (0,49)	—	ДИС; ОДУ; срезы ткани, содержащие роговой слой (РС), эпидермис (Э) и дерму (Д), взятые у 14 субъектов; измерения проведены в течение 24 ч после иссечения; нагрев до 37 °С; три измерения на каждой стороне образца; диаметр порта ИС был равен 2,5 см для большинства образцов, но для образцов малых размеров уменьшался до 1,3 см; доступны полные данные для 52 длин волн в диапазоне 1000–2200 нм [1267]
	1600	5,35 (0,24)	—	8,06 (0,29)	—	
	2200	7,46 (0,56)	—	7,17 (0,26)	—	

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
02/01; женщина (Ж), возраст 51 год; задняя сторона колена; левая нога; умеренное воспаление дермы; РС = 40–70 мкм; Э = 40–140 мкм; Д = 300 мкм	1460 1600 2200	18,70 (1,13) 5,46 (0,27) 8,86 (0,46)	— — —	11,39 (0,65) 8,62 (0,34) 8,15 (0,26)	— — —	
03/02; Ж, возраст 66 лет; низ спины, правая сторона; легкий солнечный ожог; РС = 20–50 мкм; Э = 30 мкм; Д = 200 мкм	1460 1600 2200	16,01 (0,56) 4,91 (0,10) 10,94 (0,23)	— — —	9,83 (0,59) 6,78 (0,45) 9,00 (0,54)	— — —	
04/02; Ж, возраст 66 лет; низ спины, правая сторона; легкий солнечный ожог; РС = 20–50 мкм; Э = 30 мкм; Д = 200 мкм	1460 1600 2200	12,65 (0,96) 3,86 (0,28) 8,58 (0,55)	— — —	8,61 (0,63) 6,04 (0,29) 7,74 (0,23)	— — —	
05/03; Ж, возраст 67 лет; голень, правая нога; легкий солнечный ожог, хроническое воспаление; РС = 20–50 мкм; Э = 30–50 мкм; Д = 200 мкм	1460 1600 2200	16,58 (3,26) 5,15 (0,60) 9,65 (1,17)	— — —	11,68 (1,41) 8,89 (1,11) 10,31 (0,81)	— — —	

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Биоткань 06/03; Ж, возраст 67 лет; голень, правая нога; легкий солнечный ожог, хроническое воспаление; РС = 20–50 мкм; Э = 30– 50 мкм; Д = 200 мкм	1460	18,07 (0,42)	—	13,13 (0,63)	—	
	1600	5,60 (0,17)	—	10,34 (0,52)	—	
	2200	11,26 (0,16)	—	12,20 (0,88)	—	
07/04; М, возраст 64 года; бедро, правая нога, легкий хронический дерматит; РС = 20–30 мкм; Э = 50–90 мкм; Д = 300 мкм	1000	0,69 (0,01)	—	10,45 (0,61)	—	
	1460	16,64 (0,95)	—	10,75 (0,81)	—	
	1600	4,96 (0,27)	—	7,72 (0,40)	—	
	2200	13,04 (2,36)	—	9,42 (1,57)	—	
08/05; М, возраст 75 лет; нижняя часть бедра, левая нога; нормальная кожа; РС = 8–12 мкм; Э = 20–60 мкм; Д = 200 мкм	1000	0,83 (0,03)	—	12,25 (1,20)	—	
	1460	19,06 (1,22)	—	11,46 (1,09)	—	
	1600	5,75 (0,27)	—	8,31 (0,76)	—	
	2200	11,92 (0,41)	—	10,34 (0,76)	—	
09/05; М, возраст 75 лет; нижняя часть бедра, левая нога; нормальная кожа; РС = 8–12 мкм; Э = 20–60 мкм; Д = 200 мкм	1000	0,85 (0,02)	—	11,66 (0,96)	—	
	1460	18,03 (2,01)	—	11,19 (1,51)	—	
	1600	5,61 (0,56)	—	7,87 (0,81)	—	
	2200	11,85 (0,83)	—	10,03 (0,90)	—	

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Биоткань 10/06; Ж, возраст 42 года; паховая область, левая сторона; легкое хроническое воспаление; РС = 5 мкм; Э = 25–30 мкм; Д = 200 мкм	1000	0,80 (0,01)	—	14,17 (0,71)	—	
	1460	20,49 (0,89)	—	13,64 (1,44)	—	
	1600	5,85 (0,14)	—	10,05 (0,55)	—	
	2200	12,46 (0,42)	—	11,79 (0,69)	—	
11/06; Ж, возраст 42 года; паховая область, левая сторона; легкое хроническое воспаление; РС = 5 мкм; Э = 25–30 мкм; Д = 200 мкм	1000	0,77 (0,03)	—	13,95 (1,12)	—	
	1460	20,24 (1,04)	—	13,18 (1,72)	—	
	1600	5,76 (0,28)	—	9,48 (0,91)	—	
	2200	12,71 (0,58)	—	10,89 (1,20)	—	
12/07; М, возраст 33 года; задняя часть бедр, правая сторона; легкий хронический дерматит; РС = 2–5 мкм; Э = 5–10 мкм; Д = 300 мкм	1000	0,82 (0,02)	—	14,35 (0,81)	—	
	1460	19,01 (1,28)	—	13,30 (0,91)	—	
	1600	5,81 (0,33)	—	10,14 (0,49)	—	
	2200	11,13 (1,21)	—	9,00 (0,33)	—	

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
13/08; Ж, возраст 52 года; подмышечная область, правая сторона, легкое периваскулярное хроническое воспаление; РС = 5–7 мкм; Э = 25 мкм; Д = 100 мкм	1000	0,97 (0,08)	—	13,70 (0,35)	—	
	1460	21,39 (1,25)	—	12,54 (0,72)	—	
	1600	6,17 (0,30)	—	9,94 (0,78)	—	
	2200	12,53 (0,84)	—	9,45 (0,84)	—	
14/09; М, возраст 37 лет; задняя верхняя часть левого бедра; легкий хронический дерматит; РС = 3 мкм; Э = 13 мкм; Д = 300 мкм	1000	0,82 (0,02)	—	15,00 (0,49)	—	
	1460	23,31 (0,71)	—	12,32 (0,51)	—	
	1600	6,68 (0,11)	—	10,01 (0,37)	—	
	2200	15,19 (1,37)	—	8,54 (0,52)	—	
15/10; М, возраст 70 лет; кожа черепа; легкий хронический дерматит/солнечный эластоз; РС = 4–15 мкм; Э = 8–10 мкм; Д = 200 мкм	1000	1,04 (0,02)	—	12,26 (0,44)	—	
	1460	15,95 (0,99)	—	10,75 (1,20)	—	
	1600	5,09 (0,23)	—	8,83 (0,92)	—	
	2200	12,65 (0,52)	—	8,83 (1,94)	—	
16/11*; М, возраст 61 год; кожа черепа; легкий хронический дерматит/солнечный эластоз; РС = 2–4 мкм; Э = 6 мкм; Д = 300 мкм	1000	0,79 (0,02)	—	13,11 (0,61)	—	
	1460	16,47 (1,05)	—	12,45 (0,56)	—	
	1600	5,11 (0,24)	—	10,43 (0,57)	—	
	2200	13,30 (1,48)	—	9,89 (0,79)	—	

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
17/12*; Ж, возраст 68 лет; кожа черепа/лица; легкий солнечный ожог, хроническое воспаление; РС = 2 мкм; Э = 8–10 мкм; Д = 200 мкм	1000 1460 1600 2200	1,06 (0,03) 12,81 (1,84) 4,26 (0,50) 11,32 (1,52)	— — — —	8,79 (1,18) 9,60 (0,57) 6,93 (0,75) 8,14 (0,81)	— — — —	
18/12; Ж, возраст 68 лет; кожа черепа/лица; сильный солнечный ожог, хроническое воспаление; РС = 2 мкм; Э = 8–10 мкм; Д = 200 мкм	1000 1460 1600 2200	1,32 (0,05) 12,68 (5,07) 4,31 (1,34) 11,33 (3,05)	— — — —	8,63 (1,91) 8,74 (1,26) 6,60 (0,92) 7,30 (0,24)	— — — —	
19/13*; Ж, возраст 53 года; кожа черепа/лица; легкое хроническое воспаление; РС = 4 мкм; Э = 10 мкм; Д = 200 мкм	1000 1460 1600 2200	1,55 (0,02) 16,13 (1,38) 5,38 (0,31) 13,84 (1,02)	— — — —	11,96 (0,65) 11,52 (0,64) 8,65 (0,54) 9,67 (0,65)	— — — —	
20/13; Ж, возраст 53 года; кожа черепа/лица; легкое хроническое воспаление; РС = 4 мкм; Э = 10 мкм; Д = 200 мкм	1000 1460 1600 2200	1,53 (0,02) 16,82 (1,13) 5,57 (0,19) 13,46 (0,58)	— — — —	12,89 (0,77) 12,01 (0,81) 9,47 (0,60) 10,41 (0,71)	— — — —	

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Биоткань 21/14; Ж, возраст 52 года; живот; легкое хроническое воспаление; РС = 4–5 мкм; $\Xi = 10$ мкм; $D = 200$ мкм	1000	0,88 (0,03)	—	14,96 (1,28)	—	
	1460	18,21 (2,51)	—	14,20 (0,71)	—	
	1600	5,74 (0,68)	—	10,58 (0,44)	—	
	2200	11,33 (0,76)	—	10,40 (0,47)	—	
22/14; Ж, возраст 52 года; живот; легкое хроническое воспаление; РС = 4–5 мкм; $\Xi = 10$ мкм; $D = 200$ мкм	1000	0,94 (0,02)	—	15,26 (0,63)	—	
	1460	18,46 (1,64)	—	15,10 (1,01)	—	
	1600	5,76 (0,31)	—	11,05 (0,39)	—	
	2200	13,72 (0,52)	—	13,72 (0,42)	—	
Матка						
Постклимактерическая Предклимактерическая Фиброидная	630	0,515 (0,054)	—	9,1 (1,7)	—	Модуляционный метод; интактные матки получены в результате гистерэктомии; во время измерений (3–4 ч) ткань увлажнялась [446]
	630	0,193 (0,013)	—	7,3 (0,9)	—	
	630	0,314 (0,030)	—	8,9 (1,5)	—	
	630	0,213 (0,024)	—	6,0 (0,8)	—	
	630	0,197 (0,030)	—	7,3 (1,5)	—	
630	0,0824 (0,0075)	—	—	7,2 (0,9)	—	
Измерения <i>in vivo</i>						
Аденокарцинома (множественная подкожная крупноклеточная, мужчина 62 года)						
Брюшная область, ткань в норме	674	0,0589 (0,0036)	—	8,94 (0,19)	—	Модуляционный метод, $r_{sd} = 2,2$ см [432, 434]
	811	0,0645 (0,0032)	—	8,82 (0,18)	—	
	849	0,0690 (0,0025)	—	8,77 (0,14)	—	
	956	0,1110 (0,015)	—	7,00 (0,62)	—	

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Брюшная область, опухоль	674	0,169 (0,02)	—	8,48 (0,73)	—	
	811	0,190 (0,015)	—	8,30 (0,49)	—	
	849	0,276 (0,03)	—	9,93 (0,87)	—	
	956	—	—	—	—	
Область спины, ткань в норме	674	0,0883 (0,006)	—	10,7 (0,4)	—	
	811	0,0892 (0,005)	—	9,99 (0,27)	—	
	849	0,0915 (0,0030)	—	9,65 (0,15)	—	
	956	0,127 (0,03)	—	6,3 (0,9)	—	
Область спины, опухоль	674	0,174 (0,02)	—	10,4 (0,9)	—	
	811	0,177 (0,013)	—	9,23 (0,5)	—	
	849	0,190 (0,01)	—	9,20 (0,33)	—	
	956	0,186 (0,16)	—	4,7 (2,7)	—	
Мозг						
Кора в норме, височная и лобная доли	674	> 0,2	—	10 (1)	0,92	ОПР, измерения во время нейрохирургической операции [1245]
	849	> 0,2	—	9,2 (1)	0,92	
	956	> 0,2	—	8,5 (1)	0,92	
Зрительный нерв в норме	674	0,60 (0,25)	—	18 (1)	0,92	
	849	0,75 (0,25)	—	17 (1)	0,92	
	956	0,65 (0,25)	—	16 (1)	0,92	
Астроцитомы зрительного нерва	674	1,6 (1)	—	14 (1)	0,92	
	849	1,1 (1)	—	8,5 (1)	0,92	
	950	1,8 (1)	—	8,5 (1)	0,92	

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	μ'_s , см ⁻¹	g	Примечания
Кора в норме, лобная доля	674	< 0,2	—	10 (0,5)	—	ОПР, измерения во время нейрохирургической операции [1284]; данные из работы [1285]
	811	< 0,1	—	9,1 (0,5)	—	
	849	< 0,1	—	9,2 (0,5)	—	
	956	0,15 (0,1)	—	8,9 (0,5)	—	
Кора в норме, лобная доля	674	0,2 (0,1)	—	10 (0,5)	—	
	811	0,2 (0,1)	—	8,2 (0,5)	—	
	849	< 0,1	—	8,2 (0,5)	—	
	956	0,25 (0,1)	—	8,2 (0,5)	—	
Зрительный нерв в норме	674	0,6 (0,3)	—	17,5 (2)	—	
	849	0,8 (0,3)	—	16 (2)	—	
	956	0,7 (0,3)	—	15,2 (2)	—	
Астроциты зрительного нерва	674	1,4 (0,3)	—	12,5 (1)	—	
	811	1,2 (0,3)	—	9,5 (1)	—	
	849	0,9 (0,3)	—	7,6 (1)	—	
	956	1,5 (0,3)	—	7,3 (1)	—	
Белое вещество в норме	674	2,5 (0,5)	—	13,5 (1)	—	
	849	0,95 (0,2)	—	8,5 (1)	—	
	956	0,9 (0,2)	—	7,8 (1)	—	
Белое вещество с рубцом	674	< 0,2	—	6,5 (0,5)	—	
	849	< 0,2	—	8 (0,5)	—	
Медуллобластома	674	2,6 (0,5)	—	14 (1)	—	
	849	1 (0,2)	—	10,7 (1)	—	
	956	0,75 (0,2)	—	4 (1)	—	

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Женская молочная железа						
Норма (30 японских женщин, среднее по всем возрастам)	753	0,046 (0,014)	—	8,9 (1,3)	—	Временное разрешение (ВР), μ_a (см^{-1}) $\approx 0,087 - 8,31 \cdot 10^{-4}x$, μ'_s (см^{-1}) $\approx 13 - 0,08x$, где x — возраст (20–80 лет) [415]
Норма (6 женщин, 26–43 лет)	800	0,017–0,045	—	7,2–13,5	—	ВР, μ'_s (см^{-1}) $\approx 16,7 - 7,9 \cdot 10^{-3}\lambda$, $\lambda = 500 - 1060$ нм [414]
Норма (6 женщин, толщина ткани 33–49 мм при легком сжатии)	580 780 850	0,70 (0,12) 0,23 (0,02) 0,27 (0,03)	— — —	— — —	— — —	Измерения пропускания, $g \approx 0,92 - 0,95$, $\mu'_s = 12 - 13 \text{ см}^{-1}$, работа [317]
Рак груди (5 пациенток)	630	0,305 (0,16)	—	9,41 (7,35)	—	ОПР; рецидив рака; производная гематопопорфина (72 ч) [1249]
Норма (56 лет)	674 811 849 956	0,04 0,035 0,035 0,085	— — — —	8,5 7,4 7,0 6,5	— — — —	Модуляционный метод, $r_{sd} = 2,2 \text{ см}$ [432, 434]
Фиброаденома с гиперплазией протока (56 лет)	674 811 849 956	0,055 0,06 0,055 0,12	— — — —	9 8 7,6 7,5	— — — —	
Норма (27 лет)	674 811 849 956	0,035 0,03 0,038 0,09	— — — —	11,1 9,6 9,6 9,7	— — — —	
Киста, наполненная жидкостью (27 лет)	674 811 849 956	0,07 0,07 0,08 0,16	— — — —	7,9 7,0 7,0 7,0	— — — —	

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Папиллярный рак (55 лет)	690	0,084 (0,014)	—	15,0 (0,3)	—	Модуляционный метод; ДТ [1296]
	825	0,085 (0,017)	—	12,7 (0,3)	—	
Норма (67 лет)	674	0,057	—	9,5	—	Модуляционный метод; ДТ; опухоль $1,8 \cdot 0,9 \text{ см}^2$; сегментная реконструкция [1303]
	782	0,050	—	9,4	—	
	803	0,047	—	9,0	—	
	849	0,054	—	8,9	—	
Карцинома протока <i>in situ</i> (67 лет)	674	0,17	—	4,1	—	
	782	0,18	—	3,6	—	
	803	0,15	—	4,2	—	
	849	0,21	—	3,3	—	
Задняя часть голени (11 человек, 14 измерений)	800	0,17 (0,05)	—	9,4 (0,7)	—	μ'_s (см^{-1}) $\approx 16-8,9 \cdot 10^{-3} \lambda$, $\lambda = 760-900 \text{ нм}$ [400]
Строма шейки матки	849	0,34	61,1	—	0,9	Работа [1289]; данные из работы [339]
Шейка матки						
$\mu_{\text{bs}} = \mu_s p_b, p_b$ — вероятность обратного рассеяния [1305–1307]						
Эпителий ($n = 36$) Строма ($n = 36$)	1300	—	10–140	—	0,1–11	ОКТ; двухслойная модель, генетический обратный алгоритм (ГОА) [1305]
	1300	—	30–290	—	1,5–12	
Дисплазия II–III Лейкоплакия	1300	—	40–65	—	1,4–3,6	ОКТ; однослойная модель, ГОА [1307]
	1300	—	16–32	—	1,3–2,0	
Эпителий Строма Рак	1300	—	80 (25)	—	0,28 (0,08)	ОКТ; ГОА, двухслойная модель, однослойная модель [1306, 1307]
	1300	—	210 (30)	—	3,0 (2)	
	1300	—	300 (20)	—	1,2 (0,6)	

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	μ'_s , см ⁻¹	g	Примечания
Желудочно-кишечный тракт						
$\gamma = (1 - g_2)/(1 - g_1)$						
Слизистая оболочка полости	500	2,5 (0,8)	—	16,8 (3,4)	1,98 (0,20)	Эндоскопия ОПР, t_{sd} от 0,3 до 1,35 мм; ОМК, двухмоментная ФФХГ (см. формулу (7.14)); 35 пациентов (21 женщина и 14 мужчин в возрасте от 23 до 87 лет), для каждого пациента обычно выбиралось четыре места — два в полости и два на дне, усредненные данные для нормальной ткани взяты из графиков работы [1273]
	550	3,6 (1,3)	—	13,8 (3,4)	1,93 (0,15)	
	600	1,0 (0,6)	—	12,8 (2,1)	1,90 (0,12)	
	650	0,5 (0,5)	—	11,7 (1,8)	1,87 (0,12)	
	700	0,4 (0,4)	—	10,7 (1,6)	1,86 (0,12)	
	750	0,45 (0,45)	—	9,7 (1,6)	1,85 (0,12)	
	800	0,5 (0,4)	—	9,0 (1,6)	1,85 (0,12)	
	850	0,7 (0,5)	—	8,8 (1,6)	1,85 (0,12)	
	900	0,8 (0,5)	—	8,3 (1,5)	1,86 (0,12)	
	Слизистая оболочка дна	500	3,3 (0,8)	—	21,7 (3,1)	
550		4,4 (1,5)	—	18,6 (3,1)	2,04 (0,24)	
600		1,8 (0,5)	—	16,5 (2,1)	2,00 (0,19)	
650		0,8 (0,4)	—	15,0 (2,1)	1,97 (0,17)	
700		0,7 (0,4)	—	13,8 (1,7)	1,98 (0,15)	
750		0,7 (0,5)	—	12,4 (1,6)	1,98 (0,15)	
800		0,7 (0,3)	—	11,7 (1,6)	1,95 (0,12)	
850		0,7 (0,3)	—	11,0 (1,4)	1,92 (0,12)	
900		0,8 (0,4)	—	10,3 (1,4)	1,94 (0,12)	
Голова (7 человек, 10 измерений)		800	0,16 (0,01)	—	9,4 (0,7)	—
Предплечье (5 человек, 14 измерений)	800	0,23 (0,04)	—	6,8 (0,8)	—	ВР, μ'_s (см ⁻¹) $\approx 11-5,1 \cdot 10^{-3} \lambda$, $\lambda = 760-900$ нм [329]
Предплечье	715	0,18	—	3,7	—	Модуляционный метод; t_{sd} — несколько сантиметров, данные из работы [1290]
	825	0,24	—	3,0	—	
Лоб	715	0,16	—	7,3	—	
	825	0,16	—	6,9	—	

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	μ'_s , см ⁻¹	g	Примечания
Кожа						
Дерма	660	0,07-0,2	—	9-14,5	—	ОПР; ОМК [322]
Кожа	633	0,62	—	32	—	Догниц и Вагниерес (1998) (см. работу [767])
	700	0,38	—	28,7	—	
Кожа (0-1 мм) Кожа (1-2 мм) Кожа (>2 мм)	633	0,67	—	16,2	—	Работа [388]
	633	0,026	—	12,0	—	
	633	0,96	—	5,3	—	
Предплечье						
Эпидермис Дерма	633	8 *	—	17,5	0,9 *	ОПР; * из литературы [388]
	633	0,15	—	17,5	0,9 *	
Эпидермис и дерма Подкожный жир	750	0,375	—	15	—	ОПР; ДТ [1291] (из работы [495])
	750	0,03	—	10	—	
Рука	633	0,17 (0,01)	—	9,08 (0,05)	—	ОПР, 9 приемных волокон диаметром 600 мкм; среднее расстояние 1,7 мм; фазовая функция Ми [767]
	660	0,128 (0,005)	—	8,68 (0,05)	—	
	700	0,090 (0,002)	—	8,14 (0,05)	—	
Подошва ноги	633	0,072 (0,002)	—	11,17 (0,09)	—	
	660	0,053 (0,003)	—	10,45 (0,09)	—	
	700	0,037 (0,001)	—	9,52 (0,08)	—	
Лоб	633	0,090 (0,009)	—	16,72 (0,09)	—	
	660	0,052 (0,003)	—	16,16 (0,08)	—	
	700	0,0240 (0,002)	—	15,38 (0,06)	—	

Таблица 7.1 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Кожа живота						
Выбранное направление Перпендикулярное направление (вдоль коллагеновых волокон)	810	0,014	—	20	—	ОПР; ПЗС-приемник, $r_{\text{sd}} \leq 10$ мм; ДТ [495]
	810	0,07	—	10	—	
Предплечье (светлая кожа, $n = 7$)						
Температура кожи — 22 °С	590	2,372 (0,282)	—	9,191 (0,931)	—	ОПР, сетка, стенированная методом МК [1271]
	750	0,966 (0,110)	—	7,340 (0,901)	—	
	950	0,981 (0,073)	—	6,067 (0,847)	—	
Температура кожи — 38 °С	590	2,869 (0,289)	—	9,613 (0,894)	—	
	750	1,157 (0,106)	—	7,649 (0,971)	—	
	950	1,135 (0,123)	—	6,234 (0,928)	—	
Дерма предплечья Роговой слой пальца	1300	—	47	—	—	ОКТ [13]
	1300	—	12	—	—	

Таблица 7.1 (окончание)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	g	Примечания
Ладонная сторона предплечья						
Эпидермис	1300	—	15–20	—	—	ОКТ [1301]
Верхний слой дермы	1300	—	80–100	—	—	
Ладонь руки						
Роговой слой	1300	—	10–15	—	—	
Эпидермис						
железистый слой	1300	—	60–70	—	—	
базальный слой	1300	—	40–50	—	—	
верхний слой дермы	1300	—	50–80	—	—	
Ладонная сторона предплечья (эпидермис и дерма)						
Норма	1300	—	140	—	—	ОКТ [1302]; глубина до 350 мкм; кожа обрабатывалась 2% раствором анионных тенсидов (tepsides) в воде
Обработка раствором моющего средства	1300	—	80	—	—	
Череп	674	$< 0,2$	—	9 (1)	—	ОПР; измерения во время нейрохирургической операции [1284]; данные из работы [1285]
	849	$< 0,1$	—	9 (1)	—	
	956	0,15 (0,1)	—	8,5 (1)	—	

Любые три из следующих пяти измерений достаточны для вычисления трех оптических параметров [40]:

- полное (или диффузное) пропускание для коллимированного или диффузного излучения;
- полное (или диффузное) отражение для коллимированного или диффузного излучения;
- поглощение образца, помещенного в интегрирующую сферу;
- коллимированное пропускание (для нерассеянного света);
- угловое распределение излучения, рассеянного образцом.

Итерационные методы, как правило, учитывают различие между показателями преломления на границах раздела сред, а также многослойную структуру образца. Следующие факторы отвечают за ошибки при расчете значений оптических коэффициентов и должны учитываться при сравнительном анализе оптических параметров, полученных в различных экспериментах [40]:

- физиологическое состояние биоткани (степень гидратации биоткани, ее однородность, вариабельность от образца к образцу, замороженная/оттаявшая или фиксированная/нефиксированная биоткань, измерения *in vitro/in vivo*, гладкая/шероховатая поверхность);
- геометрия облучения;
- согласованные/несогласованные показатели преломления на границах раздела;
- ориентация приемных оптических волоконных световодов внутри образца по отношению к волоконным световодам-источникам света;
- числовая апертура приемных волоконных световодов;
- угловое разрешение фотоприемников;
- возможность отделения излучения, рассеянного вперед, от нерассеянного излучения;
- теория, используемая для решения обратной задачи.

7.2. Метод интегрирующих сфер

Одним из непрямых методов определения оптических свойств биотканей, обычно используемый в исследованиях *in vitro*, является метод интегрирующих сфер [6, 48, 49, 57, 345, 372, 1239, 1240, 1242, 1246, 1251–1258, 1262, 1264, 1265, 1267, 1268, 1281, 1308, 1309, 1311, 1312, 1316–1318]. Измеряются коэффициенты диффузного отражения R_d , полного пропускания T_t и коллимированного пропускания T_c . В общем случае из этих данных можно получить коэффициент поглощения μ_a , коэффициент рассеяния μ_s и фактор анизотропии g с использованием одного из обратных методов, основанных на теории переноса излучения. Когда из гониофотометрических измерений известна фазовая функция рассеяния $p(\theta)$, величина g легко вычисляется. В этом случае для определения μ_a и μ_s достаточно измерить только R_d и T_t . Иногда в экспериментах с образцами биотканей и крови предпочтительна конфигурация с двойной интегрирующей сферой, поскольку в этом случае как отражение, так и пропускание могут быть измерены одновременно, и степень деградации образца за время измерений уменьшается (см. рис. 7.2). Тем не менее, в эксперименте с двойной интегрирующей сферой кроме поправок, вносимых в сигнал в случае одной интегрирующей сферы, требуется учитывать многократный обмен мигрирующими фотонами между сферами [390, 1253, 1254]. Измерения коллимированного пропускания обычно выполняются так, как показано на рис. 7.1 а.

Метод интегрирующей сферы использовался многими исследователями для определения коэффициента поглощения, коэффициента рассеяния, фактора анизотропии и/или приведенного коэффициента рассеяния биотканей и крови [6, 48, 49, 57, 345,

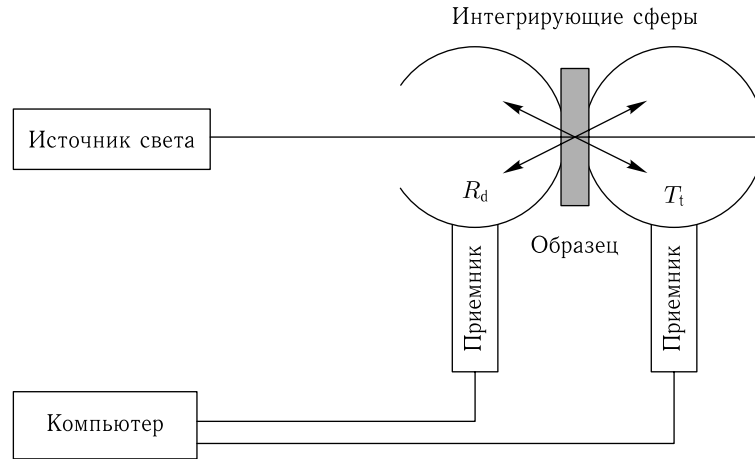


Рис. 7.2. Установка с двумя интегрирующими сферами [1311]

372, 1239–1241, 1246, 1251–1258, 1262, 1264, 1265, 1267, 1268, 1281, 1308, 1309, 1311, 1312, 1316–1318]. В экспериментах используются интегрирующие сферы из сульфата бария или материала Spectralon®. В качестве источников монохроматического света используются лазеры, ксеноновые и/или ртутные лампы в сочетании с монохроматором, а в качестве детектора — фотоумножители или кремниевые фотодиоды. Иногда освещение производится белым светом, а в качестве приемника берется волоконно-оптический ПЗС-спектрометр (оптический многоканальный анализатор) [1308].

Некоторые биоткани (например, содержащие меланин) и кровь имеют значительный коэффициент полного ослабления в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах. Поэтому измерение коллимированного пропускания в таких образцах (например, в слое неразбавленной крови умеренной толщины около 0,1 мм [48]) является технически сложной задачей. Для решения этой проблемы нужно использовать мощный источник света в сочетании с чувствительным приемником [49]. В качестве альтернативы можно собрать коллимированный свет вместе с рассеянным вперед с помощью третьей интегрирующей сферы [1262]. В этом случае коллимированное пропускание отделяется от рассеянного потока на стадии обработки данных при помощи метода Монте-Карло [1255] или приближения малых углов [1263].

7.3. Многопоточные модели

В качестве простейшего подхода к решению задачи об определении вкладов в ослабление светового пучка поглощения и рассеяния можно использовать одномерную двухпоточную модель Кубелки–Мунка (МКМ). Этот подход широко использовался для определения коэффициентов поглощения и рассеяния биологических тканей при условии, что рассеяние значительно превосходит поглощение [1, 2, 36, 37, 40, 305, 1239, 1251, 1264, 1281]. В МКМ предполагается, что свет, падающий на слой биоткани и взаимодействующий с рассеивающей средой, можно моделировать двумя противоположно направленными потоками. Оптический поток, распространяющийся в том же направлении, что и падающий, ослабляется за счет поглощения и рассеяния и усиливается за счет рассеяния назад из противоположного потока. Изменения в противоположном потоке определяются аналогичным образом. Доля каждого потока, теряемая на единице длины за счет поглощения, обозначается через K , а за

счет рассеяния — через S . Основные предположения МКМ: параметры K и S постоянны во всем слое биоткани; все световые потоки диффузные; количество света, теряемого на границах образца при измерениях отражения, пренебрежимо мало. Базовая модель МКМ не учитывает отражений на границах раздела, где существует разница показателей преломления.

Следуя МКМ и диффузионному приближению теории переноса излучения, удалось выразить параметры МКМ через параметры теории переноса излучения: коэффициенты поглощения и рассеяния и фактор анизотропии рассеяния [37, 40]. Таким образом, когда рассеяние существенно преобладает над поглощением, можно с успехом использовать простой экспериментальный метод на основе модифицированных формул МКМ:

$$S = \frac{1}{bd} = \ln \left[\frac{1 - R_d(a - b)}{T_d} \right],$$

$$K = S(a - 1), \quad a = \frac{1 - T_d^2 + R_d^2}{2R_d}, \quad b = \sqrt{a^2 - 1}, \quad (7.1)$$

$$K = 2\mu_a, \quad S = \frac{3}{4}\mu_s(1 - g) - \frac{1}{4}\mu_a,$$

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s, \quad \mu'_s = \mu_s(1 - g) > \mu_a,$$

где μ_t определяется на основе уравнения (1.1) из измеренных значений коллимированного пропускания T_c . Таким образом, все три параметра (μ_a , μ_s , g) можно найти из экспериментальных данных для полного пропускания T_t , диффузного отражения R_d и коллимированного пропускания T_c образца.

Дальнейшие модификации МКМ были предприняты с целью учета отражений на границах образца [306, 321, 1264]. Использование одного из таких способов измерения можно проиллюстрировать на примере определения оптических параметров эпидермиса кожи человека. Спектры пропускания и отражения тонких слоев эпидермиса (образцы клеевых отрывов толщиной 20–50 мкм), измеренные в области длин волн 240–400 нм на спектрофотометре с интегрирующей сферой, использовались для вычисления коэффициентов поглощения $\mu_a(\lambda)$ и рассеяния $\mu_s(\lambda)$ на основе четырехпоточковой модели, учитывающей коллимированное отражение на границах образца [306, 321] (см. рис. 7.3). Различие в коэффициентах поглощения в рассматриваемом диапазоне длин волн между нормальным эпидермисом человека и образцами, содержащими псориазные бляшки, обусловлены изменениями кожного метаболизма (см. спектры УФ-поглощения основных хромофоров эпидермиса кожи, рис. 1.6). Эпидермис псориазной кожи характеризуется выраженной оптической неоднородностью, обусловленной структурными изменениями биоткани в псориазных бляшках и появлением заполненных воздухом микропромежутков между паракератозными чешуйками, что дает рост коэффициента диффузного отражения на 10–15% (для образцов нормального эпидермиса этот коэффициент на длинах волн 240–400 нм растет самое большее на 6–10%).

Часто такие простые методы, как МКМ [48] или δ -приближение Эддингтона [345, 1255] применяются на первом шаге алгоритма обратной задачи для оценки оптических свойств биотканей и крови. Найденные значения оптических параметров далее используются для вычисления отраженной и прошедшей интенсивности с применением более сложных моделей распространения света в биоткани или крови. На следующем шаге рассчитанные величины интенсивности сравниваются с измеренными значениями. Если требуемая точность не достигнута, текущие оптические свойства

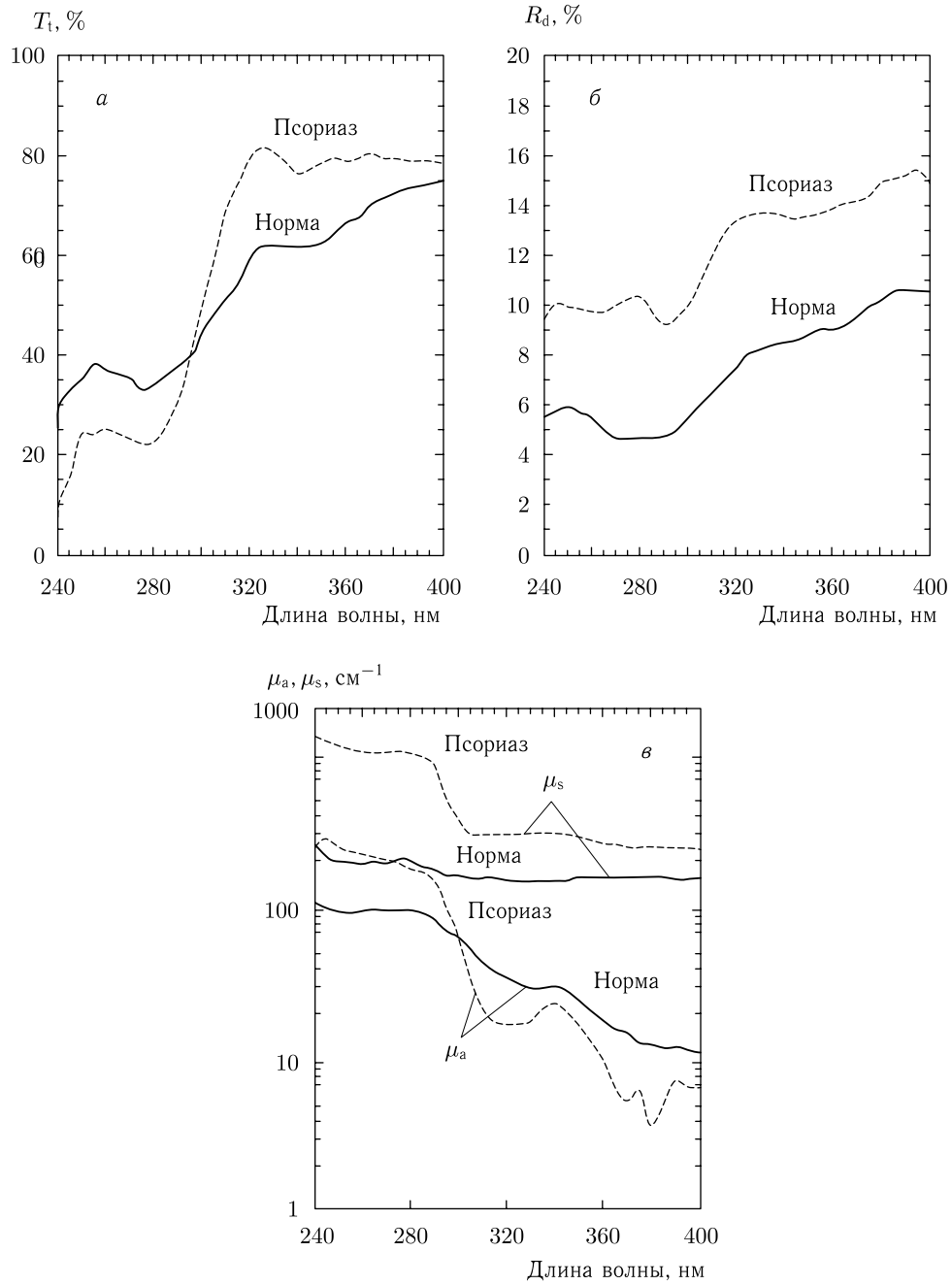


Рис. 7.3. Экспериментальные спектры полного пропускания (а) и диффузного отражения (б). Спектры коэффициентов поглощения (μ_a) и рассеяния (μ_s), рассчитанные по экспериментальным спектрам пропускания и диффузного отражения отрыва эпидермиса человека с использованием четырехпотоковой модели (в). Сплошные линии — здоровая кожа, пунктирные линии — кожа при псориазе [306, 321]

меняются при помощи одного из алгоритмов оптимизации. Процедура подгонки оптических свойств и вычисления отраженной и прошедшей интенсивности повторяется до тех пор, пока вычисленные значения не совпадут с измеренными в пределах заданной точности.

7.4. Обратный метод добавления–удвоения

Обратный метод добавления–удвоения (ОДУ) обеспечивает возможность быстрого и точного решения обратной задачи рассеяния [372, 392, 393, 1242, 1256, 1257, 1265–1267, 1281, 1311, 1316–1318]. Он основан на общем методе решения уравнения переноса для плоскопараллельных слоев, предложенном ван де Хюльстом [274] и введенном в оптику биотканей Пралом [1269, 1270]. Важное преимущество ОДУ в применении к оптике биотканей — это возможность быстрого получения итерационных решений с помощью современных компьютеров, более того, он достаточно гибок для учета анизотропии рассеяния и внутреннего отражения от границ образца. Метод включает следующие шаги:

- 1) выбор оптических параметров, подлежащих определению;
- 2) подсчет значений отражения и пропускания;
- 3) сравнение вычисленного и измеренного отражения и пропускания;
- 4) повторение процедуры до тех пор, пока рассчитанное и измеренное значения не совпадут с заданной точностью.

В принципе, метод позволяет достичь любой желаемой точности для всех измеряемых параметров, при условии достаточного компьютерного времени. Ошибка в 3% и менее рассматривается как приемлемая [1242]. Метод также можно использовать для прямой коррекции экспериментальных результатов, полученных с помощью интегрирующих сфер. Термин «удвоение» в названии метода означает, что оценки отражения и пропускания слоя при некоторых углах входящего и выходящего света можно использовать для вычисления отражения и пропускания вдвое более толстого слоя путем наложения слоев один на другой и суммирования вкладов каждого слоя в полное отражение и пропускание. Отражение и пропускание в слое произвольной толщины вычисляются в последовательном порядке, сначала для тонкого слоя с такими же оптическими характеристиками (однократное рассеяние), затем, посредством последовательного удвоения толщины, для любого выбранного слоя. Термин «добавление» отражает тот факт, что процедура удвоения может быть распространена на неоднородные слои для моделирования многослойных биотканей или учета внутренних отражений из-за резких изменений показателя преломления [1242].

Метод добавления–удвоения является численным методом решения одномерного уравнения переноса в плоско-параллельной геометрии [372, 1242, 1269, 1270, 1311, 1312, 1318]. Его можно применять для сред с произвольной фазовой функцией и произвольным угловым распределением пространственно-однородного падающего излучения. Таким образом, конечный размер пучка и боковые потери света не могут быть учтены. Метод основан на факте, что для произвольного углового распределения энергетической яркости падающего света $I_{\text{in}}(\eta_c)$, где η_c — косинус полярного угла, угловое распределение энергетической яркости отраженного света (нормированное на падающий диффузионный поток) дается выражением [1242, 1269, 1270, 1311]

$$I_{\text{ref}}(\eta_c) = \int_0^1 I_{\text{in}}(\eta'_c) R(\eta'_c, \eta_c) 2\eta'_c d\eta'_c, \quad (7.2)$$

где $R(\eta'_c, \eta_c)$ — функция перераспределения при отражении, определяемая оптическими свойствами слоя.

Распределение энергетической яркости прошедшего света можно выразить аналогичным образом с очевидной подстановкой функции перераспределения при пропускании $T(\eta'_c, \eta_c)$. Если выбрано M квадратурных точек, покрывающих интервал $(0, 1)$, функции перераспределения можно аппроксимировать матрицами:

$$R(\eta'_{ci}, \eta_{cj}) \rightarrow R_{ij}; \quad T(\eta'_{ci}, \eta_{cj}) \rightarrow T_{ij}. \quad (7.3)$$

Эти матрицы называют операторами отражения и пропускания соответственно. Если слой с номерами границ 0 и 2 состоит из двух слоев (01) и (12) с границей раздела 1 между слоями, то операторы отражения и пропускания для всего слоя (02) можно выразить как

$$\begin{aligned} \mathbf{T}^{02} &= \mathbf{T}^{12}(\mathbf{E} - \mathbf{R}^{10}\mathbf{R}^{12})^{-1}\mathbf{T}^{01}, \\ \mathbf{R}^{20} &= \mathbf{T}^{12}(\mathbf{E} - \mathbf{R}^{10}\mathbf{R}^{12})^{-1}\mathbf{R}^{10}\mathbf{T}^{21} + \mathbf{R}^{21}, \\ \mathbf{T}^{20} &= \mathbf{T}^{10}(\mathbf{E} - \mathbf{R}^{12}\mathbf{R}^{10})^{-1}\mathbf{T}^{21}, \\ \mathbf{R}^{02} &= \mathbf{T}^{10}(\mathbf{E} - \mathbf{R}^{12}\mathbf{R}^{10})^{-1}\mathbf{R}^{12}\mathbf{T}^{01} + \mathbf{R}^{01}, \end{aligned} \quad (7.4)$$

где \mathbf{E} — единичная матрица, которая в данном случае определяется как

$$E_{ij} = \frac{1}{2\eta_{ci}w_i} \delta_{ij}, \quad (7.5)$$

где w_i — вес, приписанный i -й квадратурной точке, а δ_{ij} — символ Кронекера, $\delta_{ij} = 1$ при $i = j$ и $\delta_{ij} = 0$ при $i \neq j$. Определение матричного умножения здесь также слегка отличается от стандартного, а именно

$$(\mathbf{AB})_{ik} \equiv \sum_{j=1}^M A_{ij} 2\eta_{cj} w_j B_{jk}. \quad (7.6)$$

Уравнения (7.4) позволяют вычислить операторы отражения и пропускания для слоя, если они известны для составляющих слоев. Идея метода состоит в том, чтобы начать с тонкого слоя, для которого уравнение переноса излучения можно упростить и решить относительно легко. Получив операторы отражения и пропускания для тонкого слоя, начинают процедуру удвоения и продолжают ее до тех пор, пока полная толщина слоя не будет достигнута. Для инициализации слоя существует несколько методов. Уравнения однократного рассеяния для отражения и пропускания с функцией Хеньи–Гринштейна даны в работах [274, 1269]. Скачки показателя преломления можно учесть добавлением эффективных пограничных слоев нулевой толщины с операторами отражения и пропускания, определяемыми формулами Френеля. Полное пропускание и отражение слоя получаются прямым интегрированием выражения (7.2). Различные методы выполнения интегрирования обсуждаются в работе [1269]. Программа ОДУ, разработанная Пралом [1270], позволяет получить коэффициенты поглощения и рассеяния по измеренным значениям диффузного отражения R_d и диффузного пропускания T_d слоя биоткани. Эта программа осуществляет численное решение стационарного уравнения переноса излучения (см. уравнение (1.9)) путем итерационного процесса, который оценивает отражение и пропускание по набору оптических параметров до тех пор, пока их вычисленные значения не совпадут с измеренными величинами. Значения фактора анизотропии g и показателя преломления n вводятся в программу как входные параметры.

Было показано, что с использованием всего лишь четырех квадратурных точек ОДУ обеспечивает упомянутую выше точность оптических параметров 2–3% [1242]. Более высокая точность может быть получена с большим числом квадратурных точек, однако это требует и большего компьютерного времени. Другая ценная черта ОДУ — его применимость к образцам со сравнимыми коэффициентами поглощения и рассеяния [1242, 1265, 1266], поскольку другие методы, основанные только на диффузионном приближении, в этом случае работают плохо. Более того, поскольку обеспечивается хорошая аппроксимация как анизотропной фазовой функции, так и френелевского отражения на границах, ОДУ хорошо приспособлен для оптических измерений в образцах биоткани и крови, помещенных в кювету с параллельными прозрачными стенками [49, 1242, 1265].

Метод добавления–удвоения успешно применялся для определения оптических параметров крови, дермы человека и животных, тканей глаза, таких как сетчатка, сосудистая оболочка, склера, конъюнктивы и стекловидное тело, аорты и других мягких биотканей в широком диапазоне длин волн [49, 372, 392, 393, 593, 1257, 1266–1268, 1318]. Метод обеспечивает хорошую точность в случае, когда боковые потери незначительны, но он менее гибок, чем метод Монте-Карло (МК).

7.5. Обратный метод Монте-Карло

Как реальная геометрия эксперимента, так и структура биоткани могут быть сложными. Поэтому для обеспечения надежных результатов часто используют метод Монте-Карло (МК). Сегодня в литературе доступно много алгоритмов обратного метода МК (ОМК) [2, 306, 311, 320, 322, 333–335, 339, 341, 344, 370, 372, 383, 389, 390, 581, 723, 1199, 1240, 1244–1246, 1252, 1268, 1271–1274, 1277, 1278, 1281, 1308, 1309, 1311, 1316–1318]. Многие исследователи используют программу моделирования методом МК, разработанную Жаком [1274]. Среди первых алгоритмов ОМК можно отметить два похожих алгоритма, описанных в работах [306, 1240, 1246, 1252, 1281, 1308], для определения всех трех оптических параметров биоткани (μ_a , μ_s и g) на основе полного пропускания, диффузного отражения и коллимированного пропускания, полученных *in vitro* с применением спектрофотометра с интегрирующими сферами. Начальное приближение (для ускорения процедуры) получалось с помощью теории Кубелки–Мунка, точнее ее четырех-поточкового варианта [306, 1246]. Оба алгоритма учитывают боковые потери фотонов, которые становятся существенными в достаточно толстых образцах. Аналогичные результаты были получены с использованием метода сжатого (condensed) ОМК [320, 322].

Метод МК используется для решения прямой задачи в составе обратного алгоритма для определения оптических параметров биотканей и крови. Метод МК основан на формализме ТПИ (см. главы 1 и 2), где коэффициент поглощения (рассеяния) определяется как вероятность того, что фотон будет поглощен (рассеян) на единице длины. С этими вероятностями генерируется случайная выборка траекторий фотонов.

Основной алгоритм генерации фотонных траекторий можно кратко описать так [1311]. Фотон, описываемый тремя пространственными координатами и двумя угловыми (x, y, z, θ, ϕ), получает приписываемый ему вес $W = W_0$ и помещается в начальное положение, зависящее от характеристик источника света. Размер шага l определяется с помощью формул (2.43)–(2.45). Направление следующего движения фотона определяется фазовой функцией рассеяния, подставляемой в качестве распределения плотности вероятности.

В моделировании методом МК используется несколько приближений для фазовой функции рассеяния. Сюда входят две эмпирические фазовые функции, широко используемые для аппроксимации фазовой функции рассеяния биоткани и крови,

а именно фазовая функция Хеньи–Гринштейна (ФФХГ) (см. соотношение (1.15)) и фазовая функция ядра Гегенбауэра (ФФЯГ) [1323], а также фазовая функция теории Ми [214]. ФФХГ имеет один параметр g , который можно представить в виде бесконечного разложения по полиномам Лежандра $P_n^1(\cos \theta)$,

$$p_{hg}(\theta) = \frac{1}{4\pi} \sum_{n=0}^{\infty} (2n+1) f_n P_n^1(\cos \theta), \quad (7.7)$$

где $f_n = g^n$ — момент фазовой функции n -го порядка.

Функция ФФЯГ имеет два переменных параметра, α и g :

$$p_{gk}(\theta) = K[1 + g^2 - 2g \cos(\theta)]^{-(\alpha+1)}, \quad (7.8)$$

где

$$K = \alpha g \pi^{-1} (1 - g^2)^{2\alpha} [(1 + g)^{2\alpha} - (1 - g)^{2\alpha}]^{-1}, \quad \alpha > -\frac{1}{2}, \quad |g| \leq 1.$$

Функция ФФЯГ является обобщением ФФХГ и сводится к ней, если положить $\alpha = 0,5$. Функцию ФФЯГ можно представить в виде бесконечного разложения по полиномам Гегенбауэра C_n^α [1323, 1324]:

$$p_{gk}(\theta) = \frac{2K}{(1 - g^2)} \sum_{n=0}^{\infty} \left(1 + \frac{n}{\alpha}\right) C_n^\alpha[\cos(\theta)] g^n. \quad (7.9)$$

Функции ФФХГ и ФФЯГ широко используются в расчетах переноса излучения для описания процессов однократного рассеяния в цельной крови по причине их математической простоты [48, 346, 1325]. Ясно, однако, что ФФХГ и ФФЯГ нельзя использовать для точных расчетов углового распределения света, рассеянного, например, отдельным эритроцитом. Для некоторых расчетов может оказаться полезной фазовая функция, вытекающая из теории Ми [214]:

$$p(\theta) = \frac{1}{k^2 r^2} (|S_1|^2 + |S_2|^2), \quad (7.10)$$

где S_1 и S_2 — функции полярного угла рассеяния, которые можно получить из теории Ми в виде соотношений (3.62).

Как уже отмечалось в гл. 1, многие МК-алгоритмы [309–311, 318, 327, 348, 356–358] не позволяют описать взаимодействие фотонов с эритроцитами и надежно определить фактор анизотропии рассеяния. Влияние фазовой функции рассеяния на МК-моделирование исследуется в работах [360, 361]. МК-алгоритм (rciMC), учитывающий миграцию фотона как вне клетки, так и внутри клетки без необходимости использования макроскопической фазовой функции рассеяния и фактора анизотропии рассеяния, представлен в работе [368].

Для ФФХГ случайный угол рассеяния $\theta_{\text{rnd}}^{\text{HG}}$ задается выражением [311]

$$\theta_{\text{rnd}}^{\text{HG}} = \arccos \left\{ \frac{1}{2g} \left[1 + g^2 - \left(\frac{1 - g^2}{1 - g + 2g\xi} \right)^2 \right] \right\}, \quad (7.11)$$

где ξ — случайное число, равномерно распределенное на интервале (0, 1) (см. формулу (2.44)).

Для ФФЯГ случайный угол рассеяния $\theta_{\text{rnd}}^{\text{GK}}$ определяется по формуле [230]

$$\theta_{\text{rnd}}^{\text{GK}} = \arccos \left[\frac{1 + g^2 - 1/\sqrt[\alpha]{\zeta_{\text{rnd}}}}{2g} \right], \quad (7.12)$$

где $\zeta_{\text{rnd}} = 2\alpha g \xi / K + (1 + g)^{-2\alpha}$, а α и K определяются соотношением (7.8).

Если экспериментальная фазовая функция рассеяния известна на дискретном множестве углов рассеяния θ_i , $f(\theta) = f(\theta_i)$, ее можно определить во всем непрерывном диапазоне углов с помощью интерполяции сплайнами [1312]. Тогда значение

функции $F_n = \int_0^{\theta_n} f(\theta) d\theta$ можно численно рассчитать для любого значения θ_n . Легко видеть, что F_n — неубывающая функция, отображающая интервал (0,1). Следовательно, при случайной выборке γ для определения $\theta_{\text{rnd}}^{\text{exp}}$ нужно положить $F_n = \xi$.

Фазовая функция Ми может быть затабулирована и использована таким же образом, как и экспериментально найденная фазовая функция [230]. В большинстве случаев подразумевается азимутальная симметрия. Это приводит к $p(\phi) = 1/2\pi$ и, следовательно, $\phi_{\text{rnd}} = 2\pi\xi$. На каждом шаге фотон теряет часть своего веса из-за поглощения $W_{n+1} = W_n(1 - \Lambda)$, где Λ — альбеда среды.

Когда фотон достигает границы, часть его веса передается через нее согласно формулам Френеля. Прошедшая через границу величина добавляется к величине отражения или пропускания. Угловое распределение выходящего света может быть рассчитано исходя из закона Снеллия, определяющего угол преломления. Фотон с оставшейся частью веса зеркально отражается от границы и продолжает свое случайное блуждание в среде.

Когда вес фотона становится меньше заранее определенного минимального значения, фотон уничтожается с использованием процедуры «русской рулетки» [311, 318]. Эта процедура экономит время, поскольку не имеет смысла продолжать случайные блуждания фотона, не вносящего существенного вклада в измеряемый сигнал. С другой стороны, она гарантирует сохранение полной энергии в процессе моделирования.

Метод МК имеет несколько преимуществ перед другими методами, поскольку в нем можно учесть влияние разделительных поверхностей среда–стекло и стекло–воздух, на которых происходят скачки показателя преломления и потери света на краях образца, использовать любую фазовую функцию рассеяния среды, а также конечный размер пучка и произвольное угловое распределение падающего излучения. При измерении коллимированного пропускания можно учесть вклад рассеянного света в измеряемый сигнал [1255]. Единственным недостатком данного метода является большое время, необходимое для достижения статистической сходимости, поскольку это статистический метод. Стандартное отклонение величины (диффузного отражения, пропускания и т. п.), аппроксимируемой методом МК, убывает пропорционально $1/\sqrt{N}$, где N — полное число запущенных фотонов.

Значения коэффициентов μ_a , μ_s и g для мозга человека, простаты собаки и печени свиньи на длинах волн 800 и 1064 нм, а также спектральные зависимости величин μ_a и μ_s в диапазоне 350–1050 нм для некоторых сильно рассеивающих тканей глаза (склера, сетчатки), полученные ОМК-методом из измерений пропускания и отражения *in vitro* приведены в работах [1240, 1252] (некоторые из этих данных для тканей человека представлены в табл. 7.1). Стоит отметить, что стабильная работа алгоритма поддерживалась генерацией от 10^5 до $5 \cdot 10^5$ фотонов на итерацию. От двух до пяти итераций обычно требовалось для вычисления оптических параметров с точностью 2%. Необходимое компьютерное время можно сократить, не только применяя метод сжатого ОМК, но также с помощью графических решений обратной задачи, полученных предварительно с помощью моделирования по методу МК [581, 1271–1273]. В последние годы широко используются технологии параллельных вычислений например, MCML-алгоритм был адаптирован к GPU-вычислениям [364], разработан также универсальный МК-алгоритм CUDA NVIDEA GPU [370].

Как правило, значения μ_a и μ_s' , измеренные *in vivo* для кожи человека, значительно меньше, чем полученные *in vitro* [322, 333–335, 767]. При использовании метода

двойной интегрирующей сферы расхождение в значениях коэффициента поглощения может быть связано с низкой чувствительностью метода к определению μ_a . Различия могут также быть обусловлены тем, что часто для измерений *in vitro* применяется гониофотометрический метод, который плохо работает при слабом поглощении в сочетании с сильным рассеянием ($\mu_a \ll \mu_s$). Для μ'_s это расхождение может быть также связано с сильной зависимостью от отношения показателей преломления рассеивающих частиц и окружающей среды m , $\mu'_s \sim (m - 1)^2$, которое может сильно различаться для живой ткани и биопсии [271, 1271]. Тем не менее, измерения *ex vivo* по методу «сравнения» с использованием одной интегрирующей сферы, использование адекватной модели ОМК и тщательная подготовка образцов позволяют с высокой точностью найти значения μ_a и μ'_s для кожи человека, достаточно близкие к измеренным *in vivo* [333–335] (см. табл. 7.1). Преимущество этого метода перед общепринятым методом двойной интегрирующей сферы заключается в том, что не требуется вносить поправки на свойства сферы, именно поэтому могут быть обеспечены достаточно точные измерения коэффициента поглощения.

7.6. Методы с пространственным разрешением

Для многих биотканей измерения *in vivo* возможны только в геометрии отражения назад. Пространственно-разрешенная отражательная способность $R(r_{sd})$ определяется как отнесенная к единице поверхности мощность рассеянного назад излучения, регистрируемого точечным приемником, расположенном на поверхности биоткани на расстоянии r_{sd} от точечного источника. Измеренная величина $R(r_{sd})$ зависит от оптических свойств образца, т. е. от коэффициента поглощения μ_a , коэффициента рассеяния μ'_s и фазовой функции рассеяния $p(\theta)$, показателя преломления и числовой апертуры (NA) приемной системы [1273, 1275]. Соотношение между интенсивностью рассеяния назад как функции расстояния между источником и приемником r_{sd} , с одной стороны, и оптическими параметрами, с другой стороны, можно получить на основе диффузионного приближения. Для полубесконечной среды при условии, что источник и приемник (например, выполненные в виде подводящего и принимающего отраженный свет оптических волоконных световодов) разделены расстоянием r_{sd} и ориентированы нормально к поверхности образца, отражающая способность дается выражением [1275]

$$R(r_{sd}) = \frac{z_0 A}{2\pi} \left[\frac{\mu_{\text{eff}}}{r_{sd}^2 + z_0^2} + \frac{1}{(r_{sd}^2 + z_0^2)^{3/2}} \right] \exp \left[-\mu_{\text{eff}} (r_{sd}^2 + z_0^2)^{1/2} \right], \quad (7.13)$$

где $z_0 = K/\mu'_s$ — длина экстраполяции, K — безразмерная постоянная, величина которой зависит от параметра анизотропии рассеивающих частиц и коэффициента отражения поверхности, A — площадь приемника, μ_{eff} определяется равенством (1.18).

Измерение интенсивности отраженного назад света от биоткани для заданного расстояния r_{sd} между источником и приемником является основой техники с пространственным разрешением, которая позволяет рассчитать коэффициенты рассеяния и поглощения с использованием, например, аналитического выражения (7.13), справедливого для сильно рассеивающих сред сравнительно большой толщины.

Когда объектом исследования является кожа или слизистая оболочка, следует использовать малые расстояния между источником и приемником, для которых диффузионное приближение не применимо ввиду близости траекторий фотонов к границе биоткани [46, 47, 93, 94, 236, 272, 322, 372, 495, 767, 1163, 1244, 1271–1273, 1276, 1284, 1318, 1320, 1321, 1326–1330]. В этом случае нужно использовать более сложные приближения теории переноса излучения или использовать численное ре-

шение обратной задачи методом МК. Например, авторы работы [1245] исследовали параметры пространственного распределения излучения, прошедшего через биоткань (полуширину и др.), а в работе [322] был использован конденсированный метод ОМК для обработки данных об отраженном излучении, полученных *in vivo* с помощью специального датчика, состоящего из двух светодиодов (660 нм и 940 нм) и трех пространственно разнесенных фотодетекторов. Такая методика может быть также реализована с использованием многоволоконных зондов с большим числом фиксированных расстояний между источником и приемниками [767] или ПЗС со специальной оптической системой [46, 93], позволяющей получать профилирование оптических свойств биоткани по глубине при условии достаточного числа волоконных световодов или используемых пикселей. Например, в работе [767] волоконно-оптический зонд с одним сигнальным и девятью приемными волокнами с диаметром сердцевины 600 мкм и средним расстоянием между центрами волокон, равным 1,7 мм, использовался для исследования оптических свойств кожи человека *in vivo* в широком спектральном диапазоне 400–1050 нм. ПЗС-система, описанная в работах [46] и [93], обеспечивает возможность абсолютных измерений коэффициента диффузного отражения. В этих измерениях с помощью зеркала изображения, полученные в отраженном свете, сравниваются с изображениями падающего пучка. Такая внутренняя калибровка снижает примерно в три раза неопределенность в измеряемых величинах коэффициента поглощения и приведенного коэффициента рассеяния по сравнению с обычно используемыми относительными измерениями. Эта система также обеспечивает измерения коэффициента диффузного отражения с учетом поляризации отраженного света, параллельной и перпендикулярной по отношению к линейной поляризации падающего света. В частности, на основе поляризационных измерений был обнаружен волноводный эффект в мышечной ткани.

Эффективная эндоскопическая волоконно-оптическая система и оптимизированный алгоритм были разработаны для автоматического спектрального определения локальных оптических свойств биоткани вблизи ее поверхности [1273]. Оптический зонд системы представлял собой одиннадцать оптических волоконных световодов, один для освещения и десять для приема излучения (см. рис. 7.4 д). Волоконные световоды имели числовую апертуру 0,22 и диаметр сердцевины 0,2 мм. Десять приемных волоконных световодов были расположены на разных расстояниях (обозначенных как ρ_i , $i = 1-10$, $\rho \equiv r_{sd}$) от осветительного волоконного световода, а именно от 0,3 до 1,25 мм с шагом примерно 0,1 мм.

Для записи спектра абсолютного коэффициента отражения выполнялась двухшаговая процедура калибровки. Во-первых, корректировалось влияние зависимости интенсивности источника света, а также параметров волоконных световодов, дифракционной решетки и приемника, от длины волны путем проведения измерений на стандарте с равномерным спектром отражения с применением интегрирующей сферы с покрытием из спектралона (Spectralon®). Во-вторых, получали эффективную интенсивность источника, производя серию измерений на твердом рассеивающем силиконовом (siloxane) фантоме с известными рассеивающими и поглощающими свойствами.

Модель, разработанная в работах [1273, 1277] для нахождения оптических параметров биоткани из результатов измерений с пространственным разрешением, учитывает специфическое влияние фазовой функции рассеяния и не требует каких-либо допущений об оптических свойствах биоткани, а также может описывать более сложные случаи, например многослойную биоткань. Когда измерения коэффициента отражения проводятся вблизи источника света, точность вычисленных оптических свойств существенно зависит от используемой фазовой функции рассеяния [1273, 1276]. Фазовую функцию $p(\theta)$ можно разложить в ряд по полиномам Лежандра

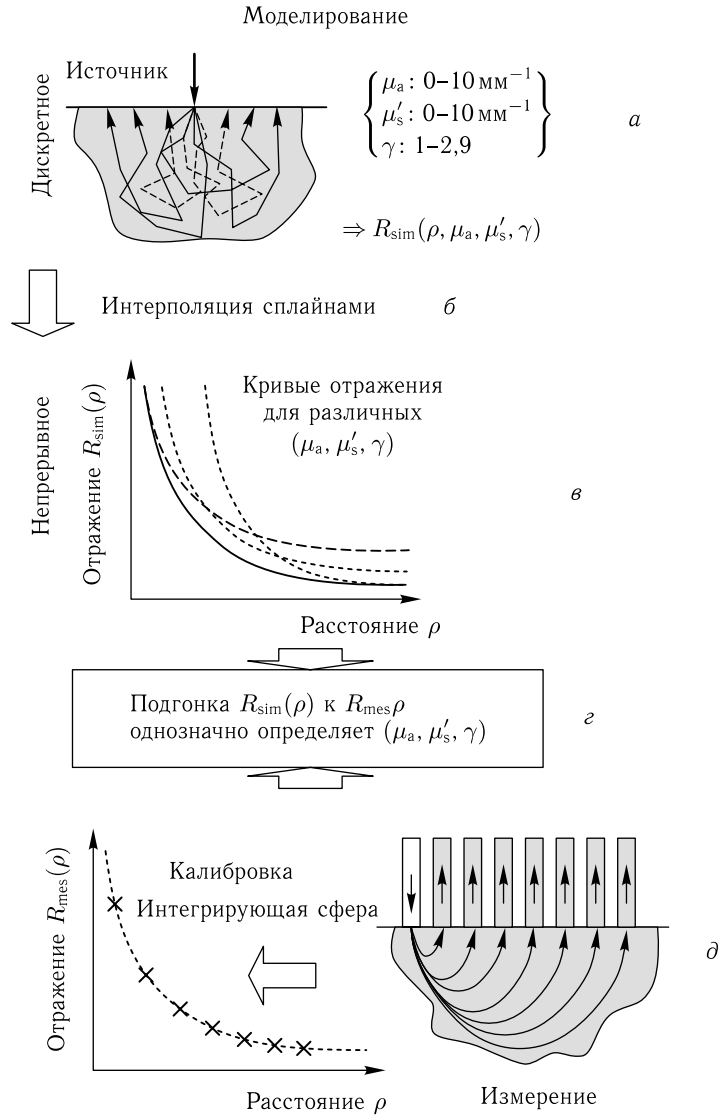


Рис. 7.4. Схема алгоритма для автоматического спектрального определения оптических свойств биоткани: *a* — сначала с помощью метода Монте-Карло строится набор кривых отражательной способности для широкого диапазона дискретных значений каждого оптического коэффициента (т.е. μ_a , μ'_s и $\gamma = (1 - g_2)/(1 - g_1)$); *б* — затем по результатам моделирования производится интерполяция кубическими В-сплайнами, что дает кривую отражения (*в*) для любого значения μ_a , μ'_s и γ . Наконец, для каждой длины волны спектра производится подгонка (*г*) измеренной кривой отражения (*д*) и результатов интерполяции, что позволяет определить μ_a , μ'_s и γ . Для подгонки используется алгоритм Левенберга-Маркардта [1273]

$P_n^1(\cos \theta)$ (см. соотношение (7.7)). Полученное выражение содержит в качестве коэффициентов моменты фазовой функции различного порядка от единицы до бесконечности, g_n , где g_1 — фактор анизотропии, обозначаемый обычно как g .

Диффузионное приближение обычно выполняется для $\mu'_s \rho > 5$ и $\mu'_s > 100\mu_a$. Для меньших расстояний между источником и приемником, в типичном случае при $0,5 < \mu'_s \rho < 5$, необходимо учитывать также второй момент фазовой функции g_2 [1278]. Можно показать, что кроме показателя преломления всего три параметра необходимы для точного описания распространения света на таких малых расстояниях: μ_a , μ'_s и γ , где

$$\gamma = \frac{1 - g_2}{1 - g_1}. \quad (7.14)$$

Причем γ зависит от относительного показателя преломления рассеивающей частицы и от отношения размера рассеивающих частиц к длине волны света; γ меняется между 0,9 (рассеяние рэлеевского типа) и значениями больше 2 (крупные по сравнению с длиной волны рассеивающие частицы). Для фазовой функции Хенни–Гринштейна $g_2 = (g_1)^2$ и, следовательно, $g = g_1 = \gamma - 1$ [1273].

Авторами работы [1273] было показано, что для фрактального распределения ансамбля рассеивающих частиц параметр γ связан с фрактальной размерностью распределения частиц по размерам. Приблизительно сорок дискретных значений были выбраны авторами работы [1273] для μ_a и μ'_s в пределах, соответственно, от 0,003 до 10 мм^{-1} и от 0,5 до 10 мм^{-1} ; 20 значений было выбрано для γ , в пределах от 1,0 до 2,9. Результатом этого стала четырехмерная матрица смоделированных кривых для коэффициента отражения, обозначенная как $R_{\text{sim}}(\rho_i, \mu_a, \mu'_s, \gamma)$, где каждый коэффициент принимает только дискретные значения (см. рис. 7.4 а). С использованием этого набора трех оптических коэффициентов (μ_a , μ'_s , γ). Поскольку длина пути и место выхода каждого фотона сохранялись, полное моделирование методом МК требовалось только для каждого из различных значений γ (таким образом, лишь 20 вариантов были необходимы при моделировании). В предположении однородной среды соотношения подобия позволяют получить любую кривую отражения $R_{\text{sim}}(\rho_i, \mu_a, \mu'_s, \gamma)$ из результатов единственного моделирования $R_{\text{sim}}(\rho_i, \mu_a = 0, \mu'_s = 1, \gamma)$, для которого величина γ постоянна [1273].

С использованием описанной методики и алгоритма были выполнены эндоскопические клинические исследования на желудке человека *in vivo* [1273]. Было обнаружено, что поглощающие и рассеивающие свойства существенно различны для полости и дна желудка (см. табл. 7.1) и хорошо соответствуют гистопатологическим наблюдениям.

В описанной в работе [1271] системе с шестью приемными волокнами с диаметром сердцевины 0,4 мм типичные расстояния между источником и приемником были $r_{\text{sd}} = 0,44; 0,78; 0,92; 1,22; 1,40$ и $1,84$ мм. Авторы провели моделирование методом МК с использованием программы, предоставленной Жаком [1274]. В ходе их исследований *in vivo* были определены температурные зависимости коэффициента поглощения и приведенного коэффициента рассеяния кожи предплечья человека (см. табл. 7.1).

Для определения оптических свойств относительно сильно поглощающей биоткани была использована другая система с шестью приемными волокнами с диаметром сердцевины 0,2 мм, расстояниями между источником и приемниками, равными 0,23; 0,67; 1,12; 1,57; 2,01 и 2,46 мм [1272]. Соответствующий алгоритм для нахождения оптических параметров был построен на основе моделирования распространения света методом МК и многопараметрических калибровочных моделей с использованием искусственных нейросетей с положительной обратной связью или метода наименьших квадратов. Абсолютная точность определения коэффициентов рассеяния и поглощения была достигнута на уровне среднеквадратичных отклонений ± 2 и $\pm 3 \text{ см}^{-1}$

соответственно. Метод был использован для определения оптических свойств образцов говяжьей печени *ex vivo*. Коэффициенты поглощения и рассеяния, измеренные на длинах волн 543 и 633 нм, оказались соответственно равными $\mu_a = 14,5 \pm 3,5 \text{ см}^{-1}$ и $\mu'_s = 7,2 \pm 3,7 \text{ см}^{-1}$ (543 нм) и $\mu_a = 4,7 \pm 1,7 \text{ см}^{-1}$ и $\mu'_s = 6,7 \pm 3,4 \text{ см}^{-1}$ (633 нм), что в целом согласуется с литературными данными.

Еще один пример метода отражения — зондирование биоткани наклонным лазерным пучком. Для описания линейного сдвига Δx центра максимального диффузного отражения по сравнению с точкой падения пучка была предложена простая аналитическая формула, облегчающая оценку оптических параметров [808, 1260, 1261]:

$$\Delta x = \frac{\sin \alpha_i}{n(\mu'_s + 0,35\mu_a)}, \quad (7.15)$$

где α_i — угол падения пучка, n — относительный средний показатель преломления рассеивающей среды, $\mu'_s \gg \mu_a$. Относительный показатель преломления равен единице для согласованной границы раздела. Точность определения коэффициента поглощения и приведенного коэффициента рассеяния данным методом равна соответственно 10–17% и 5–6%, вариации точности обусловлены выбором длины волны [1260]. Рефлектометрия наклонного падения осуществлялась также с помощью волоконно-оптического зонда, подобного описанному для рефлектометрии при нормальном падении [1261]. Освещение производилось белым светом, а диффузно отраженный свет собирался волоконно-оптическим зондом, изготовленным из черного дерлина (black derlin) и оптического волоконного световода с низкими потерями и диаметром сердцевины 600 мкм. Облучающий волоконный световод (ВС) был ориентирован под углом падения 45 град к плоскости поверхности биоткани, а девять приемных волокон, расположенных вдоль одной прямой, собирали свет, диффузно рассеянный назад от биоткани. Такой зонд также чувствителен к структурной анизотропии биоткани, обусловленной, например, ориентацией мышечных волокон. Более низкий коэффициент поглощения биоткани при ориентации измерительной оси зонда вдоль мышечных волокон, лежащих вдоль поверхности биоткани, по сравнению с ориентацией под углом 90 град к направлению этих волокон, может быть объяснен их волноводным действием. Мышечные волокна имеют более высокий показатель преломления по сравнению с окружением, тем самым обеспечивают волноводный эффект и в то же время поглощают меньше, чем пространство между ними, занятое межтканевой жидкостью со сравнительно малым показателем преломления и кровеносными капиллярами с высоким поглощением [808].

Измерения *in vivo* анизотропии коэффициентов рассеяния и поглощения кожи человека в различных точках тела были проведены с использованием прецизионных оптических систем — волоконно-оптического спектрометра, дающего пространственно-разрешенные спектры отражения, и одноволнового волоконно-оптического ПЗС-визуализатора биотканей [495]. Волоконно-оптический спектрометр имел 18 приемных ВС с диаметром сердцевины 200 мкм, расположенных в одну линию с облучающим ВС в центре, так что расстояния между источником и приемником составляли от 0,33 до 10,0 мм, и обеспечивал двумерные измерения отраженной интенсивности путем вращения ВС-системы вокруг освещающего волокна. Система видео-рефлектометрии состояла из фотометрической ПЗС-системы, имеющей прямую волоконно-оптическую связь с поверхностью кожи, и центрального освещающего оптического ВС, подающего свет от диодного лазера с длиной волны 810 нм на поверхность кожи. Получаемые изображения состояли из 1024^2 пикселей общим размером, равным 24 мкм². Для обеспечения широкого динамического диапазона совместно с ПЗС-чипом использовался 16-битный аналого-цифровой преобразователь. Для определения пространственного распределения коэффициентов рассеяния

и поглощения была разработана программа МК для двухслойной модели биоткани: сама кожа с двумя группами рассеивающих частиц — случайно распределенные частицы и бесконечные диэлектрические цилиндры (коллагеновые/эластиновые волокна дермы), выстроенные вдоль одной из главных декартовых осей параллельно поверхности кожи, и полубесконечная среда, моделирующая подкожный жировой слой и мышечную ткань. В слое кожи коэффициент рассеяния пересчитывался перед каждым актом взаимодействия в соответствии с текущим направлением распространения фотона как [495]

$$\mu_s = \mu_{s0}[1 + f(0,5 - |\cos \psi|)], \quad (7.16)$$

где μ_{s0} — средний коэффициент рассеяния для изотропной среды, f — доля рассеивателей, ориентированных в преимущественном направлении, а ψ — угол между текущим направлением фотона и осью цилиндра.

7.7. Оптическая когерентная томография

Оптическая когерентная томография (ОКТ) [1, 3, 8, 13, 17, 18, 76, 77, 84, 102, 108–111, 116, 127, 129, 135, 139, 142] — новый метод, позволяющий определять рассеивающие и поглощающие свойства биоткани *in vivo* в пределах глубины зондирования 1–3 мм [13, 1300–1302, 1305–1307, 1309, 1310, 1331–1335]. Принципы работы и приложения ОКТ подробно изложены в главах 8 и 14. Использование ОКТ для измерения коэффициента рассеяния биотканей μ_s было описано Шмиттом и др. в 1993 году [13]. Более совершенные алгоритмы, учитывающие эффекты многократного рассеяния и свойства фазовой функции рассеяния в малых углах, можно найти в литературе [1300–1302, 1305–1307, 1332–1335].

В общем случае среднеквадратичное значение тока гетеродинного сигнала фотодетектора ($i^2(z)$), полученного ОКТ-системой с глубины зондирования z , является произведением двух факторов: среднеквадратичного значения гетеродинного сигнала в отсутствие рассеяния $\langle i^2 \rangle_0$ и фактора эффективности гетеродинирования $\Psi(z)$, описывающего деградацию сигнала из-за рассеяния [1300, 1332–1335], т. е.

$$\langle i^2(z) \rangle = \langle i^2 \rangle_0 \Psi(z), \quad (7.17)$$

где множитель $\langle i^2 \rangle_0$ определяется как

$$\langle i^2 \rangle_0 = \frac{\beta^2 P_R P_S \sigma_b}{\pi (w_H)^2} \quad (7.18)$$

с коэффициентом, учитывающим конверсию оптической мощности в ток фотодетектора, β ; мощностями опорного и предметного пучков интерферометра, P_R и P_S ; эффективным сечением обратного рассеяния, σ_b ; и радиусом пучка на уровне $1/e$ на глубине зондирования в отсутствие рассеяния, w_H . Более точно, параметр w_H определен в работах [1300, 1333].

Эффективность оптического гетеродинирования $\Psi(z)$ существенно зависит от характера рассеяния. Было показано, что в случае вклада только однократного рассеяния [1300, 1333]

$$\Psi(z) \approx \exp(-2\mu_s z). \quad (7.19)$$

Здесь множитель 2 под экспонентой учитывает ослабление пучка света в предметном плече интерферометра на двойном проходе к локальной области, находящейся на глубине z , и обратно. При отсутствии поглощения коэффициент рассеяния μ_s может быть определен из измеренного наклона зависимости ОКТ-сигнала от глубины зондирования z . Для сред с поглощением, но в условиях однократного рассеяния,

свет распространяется по баллистическим траекториям и закон Бера может быть применен для описания затухания ОКТ-сигнала: $\mu_t = \mu_s + \mu_a$. Соответственно, μ_s можно получить вычитанием величины коэффициента поглощения из коэффициента полного затухания, измеренного по наклону характеристики.

Итак, измеряемый ОКТ-сигнал определяется как [1300, 1332–1335]

$$\langle i^2(z) \rangle^{1/2} \approx \langle i^2 \rangle_0^{1/2} \{ \exp(-2\mu_t z) \}^{1/2}. \quad (7.20)$$

ОКТ-исследование состоит в измерении сигнала обратного рассеяния или отражения, $R(z) \propto \langle i^2(z) \rangle^{1/2}$, от неоднородностей биоткани в зависимости от продольной координаты, или глубины, z :

$$R(z) \propto \exp(-\mu_t z). \quad (7.21)$$

Отражательная способность зависит от оптических свойств биоткани, а именно, от полного коэффициента затухания μ_t . Приближение однократного рассеяния реализуется до оптических толщин, меньших чем четырех [1331, 1336], поэтому отраженную оптическую мощность можно записать в виде

$$R(z) = I_0 \alpha(z) \exp(-\mu_t z). \quad (7.22)$$

Здесь I_0 — оптическая мощность, вводимая в биоткань, а $\alpha(z)$ — локальная отражательная способность биоткани по глубине z .

В простейшем случае измерение сигнала ОКТ для двух глубин z_1 и z_2 позволяет оценить коэффициент затухания μ_t при условии, что локальная отражательная способность $\alpha(z)$ не зависит от глубины для однородного слоя биоткани

$$\frac{R(z_1)}{R(z_2)} \approx \exp[-\mu_t (z_1 - z_2)] \quad (7.23)$$

или

$$\mu_t = \frac{1}{\Delta z} \ln \frac{R(z_1)}{R(z_2)}, \quad (7.24)$$

где $\Delta z = |z_1 - z_2|$.

Для описания связи между ослаблением сигнала ОКТ и глубиной зондирования используют такой параметр как наклон (или крутизна) ОКТ-характеристики (ОСТSS), такой метод называют еще ОКТ амплитудным анализом (ОСТА) [1337–1341]. В приближении однократного рассеяния и слабой зависимости локального отражения по глубине

$$\text{ОСТSS} \equiv \ln \frac{R(z)}{I_0} = -\mu_t z. \quad (7.25)$$

С помощью ОКТ можно изучать анизотропные свойства рассеяния биоткани. Так, исследуя с помощью системы ОКТ, работающей на длине волны 1300 нм, кортикальный слой кости, авторы работы [1309] обнаружили различия коэффициента рассеяния примерно на 40% для светового пучка, перпендикулярного ($\mu_s = 28 \text{ см}^{-1}$) и параллельного ($\mu_s = 20 \text{ см}^{-1}$) главному направлению естественных борозд в биоткани. Этот результат качественно описывается уравнением (7.16).

Значения коэффициентов поглощения и рассеяния, а также фактора анизотропии рассеяния ряда биотканей человека, определенные с помощью обсуждаемых и некоторых других ОКТ-методов на основе измерений *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*, представлены в табл. 7.1.

7.8. Прямые измерения фазовой функции рассеяния

Прямые измерения фазовой функции рассеяния $p(\theta)$ важны для выбора адекватной модели исследуемой биоткани [1, 58, 230, 345, 1191, 1311]. Фазовая функция рассеяния обычно определяется из гониофотометрических измерений в сравнительно тонких образцах биоткани [1, 37, 56, 58, 87, 96, 315, 316, 321, 322, 329, 345, 383, 1191, 1247, 1248, 1255, 1256, 1259, 1308, 1311]. Типичная гониофотометрическая установка изображена на рис. 7.5. Индикатриса рассеяния, измеренная с учетом геометрии образца и экспериментально определенной точки отсчета, аппроксимируется либо фазовой функцией Хенъи–Гринштейна (ФФХГ) [1, 31, 383, 345, 1311] (см. соотношение (1.15)), либо набором таких функций, каждая из которых характеризует свой тип рассеивающих частиц и их специфический вклад в индикатрису (см. выражение (7.7)) [1247]. В случае двухкомпонентной модели среды, содержащей мелкие и крупные (по сравнению с длиной волны) рассеивающие частицы, индикатриса представляется в виде анизотропной и изотропной компонент [56, 322, 1248]. Полезны также другие аппроксимирующие функции, например полученные из приближения Рэлея–Ганса [322], следующего из теории Ми [96, 1244, 1245], или двухпараметрическая фазовая функция ядра Гегенбауэра (ФФЯГ) (ФФХГ является ее частным случаем, см. выражение (7.8)) [1311]. Некоторые из этих типов приближений использовались для нахождения зависимости фактора анизотропии рассеяния g для эпидермиса и дермы от длины волны в диапазоне от 300 до 1300 нм, которая, как оказалось, очень хорошо совпадает с эмпирической формулой [37]

$$g_e \approx g_d \approx 0,62 + \lambda \cdot 0,29 \cdot 10^{-3}, \quad (7.26)$$

в предположении 10% вклада изотропного рассеяния (по крайней мере, в области спектра 300–630 нм). Длина волны λ выражена в нанометрах.

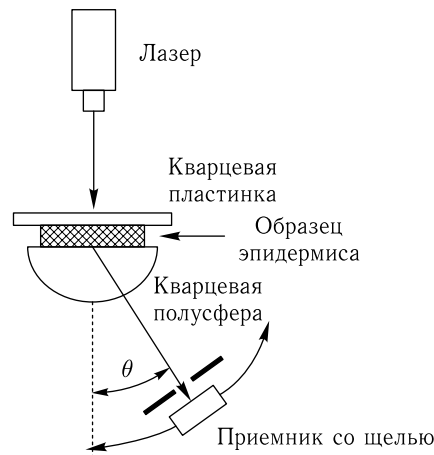


Рис. 7.5. Схема гониометра для измерения интенсивности рассеяния света как функции угла (измерения индикатрисы рассеяния) [383]

Анализ индикатрис рассеяния для последовательно отрываемых эпидермальных слоев кожи человека показал, что значение g , усредненное по пяти отрывам, составляет $g = 0,89 \pm 0,02$ для $\lambda = 633$ нм [383]. Измерения были выполнены с использованием установки, представленной на рис. 7.5. В качестве источника света использовался одномодовый He:Ne-лазер. Приемником служила система счета фотонов на основе

фотоумножителя. Вся система управлялась компьютером. Образцы эпидермиса помещались между кварцевой пластинкой и полусферой, чтобы избежать рефракции как падающего, так и рассеянного света. Измерения проводились в интервале углов рассеяния 0–60 град с шагом в один градус. Экспериментальные значения фактора анизотропии g , полученные прямыми измерениями фазовой функции рассеяния для многих типов биотканей человека, представлены в табл. 7.1.

Следует отметить, что правильное описание характеристик распространяющегося в биотканях света существенно зависит от точности формы использованной в расчетах фазовой функции рассеяния [49, 1311]. Численное моделирование, выполненное при одинаковом значении среднего косинуса угла рассеяния $\langle \cos(\theta) \rangle \equiv g$ для трех видов фазовой функции рассеяния $p(\theta)$ (ФФХГ, Ми и ФФЯГ), показало существенное различие в числе детектируемых фотонов от числа падающих во всех трех случаях описания, особенно при освещении и сборе излучения оптическими ВС с малой числовой апертурой и малым расстоянием между ними [49, 1311]. Больше фотонов детектируется для распределения, имеющего более высокую вероятность актов рассеяния с $\theta > 125^\circ$. Для клинически реальных оптических параметров, использованных в работе [49], различия в числе детектируемых фотонов превышали 60%.

Более того, для сред с высокими факторами анизотропии рассеяния, обеспечение точных измерений фазовой функции рассеяния в полном диапазоне углов от 0 до 180 град является сложной технической задачей, требующей предельно широкого динамического диапазона измерительной аппаратуры. Большая часть рассеянного излучения попадает в область углов от 0 до 30 град, отсчитываемых от направления падающего пучка. Вдобавок к этому, на измерения под углами, близкими к 90° , сильно влияет рассеяние высших порядков, даже если образец имеет умеренную оптическую толщину [654].

7.9. Определение оптических параметров биотканей

Рассмотренные выше методы и подходы успешно использовались для определения оптических свойств большого числа биотканей. Результаты измерений, выполненных *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* различными группами исследователей, собраны в табл. 7.1. Очевидно, многие типы биотканей человека и животных могут иметь очень близкие оптические свойства, но можно ожидать и некоторой специфичности. Например, нормальная склера быка более пигментирована, толще, а структура коллагена склеры делает ее более чувствительной к набуханию, чем склере человека. Другим примером является кожа свиньи, которая в принципе является довольно хорошей моделью кожи человека, однако структура эпидермиса у кожи свиньи может существенно отличаться от кожи человека, особенно в случае возрастных изменений кожи человека. С другой стороны, по своим оптическим свойствам такие биоткани, как мышечная ткань, стенка кровеносных сосудов и печень, могут быть очень близки друг другу у животных и человека. По этим причинам и чтобы не загромождать таблицу, в табл. 7.1 представлены оптические параметры только для биотканей человека. Ранее опубликованные данные об оптических свойствах биотканей как человека, так и животных, собраны в работах [40, 87, 1281, 1285]. Более новые данные можно найти в работах [98, 129, 130, 230, 333–335, 372, 389, 495, 767, 1245, 1246, 1262–1279, 1281–1286, 1288–1297, 1318, 1320, 1321].

Данные, представленные в табл. 7.1, хорошо отражают ситуацию в области измерений оптических параметров биотканей. Легко видеть, что основное внимание было уделено исследованиям оптических свойств молочной железы и головы/мозга человека в силу большой важности и перспективности оптической маммографии, а также оптического мониторинга и лечения заболеваний головного мозга, включая

психические заболевания. Кожа и лежащие под ней ткани также хорошо изучены. Тем не менее, в литературе представлено не так уж много надежных данных по оптическим параметрам этих и других биотканей. Следует также отметить, что полученные данные зависят от методики приготовления и хранения образцов биотканей, использованного метода измерений и алгоритма решения обратной задачи, инструментальных шумов и систематических ошибок.

Наиболее детальные исследования *in vitro* нормальных и коагулированных тканей мозга (серое вещество, белое вещество, мозжечок, варолиев мост, таламус), а также нативных опухолевых тканей (астроцинома II степени по ВОЗ и менигиома), с использованием спектральных измерений с одной интегрирующей сферой в диапазоне от 360 до 1100 нм описаны в работе [390] (см. табл. 7.1). Как следует из табл. 7.1, все исследованные ткани мозга имеют качественно одинаковые зависимости оптических свойств от длины волны. Коэффициент рассеяния падает, а фактор анизотропии растет с увеличением длины волны, что можно объяснить снижением вклада рэлеевского рассеяния и увеличением вклада рассеяния Ми с ростом длины волны. Поведение коэффициента поглощения в зависимости от длины волны напоминает смесь спектров поглощения окси- и деоксигемоглобина. Это означает, что, несмотря на тщательность приготовления образцов, из них не удалось полностью удалить остатки крови.

В то же время, имеют место различия в спектральных характеристиках биотканей мозга. Например, коэффициент ($\mu_t = \mu_a + \mu_s$) белого вещества существенно выше, чем серого вещества. Обе стволовые ткани мозга (варолиев мост, таламус) также имеют разные оптические свойства. Опухоли в общем случае макроскопически менее однородны, чем любые нормальные биоткани, поэтому коэффициенты рассеяния и факторы анизотропии у них слегка выше, чем у нормального серого вещества. Та же тенденция к росту коэффициентов рассеяния типична и для опухолей молочной железы (например, для карциномы, см. табл. 7.1 и работы [1250] и [1288]).

После коагуляции значения коэффициентов поглощения и рассеяния возрастают у всех биотканей. Величина этого роста, однако, различна для каждого типа биоткани и характеризуется фактором от 2 до 5. Было показано [390], что существенный рост обоих коэффициентов взаимодействия есть результат существенных структурных изменений, вызванных главным образом усадкой (уплотнением) ткани, а также набуханием коллагена и гомогенизацией сосудистых стенок. Сжатие (усадка) ткани, вызванное потерей воды при коагуляции, делает ткань более плотной, что приводит к возрастанию коэффициентов как рассеяния, так и поглощения в спектральном диапазоне, где поглощение воды не так сильно (видимая и ИК-области до 1100–1300 нм). Микроскопическое перераспределение под действием тепла показателя преломления биоткани из-за денатурации и гомогенизации белков в клетках и волокнах ткани также может вносить значительный вклад в изменение поглощающих и рассеивающих свойств. Аналогичный рост коэффициентов как поглощения (в 2–10 раз), так и рассеяния (в 2–4 раза) в области длин волн от 500 до 1100 нм был обнаружен для коагулированной крови человека.

Приведенный коэффициент рассеяния костной ткани черепа значительно меньше, чем белого вещества мозга, и сравним с коэффициентом рассеяния серого вещества, мозжечка и стволовых тканей мозга (варолиев мост и таламус). Он также сравним со значением для тканей кожи головы. Для всех коагулированных мягких тканей мозга, представленных в табл. 7.1, приведенный коэффициент рассеяния может быть значительно больше, чем у костной ткани черепа. Таким образом, при спектральных исследованиях головы взрослого человека в ближнем ИК-диапазоне рассеяние света костной тканью черепа имеет тот же порядок величины, что и окружающих тканей — кожи головы и мозга [1308]. Возможной причиной этого является высокая анизотропия рассеяния g из-за специфической структуры костной ткани. Например, корти-

кальцийный слой кости состоит из лежащей в его основе матрицы коллагеновых волокон, вокруг которой расположены содержащие кальций кристаллы гидроксиапатита. Эти кристаллы — главные рассеиватели в кости [1309]; они имеют сравнительно большой размер и обладают большой преломляющей способностью и поэтому могут отвечать за высокие значения g . Действительно, гониометрические измерения в области длин волн 650–950 нм оптических свойств тонких срезов костной ткани черепа свиньи с усреднением по шести образцам дали значения фактора анизотропии в диапазоне от $g = 0,925 \pm 0,014$ на длине волны 650 нм до $g = 0,945 \pm 0,013$ на длине волны 950 нм [1308]. Соответствующие значения коэффициентов поглощения и рассеяния, измеренные для 18 образцов с применением метода интегрирующей сферы и ОМК (ИМК), составили от $\mu_a = 0,40 \pm 0,02 \text{ см}^{-1}$ и $\mu_s = 350 \pm 7 \text{ см}^{-1}$ на длине волны 650 нм до $\mu_a = 0,50 \pm 0,02 \text{ см}^{-1}$ и $\mu_s = 240 \pm 6 \text{ см}^{-1}$ на длине волны 950 нм.

Анализируя данные, полученные различными группами для одной и той же ткани мозга, можно продемонстрировать влияние использованного теоретического подхода или методики приготовления образцов на результат. В настоящее время из-за нехватки экспериментальных данных для различных биотканей мозга такой анализ можно провести только для серого и белого вещества мозга (см. табл. 7.1). Авторы работы [390] с использованием метода ОМК (ИМК) для обработки данных эксперимента с одной интегрирующей сферой получили более низкие значения коэффициентов поглощения и рассеяния, чем авторы работы [1287], которые использовали инверсный метод, основанный на δ -приближении Эддингтона. Это расхождение можно объяснить ограничениями δ -приближения Эддингтона, которое является принципиально одномерным и не может учитывать потери света на боковых сторонах образца. Это могло приводить к переоценке коэффициентов экстинкции. С другой стороны, в рамках идентичных теоретических подходов (ОМК) использование метода быстрого замораживания и гомогенизации при приготовлении образцов [1287] по сравнению с применением метода криосрезов биотканей [390] дает более низкие значения коэффициентов рассеяния, по крайней мере, для белого вещества мозга. Такая же тенденция была продемонстрирована для образцов печени [1286] и ткани молочной железы (сравните данные работ [1250] и [1288] в табл. 7.1).

Дискретная модель мягкой биоткани, составленная из сфер десяти разных размеров, показывает, что коэффициент рассеяния убывает с длиной волны примерно как $\mu_s \sim \lambda^{2-D_f}$ для $600 \leq \lambda \leq 1400$ нм, где D_f — ограничивающая фрактальная размерность; $3 < D_f < 4$ для типичных мягких биотканей [222]. В более детальной модели биоткани из сфер, размеры которых находятся в интервале от 5 нм до 30000 нм с шагом 5 нм, $\mu_s \sim \lambda^{3-D_f}$ для $600 \leq \lambda \leq 1500$ нм, а диапазон фрактальной размерности составляет $4 < D_f < 5$ [107]. Обе модели дают один и тот же степенной закон зависимости коэффициента рассеяния (или приведенного коэффициента рассеяния) от длины волны $\mu_s(\mu'_s) = q\lambda^{-h}$ с параметром h , лежащим в интервале от 1 до 2 (см. формулы (3.29)–(3.32)). Как следует из данных табл. 3.2 и 7.1, большинство таких биотканей, как аорта, кожа, *dura mater*, склера и слизистая оболочка имеют параметр $h = 1,16$ – $1,62$ [764, 765, 1292, 1293, 1295], что соответствует предсказаниям модели. Соответствующие значения подгоночного параметра q находятся в интервале от $8,9 \cdot 10^4 \text{ см}^{-1}$ до $4,7 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1}$. Исследование кожи крысы *in vitro* в диапазоне от 500 нм до 1200 нм дало $h = 1,12$ [766]. Для мягких биотканей Жак моделировал приведенный коэффициент рассеяния тем же степенным законом с параметром q в интервале от $2 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1}$ до $2 \cdot 10^6 \text{ см}^{-1}$ и $h = 1,5$ [1299]. Экспериментальные данные для образцов кожи *ex vivo* из работы [1267] в спектральном интервале от 1000 нм до 2200 нм (с исключением дисперсии сильных полос воды) лучше воспроизводятся с использованием значения q , равного $2 \cdot 10^5$ для $h = 1,5$. При исследовании *in vivo* рассеяния назад от кожи и нижележащих биотканей человека в диапазоне длин волн от 700 до 900 нм постоянные q и h были определены

как 550 ± 11 и $1,11 \pm 0,08$ соответственно [767]. Показатель степени h связан с усредненным размером рассеивающих частиц. Таким образом, если h определено, можно вывести эквивалентный радиус M_i a_M из соотношений (3.31) и (3.32) [767]. Если относительный показатель преломления между сферами и окружающей средой равен $m = 1,037$, то измеренная постоянная $h = 1,11$ приводит к значению a_M , равному 300 нм. Измерения коэффициента диффузного отражения для ткани молочной железы дали значение a_M , равное 170 нм для нормальной ткани и 290 нм для злокачественной (см. табл. 7.1) [1288].

В противоположность обсуждавшимся выше биотканям, жировая и костная ткани демонстрируют очень низкие значения показателя степенной зависимости: $h = 0,59$ для жира брюшной полости [1294], $h = 0,79$ [1294] или $h = 0,68$ [1312] для подкожного жира и $h = 0,65$ для кости [1342, 1343]. Одно из возможных объяснений — специфичность структуры жировой и костной ткани. Жир состоит в основном из жировых клеток, каждая из них содержит каплю жира, заполняющую всю клетку. Клетки сферической формы, а их диаметр зависит от содержания жира и лежит в диапазоне от 10 до 200 мкм. Для таких крупных и достаточно однородных рассеивателей можно ожидать слабой зависимости коэффициента рассеяния света от длины волны. То же самое относится к кости, где кристаллы гидроксиапатита — основные рассеиватели — велики по размеру и имеют высокую преломляющую способность [1309]. Другое возможное объяснение более низких h — это возможное влияние дисперсии липидов и полос воды (см. рис. 1.5), которые должны уменьшать отклонение зависимости от длины волны в области около 1000–1300 нм.

Отметим, что при измерениях в области от 500 до 1200 нм для кожи крысы *in vitro* было обнаружено уменьшение h от 1,12 до 0,52, индуцированное аппликацией глицерина [766]. Поскольку главным действием глицерина на биоткань является дегидратация, которая вызывает увеличение плотности биоткани, возможна и третья причина таких малых значений степенной константы h для жира и кости, которые являются достаточно плотными и имеют наиболее низкую способность к гидратации среди всего многообразия биотканей.

Степенная зависимость от длины волны с низким значением показателя была обнаружена также у коэффициента рассеяния образца кости ноги лошади (только кортикальный слой толщиной 2 мм, взятый из диафиза третьей пястной кости лошади), определенного методом ОМК на основе измерений с помощью одной интегрирующей сферы [1309]. В диапазоне длин волн от 520 до 960 нм значения коэффициента рассеяния менялись от 350 до 250 см^{-1} для фиксированного значения параметра анизотропии рассеяния $g = 0,93$, принятого в расчетах.

7.10. Определение оптических параметров крови

Поскольку оптические свойства крови очень важны для многих оптических медицинских технологий, довольно много работ посвящено экспериментальному исследованию этих свойств и разработке соответствующих алгоритмов решения обратной задачи по восстановлению оптических параметров [48, 49, 230, 275, 345, 346, 1279, 1280, 1311, 1325, 1344–1355]. Для определения оптических параметров крови обычно используется свежая кровь человека, помещенная в калиброванную тонкую кювету (толщина от 0,01 до 0,5 мм, плоская геометрия). Перед оптическими измерениями необходимы стандартные клинические анализы для определения концентрации эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, гематокрита, среднего корпускулярного объема, гемоглобина и других представляющих интерес параметров. Если нужен уровень оксигенации образца, его можно проконтролировать с использованием обычного газоанализатора крови [230]. В большинстве случаев эксперименты выполняются либо

с полностью оксигенированной или полностью деоксигенированной кровью [48, 230, 345, 346, 1325]. Для получения полного насыщения кислородом образец подвергается воздействию воздуха или чистого кислорода (O_2) [48, 230]. Для полной деоксигенации крови добавляется дитионит натрия ($Na_2S_2O_4$) [230]. Чтобы убедиться, что ни объем, ни площадь поверхности частиц крови не менялись в течение эксперимента, нужно поддерживать рН образцов в пределах физиологических значений, примерно на уровне 7,4.

В реальности кровь течет по кровеносным сосудам, и потому предпочтительно изучать оптические свойства текущей крови. Эритроциты в потоке подвержены деформации и ориентации. При более низких скоростях сдвига происходит обратимая агрегация, а при более высоких эритроциты деформируются в эллипсоиды. Об экспериментах с текущей разбавленной и неразбавленной кровью сообщается в работах [48, 49, 1279]. Рогган и др. [48] использовали довольно сложное оборудование, чтобы проанализировать влияние гематокрита, скорости потока, осмотической концентрации раствора, гемолиза и насыщения кислородом на оптические свойства суспензий эритроцитов, погруженных в физиологический раствор. Нильссон и др. [49] исследовали влияние медленного нагревания на оптические свойства цельной текущей крови; к сожалению, уровень оксигенации не определялся и не контролировался. Влияние сдвигового напряжения на оптические свойства цельной полностью оксигенированной крови было изучено Стинбергом и др. [1279].

Несколько авторов сообщали о значениях оптических параметров крови, определенных из экспериментов по однократному рассеянию (табл. 7.2). Рейнолдс и др. [1344] определили значения сечения поглощения, сечения рассеяния и фактора анизотропии рассеяния крови для ряда длин волн в видимом и ближнем ИК-диапазонах и сравнили экспериментальные значения с рассчитанными (по теории Ми). В расчетах по теории Ми они использовали значение 2,79 мкм для радиуса эритроцита и значение 1,036 для показателя преломления эритроцита (относительно плазмы крови) [275, 1344].

Флок и др. [1280] измерили полный коэффициент ослабления и фазовую функцию рассеяния образца разбавленной цельной крови (фосфатный буферный раствор (ФБР), 1% гематокрит (Hct), толщина кюветы меньше 100 мкм) на длине волны 632,8 нм.

Штайнберг и Шеферд [1345] определили полные коэффициенты ослабления, сечения рассеяния и факторы анизотропии рассеяния эритроцитов в плазме крови и ФБР (0,9%) из измерений коллимированного пропускания и фазовой функции рассеяния на длине волны 632,8 нм, а также на основе вычислений с использованием теории Ми. Для измерения коллимированного пропускания использовались кюветы толщиной 144 мкм (плоская геометрия). Для гониометрических измерений использовалась кювета American Optical Hemoglobinometer (длина пути 51 мкм).

Ярославская и др. [230, 345] измерили фазовую функцию рассеяния ряда разбавленных образцов цельной крови, аппроксимировали ее с использованием теории Ми, функций Хензи–Гринштейна (ФФХГ) и ядра Гегенбауэра (ФФЯГ) (см. соотношения (1.15), (7.7), (7.8) и (7.10)) и определили факторы анизотропии для каждого приближения на длине волны 633 нм. Для расчетов по теории Ми радиус эритроцита предполагался равным 2,995 мкм, а показатель преломления эритроцита относительно ФБР — равным 1,04. Фазовые функции рассеяния были измерены в интервале углов от 2 до 18 град. Для экспериментов свежие образцы цельной крови собирались в гепаринизированные контейнеры и разбавлялись ФБР (рН = 7,4) до Hct = 0,1%. Образцы разбавленной крови помещались в кюветы с плоской геометрией толщиной 10 мкм.

Таблица 7.2
 Оптические параметры крови, определенные и аппроксимированные из экспериментов по однократному рассеянию (S — насыщение кислородом, Nst — гематокрит, a_{RBC} — радиус эритроцита, m_{RBC} — относительный показатель преломления эритроцита, l_{cuv} — толщина кюветы) [1311]

λ , нм	S , %	$\sigma_{a,2}$ мкм ²	$\sigma_{s,2}$ мкм ²	$\sigma_{t,2}$ мкм ²	μ_t , см ⁻¹	g	Фазовая функция	Примечание	Ссылка
665	100	0,060	57,20	—	7,47	0,9951	Ми	Сравнение с теорией Ми; $a_{RBC} = 2,79$ мкм; $m_{RBC} = 1,036$	[1344]
675	100	0,060	56,14	—	7,44	0,9950			
685	100	0,059	55,09	—	7,39	0,9949			
955	100	0,191	33,47	—	6,66	0,9925			
960	100	0,187	33,18	—	6,66	0,9924			
965	100	0,185	32,90	—	6,65	0,9924			
665	0	0,542	56,58	—	7,38	0,9951			
675	0	0,535	55,53	—	7,35	0,9950			
685	0	0,484	54,56	—	7,31	0,9949			
955	0	0,090	33,54	—	6,68	0,9925			
960	0	0,085	33,27	—	6,67	0,9924			
965	0	0,080	32,98	—	6,66	0,9924			
630	100	0,099	56,37	—	—	—			
660	100	0,066	54,20	—	—	—			
685	100	0,063	53,53	—	—	—			
800	100	0,131	42,24	—	—	—			
632,8	100	—	—	—	29	0,974	ФФХГ	$Nst = 1\%$; $l_{cuv} < 100$ мкм	[1280]
632,8	100	—	63,82	—	7,09	0,9853	Ми	$l_{cuv} = 144$ мкм и 51 мкм;	[1345]
100	—	66,62	—	7,40	0,9948		эритроциты в плазме;		
100	—	81,24	—	9,03	0,9818		эритроциты в ФР, буферированном		
100	—	79,27	—	8,81	0,9926		фосфатом (0,9%)		
632,8	100	—	—	—	—	0,982	ФФХГ	ФФЯГ — фазовая функция ядра	[345]
100	—	—	—	—	—	0,995	ФФЯГ	Гегенбауэра ($\alpha = 1,82$)	
632,8	100	—	—	—	—	0,971	ФФХГ	$Nst = 0,1\%$; $pH = 7,4$; $l_{cuv} = 10$ мкм	[230]
100	—	—	—	—	—	0,997	ФФЯГ	($\alpha = 3,658$)	
100	—	—	—	—	—	0,996	Ми	$a_{RBC} = 2,995$ мкм, $m_{RBC} = 1,04$	
577	100	—	—	≈ 95	—	0,966	ФФХГ	$Nst = 1\%$; $pH = 7,4$; $l_{cuv} = 100$ и 10 мкм	[1325]
100	—	—	—	—	—	0,997	ФФЯГ	($\alpha = 1,5$)	
100	—	—	—	—	—	0,9995	Ми		
	100	—	—	—	—	—	Рэлея-Ганса		

Таблица 7.3
 Обзор оптических свойств крови (* данные, взятые из графиков соответствующей работы; Нст — гематокрит, S — насыщение кислородом, $a_{\text{РВС}}$ — радиус эритроцита, $m_{\text{РВС}}$ — относительный показатель преломления эритроцита, t_b — температура крови, v_{sh} — сдвиговая скорость в потоке, l_{cuv} — толщина кюветы) [1311]

λ , нм	μ_a , см^{-1}	μ_s , см^{-1}	μ_t , см^{-1}	g	μ'_s , см^{-1}	Фазовая функция	Примечания	Ссылка
633	15,5	645	—	0,982	11,6	ФФХГ	Нст = 45%, $S > 98\%$	[345]
	15,4	2239	—	0,995	11,2	ФФЯГ	$\alpha = 1,82$	
	15,2 ± 0,6	400 ± 30	—	0,971 ± 0,001	11,7 ± 1,2	ФФХГ	Нст = 38%, $S > 98\%$, 7 образцов	[230]
	16,1 ± 0,6	4130 ± 170	—	0,997 ± 0,0001	12,4 ± 0,9	ФФЯГ	$\alpha = 3,658$	
	16,3 ± 0,5	2390 ± 160	—	0,9962 ± 0,0001	—	Ми	$a_{\text{РВС}} = 2,995$ мкм; $m_{\text{РВС}} = 1,04$	
	3,0	—	—	—	—	ФФХГ	Нст = 44 ± 3%, $S = 100\%$	[49] *
	3,5	—	—	—	18,5		$t_b = 25^\circ\text{C}$	
	4,0	—	—	—	18,2		$t_b = 35^\circ\text{C}$	
	4,5	—	—	—	18,0		$t_b = 42^\circ\text{C}$	
	4,5	—	—	—	21,0		$t_b = 48^\circ\text{C}$	
	6,0	—	—	—	17,0		$t_b = 54^\circ\text{C}$	
	488	20	—	—	—	20	ФФЯГ	$\alpha = 1,0$; Нст = 41%
16		—	—	—	20		$S = 25\%$	
12		—	—	—	20		$S = 50\%$	
7		—	—	—	18		$S = 75\%$	
							$S = 100\%$	
1,25		300	—	—	—	ФФЯГ	$\alpha > 0,99$; Нст = 5%	[48] *
1,10		300	—	—	—		$S = 0\%$	
							$S = 100\%$	
							Нст = 50 ± 0,5%; $S = 100\%$	[1279] *
							$v_{\text{sh}} = 50$ c^{-1}	
							$v_{\text{sh}} = 100$ c^{-1}	
							$v_{\text{sh}} = 150$ c^{-1}	
						$v_{\text{sh}} = 200$ c^{-1}		
						$v_{\text{sh}} = 300$ c^{-1}		
						$v_{\text{sh}} = 400$ c^{-1}		
						$v_{\text{sh}} = 500$ c^{-1}		
	102,2	134,4	—	0,91	—		ОДУ, $l_{\text{cuv}} = 90$ мкм	[1354]

Хэммер и др. [1325] представили обстоятельное исследование поведения однократного рассеяния на эритроцитах. Они измеряли коллимированное пропускание и фазовую функцию рассеяния суспензий эритроцитов в изотоническом ФБР ($pH = 7,4$; $Hct = 1\%$) для ряда длин волн в видимом спектральном диапазоне от 458 до 660 нм. Фазовые функции рассеяния были измерены для 20 углов рассеяния в диапазоне между 0,75 и 14,5 град. Для измерения пропускания использовалась кювета толщиной 100 мкм (плоская геометрия), а для измерений фазовой функции рассеяния — кювета толщиной 10 мкм (плоская геометрия).

Оптические свойства разбавленной и цельной крови человека, определенные непрямыми методами, можно найти в публикациях Ярославской и др. [230, 345], Рогана и др. [48], Нильссона и др. [49] и Стинбергера и др. [1279]. Сводка оптических свойств разбавленной и цельной крови, определенных непрямыми методами, дана в табл. 7.3.

Оптические параметры образцов полностью оксигенированной цельной крови на длине волны 633 нм [230] и в ближнем ИК-диапазоне спектра [345] были определены с использованием метода ОМК из измерений с двойной интегрирующей сферой (см. табл. 7.3). Измеренные величины включали диффузное отражение, полное пропускание и коллимированное пропускание. Из измеренных данных были получены коэффициент поглощения, коэффициент рассеяния и фактор анизотропии рассеяния (в предположении фазовой функции Хенъи–Гринштейна). В работе [230] были изучены образцы крови с $Hct = 38\%$ и насыщением кислородом $S > 98\%$. В работе [345] исследованный спектральный диапазон простирался от 700 до 1200 нм и использовались образцы крови с $Hct = 45,5 \pm 0,5\%$, помещенные в калиброванные кюветы (толщина 0,1 и 0,5 мм, плоская геометрия). Спектральные зависимости оптических параметров цельной крови, полученные в работе [345, 1311], представлены на рис. 7.6. Кроме этого, было проанализировано влияние аппроксимации фазовой функции рассеяния на результирующую оценку оптических параметров [230, 345]. Рассматривались фазовые функции Хенъи–Гринштейна, ядра Гегенбауэра и Ми (см. соотношения (1.15), (7.7), (7.8) и (7.10)). Рассчитанные угловые распределения рассеянного света сравнивались с гониофотометрическими измерениями, выполненными на длине волны 633 нм. Фазовые функции рассеяния сильно разбавленных образцов крови ($Hct = 0,1\%$, $S > 98\%$) также измерялись с помощью гониофотометра. Для оценки полученных данных были рассчитаны угловые распределения рассеянного излучения для оптически толстых образцов и результаты были сопоставлены с гониофотометрическими измерениями. Представленные данные показали, что используемое приближение для фазовой функции рассеяния может иметь существенное влияние на получаемые значения μ_s и g , в то время как μ_a и приведенный коэффициент рассеяния μ'_s намного менее чувствительны к точному виду фазовой функции рассеяния. Было показано, что как R_d , так и T_t сильно зависят от вида фазовой функции, и что степень этой зависимости определяется толщиной образца крови. Представленные данные подтверждают, что изменение используемого приближения для фазовой функции рассеяния может вызвать большие расхождения в получающихся значениях оптических параметров. Следовательно, для точного определения оптических постоянных крови требуется точное знание фазовой функции рассеяния.

Нильссон и др. [49] исследовали влияние медленного нагрева на оптические свойства полностью насыщенной кислородом цельной крови на длине волны 633 нм (табл. 7.3). 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 Хенъи–Гринштейна)

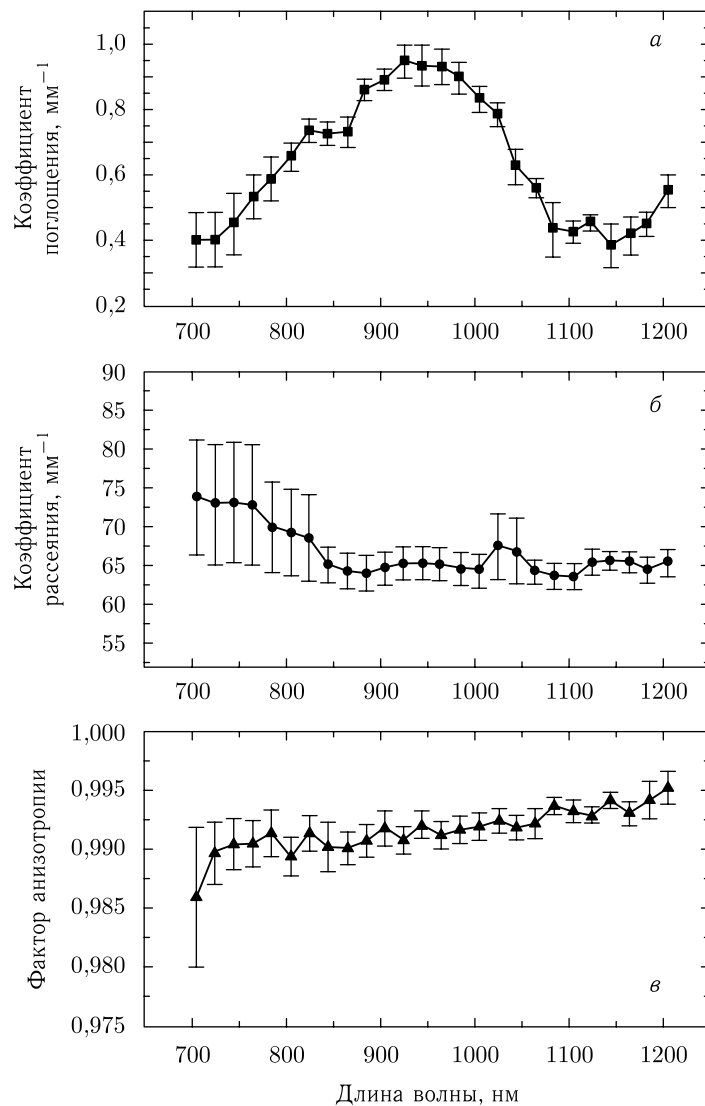


Рис. 7.6. Оптические свойства цельной крови [345, 1311]: *a* — коэффициент поглощения; *b* — коэффициент рассеяния; *c* — фактор анизотропии рассеяния. Гематокрит, $Hct = 45,5 \pm 0,5\%$; насыщение кислородом, $S > 98\%$. Среднее по 6 образцам. Вертикальные линии показывают стандартное отклонение.

определялись с использованием обратного метода добавления–удвоения. 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 $0,48 \pm 0,02$ 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 °С. Коагуляция крови происходила приблизительно при 55 °С.

Одно из наиболее всесторонних исследований макроскопических оптических свойств суспензии эритроцитов при различных физиологических и биохимических условиях (гематокрит, насыщение кислородом, осмотическая концентрация и гемолиз) было проведено Рогганом и др. (табл. 7.3) [48]. Авторы измеряли оптические параметры суспензии эритроцитов в ФБР в условиях потока с использованием метода двойной интегрирующей сферы и определяли оптические коэффициенты с помощью метода ОМК. Коэффициент поглощения, коэффициент рассеяния и фактор анизотропии рассеяния (в предположении фазовой функции ядра Гегенбауэра с $\alpha = 1$) определялись для оксигенированных и деоксигенированных суспензий эритроцитов ($Hct = 5\%$) при нормальных физиологических условиях (см. рис. 7.7). Для экспериментов эритроциты отделяли от плазмы крови и фракции лейкоцитов, промывали в ФБР (300 мосмоль/л, $pH = 7,4$) и суспензировали в ФБР. Гематокрит поддерживался посредством разбавления эритроцитов ФБР. Используя ФБР с различной осмолярностью, можно было варьировать осмолярность суспензии эритроцитов. Гемолиз вызывался разбавлением суспензии дистиллированной водой. Оксигенация и циркуляция крови устанавливались и контролировались экстракорпоральным блоком циркуляции. Температура крови поддерживалась постоянной на уровне 20 °С. Толщина проточной кюветы составляла 97 мкм.

Рогган и др. [48] также пришли к выводу о том, что точное приближение фазовой функции рассеяния играет важную роль в правильном определении оптических свойств крови. Было обнаружено, что поглощение и рассеяние линейно увеличиваются с гематокритом (для $Hct < 50\%$). Поглощение и рассеяние слегка убывают с ростом скорости сдвига. Среди параметров потока главным фактором, влияющим на оптические свойства, была аксиальная миграция клеток. Деформация эритроцитов не оказывала влияния на оптические свойства, если объем и содержание гемоглобина в них поддерживались постоянными. Растворы гемоглобина обладали меньшим поглощением, чем суспензии эритроцитов с той же концентрацией гемоглобина. Изменение оксигенации суспензии эритроцитов вызывало ожидаемые изменения коэффициента поглощения. На коэффициент рассеяния изменение оксигенации эритроцитов не влияло. Спектральные зависимости оптических параметров эритроцитов, взвешенных в ФБР ($Hct = 5\%$, сдвиговая скорость = 500 с^{-1} , осмолярность = 300 мосмоль/л), показаны на рис. 7.7. Последующие обстоятельные исследования оптических параметров крови, выполненные этой группой исследователей, отражены в работах [1347–1353], а также подробно проанализированы в монографии [6].

Стинберген и др. [1279] анализировали влияние скорости сдвига на оптические свойства полностью оксигенированной цельной крови (табл. 7.3). Коллимированное пропускание и угловое распределение интенсивности света были измерены на длине волны 633 нм для различных скоростей сдвига от (50 до 500 с^{-1}) и толщин слоя крови (от 20 до 100 мкм). Для скоростей сдвига выше 150 с^{-1} полный коэффициент ослабления определялся непосредственно из измерений коллимированного пропускания. Фактор анизотропии определялся из угловых распределений интенсивности с использованием метода ОМК с фазовой функцией рассеяния в форме Хеньи–Гринштейна. Значение полного коэффициента ослабления ($\mu_t = 1200\text{ см}^{-1}$) было определено из измерений коллимированного пропускания, а значения коэффициента поглощения ($\mu_a = 7\text{ см}^{-1}$ и 10 см^{-1}) были взяты из литературы [48]. Кроме того,

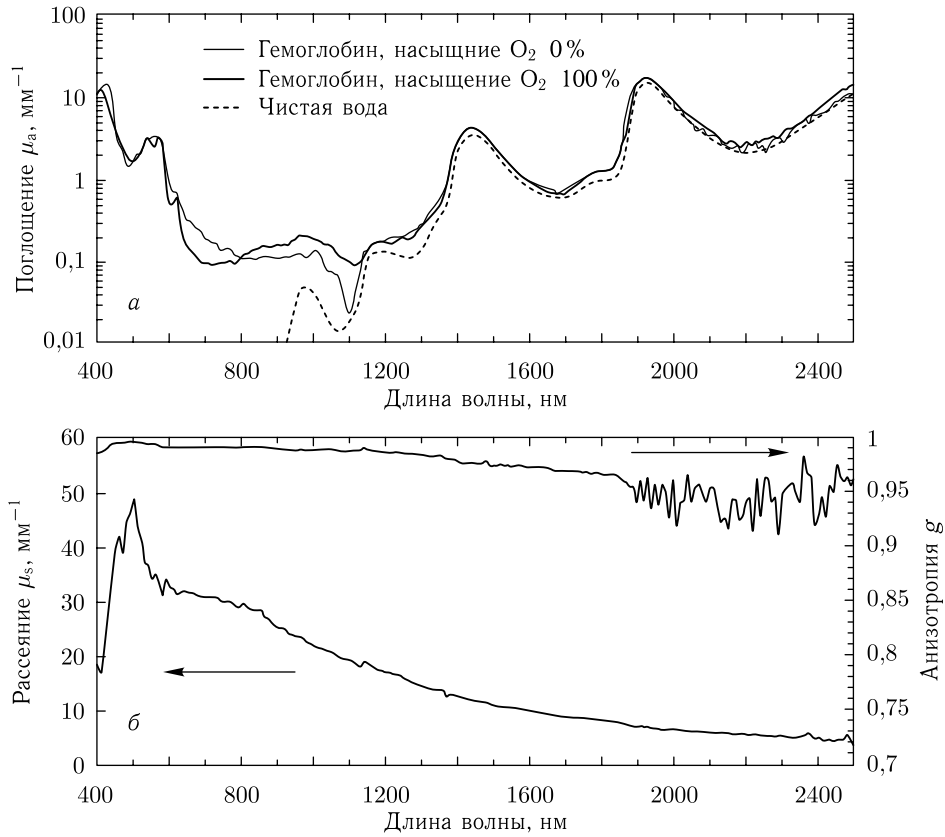


Рис. 7.7. Оптические свойства эритроцитов, взвешенных в ФБР ($\text{Hct} = 5\%$, осмотическая концентрация = 300 мосмоль/л, скорость сдвига = 500 c^{-1}) [48]

авторы измерили g -фактор для слоев крови различной толщины и определили реальный g -фактор посредством экстраполяции своих результатов к нулевой толщине слоя крови. Гематокрит исследуемой крови менялся между 49,5 и 50,5%. Непрерывное возрастание g -фактора (от 0,950 до 0,973) было обнаружено с ростом скорости сдвига.

Оптические свойства биотканей существенно зависят от содержания в них крови. Оптические свойства самой цельной крови существенно отличаются от свойств мягких биотканей, цельная кровь — это предельно мутная среда с сильным поглощением в видимой области и исключительно высокой анизотропией рассеяния (см. табл. 7.2 и 7.3). Поэтому цельная кровь имеет очень короткую среднюю длину свободного пробега фотона и, напротив, очень большую транспортную длину свободного пробега фотона по сравнению с большинством бескровных тканей. В результате присутствие даже небольшого количества крови сильно меняет процесс распространения света в биотканях. Этот факт иллюстрируется данными рис. 7.8, где представлена транспортная средняя длина свободного пробега фотона, вычисленная при зондировании светом бескровных и кровосодержащих тканей [1256, 1311]. Оптические свойства других кровосодержащих биотканей меняются аналогичным образом в соответствии с полным объемом содержащейся крови и ее пространственным распределением [165, 168, 369, 372, 1058, 1061, 1316, 1318–1321]. В результате оптический отклик био-

ткани сильно зависит от присутствия крови и от изменения ее параметров, таких как насыщение кислородом гемоглобина крови и гематокрит. Это открывает широкие возможности в оптической диагностике, но при этом делает дозиметрию света в биотканях еще более трудной задачей. Однако специальные приемы, как например, механическое выдавливание крови из области измерений, может существенно упростить анализ и дать возможность детектировать другие важные хромофоры биоткани [200, 1058, 1061, 1319]. Более подробно методы управления оптическими свойствами биотканей и крови обсуждаются в гл. 9.

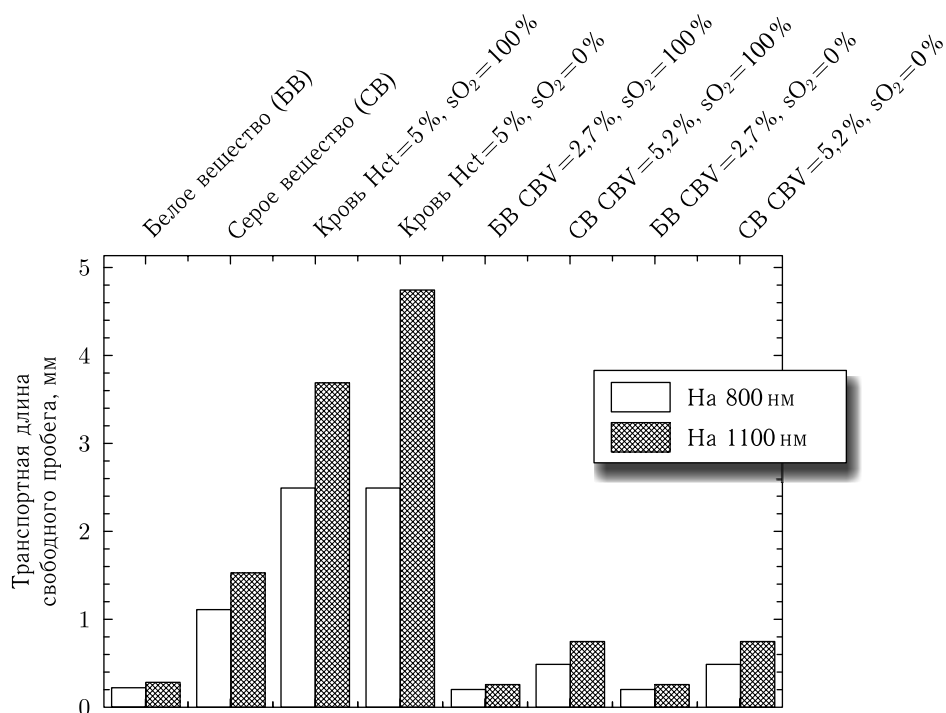


Рис. 7.8. Средняя транспортная длина свободного пробега ($l_{tr} = (\mu_a + \mu'_s)^{-1}$) на длинах волн 800 и 1100 нм для белого вещества (БВ) мозга, серого вещества (СВ) мозга, насыщенной кислородом крови, дезоксигенированной крови, БВ и СВ в условиях перфузии [1311]. На основе результатов работ [48, 1256]. Гематокрит крови при вычислениях для биотканей с перфузией полагался равным 40%. CBV — церебральный объем крови

Лазерная фотодинамическая терапия [19, 26, 29, 35, 1322] и лазерно-индуцированная интерстициальная термическая терапия (ЛИТТ) глубоких опухолей [2] — наиболее перспективные из наименее инвазивных методик терапии рака. В этом случае, помимо знаний оптических свойств опухолевой ткани и окружающих сред, для планирования терапии и точной дозиметрии излучения существенна информация о содержании крови и ее оптических свойствах [1346]. Кроме того, знание оптических свойств биотканей и крови позволяет определить наиболее эффективную длину волны для проведения лечения. Это влечет за собой необходимость детального учета присутствия крови при моделировании взаимодействия лазерного излучения с нормальными и патологически измененными биотканями, например, при планировании клинических процедур, таких как ЛИТТ, фотодинамическая терапия или фотохимиотерапия.

7.11. Измерение глубины проникновения света в биоткань и дозиметрия излучения

На практике важными являются прямые измерения глубины проникновения света в биоткани на разных длинах волн или на некоторой специфической длине волны. В частности, такие данные позволяют обеспечить стратегию лазерной фототерапии. Как показано ранее, детальные расчеты распределения света в биотканях могут быть очень сложными и часто требуют численного решения уравнения переноса излучения (см. уравнение (1.9)). Однако, если в эксперименте выполняются некоторые специфические условия («широкий» осветительный пучок, «полубесконечные» образцы), а свет в результате рассеяния трансформируется в практически изотропное распределение уже вблизи освещаемой поверхности, то можно использовать одномерную модель диффузии, которая дает решение, описываемое выражением (1.36), верным для глубин $z \geq 2l_d = 2/\mu_{\text{eff}}$, где μ_{eff} определяется формулой (1.18).

В работе [1282] значения глубины проникновения были определены с использованием аналога формулы (1.36) для ряда биотканей в норме и патологии; для измерений внутри толстых слоев биоткани освещение производилось параллельным лазерным пучком шириной 5 см (на одной из длин волн 633, 675, 780 или 835 нм), а прием излучения осуществлялся измерительной иглой с оптическим ВС, вводимой в образец биоткани. Эти данные представлены в табл. 7.4, по ним определялась величина $l_d = 1/\mu_{\text{eff}}$. На каждой определенной глубине, начиная с $z \geq 2l_d$ и глубже, на торец приемного оптического ВС попадало рассеянное излучение с одинаковой плотностью потока независимо от ориентации торца световода. Плотность потока излучения уменьшалась по мере увеличения глубины. Логарифмируя зависимость сигнала фотоприемника, пропорционального интенсивности детектируемого излучения, от положения торца ВС по глубине биоткани z и используя метод наименьших квадратов, получали прямую наилучшей аппроксимации, наклон которой определяет эффективный коэффициент ослабления $\mu_{\text{eff}} = 1/l_d$ (см. уравнение (1.36)).

Величина, обычно измеряемая в дозиметрии, — энергетическая освещенность $F(\mathbf{r})$ (см. формулу (1.11)), определяемая как мощность, падающая на единицу поверхности плоского приемника [1283]. При таком определении свет, падающий наклонно, вносит меньший вклад в $F(\mathbf{r})$, чем падающий перпендикулярно, а свет, падающий снизу, вообще не дает вклада. Индуцированный светом нагрев биоткани или любой фотобиологический эффект зависит от величины поглощенной энергии. Для изотропных сред поглощение нечувствительно к углу облучения, поэтому адекватной дозиметрической характеристикой будет полная плотность потока энергии излучения $U(\mathbf{r})$ (см. формулу (1.12)) или полная освещенность в точке, определяемая как мощность света, падающая на сферу, деленная на площадь сечения сферы [1283]. Для изотропного распределения интенсивности света полная освещенность в четыре раза больше энергетической освещенности измеренной в той же точке внутри биоткани (\mathbf{r}).

В работе [1283] экспериментальные данные по диффузному отражению R_d и коллимированному пропусканию T_c образца костной ткани толщиной d были использованы для вычисления методом МК прошедшей энергетической освещенности $F(d)$ и ее сравнения с полной освещенностью $U(d)$ в той же точке в образце бесконечной толщины. В результате был определен дозиметрический поправочный фактор U/F . Результаты дозиметрической коррекции с использованием полученных *in vitro* экспериментальных данных и соответствующих рассчитанных данных для костной ткани черепа человека представлены в табл. 7.5. Расчеты коэффициента поглощения μ_a и приведенного коэффициента рассеяния μ'_s на основании измеренных величин R_d

Таблица 7.4
 Оптическая глубина проникновения в биологическую ткань l_d в мм, измеренная *ex vivo* для нескольких длин волн. Число образцов ткани, взятых от различных субъектов, дано в скобках (^a стандартная ошибка, ^b абсолютное среднее отклонение, для других приведена ошибка, полученная методом наименьших квадратов) [1282]

Биоткань	l_d , мм $\lambda = 633$ нм	l_d , мм $\lambda = 675$ нм	l_d , мм $\lambda = 780$ нм	l_d , мм $\lambda = 835$ нм
Кровь	$0,19 \pm 0,01^a$ (10)	$0,28 \pm 0,01^a$ (10)	$0,42 \pm 0,02^a$ (10)	$0,51 \pm 0,02^a$ (10)
Саркома	0,2–4,0 (10)	0,4–4,3 (6)	0,5–4,6 (6)	—
Печень (цирроз)	$0,43 \pm 0,06^b$ (5)	$0,60 \pm 0,02$ (2) $0,58 \pm 0,01$	$1,04 \pm 0,02$ (2) $0,99 \pm 0,02$	—
Селезенка	$0,49 \pm 0,07^b$ (5)	$0,87 \pm 0,02$ (2) $0,94 \pm 0,01$	$1,21 \pm 0,01$ (2) $1,16 \pm 0,02$	—
Заушная железа	$0,61 \pm 0,08^b$ (3)	—	—	—
Метастазы бронхального узла	$1,05 \pm 0,01$ (2) $1,01 \pm 0,01$	—	—	—
Легкое	$0,81 \pm 0,06^a$ (10)	$1,09 \pm 0,11^b$ (4)	$1,86 \pm 0,12^b$ (4)	$2,47 \pm 0,03$ (1)
Бронхиальная киста	$1,05 \pm 0,02$ (2) $0,97 \pm 0,02$	—	—	—
Метастазы нервного узла Клоке	$1,12 \pm 0,01$ (1)	—	—	—
Щитовидная железа	$1,23 \pm 0,08^a$ (15)	$1,42 \pm 0,15^b$ (5)	$1,70 \pm 0,16^b$ (5)	$3,04 \pm 0,05$ (1)
Невринома	$1,23 \pm 0,02$ (1)	—	—	—
Тазовый нервный узел	$1,39 \pm 0,11^b$ (6)	$1,42 \pm 0,01$ (2) $1,45 \pm 0,02$	$1,83 \pm 0,02$ (2) $1,78 \pm 0,02$	$2,32 \pm 0,03$ (1)
Агрессивный фиброматоз	$1,41 \pm 0,16^b$ (4)	$1,54 \pm 0,03$ (2) $1,44 \pm 0,03$	$1,87 \pm 0,02$ (2) $1,77 \pm 0,03$	—

Таблица 7.4 (окончание)

Биоткань	l_d , мм $\lambda = 633$ нм	l_d , мм $\lambda = 675$ нм	l_d , мм $\lambda = 780$ нм	l_d , мм $\lambda = 835$ нм
Метаастазы печени	$1,53 \pm 0,15^6$ (5) —	$1,81 \pm 0,21^6$ (3) —	$2,48 \pm 0,30^6$ (3) —	$3,27 \pm 0,03$ (2) $3,81 \pm 0,03$
Карцинома легкого	$1,68 \pm 0,15^6$ (7)	$2,01 \pm 0,27^6$ (3)	$2,82 \pm 0,31^6$ (3)	$3,89 \pm 0,03$ (1)
Предгортанная поперечно-полосатая мышца	$1,72 \pm 0,20^6$ (3)	—	—	—
Жировая ткань молочной железы	$1,81 \pm 0,09^a$ (10)	$2,03 \pm 0,18^6$ (6)	$2,24 \pm 0,19^6$ (6)	$2,79 \pm 0,28^6$ (3)
Молочная железа	$2,59 \pm 0,18^a$ (14)	$2,87 \pm 0,30^6$ (5)	$3,12 \pm 0,32^6$ (5)	$3,54 \pm 0,40^6$ (3)
Дисплазия молочной железы	$2,21 \pm 0,20^6$ (9)	$2,68 \pm 0,29^6$ (3)	$3,03 \pm 0,33^6$ (3)	—
Карцинома молочной железы	$2,87 \pm 0,22^a$ (10)	$3,14 \pm 0,36^6$ (3)	$3,62 \pm 0,41^6$ (3)	$4,23 \pm 0,04$ (1)
Миома матки	$2,74 \pm 0,22^6$ (6)	$2,93 \pm 0,03$ (1)	$3,28 \pm 0,03$ (1)	—
Матка	$2,14 \pm 0,18^a$ (15)	$2,40 \pm 0,22^6$ (4)	$2,61 \pm 0,25^6$ (4)	$3,31 \pm 0,02$ (1)
Подчелюстная железа	$2,49 \pm 0,23^6$ (3)	—	—	—
Злокачественная фиброзная гистиоцитома	$2,48 \pm 0,03$ (1)	—	—	—
Прямая кишка	$2,48 \pm 0,21^6$ (7)	$2,73 \pm 0,29^6$ (3)	$2,91 \pm 0,31^6$ (3)	—
Липома	$2,83 \pm 0,21^a$ (11)	$3,03 \pm 0,29^6$ (4)	$3,71 \pm 0,33^6$ (4)	$4,19 \pm 0,03$ (1)
Мезенхимома	$4,01 \pm 0,03$ (1)	—	—	—
Подмышечная эпидермоидная карцинома	$2,12 \pm 0,18^6$ (8)	$2,51 \pm 0,22^6$ (4)	$2,64 \pm 0,23^6$ (4)	$3,24 \pm 0,03$ (1)
Печень (<i>post mortem</i>)	$1,20 \pm 0,13^a$ (10)	$1,69 \pm 0,16^a$ (10)	$2,91 \pm 0,30^a$ (10)	$3,68 \pm 0,35^a$ (10)
Мозг (<i>post mortem</i>)	$0,92 \pm 0,08^a$ (10)	$1,38 \pm 0,13^a$ (10)	$2,17 \pm 0,16^a$ (10)	$2,52 \pm 0,19^a$ (10)
Мышца (<i>post mortem</i>)	$1,47 \pm 0,10^a$ (10)	$1,63 \pm 0,10^a$ (10)	$3,46 \pm 0,23^a$ (10)	$3,72 \pm 0,29^a$ (10)

и T_c были выполнены с помощью упрощенной процедуры, применимой для образца биоткани толщиной $d > 2/\mu_{\text{eff}}$. В этом случае $T_c = T_c^{\text{eff}} \exp(-\mu_{\text{eff}}d)$. Как показано в работе [1283], величины T_c^{eff} , R_d и U/F зависят с хорошей точностью только от отношения μ_a/μ'_s . Знание T_c^{eff} позволяет оценить μ_{eff} из уравнения для T_c и, далее, μ_a и μ'_s из уравнения (1.18), если известно отношение μ_a/μ'_s . Все расчеты методом МК были проведены для среднего показателя преломления биоткани $\bar{n} = 1,35$ и фактора анизотропии $g = 0,8$.

Таблица 7.5

Оптические параметры и поправочный дозиметрический фактор U/F для костной ткани черепа человека, рассчитанные на основе измерений *in vitro* для различных длин волн (значения представлены в виде средних значений и стандартной ошибки); для получения объемной плотности излучения U в интактной улитке внутреннего уха измеренная для срезов ткани плотность излучения прошедшего излучения должна быть умножена на фактор U/F [1283]

λ , нм	μ_a/μ'_s	T_c^{eff}	μ_a , см^{-1}	μ'_s , см^{-1}	μ_{eff} , см^{-1}	U/F
593	$0,0135 \pm 0,0048$	$0,585 \pm 0,054$	$0,561 \pm 0,108$	$47,1 \pm 8,3$	$8,70 \pm 0,91$	$10,0 \pm 1,5$
635	$0,0072 \pm 0,0018$	$0,501 \pm 0,038$	$0,371 \pm 0,022$	$55,7 \pm 9,1$	$7,80 \pm 0,44$	$12,9 \pm 1,4$
690	$0,0035 \pm 0,0008$	$0,398 \pm 0,026$	$0,169 \pm 0,011$	$51,1 \pm 7,3$	$5,04 \pm 0,32$	$17,7 \pm 1,7$
780	$0,0028 \pm 0,0005$	$0,367 \pm 0,026$	$0,107 \pm 0,009$	$40,0 \pm 4,6$	$3,56 \pm 0,18$	$19,5 \pm 1,6$
830	$0,0028 \pm 0,0005$	$0,367 \pm 0,027$	$0,104 \pm 0,009$	$38,8 \pm 4,4$	$3,45 \pm 0,16$	$19,4 \pm 1,6$

7.12. Измерения показателя преломления

Средний показатель преломления биоткани \bar{n} определяется показателями преломления материала рассеивающих центров \bar{n}_s и базового (окружающего) вещества \bar{n}_0 (см. формулы (3.1)–(3.5)). Различие этих показателей преломления в биотканях, количественно характеризуемое отношением $m = \bar{n}_s/\bar{n}_0$, определяет эффективность рассеяния света. Например, в простой монодисперсной модели биоткани, такой как набор диэлектрических сфер одинакового диаметра $2a$, приведенный коэффициент рассеяния равен [271]

$$\mu'_s \equiv \mu_s(1 - g) = 3,28\pi a^2 \rho_s (2\pi a/\lambda)^{0,37} (m - 1)^{2,09}, \quad (7.27)$$

где $\mu_s = \sigma_{\text{sca}}\rho_s$ — коэффициент рассеяния, σ_{sca} — сечение рассеяния, ρ_s — объемная плотность числа сфер, g — фактор анизотропии рассеяния, λ — длина волны света в рассеивающей среде. Это уравнение верно для невзаимодействующих рассеивателей Ми, когда $g > 0,9$; $5 < 2\pi a/\lambda < 50$; $1 < m < 1,1$.

Например, ядра клеток эпителия можно рассматривать как сфероидальные рассеиватели Ми с показателем преломления n_{nc} , который превышает показатель преломления окружающей цитоплазмы n_{cp} . Ядра нормальных клеток имеют характерный диаметр $d = 4$ – 7 мкм. В отличие от них, ядра клеток диспластической ткани могут достигать диаметра 20 мкм, занимая почти весь объем клетки [1163]. В видимом диапазоне, где длина волны $\lambda_0 \ll d$, можно использовать приближение ван де Хюльста для описания сечения упругого рассеяния ядер, т. е. [272, 273]

$$\sigma_{\text{sca}}(\lambda, d) = \frac{1}{2} \pi d^2 \left(1 - \frac{2 \sin \delta}{\delta} + \left(\frac{2 \sin \delta}{\delta} \right)^2 \right), \quad (7.28)$$

где $\delta = 2\pi d(n_{nc} - n_{cp})/\lambda_0$, λ_0 — длина волны света в вакууме. Это выражение представляет некоторую составляющую от полного сечения рассеяния. Эта составляющая может быть различима на фоне полного сечения рассеяния, поскольку она периодически зависит от величины, обратной длине волны, что, в свою очередь, порождает периодическую компоненту в оптическом отражении биоткани. Поскольку частота указанных осцилляций (в пространстве обратных длин волн) пропорциональна размеру частицы, из фурье-образа периодической компоненты можно получить распределение клеточных ядер по размерам.

Измерение показателя преломления биоткани и ее компонентов очень важно для оптики биотканей и клеток, поскольку показатель преломления определяет отражение и преломление света на границах между биотканью/клеткой и воздухом, биотканью/клеткой и приемным оптическим волокном, а также между слоями биоткани и органеллами клетки. В результате распространение света и его распределение внутри биоткани и клеток, в частности скорость света и характер миграции фотонов зависит от характера пространственного распределения показателя преломления [31, 129, 130, 245, 248–270, 298, 1267, 1301, 1302, 1356–1391]. Хотя исследования показателя преломления биотканей имеют довольно давнюю историю [87], для многих биотканей трудно найти в литературе надежные данные. Согласно работе [87], большинство биотканей имеет показатель преломления в видимой области в диапазоне от 1,335 до 1,620 (например, 1,55 для рогового слоя кожи, 1,620 для зубной эмали, 1,386 на поверхности хрусталика глаза). Стоит отметить, что результаты измерений *in vitro* и *in vivo* могут существенно различаться. Например, показатель преломления брыжейки крысы, измеренный *in vitro*, равен 1,52 и лишь 1,38 при измерениях *in vivo* [87]. Эта разница может быть отнесена на счет изменения преломляющей способности базового вещества n_0 из-за различной степени гидратации биоткани в условиях *in vitro* и *in vivo*. Как правило, в условиях *in vivo* степень гидратации выше, а рефракция ниже.

Действительно, оптические свойства биотканей, включая показатель преломления, зависят от содержания воды, зачастую определяя спектральные и дисперсионные характеристики биоткани [87, 1382, 1392]. Показатели преломления воды в широком диапазоне длин волн от 200 нм до 200 мкм приведены в работе [87]. В частности, $n_w = 1,396$ для $\lambda = 200$ нм, 1,335 для $\lambda = 500$ нм, 1,142 для $\lambda = 2800$ нм, 1,400 для $\lambda = 3500$ нм, 1,218 для $\lambda = 10000$ нм и 2,130 для $\lambda = 200$ мкм. Уравнение (6.5) описывает спектральную зависимость показателя преломления воды в видимом и ближнем ИК-диапазонах, соответствующих «окну прозрачности» биоткани [1191].

В качестве модели можно представить биоткань как смесь воды и биоорганического компонента ткани. Например, показатель преломления кожи человека можно аппроксимировать показателем преломления смеси воды и белка, взятого в пропорции 70/30 [1267, 1386, 1392]. Предполагая, что дегидратированный белок имеет постоянный показатель преломления 1,5 по всему диапазону длин волн, авторы работы [1267] предложили следующее выражение для оценки показателя преломления кожи:

$$n_{\text{skin}}(\lambda) = 0,7(1,58 - 8,45 \cdot 10^{-4}\lambda + 1,10 \cdot 10^{-6}\lambda^2 - 7,19 \cdot 10^{-10}\lambda^3 + \\ + 2,32 \cdot 10^{-13}\lambda^4 - 2,98 \cdot 10^{-17}\lambda^5) + 0,3 \cdot 1,5, \quad (7.29)$$

где длина волны λ выражена в нанометрах.

Для различных частей биологической клетки значение показателя преломления в ближнем ИК-диапазоне можно оценить следующим образом: внеклеточная жидкость $\bar{n} = 1,35$ –1,36; цитоплазма 1,360–1,375, клеточная мембрана 1,46, ядро

1,38–1,41; митохондрии и органеллы 1,38–1,41; меланин 1,6–1,7 [58]. Из-за разницы в показателе преломления компонентов, образующих клетку, возникает рассеяние света на клеточных структурах [1383]. Органеллы и субкомпоненты органелл, имеющие показатель преломления, отличный от окружения, в первую очередь являются источниками рассеяния на клетке. Сама клетка как целое может быть значительным источником рассеяния на малые углы, что важно в таких приложениях, как цитометрия в потоке, где клетки изучаются раздельно [211, 215]. Напротив, в биотканях, где клетки окружены другими клетками или структурами, и межклеточная среда является более или менее однородной, именно органеллы становятся главными рассеивателями. Например, в эпителиальной ткани клеточные ядра являются хорошо идентифицируемыми рассеивателями, поскольку часто это наиболее крупные органеллы в клетке с более высоким показателем преломления, чем у цитоплазмы. Для идентификации также важно, что при развитии неопластических изменений размеры ядер увеличиваются по сравнению с остальной клеткой [216–219, 229, 232, 236, 272, 1293]. Митохондрии (0,5–1,5 мкм в диаметре), лизосомы (0,5 мкм) и пероксисомы (0,5 мкм) — очень важные рассеиватели, размер которых относительно длины волны предполагает их значительный вклад в рассеяние назад. Гранулы меланина, которые традиционно рассматриваются как поглотители, из-за их размера, сравнимого с длиной волны света, и высокого показателя преломления должны также учитываться как важные рассеиватели [58]. Структуры, состоящие из мембранных слоев, такие как эндоплазматическая сеть или аппарат Гольджи, могут также оказаться существенными рассеивателями, поскольку в них имеют место пространственные флуктуации показателя преломления с большой частотой и амплитудой. Кроме клеточных компонентов, фиброзные структуры биоткани, такие как коллагеновые и эластиновые волокна, должны рассматриваться как важные рассеиватели.

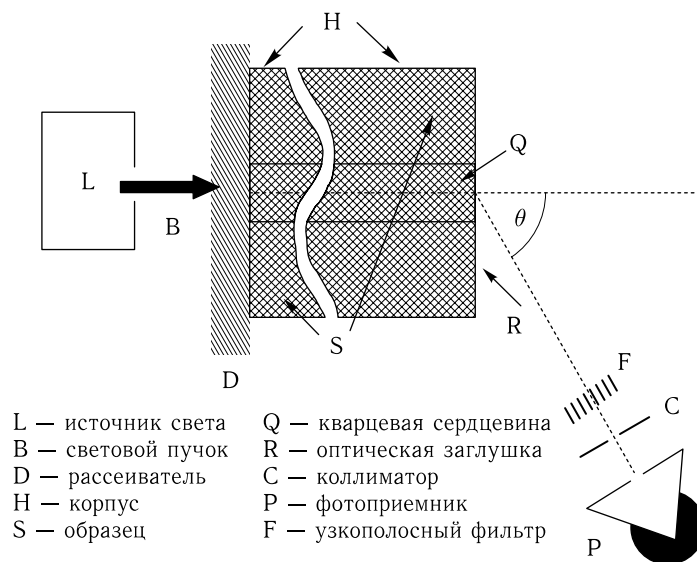


Рис. 7.9. Схема экспериментальной установки для определения показателя преломления биоткани и крови. Кварцевое волокно без оболочки помещается в исследуемую среду. Измеряется угловое распределение выходящего на воздух света, а показатель преломления определяется по формуле (7.30) [248]

Таблица 7.6
 Экспериментальные значения фазового n или группового n_g показателей преломления биологических тканей, крови и их компонентов, измеренные *in vitro* и *in vivo* *; среднеквадратичные отклонения даны в скобках

Биоткань	λ , нм	n, n_g	Примечания
Аорта человека			
Норма: адвентициальная (наружная) оболочка	456–1064	1,36	Работа [1281]
медиальная (средняя) часть стенки сосуда	456–1064	1,38	
интима (внутренняя оболочка)	456–1064	1,39	
Кальцифицированная: медиальная (средняя) часть стенки сосуда	456–1064	1,53	
интима (внутренняя оболочка)	456–1064	1,39	
Мочевой пузырь человека			
Слизистая	456–1064	1,37	Работа [1281]
Стенка	456–1064	1,40	
Цельный	456–1064	1,38	
Мозг человека			
Серое вещество	456–1064	1,36	Работа [1281]
Белое вещество	456–1064	1,38	
Белое и серое вещество	456–1064	1,37	
Прямая кишка человека			
Мышечная ткань	456–1064	1,36	Работа [1281]
Подслизистая	456–1064	1,36	
Слизистая	456–1064	1,38	
Цельная	456–1064	1,36	
Женская молочная железа			
Норма	800	1,403	Работа [31]
Злокачественная опухоль	800	1,431	

Таблица 7.6 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	n , n_g	Примечания
Молочная железа крысы (8 животных, 32 опухоли)			
Жировая ткань	750–850	1,467 (0,026)	ОКТ, титан-сапфировый лазер в качестве источника с центральной длиной волны 800 нм и шириной полосы ~ 100 нм; индуцированная <i>N</i> -метил- <i>N</i> -нитрозомочевинной опухоль молочной железы крысы (аналогичная по патологии карциноме протока у человека) [1364]
Фиброзная строма	750–850	1,388 (0,043)	
Опухоль	750–850	1,390 (0,028)	
Пищевод человека			
Слизистая	456–1064	1,37	Работа [1281]
Жир человека			
Подкожный	456–1064	1,44	Работа [1281]
Внутрибрюшной	456–1064	1,46	
Брыжеечный жир человека	1300	1,467 (0,008)	ОКТ, измерения оптической длины пути [1407]
Жир быка	633	1,455 (0,006)	Волоконно-оптический рефрактометр (ВОР); гомогенизированная ткань [248]
Жир свиньи	488	1,510 (0,002)	Лазерный рефрактометр (ЛР) [1357]
	632,8	1,492 (0,003)	
	1079,5	1,482 (0,002)	
	1341,4	1,478 (0,004)	
	632,8	1,493 (0,005)	ЛР [1358]
Сердце человека			
Трабекула Миокард	456–1064	1,40	Работа [1281]
	456–1064	1,38	
Мышца левого желудочка сердца человека	1300	1,382 (0,007)	ОКТ, измерения оптической длины пути [1407]
Бедренная вена человека	456–1064	1,39	Работа [1281]

Таблица 7.6 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	n , n_g	Примечания
Почка			
человека	456–1064	1,37	Работа [1281]
человека	633	1,417 (0,006)	ВОР [248]
собаки	633	1,400 (0,006)	
свиный	633	1,390 (0,006)	
быка	633	1,390 (0,006)	
Печень			
человека	456–1064	1,38	Работа [1281]
человека	633	1,367 (0,006)	ВОР; гомогенизированная ткань [248]
собаки	633	1,380 (0,006)	
свиный	633	1,390 (0,006)	
быка	633	1,390 (0,006)	
Легкое			
человека	456–1064	1,38	Работа [1281]
человека	633	1,380 (0,006)	ВОР; гомогенизированная ткань [248]
собаки	633	1,380 (0,006)	
свиный	633	1,380 (0,006)	
Мышечная ткань			
человека	456–1064	1,37	Работа [1281]
человека	633	1,400 (0,006)	ВОР; гомогенизированная ткань [248]
собаки	633	1,412 (0,006)	
быка	592 (560–640)	1,382 (0,004)	Флуоресцентная конфокальная микроскопия [1363]

Таблица 7.6 (продолжение)

Бютокань	λ , нм	n , n_g	Примечания
овцы \parallel	488	1,404 (0,003)	ЛР [1357], значками \parallel и \perp обозначены образцы одной и той же ткани с волокнами, ориентированными соответственно параллельно и перпендикулярно границе образца
	632,8	1,389 (0,002)	
	1079,5	1,378 (0,004)	
	1341,4	1,375 (0,003)	
овцы \perp	488	1,402 (0,002)	
	632,8	1,389 (0,002)	
	1079,5	1,375 (0,003)	
	1341,4	1,373 (0,003)	
свиный \parallel	488	1,402 (0,002)	
	632,8	1,381 (0,002)	
	1079,5	1,372 (0,003)	
	1341,4	1,370 (0,003)	
свиный \perp	488	1,399 (0,002)	
	632,8	1,379 (0,002)	
	1079,5	1,370 (0,002)	
	1341,4	1,367 (0,003)	
свиный \parallel свиный \perp	632,8	1,380 (0,007)	ЛР [1358]
	632,8	1,460 (0,008)	

Таблица 7.6 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	n , n_g	Примечания
Мышца брюшной стенки крысы (вида Уистар Хан)	589	1,3980	Рефрактометр Аббе, измерение показателя преломления и массы (m) в ходе процесса дегидратации при нагреве образца фенолом для сушки, * интактная ткань [1386]
	589	($m = 0,1623g$) *	
	589	1,3995	
	589	($m = 0,1455g$)	
	589	1,4105	
	589	($m = 0,1361g$)	
	589	1,4200	
	589	($m = 0,1252g$)	
	589	1,4295	
	589	($m = 0,1144g$)	
589	1,4410		
589	($m = 0,1053g$)		
589	1,4525		
589	($m = 0,0955g$)		
589	1,4640		
589	($m = 0,0860g$)		
589	1,4785		
589	($m = 0,0747g$)		
589	1,4910		
589	($m = 0,0654g$)		
589	1,5035		
589	($m = 0,0551g$)		

Таблица 7.6 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	n , n_g	Примечания
Кожа человека			
Роговой слой (РС) *	1300	$n_g = 1,51$ (0,02)	ОКТ, отслеживание опорного зеркала и фокуса [1407]
Эпидермис *	1300	$n_g = 1,34$ (0,01)	
Дерма	1300	$n_g = 1,41$ (0,03)	
Дерма	1300	$n_g = 1,400$ (0,007)	ОКТ, измерения оптической длины пути [1407]
РС * (ладонь руки)	1300	$(n_{lg})^{1/2} = 1,47$ (0,01)	ОКТ, отслеживание фокуса посредством сдвига линзы на конце волокна/линзы коллиматора [1301]
Эпидермис * (ладонь руки, гранулярный слой)	1300	$(n_{lg})^{1/2} = 1,43$ (0,02)	
Эпидермис * (ладонь руки, базальный слой)	1300	$(n_{lg})^{1/2} = 1,34$ (0,02)	
Эпидермис * (ладонная сторона предплечья)	1300	$(n_{lg})^{1/2} = 1,36$ (0,01)	
Верхняя дерма * (ладонь руки)	1300	$(n_{lg})^{1/2} = 1,41$ (0,03)	
Верхняя дерма * (ладонная сторона предплечья)	1300	$(n_{lg})^{1/2} = 1,43$ (0,02)	
РС * (тыльная сторона большого пальца)	980	$(n_{lg})^{1/2} = 1,50$ (0,02)	
Граница раздела «воздух-кожа» * (ладонная сторона большого пальца)	980	$(n_{lg})^{1/2} = 1,56$	Работа [1411]
Граница раздела «РС-эпидермис» * (ладонная сторона большого пальца)	980	$(n_{lg})^{1/2} = 1,34$	
РС. слой кожи человека	400-700	1,55	Работа [87]

Таблица 7.6 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	n , n_g	Примечания	
Кожа человека (эпидермис) (12 женщин от 27 до 63 лет; 10 европеоидной расы* и 2 негроидной расы**)	325*	1,489 (S) 1,486 (P)	Призмный лазерный рефрактометр S- или P-поляризации, формулы Френеля; свежие образцы ткани измерялись при комнатной температуре не более чем через 30 ч после абдоминопластической операции, неопределенность показателя преломления оценена как $\pm 0,006$ [1367]	
	442***	1,449 (S) 1,447 (P)		
	532***	1,448 (S) 1,446 (P)		
	633*	1,433 (S) 1,433 (P)		
	850*	1,417 (S) 1,416 (P)		
	1064*	1,432 (S) 1,428 (P)		
	1310*	1,425 (S) 1,421 (P)		
	1557*	1,404 (S) 1,400 (P)		
	325*	1,401 (S) 1,403 (P)		
	442***	1,395 (S) 1,400 (P)		
Кожа человека (дерма) (12 женщин от 27 до 63 лет; 10 европеоидной расы* и 2 негроидной расы**)	532***	1,378 (S) 1,381 (P)		
	633*	1,396 (S) 1,393 (P)		
	850*	1,384 (S) 1,389 (P)		
	1064*	1,375 (S) 1,385 (P)		
	1310*	1,358 (S) 1,364 (P)		
	1557*	1,363 (S) 1,367 (P)		
	1300	$(n_g)^{1/2} = 1,415$	ОКТ, отслеживание фокуса [1302]	
	1300	$(n_g)^{1/2} = 1,365$		
	Кожа свиньи (обработанная раствором моющего средства)	456-1064	1,42	Работа [1281]
		456-1064	1,40	

Таблица 7.6 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	n , n_g	Примечания
Кожа свиньи (дерма)	325	1,393	Призмный лазерный рефрактометр, формулы Френеля; образцы свежей ткани толщиной от 0,31 до 0,84 мм; неопределенность показателя преломления оценена как $\pm 0,004$ [1365,1366]
	442	1,376	
	532	1,359	
	633	1,354	
	850	1,364	
	1064	1,360	
	1310	1,357	
	1557	1,361	
Селезенка			
человека	456–1064	1,37	Работа [1281]
собаки свиньи	633	1,400 (0,006)	ВОР; гомогенизированная ткань [248]
	633	1,400 (0,006)	
Желудок человека			
Мышечная ткань Слизистая Цельный	456–1064	1,39	Работа [1281]
	456–1064	1,38	
	456–1064	1,38	
Тонкий кишечник свиньи	488	1,391 (0,002)	ЛР [1357]
	632,8	1,373 (0,002)	
	1079,5	1,361 (0,003)	
	1341,4	1,359 (0,004)	
Спинномозговая жидкость человека			
	400–700	1,335	Работа [87]
Брыжейка крысы Брыжейка крысы *	400–700	1,52 (0,01)	Работа [87]
	400–700	1,38 (0,1)	

Таблица 7.6 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	n , n_g	Примечания
Брыжейка крысы	850	1,4245 ($T = 25$ °C) 1,4239 ($T = 30$ °C) 1,4223 ($T = 35$ °C) 1,4216 ($T = 38$ °C) 1,4186 ($T = 40$ °C) 1,4027 ($T = 42$ °C) 1,4016 ($T = 44$ °C) 1,4000 ($T = 46$ °C) 1,3986 ($T = 48$ °C)	ОКТ; несколько кусочков брыжейки крысы, состоящих, в основном, из фосфолипидных двойных слоев; фазовый переход «гель-жидкость» в области от 38 до 42 °C [1361]
Глаз человека			
Водянистая влага	400–700	1,336	Работа [87]
Роговица: цельная волокна базовое вещество	400–700 400–700 400–700	1,376 1,47 1,35	
Хрусталик: поверхность центр	400–700 400–700	1,386 1,406	
Стекловидное тело	400–700	1,336	
Слезная жидкость	400–700	1,3361–1,3379	
Склера	442–1064	1,47–1,36	Работа [1281]

Таблица 7.6 (продолжение)

Бютокань	λ , нм	n , n_g	Примечания	
Роговица				
Человек: фибриллы основной материал	589 589	1,411 (0,004) 1,365 (0,009)	Измерения на рефрактометре Аббе и расчеты на основе данных рентгеновской дифракции [771]	
Бык: фибриллы основной материал	589 589	1,413 (0,004) 1,357 (0,009)		
Кролик: фибриллы основной материал	589 589	1,416 (0,004) 1,357 (0,010)		
Форель: фибриллы основной материал	589 589	1,418 (0,004) 1,364 (0,009)		
Бык				
Строма	589	1,375		Данные из работ [772, 773]
Гидратированные фибриллы	589	1,413		
Гидратированный внефибрилярный матрикс	589	1,359		
Сухой коллаген	589	1,547		
Сухой внефибрилярный материал	589	1,485		
Растворитель (раствор солей)	589	1,335		
Гидратированная строма	589	1,335 + 0,04/ (0,22 + 0,24H)	H = 3–8, H = 3,2 — физиологическая гидратация [772]	

Таблица 7.6 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	n , n_g	Примечания
Роговица теленка: норма гидратированная ($H = 1,5-5$): $n_g(H) = a + b/(H + 1)$	820	$n_g = 1,380$ (0,001) $a = 1,324$ (0,002) $b = 0,272$ (0,009)	ОКТ, метод опорного зеркала; $H = 5,3 \cdot d - 0,67$, d — толщина стромы роговицы в мм [1413]
	820		
	550	1,3771	Обстфельд, 1982, из работы [1415]
	589	1,380 (0,005)	Пател и др., 1995, из работы [1415]
	855	$n_g = 1,3817$ (0,0021)	ОКТ [1414]
Роговица человека	1270	$n_g = 1,389$ (0,004)	ОКТ, 21 °С [1415]
	1270	$n_g = 1,386$	ОКТ, экстраполяция для 550 нм [1415]
	1270	$n_g = 1,390$ (0,005)	ОКТ, экстраполяция для 589 нм [1415]
	1270	$n_g = 1,3838$ (0,0021)	ОКТ, экстраполяция для 855 нм [1415]
Зуб человека			
Эмаль Эмаль Апатит	220	1,73	Работа [87]
	400–700	1,62	
	400–700	> 1,623	
Дентиновый матрикс	Видимый свет	1,553 (0,001)	Метод оптической иммерсии [1403]
Эмаль Дентин	856	$n_g = 1,62$ (0,02)	ОКТ, метод опорного зеркала [635]
	856	$n_g = 1,50$ (0,02)	
Эмаль Дентин	850	$n_g = 1,65$	ОКТ [1408]
	850	$n_g = 1,54$	
Ноготь человека *	850	$n_g = 1,51$	ОКТ [1408]

Таблица 7.6 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	n , n_g	Примечания
Волос человека			
Бронет	850	$n_g = 1,59$ (0,08)	ОКТ [1406]
Шатен	850	$n_g = 1,58$ (0,06)	
Рыжий	850	$n_g = 1,56$ (0,01)	
Блондин	850	$n_g = 1,57$ (0,01)	
Седеющий	850	$n_g = 1,58$ (0,01)	
Седой	850	$n_g = 1,58$ (0,01)	
Пряди волос человека	400–600	1,45 (304 нм, 0,6%)	Эллипсометрия, значения зависят от толщины слоя шероховатости поверхности кутикулы (от 304 до 359,7 нм) и включений воздуха (от 0,6 до 5,7%) [1422]
	400–600	1,46 (299,5 нм, 0,1%)	
	400–600	1,47 (308,7 нм, 0,8%)	
	400–600	1,46 (273,7 нм, 2,2%)	
	400–600	1,50 (327,5 нм, 4,7%)	
	400–600	1,50 (359,7 нм, 5,7%)	
	400–600		
Цельная кровь человека			
	633	1,400 (0,006)	ВОР [248]
	488	1,395 (0,003)	ЛР [1357]
	632,8	1,373 (0,004)	
	1079,5	1,363 (0,004)	
	1341,4	1,360 (0,005)	
Цельная кровь человека:			
0 %-й водный раствор	633	1,34	Равносторонняя полая призма [1354]
20 %-й водный раствор	633	1,35	
40 %-й водный раствор	633	1,35	
60 %-й водный раствор	633	1,36	
Неразбавленная кровь (экстраполяция)	633	1,38	

Таблица 7.6 (продолжение)

Биоткань	λ , нм	n , n_g	Примечания
Плазма человека	488	1,350 (0,002)	ЛР [1357]
	632,8	1,345 (0,002)	
	1079,5	1,332 (0,003)	
	1341,4	1,327 (0,004)	
Эритроциты человека (сухие): Норма ($n = 7$, фиксированные эритроциты) Диабет ($n = 9$, фиксированные эритроциты) Норма ($n = 7$, интактные эритроциты) Диабет ($n = 9$, интактные эритроциты)	550	1,61–1,66	Поляризационно-интерференционный микроскоп Номерского; рН = 6–8 [1389]
	550	1,56–1,62	
	550	1,57–1,61	
	550	1,61–1,64	
Гемоглобин			
Оксигенированный (из крови свиньи) Дезоксигенированный (из крови свиньи)	800	1,392 (0,001)	ОКТ; 37 °С, гемоглобин 93 г/л [1362]
	800	1,388 (0,002)	
Гликированный (глюкоза, 40–400 мг/дл) Гликированный (глюкоза, 400–800 мг/дл)	820	1,382 → 1,415	ОКТ, гемоглобин 140 г/л [1388]
	820	1,415 → 1,385	
Гемоглобин (человека, оксигенированный)	250	1470 (0,03)	Измерения френелевского отражения, спектрометр с ИС; гемоглобин 287 г/л; данные представлены авторами работ [1379,1380]
	300	1,441 (0,03)	
	400	1,409 (0,03)	
	500	1,413 (0,03)	
	589	1,406 (0,03)	
	700	1,404 (0,03)	
	800	1,400 (0,03)	
	900	1,401 (0,03)	
	1000	1,401 (0,03)	
1100	1,400 (0,03)		

Таблица 7.6 (продолжение)

Бюتكань	λ , нм	n , n_g	Примечания	
	250	1,435 (0,03)	Измерения френелевского отражения, спектрометр с ИС; гемоглобин 165 г/л; данные представлены авторами работ [1379,1380]	
	300	1,405 (0,03)		
	400	1,383 (0,03)		
	500	1,383 (0,03)		
	589	1,375 (0,03)		
	700	1,374 (0,03)		
	800	1,370 (0,03)		
	900	1,369 (0,03)		
	1000	1,370 (0,03)		
	1100	1,369 (0,03)		
	250	1,416 (0,03)		Измерения френелевского отражения, спектрометр с ИС; гемоглобин 104 г/л; данные представлены авторами работ [1379,1380]
	300	1,389 (0,03)		
	400	1,367 (0,03)		
	500	1,363 (0,03)		
	589	1,357 (0,03)		
	700	1,356 (0,03)		
	800	1,353 (0,03)		
	900	1,352 (0,03)		
	1000	1,353 (0,03)		
1100	1,352 (0,03)			
	250	1,398 (0,03)	Измерения френелевского отражения, спектрометр с ИС; гемоглобин 46 г/л; данные представлены авторами работ [1379,1380]	
	300	1,373 (0,03)		
	400	1,354 (0,03)		
	500	1,348 (0,03)		
	589	1,343 (0,03)		
	700	1,341 (0,03)		
	800	1,338 (0,03)		
	900	1,338 (0,03)		
	1000	1,338 (0,03)		
	1100	1,337 (0,03)		
	633	1,3750 (0,0003)	Рефрактометр Аббе [1380]; гемоглобин 165 г/л	
	633	1,3600 (0,0003)		Рефрактометр Аббе [1380]; гемоглобин 104 г/л

Таблица 7.6 (окончание)

Биоткань	λ , нм	n , n_g	Примечания
Коллаген (типа I): сухой полностью гидратированный	850	$n_g = 1,53$ (0,02)	ОКТ [1404]
	850	$n_g = 1,43$ (0,02)	
Цитоплазма	400–700	1,350–1,367	Работа [87]
Ядра клеток эпителия шейки матки: Норма: Базальные/парабазальные клетки	Красный/ БИК	n (Δn) 1,387 (0,004–0,007)	Гистология, цитометрия и моделирование; 20 ядер анализировались в каждом случае; Δn – пространственные флуктуации показателя преломления [422]
Промежуточные		1,372 (0,004–0,006)	
Поверхностные	Красный/ БИК	1,414 (0,005–0,008)	
Интраэпителиальная цервикальная неоплазия (ИЦН 3): Базальные/парабазальные клетки	Красный/ БИК	1,426 (0,008–0,010)	
	Красный/ БИК	1,404 (0,007–0,009)	
Промежуточные	Красный/ БИК	1,431 (0,008–0,011)	
Поверхностные	Красный/ БИК		

Измерения преломляющей способности ряда сильно рассеивающих биотканей и крови были выполнены на длине волны 633 нм при помощи волоконно-оптического рефрактометра, схематически показанного на рис. 7.9 [248]. Метод измерения основан на простом факте, что световой конус, выходящий из оптического ВС, зависит от показателей преломления вещества оболочки и сердцевины (кварц) ВС, а также среды, куда световой конус выходит. Оболочка ВС с диаметром сердцевины 1 мм частично удалялась и вместо нее служила исследуемая биоткань, показатель преломления которой нужно было измерить. Свет проходя этот участок, выходил по сердцевине в окружающее воздушное пространство. При известных показателях преломления для воздуха (n_0) и кварцевой сердцевины (n_q), наряду с распределением интенсивности выходящего света по углам (θ), измеряемого на выходе ВС, из выражения для числовой апертуры ВС можно вывести следующую формулу для определения показателя преломления биоткани (\bar{n}) [248]:

$$\bar{n} = \left\{ n_q^2 - [n_0 \sin \theta]^2 \right\}^{1/2}. \quad (7.30)$$

С применением этого простого, но достаточно чувствительного метода, было обнаружено, что наибольшим показателем преломления (1,455) обладает жировая ткань, затем идет ткань почки (1,418), мышечная ткань (1,410), кровь и селезенка (1,400) [248]. Наименьший показатель преломления был найден у ткани легких и печени (1,380 и 1,368, соответственно) [248]. Оказалось также, что гомогенизация биоткани не влияет существенно на показатель преломления (изменение не превосходит ошибку измерений, равную 0,006), в то время как коагулированная биоткань имеет более высокие показатели преломления, чем нативная (например, для яичного белка \bar{n} меняется от 1,321 до 1,388). Более того, имеется тенденция к убыванию показателя преломления с ростом длины волны от 390 до 700 нм (например, для мышечной ткани быка в пределах от 1,42 до 1,39), что также характерно для большинства небиологических веществ.

Экспериментальные значения среднего показателя преломления для некоторых биотканей, измеренные на отдельных длинах волн, представлены в табл. 7.6.

Принцип полного внутреннего отражения при освещении лазерным пучком также используется для измерений рефракции биотканей и крови [1357, 1358, 1375–1378]. Схема лазерного рефрактометра показана на рис. 7.10 [1357]. Тонкий слой биоткани служит прослойкой между двумя прямоугольными призмами, изготовленными из стекла ZF5 с высоким показателем преломления $n_0 = 1,70827$ с углом $\alpha = 29^\circ 55' 41,4''$. Для падающего лазерного пучка, поляризованного в S -плоскости, справедливо следующее выражение для среднего показателя преломления биоткани [1357]:

$$\bar{n} = \sin i_t \cdot \cos \alpha + \sin \alpha \cdot [n_0^2 - \sin^2 i_t]^{1/2}, \quad (7.31)$$

где угол падения i_t , соответствующий полному внутреннему отражению, является измеряемым параметром.

Результаты измерений, выполненных авторами работы [1357] для образцов свежих биотканей животных и крови человека на четырех лазерных длинах волн 488, 632,8, 1079,5 и 1341,4 нм при комнатной температуре, были представлены в виде дисперсионного уравнения Коши как

$$\bar{n} = A + B \cdot \lambda^{-2} + C \cdot \lambda^{-4}, \quad (7.32)$$

где длина волны λ выражена в нанометрах, значения коэффициентов Коши представлены в табл. 7.7. Измеренные средние значения со стандартными отклонениями для четырех длин волн представлены в табл. 7.6. Образцы мышечной ткани свиньи

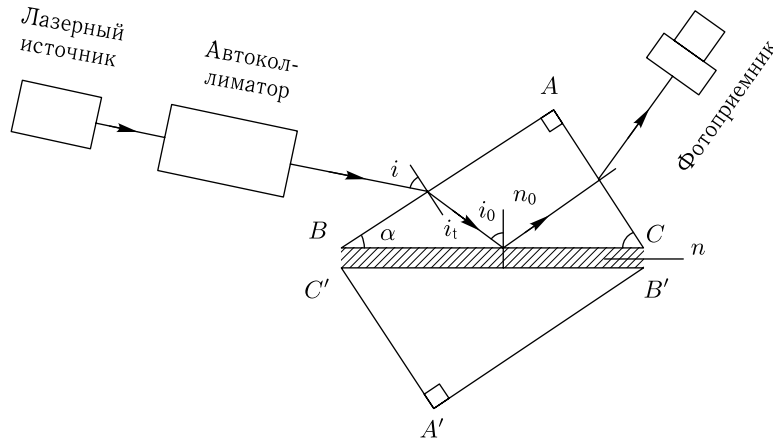


Рис. 7.10. Схема лазерного рефрактометра на основе принципа полного внутреннего отражения [1357]

Значения коэффициентов Коши в дисперсионном уравнении (7.32) [1357] Таблица 7.7

Биоткань	A	$B \cdot 10^{-3}$	$C \cdot 10^{-9}$
Мышечная ткань свиньи $_{\parallel}$	1,3694	0,073223	1,8317
Мышечная ткань свиньи $_{\perp}$	1,3657	1,5123	1,5291
Жировая ткань свиньи	1,4753	4,3902	0,92385
Тонкий кишечник	1,3563	4,3905	0,92379
Мышечная ткань овцы $_{\parallel}$	1,3716	5,8677	0,43999
Мышечная ткань овцы $_{\perp}$	1,3682	8,7456	-0,16532
Цельная кровь человека	1,3587	1,4744	1,7103
Плазма крови человека	1,3194	14,578	-1,7383

(или овцы), помеченные значками \parallel и \perp , — это одни и те же образцы с волокнами, ориентированными параллельно и перпендикулярно границе раздела соответственно.

Выражение для показателя преломления плазмы крови человека, полученное в работе [1357], было экстраполировано на диапазон длин волн от 400 до 1000 нм в виде [1009, 1359]:

$$n_{bp}(\lambda) = 1,3254 + 8,4052 \cdot 10^3 \lambda^{-2} - 3,9572 \cdot 10^8 \lambda^{-4} - 2,3617 \cdot 10^{13} \lambda^{-6}. \quad (7.33)$$

Для моделирования поведения показателя преломления биоткани, крови и их компонентов можно использовать замечательное свойство белков: все водные растворы различных белков равных концентраций имеют примерно одинаковый показатель преломления n_{pw} [1360]. Более того, показатель преломления меняется почти линейно с ростом концентрации C_p :

$$n_{pw}(\lambda) = n_w(\lambda) + \beta_p(\lambda) \cdot C_p, \quad (7.34)$$

где n_w — показатель преломления воды, а β_p — удельный коэффициент рефракции белка; C_p измерено в граммах на 100 мл (г/дл). Например, показатель преломления цитоплазмы эритроцита человека, определяемый внутриклеточным раствором

гемоглобина, можно найти из этого уравнения при $\beta_p = 0,001942$ для длины волны 589 нм; т. е. при нормальной концентрации гемоглобина в цитоплазме 300–360 г/л показатель преломления эритроцита $n_{RBC} = 1,393–1,406$ [48]. Поскольку коэффициент рассеяния крови, который определяется главным образом показателем преломления гемоглобина, незначительно зависит от длины волны в диапазоне 580–800 нм [48], это значение β_p можно использовать для оценки показателя преломления растворов гемоглобина и в ближнем ИК-диапазоне. Значения удельного коэффициента рефракции β_p для других белков, измеренные с помощью рефрактометра Аббе на длине волны 589 нм представлены в табл. 7.8 [1360]. Другими материалами, представляющими биологический интерес, являются углеводороды, липоиды и соединения нуклеиновых кислот. Первые два из них имеют низкие значения β в пределах 0,0014–0,0015, а нуклеиновые кислоты — более высокие значения 0,0016–0,0020 [1360].

Таблица 7.8
Значения инкремента удельной рефракции β_p , измеренные рефрактометром Аббе на длине волны 589 нм для белков [1360]

Белок	β_p , дл/г
Общая сыворотка крови (человека)	0,00179
Эуглобулин	0,00183
Псевдоглобулин	0,00181
Общий альбумин	0,00181
Рекристаллизованный альбумин	0,00181
Липопротейн	0,00170–0,00171
Гемоцианин: улитка (<i>Helix</i>)	0,00179
осьминог (<i>Octopus</i>)	0,00184
краб (<i>Carcinus</i>)	0,00187
Ячный альбумин	0,001813
СО гемоглобин овцы	0,001945
Глобин быка	0,00178
СО гемоглобин быка	0,00193–0,00195

Зависимость удельного коэффициента рефракции от степени оксигенации нативного раствора гемоглобина $\beta_{Hb}(\lambda)$, нормированного на показатель преломления воды $n_w(\lambda)$ (см. формулу (7.34)), представлена в табл. 7.9 [1380]. Ошибка измерений, которая включает ошибку определения концентрации гемоглобина и показателя преломления, составляет $\pm 0,00003$. Следовательно, можно получить средний постоянный нормированный удельный коэффициент рефракции, равный $(\beta_{Hb}/n_w) = 0,00199$ дл/г для спектральных областей 310–355 нм и 500–1100 нм, поскольку стандартное отклонение усредненного значения (β_{Hb}/n_w) в этих областях равно $\pm 0,000036$ и находится в тех же пределах, что и ошибка определения (β_{Hb}/n_w) для фиксированной длины волны.

Спектральные зависимости показателя преломления окси- и дезоксигемоглобина в диапазоне длин волн 450–820 нм были получены в работе [1391]. Эти и более поздние работы [225, 1325, 1362, 1393, 1394] используют спектральные измерения поглощения (см. рис. 7.11) и преобразование полученной мнимой части комплексного показателя преломления (см. соотношения (3.16) и (3.17)) в его действительную

Таблица 7.9

Зависящие от длины волны значения инкремента удельной рефракции гемоглобина $\beta_{\text{Hb}}(\lambda)$, нормированные на показатель преломления чистой воды $n_w(\lambda)$ (см. формулу (7.34)) с ошибкой $\pm 0,00003$; раствор оксигенированного нативного гемоглобина; измерения френелевского отражения с использованием модифицированного спектрометра с интегрирующей сферой [1380]

Длина волны, нм	$\frac{\beta_{\text{Hb}}(\lambda)}{n_w(\lambda)}$, дл/г	Длина волны, нм	$\frac{\beta_{\text{Hb}}(\lambda)}{n_w(\lambda)}$, дл/г	Длина волны, нм	$\frac{\beta_{\text{Hb}}(\lambda)}{n_w(\lambda)}$, дл/г	Длина волны, нм	$\frac{\beta_{\text{Hb}}(\lambda)}{n_w(\lambda)}$, дл/г
250	0,002210	350	0,001989	450	0,002156	620	0,001964
260	0,002105	360	0,001983	460	0,002109	640	0,001954
270	0,002048	370	0,001860	470	0,002078	680	0,001970
280	0,002044	380	0,001774	480	0,002056	760	0,001958
290	0,002047	390	0,001694	490	0,002033	800	0,001939
300	0,002020	400	0,001664	500	0,002005	840	0,001935
310	0,001998	410	0,001799	520	0,001983	900	0,001998
320	0,002007	420	0,002117	540	0,001981	980	0,002017
330	0,002021	430	0,002273	560	0,001992	1060	0,002040
340	0,002010	440	0,002210	580	0,002004	1100	0,002056

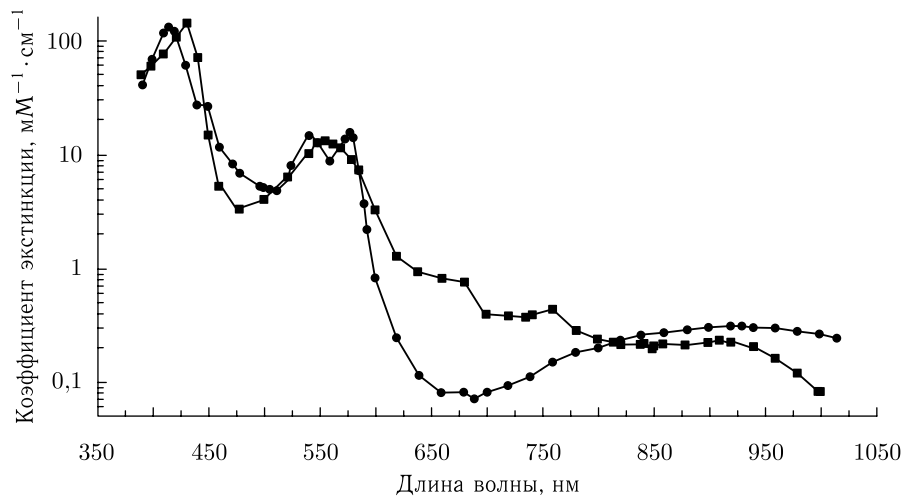


Рис. 7.11. Спектры поглощения деокси- и оксигемоглобина: \blacksquare — ε_{λ}^d , рН = 5,5–9,5; \bullet — ε_{λ}^o , рН = 5,5–10,0 [1311]

часть с использованием соотношений Крамерса–Кронига [225, 1325, 1362, 1391, 1393–1395]. Эти соотношения вытекают из принципа причинности, который требует, чтобы действительная и мнимая части комплексного показателя преломления получались друг из друга преобразованием Гильберта как

$$\begin{aligned} n'(\tilde{\nu}) - 1 &= \text{Hi}[n''(\tilde{\nu})], \\ n''(\tilde{\nu}) &= \text{Hi}^{-1}[n'(\tilde{\nu}) - 1], \end{aligned} \quad (7.35)$$

где $\tilde{\nu} = 1/\lambda$. Таким образом, исходная формула для определения $n'(\lambda)$ на основе измерения $\mu_a(\lambda) = (4\pi/\lambda)n''(\lambda)$ выглядит как

$$n'(\tilde{\nu}) = 1 + \frac{2}{\pi} \int_0^{\infty} \frac{n''(\tilde{\nu}')\tilde{\nu}' d\tilde{\nu}'}{(\tilde{\nu}')^2 - (\tilde{\nu})^2}. \quad (7.36)$$

Из этого соотношения следует, что для вычисления показателя преломления для одной длины волны $\lambda = 1/\tilde{\nu}$ нужно знать спектр поглощения во всем интервале $[0, \infty]$, что является проблемой. Другая проблема состоит в проведении интегрирования в окрестности интересующей нас длины волны. Для преодоления этих трудностей можно определить подходящие граничные условия для конечного интеграла, а также использовать аналитическое продолжение экспериментальных данных перед интегрированием, либо разложение экспериментальных данных в ряд [225, 1325, 1362, 1391]. Для численного интегрирования в уравнении (7.36) необходимо выбрать нужный шаг интегрирования и симметричную область вокруг интересующего нас значения $\tilde{\nu} = 1/\lambda$ [1362, 1391]. При использовании метода разложения в ряд спектр n'' можно представить как сумму нескольких функций, имеющих пики, обычно гауссовой или лоренцевой формы, которые соответствуют полосам поглощения в измеряемой спектральной области [1325, 1362]. Поскольку преобразование Гильберта линейно, спектр показателя преломления в этом случае есть просто сумма соответствующих преобразований Гильберта указанных функций. Хэммер и др. [1325] и Боровой и др. [225] использовали этот подход для определения показателя преломления эритроцитов в диапазоне длин волн от 400 до 1000 нм, а Фабер и др. [1362] проделали такой анализ в области длин волн от 250 до 1000 нм для оксигенированного и дезоксигенированного гемоглобина. Эти данные представлены на рис. 7.12.

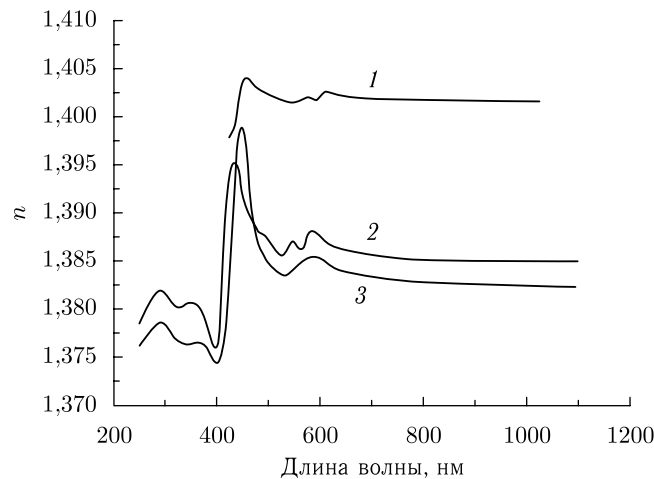


Рис. 7.12. Спектральные зависимости показателя преломления (действительная часть) для: 1 — эритроцитов, 100% оксигенация гемоглобина со средней концентрацией его в эритроцитах 340 г/л [225, 1325]; 2 — оксигенированного (100%) гемоглобина; и 3 — дезоксигенированного гемоглобина при концентрации 140 г/л, что соответствует средней концентрации гемоглобина в цельной крови [1362]

В работе [1394] показано, что использование соотношения Крамерса–Кронига при восстановлении спектральной функции показателя преломления водного раствора гемоглобина в диапазоне от 250 до 1000 нм, дает отличные результаты при

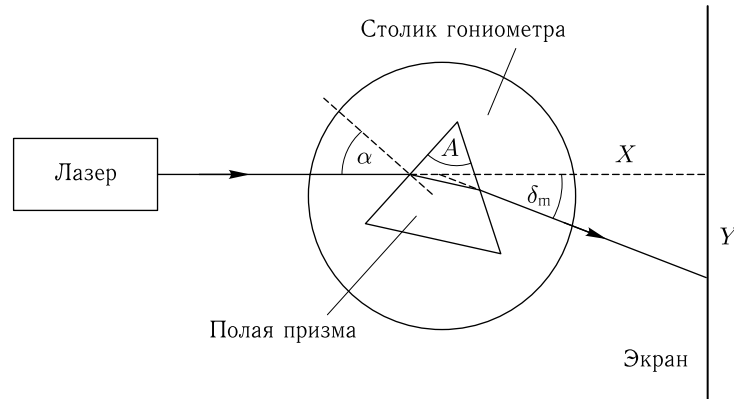


Рис. 7.13. Схема рефрактометра с полой призмой для измерения показателя преломления крови и других биологических жидкостей [1354]

обязательном учете дисперсионных свойств растворителя, в данном случае воды. Это хорошо подтвердили результаты прямых измерений показателя преломления гемоглобина [1379, 1380, 1384]. Отметим, что в работе [1384] использовался промышленный цифровой многоволновый рефрактометр DSR- α (Schmidt & HaenschTM, Германия), с девятью длинами волн, охватывающими весь видимый диапазон: 401,5, 435,8, 486,1, 546,1, 587,6, 589,3, 632,8, 656,3 и 706,5 нм. Отметим также, что при измерениях на отмытых эритроцитах влияние рассеяния света на спектральные характеристики гемоглобина значительно, однако правильный выбор геометрии эксперимента и последующая обработка данных с использованием теории Ми может существенно улучшить качество получаемой информации [1393].

Для учета вклада в дисперсию в интересующем нас диапазоне (видимом и ближнем ИК) от полос поглощения, лежащих в УФ- и дальнем ИК-диапазонах, нужно обеспечить абсолютные измерения показателя преломления по крайней мере на одной длине волны внутри исследуемого спектрального диапазона, но вдали от полос поглощения. Такие измерения могут дать опорные данные и возможны, например, с применением рефрактометра Аббе для растворов гемоглобина или метода ОКТ для цельной крови [1362, 1384, 1387, 1388]. Другой метод, в принципе позволяющий измерить показатель преломления крови и других биологических жидкостей на нескольких отдельных длинах волн, схематически показан на рис. 7.13. В этом методе в качестве рефрактометра используется равнобедренная полая призма с малым углом (10 град), склеенная из тонких кварцевых пластинок, а в качестве рабочего алгоритма следующее выражение для вычисления показателя преломления [1354]:

$$n = \frac{\sin\left(\frac{A + \delta_m}{2}\right)}{\sin\left(\frac{A}{2}\right)}, \quad (7.37)$$

где A — угол при вершине призмы, а δ_m — угол минимального отклонения.

Поляризационный интерференционный микроскоп Номарского успешно использовался для измерений показателя преломления фиксированных и интактных высушенных эритроцитов, взятых у здоровых людей и больных диабетом [1389]. Было показано, что для интактных эритроцитов при физиологическом рН = 7,3 гипергликирование гемоглобина приводит к более высокому показателю преломления, в максимуме он возрастал от 1,55 до 1,65 для больных диабетом. Сначала рост, затем

последующее насыщение зависимости и даже некоторое уменьшение показателя преломления растворов гемоглобина или цельной крови с увеличением концентрации глюкозы были обнаружены в ходе измерений методом ОКТ [1387, 1388]. Результаты для раствора гемоглобина при концентрации 140 г/л, характерной для крови при нормальных физиологических условиях, показаны на рис. 7.14.

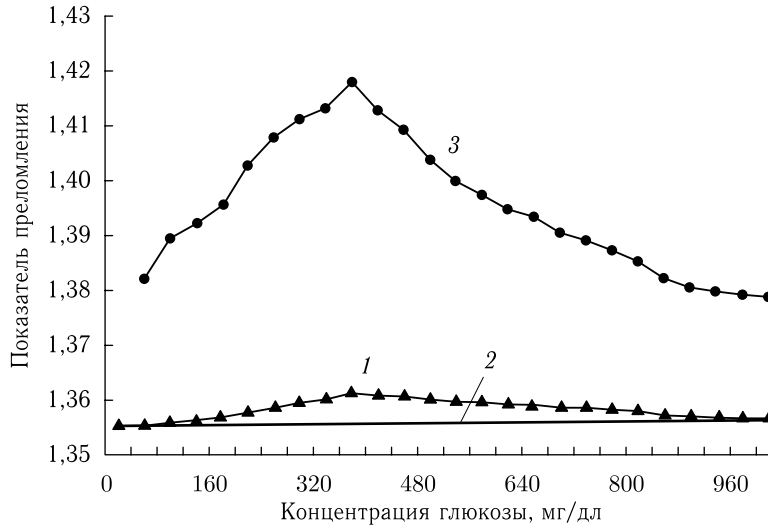


Рис. 7.14. Экспериментальные и реконструированные данные по изменению показателя преломления гемоглобина человека при увеличении концентрации глюкозы в растворе [1388]. ОСТ-рефрактометр работает на средней длине волны 820 нм, концентрация гемоглобина 140 мг/л при pH = 7,3. 1 — Исходные данные; 2 — данные, рассчитанные с помощью соотношений (7.38) и (7.39) для не взаимодействующих гемоглобина и глюкозы; 3 — реконструированный на основе соотношения (7.40) показатель преломления гликированной фракции гемоглобина

Согласно соотношению (7.34), начальный показатель преломления раствора гемоглобина с концентрацией 140 г/л в воде с нулевой концентрацией глюкозы на длине волны 820 нм должен составлять $n_{\text{Hb}140} = 1,355$. При оценке вклада глюкозы в средний показатель преломления раствора в предположении отсутствия взаимодействия гемоглобина с молекулами глюкозы взвешенное среднее значение показателя преломления (см. формулу (3.2)) раствора глюкозы в воде, n_{glw} , и гемоглобина, n_{Hb} , вычисляется по формуле

$$n_{\text{Hb} + \text{gl}} = f_{\text{glw}} n_{\text{glw}} + (1 - f_{\text{glw}}) n_{\text{Hb}}, \quad (7.38)$$

где f_{glw} — объемная доля раствора глюкозы. В экспериментах объемная доля раствора глюкозы поддерживалась постоянной и равной $f_{\text{glw}} = 0,86$, что соответствует концентрации гемоглобина 140 г/л (14%). В этом уравнении присутствует показатель преломления сухого гемоглобина n_{Hb} . Значение n_{glw} можно вычислить с помощью выражения [238, 467, 468]:

$$n_{\text{glw}} = n_{\text{w}} + 1,515 \cdot 10^{-6} \cdot C_{\text{gl}}, \quad (7.39)$$

где C_{gl} — концентрация глюкозы в мг/дл. Поскольку n_{w} можно найти для длины волны 820 нм из выражения (6.5) как $n_{\text{w}} = 1,328$, а C_{gl} известно, то n_{glw} можно вычислить для каждой концентрации глюкозы.

Показатель преломления гемоглобина n_{Hb} можно вычислить с помощью выражений (7.34) и (7.38), когда концентрация глюкозы равна нулю. Из выражения (7.34) следует, что $n_{\text{Hb}140} = 1,355$, тогда из выражения (7.38), $n_{\text{Hb}140} = f_w n_w + (1 - f_w) n_{\text{Hb}}$, и для $f_w = 0,86$ и $n_w = 1,328$, $n_{\text{Hb}} = 1,521$, что вполне коррелирует с экспериментальными данными по показателю преломления сухих эритроцитов крови здорового человека [1389]. Следовательно, $n_{\text{Hb}+gl}$ можно найти для раствора с различной концентрацией глюкозы и постоянной концентрацией гемоглобина. Как следует из выражения (7.38), средний показатель преломления для невзаимодействующих молекул при увеличении концентрации глюкозы в 10 раз (от 40 до 400 мг/дл) вызывает лишь небольшое линейное увеличение показателя преломления от 1,355 до 1,356 (см. линейную зависимость 2 на рис. 7.14).

Напротив, экспериментальные данные показывают, что показатель преломления раствора гемоглобина при увеличении концентрации глюкоза от 40 до 400 мг/дл меняется более эффективно, а именно от 1,355 до 1,361 (кривая 1 на рис. 7.14). Такой характер зависимости, а именно существенное увеличение показателя преломления, насыщение зависимости и последующий ее спад, можно отнести на счет взаимодействия молекул глюкозы и гемоглобина, когда возникают различные формы гликированного гемоглобина с новыми молекулярными структурами и оптическими свойствами [1396]. Объемная доля гликированного гемоглобина (GHb) в крови больных диабетом линейно зависит от средней концентрации свободной глюкозы в плазме крови (MBG) и описывается следующим эмпирическим выражением [1396]:

$$f_{\text{GHb}} = 2,7 \cdot 10^{-4} \text{ MBG (мг/дл)} + 0,058. \quad (7.40)$$

Это соотношение позволяет реконструировать показатель преломления гликированной части полного гемоглобина с использованием общего соотношения (7.38). Окончательный результат этой реконструкции представлен кривой 3 на рис. 7.14. Для понимания поведения показателя преломления гликированного гемоглобина можно использовать классическую теорию дисперсии в конденсированной среде. Эта теория дает следующую формулу для показателя преломления [1397]:

$$n = 1 + \alpha N \frac{q^2}{M}, \quad (7.41)$$

где α — коэффициент, зависящий от длины волны, N — число молекул, q и M — заряд и масса заряда молекулы, способного к колебаниям на частоте собственных колебаний под действием света. Из этого уравнения следует, что показатель преломления гемоглобина является квадратичной функцией заряда и обратно пропорционален массе заряда молекулы. Каждый белок имеет несколько различных боковых групп (R), которые определяют заряд молекулы. Как следует из работы [1389], заряд R -группы молекулы гемоглобина может быть увеличен при связывании глюкозы, но одновременно при гликировании возможно увеличение массы заряда гемоглобина, что уменьшает показатель преломления. Эти факты, по-видимому, могут объяснить изменения показателя преломления, полученные в экспериментах. При концентрациях глюкозы от 40 до 200–300 мг/дл влияние увеличения заряда R -группы молекул гликированного гемоглобина больше, чем увеличения массы заряда, и показатель преломления растет. При концентрациях глюкозы выше 200–300 мг/дл из-за существенного роста M и насыщения заряда зависимость показателя преломления насыщается и даже спадает с ростом концентрации глюкозы.

На изменения показателя преломления могут также влиять некоторые другие факторы, такие как насыщение гемоглобина кислородом (см. рис. 7.13) [1361, 1362] и/или возрастание сродства гемоглобина к кислороду при увеличении концентрации

глюкозы (увеличение сродства до 200% было обнаружено авторами работы [1398] при концентрации глюкозы порядка 15–20 мМ).

Поскольку показатель преломления компонентов биоткани и крови определяет их рассеивающие свойства, измерения параметров рассеяния могут быть использованы для оценки показателей преломления компонентов биоткани и крови и их средних значений [1292, 1310, 1368–1373, 1383, 1386, 1393, 1399–1401]. Обсудим это более детально [1399]. Для монодисперсной системы сферических рассеивателей приведенный коэффициент рассеяния можно описать следующим выражением, записанным в более общем виде, чем выражение (7.27):

$$\mu'_s = N_0 \pi a F(f_s) Q_s(n_s, n_0, a, \lambda) (1 - g), \quad (7.42)$$

где N_0 — число рассеивающих частиц в единице объема, a — их радиус, $F(f_s)$ — функция, учитывающая плотность упаковки частиц, f_s — объемная доля рассеивающих частиц, n_s — их показатель преломления, n_0 — показатель преломления базового материала, λ — длина волны, а Q_s и g — факторы эффективности и анизотропии рассеяния, рассчитываемые по теории Ми [129, 212, 214].

Определение приведенного коэффициента рассеяния образца биоткани на основе измерений, например методом интегрирующей сферы, и использования соответствующих инверсных алгоритмов (обратный метод добавления–удвоения или Монте-Карло), а также оценка среднего радиуса и показателя преломления рассеивателей на одной из длин волн, позволяют решить обратную задачу и реконструировать спектральную зависимость показателя преломления рассеивателей при заданной спектральной зависимости показателя преломления базового материала [1399]. Аналогичные измерения и теоретические оценки, проделанные для образца биоткани до и после продолжительного выдерживания в физиологическом растворе или другой биологически совместимой жидкости с известными оптическими характеристиками, позволяют рассчитать спектральные зависимости показателя преломления как рассеивателей, так и базового материала.

Рассмотрим несколько примеров. Основными рассеивателями в склере глаза человека являются длинные коллагеновые волокна, имеющие широкий разброс диаметров со средним значением 100 нм. Волокна квазислучайным образом упорядочены в пучки (см. гл. 3) [769, 1402]. Характерная структура распределения по размерам и многочисленные пересечения пучков волокон позволяют приближенно описать эту рассеивающую систему как монодисперсную систему сферических рассеивателей с эквивалентным радиусом Ми, равным 250 нм, и одинаковыми спектральными свойствами материала. Аналогичный подход был использован при нахождении эквивалентного радиуса Ми рассеивателей, формирующих спектр отражения *in vivo* кожи, рассеивающие свойства которой определяются дермой, также состоящей из квазислучайно упорядоченных пучков волокон (фиброзная соединительная ткань) (см. соотношения (3.31) и (3.32)).

С использованием экспериментально найденной спектральной зависимости приведенного коэффициента рассеяния и с учетом длительного помещения образца склеры в физиологический раствор, в результате чего интерстициальная жидкость была замещена физиологическим раствором, показатель преломления которого почти такой же, как у воды, была реконструирована спектральная зависимость показателя преломления рассеивателей [1292, 1400]. Для реконструкции использовалась спектральная зависимость для воды, описываемая соотношением (6.5). Окончательным результатом реконструкции явилась приближенная формула для расчета показателя

преломления материала эффективных рассеивателей склеры в спектральном диапазоне от 400 до 800 нм:

$$n_s(\lambda) = 1,4389 + 1,5880 \cdot 10^4 \lambda^{-2} - 1,4806 \cdot 10^9 \lambda^{-4} + 4,3917 \cdot 10^{13} \lambda^{-6}. \quad (7.43)$$

Фактически это дисперсионное соотношение должно быть близко к спектральной зависимости показателя преломления гидратированного коллагена, поскольку 75 % сухого веса склеры приходится на коллаген [769]. Рассчитанное значение показателя преломления гидратированного коллагена склеры (68 % содержания воды в строме) $n = 1,474$ [238], соответствующее прямым измерениям рефракции для склеры на длине волны 589 нм [769], хорошо согласуется со значением, вычисленным с помощью полуэмпирического соотношения (7.43).

Аналогичный анализ экспериментальных данных по рассеивающим свойствам кожи человека в спектральном диапазоне от 400 до 700 нм позволяет реконструировать спектральные зависимости показателей преломления как материала эффективных рассеивателей $n_{ss}(\lambda)$, так и базового материала (интерстициальной жидкости) $n_{si}(\lambda)$ [1292]:

$$n_{ss}(\lambda) = 1,4776 - 1,7488 \cdot 10^4 \lambda^{-2} + 6,7270 \cdot 10^9 \lambda^{-4} - 3,3390 \cdot 10^{14} \lambda^{-6}, \quad (7.44)$$

$$n_{si}(\lambda) = 1,3510 + 2,1342 \cdot 10^3 \lambda^{-2} + 5,7893 \cdot 10^8 \lambda^{-4} - 8,1548 \cdot 10^{13} \lambda^{-6}. \quad (7.45)$$

Используя закон Глэдстоуна и Дейла (3.1) и эти выражения, можно получить дисперсионную формулу для кожи в виде [1292]

$$n_{skin}(\lambda) = 1,3090 - 4,3460 \cdot 10^2 \lambda^{-2} + 1,6065 \cdot 10^9 \lambda^{-4} - 1,2811 \cdot 10^{14} \lambda^{-6}. \quad (7.46)$$

Это более точная формула для показателя преломления кожи, чем формула (7.29), которая была получена из простейших предположений о модели кожи как смеси воды и белка с показателем преломления, не зависящим от длины волны.

Для оптики биотканей важно знать дисперсионные свойства меланина, который содержится в коже, волосах, склере и радужной оболочке глаза, а также других биотканях. Гранулы меланина являются основными рассеивающими назад частицами, которые влияют на сигнал ОКТ и спектры отражения, снятые от поверхности кожи с высоким пространственным разрешением. Спектроскопические исследования водных суспензий меланина и определение среднего радиуса частиц посредством электронной микроскопии позволяют решить обратную задачу и реконструировать зависимость показателя преломления от длины волны для частиц меланина в диапазоне от 350 до 800 нм [1292, 1401]:

$$n_M(\lambda) = 1,6840 - 1,8723 \cdot 10^4 \lambda^{-2} + 1,0964 \cdot 10^{10} \lambda^{-4} - 8,6484 \cdot 10^{14} \lambda^{-6}. \quad (7.47)$$

Оригинальный метод для измерения показателя преломления дентина зуба, основанный на оптической иммерсии и использующий тубулярную структуру дентина, был предложен в работе [1403]. Образцы дентина свежераспиленного зуба после обработки с удалением органических компонентов внутри тубул заливались иммерсионными жидкостями с различными показателями преломления. Показатель преломления жидкости подбирался таким образом, чтобы рассеяние света образцом было минимально. Это значение и принималось за усредненный показатель преломления материала межтубулярного пространства дентина зуба, который оказался равным, $n_0 = 1,553 \pm 0,001$ для видимой области спектра.

Другой метод, основанный на измерении временной задержки сверхкоротких оптических импульсов, был использован для оценки показателя преломления здоровой и опухолевой (злокачественной) ткани молочной железы [31]. Для известной толщины образца биоткани измерение временного сдвига Δt пика прошедшего биотканью

импульса, по сравнению с временной задержкой этого импульса в слое воздуха той же толщины, можно вычислить средний фазовый показатель преломления \bar{n} образца биоткани. Поскольку такие сдвиги очень малы, то для измерений нужно использовать очень короткие импульсы, спектр которых уже содержит большое число длин волн, что требует учета материальной дисперсии ($d\bar{n}/d\lambda$) и введения группового показателя преломления среды

$$\bar{n}_g = \bar{n} - \lambda \left(\frac{d\bar{n}}{d\lambda} \right). \quad (7.48)$$

Временная задержка импульса в образце биоткани толщиной d равна [31]

$$\Delta t = \frac{d}{c_0} (\bar{n}_{g1} - n_{g2}), \quad (7.49)$$

где c_0 — скорость света в вакууме; \bar{n}_{g1} — эффективный (средний) групповой показатель преломления биоткани, а n_{g2} — групповой показатель преломления однородной опорной среды (воздуха). Эффективный групповой показатель преломления биоткани равен

$$\bar{n}_{g1} = f_s n_{gs} + (1 - f_s) n_{g0}, \quad (7.50)$$

где f_s — объемная доля рассеивающих частиц в биоткани, n_{gs} — групповой показатель преломления базового материала биоткани. Значения фазового показателя преломления двух образцов здоровой ($d = 0,8$ мм) и патологической ($d = 0,85$ мм) ткани молочной железы были определены как $\bar{n} = 1,403$ для здоровой и $1,431$ для злокачественной опухолевой ткани [31].

Динамические и пространственно-ограниченные ОКТ-измерения показателя преломления и коэффициентов рассеяния биотканей и крови очень важны для мониторинга физиологических изменений в живых тканях [1300–1302, 1305–1307, 1309, 1331–1341, 1361, 1362, 1387, 1388]. Основные принципы и приложения ОКТ описаны в главах 8 и 14. ОКТ обеспечивает возможность простых и прямых измерений показателя преломления как *in vitro*, так и *in vivo* [635, 1301, 1302, 1331–1341, 1361, 1362, 1387, 1388, 1404–1418]. Диапазон по глубине, в пределах которого получают ОКТ-изображения, определяется оптической длиной пути Δz_{opt} между двумя точками вдоль направления в глубь среды. Поскольку используется широкополосный источник света, оптическая длина пути пропорциональна групповому показателю преломления n_g и геометрической длине пути Δz [1282]:

$$\Delta z_{\text{opt}} = n_g \Delta z. \quad (7.51)$$

Обычно $n_g \approx n$. Это простое соотношение верно для однородной среды и может быть использовано в исследованиях *in vitro*, когда известна геометрическая толщина образца биоткани Δz .

Иногда требуется одновременно измерять и показатель преломления, и толщину образца биоткани [1405, 1407, 1413]. В этом случае в пробном плече интерферометра устанавливается стационарное зеркало и определяется его геометрическое положение в предположении, что групповой показатель преломления воздуха равен единице (z_1). Затем образец биоткани с неизвестным показателем преломления n_g и толщиной d должен быть помещен перед зеркалом в пробном плече. Появятся два пика от передней (z_2) и задней (z_3) поверхностей образца, расстояние между которыми равно оптической толщине образца (см. соотношение (7.51)), а положение зеркала

(z_4) будет сдвинуто на $(n_g - 1)d$ из-за присутствия образца, у которого групповой показатель преломления больше, чем у воздуха. Таким образом, расчет геометрической толщины и группового показателя преломления происходит следующим образом:

$$d = (z_3 - z_2) - (z_4 - z_1); \quad n_g = (z_3 - z_2)/d. \quad (7.52)$$

Для измерения *in vivo* показателя преломления биоткани был предложен [1407] и развит в работах [1301, 1302, 1408–1412] ОКТ-метод с переменным фокусом, в котором измеряется сдвиг фокуса объектива вдоль оптической оси за счет распространения света в биоткани. Для определения показателя преломления необходимо совпадение максимумов интерференционной картины с пространственным фокусом, регистрируемое как максимум сигнала. Необходимо прозондировать по крайней мере две точки в глубину биоткани для того, чтобы оценить среднее значения показателя преломления между ними. Обычно производится многошаговое измерение. Геометрическое среднее показателей преломления для волоконно-линзовой системы переменного фокуса определяется следующим выражением [1301, 1302]:

$$\tilde{n} = \sqrt{n_g n} = \frac{n_{\text{obj}}}{\sqrt{1 - \frac{\Delta z_{L1}}{\Delta z_{\text{Fiber}}}}}, \quad (7.53)$$

где n_{obj} — показатель преломления объектива в пробном плече, Δz_{L1} — изменение положения первой линзы объектива, а Δz_{Fiber} — положение торца волокна в пробном плече. Разность между фазовым и групповым показателями преломления обычно мала, всего несколько процентов, и на практике ею пренебрегают ($n_g \approx n$). Для кусочно-однородной вдоль направления в глубь среды ОКТ-характеристики необходимо оценивать ее наклон, $\Delta z_{L1}/\Delta z_{\text{Fiber}}$, при перефокусировке (при этом Δz_{L1} настраивается по максимуму сигнала).

Была также предложена бифокальная оптическая когерентная рефрактометрия, основанная на измерении разности оптических длин пути между двумя фокусами одновременно [1410, 1411]. Основным достоинством этого метода является отсутствие необходимости физически перемещать линзу объектива или образец в процессе продольного сканирования. При использовании сравнительно небольших значений числовой апертуры линзы объектива (NA) в пробном плече отношение двух разностей оптических длин пути между двумя фокусами: измеренной в среде, $\Delta z_{\text{f-opt}}$, и в воздухе, Δz_{f} , описывается выражением [1411]

$$\frac{\Delta z_{\text{f-opt}}}{\Delta z_{\text{f}}} \approx n_g n \left[1 + \frac{1}{2} (\text{NA})^2 \left(1 - \frac{1}{n^2} \right) \right]. \quad (7.54)$$

Для типичного значения показателя преломления биоткани $n = 1,4$ и $\text{NA} = 0,2$ второй член в круглых скобках составляет лишь 1% от величины всего отношения. Учитывая эту оценку, а также то, что $n_g \approx n$, можно получить значительно более простое соотношение, использованное в работе [1301]:

$$\Delta z_{\text{f-opt}} \approx n^2 \Delta z_{\text{f}}. \quad (7.55)$$

Формулы (7.51)–(7.55), полученные для оценки показателя преломления, подразумевают, что исследуемая среда однородна. Биоткани и кровь являются неоднородными средами с сильным рассеянием. Следовательно, эти соотношения должны быть модифицированы. Например, формула (7.51) должна быть модифицирована для применения к описанию динамических ОКТ-изображений образцов крови при ее седиментации (см. рис. 7.15) [1331]. Из ОКТ-изображений слоя цельной крови в процессе ее седиментации следует, что средний показатель преломления слоя уменьшается (линия, показывающая отражение от задней стенки кюветы, подни-

мается со временем и приближается к линии, показывающей верхнюю поверхность кюветы). Такое поведение можно связать с уменьшением объемного рассеяния из-за агрегации эритроцитов в процессе седиментации.

Когда показатель преломления рассеивающих частиц n_s мало отличается от показателя преломления базового вещества n_0 , рассеянное поле $\mathbf{E}_{sc}(\mathbf{r})$ в точке \mathbf{r} можно записать в виде следующего итерационного ряда [614]:

$$\mathbf{E}_{sc}(\mathbf{r}) = \alpha \mathbf{E}_1(\mathbf{r}) + \alpha^2 \mathbf{E}_2(\mathbf{r}) + \dots, \quad (7.56)$$

где

$$\alpha = \frac{n_s - n_0}{2\pi n_0}. \quad (7.57)$$

Первый член в (7.56) отвечает за акты однократного рассеяния (приближение Рэлея–Ганса), второй член — за все акты двукратного рассеяния. Значения $\mathbf{E}_{sc}(\mathbf{r})$ в направлении распространения падающего света (в положительном направлении оси z) образуют «свет, рассеянный вперед». Эта порция рассеянного света добавляется к падающей волне, слегка изменяя как ее фазу, так и амплитуду, которая может быть выражена как [614]

$$\exp \left[ik \left(z + L \frac{\Delta n}{n_0} \right) \right], \quad (7.58)$$

где $k = 2\pi/\lambda$ — волновое число, λ — длина волны в среде с показателем преломления n_0 , а L — толщина рассеивающей среды. Действительная часть величины Δn дает изменение фазы прошедшего света, так что она должна быть интерпретирована как изменение показателя преломления среды из-за рассеяния. Мнимая часть Δn приводит к экспоненциальному затуханию проходящей волны, вызванному уходом рассеянного света из проходящего потока.

Показатель преломления среды n_Σ есть [614]

$$n_\Sigma = n_0 + \Delta n = \bar{n} + \frac{\overline{n^2} - \bar{n}^2}{\bar{n}} Q(\lambda/l_c), \quad (7.59)$$

где \bar{n} определяется показателями преломления компонентов биоткани или крови (см. соотношение (3.1)); для двухкомпонентной среды эта величина равна

$$\bar{n} = f_s n_s + (1 - f_s) n_0, \quad (7.60)$$

где f_s — объемная доля рассеивающих частиц, $\overline{n^2}$ — среднее квадратичное значение флуктуаций показателя преломления, $Q(\lambda/l_c)$ учитывает форму рассеивателей и характер их агрегации, а l_c — длина корреляции случайно распределенных флуктуаций показателя преломления. В пределе больших корреляционных длин, $l_c \gg \lambda$, (крупные частицы), $Q = 1,17$, а в пределе малых l_c (рэлеевский предел) $Q = 0$. В случае, когда флуктуации (неоднородности) показателя преломления принимают форму параллельных цилиндров, $Q = 0,67$ для больших l_c .

В процессе седиментации крови формируется двухфазная система из эритроцитов и плазмы. Каждая фаза имеет собственный объем (толщину после сепарации) и показатель преломления. Обозначим зависящую от времени толщину слоя эритроцитов через $H(t)$, тогда толщина верхнего слоя чистой плазмы равна $L - H(t)$ (см рис. 7.15). Средний показатель преломления слоя толщины L , содержащего два слоя с различными показателями преломления можно записать в виде

$$n_{sed}(t) = \frac{L - H(t)}{L} \bar{n} + \frac{H(t)}{L} n_\Sigma, \quad (7.61)$$

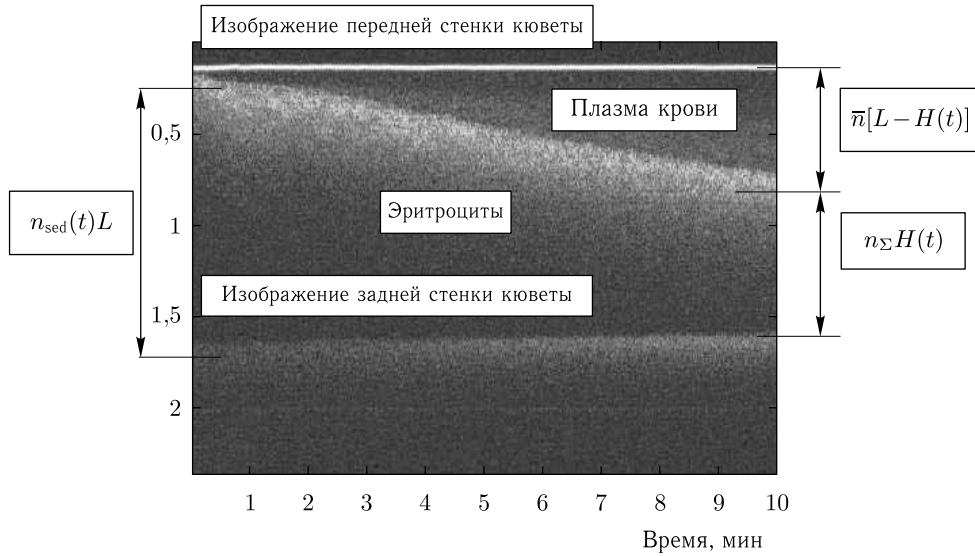


Рис. 7.15. Седиментация крови в кювете толщиной $L = 1,1$ мм. Динамическое ОКТ-изображение ($\lambda = 820$ нм) образца цельной крови, взятого у здорового добровольца (женщина 35 лет), слегка разбавленного физиологическим раствором (13%) [1331]

где n и \bar{n} определяются формулами (7.59) и (7.60). Поскольку n_{Σ} всегда больше \bar{n} и процесс седиментации в общем случае выражается как $H(t)/L \rightarrow Hct$ (гематокрит крови), тогда полный показатель преломления должен убывать со временем.

Чтобы описать влияние зависящих от времени изменений показателя преломления на ОКТ-изображении в процессе седиментации крови, в формуле (7.51) n нужно заменить на n_{Σ} . Начальный показатель преломления перед седиментацией можно оценить на основе экспериментального ОКТ-изображения, представленного на рис. 7.15 для цельной крови, слегка разбавленной физиологическим раствором. Экспериментальное значение Δz_{opt} (расстояние между нижней и верхней яркими линиями в нулевой момент времени) равно 1,533 мм, для геометрической толщины кюветы $\Delta z = 1,1$ мм, из соотношения $\Delta z_{opt} \approx n_{\Sigma} \Delta z$ можно найти $n_{\Sigma} = 1,394$. Учитывая тот факт, что показатель преломления цельной крови $n_b = 1,400$, можно оценить ожидаемое значение показателя преломления $n_{\Sigma}(t=0)$ из $n_{\Sigma}(t=0) = f_b n_b + (1 - f_b) n_{saline}$, где f_b — объемная доля цельной крови в образце, а n_{saline} — показатель преломления физиологического раствора. Для $f_b = 0,87$ и $n_{saline} = 1,330$ ожидаемое значение $n_{\Sigma} = 1,391$ хорошо согласуется с измеренным значением.

Экспериментальное значение Δz_{opt} , измеренное через 10 мин после начала седиментации крови, равно 1,483 мм; таким образом, $n_{sed}(t=10 \text{ мин}) = 1,348$. Учитывая это, из ОКТ-изображения, для которого $(L - H)/L = 0,55$; $H/L = 0,45$ и $\bar{n} = f_{bp} n_{bp} + (1 - f_{bp}) n_{saline} = 0,87 \cdot 1,340 + 0,13 \cdot 1,33 = 1,339$, можно оценить n_{Σ} по формуле (7.61) как $n_{\Sigma} = 1,359$ и соответствующие флуктуации относительного показателя преломления слоя по формуле (7.59) как $(n^2 - \bar{n}^2) / \bar{n} \approx 0,017$ для $Q = 1,17$.

Результаты измерений *in vitro* и *in vivo* фазового и группового показателей преломления биотканей, крови и их композиций с использованием обсужденных и некоторых других методов представлены в табл. 7.6.

Глава 8

ЭФФЕКТЫ КОГЕРЕНТНОСТИ СВЕТА ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ С БИОТКАНЯМИ И ПОТОКАМИ КЛЕТОК

В данной главе рассматриваются эффекты когерентности света, сопровождающие распространение лазерного излучения в биологических тканях и взаимодействие лазерного излучения с потоками клеток. Эти эффекты включают дифракцию, интерференцию спекл-полей, рассеяние движущимися частицами (эффект Доплера) и т. п. Обсуждаются принципы спектроскопии квазиупругого рассеяния света, диффузионно-волновой спектроскопии, спекл-визуализации полного поля (спеклоскопии), конфокальной микроскопии, оптической когерентной томографии и визуализации с помощью генерации второй гармоники.

8.1. Формирование спекл-структур

Спекл-структуры (или пятнистые структуры) формируются в результате интерференции большого числа элементарных волн со случайными фазами, возникающими при отражении когерентного света от шероховатой поверхности или при прохождении когерентного света через рассеивающую среду [45, 76, 77, 82, 83, 112, 113, 129, 135, 136, 139, 221, 223, 555, 608, 1423–1459]. Спеклы представляют собой трехмерную интерференцию, происходящую в каждой точке пространства, где пересекаются отраженные или прошедшие волны от оптически шероховатой поверхности или объемных неоднородностей. В общем случае существует два типа спеклов: субъективные спеклы, которые получаются в пространстве изображений оптической системы (включая глаз), и объективные спеклы, которые формируются в свободном пространстве и обычно наблюдаются на экране, расположенном на некотором расстоянии от объекта. Поскольку большинство биообъектов оптически неоднородны, освещение их когерентным светом всегда вызывает появление спекл-структур, которые либо искажают результаты измерений и, следовательно, должны быть каким-либо образом исключены, либо несут новую информацию о структуре и движении биообъекта и его компонентов. Здесь мы обсудим, в основном, возможность извлечения информации из спекл-полей.

Рисунок 8.1 схематически иллюстрирует принципы формирования и распространения спеклов, сформированных в режиме пропускания и отражения когерентного света в оптически неоднородной среде, а на рис. 8.2 показана реальная спекл-картина, образованная при пропускании пучка от He:Ne-лазера через тонкий слой образца эпидермиса человека. Средний размер спекла в дальнем поле оценивается как

$$d_{av} \sim \lambda/\varphi, \quad (8.1)$$

где λ — длина волны, а φ — угол наблюдения.

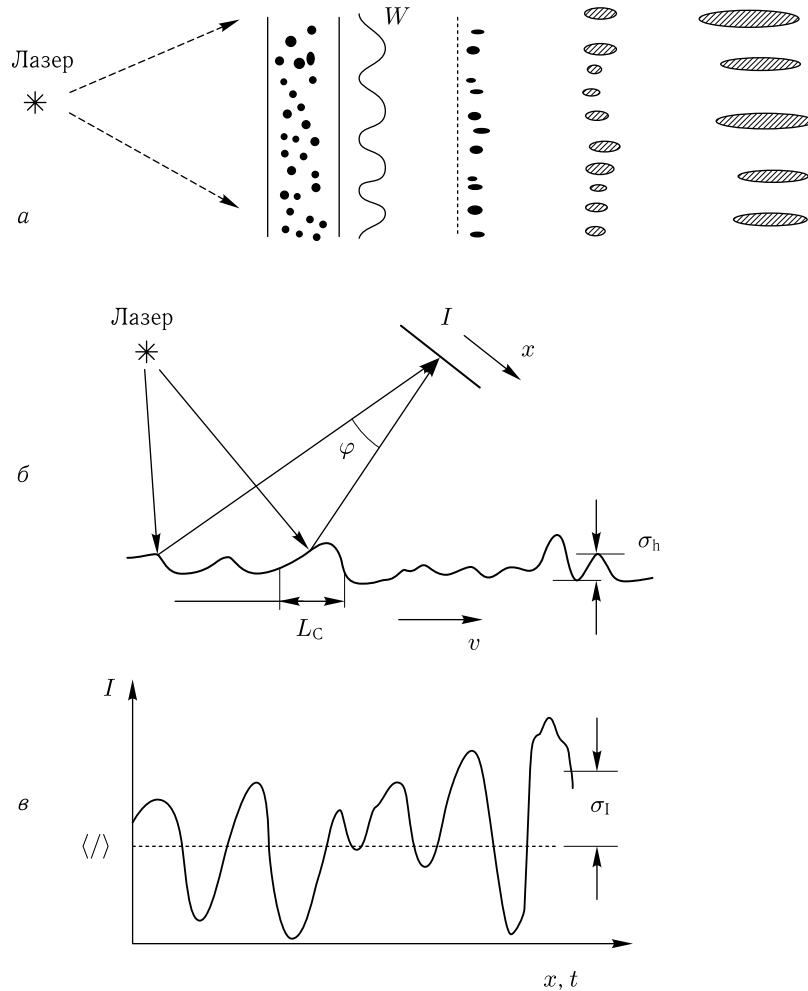


Рис. 8.1. Формирование и распространение спеклов (а); наблюдение спеклов (б) и модуляция интенсивности (в); W — рассеянная волна [1424]

Смещение точки наблюдения по экрану (x) или сканирование лазерного пучка по объекту с некоторой скоростью v (или эквивалентное движение объекта относительно лазерного пучка), при котором точка наблюдения остается неподвижной, приводит к возникновению пространственных или временных флуктуаций интенсивности рассеянного поля. Эти флуктуации характеризуются средним значением интенсивности $\langle I \rangle$ и стандартным отклонением σ_I (см. рис. 8.1 б). Сам объект характеризуется стандартным отклонением σ_h высоты (глубины) неоднородностей и длиной корреляции L_c этих неоднородностей (случайного рельефа).

Поскольку многие ткани и клетки являются фазовыми объектами (поглощение мало, а перераспределение света определяется набегам фазы поля) [77, 257, 263, 267–270, 555, 1373], распространение когерентных пучков в биообъектах можно описывать в рамках модели случайного фазового экрана (СФЭ) [75]. Амплитудный

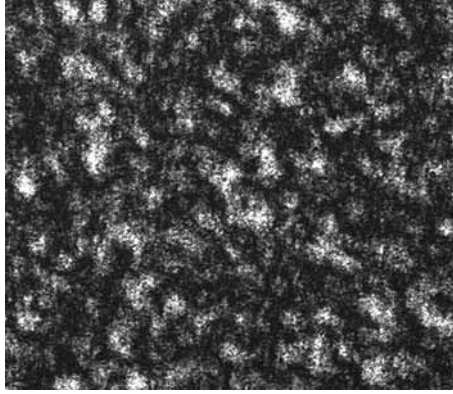


Рис. 8.2. Спекл-структура, возникающая при прохождении пучка излучения He:Ne-лазера (633 нм) через тонкий образец эпидермиса кожи человека (эпидермальный отрыв кожи)

коэффициент пропускания СФЭ дается выражением

$$t_s(x, y) = t_0 \exp[-i\Phi(x, y)], \quad (8.2)$$

где t_0 — не зависящее от координат амплитудное пропускание; $\Phi(x, y)$ — случайный фазовый сдвиг, вносимый СФЭ в точке (x, y) . Такие пространственные флуктуации фазы могут возникать из-за вариаций показателя преломления $n(x, y)$ или толщины СФЭ $h(x, y)$ от точки к точке. Для тонких пропускающих и отражающих СФЭ имеем соответственно:

$$\begin{aligned} \Phi(x, y) &= (2\pi/\lambda) [n(x, y) - 1] h(x, y), \\ \Phi(x, y) &= (4\pi/\lambda) h(x, y). \end{aligned} \quad (8.3)$$

Фазовые флуктуации рассеянного поля характеризуются стандартным отклонением σ_Φ и длиной корреляции L_Φ . Вообще говоря, существует два типа СФЭ: слабо рассеивающие СФЭ ($\sigma_\Phi^2 \ll 1$) и глубокие СФЭ ($\sigma_\Phi^2 \gg 1$).

Идеальные условия формирования спеклов, при которых возникают полностью развитые спеклы, можно сформулировать следующим образом.

1. Когерентный свет освещает диффузную поверхность (или транспарант), характеризуемую гауссовыми изменениями оптической длины $\Delta L = \Delta(nh)$ с распределением плотности вероятности

$$p(\Delta L) = (2\pi\sigma_L^2)^{-1/2} \exp\left[-\frac{(\Delta L)^2}{2\sigma_L^2}\right]. \quad (8.4)$$

2. Стандартное отклонение вариаций рельефа $\sigma_L \gg \lambda$; как длина когерентности света, так и размеры рассеивающей поверхности значительно превосходят разность оптических длин пути, обусловленную рельефом поверхности, и вклад в результирующую спекл-картину дает большое число рассеивающих центров.

Статистические свойства спеклов можно разделить на статистику первого и второго порядка. Статистика первого порядка описывает свойства спекл-полей в каждой точке. Такое описание обычно использует функцию распределения плотности вероятности интенсивности $p(I)$ и контраст

$$V_I = \frac{\sigma_I}{\langle I \rangle}, \quad \sigma_I^2 = \langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2, \quad (8.5)$$

где $\langle I \rangle$ и σ_I^2 — средняя интенсивность и дисперсия флуктуаций интенсивности соответственно. В некоторых случаях используются статистические моменты высших порядков. Например, в дополнение к контрасту, обычно определяемому как

$$V_I = \left(\frac{\mu_2}{\mu_1} \right)^{0,5}, \quad (8.6)$$

можно ввести параметр асимметрии

$$Q_a = \frac{\mu_3}{\mu_2^{1,5}}, \quad (8.7)$$

который дает дополнительную информацию о рассеивающем объекте. Здесь статистические моменты μ_n определяются как

$$\mu_n = (N - 1)^{-1} \sum_{j=1}^N (I_j - \mu_1)^n. \quad (8.8)$$

Для идеальных условий, когда комплексная амплитуда рассеянного света имеет гауссову статистику, контраст $V_I = 1$ (развитые спеклы), и функция распределения вероятности (ФРВ) интенсивности есть экспонента с отрицательным показателем [223]:

$$p(I) = \frac{1}{\langle I \rangle} \exp \left(-\frac{I}{\langle I \rangle} \right). \quad (8.9)$$

Таким образом, наиболее вероятное значение интенсивности в соответствующей спекл-структуре равно нулю, т. е. деструктивная интерференция происходит с наибольшей вероятностью.

График выражения (8.9) приведен как кривая 1 на рис. 8.3, и можно видеть, что наиболее вероятный спекл темный. ФРВ интенсивности, описываемая этим выражением, может возникнуть только за счет интерференции света, который поляризован одинаковым образом, вследствие чего таким же образом поляризована и вся спекл-структура [1426–1430, 1450, 1460]. Таким образом, рассеивающая поверхность не может деполаризовать рассеянный свет. Материалы, в которые свет не проникает глубоко и рассеивается только однократно, в общем случае создают спекл-структуры с распределением интенсивности, соответствующим (8.9). С другой стороны, материалы, в которые свет проникает достаточно глубоко и испытывает многократное рассеяние, что характерно для многих биологических тканей, деполаризуют интерферирующий свет.

Лазерные спеклы, возникающие от большинства биологических тканей, не являются «вполне развитыми» в том смысле, что распределение их интенсивности отлично от убывающей экспоненциальной зависимости (8.9). Такие спекл-структуры могут иметь совершенно иную ФРВ интенсивности, лучше всего представляемую в терминах некогерентной комбинации двух спекл-полей. Действие многих спекл-интерферометров основано на интерференции двух независимых спекл-структур [223, 1425–1429, 1433–1447]. Спекл-структуры могут интерферировать как когерентно, так и некогерентно. В случае когерентной комбинации статистические свойства результирующей третьей спекл-структуры остаются принципиально теми же, что и у двух исходных структур, и в типичном случае следуют (8.9). Однако в случае некогерентной комбинации двух спекл-полей результирующая ФРВ интенсивности подчиняется не экспоненциальной статистике (8.9), а распределению [1436]

$$p(I) = \frac{4I}{\langle I \rangle^2} \exp \left(-\frac{2I}{\langle I \rangle} \right). \quad (8.10)$$

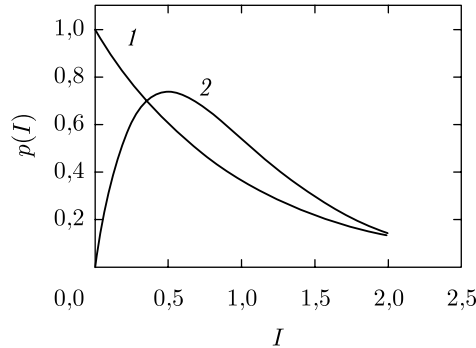


Рис. 8.3. Теоретические функции распределения плотности вероятности для интенсивности $p(I)$ полностью развитой спекл-структуры (кривая 1, формула (8.9)) и некогерентной комбинации двух спекл-полей (кривая 2, формула (8.10)) [1436]

Форма этого распределения показана как кривая 2 на рис. 8.3. ФРВ интенсивности спекл-структур от большинства биологических тканей описывается этим выражением. Причина состоит в следующем: когерентный свет, рассеянный большинством биологических тканей, создает случайным образом поляризованные спекл-структуры, и любые две ортогонально поляризованные компоненты рассеянного света некогерентны друг другу. Таким образом, отдельные спекл-структуры от биологических тканей, которые поляризуют спекл-структуры случайным образом, можно рассматривать как некогерентную комбинацию двух или более спекл-структур. На рис. 8.4 показана измеренная ФРВ интенсивности спекл-структуры при рассеянии назад от образца свиной кожи, освещаемой расширенным пучком He:Ne-лазера (633 нм). Ясно видно, что ФРВ интенсивности рассеянного кожей света в основном следует формуле (8.10).

Частично развитые спекл-поля характеризуются контрастом $V_I < 1$. Контраст может быть ниже по следующим причинам.

1. Если к спекл- полю добавляется однородный когерентный фон с интенсивностью I_b , то

$$V_I = (1 - \rho_b^2)^{1/2}, \quad (8.11)$$

где $\rho_b = \langle I_b \rangle / (\langle I_b \rangle + \langle I \rangle)$. Например, с уменьшением шероховатости поверхности (или степени неоднородности объемного рассеивателя) имеем $\sigma_\phi^2 \rightarrow 0$. При этих условиях сильная зеркальная (нерассеянная) компонента когерентного пучка интерферирует со спекл-полем. В предельном случае идеально плоской поверхности (однородной среды) спеклы исчезают, $V_I = 0$.

2. Если появляется однородный некогерентный фон (например, из-за снижения когерентности источника света или многократного рассеяния в среде), то

$$V_I = 1 - \rho_b. \quad (8.12)$$

Для гауссовой статистики и гауссовой корреляционной функции фазовых флуктуаций распространение интенсивности спекл-поля в свободном пространстве вдоль оси z за СФЭ описывается выражением [75]

$$\sigma_I^2(z) = \frac{\sigma_\phi^2}{2} \left\{ 1 + \frac{1}{1 + D^2} \right\}, \quad (8.13)$$

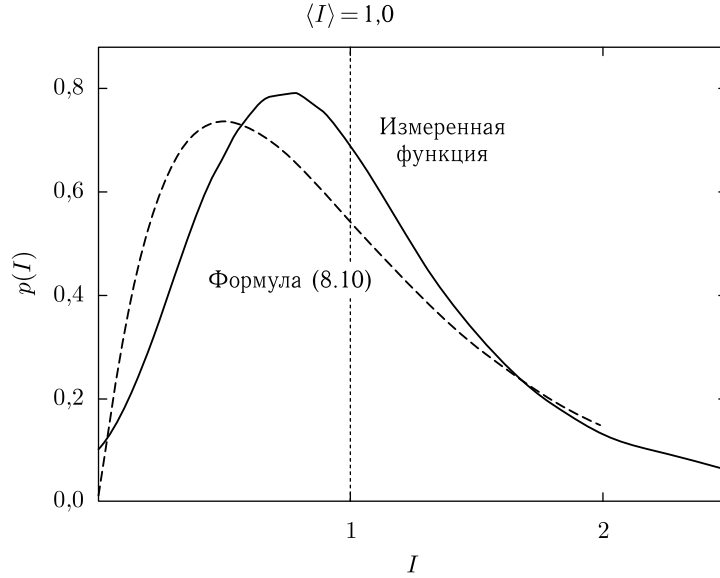


Рис. 8.4. Измеренная функция распределения плотности вероятности интенсивности $p(I)$ спекл-поля при облучении образца кожи свиньи излучением He:Ne-лазера (633 нм) в сравнении с теоретической функцией для некогерентной комбинации двух полей (формула (8.10)) [1436]

где $D = z\lambda/\pi L_\phi^2$ — волновой параметр. Для слабо рассеивающего СФЭ ($\sigma_\phi^2 \ll 1$) контраст спекл-поля всегда меньше единицы. Для глубокого СФЭ ($\sigma_\phi^2 \gg 1$) контраст достигает своего максимума в зоне дифракции Френеля ($D \approx 1$), когда $z_{\text{max}} = (2\pi/\lambda)(L_\phi^2/\sigma_\phi)$, $V > 1$. Тот факт, что контраст выше единицы, означает доминирование темных областей в спекл-структуре. Появление максимума флуктуаций интенсивности объясняется фокусировкой рассеянных волн за СФЭ. В зоне дифракции Фраунгофера имеем $V_I \rightarrow 1$.

Распределение интенсивности света, прошедшего через СФЭ, можно представить в следующем виде [75, 223]:

$$I_\Sigma(x, y) = I_c(x, y) + I_s(x, y). \quad (8.14)$$

Здесь $I_c(x, y)$ — интенсивность света, прошедшего в направлении вперед (когерентная компонента), а $I_s(x, y)$ — интенсивность рассеянной компоненты.

Для рассеянного поля с гауссовой статистикой интенсивность $I(0)$ в центре пучка и радиус r_s рассеянного пучка в плоскости наблюдения определяются следующими соотношениями:

$$I(0) \approx I_0(0) \exp(-\sigma_\phi^2), \quad (8.15)$$

$$r_s \approx \frac{z\lambda}{\pi L_\phi} \quad (\sigma_\phi^2 \ll 1), \quad (8.16)$$

$$r_s \approx \frac{z\lambda}{\pi L_\phi} \sigma_\phi \quad (\sigma_\phi^2 \gg 1),$$

где $I_0(0)$ — интенсивность падающего пучка на его оси.

Как для слабо рассеивающих, так и для глубоких СФЭ, движущихся со скоростью v в направлении, перпендикулярном лазерному пучку радиуса w , время корре-

ляции флуктуаций интенсивности рассеянного поля задается выражением [1450]

$$\tau_c \approx \sqrt{2} \cdot \frac{w}{v}. \quad (8.17)$$

Это соотношение верно для гауссова падающего пучка, когда плоскость наблюдения лежит в зоне дифракции Фраунгофера.

Для фазовых объектов с $\sigma_\phi^2 \gg 1$ и небольшим числом рассеивателей $N = w/L_\phi$, вносящих вклад в поле в некоторой точке в плоскости наблюдения, контраст спекл-структуры больше единицы [1427]:

$$V_I = \left\{ 1 - \frac{2}{N} + \frac{\sigma_\phi^2}{4N} \exp \left[\frac{2\pi L_\phi}{\lambda \sigma_\phi} \sin \theta \right]^2 \right\}^{1/2}, \quad (8.18)$$

где θ — угол наблюдения (угол рассеяния). Заметим, что статистика спекл-поля в этом случае негауссова и неоднородна (т. е. статистические параметры зависят от угла наблюдения).

Статистика второго порядка показывает, насколько быстро интенсивность меняется от точки к точке спекл-структуры, т. е. она характеризует размер и распределение размеров спеклов в структуре. Статистика второго порядка обычно описывается с помощью автокорреляционной функции флуктуаций интенсивности,

$$g_2(\Delta\xi) = \langle I(\xi + \Delta\xi)I(\xi) \rangle, \quad (8.19)$$

и ее фурье-образу, представляющего спектр мощности случайного процесса, $\xi \equiv x$ или t — пространственная или временная переменная; $\Delta\xi$ — ее изменение. Угловые скобки $\langle \rangle$ в формуле (8.19) означают усреднение по ансамблю или по времени. Для описания сравнительно малых флуктуаций интенсивности удобно использовать автокорреляционную функцию \tilde{g}_2 флуктуационной составляющей интенсивности и соответствующую структурную функцию D_I :

$$\tilde{g}_2(\Delta\xi) = [\langle I(\xi + \Delta\xi) - \langle I \rangle \rangle] \cdot [I(\xi) - \langle I \rangle], \quad (8.20)$$

$$D_I(\Delta\xi) = \langle [I(\xi + \Delta\xi) - I(\xi)]^2 \rangle, \quad (8.21)$$

$$D_I(\Delta\xi) = 2 [\tilde{g}_2(0) - \tilde{g}_2(\Delta\xi)].$$

Для анализа обычно используются нормированные автокорреляционная и структурная функции. Автокорреляционная функция предпочтительна для анализа флуктуаций интенсивности, вызванных сравнительно крупными неоднородностями рассеивающего объекта. В то же время, структурная функция более чувствительна к мелкомасштабным колебаниям интенсивности. На рис. 8.5 и 8.6 показаны типичные автокорреляционные и структурные функции, измеренные для двух типов нормальной и патологической ткани — эпидермиса кожи и зубной эмали человека [77, 555, 1446]. Эти графики ясно показывают различие в чувствительности указанных функций к пространственным флуктуациям различного масштаба.

8.2. Интерференция спекл-полей

В общем случае благодаря значительному вкладу объемного рассеяния отражение лазерного излучения от биологического объекта вызывает формирование частично развитых спекл-структур со сравнительно малым размером спеклов, отличным от единицы контрастом и случайной поляризацией света в отдельных спеклах. В элементарном случае, когда отраженный свет в спекл-структурах сохраняет линейную

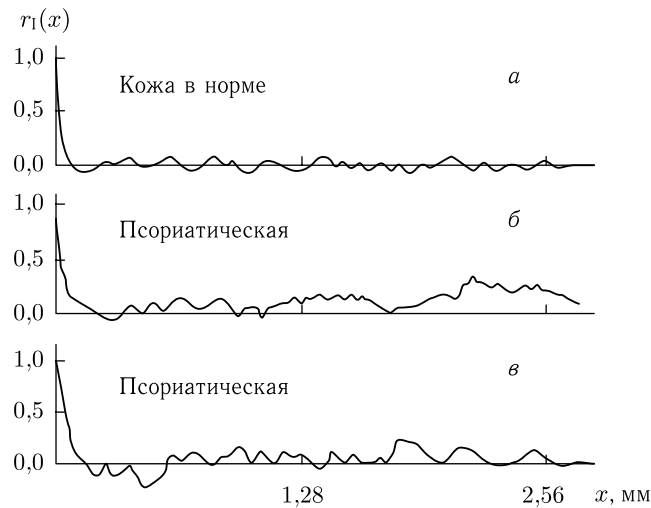


Рис. 8.5. Нормированные автокорреляционные функции флуктуаций интенсивности в спеклах $r_I(x)$ для тонких слоев нормальной (а) и псориатической (б и в) эпидермиса человека при зондировании сфокусированным лазерным пучком [77, 555]

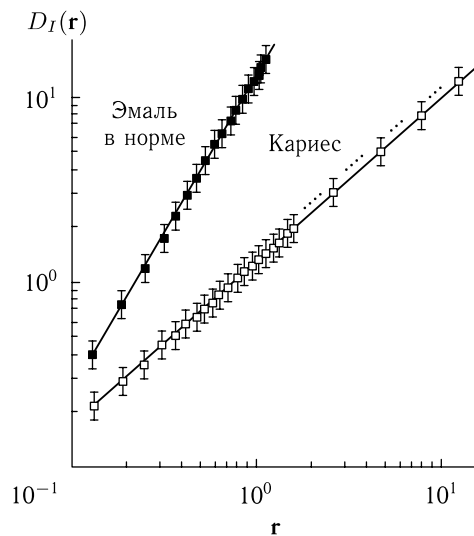


Рис. 8.6. Различие между структурными функциями флуктуаций интенсивности спеклов при рассеянии сфокусированного лазерного пучка от нормальной (верхняя линия) и пораженной кариесом (нижняя линия) эмали зуба человека [77, 555]

поляризацию, распределение интенсивности на выходе двухлучевого интерферометра можно записать как [1447, 1448]

$$I(r, t) = I_r(r) + I_s(r) + 2 [I_r(r)I_s(r)]^{1/2} |\gamma_{11}(\Delta t)| \cos \{ \Delta\Phi_I(r) + \Delta\Psi_I(r) + \Delta\Phi_I(t) \}, \quad (8.22)$$

где $I_r(r)$ и $I_s(r)$ — распределения интенсивности опорного и сигнального поля, соответственно; r — поперечная пространственная координата; $\gamma_{11}(\Delta t)$ — степень

временной когерентности света; $\Delta\Psi_I(r)$ — детерминированная разность фаз интерферирующих волн; $\Delta\Phi_I(r) = \Phi_{I_1}(r) - \Phi_{I_2}(r)$ — случайная разность фаз; и $\Delta\Phi_I(t)$ — зависящая от времени разность фаз, связанная с движением объекта. В частности, для продольных гармонических колебаний с амплитудой l_0 и частотой Ω_v имеем

$$\Delta\Phi_I(t) = \frac{4\pi}{\lambda} l_0 \sin(\Omega_v t). \quad (8.23)$$

В отсутствии спекл-модуляции детерминированная разность фаз $\Delta\Psi_I(r)$ отвечает за формирование регулярных интерференционных полос. В среднем выходной сигнал спекл-интерферометра достигает своего максимума, когда интерферирующие поля согласованы по фазе ($\Delta\Psi_I(r) = \text{const}$ в пределах апертуры приемника), используются сфокусированные лазерные пучки (формируются спеклы максимального размера) и приемник с максимальной площадью.

Для фотоприемника большой апертуры, не разрешающего амплитудно-фазовых пространственных вариаций интерференционного поля, глубину модуляции фотоэлектрического сигнала интерферометра с сфокусированными пучками можно выразить как [1449]

$$\beta = \left| \frac{\sin u}{u} \right|, \quad u = \frac{\pi(\text{NA})^2 \Delta z}{\lambda}, \quad (8.24)$$

где NA — числовая апертура объектива в объектном плече спекл-интерферометра (см. рис. 8.7), Δz — продольное смещение объекта.

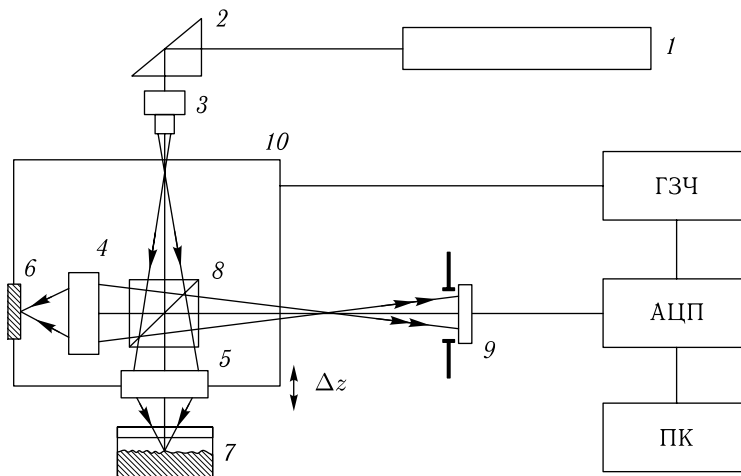


Рис. 8.7. Лазерный интерферометр с согласованием волнового фронта [1449]: 1 — He:Ne-лазер (633 нм); 2 — призма; 3, 4, 5 — объективы; 6 — опорное зеркало; 7 — многослойный объект; 8 — делитель пучка; 9 — фотоприемник; 10 — сканирующая платформа; ГЗЧ — генератор звуковой частоты; АЦП — синхронизированный аналого-цифровой преобразователь; ПК — персональный компьютер

8.3. Распространение пространственно-модулированных лазерных пучков в рассеивающей среде

Для анализа микропрофиля и диагностики формы поверхности, определения смещений шероховатых поверхностей, лазерной анемометрии биологических жидкостей и задач проточной цитометрии исследуемые объекты облучаются пространственно-

модулированными лазерными пучками (например, пучками с регулярными интерференционными полосами) [5, 22, 76, 77, 472, 555, 1441, 1460–1467]. Интерференционные методы дают возможность получения легко регулируемых, в том числе и малых, расстояний между полосами пространственной модуляции, $\Lambda_I = \lambda/2\theta_I$ (θ_I — угол между волновыми векторами интерферирующих полей), которые могут быть сравнимы с размерами неоднородностей объекта. Использование модулированных пучков с большими расстояниями между полосами интерференции, существенно превосходящими размеры неоднородностей, приводит к появлению новых корреляционных эффектов в рассеянном поле и, следовательно, также дает возможность исследовать случайные фазовые объекты с помощью спекл-технологий [472, 555, 1441, 1465–1467]. Интерференционные полосы средней интенсивности, возникающие в этом случае, имеют контраст, меняющийся вдоль оси распространения света z . Если диаметр пучка и расстояние между полосами достаточно велики, полосы модулируют спекл-поле, и эволюция контраста полос средней интенсивности вдоль оси z определяется статистическими параметрами объекта и расстоянием между полосами.

Формирование и движение полос обычно обеспечивается с помощью пространственно-временного оптического модулятора [472, 555, 1441, 1465–1467]. Интерференционные полосы средней интенсивности регистрируются фотоприемником со щелью, ориентированной вдоль полос. Широкая апертура используется для усреднения спекл-модуляции рассеянного поля. Глубина модуляции фотоэлектрического сигнала равна относительному контрасту интерференционных полос:

$$\frac{\bar{V}_I(z)}{V_{I0}} = |\mu(z)|, \quad (8.25)$$

где $\bar{V}_I(z)$ — контраст полос средней интенсивности, V_{I0} — контраст в исходном лазерном пучке, а $|\mu(z)|$ — модуль поперечного коэффициента корреляции комплексной амплитуды рассеянного поля.

Для экспериментального моделирования биотканей и клеточных структур с различными статистическими свойствами фазовых неоднородностей были разработаны специальные фантом-спеклограммы с плавно меняющимися и осциллирующими коэффициентами корреляции граничного поля [472, 1441]. На рис. 8.8 представлены теоретические и экспериментальные зависимости пространственной эволюции относительного контраста полос, полученные для спеклограмм-фантомов с почти гауссовым коэффициентом корреляции $K_\phi(\Delta x)$ флуктуаций фазы граничного поля. Эти зависимости позволяют реконструировать статистические параметры фазового объекта, включая коэффициент корреляции $K_\phi(\Delta x)$ [472, 555, 1441, 1465–1467].

Когда пространственно-модулированный пучок света фокусируется с помощью дифракционно-ограниченной оптической системы с апертурой $D > \Lambda_I$, в области фокусировки формируется два пространственно разделенных световых пятна. Оптическая схема такой системы представлена на рис. 8.9. Поскольку освещаются две различные области объекта, то взаимодействие указанных световых пятен с рассеивающей средой порождает две совершенно разные (некоррелированные) спекл-составляющие дифракционного поля. Если расстояние между интерференционными полосами удовлетворяет неравенству $\Lambda_I < d_{av}$ (средний размер спеклов в плоскости наблюдения), то диаметр перетяжки пучка удовлетворяет неравенству $2w_0 > L_\phi$. В такой ситуации в пределах каждого спекла наблюдаются регулярные полосы интерференции, ориентированные случайным образом от спекла к спеклу. Контраст полос зависит в этом случае только от соотношения между интенсивностями интерферирующих полей и не зависит от статистических свойств объекта. Если $\Lambda_I > d_{av}$ и $2w_0 > L_\phi$, то в рассеянном поле не появляются полосы (см. рис. 8.10 б). Однако, когда объект

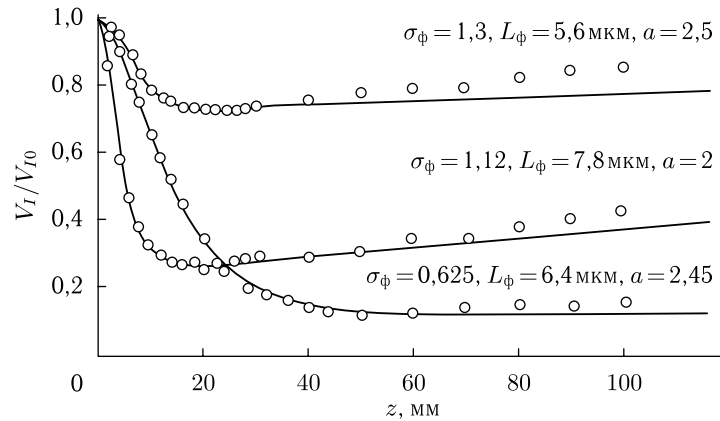


Рис. 8.8. Экспериментальные и теоретические зависимости [472] относительного контраста полос V_I/V_{I0} от расстояния z от объекта для фантома ткани в виде спекл-интерферограммы с плавно меняющимся коэффициентом корреляции фазовых флуктуаций поля на границе, $K_\phi(\Delta x) = \exp\{-|\Delta x|/L_\phi\}^a$

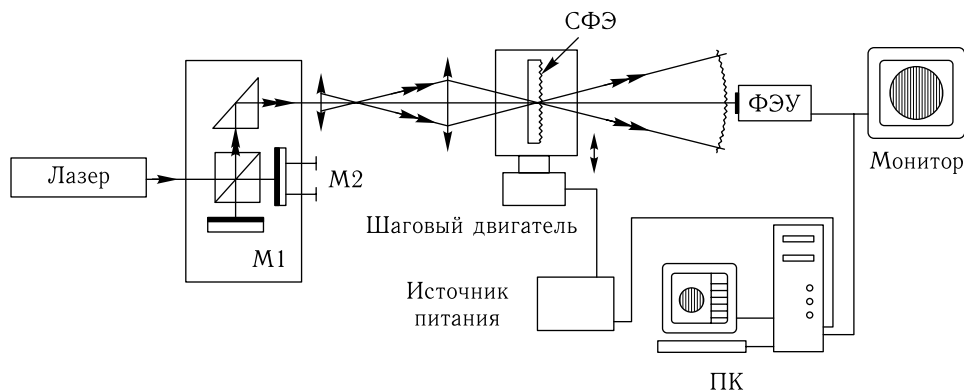


Рис. 8.9. Экспериментальная установка для изучения контраста интерференционных полос, возникающих при рассеянии сфокусированного пространственно-модулированного лазерного пучка, рассеянного случайным фазовым объектом [472]

движется в поперечном направлении, появляется набор полос средней интенсивности (см. рис. 8.10 в). Контраст этой картины определяется статистическими свойствами объекта.

Метод спеклов с использованием пространственно модулированного пучка дает возможность определять такие статистические параметры случайных фазовых объектов, как стандартное отклонение σ_ϕ и длина корреляции L_ϕ фазовых флуктуаций [472, 555, 1441, 1465–1467]. Строго говоря, этот метод можно применять к фазовым объектам с плавными нерегулярностями и гауссовой статистикой. Данный подход можно также использовать для изучения объектов с негауссовой статистикой или резкими неоднородностями, однако в этом случае необходима калибровка. Прямые измерения с использованием достаточно быстродействующей приемной системы позволяют анализировать объекты в реальном времени, что особенно важно для исследования биотканей и клеточных структур, в частности, при создании оптических топографических схем. Этот метод можно использовать для изучения

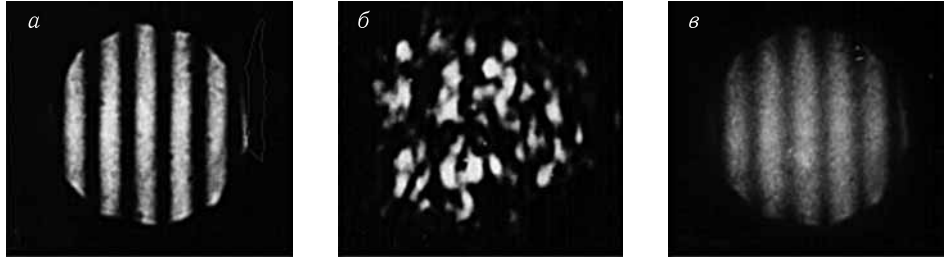


Рис. 8.10. Интерферограммы, наблюдаемые без объекта (а), со стационарным объектом (б, фантом ткани в виде спекл-интерферограммы) и с движущимся объектом (в) [472]

тонких слоев эпидермиса человека, более толстых прозрачных биотканей переднего сегмента глаза человека (роговицы и хрусталика) и склеры в процессе оптического просветления (увеличенной прозрачности) в условиях механических и осмотических напряжений [238, 555, 768]. Наряду с мониторингом статистических параметров биотканей, этот подход должен быть также полезен для разработки нового поколения лазерных интерференционных ретинометров — устройств для определения ретиальной остроты зрения глаза человека [5, 473, 1441]. Поскольку интерференционная картина обычно усредняется при сканировании сфокусированного лазерного пучка, то даже пациенты с мутным (катаракта) хрусталиком могут видеть интерференционные полосы (см. рис. 8.10).

8.4. Динамическое рассеяние света

8.4.1. Квазиупругое рассеяние света. Квазиупругое рассеяние света, фотонно-корреляционная спектроскопия, спектроскопия флуктуаций интенсивности и доплеровская спектроскопия — близкие по физическому смыслу термины, относящиеся к динамическому рассеянию света, лежащему в основе неинвазивного метода исследования динамики частиц в сравнительно протяженном масштабе времени [5, 78, 79, 112, 113, 555, 1460–1463, 1468, 1469]. Реализация режима однократного рассеяния и использование источников когерентного света в этом случае имеют принципиальное значение. Пространственный масштаб тестирования коллоидной структуры (ансамбля биологических частиц) определяется величиной обратного модуля волнового вектора, $|\vec{q}|^{-1}$, определенного формулой (3.39)

$$|\vec{q}| = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2}, \quad (8.26)$$

где n — показатель преломления базового вещества рассеивающей среды (или средний показатель преломления базового вещества и вещества рассеивающих частиц, $n = \bar{n}$), а θ — угол рассеяния. Смешивание на фотоприемнике компонентов электрического поля рассеянного света приводит к появлению так называемых «биений» (модуляции) электрического тока приемника, которые определяются видом автокорреляционной функции флуктуаций интенсивности детектируемого излучения:

$$g_2(\tau) = \langle I(t)I(t + \tau) \rangle. \quad (8.27)$$

Для гауссовой статистики эта автокорреляционная функция связана с автокорреляционной функцией первого порядка (по полю) формулой Зигерта:

$$g_2(\tau) = A \left[1 + \beta_{sb} |g_1(\tau)|^2 \right], \quad (8.28)$$

где τ — время задержки; $A = \langle i \rangle^2$ — квадрат среднего значения фототока или базовая линия автокорреляционной функции; β_{sb} — параметр эффективности «биений», $\beta_{sb} \approx 1$ и

$$g_1(\tau) = \left\langle \frac{E^*(t+\tau)E(t)}{|E(t)|^2} \right\rangle \quad (8.29)$$

— нормированная автокорреляционная функция оптического поля.

Для монодисперсной системы броуновских частиц имеем

$$g_1(\tau) = \exp(-\Gamma_T \tau), \quad (8.30)$$

где $\Gamma_T = q^2 D_T$ — параметр релаксации, $D_T = k_B T / 6\pi\eta r_h$ — коэффициент трансляционной диффузии, k_B — постоянная Больцмана, T — абсолютная температура, η — абсолютная вязкость среды, а r_h — гидродинамический радиус частицы. Многие биологические системы характеризуются бимодальным распределением коэффициента диффузии, когда быструю диффузию (D_{Ti}) можно отделить от медленной диффузии (D_{Ts}), связанной, например, с агрегацией частиц [5, 1469–1471]. В первом случае автокорреляционная функция первого порядка записывается как

$$g_1(\tau) = p_1 \exp(-q^2 D_{Ts} \tau) + p_2 \exp(-q^2 D_{Ti} \tau), \quad (8.31)$$

где p_1 и p_2 — коэффициенты, пропорциональные концентрации и эффективности рассеяния мелких и крупных частиц соответственно. Целью спектроскопии квазиупругого рассеяния является реконструкция распределения рассеивающих частиц по размерам, что часто необходимо для диагностики и мониторинга заболеваний путем анализа агрегации или дезагрегации клеток или клеточных структур, а также при исследованиях различных суспензий частиц, включая наночастицы, используемых в качестве специфических меток в диагностике или терапии рака и других заболеваний.

8.4.2. Динамические спеклы. Особенности дифракции лазерных пучков от движущихся фазовых экранов лежат в основе спекл-методов для структурной диагностики и мониторинга биологических потоков и параметров движения биообъектов, включая измерение вибраций [22, 76, 82, 83, 1433–1439, 1442–1448, 1472–1478]. Привлекательность спекл-методов состоит в простоте их технической реализации.

Для получения информации о движении рассеивателей можно анализировать флуктуации интенсивности отдельных спеклов. Такой анализ может быть основан либо на *спектроскопии корреляции фотонов*, либо на *лазерном доплеровском измерении скорости*. Интуитивно не совсем ясно, что меняющиеся во времени спеклы и флуктуации интенсивности, обусловленные эффектом Доплера, идентичны. В основе теории меняющихся во времени спеклов лежит классическая (хотя и случайная) интерференция, возникающая при наложении друг на друга световых пучков одинаковой частоты. Флуктуации интенсивности вызваны изменением оптических длин путей интерферирующих пучков из-за движения рассеивателей. С другой стороны, доплеровские флуктуации объясняются эффектом «биений» волн, слегка различающихся по частоте за счет доплеровского сдвига частоты при рассеянии света движущимся объектом. Таким образом, объяснение спеклов базируется на наложении волн *одинаковой* оптической частоты, в то время как в доплеровской картине накладываются волны *разных* частот. Несмотря на эти очевидные различия в подходе, математически можно показать, что оба подхода ведут к идентичным уравнениям, связывающим флуктуации интенсивности с распределением рассеивателей по скоростям [82, 83]. Таким образом оба подхода представляют собой два различных пути описания одного и того же физического явления.

В случае дифракции остро фокусированного гауссова пучка на движущемся СФЭ с гауссовой статистикой фазовых неоднородностей и гауссовой корреляционной функцией спектр мощности флуктуаций интенсивности в дальней зоне поля может быть представлен в форме гомодинной (I) и гетеродинной (II) частей [1472]:

$$S(\omega) = \left\{ C_1 (2b)^{0.5} \exp \left[-\frac{b\omega^2}{2} \right] \right\}_I + \left\{ C_2 b^{0.5} (\exp [-b(\omega - \omega_0)^2] + \exp [-b(\omega + \omega_0)^2]) \right\}_{II}. \quad (8.32)$$

Здесь $\omega = 2\pi f\lambda/v$ — безразмерная частота, f — частота модуляции, v — скорость движения СФЭ,

$$b = \frac{L_c^2 + 2Mw_0^2}{4M},$$

и

$$\omega_0 = 4\pi M \frac{\left(\frac{w_0}{L_c}\right)^2 \left(\frac{x^0}{z}\right)}{1 + 2M \left(\frac{w_0}{L_c}\right)^2},$$

где M — параметр, зависящий от дисперсии флуктуаций профиля СФЭ (σ_h) и длины волны излучения (λ), w_0 — радиус перетяжки пучка, x^0 — фиксированная точка, в которой наблюдаются спеклы в движущейся системе отсчета, а z — расстояние между плоскостями рассеяния и наблюдения.

Для слабо рассеивающих СФЭ (например, модели тонкого кровеносного сосуда) имеем $M = 1$ и $C_1 \ll C_2$. Для глубокого СФЭ (например, модели толстого кровеносного сосуда) имеем $M \sim (\sigma_h/\lambda)^2$ и $C_1 \gg C_2$. В случае тонких сосудов можно ожидать появления высокочастотного пика в спектре флуктуаций интенсивности (гетеродинная часть спектра) из-за интерференционного взаимодействия зеркальной и рассеянной компонент. Зеркальная компонента (в пропускании или отражении) служит опорной волной. Положение пика на шкале частот зависит от угла наблюдения (x^0/z). Поскольку стандартное отклонение флуктуаций профиля мало ($\sigma_h \ll \lambda$), спектр $S(\omega)$ флуктуаций интенсивности имеет только высокочастотные компоненты. Напротив, в модели глубокого СФЭ из-за подавления зеркальной компоненты (за счет рассеяния) интерференционное взаимодействие исчезает и в спектре присутствуют только низкочастотные компоненты (гомодинная часть).

Сказанное иллюстрируется теоретическими и экспериментальными спектрами, представленными на рис. 8.11 и 8.12. Таким образом, статистические характеристики прошедшего (отраженного) света существенно зависят от угла наблюдения и степени неоднородности объекта. Такая статистика спеклов связана с малым числом рассеивателей и может быть классифицирована как статистически неоднородная негауссова статистика (ср. соотношение (8.18)). Как и в спектроскопии квазиупругого рассеяния (доплеровской спектроскопии), сдвиг частоты является линейной функцией как скорости движения рассеивателя, так и угла наблюдения спеклов, только когда число рассеивателей, облучаемых лазерным полем, достаточно велико. Если число рассеивателей мало, $N_s = (w_0/L_c) < 5$, можно ожидать дополнительной сильной зависимости сдвига частоты от N_s в соответствии с теоретической зависимостью, представленной на рис. 8.13.

8.4.3. Спеклоскопия полного поля. Одна из проблем использования метода временной статистики спеклов — спеклоскопии — состоит в том, что измерения производятся только в одной точке спекл-структуры (на единичном спекле). Поэтому, если нужно проанализировать протяженный объект, например получить

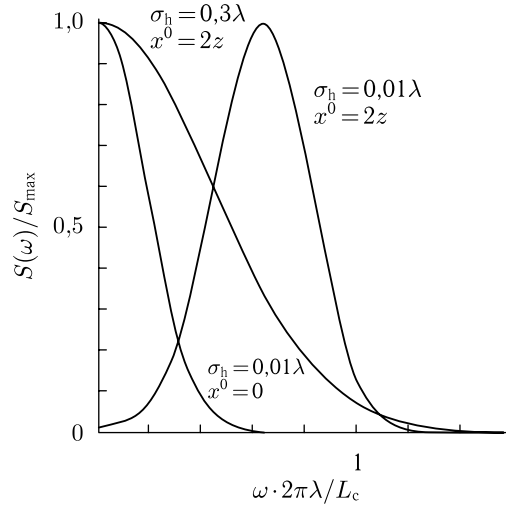


Рис. 8.11. Нормированные теоретические спектры мощности флуктуаций интенсивности динамических спеклов, возникающих при взаимодействии сфокусированного пучка лазера ($w_0 = 10\lambda$) с фазовыми объектами, характеризуемыми различными степенями неоднородности (σ_h) для различных углов наблюдения (x^0) [1481]

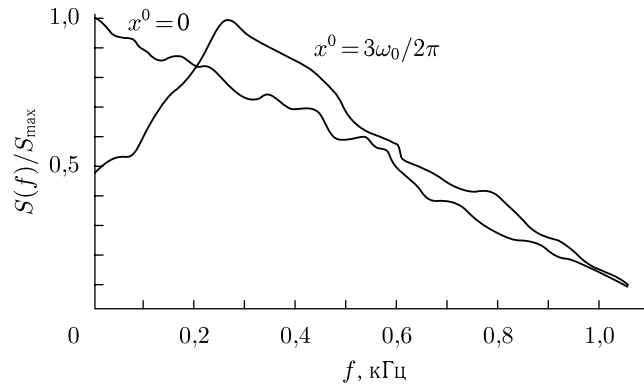


Рис. 8.12. Рассеяние от случайного потока: нормированные экспериментальные спектры флуктуаций интенсивности для динамических спеклов при различных углах наблюдения (x^0); $w_0 \approx 2,3\lambda$; спектры усреднялись по 256 реализациям мгновенного спектра [1481]

карту распределения скоростей, необходимо обеспечить сканирование исследуемой области. Например, получение карты распределения скорости кровотока особенно важно в различных диагностических приложениях. Существуют различные схемы и методы картирования спеклов. Например, для одновременной регистрации спеклов вдоль выбранной линии использовалась ПЗС-линейка, а для получения двумерных картин — дополнительное сканирование по другой координате с помощью зеркала [1479, 1480]. В этом случае для характеристики локального кровотока использовалось отношение средней интенсивности к разности интенсивностей в спекл-картине, и величина, называемая «нормированным размыванием» картины, служила мерой скорости. В частности, карта скорости микроциркуляции крови сетчатки глаза кролика была получена при освещении сетчатки светом диодного лазера, скани-

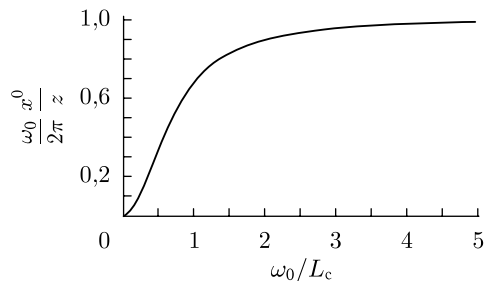


Рис. 8.13. Нормированная теоретическая зависимость центральной частоты в спектре флуктуаций интенсивности от числа рассеивающих элементов, $N_s = \omega_0/L_c$ [1481]

рования и накопления спекл-изображений и, затем, вычисления разностей между последовательными изображениями. Эти измерения показали хорошую корреляцию с прямыми инвазивными методами [1480]. Сканирование пучков используется также в лазерном доплеровском методе [1481–1483], на рынке имеются промышленные сканирующие доплеровские системы, обеспечивающие картирование капиллярного кровотока на больших участках тела.

Однако несканирующие, так называемые полнополевые методы картирования капиллярного кровотока более привлекательны. Контраст спекл-картины, рассматриваемый как мера интегрирования по времени флуктуирующей спекл-структуры, может быть использован как чувствительный параметр для реализации полнополевого метода. Если время интегрирования сравнимо с периодом флуктуаций интенсивности, вызванных динамическим рассеянием света, то ясно, что эффект будет состоять в размытии регистрируемой спекл-структуры и снижении контраста спеклов.

Использование таких *проинтегрированных по времени спеклов* привело в начале 80-х гг. к разработке метода визуализации потоков, который является полнополевым и очень просто (и достаточно дешево) осуществляет сбор и обработку данных (см. работы [82, 83, 112, 1435, 1439, 1484–1488]). Под первоначальным названием «спекл-фотография с одной экспозицией» он был разработан прежде всего для измерения ретинального кровотока. Базовый метод состоял в фотографировании сетчатки при лазерном облучении с временем экспозиции того же порядка, что и время декорреляции флуктуаций интенсивности. Ясно, что очень короткая экспозиция может «заморозить» спеклы и дать высококонтрастную картину, в то время как длительная экспозиция приводит к усреднению спеклов и низкому контрасту. В общем, распределение скоростей в поле зрения отображается в виде вариаций контраста спеклов. Последующее фильтрование высоких пространственных частот преобразует указанные вариации контраста в более наглядные вариации интенсивности. В ходе дальнейшего развития метода появилась цифровая обработка спекл-фотографий, включающая цветное кодирование скоростей. В последнее время метод удалось сделать полностью цифровым, позволяющим в реальном времени исследовать капиллярный кровоток кожи [82, 83, 1484, 1485]. Поскольку метод перестал быть фотографическим, он получил новое современное название «анализ контраста лазерных спеклов» — по-английски «laser speckle contrast analysis» (LASCA). Близкий метод был использован для дистанционной регистрации сердечных биений [1489]: телевизионная камера записывала спекл-структуру от вены, эта структура оцифровывалась кадр за кадром, затем вычислялся контраст и отображался как функция времени; каждый минимум контраста соответствовал удару сердца.

LASCA использует минимальный набор инструментов: лазер с расширяющей пучок оптикой, ПЗС-камеру, фрейм-граббер (плату захвата изображения) и персо-

нальный компьютер. Специально разработанное математическое обеспечение осуществляет вычисление локального контраста и конвертирует его в псевдоцветовую карту контраста (и, следовательно, скорость). Контраст количественно описывается отношением стандартного отклонения флуктуаций интенсивности к средней интенсивности, $\sigma_I/\langle I \rangle$ (см. соотношение (8.5)). Изображение интегрируется по времени экспозиции, поэтому для регистрации составляющих пространственных распределений с высокими скоростями (например, при исследовании капиллярного кровотока) минимальное время экспозиции должно быть достаточно малым, чтобы метод эффективно работал в реальном времени. Простота базовой установки видна из рис. 8.14. Пучок света от лазера расширяется с помощью простой оптики и освещает исследуемую область. ПЗС-камера регистрирует изображение освещаемой области, которое можно наблюдать на экране персонального компьютера. По команде с компьютера фрейм-граббер осуществляет захват изображения, и программа немедленно обрабатывает его и формирует псевдоцветовую карту контраста, отображающую распределение скоростей. Оператор имеет в своем распоряжении несколько опций, включая число пикселей, по которым определяется локальный контраст, масштаб карты контраста, выбор контурных цветов. Наиболее важным является выбор числа пикселей, по которым вычисляется локальный контраст: слишком малое число пикселей — сомнительная статистика, слишком большое — потеря пространственного разрешения. На практике удовлетворительным компромиссом является квадрат 7×7 или 5×5 пикселей.

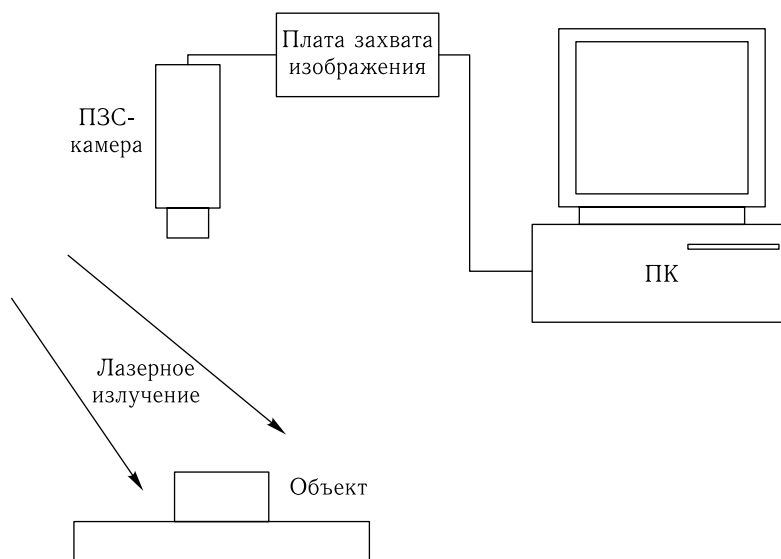


Рис. 8.14. Базовая установка для LASCА (анализ контраста лазерных спеклов) [1435]

Как говорилось выше, принцип LASCА очень прост. Проинтегрированное по времени изображение движущегося предмета размывается, что проявляется как снижение контраста спекл-картины, определяемого (и измеряемого) как отношение стандартного отклонения интенсивности к ее среднему значению. Интегрирование происходит при любом «движении» спекла. Для случайного распределения скоростей по объекту каждый спекл флуктуирует по интенсивности. С другой стороны, при боковом движении твердого объекта спеклы также движутся регулярно в боковом направлении, их изображение смазывается, и в результате опять происходит снижение

контраста. Для потока жидкости ситуация является комбинацией двух предыдущих типов «движения». В каждом случае проблемой для количественных измерений является определение соотношения между контрастом спеклов и скоростью (или распределением скоростей).

Чем выше скорость, тем быстрее флуктуации и тем больше размытие картины за время интегрирования. С помощью некоторых предположений можно получить следующее математическое соотношение между контрастом спеклов и временной статистикой их флуктуаций [1435]:

$$\sigma_s^2(T) = \frac{1}{T} \int_0^T \tilde{g}_2(\tau) d\tau, \quad (8.33)$$

где σ_s^2 — дисперсия флуктуаций интенсивности спекл-картины *в пространстве*; T — время интегрирования, $\tilde{g}_2(\tau)$ — коэффициент автокорреляции флуктуаций интенсивности отдельного спекла *во времени*, определяемый формулой (8.20). Формула (8.33) определяет связь между LASCA и другими методами, использующими измерение флуктуаций интенсивности при рассеянии лазерного излучения движущимися объектами или частицами. Для LASCA измеряемой величиной является левая часть соотношения (8.33), а то время как для спектроскопии корреляции фотонов, лазерного доплеровского метода и метода меняющихся во времени спеклов измеряемой величиной является его правая часть. Стоит также заметить, что LASCA использует *спеклы-изображения*, в то время как большинство временных методов используют *спеклы дальнего поля*. Однако это не нарушает фундаментальной эквивалентности двух подходов, выражаемой соотношением (8.33).

Все методы позволяют определить время корреляции τ_c . В случае метода корреляции фотонов этот параметр измеряется непосредственно. В случае LASCA — требуются некоторые дополнительные допущения для установления связи измеряемого контраста спеклов с τ_c .

В зависимости от типа исследуемого движения можно использовать различные модели для нахождения соотношения между контрастом спеклов и временем корреляции τ_c для заданного времени интегрирования T . Например, в случае лоренцева распределения скоростей это соотношение имеет вид (см. также рис. 8.15) [1435]:

$$\frac{\sigma_s}{\langle I \rangle} = \left[\frac{\tau_c}{2T} \left\{ 1 - \exp\left(-\frac{2T}{\tau_c}\right) \right\} \right]^{1/2}. \quad (8.34)$$

Как и все временные методы измерения сдвигов частоты (спектроскопия корреляции фотонов, лазерная доплеровская спектроскопия и метод меняющихся во времени спеклов), LASCA испытывает аналогичные трудности, связанные с привязкой корреляционного времени τ_c к распределению скоростей рассеивателей. Она неочевидна и зависит от эффектов многократного рассеяния, размеров и формы рассеивающих частиц, не-newтоновости потока и негауссовости статистики из-за малого числа рассеивателей в объеме, где проводится измерение, спина рассеивателей и т. д. Из-за неопределенностей, вызванных указанными факторами, во всех этих методах обычно полагаются главным образом на калибровку, а не на абсолютные измерения. Одновременно во многих научных группах ведется работа по построению адекватных моделей и описанию однозначной связи между измеренным временем корреляции и распределением скоростей [82, 83, 1433–1445, 1451–1459, 1472–1480, 1484–1488].

Для измерения временной статистики флуктуирующих спекл-структур необходимо измерять интенсивность отдельного спекла. Чтобы сделать это точно, апертура

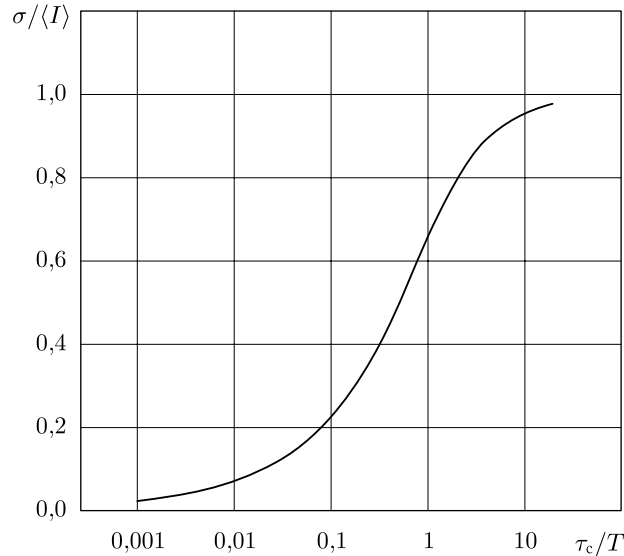


Рис. 8.15. Изменение контраста спеклов в зависимости от отношения времени декорреляции (τ_c) к времени интегрирования (T) для лоренцевой модели LASCA [1435]

приемника должна быть меньше среднего размера спекла. Иначе возникает некоторое пространственное усреднение, и статистика первого порядка нарушается (некоторая потеря точности может иметь место и во втором порядке). Для LASCA вопрос более сложен, потому что здесь вычисляется локальный контраст спеклов в квадрате пикселей, размер которого находится под контролем оператора. Чем больше квадрат, используемый для выборки, тем лучше статистика. Но важно также включить в выборку достаточное число не только пикселей, но и спеклов; если спеклы намного крупнее пикселей, как предполагалось выше, то в выборку попадает малое число спеклов. Это означает, что размер спекла, пригодного для измерений, еще более ограничен. Если он слишком мал, то на каждый пиксель приходит более одного спекла, что приводит к усреднению спеклов и потере измеряемого контраста. Если он слишком велик, в выборку попадает слишком мало спеклов для того, чтобы гарантировать хорошую статистику. Таким образом, размер спекла должен тщательно контролироваться. Этого можно достичь путем выбора определенной апертуры отображающей оптики, поскольку она одна определяет размер спеклов [1425], но при этом теряется контроль над количеством света, попадающего в камеру, когда скорость срабатывания затвора (другой управляющий параметр) уже определена, исходя из необходимого диапазона измеряемых скоростей. В случае малого динамического диапазона используемой камеры это может стать существенным ограничением и привести к необходимости дополнительного использования нейтральных фильтров, чтобы гарантировать пригодный для работы уровень освещения приемника, что не всегда технически просто сделать.

Другая проблема с LASCA — это невозможность реализовать полный диапазон значений контраста, который предсказывает теория. Стационарный объект должен давать контраст спеклов, равный единице ($\sigma_1 = \langle I \rangle$), в соответствии с хорошо известной статистической теорией спеклов и экспериментом). Полностью размытая спекл-структура от быстро движущихся рассеивателей должна иметь нулевой контраст. Например, модель Лоренца (см. соотношение (8.34) и рис. 8.15) предполагает, что

для данного времени интегрирования T динамический диапазон метода, соответствующий значениям контраста от 0,1 до 0,9 должен составлять около $2^{1/2}$ порядков величины по τ (и, следовательно, по скорости). На практике измеренные значения контраста достигали лишь 0,6 даже для стационарных случайных рассеивателей [83]. Одна из возможных причин — темновой ток ПЗС-камеры. Посредством некоторой предварительной обработки данных можно исключить влияние темнового тока и получить контраст для стационарной диффузно рассеивающей поверхности, равный 0,95, что очень близко к теоретическому значению 1,0 для полностью развитой спекл-структуры [1484]. Существуют и другие проблемы LASCA, связанные с собственной статистикой гауссова профиля лазерного пучка и нелинейностью ПЗС-камеры [1484]. Однако многие из этих проблем характерны также для лазерного доплеровского метода, фотонно-корреляционной спектроскопии и других методов, использующих изменение спеклов во времени.

Таким образом, LASCA представляет собой работающий в реальном времени полнополевой, неинвазивный и бесконтактный метод изображения потоков, таких как капиллярный кровоток [82, 83, 112, 1435, 1439, 1484, 1485–1488]. Он использует доступное оборудование и удобное для пользователя математическое обеспечение. В то же время лазерный доплеровский метод, спектроскопия корреляции фотонов и метод меняющихся во времени спеклов основаны на анализе флуктуаций интенсивности в одной точке, поэтому для получения полной картины потока обычно необходим тот или иной способ пространственного сканирования. У типичных сканирующих лазерных доплеровских систем время такого сканирования может составлять несколько минут. LASCA достигает аналогичной цели в течении одной экспозиции и выдает псевдоцветовую карту кровотока менее чем за секунду без необходимости сканирования. Основной недостаток LASCA — потеря разрешения, связанная с необходимостью усреднения по блоку пикселей с целью набора пространственной статистики, используемой в анализе. Однако преимущество работы в реальном времени без сканирования перевешивает проблемы потери разрешения, особенно в биомедицинских приложениях. Отметим, что появление сначала диодных линеек и матриц, а затем КМОП- (CMOS) камер, позволило отказаться от сканирования для всех упомянутых методов и существенно расширить возможности спекл-методов, в том числе предложить комбинированные методы с пространственно-временным усреднением [1439, 1440, 1443, 1444, 1490, 1491].

8.4.4. Диффузионно-волновая спектроскопия. Диффузионно-волновая спектроскопия (ДВС) — это особый класс исследований в области динамического рассеяния света, связанный с изучением динамики частиц в пределах очень коротких промежутков времени [73, 80, 81, 555, 1433, 1437, 1438, 1492–1495]. Фундаментальное отличие этого метода от спектроскопии квазиупругого рассеяния света заключается в том, что он применим в случае плотных сред с многократным рассеянием, что очень важно для биологических тканей. ДВС уникально подходит для измерений среднего размера частиц и их движения в мутной макроскопически однородной сильно рассеивающей среде. В последние годы ДВС стали называть более точно, как диффузионно-корреляционная спектроскопия (ДКС) [1495].

Несмотря на определенное сходство между экспериментами по ДВС и обычными экспериментальными схемами корреляционной спектроскопии оптического смешения (см. выражение (8.28)), теория ДВС основана на качественно отличной интерпретации распространения излучения в сильно рассеивающих средах. Предполагается, что благодаря многократному рассеянию каждый фотон, достигший точки наблюдения, испытывает большое число актов рассеяния N . Последовательные акты рассеяния, происходящие в момент времени t на рассеивающих частицах, расположенных в точ-

ках $r_1(t), r_2(t), \dots, r_i(t), \dots, r_N(t)$ среды, с волновыми векторами $k_1, k_2, \dots, k_i, \dots, k_N$, приводят к формированию поля $E(t)$, у которого полный сдвиг фазы $\Delta\phi(t)$ определяется как [1492]

$$\Delta\phi(t) = \sum_{i=0}^N k_i(t) [r_{i+1}(t) - r_i(t)], \quad (8.35)$$

$\Delta\phi(t)$ зависит от полной длины пути s каждого фотона, мигрирующего от точки источника r_0 то точки приема r_{N+1} (рис. 8.16):

$$s = \sum_{i=0}^N |r_{i+1}(t) - r_i(t)| = \sum_{i=0}^N \left(\frac{k_i}{|k_i|} \right) [r_{i+1}(t) - r_i(t)]. \quad (8.36)$$

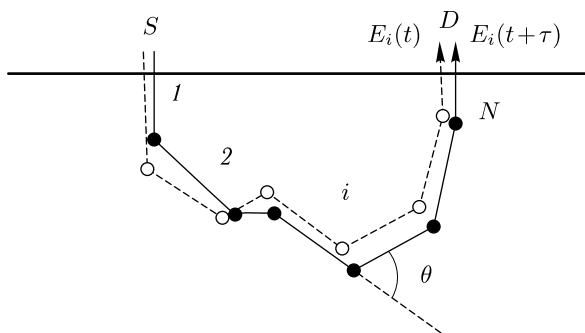


Рис. 8.16. Схема распространения когерентного излучения через случайно-неоднородную полубесконечную среду с сильным рассеянием, в которой свет идет от источника (S) к приемнику (D): \circ — положения рассеивающих частиц в момент времени t , \bullet — положения рассеивающих частиц в момент времени $t + \tau$

Величина s связана с числом актов рассеяния N соотношением $s = Nl_s$, где $l_s = (\mu_s)^{-1}$. В сильно рассеивающих средах, например коже человека, s можно рассматривать как статистически независимое случайное блуждание. Функция распределения путей миграции фотонов $p(s)$ в среде определяется как вероятность того, что свет покроеет оптический путь s , двигаясь от точки r_0 до точки r_{N+1} [1492]:

$$p(s) = \left(\frac{c}{4\pi s D} \right)^{3/2} \exp \left(- \frac{c|r_0 - r_{N+1}|^2}{4sD} \right). \quad (8.37)$$

Здесь D — коэффициент диффузии фотонов (см. соотношения (1.26) и (1.27)), а c — скорость света в среде.

Поле $E(t)$ интерферирует с полем $E(t + \tau)$, рассеянным на том же ряде рассеивающих частиц немного позже в момент времени $(t + \tau)$ (см. рис. 8.16). Время, необходимое фотону для прохождения всего оптического пути, короче характерного времени изменения положения рассеивающих частиц среды. Таким образом, в результате движения частиц разность фаз между полями $E(t)$ и $E(t + \tau)$ будет различной в разные моменты времени, т.е. флуктуирующей. Это предопределяет временные флуктуации интенсивности рассеянного излучения, зарегистрированного в дальней зоне. Картины флуктуаций интенсивности (спеклы) можно визуализировать на экране или обнаружить гомодинным приемником [1496].

Количественно указанные флуктуации описываются временной автокорреляционной функцией поля:

$$G_1(\tau) = \langle E^*(t + \tau)E(t) \rangle, \quad (8.38)$$

вычисляемой как [1497]

$$G_1(\tau) = I_0 \sum_{j=0, \infty} p(s_j) \exp\left(-\frac{N}{6} \langle q^2 \rangle \langle \Delta r^2(\tau) \rangle\right), \quad (8.39)$$

где $I_0 = \langle |E(t)|^2 \rangle$, $\langle \cdot \rangle$ — среднее по ансамблю, q — разность волновых векторов k_i и k_{i+1} :

$$q = |k_i - k_{i+1}| = 2k_0 \sin \frac{\theta}{2}. \quad (8.40)$$

Соответственно,

$$\langle q^2 \rangle = \langle 4k_0^2(1 - \cos \theta) \rangle = 2k_0(1 - \langle \cos \theta \rangle) = 2k_0 \frac{l_s}{l_{tr}}, \quad (8.41)$$

где $k_0 = |k_i| = |k_{i+1}|$, θ — угол между направлениями k_i и k_{i+1} (т. е. угол рассеяния в i -м акте), а l_{tr} — транспортная длина свободного пробега фотона (которая соответствует среднему расстоянию, на котором фотон полностью теряет первоначальное направление своего движения) (см. формулу (1.16)).

В элементарной ситуации, когда частицы движутся независимо друг от друга, координаты их положения представляются гауссовыми случайными величинами, а изменение импульса фотона при каждом акте рассеяния не зависит от положения частицы, зависящая от пути нормированная автокорреляционная функция записывается как [80]

$$g_1(\tau, s) = \exp\left\{-\frac{4\pi^2}{3\lambda^2} \langle \Delta r^2(\tau) \rangle \frac{s}{l_{tr}}\right\}. \quad (8.42)$$

Здесь s — полная длина пробега фотона.

В плотных средах имеем $s \gg l_{tr}$. Следовательно, в отличие от случая однократного рассеяния, корреляционная функция $g_1(\tau, s)$ чувствительна к движению частицы в масштабе длин порядка $\lambda[s/l_{tr}]^{-1/2}$, что в общем случае гораздо меньше λ . Таким образом, автокорреляционная функция ДВС затухает гораздо быстрее, чем аналогичные функции, используемые в спектроскопии квазиупругого рассеяния.

Подставляя соотношение (8.41) в (8.39), получаем, что нормированная временная автокорреляционная функция поля $g_1(\tau) = G_1(\tau)/\langle |E(t)|^2 \rangle$ имеет вид

$$g_1(\tau) = \int_0^\infty p(s) \exp\left(-\frac{1}{3} k_0^2 \langle \Delta r^2(\tau) \rangle \frac{s}{l_{tr}}\right) ds. \quad (8.43)$$

Видно, что, как и в обычном методе динамического рассеяния света [78, 79], изменение $g_1(\tau)$ определяется через средний квадрат смещения частиц $\langle \Delta r^2(\tau) \rangle$ с той лишь разницей, что наклон $g_1(\tau)$ растет пропорционально среднему числу рассеивающих частиц. Йод и др. проверили это непосредственно с использованием импульсного лазера и стробирования уширенного импульсного отклика для селекции фотонов по длинам пути [1498]. При непрерывном облучении формула (8.43) справедлива в предположении, что длина когерентности лазера много больше ширины распределения длин пути фотонов.

Для многократно рассеивающей системы перенос временной корреляционной функции поля достаточно точно моделируется корреляционным уравнением диффузии [1499], т. е.

$$(D\nabla^2 - c\mu_a - 2c\mu'_s D_B k_0^2 \tau) \cdot G_1(\mathbf{r}, \tau) = -cS(\mathbf{r}). \quad (8.44)$$

Здесь функция $G_1(\mathbf{r}, \tau)$ определяется формулой (8.38) и является функцией положения \mathbf{r} и времени корреляции τ ; она имеет размерность интенсивности (энергия на единицу площади в единицу времени); D — коэффициент диффузии фотонов, k_0 — волновое число света в среде, c — скорость света в среде, $D_B \equiv D_T = k_B T / 6\pi\eta r_h$ (см. формулу (8.30)), а $S(\mathbf{r})$ — распределение источников света с размерностью числа фотонов на единицу объема в секунду. Заметим, что аналогично коэффициенту μ_a , описывающему потери корреляции из-за поглощения фотонов, $2\mu'_s D_B k_0^2 \tau$ представляет собой потери из-за утраты корреляции в динамических процессах. Корреляционное уравнение диффузии (8.44) верно для рассеивающих сред с динамической рассеяния, подчиняющейся законам броуновского движения (D_B). Когда $\tau = 0$, нет «динамического поглощения» и (8.44) сводится к стационарному уравнению диффузии фотонов (1.17).

Корреляционное уравнение диффузии может быть модифицировано для учета других динамических процессов. В случаях случайного и сдвигового потока корреляционное уравнение диффузии принимает вид [1500, 1501]

$$\left(D\nabla^2 - c\mu_a - \frac{1}{3} c\mu'_s k_0^2 \langle \Delta r^2(\tau) \rangle - \frac{1}{3} c\mu'_s k_0^2 \langle V^2 \rangle \tau^2 - \frac{1}{15} c\mu_s'^{-1} \Gamma_{\text{eff}}^2 k_0^2 \tau^2 \right) G_1(\mathbf{r}, \tau) = -cS(\mathbf{r}). \quad (8.45)$$

Здесь четвертый и пятый члены в левой части возникают из-за случайного и сдвигового потока соответственно. $\langle V^2 \rangle$ — второй момент распределения частиц по скоростям (в предположении, что это распределение изотропно и гауссово), а Γ_{eff} — эффективная скорость сдвига. Заметим, что «динамическое поглощение» для потока в уравнении (8.45) растет как τ^2 , а не линейно по τ , как для броуновского движения, поскольку частицы в потоке движутся по баллистическим траекториям; кроме того, D_B , $\langle V^2 \rangle$ и Γ_{eff} появляются раздельно, поскольку различные динамические процессы не коррелированы. Форма члена, описывающего «динамическое поглощение» для случайного потока, связана с соответствующим членом для броуновского движения. Они оба имеют вид $\frac{1}{3} c\mu'_s k_0^2 \langle \Delta r^2(\tau) \rangle$, где $\langle \Delta r^2(\tau) \rangle$ — среднее квадратичное отклонение рассеивающей частицы. Для броуновского движения $\langle \Delta r^2(\tau) \rangle = 6D_B \tau$, а для случайного потока $\langle \Delta r^2(\tau) \rangle = \langle V^2 \rangle \tau^2$.

Схема экспериментальной установки для ДВС представлена на рис. 8.17. Она может состоять из многомодового оптического волоконного световода (ВС), транспортирующего лазерный пучок с достаточной длиной когерентности (большей или равной полной длине пробега фотона s в условиях многократного рассеяния). Лазерное излучение, диффузно рассеянное в среде, затем собирается уже с помощью одномодового ВС, которое позволяет зарегистрировать флуктуации интенсивности света в пределах области пространственной когерентности рассеянного излучения с помощью достаточно чувствительной приемной системы, включающей фотоумножитель (ФЭУ) или лавинный фотодиод (ЛФД), которые работают в режиме счета фотонов и связаны с цифровым многоканальным электронным автокоррелятором. Выходной сигнал автокоррелятора представляет собой временную автокорреляционную функцию флуктуаций интенсивности $g_2(\tau)$ (формула (8.27)), которая связана с нормированной временной автокорреляционной функцией поля $g_1(\tau)$ соотношением

Зигерта (формула (8.28)). Дальнейший анализ найденной функции $g_1(\tau)$ может быть выполнен так же, как при однократном рассеянии, где автокорреляционная функция оценивается путем ее представления в полулогарифмическом масштабе.

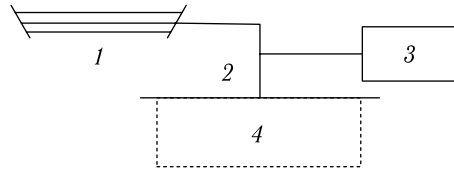


Рис. 8.17. Схема экспериментальной установки для ДВС: 1 — лазер с длиной когерентности не меньше, чем полная длина пути фотона s при многократном рассеянии; 2 — волоконно-оптический датчик — многомодовое облучающее волокно и одномодовое приемное волокно; 3 — приемная система — фотоэлектронный умножитель (РМТ) или лавинный фотодиод (APD), работающие в режиме счета фотонов и связанные с цифровым многоканальным автокоррелятором; 4 — биоткань, перфузированная кровью

8.5. Конфокальная микроскопия

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, использующая конфокальный принцип (с двумя оптически сопряженными диафрагмами или щелями малого размера, расположенными соответственно в плоскости предметов и изображений) для селекции рассеянных фотонов, приходящих из данного объема (рис. 8.18), представляет собой хорошо разработанный метод получения изображений для медицинских исследований [1, 3, 28, 76, 120, 122, 168, 351, 1110–1112, 1124, 1125, 1128, 1167, 1168, 1176, 1177, 1187, 1225, 1363, 1381, 1502–1529]. Конфокальная микроскопия позволяет получать трехмерные изображения *in vivo* биологических тканей, например кожи или ретины, на субклеточном уровне. Пространственное разрешение и быстродействие микроскопа вполне достаточно не только для распознавания различных типов клеток биоткани, но и для одновременного наблюдения движущихся клеток крови в микрососудах [972, 1512]. Конфокальное «оптическое секционирование» используется в различных видах микроскопии биотканей и клеток, таких как флуоресцентная [1110–1112] и спектроскопия комбинационного рассеяния [1167, 1168, 1176, 1177, 1187], которые уже были описаны в предыдущих главах, и отражательная микроскопия [1128, 1506, 1512, 1526], принципы которой будут изложены в этом разделе.

В обычном микроскопе поперечное и аксиальное разрешение не являются независимыми. Большим преимуществом конфокального микроскопа является то, что его аксиальное разрешение существенно выше, чем у обычного микроскопа, в результате чего появляется возможность «оптического секционирования», т. е. получения тонких послойных изображений [1128, 1502–1505]. Поперечное разрешение конфокального микроскопа обратно пропорционально числовой апертуре (NA) линзы объектива микроскопа [1512]

$$\Delta x = \frac{0,46\lambda}{NA}. \quad (8.46)$$

Теоретическое поперечное разрешение на длине волны $\lambda = 1064$ нм составляет $\Delta x = 0,4$ мкм при $NA = 1,2$ для линзы объектива с водной иммерсией. Аксиальное разрешение более чувствительно к числовой апертуре линзы объектива микроскопа. Поэтому для получения максимального аксиального разрешения и, следовательно, наилучшего оптического секционирования, предпочтительно использовать объективы

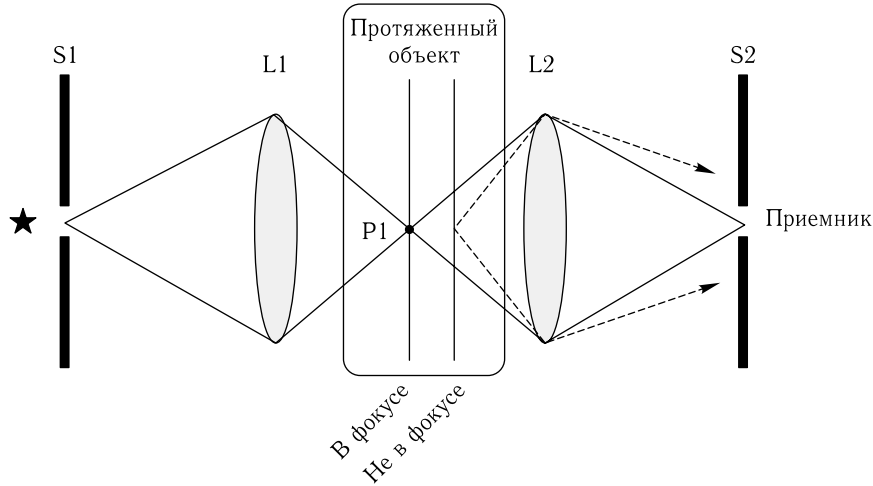


Рис. 8.18. Принцип конфокального микроскопа [1514]

микроскопа с наибольшей числовой апертурой. Полная ширина по поперечному аксиальному распределению энергетической освещенности определяет аксиальное разрешение или толщину оптического секционирования [1512]:

$$\Delta z = \frac{1,4n\lambda}{(\text{NA})^2}, \quad (8.47)$$

где n — показатель преломления иммерсионной среды линзы объектива. Теоретическое аксиальное разрешение на длине волны $\lambda = 1064$ нм составляет $\Delta z = 1,4$ мкм при $\text{NA} = 1,2$ для линзы объектива с водной иммерсией и $n = 1,35$. Поперечное Δx и аксиальное Δz разрешения конфокального микроскопа, измеренные для рассеивающей среды с $n = 1,35$ при $\lambda = 1064$ нм и числовой апертуры линзы объектива $\text{NA} = 1,2$ оказались равными 0,7 мкм и 3 мкм соответственно [1512]. Различия в величинах теоретического и измеренного разрешения можно отнести за счет сферической аберрации. На более короткой длине волны разрешение должно быть существенно выше, так на длине волны 442 нм для линзы микроскопа с числовой апертурой $\text{NA} = 1,4$ (масляная иммерсия) поперечное разрешение было равно 0,14 мкм, а аксиальное разрешение, или разрешение по глубине, — 0,23 мкм [1128].

Сравним поперечное разрешение обычного (conv) и конфокального (conf) микроскопов [1128, 1504]. Если наблюдается изображение отдельной точки образца в отраженном свете с помощью обычной микроскопии, распределение интенсивности изображения дается выражением

$$I_{\text{conv}}(r) = \left(\frac{2J_1\left(\frac{2\pi}{\lambda} \text{NA} \cdot r\right)}{\frac{2\pi}{\lambda} \text{NA} \cdot r} \right)^2, \quad (8.48)$$

где J_1 — функция Бесселя первого порядка, а r — поперечное расстояние в фокальной плоскости. Для конфокального случая в присутствии диафрагмы малого сечения

распределение интенсивности изображения описывается формулой

$$I_{\text{conf}}(r) = \left(\frac{2J_1 \left(\frac{2\pi}{\lambda} \text{NA} \cdot r \right)}{\frac{2\pi}{\lambda} \text{NA} \cdot r} \right)^4. \quad (8.49)$$

Для конфокального случая изображение в 1,4 раза более резкое по сравнению с обычным микроскопом.

Рассмотрим аксиальное разрешение конфокального микроскопа для изображения как точек, так и плоскостей [1128, 1504, 1505]. Если конфокальный микроскоп сканировать аксиально так, чтобы интенсивность света, отраженного от плоского зеркала, регистрировалась как функция смещения зеркала в направлении фокальной плоскости, то интенсивность отраженного света дается простой параксиальной теорией в виде [1505]

$$I_{\text{conf}}(z) = \left[\frac{\sin \frac{v(z)}{2}}{\frac{v(z)}{2}} \right]^2. \quad (8.50)$$

Символом $v(z)$ обозначена нормированная аксиальная координата, связанная с настоящей аксиальной координатой z соотношением

$$v = \frac{8\pi}{\lambda} n z \sin^2 \left(\frac{\alpha}{2} \right), \quad (8.51)$$

где $n \sin \alpha = \text{NA}$. В фокальной плоскости интенсивность отраженного сигнала максимальна. Эти соотношения верны для отображения плоских отражателей. Для точечных или линейных отражателей уравнение (8.50) принимает вид

$$I_{\text{conf}}(z) = \left[\frac{\sin \frac{v(z)}{2}}{\frac{v(z)}{2}} \right]^4. \quad (8.52)$$

Оптическое секционирование выражено слабее для точки или линии, чем для плоскости. Все эти формулы относятся только к светлопольному изображению в режиме отражения. Для флуоресцентного изображения, которое является некогерентным, справедливы другие формулы [1128]. Следует отметить, что качество изображения зависит не только от разрешения, но в очень большой степени и от контраста изображения.

Принцип подавления рассеянного излучения от точек вне фокальной плоскости в конфокальном микроскопе показан на рис. 8.1 и 8.19. Отраженный свет от фокальной плоскости проходит через точечную диафрагму и почти полностью достигает приемника. Пятно отраженного света, приходящего не из фокуса системы (рассеянного в объеме), намного больше диафрагмы, и лишь незначительная часть интенсивности такого света проходит через точечную диафрагму и регистрируется. Важную проблему для конфокальной микроскопии представляют оптические aberrации, вносимые образцом и самим прибором [1128].

Высокий контраст изображения и высокое пространственное разрешение отражательной конфокальной микроскопии (ОКМ) достигаются благодаря зондированию малого (10–100 мкм³) объема биоткани. Локализация полезного сигнала в исследуемом объеме столь малых размеров становится возможной в результате взаимного оптического согласования источника лазерного излучения, исследуемого объема и фотоприемника. Поле зрения источника света и фотоприемника ограничено точечными диафрагмами, которые расположены в плоскости предмета и изображения (рис. 8.19)

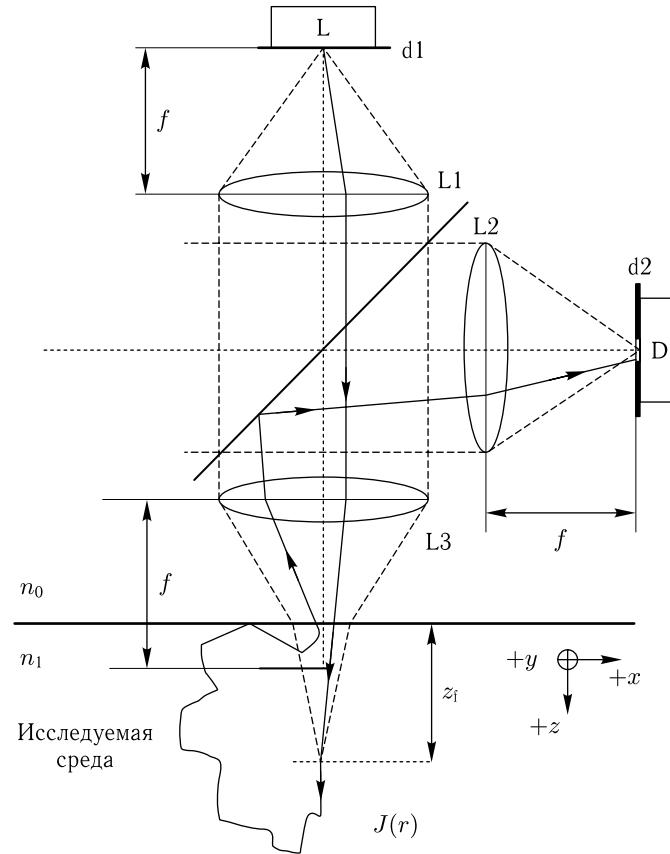


Рис. 8.19. Схема конфокального зондирования: L1, L2 и L3 — короткофокусные линзы ($f = 8$ мм), образующие попарно низкоапертурный коллиматор; d1 и d2 — ограничивающие диафрагмы диаметром 10 мкм; z_f , глубина погружения фокальной точки в исследуемую среду; L — лазерный источник; D — приемник оптического излучения; n_0 и n_1 — показатели преломления внешней и исследуемой сред [1521]

[1521]. Если глубина проникновения z_f фокуса линзы внутрь биоткани не превышает трех–четырёх длин свободного пробега фотона l_{ph} (см. формулу (1.8)), то такие точечные диафрагмы гарантируют, что фотоны, отраженные точно назад биотканью и клеточными компонентами внутри зондируемого объема (так называемые баллистические фотоны), преобладают в регистрируемом сигнале. Именно эти фотоны несут необходимую информацию, позволяющую реконструировать внутреннюю структуру исследуемой среды.

С ростом z_f , т. е. когда фокус проникает глубже в рассеивающую среду, доля баллистических фотонов в детектируемом сигнале снижается, в то время как доля фотонов, рассеянных средой, увеличивается. При типичных условиях эксперимента с биологическими тканями ОКМ позволяет различить баллистические фотоны на фоне множества рассеянных средой фотонов, пока z_f не станет больше l_{ph} в 5–8 раз. Другими словами, из-за интенсивного многократного рассеяния света, характерного для большинства биотканей, ОКМ позволяет получить изображение клеточной

структуры, например кожи, расположенной на глубине не более 300–400 мкм [1502, 1510–1512].

Рисунок 8.20 показывает результаты моделирования пространственного распределения $J(r)$ плотности вероятности эффективных оптических путей фотонов методом Монте-Карло, выполненного для конфокальной схемы зондирования с фокусом линзы объектива, погруженным в однородную рассеивающую среду на глубину $z_f = 300$ мкм. Параметры ОКМ представлены на рис. 8.19. Как и ожидается, при глубине погружения z_f не более 3–4 длин свободного пробега фотона ($\mu_s \leq 100 \text{ см}^{-1}$, что эквивалентно, $l_{ph} \geq 100$ мкм), в пространственном распределении плотности эффективных оптических путей фотонов наблюдается ясно выраженная фокусировка фотонов на глубине 300 мкм (рис. 8.20 а).

Если z_f достигает 8–20 средних длин свободного пробега ($\mu_s = 266\text{--}400 \text{ см}^{-1}$ и, соответственно, $l_{ph} = 25\text{--}37,5$ мкм), то тенденция к фокусировке излучения микроскопа в ткани все еще сохраняется (рис. 8.20 б). Однако центральное фокальное пятно намного больше, чем в случае менее рассеивающей среды (рис. 8.20 а). По мере дальнейшего увеличения коэффициента рассеяния среды ($\mu_s \geq 1000 \text{ см}^{-1}$) и соответствующего сокращения средней длины свободного пробега фотона ($l_{ph} \leq 10$ мкм) падающее излучение микроскопа оказывается дефокусированным, хотя его прямолинейная направленность еще сохраняется неизменной (рис. 8.20 в).

Эти данные (рис. 8.20) ясно показывают возможность локализации сфокусированного зондирующего лазерного излучения в однородной, многократно и анизотропно рассеивающей ($g = 0,9$) и слабо поглощающей ($\mu_a = 0,1 \text{ см}^{-1}$) среде при ее зондировании с помощью ОКМ.

Для калибровки конфокальных микроскопов служат специально разработанные фантомы биотканей (см., например, [1225]).

8.6. Оптическая когерентная томография

Последние два десятилетия интенсивно развиваются методы оптической интерферометрии и томографии биотканей и органов с использованием частично когерентного света [1, 3, 8, 17, 18, 28, 45, 76, 77, 84, 102, 108–111, 116, 126, 127, 129, 135, 136, 138, 139, 142, 146, 147, 156, 196, 355, 362, 555, 624–636, 711, 751, 887, 1163, 1226–1229, 1234, 1300–1302, 1305–1307, 1331–1341, 1361, 1362, 1388, 1404–1417, 1530–1568]. В связи с важностью таких исследований, обусловленной перспективами ранней неинвазивной диагностики заболеваний, для обсуждения проблем в данной области науки организована даже специальная ежегодная международная конференция [8, 45, 116]. Оптическая когерентная томография (ОКТ) была впервые продемонстрирована в 1991 г. [1530]. Изображения сетчатки глаза человека и атеросклеротической бляшки были получены *in vitro* как примеры визуализации в прозрачных слабо рассеивающих средах и в средах с сильным рассеянием. Краткий исторический обзор и анализ основ низкокогерентной интерферометрии и томографии представлен Ферчером и сотрудниками [84, 142, 1532, 1533], которые также обсудили офтальмологические приложения этих методов. Обзор ранних этапов развития оптической низкокогерентной рефлектометрии и некоторых недавних биомедицинских приложений дан также Мастерсом [1562]. Опубликовано несколько монографий и справочных пособий, посвященных полностью или в значительной степени описанию принципов и биомедицинских приложений ОКТ [127, 135, 136, 146, 147, 156, 196].

В литературе используются различные термины для обозначения этого метода исследований: двухлучевая когерентная интерферометрия или лазерная доплеровская интерферометрия, оптическая когерентная томография (ОКТ) или оптическая

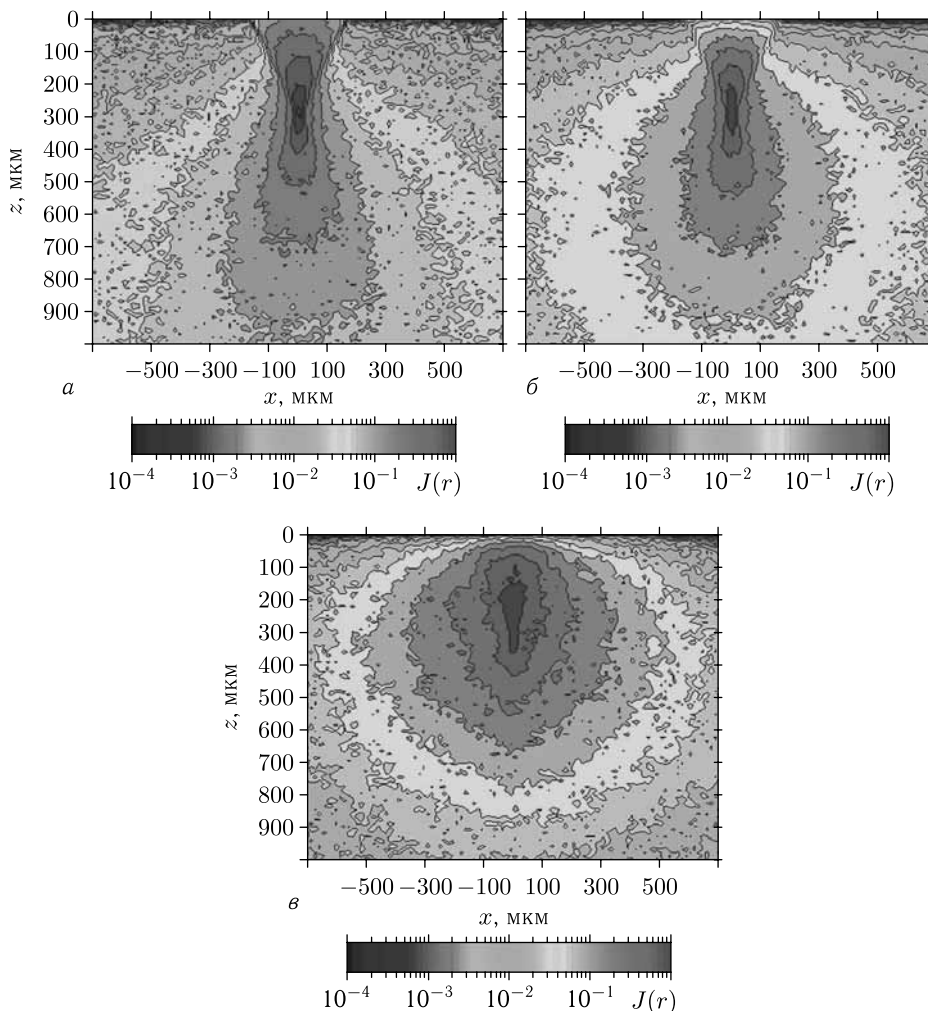


Рис. 8.20. Пространственное распределение $J(r)$ плотности вероятности эффективных оптических длин пути фотона, рассчитанные для однородной ($n_1 = 1,4$), многократно ($\mu_s = 100$ (а), 266 (б) и 1000 см^{-1} (в)) и анизотропно ($g = 0,9$) рассеивающей и слабо поглощающей ($\mu_a = 0,1 \text{ см}^{-1}$) среды, исследуемой с помощью конфокальной микроскопии отражения в геометрии, представленной на рис. 8.19, $z_i = 300 \text{ мкм}$ [1521]

когерентная рефлектометрия. Томографическая схема отличается от интерферометрической дополнительным поперечным сканированием, которое позволяет получать топограммы различных слоев биоткани.

ОКТ аналогична ультразвуковой визуализации с тем лишь отличием, что вместо звуковых волн измеряется интенсивность отраженного от образца видимого или инфракрасного света. Стробирование по времени используется таким образом, что время, необходимое для прихода назад отраженного света, или время задержки «эха», используется для определения интенсивности отраженного света как функции глубины. В отличие от ультразвука, времена задержки порядка фемтосекунды, обусловленные большой скоростью распространения света, не могут быть измерены

средствами электроники. Поэтому для измерения таких ультракоротких времен задержки света, отраженного от различных по глубине слоев образца, привлекается оптическая времяпролетная методика. Для решения этой задачи в ОКТ используется оптический интерферометр, освещаемый низкокогерентным источником света.

Обычно метод реализуется с использованием двухлучевого интерферометра Майкельсона. Если длина пути света в опорном плече меняется с постоянной линейной скоростью v , то сигнал, возникающий из-за интерференции света, рассеянного назад (отраженного) от образца, и света в опорном плече, модулируется на доплеровской частоте

$$f_D = \frac{2v}{\lambda}. \quad (8.53)$$

Благодаря малой длине когерентности источника света

$$l_c = \frac{2 \ln(2)}{\pi} \cdot \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda}, \quad (8.54)$$

где $\Delta\lambda$ — ширина полосы источника света с гауссовым профилем линии, доплеровский сигнал вызывается светом, рассеянным назад лишь в очень малой области (с размером порядка длины когерентности l_c), соответствующей текущему значению оптической длины пути в опорном плече. При использовании многомодового диодного лазера или суперлюминесцентного диода (СЛД) с шириной полосы 15–60 нм ($\lambda \sim 800\text{--}860$ нм) продольное разрешение находится в интервале 5–20 мкм. Для титан-сапфирового лазера с длиной волны 820 нм ширина полосы может достигать 140 нм. Соответствующее разрешение составляет 2,1 мкм [45, 84].

Типичная схема двухлучевого интерферометра Майкельсона с низкокогерентным источником, а также принцип действия такого устройства показаны на рис. 8.21, иллюстрирующем офтальмологические применения данного метода [1532, 1533]. Рас-

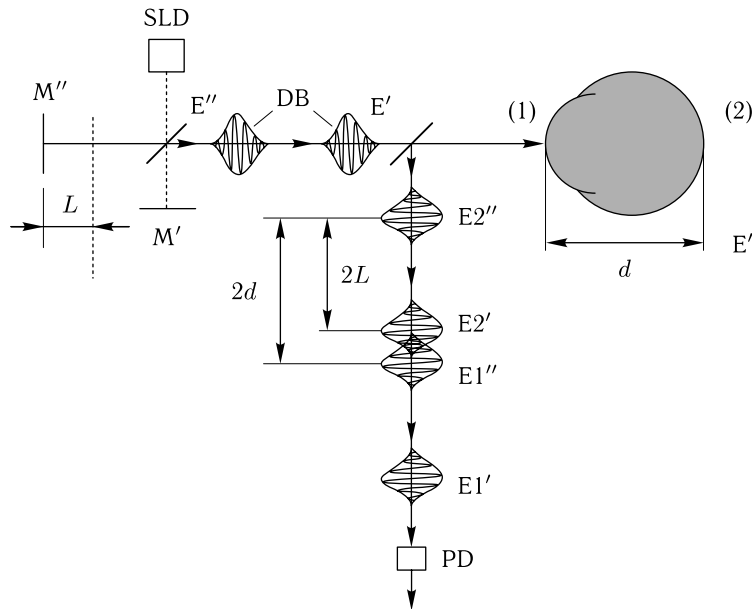


Рис. 8.21. Двухлучевой интерферометр Майкельсона с частично-когерентным источником возбуждения для офтальмологических приложений [1532, 1533]: SLD — суперлюминесцентный диод; M' и M'' — зеркала интерферометра; DB — двойной пучок; PD — фотоприемник

смотрим интерференцию света, отраженного от фронтальной поверхности роговицы глаза (1) и пигментного эпителия сетчатки (2). При данных условиях каждый из двух пучков E' и E'' расщепляется на два пучка, E'_1, E'_2 и E''_1, E''_2 . Предположим, что d — геометрическое расстояние между отражающими поверхностями глаза. Тогда компоненты поля характеризуются дополнительными временами задержки и полное поле световых пучков, отраженных от глаза, можно записать как

$$E(t) = E_1(t) + E_2(t - \tau) = E'_1(t) + E''_1(t - \delta) + E'_2(t - \tau) + E''_2(t - \delta - \tau), \quad (8.55)$$

где $\tau = 2nd/c_0$, а n — показатель преломления среды между двумя отражающими поверхностями. При использовании квазимонохроматических источников интерферирующие пучки состоят из групп волн и n следует заменить групповым показателем преломления

$$n_g = n - \lambda \frac{dn}{d\lambda}. \quad (8.56)$$

Нужно принять во внимание, что длина когерентности света увеличивается в диспергирующей среде и пространственное разрешение снижается. Это особенно заметно для широкополосных лазерных систем. В частности, для титан-сапфирового лазера с шириной полосы 140 нм длина когерентности равна 2,1 мкм в воздухе (в отсутствии дисперсии) и 60 мкм в воде (в слое толщиной 24 мм) [1548]. Согласно работе [1548], длина когерентности в среде есть

$$l'_c = \left[l_c^2 + \left(\frac{dn_g}{d\lambda} d\Delta\lambda \right)^2 \right]^{1/2}, \quad (8.57)$$

где d — толщина среды. Таким образом, мы обнаруживаем, что если толщина зондируемой биоткани невелика (порядка 1 мм), добавка к длине когерентности из-за дисперсии остается малой. Например, для титан-сапфирового лазера с наибольшей шириной полосы эта добавка того же порядка, что и длина когерентности в свободном пространстве.

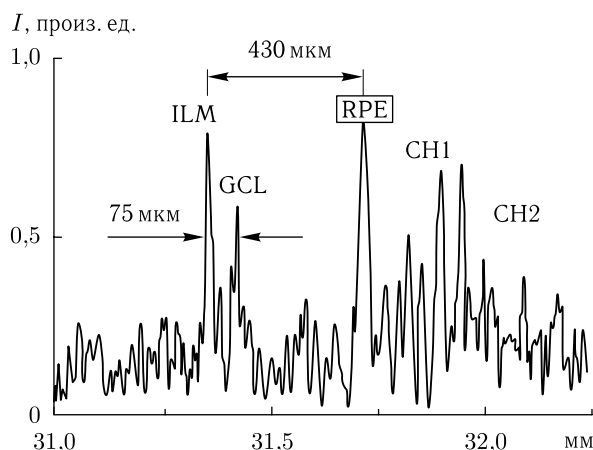


Рис. 8.22. Сигнал интерференции (в произвольных единицах), полученный при зондировании *in vivo* глазного дна человека. Длина волны излучения суперлюминесцентного диода 825 нм, а его длина когерентности 12 мкм [1532, 1533]; ILM — внутренний граничный слой; GCL — слой ганглия; RPE — пигментный эпителий сетчатки; CH1 и CH2 — слои сосудистой оболочки.

Расстояние измерено относительно роговицы

Рисунок 8.22 представляет типичный вид интерференционного сигнала, соответствующего зондированию *in vivo* глазного дна человека с использованием частично когерентных пучков в интерферометре, схематически изображенном на рис. 8.21. Анализируя такой сигнал, можно очень точно определить толщину слоя нервных волокон (расстояние между ILM и GCL, 75 мкм). Наряду с геометрическими параметрами, частично-когерентная интерферометрия обеспечивает возможность мониторинга оптических параметров тканей (коэффициенты поглощения и рассеяния, показатель преломления). В свою очередь, связь этих параметров с физиологическим состоянием ткани позволяет получать надежные диагностические данные как в офтальмологии, так и в других областях медицины.

Было показано, что пространственное разрешение оптических интерференционных методов примерно на порядок выше, чем у обычно используемых ультразвуковых диагностических методов. Кроме того, благодаря бесконтактности интерференционная методика не требует анестезии глаза. Результаты измерений, полученные с использованием интерференционного метода, характеризуются высокой воспроизводимостью и могут легко интерпретироваться даже неспециалистами [1532, 1533]. Кроме определения геометрических и оптических параметров заднего сегмента глаза человека (толщина глазного дна и его компонентов), низкокогерентная интерферометрия может быть успешно использована для измерения толщины роговицы с разрешением порядка 1,6–3,5 мкм, что необходимо при мониторинге во время обычных и лазерных хирургических операций с целью изменения рефракции роговицы, для определения различных патологий роговицы, а также для измерения глубины передней камеры и аксиальной протяженности глаза. Последняя возможность особенно важна при хирургическом лечении катаракты, поскольку ошибка в 0,2–0,3 мм в определении аксиальной протяженности глаза порождает ошибку в рефракции глаза около одной диоптрии [1532, 1533].

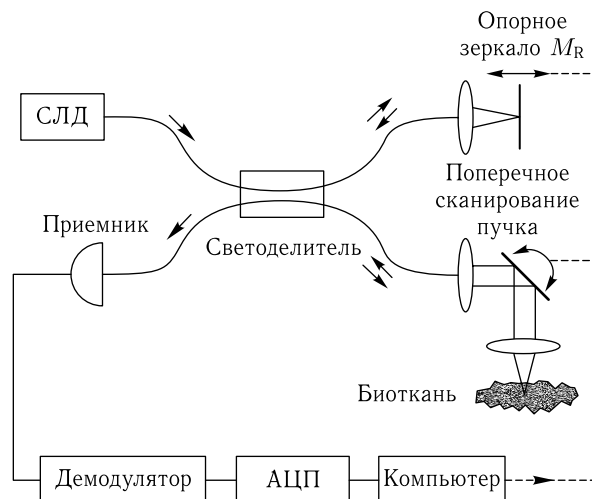


Рис. 8.23. Типичная волоконно-оптическая система ОКТ. Свет от суперлюминесцентного диода (СЛД) расщепляется делителем пучка на опорный (гетеродинный) и сигнальный пучок, падающий на исследуемую среду (биоткань). Отраженное поле складывается с полем опорного пучка, отраженного от продольно сканируемого опорного зеркала, суперпозиция полей регистрируется приемно-демодулирующей системой [1568]

ОКТ можно описать также на основе принципов гетеродинной техники [1568]. На рис. 8.23 показана типичная волоконно-оптическая схема, в которой два пучка — сигнальный и гетеродинный — генерируются широкополосным источником, таким как СЛД. Сигнальный пучок падает на образец, затем пропущенный или рассеянный свет складывается с гетеродинным пучком на балансном детекторе. Благодаря большой ширине спектра излучения и, следовательно, малой продольной длине когерентности, свет, приходящий с образца, и гетеродинный пучок интерферируют только тогда, когда их разность хода укладывается в длину когерентности света. При увеличении длины пути гетеродинного пучка на Δl с помощью зеркала в опорном плече M_R этот пучок будет интерферировать только с теми частями сигнального поля, которые прошли то же расстояние Δl в среде. Таким образом, вклады в сигнальное поле от фотонов, прошедших разные длины пути в образце, разделяются. На практике зеркало опорного пучка движется с постоянной скоростью и одновременно записывается гетеродинный сигнал биений, возникающий из-за доплеровского сдвига частоты опорного пучка при отражении от движущегося зеркала (см. формулу (8.53)). Перемещая лазерный пучок по двумерному растру и выполняя вертикальное сканирование в каждой точке, можно получить трехмерное изображение.

На рис. 8.24 *a* показан пример модулированного во времени интерференционного сигнала, зарегистрированного фотоприемником. Регистрируемый переменный сигнал подвергается полосовой фильтрации с центром на доплеровской частоте, затем он выпрямляется и пропускается через фильтр нижних частот. На выходе этого фильтра получается огибающая модулированного по времени переменного интерференционного сигнала, эквивалентная амплитуде кросс-корреляции. Рисунок 8.24 *б* дает пример регистрируемой огибающей, соответствующей рис. 8.24 *a*.

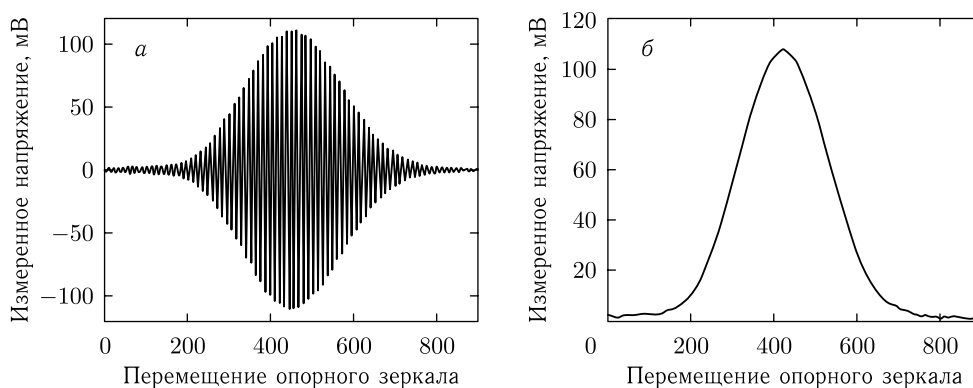


Рис. 8.24. Сигналы на выходе низкокогерентного интерферометра: *a* — модулированная во времени переменная составляющая интерференционного сигнала; *б* — соответствующий сигнал после демодуляции (амплитуда кросс-корреляции, т. е. огибающая) [1336]

ОКТ выполняет послойную визуализацию путем измерения временной задержки и величины оптического «эха» в различных поперечных положениях, для которой существенно использование принципа селекции фотонов с помощью низкокогерентной интерферометрии. Послойное изображение получается при выполнении последовательности быстрых аксиальных измерений в каждой точке в процессе поперечного сканирования падающего пучка по образцу (см. рис. 8.25). Результатом является двумерный массив данных, представляющий величину оптического отражения или

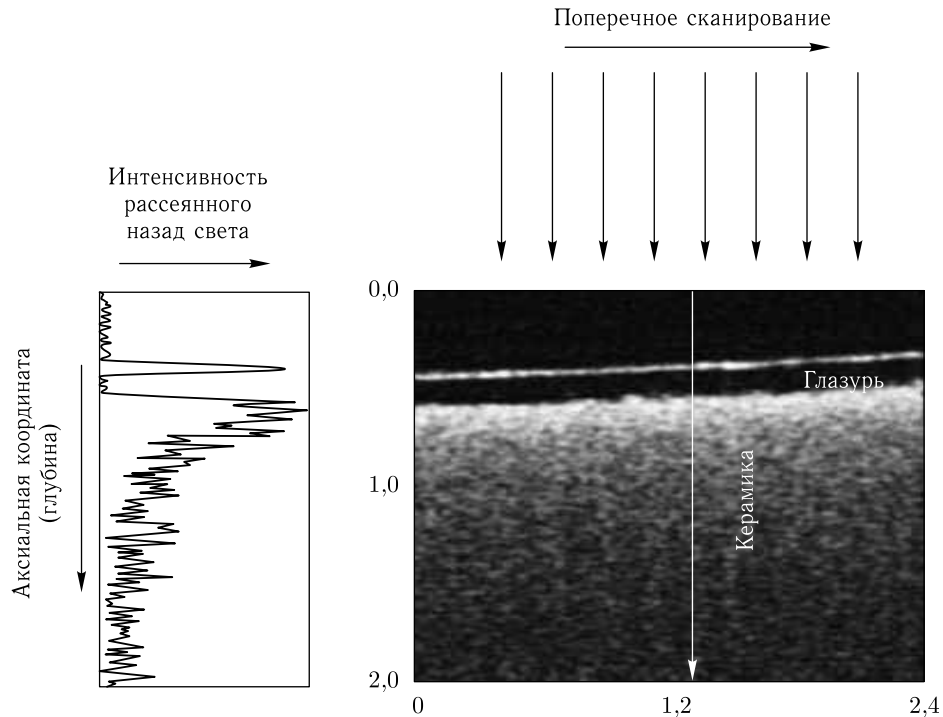


Рис. 8.25. ОКТ-изображение (справа внизу) генерируется посредством измерения времени задержки и величины сигнала интенсивности света, рассеянного назад (слева), для различных поперечных положений (сверху). В качестве примера представлено ОКТ-изображение керамического материала с глазурью, моделирующего твердые биоткани (зуб или кость) [1336]

рассеяния назад от данной плоскости поперечного сечения в толще образца. Системы на волоконно-оптических разветвителях, технология которых хорошо разработана в телекоммуникационной индустрии, представляются наиболее удачными для ОКТ-визуализации биологических тканей, поскольку они могут быть интегрированы почти во все ныне доступные медицинские средства получения изображений, в частности эндоскоп и микроскоп [108, 109, 111, 1306, 1416]. Рисунок 8.23 показывает пример оптоволоконного варианта ОКТ.

В литературе описаны многочисленные волоконно-оптические системы ОКТ (см., например, работы [1, 108, 109, 111, 127, 136, 142, 146, 147, 156, 196]). В этих системах свет от низкокогерентного источника делится с помощью волоконно-оптического разветвителя. Одна половина направляется по одномодовому ВС на опорное зеркало. Оставшаяся половина направляется в образец через соответствующую фокусирующую оптику. Дистальный конец ВС в пробном плече выполняет двойную роль как когерентный приемник света и как пространственный фильтр, аналогичный конфокальной точечной диафрагме. Поскольку в сигнал интерференции дают свой вклад постоянная составляющая и генерируемый в опорном плече шум интенсивности, система предрасположена к избыточному фотонному шуму. Один из путей снижения такого типа шума — использование балансной схемы детектирования, в которой фоновые шумы компенсируются при вычитании фототоков, генерируемых двумя фотоприемниками [1336, 1568]. При этом полезные сигналы интерференции на выходе приемников складываются, поскольку они меняются в противофазе.

Преимуществом ОКТ является возможность получать изображения с предельно высоким аксиальным разрешением независимо от поперечного разрешения. Аксиальное разрешение определяется длиной когерентности используемого источника света, т. е. выражением (8.54), которое не зависит от условий фокусировки зондирующего пучка. Поперечное разрешение, достигаемое в ОКТ-системах визуализации, определяется размером пятна в фокусе и ограничено числовой апертурой линзы, подающей излучение на образец, и длиной волны, как в обычной или конфокальной микроскопии (см. формулы (8.48) и (8.49)).

Для калибровки ОКТ-систем разработано несколько видов специализированных фантомов биотканей [1226–1229].

8.7. Генерация второй гармоники и нелинейное комбинационное рассеяние

Генерация второй гармоники (ГВГ) — новый высокоразрешающий нелинейно-оптический способ визуализации для изучения интактных тканей и клеточных структур [177, 1133, 1134, 1141, 1146, 1156, 1160, 1161, 1569–1602]. ГВГ представляет собой нелинейный оптический процесс второго порядка, который может происходить только в средах, не имеющих центральной симметрии, например в анизотропных кристаллах или на границах, таких как мембраны. Метод может использоваться для получения изображений высокоупорядоченных структурных белков без каких-либо экзогенных меток, а также для зондирования биологических мембран с высокой специфичностью к типу мембраны.

Коллаген, являющийся основным компонентом соединительных тканей, обладает заметной нелинейной восприимчивостью для ГВГ. Спираль вторичной структуры коллагена, не имеющая центральной симметрии и удовлетворяющая условиям ГВГ, самоорганизуется в структуры высших порядков. Было показано, что в нелинейной восприимчивости второго порядка у коллагена доминирующей является компонента вдоль оси волокна. В таких многокомпонентных средах, как кожа, ГВГ происходит главным образом в дерме, а не в таких клеточных слоях, как эпидермис или подкожный жир. Метод ГВГ обладает рядом преимуществ, связанных с делением длины падающей волны и селективностью по отношению к структуре биоткани, которые позволяют легко уменьшить влияние поверхностного отражения на основной гармонике и многократного рассеяния в слое эпидермиса без применения техники стробирования. Кроме того, ГВГ-поляриметрия является эффективным инструментом исследования ориентации коллагеновых волокон в биотканях [1575, 1576, 1578, 1579, 1600].

В общем случае нелинейная поляризация среды выражается как [1571]

$$P = \chi^{(1)}\mathbf{E} + \chi^{(2)}\mathbf{E}\mathbf{E} + \chi^{(3)}\mathbf{E}\mathbf{E}\mathbf{E} + \dots, \quad (8.58)$$

где P — индуцированная поляризация среды, $\chi^{(n)}$ нелинейная восприимчивость n -го порядка, \mathbf{E} — вектор напряженности электрического поля падающего света. Первый член описывает линейное поглощение и отражение света, второй — ГВГ, генерацию суммарных и разностных частот, а третий — двух- и трехфотонное поглощение и генерацию третьей гармоники.

В отличие от двухфотонной флуоресценции (см. разд. 5.2) ГВГ не возникает в результате процесса поглощения. Вместо этого интенсивное поле лазера индуцирует нелинейную поляризацию второго порядка в ансамбле молекул, в результате чего получается когерентная волна точно на удвоенной частоте (или с половинной

длиной волны) падающего света. Спектральные и временные профили флуоресценции с двухфотонным возбуждением и ГВГ также различны. Для двухфотонной флуоресценции ширина спектра испускания определяется относительной геометрией основного и возбужденного состояний молекулы; время жизни свечения связано с силой осциллятора перехода и в типичном случае имеет порядок нескольких наносекунд. Для ГВГ, напротив, и спектральные, и временные характеристики зависят от лазерного источника: ширина полосы равна $1/\sqrt{2}$ от ширины полосы возбуждающего лазера и, благодаря когерентности процесса, импульс ГВГ во времени развивается синхронно с возбуждающим импульсом.

Упрощенное выражение для интенсивности сигнала ГВГ имеет вид [1571]

$$I(2\omega) \propto \left[\chi^{(2)} \frac{E(\omega)}{\tau_p} \right]^2 \tau_p, \quad (8.59)$$

где $\chi^{(2)}$ — нелинейная восприимчивость второго порядка, $E(\omega)$ и τ_p — энергия и длительность лазерного импульса соответственно. Как и при двухфотонной флуоресценции (см. формулы (5.13)–(5.16)), сигнал квадратичен по пиковой мощности, но поскольку ГВГ — мгновенный процесс, сигнал генерируется только на протяжении лазерного импульса. Макроскопическое значение $\chi^{(2)}$ можно выразить через первую молекулярную гиперполяризуемость β как

$$\chi^{(2)} = \rho_M \langle \beta \rangle, \quad (8.60)$$

где ρ_M — плотность числа молекул, а угловые скобки означают усреднение по ориентациям. Этим подчеркивается необходимость отсутствия центра симметрии в области, поскольку $\langle \beta \rangle$ исчезает для изотропного распределения дипольных моментов. Как следует из соотношений (8.59) и (8.60), сигнал ГВГ зависит от квадрата поверхностной плотности молекул, в то время как интенсивность двухфотонной флуоресценции линейна по плотности флуорофоров (см. формулу (5.11)).

В рамках двухуровневой модели первая гиперполяризуемость молекулы β дается выражением [1571]

$$\beta = \frac{3e^2}{2\hbar^3} \frac{\omega_{ge} f_{ge} \Delta\mu_{ge}}{[\omega_{ge}^2 - \omega^2][\omega_{ge}^2 - 4\omega^2]}, \quad (8.61)$$

где e — заряд электрона, ω_{ge} , f_{ge} и μ_{ge} — разность энергий, сила осциллятора и изменение дипольного момента между основным и возбужденным состояниями соответственно. Поскольку ГВГ не связана с поглощением, амплитуда волны второй гармоники может быть резонансно усилена, когда энергия сигнала второй гармоники перекрывается с электронной полосой поглощения. Из (8.61) следует, что β становится большой, когда несущая частота лазера приближается к частоте электронного перехода, тогда полный отклик второго порядка представляет собой сумму нерезонансного и резонансного вкладов:

$$\chi_{\text{total}}^{(2)} = \chi_{\text{nonres}}^{(2)} + \chi_{\text{res}}^{(2)}. \quad (8.62)$$

В зависимости от специфических свойств молекулы и длины волны возбуждающего света резонансный вклад может преобладать, что приводит к усилению сигнала на порядок или более.

Метод ГВГ-микроскопии успешно используется для получения высокоразрешающих изображений живых клеток [1571], трехмерных изображений эндогенных структурных белков в биотканях [1572], биомолекулярных решеток в клетках, тканях и организмах [1573]. Получение динамических изображений *in vivo* коллагена в здоровых тканях и его модифицированных состояний в области опухоли описано

в работе [1574], а генерация поляризационных ГВГ-изображений коллагена в работах [1575, 1576, 1579, 1584], в том числе в сухожилии хвоста крысы [1575] и дерме кожи человека [1579].

ГВГ-микроскопия позволяет изучать многие биохимические и биофизические процессы, например механизмы обратимой диссоциации коллагена в биотканях под воздействием глицерина [1578], роль миозина в генерации ГВГ от мышечных саркомеров [1585], структурные изменения в смешанных коллагеновых гелях (типов I и V) как маркера для регистрации изменений в строме молочной железы человека при раке [1590], электрическую активность в интактных нейронных сетях [1591], микроструктуру и механические свойства коллагенового геля [1594], а также определять углы закрутки миозина и коллагена [1596], изучать наноструктуры коллагена на основе анализ тензора восприимчивости второго порядка [1599], отображать пространственную ориентацию волокнистых структур биоткани [1600].

ГВГ, как один из методов многофотонной нелинейной томографии, имеет значительные возможности в клинических исследованиях [1597]. Например, возможна количественная оценка состояния такого заболевания, как несовершенный остеогенез [1587], наблюдение перестройки внеклеточного матрикса при раке яичников [1589], визуализация поражений кожи [1592], количественный анализ структуры коллагена дермы человека в здоровом и патологическом состояниях [1593], получение изображений роговицы после внутривитреальной лазерной абляции фемтосекундным лазером [1580].

Главное достоинство нелинейных методов заключается в отсутствии необходимости использования маркеров, однако новые типы маркеров, такие как наночастицы ZnO с сильным нелинейным откликом, могут оказаться полезными, например, при изучении диффузии наночастиц в биотканях и их использовании как локальных генераторов или тушителей свободных радикалов в задачах лечения и профилактики зубных и кожных заболеваний [1157–1161]. Метод ГВГ с наномаркерами и без них имеет перспективы и для нелинейной цитометрии *in vivo* [173, 179, 182, 1147, 1152, 1155, 1156].

Поскольку метод ГВГ технически реализуется практически на одном и том же экспериментальном оборудовании, что и многофотонная флуоресценция и когерентное антистоксово комбинационное рассеяние (КАСКР) (Coherent anti-Stokes Raman scattering, CARS), то часто эти методы используются одновременно в рамках мультимодальных подходов с целью получения дополнительной информации о фундаментальных процессах в биотканях и клетках (см., например, [1577, 1601, 1602]). Так, в работе [1577] с помощью комбинации метода ГВГ и двухфотонной флуоресценции получены изображения *in vivo* клеток и внеклеточного матрикса. Исследование действия ДМСО на динамику просветления кожи с помощью количественной мультимодальной нелинейной микроскопии (ГВГ/КАСКР) представлено в работе [1601], а одновременная мультимодальная визуализация для исследований *in vivo* динамики биологических процессов, интегрирующая мультиплексное когерентное антистоксово комбинационное рассеяние (М-КАСКР), ГВГ и двухфотонную флуоресценцию описана в работе [1602].

К нелинейной спектроскопии и микроскопии относятся также активная спектроскопия КР (АСКР), требующая для своей реализации два перестраиваемых лазера и, следовательно, обладающая высокой селективностью, а также когерентное антистоксово комбинационное рассеяние (КАСКР), которое формально описывается в рамках четырехволнового смешения [5, 1171, 1172, 1601–1608]. Основные достоинства КАСКР по сравнению с обычным КР, кроме возможности усиления сигнала более, чем на четыре порядка величины, является прямая генерация сигнала, узкая полоса и полное отсутствие влияния автофлуоресценции, поскольку сигнал генерируется на

длинах волн короче, чем длина волны возбуждения. При сопряжении с лазерным сканирующим микроскопом КАСКР позволяет получать видеоизображения. Метод был использован для визуализации липидных везикул в клетках HeLa, мембраны лизированных эритроцитов, роста капелек жира в живых адипоцитах, транспорта органелл в живых клетках и запасания липидов в *Nematode Caenorhabditis Elegans* при регистрации КАСКР-сигнала на частоте 2845 см^{-1} [1605]. Было показано, что КАСКР-визуализация не является деструктивной для исследуемых клеток, если время измерения не превышает 5 мин [1605].

Некоторые из биологических применений КАСКР, как важной составляющей мультимодальных систем нелинейной микроскопии и спектроскопии, были описаны выше [1601, 1602]. Отметим, что в работе [1601] сигнал КАСКР служил в качестве опорного при изучении процессов просветления *ex vivo* кожи человека при воздействии ДМСО на структуру коллагена и, соответственно, потерю сигнала второй гармоники и уменьшения рассеяния света. В работе [1602] описан метод мультиплексного КАСКР (М-КАСКР), в котором возбуждение КАСКР-сигнала осуществляется от двух источников — фемтосекундного титан-сапфирового лазера и фотонно-кристаллического волоконного световода, генерирующего широкополосное излучение. Одновременно возбуждаемые нелинейные сигналы регистрируются с помощью системы с временным разрешением и разрешением по длинам волн. В случае получения изображений биоткани и клеток с помощью М-КАСКР нерезонансный фон эффективно устраняется методом простого вычитания.

Принципы и перспективы развития метода КАСКР как метода, обеспечивающего получение специфической информации о химическом строении и молекулярной структуре объекта без использования экзогенных зондов и неинвазивно, а также его биологические и медицинские приложения обсуждаются в работах [1171, 1172, 1603, 1604]. Исследования *ex vivo* мозга мыши с помощью М-КАСКР и сравнение результатов с классическим гистологическим анализом подтвердили возможности метода как идеального средства хемоселективной визуализации биотканей [1606]. Показано, что метод позволяет осуществлять количественный анализ КАСКР-изображений, что необходимо, например, для быстрой диагностики рака молочной железы [1607]. В частности, функциональная визуализация клеточных и тканевых структур с помощью КАСКР и соответствующие алгоритмы обработки изображений дают возможность отличать раковые поражения от нормальной ткани и доброкачественных пролиферативных поражений.

Коммерчески доступный микроэндоскоп был использован для получения минимально инвазивных мультимодальных нелинейных видеоизображений клеточных процессов в спинном мозге живой мыши [1608]. Система позволяла одновременное получение КАСКР-изображений миелиновых оболочек и регистрацию флуоресценции при двухфотонном возбуждении от микроглиальных клеток и аксонов. Несмотря на свой небольшой диаметр, микроэндоскоп обеспечивал высокую скорость мультимодальной визуализации в достаточно обширной области ткани и при хорошем разрешении, достаточном для количественной оценки малых различий в толщине миелиновых оболочек и подвижности микроглиальных клеток.

Типичная глубина зондирования методов нелинейной микроскопии и спектроскопии не превышает 300 мкм из-за сильного рассеяния многих биотканей [1609]. Однако применение технологии оптического просветления биоткани за счет частичной замены воды другими жидкостями с показателем преломления, близким к показателю преломления белков [200, 201, 1609–1612], позволяет существенно снизить рассеяние и получить глубину зондирования, превышающую 2 мм. Более подробно методы оптического просветления рассмотрены в следующей главе.

Глава 9

УПРАВЛЕНИЕ ОПТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ

В данной главе описываются основные принципы и достижения в области управления оптическими свойствами биологических тканей. В качестве основной технологии обсуждается метод оптической иммерсии с использованием экзогенных оптических просветляющих агентов (ОПА). Рассмотрены транспорт воды в тканях, их набухание (или усадка, сжатие) и гидратация (или дегидратация) при их взаимодействии с ОПА. Анализируются свойства оптического просветления фиброзных и эпителиальных тканей при использовании спектрофотометрии, модуляционных, флуоресцентных и поляризационных измерений, конфокальной микроскопии и ОКТ, а также нелинейно-оптических методов — двухфотонной флуоресценции и ГВГ. Обсуждаются исследования *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* разнообразных тканей человека и животных, включая склеру глаза, кожу, твердую мозговую оболочку (*dura mater*), ткань желудка, хрящ, кровеносные сосуды, и кровь. Обсуждается доставка ОПА, проницаемость тканей и резервуарная функция кожи. Обсуждается также визуализация клеток и клеточных потоков при оптическом просветлении. Описаны некоторые важные приложения иммерсии тканей, например, мониторинг глюкозы в биоткани, прецизионная лазерная хирургия, а также некоторые другие методы управления оптическими свойствами тканей, такие как сжатие и растяжение, тепловое воздействие и отбеливание тканей.

9.1. Основы управления оптическими свойствами тканей и краткий обзор

Отражением, поглощением, рассеянием и флуоресценцией живых биологических тканей и крови можно эффективно управлять, используя различные методы, описанные в обширной литературе [1–6, 9, 10, 24, 26, 29, 48, 49, 54, 57, 61, 62, 76, 77, 85, 90, 91, 95, 96, 129, 139, 162, 163, 166, 178, 200, 201, 221, 238, 264, 351, 392, 393, 452, 463, 467–469, 555, 608, 621, 622, 654, 738, 764–766, 769, 781, 791, 792, 810, 826, 991, 1006–1010, 1059, 1177, 1191–1194, 1257, 1258, 1271, 1292, 1293, 1306, 1331, 1336–1343, 1359–1362, 1383, 1387–1389, 1399, 1400, 1418, 1439, 1470, 1486, 1487, 1521, 1547, 1578, 1579, 1609–1811]. Окрашивание (сенсбилизация) биологических материалов широко применяется для изучения механизмов взаимодействия света с отдельными компонентами биоматериалов, а также для оптического мониторинга физиологических процессов и селективного фоторазрушения отдельных компонентов живых тканей. Этот подход лежит в основе диагностики и фотодинамической терапии (ФДТ) злокачественных новообразований, УФА-фотохимиотерапии псориаза и других пролиферативных заболеваний, ангиографии и многих других медицинских приложений.

В видимом и ближнем ИК-диапазоне биологические ткани и жидкости слабо поглощают, но сильно рассеивают свет (см. табл. 7.1). Рассеяние определяет спектральные и угловые характеристики света, взаимодействующего с тканями, а также

глубину его проникновения в ткань. Очевидно, что направленное изменение тем или иным способом рассеивающих свойств должно существенно влиять на характеристики света, распространяющегося в тканях. Управлять оптическими (рассеивающими) свойствами биоткани можно посредством различных физических или химических воздействий, например при сжатии или растяжении биоткани, УФ облучении или коагуляции, воздействии низких температур, пропитывании химическими агентами, гелями и маслами. Все эти явления можно понять, если рассматривать ткань как рассеивающую среду со всеми оптическими эффектами, характерными для дисперсных физических систем. Хорошо известно, что прозрачностью дисперсной физической системы можно эффективно управлять, обеспечивая согласование показателей преломления рассеивающих элементов и базового материала. Это так называемая иммерсионная техника. Другая возможность управлять оптическими свойствами дисперсной системы — менять ее параметр упаковки и/или размеры рассеивающих частиц (см. главы 1–3).

Управление оптическими свойствами тканей *in vivo* очень важно для многих медицинских приложений. Многочисленные технологии лазерной хирургии, терапии и диагностики включают сжатие и растяжение биоткани, которые используются для облегчения доставки лазерного излучения к нижележащим слоям ткани. Метод локального сжатия склеры глаза человека позволяет выполнять транссклеральную лазерную коагуляцию стекловидного тела и сетчатки/хороида [392, 769, 1257]. Возможность эффективного просвечивания верхних слоев биоткани важна, например, для получения изображений внутри глазного яблока, а также в функциональной оптической томографии при обнаружении локальных неоднородностей, скрытых за сильно рассеивающей средой. Склера глаза человека была одной из первых тканей, для которой была показана возможность управления оптическими свойствами путем ее пропитывания оптическими просветляющими агентами (ОПА) [6, 24, 61, 77, 200, 221, 238, 781, 810, 949, 1338, 1613–1615, 1623–1629, 1686, 1687, 1697, 1728, 1729, 1743, 1758, 1766, 1811]. Для просветления склеры использовались такие ОПА, как рентгеноконтрастные вещества (тразограф, верографин, гипак), глюкоза и полиэтиленгликоль (ПЭГ), которые обладают гиперосмотическими свойствами.

В общем случае коэффициент рассеяния μ_s и фактор анизотропии рассеяния g эпителиальной ткани зависят от разности показателей преломления между клеточными компонентами — клеточная мембрана, цитоплазма, ядро клетки, другие органеллы (митохондрии, лизосомы и пероксисомы), меланиновые гранулы — и внеклеточной жидкостью. Для фиброзных (соединительных) тканей (строма склеры глаза, строма роговицы, дерма кожи, твердая мозговая оболочка, мышечная ткань, неклеточная матрица стенки сосуда, фиброзный компонент ткани женской молочной железы, сухожилие, хрящ и т.п.) важна разница показателей преломления между интерстициальной средой и длинными волокнами склеропротеина (коллаген-, эластин- или ретикулин-образующими волокнами), образующего часть неклеточного матрикса ткани, окружающего клетки и заполняющего пространство между ними [63, 64, 85, 96, 200, 222, 774–776, 1613–1615, 1621, 1622]. Согласование показателей преломления проявляет себя в уменьшении коэффициента рассеяния ($\mu_s \rightarrow 0$) и возрастании направленности рассеяния ($g \rightarrow 1$). Для дермы кожи и склеры глаза снижение μ_s может быть значительным [200, 238, 766, 768, 781, 1613–1615, 1630, 1729–1768]. Для тканей с большим содержанием крови, таких как печень, действие ОПА различной осмотической активности также приводит к согласованию показателей преломления и уменьшению коэффициента рассеяния, но эффект не так выражен, как у кожи и склеры, из-за изменения размеров клеток в результате осмотического напряжения [1621, 1622].

Итак, мягкие биоткани представляют собой образования с плотно упакованными группами клеток (эпителий и эндотелий органа) и сетью волокнистых структур (стромы, соединительная ткань), через которую просачивается интерстициальная жидкость. В микроскопических масштабах клетки и их компоненты не имеют четко выраженных границ, поэтому ткань можно рассматривать как непрерывную структуру с пространственными вариациями показателя преломления. Как уже обсуждалось, для моделирования такой сложной структуры набором частиц необходимо использовать статистический подход (см. гл. 3). На рис. 3.1 показан гипотетический профиль показателя преломления, измеренный вдоль некоторой линии в произвольном направлении внутри объема ткани и соответствующий статистически усредненному профилю показателя преломления. Средний фоновый (базовый) показатель преломления \bar{n}_0 определяется как взвешенное среднее показателей преломления цитоплазмы и интерстициальной жидкости, n_{cp} и n_{is} (см. формулу (3.2)). Показатель преломления частицы можно определить как сумму показателя преломления фона и среднего отклонения показателя преломления, $\langle \Delta n \rangle$, описываемого выражениями (3.3)–(3.5).

Для двухкомпонентной модели средний показатель преломления биоткани \bar{n} определяется показателями преломления рассеивающих центров n_s и базового материала n_0 , $\bar{n} = f_s n_s + (1 - f_s) n_0$ (см. соотношение (7.60)). Отношение $n_s/n_0 \equiv m$ определяет коэффициент рассеяния. К примеру, в простой монодисперсной модели рассеивающих диэлектрических сфер (теория Ми) приведенный коэффициент рассеяния μ'_s определяется формулой (7.27), где $\mu'_s \sim m - 1)^2$. Из формулы (7.27) следует, что при увеличении показателя преломления базового вещества всего лишь на 5% ($n_0 = 1,35 \rightarrow 1,42$), при условии, что для рассеивающих центров $n_s = 1,47$ и остается неизменным, величина μ'_s уменьшается в семь раз. В предельном случае равных показателей преломления непоглощающих частиц и базового материала $m = 1$ и $\mu'_s \rightarrow 0$. В живой ткани относительный показатель преломления является функцией физиологического или патологического состояния ткани. В зависимости от специфики состояния ткани показатель преломления рассеивающих частиц или фона может изменяться (возрастать или убывать), вследствие чего рассеяние света может, соответственно, расти или уменьшаться.

Рассеяние и поглощение света частицами, составляющими ткань или кровь, можно рассчитать по теории Ми. Существенными параметрами являются размер частиц (радиус a), комплексный показатель преломления диэлектрического вещества-хозяина (базового материала ткани или плазмы крови) n_0 и относительный показатель преломления вещества рассеивающих частиц $m = n'_s/n_0$. Мнимая часть комплексного показателя преломления отвечает за потери света из-за поглощения. Теория Ми определяет эффективность поглощения и рассеяния и фазовую функцию рассеяния, на основании которых вычисляются коэффициенты поглощения и рассеяния $\mu_s = \rho \sigma_{sca}$ и $\mu_a = \rho \sigma_{abs}$, а также фактор анизотропии рассеяния g , где ρ — плотность числа рассеивающих частиц. Соответствующие сечения рассеяния и поглощения σ_{sca} и σ_{abs} и g -фактор описываются формулами (3.53), (3.54) и (3.55) соответственно.

Транспортный коэффициент рассеяния сильно возрастает с увеличением отношения действительной части показателя преломления рассеивающих частиц к показателю преломления базового материала, n'_s/n_0 , особенно для частиц размером 0,1–1 мкм (см. рис. 6.2) [1193, 1194]. При полном согласовании показателей преломления рассеивающих частиц и базового материала коэффициент рассеяния стремится к нулю, а фактор анизотропии рассеяния максимален и приближается к единице для частиц размером порядка 1 мкм.

Однако на практике полного согласования показателей преломления достичь не удается, поэтому могут быть существенны другие механизмы просветления ткани. Иногда действие гиперосмотических химических агентов или сильное механическое

сжатие могут приводить к обратимому или необратимому изменению размеров рассеивающих частиц. Зависимость параметров рассеяния от длины волны в системах с частично согласованными показателями преломления ($n'_s/n_0 = 1,07$) показана на рис. 6.3. Такой уровень согласования типичен для многих соединительных и эпителиальных тканей. Спектральные изменения относительного показателя преломления при вычислениях не учитывались, однако они могут быть важны на практике. Если размеры частиц и отношение показателей преломления фиксированы, то зависимость от длины волны связана с отношением длины волны к размеру частицы. Для частиц с показателем преломления, близким к показателю базового вещества (см. рис. 6.3), коэффициент рассеяния системы частиц очень большого или очень малого диаметра почти не зависит от длины волны в области от 400 до 800 нм, в то время как для частиц среднего диаметра он убывает с ростом длины волны. Такая же тенденция в зависимости от длины волны (отсутствие зависимости для очень крупных или очень мелких рассеивающих частиц и убывание для частиц среднего размера) ожидается у фактора анизотропии рассеяния.

Из проведенного рассмотрения следует, что снижение рассеяния может быть связано не только с согласованием показателей преломления, но также с изменениями распределения рассеивающих частиц по размерам. Как агрегация с образованием крупных частиц, так и дизагрегация с образованием более мелких частиц, в определенных пределах размеров частиц могут приводить к подавлению рассеяния. Однако свойства анизотропии рассеяния систем больших и малых частиц могут существенно отличаться друг от друга, что можно использовать для выяснения механизмов, связанных с изменением размеров частиц и согласованием показателей преломления. Концептуально во многих ситуациях лидирующим механизмом просветления тканей должно быть именно согласование показателей преломления, поскольку выравнивание показателей преломления рассеивающих частиц и окружающей среды всегда имеет место при иммерсии тканей, дегидратации или сжатии, и чувствительность рассеивающих свойств к такому выравниванию чрезвычайно высока.

Как система частиц цельная кровь обладает выраженным эффектом просветления, который может сопровождаться индуцированной или спонтанной агрегацией и дизагрегацией, а также набуханием или сморщиванием эритроцитов, при применении биологически совместимых просветляющих агентов с определенными осмотическими свойствами [200, 1009, 1010, 1331, 1336, 1359, 1646–1650, 1700, 1701].

При помощи введения внутрь ткани просветляющих агентов можно достичь заметного уменьшения рассеяния и, соответственно, увеличения оптического пропускания склеры и кожи животных и человека, имплантатов кожи, тканей желудочно-кишечного тракта человека, хрящей и сухожилий человека и животных в видимом и ближнем ИК-диапазоне. В качестве ОПА используются рентгеноконтрастные вещества (верографин, тразограф и гипак), глюкоза, фруктоза, сорбитол, маннитол, пропандиол, бутандиол, глицерин, пропиленгликоль, полимеры полипропилена на гликолевой основе (ППГО), этиленгликоль, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полимеры на основе ПЭГ, диметилсульфоксид (ДМСО) и другие растворы [24, 61, 77, 162, 163, 166, 200, 221, 238, 467–469, 555, 621, 622, 766, 781, 791, 792, 810, 826, 1293, 1306, 1319, 1332, 1418, 1439, 1486, 1487, 1547, 1578, 1613–1615, 1623–1640, 1642–1645, 1651, 1652, 1662, 1673, 1674, 1676, 1677, 1685–1698, 1702–1705, 1706–1709, 1714–1811].

Координация между показателями преломления в многокомпонентных прозрачных тканях, обладающих поляризационной анизотропией (например, роговица), приводит к уменьшению такой анизотропии [5, 10, 200]. Напротив, для сильно рассеивающей ткани со скрытым линейным двулучепреломлением пропитывание иммерсионным агентом может существенно улучшить способность к детектированию

поляризационной анизотропии благодаря уменьшению фонового рассеяния [200, 621, 622, 1697, 1698].

Зависящие от концентрации изменения характера рассеяния и пропускания в суспензиях α -кристаллина, извлеченного из хрусталика телят, считаются связанными с явлением осмоса [1618]. Осмотические и диффузионные процессы, происходящие в биотканях, подвергающихся воздействию верографина, тразографа, глюкозы, глицерина и других ОПА, также имеют важное значение для просветления ткани и ее метаболизма [200, 238]. Осмотические явления участвуют в процессах модуляции оптических свойств биологических материалов (клеток и тканей) при воздействии на них сахаров, спиртов и растворов электролитов, что может повлиять на оценку насыщения гемоглобина кислородом или идентификацию цитохромоксидазы и других биологически важных эндогенных поглотителей в тканях с использованием оптических методов [1621, 1622].

Экспериментальные исследования по оптическому просветлению кожи и ее компонентов (эпидермиса и дермы) в норме и патологии, а также по управлению спектрами отражения и пропускания с применением воды, глицерина, водно-глицериновых растворов, глюкозы, солнцезащитных кремов, косметических лосьонов, гелей и фармацевтических продуктов были выполнены в работах [57, 306, 383, 469, 555, 766, 826, 1336, 1418, 1547, 1578, 1610, 1613–1615, 1626–1632, 1634, 1635, 1638, 1640, 1643, 1645, 1653, 1691, 1695, 1702, 1703, 1706–1709, 1711, 1714, 1715, 1717–1724, 1726, 1730–1736, 1738, 1739, 1741, 1742, 1744, 1746–1757, 1760–1765, 1767, 1776, 1781, 1785–1791, 1801, 1802, 1808, 1809]. Было установлено, что управление оптическими свойствами кожи, в основном, обусловлено влиянием иммерсии на показатели преломления рассеивающих частиц (компонентов кератиноцитов в эпидермисе, коллагеновых и эластиновых волокон в дерме) и базового вещества и/или обратимой диссоциацией коллагена [200]. Кроме этого, некоторые из наблюдаемых эффектов были вызваны введением в ткань дополнительных рассеивающих или поглощающих центров или, напротив, их вымыванием.

Примечательно, что при исследованиях *in vivo* заметное просветление кожи хомяка [766], свиньи [1720] и человека [1336, 1630, 1632, 1638], склеры глаза человека и кролика [61, 1625], а также твердой мозговой оболочки кролика [1439] происходило сравнительно быстро, в течение нескольких минут, после местного нанесения или внутритканевой инъекции глицерина, глюкозы, пропиленгликоля, тразографа, ППГО и полимеров на основе ПЭГ.

Альбумин, белок, используемый для согласования показателей преломления в экспериментах с применением фазово-контрастной микроскопии [1360, 1383, 1619, 1620], может быть также использован как иммерсионная среда для исследования биотканей и получения их изображений [58, 96]. Потенциальной альтернативой могут служить белки с молекулами меньшего размера, чем альбумин, поскольку сам альбумин из-за сравнительно большого размера молекул и наличия их агрегатов рассеивает свет. С другой стороны, направленное увеличение рассеяния также может служить диагностическим признаком. Например, более точный медицинский диагноз за счет повышения контраста изображения в области патологии можно обеспечить, применяя уксусную кислоту, которая успешно используется как отбеливающий (контрастирующий) агент в оптических исследованиях шейки матки [58, 96, 1663–1668, 1812–1814]. Было предположено, что отбеливающий эффект уксусной кислоты, наблюдаемый в ткани шейки матки, вызывается коагуляцией белков клеточных ядер. Таким образом, проба с уксусной кислотой может быть чрезвычайно значимой при количественной оптической диагностике предраковых состояний, благодаря возможности селективно усиливать рассеяние на ядрах клеток и тем самым следить за изменением их размеров и внутренних перестроек [58, 96].

Очевидно, что потеря воды тканью существенно влияет на ее оптические свойства. Одной из главных причин дегидратации ткани *in vivo* является действие эндогенных или экзогенных осмотических жидкостей. В условиях *in vitro* к потере воды приводит спонтанное ее испарение с поверхности образца биоткани или замораживание. Нагрев образца до температуры, не вызывающей коагуляции, или замораживание в холодильнике существенно повышает эффективность дегидратации. Действие гиперосмотических ОПА также ведет к дегидратации ткани, которая может быть достаточно сильной [200, 1742, 1752]. В результате дегидратации коэффициент рассеяния биоткани уменьшается, в основном за счет уменьшения относительного показателя преломления рассеивателей и межтканевой жидкости и более плотной регулярной упаковки коллагеновых волокон. Для некоторых биотканей коэффициенты поглощения и рассеяния на длинах волн вдали от полос поглощения воды могут даже несколько возрасти (коэффициент поглощения на несколько десятков процентов, а коэффициент рассеяния на несколько процентов), в основном из-за более плотной нерегулярной упаковки компонентов ткани, вызванной ее усадкой (сжатием). Однако и в этом случае полное оптическое пропускание образца ткани увеличивается за счет уменьшения его толщины при дегидратации [764, 765]. Несмотря на большую плотность ткани при ее дегидратации, в окрестности сильных полос поглощения воды коэффициент поглощения дегидратированной ткани уменьшается за счет меньшего содержания воды.

Можно значительно увеличить пропускание света через мягкую биоткань путем ее сжатия (компрессии) или растяжения [200, 1059, 1319, 1617, 1803–1807]. Оптическая прозрачность живой ткани есть следствие ее оптической однородности, которая достигается благодаря удалению крови и интерстициальной жидкости (воды) из места сжатия или растяжения. В результате повышается показатель преломления базового вещества, приближаясь к показателю преломления рассеивающих элементов (клеточных мембран, мышечных или коллагеновых волокон) (см. формулу (7.27)). Более плотная упаковка компонентов ткани при сжатии делает ее менее хаотичной и более организованной системой, которая может рассеивать меньше света из-за кооперативных (интерференционных) эффектов [654, 1616]. Конечно, отсутствие крови в сжатой области также дает вклад в изменение поглощающих и преломляющих свойств ткани. Некоторые механизмы, лежащие в основе эффектов оптического просветления и изменения характера преломления света тканями при сжатии и растяжении, предложены в работах [61, 62, 200, 654, 768, 769, 1059, 1257, 1319, 1341, 1616, 1678, 1803–1807].

Нагревание длинными лазерными импульсами индуцирует обратимые и необратимые изменения в оптических свойствах ткани [764, 765, 1662]. В общем случае полное пропускание уменьшается, а диффузное отражение растет, демонстрируя нелинейное поведение во время нагрева импульсом лазера. Многие типы тканей, подвергнутые медленной коагуляции (от 10 мин до 2 ч) в горячей воде или физиологическом растворе (70–85 °С), демонстрируют возрастание коэффициентов рассеяния и поглощения (см. табл. 7.1).

УФ-облучение вызывает эритему (покраснение кожи), стимулирует синтез меланина и может вызвать отек и пролиферацию ткани, если доза облучения достаточно велика [54, 1059, 1656, 1657]. Все эти фотобиологические эффекты могут отвечать за изменение оптических свойств кожи и должны приниматься во внимание при назначении фототерапии. Известно также, что УФ-облучение вызывает в хрусталике человека генерацию новых поглощающих в видимой области хромофоров [794].

Естественные физиологические изменения в клетках и тканях также вызывают вариации их оптических свойств, которые можно зарегистрировать и использовать как меру указанных изменений. Например, измерение коэффициента рассеяния

позволяет определять содержание глюкозы в ткани [166, 467–469, 534, 991, 996, 999, 1006–1008, 1191, 1192, 1650, 1683, 1684, 1761, 1765] или контролировать отек [1682], а также определять параметры крови [763]. Обнаружена почти параболическая зависимость коэффициента рассеяния от гематокрита (Hct) в тонких слоях крови (см. соотношение (3.23)) [763]. Оптические свойства крови, зависящие от гематокрита, насыщения гемоглобина кислородом, температуры и параметров кровотока, можно найти в табл. 7.1–7.4 и 7.6.

9.2. Оптическая иммерсия с помощью экзогенных химических агентов

9.2.1. Принципы оптической иммерсии. Рассмотрим принципы оптической иммерсии, основанной на пропитывании ткани или разбавлении крови биологически совместимым химическим агентом, который может также иметь некоторые гиперосмотические свойства. Любая соединительная (фиброзная) ткань эффективно пропитывается жидким агентом или его раствором. Как пример фиброзной ткани проанализируем склеру глаза человека.

Модель участка склеры человека можно представить как слой толщины d , заполненный длинными и тонкими диэлектрическими цилиндрами (коллагеновыми волокнами) со средним диаметром ~ 100 нм и показателем преломления $n_c = 1,474$ (см. рис. 9.1) [238, 791, 792]. Цилиндры расположены в плоскостях, параллельных поверхности слоя, но в каждой плоскости ориентированы случайным образом (см. рис. 3.5). Пространство между коллагеновыми волокнами заполнено однородным базовым веществом с показателем преломления $n_0 = 1,345$. Заметная разница показателей преломления между коллагеновыми волокнами и базовым веществом делает систему мутной, т. е. вызывает многократное рассеяние и плохое пропускание распространяющегося света. Показатель преломления базового вещества является управляемым параметром и может изменяться в пределах от 1,345 до 1,474, что переводит систему из режима многократного рассеяния в режим рассеяния малой кратности и даже однократного. Для $n_c = n_0 = 1,474$ среда становится полностью однородной и оптически прозрачной, если поглощение рассеивающих элементов и базового вещества мало.

Описанная модель применима к любой фиброзной ткани, включая дерму кожи и мышечную ткань. Для этого нужно лишь изменить показатели преломления, диаметры волокон и расстояния между ними. Пропускание коллимированного света слоем ткани толщины d определяется законом Бугера–Ламберта–Бера (см. уравнение (1.1)):

$$T_c = \frac{I(d)}{I_0} = \exp(-\mu_t d), \quad (9.1)$$

где I_0 и $I(d)$ — интенсивности падающего и регистрируемого на выходе света соответственно; $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ — коэффициент ослабления. Как следует из табл. 7.1 для склеры глаза человека на длине волны $\lambda = 800$ нм коэффициент поглощения $\mu_a \approx 1,6 \text{ см}^{-1}$, а приведенный коэффициент рассеяния $\mu'_s = \mu_s(1 - g) \approx 38 \text{ см}^{-1}$. Для $g = 0,9$ $\mu_s \approx 380 \text{ см}^{-1}$.

Благодаря фиброзной структуре склеры вполне разумно предположить, что диффузию жидкости в ткани можно приближенно рассматривать как свободную диффузию [238, 1685, 1815]. Поэтому для описания кинетики изменений показателя преломления и соответствующего уменьшения коэффициента рассеяния при диффузии химического агента в межфибрилярном веществе ткани можно использовать

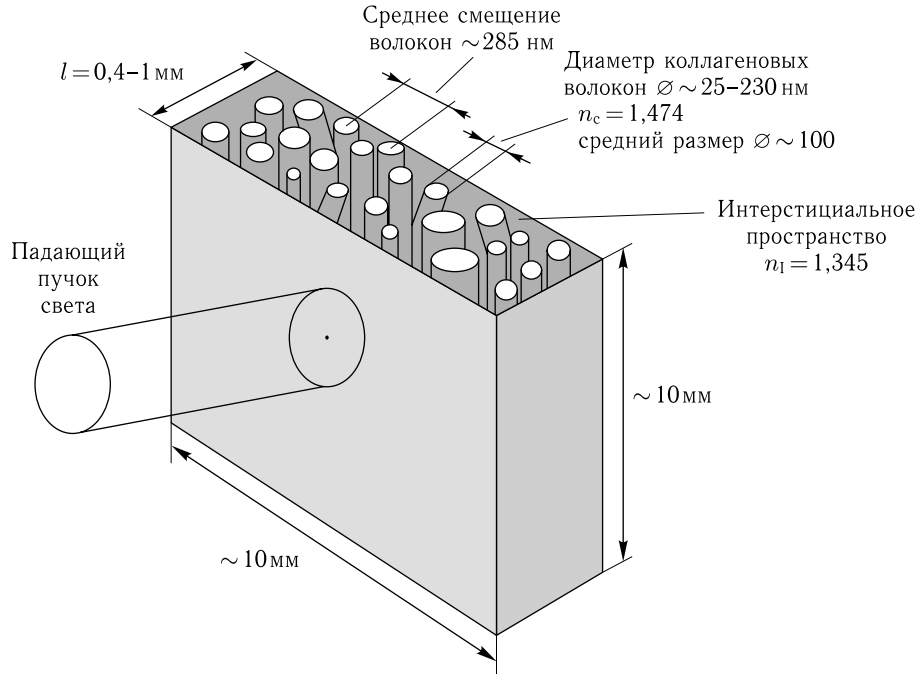


Рис. 9.1. Схематическое представление образца склеры глаза человека и падающего пучка света [238]

модель свободной диффузии с приближенным решением уравнения диффузии [238, 1815]

$$\frac{\partial C_f(x, t)}{\partial t} = D_f \frac{\partial^2 C_f(x, t)}{\partial x^2}, \quad (9.2)$$

где $C_f(x, t)$ — концентрация жидкости, D_f — коэффициент диффузии, а x — пространственная координата. Это уравнение применимо в случаях, когда скорость процесса не ограничена мембранами, например при диффузии веществ в межфибрилярном пространстве, или при высокой скорости проникновения растворенного вещества через мембраны [1815]. Для образца ткани в виде пластинки толщиной d , который в момент времени $t = 0$ помещается в раствор с начальной концентрацией агента C_{a0} (начальная концентрация агента внутри слоя равна 0, т. е. $t = 0$; $0 \leq x \leq d$; $C_a(x, 0) = 0$, и граничные условия имеют вид $C_a(0, t) = C_a(d, t) = C_{a0}$), уравнение (9.2) имеет следующее решение, описывающее зависящее от времени распределение концентрации агента в образце [238, 1815]:

$$C_a(x, t) = C_{a0} \left\{ 1 - \frac{4}{\pi} \left[\exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \sin\left(\frac{\pi x}{d}\right) + \frac{1}{3} \exp\left(-\frac{9t}{\tau}\right) \sin\left(\frac{3\pi x}{d}\right) + \frac{1}{5} \exp\left(-\frac{25t}{\tau}\right) \sin\left(\frac{5\pi x}{d}\right) + \dots \right] \right\}, \quad (9.3)$$

где

$$\tau = \frac{d^2}{\pi^2 D_a}, \quad (9.4)$$

D_a — коэффициент диффузии агента.

Отношение количества растворенного вещества m_t в момент времени t к его равновесному значению m_∞ определяется как [1815]

$$\frac{m_t}{m_\infty} = \frac{\int_0^d C_a(x, t) dx}{C_{a0} d} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \left\{ \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) + \frac{1}{9} \exp\left(-\frac{9t}{\tau}\right) + \frac{1}{25} \exp\left(-\frac{25t}{\tau}\right) + \dots \right\}. \quad (9.5)$$

Это отношение, в свою очередь, определяет усредненную по объему концентрацию агента $C_a(t)$, которая в приближении первого порядка имеет вид [238, 1652, 1685]

$$C_a(t) = \frac{1}{2} \int_0^d C_a(x, t) dx \approx C_{a0} \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right]. \quad (9.6)$$

Формулы (9.3)–(9.6) позволяют найти зависящую от времени концентрацию химических агентов со сравнительно малым молекулярным весом на глубине x внутри образца ткани или временные изменения полного количества этих агентов в образце, если коэффициент диффузии D_a молекул этих агентов в ткани известен. С другой стороны, измерения $C_a(t)$ позволяют оценить значение D_a молекул введенного вещества в интерстициальной жидкости ткани. Для соединений (агентов) с низким молекулярным весом значения коэффициентов диффузии в их собственной среде составляют примерно $10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, например для воды $D_a = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ и для сахарозы $D_a = 0,5 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ [1815].

Когда агент поступает только через поверхность образца, а такая ситуация имеет место при его местном применении *in vivo*, формула (9.6) сохраняет силу, но для характерного времени диффузии получается другое выражение [1702]:

$$\tau = \frac{d^2}{D_a}. \quad (9.7)$$

Выражения (9.3)–(9.7) были получены для диффузии в однородном слое. Благодаря волокнистой структуре ткань может быть представлена как пористый материал, что приводит к модификации коэффициента диффузии химического агента:

$$D_a = \frac{D_{ai}}{p}. \quad (9.8)$$

Здесь D_{ai} — коэффициент диффузии химического агента в интерстициальной жидкости, а p — коэффициент пористости, определяемый как

$$p = \frac{V - V_c}{V}, \quad (9.9)$$

где V — объем образца ткани, а V_c — объем, занимаемый коллагеновыми волокнами.

Для описания диффузии больших молекул нужно использовать теорию затрудненной диффузии через проницаемую мембрану [238, 1685, 1815]. На основе закона Фика, связывающего поток вещества J (моль/с/см²) с градиентом его концентрации,

$$J = -D_a \frac{dC}{dx}, \quad (9.10)$$

для стационарного переноса вещества через тонкую мембрану имеем [1815]

$$J = P_a(C_1 - C_2), \quad (9.11)$$

где $P_a = D_a/d$ — коэффициент проницаемости, а C_1 и C_2 — концентрации молекул в двух областях пространства, разделенных мембраной.

Используя соотношения (9.10) и (9.11), можно найти изменение концентрации молекул внутри замкнутой области объема V , окруженной проницаемой мембраной площади S , при помощи следующего уравнения [1815]:

$$\frac{dC_2}{dt} = \frac{P_a S}{V} (C_1 - C_2). \quad (9.12)$$

Для большого внешнего объема, когда C_1 можно рассматривать как константу, уравнение (9.12) имеет приближенное экспоненциальное решение такого же вида, что и выражение (9.6) [238, 1685, 1815], с $C_2 = C_a$, $C_1 = C_{a0}$, и

$$\tau = \frac{d^2}{D_a}. \quad (9.13)$$

Выражение (9.13) отражает тот факт, что в экспериментах с плоскими слоями тканей (см. рис. 9.2) $V = S \cdot d$, где S и d — площадь и толщина образца. Вид этого выражения такой же, как и для свободной диффузии, но значения коэффициентов для свободной и заторможенной диффузии могут существенно различаться.

При пропитывании ткани агентом показатель преломления базового вещества (вещества межфибрилярного пространства) n_0 является зависящей от времени функцией концентрации $C_a(t)$ проникающего в образец агента, определяемой выражением (9.6). Зависящая от времени объемная доля агента в образце ткани f_a пропорциональна его концентрации C_a , поэтому, используя закон Глэдстоуна и Дэйла (см. выражение (3.1)), можно записать

$$n_0(t) = n_{0i}(t)f_0(t) + n_a f_a(t), \quad (9.14)$$

где $f_0(t) + f_a(t) = 1$, n_{0i} — изначальный (собственный) показатель преломления базового вещества до внесения агента. При использовании неосмотических или низкоосмотических агентов собственный показатель преломления вещества межфибрилярного пространства может рассматриваться как независимый от времени: $n_{0i}(t) \approx n_{0i}$ ($t = 0$).

Выражение для коэффициента рассеяния, выведенное для системы невзаимодействующих тонких цилиндров с числом волокон на единицу площади ρ_s имеет вид [238, 1685]:

$$\mu_s \approx \rho_s \left(\frac{\pi^5 a^4 n_0^3}{\lambda_0^3} \right) (m^2 - 1)^2 \left[1 + \frac{2}{(m^2 + 1)^2} \right], \quad (9.15)$$

где $\rho_s = f_{\text{цил}}/\pi a^2$, $f_{\text{цил}}$ — поверхностная доля торцов цилиндров, a — радиус цилиндра, $m = n_s/n_0$ — показатель преломления цилиндров (рассеивателей) относительно базового вещества, λ_0 — длина волны света в вакууме.

В первом приближении разумно предположить, что радиусы рассеивателей (волокон) и их плотность не подвергаются существенному изменению со стороны химических агентов (нет набухания или усадки ткани), абсолютное изменение n_0 не слишком велико, а вариации μ_s обусловлены только изменением относительного показателя преломления рассеивателей и вещества межфибрилярного пространства, m . Тогда, учитывая, что для большинства тканей $m \approx 1$, можно записать коэффициент рассеяния на отдельной длине волны как функцию отношения относительных показателей преломления m в следующем виде [238, 1685]:

$$\mu_{s2} \approx \mu_{s1} \left(\frac{m_2 - 1}{m_1 - 1} \right)^2. \quad (9.16)$$

Это соотношение описывает изменение рассеивающих свойств из-за согласования или рассогласования показателей преломления, вызванного изменением показателя

преломления рассеивателей, базовой среды или и того, и другого. Аналогичное равенство для системы сферических частиц Ми вытекает из соотношения (7.27). Благодаря квадратичной зависимости чувствительность к согласованию показателей преломления очень высока, например, для $m_1 = 1,1$ и $m_2 = 1,01$ $\mu_{s2} \approx 0,01\mu_{s1}$.

В иммерсионном методе показатель преломления рассеивающих частиц n_s обычно поддерживается постоянным в процессе диффузии ОПА в ткани. Поэтому можно использовать выражение (9.14), чтобы переписать соотношение (9.16) в виде, справедливом для диффузии ОПА малой осмолярности:

$$\mu_s(t) = \mu_s(t=0) \cdot \frac{(n_s/n_0(t) - 1)^2}{(n_s/n_0(t=0) - 1)^2}. \quad (9.17)$$

Нужно отметить, что более строгий подход к вычислению коэффициента рассеяния должен быть основан на рассмотрении рассеяния света плотно упакованными системами тонких диэлектрических цилиндров или сферических частиц с индивидуальным для каждого случая распределением по размерам (см. гл. 1–3).

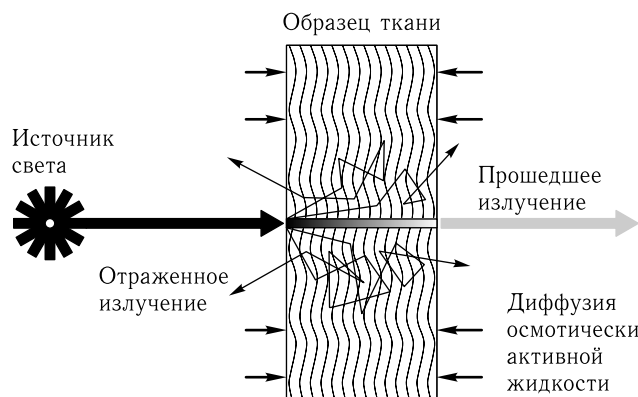


Рис. 9.2. Схематическое представление диффузии иммерсионного агента в биоткань, а также пучков прошедшего и рассеянного света [1652]

Для оценки изменения коллимированного пропускания ткани, вызванного диффузией агента в образец (см. рис. 9.2), формулы (9.1), (9.6), (9.14) и (9.17) нужно использовать вместе. Обычно иммерсионные агенты не имеют сильных полос поглощения в исследуемом диапазоне длин волн, поэтому коэффициент поглощения может считаться постоянным. Диффузное пропускание и отражение, а также дифференциальные характеристики рассеяния (угловые зависимости) для образца ткани можно рассчитать, если известно поведение фактора анизотропии g при оптической иммерсии. Для частиц Ми анализ поведения g -фактора, вызванного согласованием показателей преломления, можно выполнить с использованием выражения (3.55). Соответствующие вычисления в рамках теории Ми для нормированного приведенного коэффициента рассеяния и g -фактора на разных длинах волн и для разных размеров сферических рассеивателей представлены на рис. 6.2 и 6.3. Для оценки связи этих расчетов с кинетикой диффузии ОПА можно воспользоваться формулами (9.6), (9.14) и (9.17).

Для исследований *in vivo* геометрия измерений отражения назад является принципиальной, поэтому для описания таких исследований формулы (9.6), (9.14) и (9.17) следует использовать совместно с формулами (1.33) или (7.13), либо их аналогами, полученными для взаимодействующих частиц (см. главы 1–3).

9.2.2. Транспорт воды. Баланс воды в живых тканях является одним из важных показателей их состояния. При диффузии молекул (белков, сахаров, спиртов, полимеров и т. д.) в ткани вода должна участвовать в процессах молекулярного движения [238]. Вода может переноситься через полупроницаемую мембрану (некоторый слой ткани) благодаря повышенной концентрации растворенного вещества в одной из двух частей системы. Это имеет место для мембран, более проницаемых по отношению к воде, чем к растворенному веществу, и называется осмосом [238, 1815]. Простейший случай транспорта воды — это когда мембрана обладает проницаемостью по отношению к воде, но полностью непроницаема для молекул растворенного вещества. В общем случае биологические мембраны проницаемы как для воды, так и растворенных в ней веществ, однако степень проницаемости для воды и растворенных веществ может быть существенно различной. Это наиболее сложный для описания случай, однако ситуация упрощается, когда вода и растворенное вещество проникают через мембрану одним и тем же путем, например через межфибриллярные пространства (поры) в фиброзных тканях, которые заполнены интерстициальной жидкостью, содержащей воду. В этом случае потоки воды и растворенного вещества взаимодействуют и каждый поток зависит от степени такого взаимодействия. Взаимодействие между стационарными потоками может быть описано в рамках необратимой термодинамики [1815].

Предполагая, что в системе присутствует только один тип растворенных молекул (через мембрану движутся два потока: поток воды J_w и поток растворенного вещества J_s , которые пропорциональны градиентам химического потенциала воды и растворенного вещества), можно найти объемный поток, определяемый как [1815]

$$J_V = J_w \bar{V}_w + J_s \bar{V}_s, \quad (9.18)$$

где \bar{V}_w и \bar{V}_s — парциальные мольные объемы, имеющие вид, следующий из уравнения

$$J_V = L_p(\Delta p - \sigma RT \Delta C_s). \quad (9.19)$$

Поток растворенного вещества можно выразить как [1815]

$$J_s = RT \omega \Delta C_s + \bar{C}_s (1 - \sigma) J_V. \quad (9.20)$$

В формулах (9.19) и (9.20) L_p — феноменологический коэффициент, отражающий тот факт, что объемный поток может быть увеличен за счет роста гидростатического давления Δp ; $RT \Delta C_s$ — осмотическое давление, σ — коэффициент отражения ($\sigma = -L_{pd}/L_p$), где L_{pd} — феноменологический коэффициент, характеризующий, с одной стороны, объемный поток, индуцированный осмотическим давлением в мембране $RT \Delta C_s$, а с другой стороны — эффективность разделения молекул воды и растворенного вещества; $\omega = (L_D - L_p \sigma^2) \bar{C}_s$, где L_D — феноменологический коэффициент, характеризующий обменный поток, индуцированный осмотическим давлением $RT \Delta C_s$, а \bar{C}_s — средняя концентрация растворенного вещества в двух взаимодействующих растворах.

Для идеальной полупроницаемой мембраны $\sigma = 1$. Для мембран, проницаемых для молекул растворенного вещества $0 < \sigma < 1$. Формулы (9.19) и (9.20) справедливы для растворов с низкой концентрацией. Нужно заметить, что объемный поток для полупроницаемой мембраны, описываемый формулой (9.19), имеет одинаковый механизм возникновения как для гидростатического, так и для осмотического давления. Поэтому для пористых (волокнистых) материалов, таких как склера, дерма, мышечная ткань, твердая мозговая оболочка, ожидается, что осмотическое давление индуцирует поток воды благодаря растущему гидростатическому давлению, а не за счет

независимой диффузии молекул воды, обусловленной градиентом ее концентрации, поскольку это влечет за собой существенно большее сопротивление среды [1815].

9.2.3. Набухание и гидратация ткани. При применении химических агентов в качестве ОПА большое значение имеет уровень рН среды, поскольку он определяет набухание или усадку (сжатие) ткани [1816]. Набухание или сжатие фиброзной ткани обусловлено не только изменением размеров коллагеновых и/или эластиновых волокон, но и объема образца из-за изменения среднего расстояния между волокнами. Хорошо известно, что изменение рН окружения в кислотную или щелочную сторону относительно коллоидной изоэлектрической точки повышает степень набухания. Это объясняется появлением положительного или отрицательного заряда коллоидных частиц и, следовательно, повышением степени гидратации. В общем случае начальное рН-состояние исследуемой ткани и кислотная или щелочная природа ОПА могут приводить к различным зависимостям толщины ткани или ее объема от концентрации химического агента (или времени пропитывания). Такое поведение ткани необходимо учитывать при оценке ее свойств на основании оптических измерений. Например, набухание или сжатие склеры глаза наблюдалось для различных условий приготовления образцов ткани и используемых растворов [238, 555, 1625, 1628, 1686, 1687].

Детальное исследование набухания склеры и роговицы быка в зависимости от рН и ионной силы раствора, в котором находится исследуемый образец, и в условиях отсутствия потерь протеогликанов тканью представлено в работе [779]. Для измерения межмолекулярных расстояний (ММР), диаметров волокон, D-периодичности и межфибриллярных расстояний (МФР) коллагена как функций рН, ионной силы и гидратации ткани, использовалась дифракция рентгеновских лучей. Гидратация H определялась как

$$H = \frac{\text{Weight}_{\text{wet}} - \text{Weight}_{\text{dry}}}{\text{Weight}_{\text{dry}}}. \quad (9.21)$$

Было обнаружено, что обе ткани набухают вблизи рН = 4 (изоэлектрическая точка), что более высокая гидратация достигается при низких значениях ионной силы и что склера набухает примерно на одну треть от набухания роговицы. В обеих тканях ММР уменьшалось с ростом ионной силы; в случае гидратации склеры при $H \approx 2,5$ и рН = 7,0 величина ММР изменялась от 1,71 до 1,61 нм при 33-кратном увеличении ионной силы. ММР практически не менялось при гидратации, когда $H > 1$ ($H = 3,2$ — физиологическая гидратация); соответствующие средние значения ММР для роговицы $1,75 \pm 0,04$ нм ($n = 12$) и для склеры $1,65 \pm 0,02$ нм ($n = 9$) при рН = 7,4. Для обезвоженных тканей ($H = 0$) среднее расстояние составило $1,25 \pm 0,02$ нм ($n = 2$) для роговицы и $1,27 \pm 0,01$ нм для склеры.

Упаковка волокон, характеризуемая (МФР)², является другим важным параметром, определяющим возможность управления рассеянием света в ткани. Для роговицы быка при физиологическом рН = 7,4 квадрат МФР линейно убывает от $\sim 9,2 \cdot 10^3$ нм² (при сильной гидратации ткани, $H = 9,7$) до $\sim 2,1 \cdot 10^3$ нм² (при гидратации в десять раз меньшей), а при физиологической гидратации, $H = 3,2$, составлял $4,2 \cdot 10^3$ нм². Как диаметр волокон (среднее значение $39,0 \pm 1,1$ нм ($n = 6$)), так и D-периодичность (среднее значение $64,50 \pm 0,35$ нм ($n = 6$)) коллагена роговицы не зависели от гидратации и рН, когда гидратация была ниже единицы. Это означает, что волокна преимущественно поглощают начальную воду, а затем сохраняют примерно постоянный диаметр. То, что D-периодичность остается неизменной при гидратации, означает, что при набухании не происходит заметного изменения размеров вдоль оси волокон. Аналогичные тенденции можно ожидать и для склеры, как среды на базе коллагена. Объем ткани при данном уровне гидратации можно

выразить через сухой объем. Соответствующее выражение, описывающее объем роговицы при ее гидратации, можно записать как [779]

$$V_H = V_T(1 + 1,066 \cdot H). \quad (9.22)$$

Это уравнение должно применяться к любому объему ткани, например к объему, ассоциированному с каждым волокном.

Набухание склеральной ткани следует тем же принципам, что и для роговицы, с той же изоэлектрической точкой вблизи $pH = 4$, но на более низком уровне набухания. Как было замечено в работе [779], существует несколько причин более низкой гидратации склеры: низкая концентрация протеогликанов, высокое содержание коллагена и большой размер волокон с меньшей общей площадью поверхности, чем в роговице, а также структурные особенности, связанные с объединением волокон в пучки, которые могут ветвиться и переплетаться друг с другом.

Авторами работы [779] было обнаружено, что для роговицы быка при значениях pH вблизи изоэлектрической точки за счет быстрого роста рассеяния света по мере гидратации оптическое пропускание также быстро уменьшается. Например, при $pH = 5$ пропускание составляло примерно 98% для $H = 2$; 87% для $H = 3,2$ и только 12% для $H = 6$. Напротив, рассеяние света при более высоких значениях pH (6–8) медленно менялось по мере гидратации: пропускание было выше 90% для любого уровня гидратации от 1 до 7 с локальным максимумом 98% при $H = 4$. В соответствии с модельными представлениями, детально обсужденными в гл. 3, прозрачность роговицы зависит от ряда структурных параметров, таких как диаметр волокон, плотность их упаковки, положение каждого волокна относительно его соседей и показатели преломления коллагена и межфибриллярного матрикса, так что изменения одного или нескольких из этих параметров может быть достаточным для усиления или ослабления рассеяния света.

Из проведенных исследований следует, что для увеличения прозрачности роговицы, обусловленной отеком стромы, можно использовать гипертонические капли, экстрагирующие из ткани достаточное количество воды. Как было показано в работе [779], для лечения отека роговицы лучше других гипертонических препаратов подходит хлорид натрия, поскольку он может также снижать давление набухания в строме и уменьшать диаметр волокон при частом применении.

Связь между гидратацией H (мг воды на мг сухого веса ткани) и толщиной роговицы d (в мм) описывается следующими эмпирическими формулами [1413, 1688, 1689]: для роговицы кролика

$$H = 10 \cdot d - 0,42, \quad (9.23)$$

для роговицы быка

$$H = 5,3 \cdot d - 0,67. \quad (9.24)$$

9.3. Оптическое просветление фиброзных тканей

9.3.1. Спектральные свойства склеры при иммерсии. В нормальном состоянии склера глаза (см. разд. 3.6 и рис. 3.24) является мутной средой, непрозрачной в видимом диапазоне [768, 769]. Природа спектра склеры может быть понята на основе рассеяния света системой полидисперсных нерегулярно расположенных коллагеновых цилиндров, погруженных в базовое вещество с более низким показателем преломления (см. гл. 3) [791] и сильными полосами поглощения воды [768, 769, 781]. При естественной толщине 0,6–0,8 мм эта ткань демонстрирует многократное рассеяние и имеет насыщенный белый цвет. Переход от многократного рассеяния

к рассеянию низкой кратности или однократному рассеянию можно обеспечить путем высушивания образца ткани [768, 769] (рис. 3.24 в) или пропитывания его иммерсионной жидкостью [238, 781, 791, 1338, 1685, 1728, 1729, 1743, 1766, 1811].

Рисунок 9.1 дает схематическое представление структуры образца склеры и геометрии его облучения светом. Аналитические подходы к описанию распространения света в склере пригодны только при использовании сильно упрощающих предположений, существенно снижающих адекватность модели. Поэтому для вычисления спектральных характеристик и статистики фотонов использовалось прямое моделирование миграции фотонов в среде с использованием метода Монте-Карло [238, 791]. Моделирование спектров пропускания и отражения склеры методом Монте-Карло производилось с использованием функции распределения вероятностей для длины свободного пробега фотона l (см. разд. 1.1.3). Упорядоченность рассеивателей (тонких диэлектрических цилиндров) учитывалась с помощью экспериментальной радиальной функции распределения $g(r)$, полученной из данных электронографии склеры глаза человека [770, 791] (рис. 3.6). Предполагалось, что упорядоченность влияет только на каждый индивидуальный акт взаимодействия фотона с частицей. В качестве угловой зависимости интенсивности света, рассеянного частицей, бралась индикатриса рассеяния цилиндра с диаметром, соответствующим наиболее вероятному значению размера частицы, 120 нм. Эффект многократного рассеяния автоматически включается в процедуру моделирования траектории фотона методом Монте-Карло, при этом пространственное распределение рассеивающих центров предполагается совершенно произвольным. Это приближение справедливо, если область локального упорядочения рассеивающих частиц намного меньше, чем средняя длина свободного пробега фотона в среде, что имеет место в склере.

Результаты такого моделирования для образца склеры (толщина 1 мм, средний диаметр волокон 120 нм, среднее расстояние между коллагеновыми волокнами 285 нм, показатель преломления волокон $n_c = 1,474$, показатель преломления межфибрилярного пространства $n_0 = 1,345$) представлены на рис. 9.3–9.6. Коллимированное пропускание представляет часть фотонов, покидающих слой ткани в направлении, отличающемся от исходного не более чем на $\pm 0,5^\circ$, что соответствует попаданию в апертуру спектрометра. Были рассчитаны также спектры полного пропускания и диффузного отражения, учитывающие реальную геометрию использованных в эксперименте интегрирующих сфер (потери некоторого количества рассеянного света). Расчеты проводились для различных значений показателя преломления базового вещества от 1,345 до 1,450, что соответствовало различным уровням согласования показателей преломления. Ясно видно, что модель описывает главные черты спектров нормальной и подвергнутой иммерсии ткани. Сравнение рассчитанных спектров с наблюдаемыми экспериментально (см. рис. 9.7) показывает, что согласование показателей преломления может рассматриваться как основной механизм, отвечающий за увеличение прозрачности ткани.

Моделирование методом Монте-Карло позволяет описать переход режима рассеяния ткани от полностью диффузного к когерентному (с преобладанием баллистических фотонов) по мере согласования показателей преломления. Такой переход хорошо иллюстрируется гистограммами на рис. 9.4–9.6. Рассчитывались числа фотонов, рассеянных назад и вперед и собранных интегрирующими сферами. Эти гистограммы показывают, что для склеры с рассогласованными или слегка согласованными показателями преломления ($n_0 = 1,370$) имеется широкое распределение числа актов рассеяния со средним значением 25–30 столкновений, которые претерпевают фотоны, проходящие вперед, при этом баллистических фотонов (соответствующих когерентной части пропущенного света) не видно на гистограмме. Для хорошо согласованных показателей преломления появляются баллистические фотоны. В частности, для

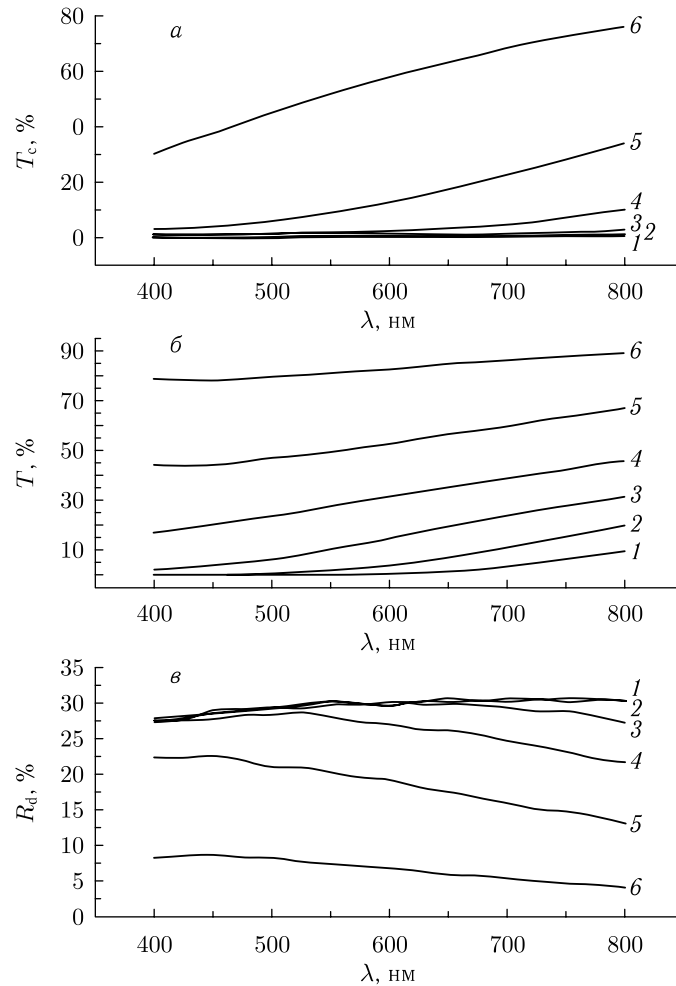


Рис. 9.3. Спектры коллимированного (*a*) и полного (*б*) пропускания, а также спектры диффузного отражения (*в*) склеры глаза человека при толщине 1 мм, рассчитанные методом Монте-Карло для различных значений степени согласования показателей преломления при геометрии, приближенной к экспериментальной (см. рис. 9.7); показатель преломления коллагеновых волокон $n_c = 1,47$, межфибрилярного вещества $n_0 = 1,35, 1,37, 1,39, 1,41, 1,43$ и $1,45$ [651, 791]

умеренно согласованных показателей преломления ($n_0 = 1,410$) нерассеянные и претерпевшие малое число актов рассеяния фотоны преобладают в обоих направлениях, вперед и назад, при среднем числе столкновений 3–4 для движущихся вперед фотонов и весьма большой баллистической составляющей. Для высокой степени согласования ($n_0 = 1,450$) баллистическая компонента доминирует, а рассеяние мало как вперед, так и назад. В ближнем ИК-диапазоне оптическое просветление тканей и преобразование режима рассеяния от многократного к мало- и даже однократному происходит намного раньше, чем для видимого света. Сильная баллистическая составляющая, появляющаяся в ткани при просветлении, открывает перспективу более широкого применения когерентных диагностических методов в биомедицине.

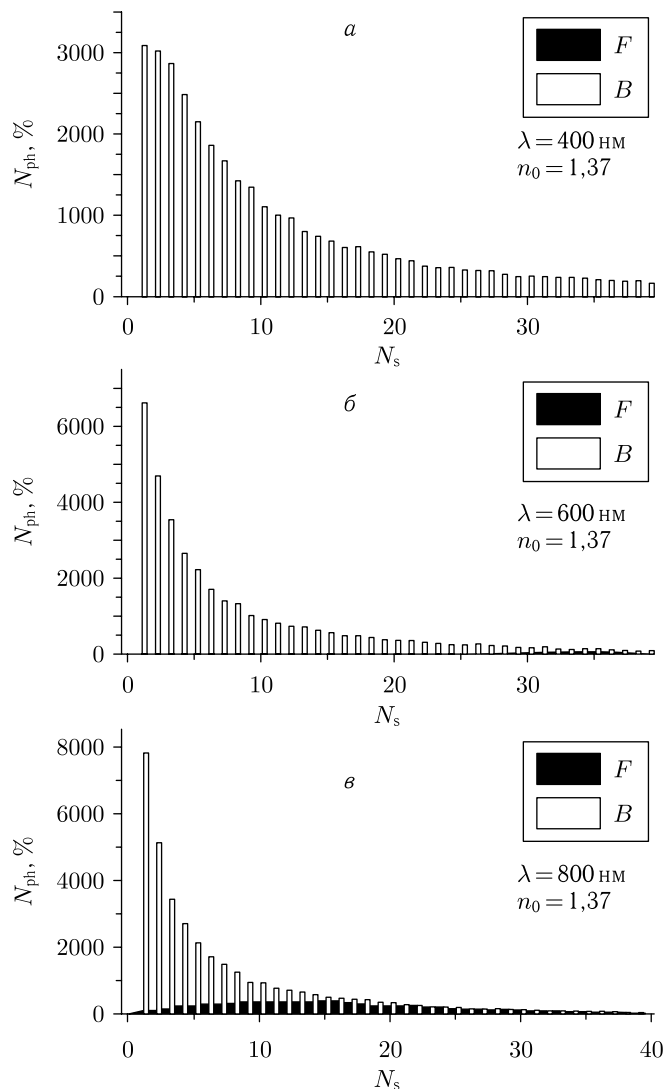


Рис. 9.4. Рассчитанные методом Монте-Карло распределения числа фотонов N_{ph} , рассеянных вперед (F) или назад (B) и испытавших определенное число столкновений N_s прежде, чем покинуть слой склеры глаза человека толщиной 1 мм (геометрия с двумя интегрирующими сферами), для мало согласованных показателей преломления коллагеновых волокон и межфибриллярного вещества ($n_c = 1,474$, $n_0 = 1,370$): *a* — $\lambda = 400 \text{ нм}$; *б* — $\lambda = 600 \text{ нм}$; *в* — $\lambda = 800 \text{ нм}$ [651, 791]

Полное пропускание, диффузное отражение и коллимированное пропускание образцов склеры измерялись в интервале длин волн от 200 до 2200 нм с использованием коммерческих спектрофотометров Varian Cary 5E, 500 или 2415 с внутренней интегрирующей сферой [238, 766, 1636, 1637, 1685]. Для реконструкции коэффициента поглощения и приведенного коэффициента рассеяния по данным таких измерений применялись обратный метод добавления–удвоения (ОДУ) [1270] или обратный метод Монте-Карло (ОМК) [1625].

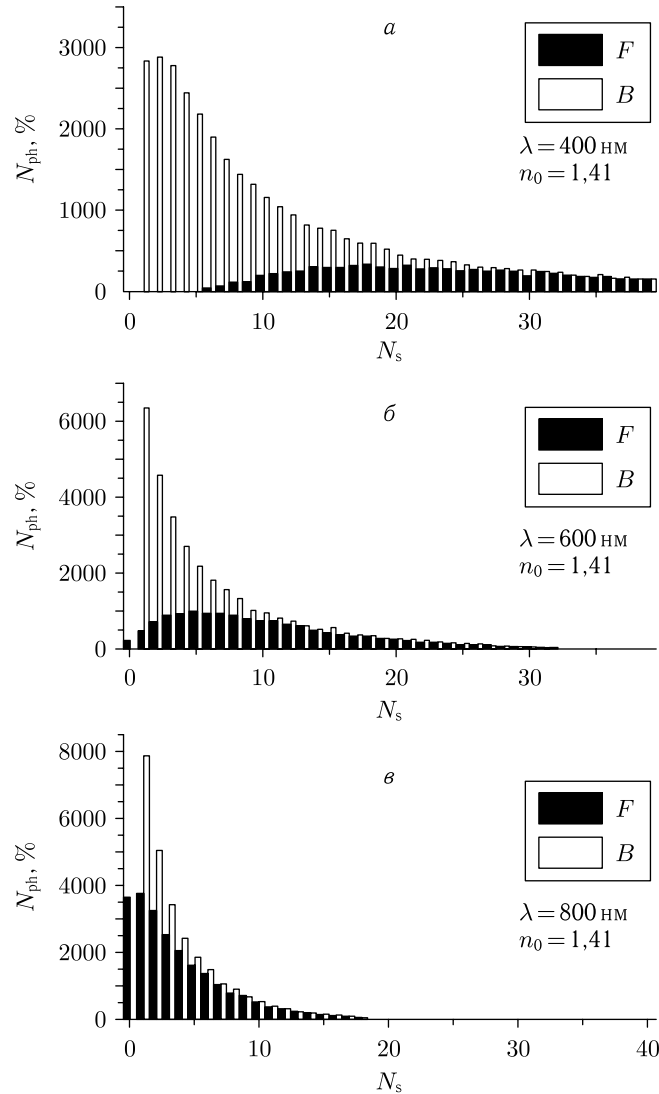


Рис. 9.5. Рассчитанные методом Монте-Карло распределения числа фотонов N_{ph} , рассеянных вперед (F) или назад (B) и испытавших определенное число столкновений N_s прежде, чем покинуть слой склеры глаза человека толщиной 1 мм (геометрия с двумя интегрирующими сферами), для средне согласованных показателей преломления коллагеновых волокон и межфибрилярного вещества ($n_c = 1,474$, $n_0 = 1,410$): *a* — $\lambda = 400 \text{ нм}$; *б* — $\lambda = 600 \text{ нм}$; *в* — $\lambda = 800 \text{ нм}$ [651, 791]

Для исследования оптического просветления тканей *in vitro* и особенно *in vivo* подходят волоконно-оптические спектрометры с дифракционной решеткой, такие как LESA-5, 6, 7 (BioSpec, Россия) и PC1000, PC2000, USB2000 (Ocean Optics Inc., США), обеспечивающие быстрое снятие спектра во время действия иммерсионного агента [1059, 1293, 1439, 1625, 1630, 1643, 1645, 1651, 1652, 1695, 1698]. Как правило, интерес представляет диапазон от 400 до 1000 нм, а волоконный зонд

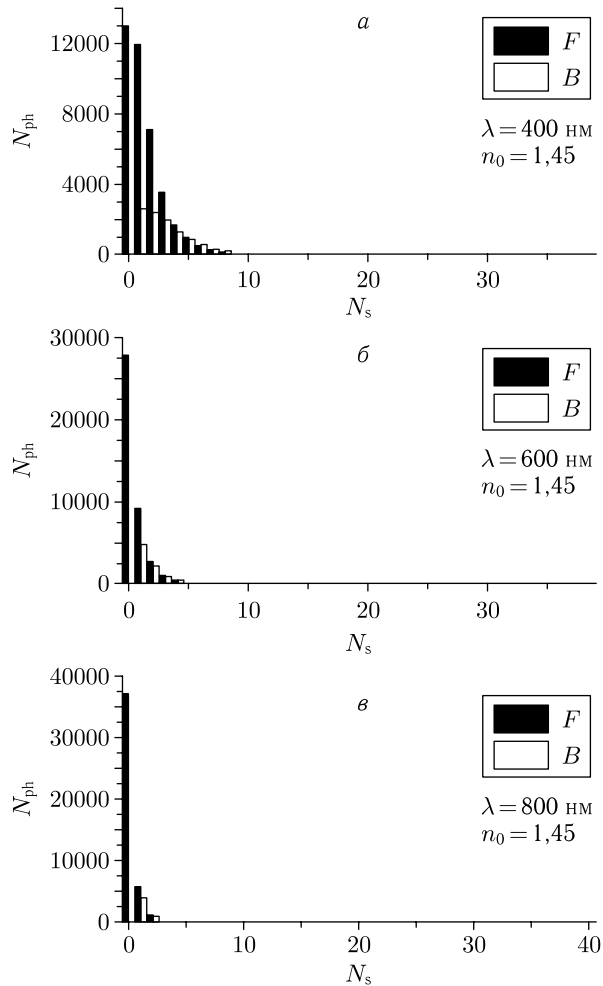


Рис. 9.6. Рассчитанные методом Монте-Карло распределения числа фотонов N_{ph} , рассеянных вперед (F) или назад (B) и испытавших определенное число столкновений N_s прежде, чем покинуть слой склеры глаза человека толщиной 1 мм (геометрия с двумя интегрирующими сферами), для хорошо согласованных показателей преломления коллагеновых волокон и межфибриллярного вещества ($n_c = 1,474$, $n_0 = 1,450$): а — $\lambda = 400$ нм; б — $\lambda = 600$ нм; в — $\lambda = 800$ нм [651, 791]

спектрометра обычно состоит из семи оптических волокон. Одно волокно направляет свет от спектрометра на объект, а шесть остальных собирают отраженное излучение. Среднее расстояние между осветительным и приемным волокнами около 200 мкм для PC1000 и LESA-6 и около 2 мм для LESA-5. Спектрометры калибруются с использованием диффузно отражающего эталона белого цвета, равномерно отражающего свет во всем видимом диапазоне, например слоя $BaSO_4$ с гладкой поверхностью, или любого другого эталона, равномерно отражающего свет в спектральном диапазоне измерений.

Спектры образцов склеры человека снимались *in vitro* [238, 1685]. Склеру тщательно очищали от ресничного тела и сетчатки, мыли и разрезали на кусочки раз-

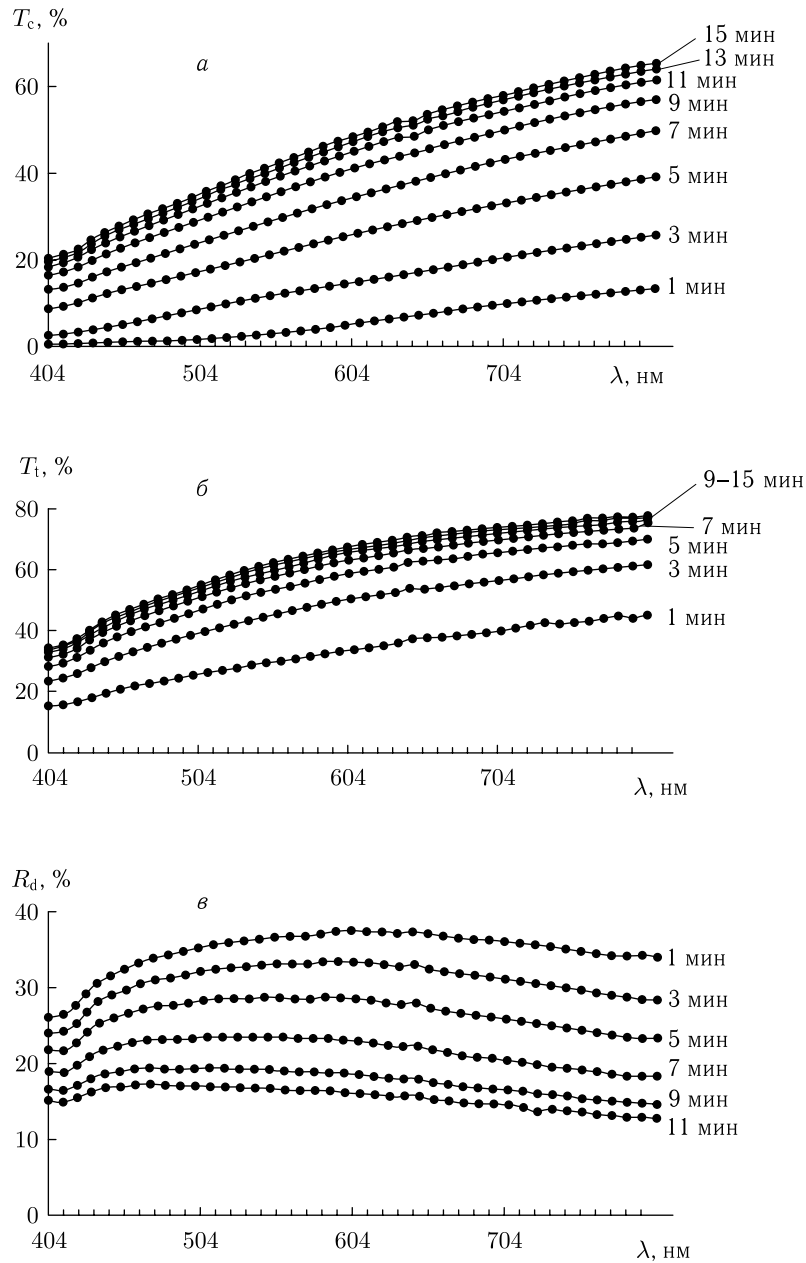


Рис. 9.7. Экспериментальные спектры образцов склеры глаза человека, снятые через различные интервалы времени при пропитывании раствором тразографа-60 (первый спектр был снят через минуту после того, как образец был погружен в раствор, и затем измерения проводились с интервалом 2 мин. Время измерения отдельного спектра при проходе от длинных волн к коротким составляло около 85 с): *a* — коллимированное пропускание T_c , толщина образца 0,6 мм; *б* — полное пропускание T_t , толщина образца 0,7 мм; *в* — диффузное отражение R_d ; толщина образца 0,7 мм (сильно пигментированная ткань) [238, 1685]

мером 10×10 мм. Образец склеры помещался в ячейку объемом 1 мл, заполненную осмотической жидкостью или физиологическим раствором. Для оптического просветления склеры в работах [238, 1685] использовались три различных типа химических агентов. Основная часть экспериментов была проведена с использованием рентгеноконтрастного вещества тразографа — 60 % и 76 % водного раствора производной 2,4,6-трийодбензойной кислоты с молекулярным весом около 500. Некоторые измерения были выполнены с двумя ОПА с совершенно разными молекулярными весами, например глюкозой (~ 180) и ПЭГ (6000 или 20000). При комнатной температуре показатели преломления некоторых из использованных агентов, измеренные с помощью рефрактометра Аббе, имели следующие значения: тразограф-60, $n = 1,437$; тразограф-76, $n = 1,460$; растворы ПЭГ (6000): $n = 1,368$ (0,4 г/мл), 1,394 (0,6 г/мл), 1,403 (0,8 г/мл) и 1,469 (1,0 г/мл); растворы глюкозы: $n = 1,363$ (0,2 г/мл), 1,378 (0,3 г/мл), 1,391 (0,4 г/мл) и 1,415 (0,54 г/мл). Для водных растворов глюкозы показатель преломления на любой длине волны видимого и ближнего ИК-диапазона, где глюкоза не имеет сильных полос поглощения, можно рассчитать по формулам (6.5) и (7.39).

Типичные спектры коллимированного и полного пропускания, $T_c(\lambda)$ и $T_t(\lambda)$, и спектр диффузного отражения $R_d(\lambda)$, измеренные с помощью спектрофотометра с интегрирующей сферой в разные моменты времени во время действия тразографа-60 представлены на рис. 9.7 [238, 1685]. Нетрудно видеть, что необработанная склера слабо пропускает видимый и ближний ИК свет. Применение тразографа делает эту ткань в высокой степени прозрачной — до 70–75 % на длине волны 600–800 нм у образца, который держали в растворе 7–10 мин. В дополнение к этому, его отражательная способность в этом диапазоне длин волн упала с 35–40 % до 13–15 %.

По множеству измерений с различными образцами склеры можно сделать вывод, что в диапазоне от 400 до 500 нм пропускание необработанной склеры составляет менее 1–2 %, а при переходе в ближний ИК-диапазон увеличивается до 6–30 % в зависимости от толщины и пигментации образца. Тразограф или иной агент не только увеличивает пропускание, но и меняет форму спектральной кривой: в среднем, для коротких длин волн, коллимированное пропускание увеличивалось от 1–2 % до 20 % (10–20 раз), а для длинных волн от 20–30 % до 50–80 % (2,5 раза).

Для оптически просветленной склеры коллимированный свет дает основной вклад в пропускание. Прямые измерения, выполненные на образце склеры толщиной 0,75 мм, обработанном тразографом-60, в течение 40 мин, показали, что пропускание при угловой апертуре приемной системы 30° составляло $T_{30} \approx 35\%$ на 400 нм и $\approx 85\%$ на 840 нм, а коллимированное пропускание (угловая апертура приемника менее 1°) составляло $T_c \approx 27\%$ на 400 нм и $\approx 85\%$ на 840 нм. Из этих измерений следует, что баллистический компонент формируется быстрее и более эффективно для ИК-излучения. Из ПЗС-изображений лазерного пучка, пропущенного через склеру при различных уровнях оптического просветления (см. рис. 9.8), также видно формирование баллистической группы фотонов (центр картины) при уменьшении кратности рассеяния. Эти изображения качественно подтверждают результаты расчета статистики фотонов при просветлении ткани (рис. 9.4–9.6).

Эффективность просветления ткани зависит от концентрации и температуры используемых растворов. Для склеры быка при комнатной температуре ($18,5^\circ\text{C}$), максимум коллимированного пропускания на 450 нм составляет: $T_{c,\text{max}} = 13\%$ (тразограф-60), 22 % (глюкоза, 45 %), 39 % (тразограф-76), 46 % (ПЭГ (6000), 80 %), а на 700 нм — $T_{c,\text{max}} = 73\%$ (глюкоза, 45 %), 76 % (тразограф-60), 99 % (тразограф-76 и ПЭГи, 6000 и 20000, 80 %) [1692]. Максимальное пропускание достигается через

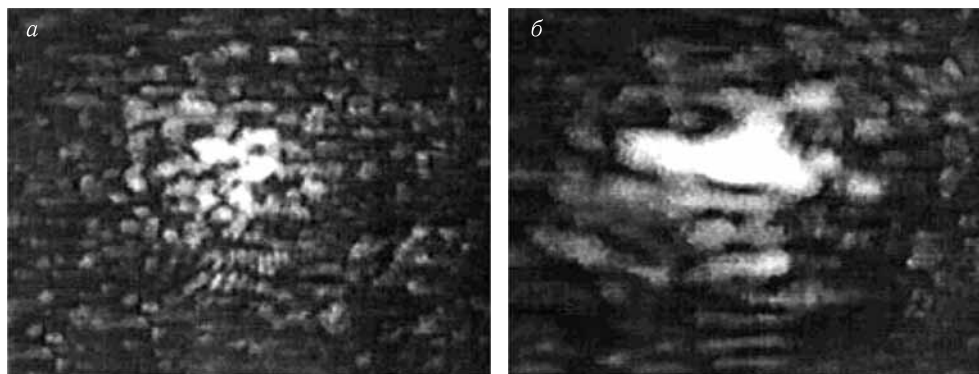


Рис. 9.8. Спеклограммы, записанные для двух различных моментов времени в дальней зоне поля для образца оптически просветленной склеры глаза человека при облучении сфокусированным пучком He:Ne-лазера (633 нм). Увеличение прозрачности образца было вызвано тразографом-60, который находился в кювете с образцом в течение 2,5 мин (а) и 10 мин (б) [555]

15–30 мин. При физиологической температуре этот временной промежуток значительно сокращается. Например, для раствора ПЭГ 20000 (80 %) время максимального просветления ткани менялось с 27 мин при 18,5 °С до 12 мин при 38 °С.

Зависящее от времени коллимированное пропускание образца склеры, измеренное на длине волны 633 нм в процессе воздействия тразографа-60, показано на рис. 9.9. Он показывает кинетику просветления ткани. Аналогичные характеристики были измерены при воздействии глюкозы и ПЭГ. Временной отклик интенсивности пропущенного тканью света можно использовать для оценки коэффициентов диффузии взаимодействующих жидкостей: воды и агента (тразографа, глюкозы, глицерина, ПЭГ и т.п.). Основываясь на ранее изложенной теории, можно оценить коэффициент диффузии агента, предполагая, что вода и агент диффундируют по одним и тем же путям. Простой алгоритм для определения коэффициента диффузии дается формулами (9.1), (9.4), (9.6), (9.14) и (9.17). Имеются и более сложные алгоритмы, учитывающие набухание и сжатие ткани и дающие решение обратной оптической задачи для данной измерительной процедуры (методами ОДУ или ОМК) [1177, 1625, 1651, 1652, 1686, 1729].

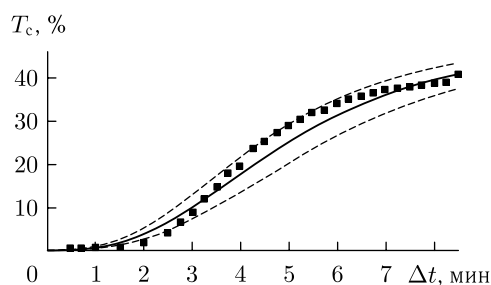


Рис. 9.9. Зависящее от времени коллимированное пропускание (точки) образца склеры глаза человека, толщиной 0,5 мм, измеренное одновременно с пропитыванием раствором тразографа-60 [238]. Сплошная и штриховые линии представляют среднее значение и верхнюю и нижнюю границы для коллимированного пропускания T_c , рассчитанные на основе экспериментальных данных для коэффициента диффузии тразографа $D_T = (1,46 \pm 0,19) \cdot 10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$

Данные о коэффициентах диффузии различных образцов склеры глаза человека представлены в работе [200]. Значения D_T , рассчитанные с использованием примерно 30 значений T_c , измеренных для каждого образца в различные интервалы времени, дают вполне разумные среднеквадратичные ошибки и разницу между средними значениями величин от образца к образцу. Как можно видеть из рис. 9.9, среднеквадратичные отклонения включают низкочастотные колебания $T_c(t)$, которые могут быть обусловлены пространственно-временными флуктуациями диффузионной способности агента при взаимодействии со структурой ткани и могут быть исключены из ошибок измерений при использовании более точной модели протекающих процессов. В среднем полученные значения D_T не сильно отличаются от значений D_a для диффузии малых молекул в воде, с учетом некоторого затруднения их диффузии в матриксе ткани по сравнению с водой [1815].

Нужно заметить, что для гиперосмотических агентов транспорт жидкости в ткани может быть более сложным, поскольку в нем участвуют по крайней мере два взаимодействующих потока. Для более полного описания просветления ткани в этом случае необходимо дополнительное измерение показателя преломления просветляющего агента, вес и/или толщина ткани и осмотическое давление в процессе ее иммерсии. Такой мониторинг показателя преломления тразографа-60 в ходе оптического просветления склеры дал следующие значения: 1,4370 ($t = 0$); 1,4321 (12 мин); 1,4222 (20 мин), 1,4025 (40 мин). Измерения веса образцов ткани до и после действия агентов дали следующие значения: тразограф-60 (образец $5 \times 8 \times 0,6 \text{ мм}^3$), 54 мг ($t = 0$) и 51 мг (34 мин); глюкоза (40%, рН = 3,5) (образец $10 \times 11 \times 0,5 \text{ мм}^3$), 82 мг ($t = 0$) и 66 мг (20 мин); РЕГ (6000) (1 г/мл) (образец $8 \times 10 \times 0,5 \text{ мм}^3$), 65 мг ($t = 0$) и 48 мг (60 мин). Таким образом, относительное уменьшение веса образца составило: 5,5% для тразографа-60, 15,5% для 40%-й глюкозы и 28% для ПЭГ (6000). Оба эксперимента с показателем преломления и взвешиванием показывают разницу в осмотических свойствах использованных агентов и их способности к дегидратации ткани, которая является низкой для тразографа-60, средней для 40%-й глюкозы и высокой для ПЭГ (6000). Из эксперимента следует, что в оптическом просветлении склеры тразографом-60 доминирует процесс замещения межфибриллярной жидкости (в основном, воды) тразографом-60, показатель преломления которого выше, чем у воды. Значительное уменьшение показателя преломления жидкости в кювете с образцом означает, что вода эффективно покидает ткань, а небольшая потеря веса образца говорит о том, что вода замещается тразографом-60. Таким образом, можно предположить, что в системе имеется два приблизительно одинаковых потока: поток воды J_w , направленный наружу из слоя, и поток растворенного вещества J_s — внутрь слоя. Оба потока пропорциональны градиентам химического потенциала воды и растворенного вещества (см. формулу (9.19)) [1815]. Для глюкозы и особенно для ПЭГ дегидратация играет важную роль из-за неравенства двух потоков: поток воды J_w из слоя ткани больше, чем поток растворенного вещества J_s внутрь слоя. Поэтому структурные изменения коллагеновых волокон и расстояний между ними, вызванные дегидратацией и описанные в разд. 9.2.3 [779], должны учитываться в модели просветления ткани на основе ее дегидратации.

Взаимодействие ОПА, проникшего внутрь ткани, с коллагеновыми волокнами может отвечать за квазипериодические низкочастотные (с периодом 3–4 мин) осцилляции пропускания света, которые хорошо видны на рис. 9.9. Осциллирующий характер отклика ткани можно объяснить многоступенчатой природой диффузии жидкости в неоднородной среде [238, 555]. На первом этапе проникновение ОПА в ткань приводит к выравниванию показателей преломления интерстициальной жидкости и гидратированного коллагена волокон, в результате чего существенно увеличивается прозрачность. Следующий этап характеризуется взаимодействием ОПА,

содержащегося в обновленной интерстициальной жидкости, с коллагеном волокон, что приводит к дегидратации коллагена и росту его показателя преломления, что слегка нарушает оптическое согласование и вызывает небольшое уменьшение пропускания. Возникший дисбаланс концентраций воды и ОПА ведет, в свою очередь, к проникновению дополнительного количества ОПА в образец, что вызывает восстановление согласования показателей преломления и увеличение прозрачности, — это третий этап взаимодействия. Собственная инерция каждого из рассмотренных процессов может вызывать установление квазипериодических колебаний с периодом и амплитудой, зависящими от параметров нелинейной системы. Весьма регулярные осцилляции глубины ОКТ-изображения кожи хомяка и крысы с периодом, близким к 2,5 и 3,5 мин соответственно, были также обнаружены при иммерсии ткани глицерином [1721].

Измеренные значения осмотического давления оказались равными 4,3 МПа для тразографа-60 и 7,1 МПа для тразографа-76 [238]. Для необработанной склеры значение осмотического давления было равно 0,74 МПа, и оно возрастало после применения тразографа-60 в течение 30 мин до 5,02 МПа. С одной стороны, осмотическое давление обуславливает появление и интенсивность потоков жидкостей (см. разд. 9.2.2 и формулы (9.19) и (9.20)), что необходимо для эффективного просветления, но, с другой стороны, слишком большое осмотическое давление может разрушить структуру ткани. Прямые гистологические исследования показали, что даже при весьма длительном воздействии известных ОПА не происходит серьезных необратимых изменений в клеточной и фиброзной структуре склеры человека [1693]. Например, для тразографа-60 время обратимого воздействия без значительных нарушений составляет по крайней мере 30 мин, при этом могут наблюдаться лишь небольшие изменения структуры ткани, характеризующиеся умеренным набуханием ее локальных структур.

Обратимость структурных изменений ткани при воздействии ОПА также видна из данных, представленных на рис. 9.10 [555, 1694]. Эти данные показывают, что переход от многократного рассеяния к однократному, т. е. наступление оптической прозрачности и установление линейной поляризации прошедшего света, является обратимым. Для демонстрации обратимости образец после воздействия на него ОПА

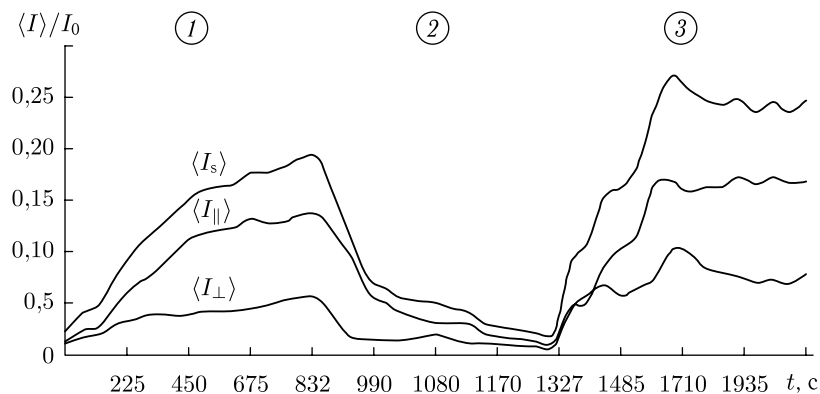


Рис. 9.10. Временные зависимости значений средней интенсивности спеклов $\langle I_s \rangle$ и ее поляризационных компонент $\langle I_{\perp} \rangle$ и $\langle I_{\parallel} \rangle$, измеренных в параксиальной области для образца склеры глаза человека толщиной 0,4 мм, усредненные по траектории сканирования (1,5 мм): 1, 2, 3 — последовательные измерения с образцом, который сначала помещался в тразограф-60, затем в физиологический раствор (0,9% NaCl), а потом снова в тразограф-60; $\lambda = 633$ нм [1694]

в течение времени, достаточного для значительного просветления, погружался на несколько минут в физиологический раствор для вымывания ОПА и восстановления начальных рассеивающих характеристик образца (малое пропускание), а затем физиологический раствор заменялся на ОПА для повторного просветления. В принципе, циклическое просветление ткани можно делать несколько раз.

Теоретические и экспериментальные результаты показывают, что применение ОПА к склере воздействует на согласование показателей преломления коллагеновых волокон и межфибриллярной жидкости, что приводит к значительному изменению (уменьшению) рассеяния света склерой. Для различных ОПА согласование показателей преломления достигается различными путями: 1) вода может покидать межфибриллярное пространство и уходить из образца (дегидратация); 2) ОПА может входить в ткань и заполнять межфибриллярное пространство, а вода может частично покидать межфибриллярное пространство и частично уходить из образца. Первый механизм характерен только для сильно гипертонических агентов. Для фиброзной ткани, типа склеры, второй механизм является предпочтительным для всех исследованных ОПА, поскольку размеры их молекул намного меньше, чем среднее межфибриллярное расстояние (просвет между фибриллами), составляющее примерно 185 нм, в то время как диаметр самой большой молекулы ПЭГ (20000) должен быть менее 5 нм. На самом деле структура межфибриллярного матрикса и структурные свойства молекул также могут оказывать свое влияние на диффузию, поэтому диффузионная способность чужеродных молекул и соответствующая величина потока воды различны для различных используемых агентов. Более сильный поток воды в склере индуцировался ПЭГ, средний по уровню — 40%-й глюкозой и малый — тразографом-60 (см. весовые измерения) [238].

Кинетика оптического просветления ткани с использованием ОПА определяется характерным временем отклика, примерно от 3 до 10 мин. Это хорошо согласуется с результатами Рола [769], который использовал точечное механическое напряжение или локальный нагрев, индуцированный лазерным пучком для локального просветления склеры. Действительно, как следует из (9.19), осмотическое давление и гидростатическое давление, обусловленное, например, механическим напряжением, одинаковым образом индуцируют поток жидкости и время отклика определяется скоростью диффузии воды в межфибриллярном пространстве. Поэтому оптическое просветление при локальном механическом напряжении должно быть в какой-то степени эквивалентно действию гипертонического агента, поскольку локальное напряжение вытесняет воду из области сжатия и одновременно уменьшает толщину слоя ткани. На практике оптическое просветление с помощью ОПА предпочтительнее, так как дает больше возможностей управлять пространственно-временным откликом и эффективностью посредством применения разных химических агентов; кроме того, действие этих агентов может быть комбинированным (оптическое просветление ткани и лечение).

Перечисленные результаты являются общими и могут быть использованы для описания многих других фиброзных тканей. Следует отметить, что склера может рассматриваться как живой эталон диффузного рассеяния в видимом диапазоне, подобный матовому стеклу (см. спектры диффузного отражения на рис. 9.7). Например, благодаря более простой структуре, стабильным и управляемым параметрам склеры по сравнению с кожей, основанные на рассеянии света технологии мониторинга глюкозы, разработанные для кожи [467–469, 991, 1006–1008], могут быть более эффективны в применении к склере. В этой связи интересно проанализировать изменения цвета склеры в процессе ее просветления [622, 791]. Количественная оценка такого изменения по спектрам пропускания и отражения (рис. 9.7) была получена

путем вычисления цветовых координат в системе МКО 1964. Из рассчитанных цветовых треугольников следует, что склера до просветления имеет красноватый оттенок в прошедшем свете, однако это не влияет существенно на зрительное восприятие, поскольку коэффициент пропускания чрезвычайно мал. В процессе просветления склеры ее цвет становится белее. В диффузно отраженном свете исходная склера белая, что и наблюдается визуально. При просветлении цвет склеры в отраженном свете слабо смещается в сторону голубоватого оттенка.

С использованием волоконно-оптического спектрометра с линейкой фотодиодов, показанного на рис. 9.11, были выполнены детальные измерения *in vitro* для образцов склеры человека при воздействии на них различных ОПА, не имеющих сильных полос поглощения в исследуемом диапазоне длин волн, 400–800 нм (глюкоза, тразограф, верографин и пропиленгликоль) [1651]. При исследованиях *in vitro* удалялись конъюнктива и ресничное тело, а также сетчатка и сосудистая оболочка. Средняя толщина образцов составляла примерно 0,5 мм. Образцы закреплялись на пластиковой подложке с квадратной апертурой $5 \times 5 \text{ мм}^2$ (обеспечивалась эффективная диффузия ОПА с обеих сторон образца) и помещались в кювету объемом 5 мл, заполненную исследуемым ОПА.

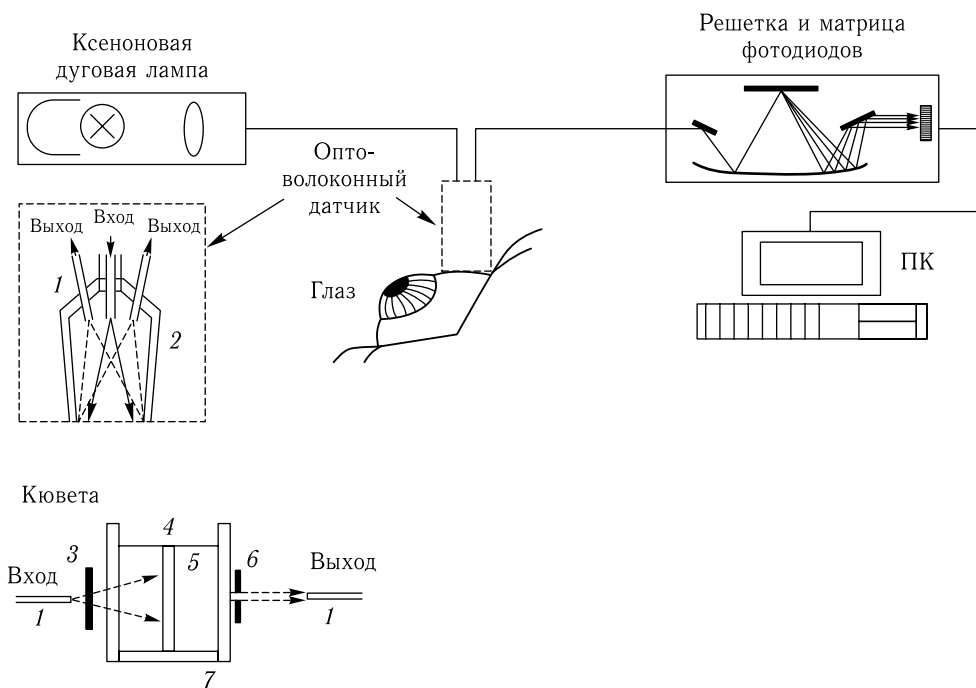


Рис. 9.11. Экспериментальная установка для измерений *in vitro* и *in vivo* коллимированного пропускания света и спектров отражения [1625]. Измерения *in vitro*: 1 — оптический волоконный световод; 2 — алюминиевый кожух; 3 — нейтральные фильтры; 4 — образец склеры; 5 — ОПА; 6 — диафрагма 0,5 мм; 7 — кювета

Для выяснения механизмов оптического просветления склеры параллельно измерялись спектры коллимированного пропускания и вес образца при помещении его в раствор глюкозы. Рисунки 9.12, 9.13 и 9.14 иллюстрируют кинетику спектров пропускания и изменения веса. Легко видеть, что необработанная склера является

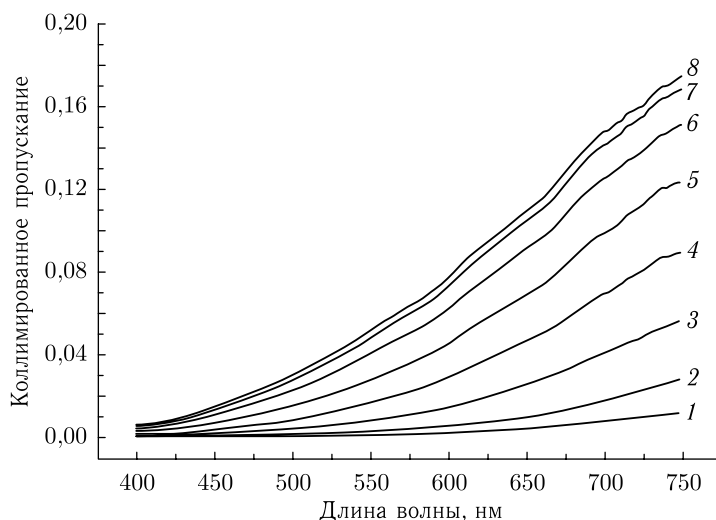


Рис. 9.12. Зависящие от времени спектры коллимированного пропускания образца склеры глаза человека, пропитанного 40%-й глюкозой: 1 — 10 с; 2 — 1 мин; 3 — 2 мин; 4 — 3 мин; 5 — 4 мин; 6 — 5 мин; 7 — 6,5 мин и 8 — 8,5 мин после погружения образца склеры в раствор глюкозы [1625]

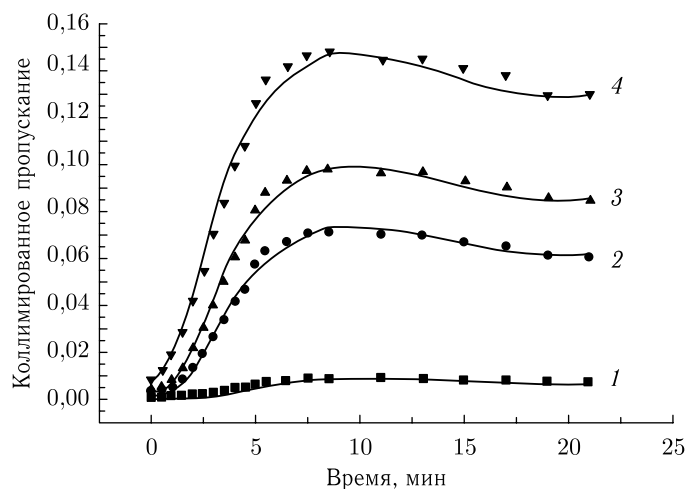


Рис. 9.13. Зависящее от времени коллимированное пропускание образца склеры глаза человека, измеренное на длинах волн 420 нм (1); 589 нм (2); 630 нм (3) и 700 нм (4) одновременно с пропитыванием раствором 40%-й глюкозы [1625]

плохо пропускающей средой для видимого света. Под действием глюкозы эта ткань становится весьма прозрачной. Как следует из рис. 9.13, характерное время отклика для оптического просветления склеры составляет около 5 мин.

На основе представленных измерений и с учетом того, что использованный 40%-й раствор глюкозы, имеющийся в продаже в аптеках, имеет низкий рН (3,5), представляется адекватной следующая модель воздействия глюкозы на склеру. На первой стадии, занимающей примерно 5 мин после помещения образца в раствор глюкозы,

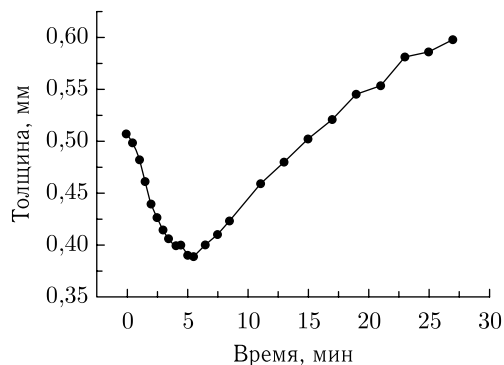


Рис. 9.14. Рассчитанная зависимость толщины образца склеры глаза человека от времени при пропитывании раствором 40%-й глюкозы (моделирование методом Монте-Карло с подгонкой по экспериментальным данным, представленным на рис. 9.12 и 9.13) [1292]

значительное оптическое просветление сопровождается уменьшением толщины образца. На этой стадии наличие просветления можно отнести, в основном, на счет согласования показателей преломления коллагеновых волокон и межколлагенового пространства, куда проникает глюкоза, и осмотического действия окружающей глюкозы, приводящего к дегидратации ткани, что также проявляется в уменьшении толщины образца вплоть до 25% от своей первоначальной величины. Отметим, что оба процесса — диффузия глюкозы внутрь ткани и выход воды (дегидратация) из ткани — приводят к согласованию показателей преломления рассеивателей и базового вещества. Сжатие ткани за счет осмотического давления со стороны глюкозы может дополнительно просветлять ткань вследствие ее большей упорядоченности, но это эффект уже второго порядка малости, как это следует из поведения просветления на втором этапе.

При более длительном воздействии глюкозы, до 7 мин, процесс оптического просветления насыщается из-за установления равновесия между концентрациями компонентов (глюкозы, воды, белков, солей и т. д.) в системе и некоторого увеличения толщины образца. Между 7-й и 15-й минутами включение процесса увеличения толщины образца с возвращением к первоначальному ее значению хорошо заметно на фоне вклада насыщенных молекулярных потоков: коллимированное пропускание слегка идет вниз, но по-прежнему очень велико. Дальнейшее набухание ткани со временем, при котором увеличение толщины достигает 20% ее первоначального значения, не оказывает серьезного влияния на коэффициент пропускания ткани. Несмотря на сложное поведение толщины образца ткани под действием данного специфического химического агента (40%-й глюкозы с $\text{pH} = 3,5$), вариации толщины не сильно влияют на оптическое просветление.

Такое немонотонное поведение толщины ткани — сначала сжатие, а затем набухание — можно объяснить с использованием результатов работы [779], где было экспериментально показано, что для склеры быка гидратация (набухание) может меняться от $H = 2,48$ при значении $\text{pH} = 7$, близком к физиологическому, до $H = 7,15$ при $\text{pH} = 3$. В нашем случае это означает, что на первой стадии, когда значение pH ткани близко к физиологическому, поскольку не сильно меняется под действием глюкозы (ввиду ее малого количества, проникшего в склеру), преобладает дегидратация ткани из-за осмотического действия глюкозы, однако на поздних стадиях из-за большого количества глюкозы, как прошедшей внутрь ткани, так и находящейся в кювете, pH системы в целом (ткань в кювете с глюкозой) идет вниз и происходит набухание.

Следует снова подчеркнуть, что обсуждаемые эффекты сжатия и набухания ткани важны, но не преобладают в действии глюкозы, однако их необходимо учитывать при точном определении скорости диффузии глюкозы и других агентов в ткани. Так, экспериментальные данные по коллимированному пропусканию (рис. 9.12 и 9.13) и изменению толщины образца ткани в процессе воздействия (рис. 9.14) могут быть использованы для оценки коэффициента диффузии глюкозы в склере [654, 1292]. Детальная модель переноса глюкозы в фиброзной ткани описана в работе [1652]. Формулы (9.1), (9.6), (9.14) и (9.17) составляют основу этой модели, которая может быть использована для реконструкции коэффициента диффузии. Рассчитанное среднее значение коэффициента диффузии для переноса 40%-й глюкозы в образце склеры равно $D_G = (3,45 \pm 0,46) \cdot 10^{-6} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ при температуре 20 °С. Это значение не сильно отличается от значений D_a для диффузии легких молекул (таких как сахароза, глюкоза и т. п.) в воде при нулевой концентрации $(3,6-5,2) \cdot 10^{-6} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ при 12–15 °С [1815, 1817, 1818]. При использовании гиперосмотических агентов коэффициент диффузии должен быть близок к коэффициенту диффузии воды в ткани, поскольку это основной поток в системе. В зависимости от структуры ткани это значение может быть равно значению коэффициента диффузии воды в воде $D_w = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ или немного меньше него.

Коэффициент диффузии является функцией размера и формы диффундирующих молекул [1815]:

$$D_a = \text{const} \cdot M^{-S}. \quad (9.25)$$

Для малых молекул $S = 1/2$, а для сферических молекул, диффундирующих в воде (большие молекулы белков) $S = 1/3$. В общем случае параметр S для диффузии в воде лежит в интервале 0,3–0,5, а для диффузии через биологические мембраны он равен примерно 3,5. Например, изменение массы молекулы M от 45 до 122 при диффузии в воде меняет коэффициент диффузии от $1,6 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ до $0,8 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ (вдвое), а для тех же молекул, диффундирующих через плазматическую мембрану — от $1,4 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ до $2,0 \cdot 10^{-10} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ (в 70 раз) [1815].

9.3.2. Модуляционная спектроскопия склеры *in vitro*. Временной отклик оптических характеристик склеры глаза человека на воздействие ОПА можно измерять с использованием метода волн фотонной плотности (см. разд. 1.3) [1626]. Если интенсивность падающего на образец ткани света модулирована на частоте ω , то за счет рассеяния в ткани на той же частоте индуцируется волна фотонной плотности (интенсивности) с амплитудой [1–4, 129]

$$A(r) = A_{\text{dc}} + A_{\text{ac}} \exp[-i(\omega t - \theta)], \quad (9.26)$$

где A_{dc} , A_{ac} и $(\omega t - \theta)$ — постоянная и переменная составляющие амплитуды волны фотонной плотности и ее фаза, соответственно.

Диффузионная теория дает возможность независимо определять коэффициент поглощения и приведенный коэффициент рассеяния из измерений на одной частоте модуляции. Выражения для измеряемых величин: фазовой задержки θ и амплитуды переменной составляющей A_{ac} приведены в работах [1–4, 129] (см. разд. 1.3 и 11.2). Эти выражения зависят от расстояния между источником и приемником r_{sd} , приведенного коэффициента рассеяния μ'_s , и коэффициента поглощения μ_a .

Данные, показанные на рис. 9.15, представляют собой временные зависимости амплитуды переменной составляющей в процессе воздействия тразографа-60 для трех значений расстояния между источником и приемником r_{sd} и двух разных способов применения иммерсионного агента — в виде внутритканевой инъекции и наружного в виде капель. Источником света служил лазерный диод с длиной волны

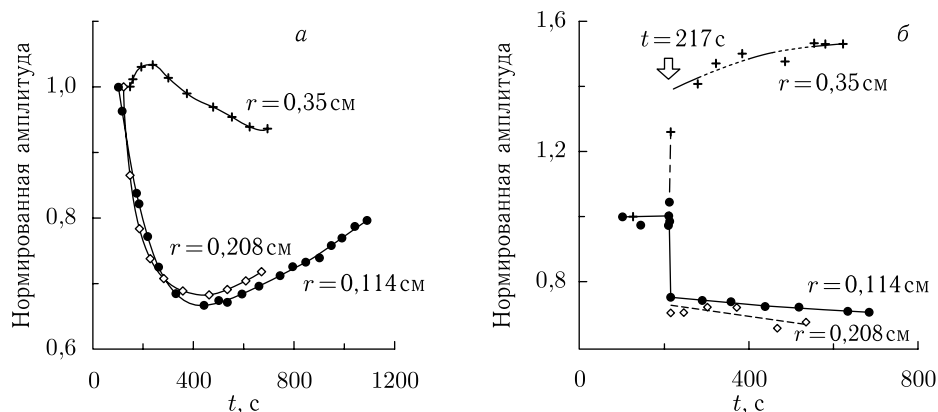


Рис. 9.15. Модуляционные измерения. Зависящие от времени изменения амплитуды оптического сигнала от глазного яблока человека *in situ* после инъекции тразографа-60 (а) и местного нанесения тразографа-60 (б) в окрестности конца приемного оптического волоконного световода [1626]

786 нм и мощностью 4 мВт с многомодовым волоконным световодом (диаметр сердцевины 62,5 мкм) на выходе [1626]. Глубина модуляции интенсивности на частоте 140 МГц обеспечивалась на уровне 80 % изменением тока инжекции лазерного диода. Экспериментальная установка была разработана в Пенсильванском университете. Многоволоконная приемная систем с небольшими расстояниями между приемниками и источником в сочетании с многоканальным волоконно-оптическим переключателем Discop были использованы в иммерсионном эксперименте на склере глаза человека *in situ* для цельного глазного яблока. Для внутритканевой инъекции тразографа-60 просветление склеры наблюдалось уже в течение первых 3 мин. Для малых расстояний между источником и приемником, 1–2 мм, и для сравнительно больших — 3,5 мм, временные зависимости имеют противоположный характер. Имея в виду, что в течение первых трех минут после инъекции агента положительная шкала времени соответствует уменьшению рассеяния из-за иммерсии ткани, противоположные тенденции рассматриваемых зависимостей можно понимать следующим образом. Для малых расстояний между источником и приемником, близких к геометрии точного отражения назад, интенсивность отраженного света убывает с уменьшением рассеяния, а для больших расстояний, когда существенны эффекты поперечной диффузии фотонов, интенсивность сначала идет вверх с уменьшением рассеяния, но если рассеяние продолжает убывать, интенсивность начинает снижаться. Вот почему на кривой наблюдается локальный максимум. На третьей минуте после инъекции агента, благодаря его диффузии в соседние области ткани, амплитуды всех сигналов стремятся к своим начальным значениям. Другой метод применения агента в виде наружного нанесения капель показывает те же тенденции для малых и больших расстояний, что и при инъекции, однако существенные изменения амплитуд наступают моментально после нанесения агента, после чего амплитуды медленно меняются в противоположных направлениях. Такое поведение зависит от специфических особенностей применения агента, а именно 1) поверхностного пропитывания (подчеркивает важность эффекта поверхностной иммерсии); 2) непрерывного обновления агента на поверхности ткани (много капель в течение интервала измерения).

Это исследование, выполненное в условиях, очень близких к измерениям *in vivo*, также показывает, что воздействие на склеру глаза гиперосмотического агента дает

обратимое согласование показателей преломления коллагеновых волокон и интерстициального вещества, которое обеспечивает резкое снижение рассеивающей способности ткани, до 60% в изменении переменного сигнала за 10–12 мин действия тразографа-60.

9.3.3. Исследования склеры *in vivo*. Измерения *in vivo* были выполнены для глаза кролика с использованием экспериментальной установки, показанной на рис. 9.11. Экспериментальные спектры и временной отклик на выбранных длинах волн показаны на рис. 9.16 и 9.17 [1625, 1729]. Температура поверхности глаз кролика была $\sim 38^\circ\text{C}$. 40%-я глюкоза использовалась как агент для оптического просветления склеры и применялась в виде глазных капель. Видно значительное уменьшение отражательной способности в течение первых 5 мин применения глюкозы. Провалы, появляющиеся на длинах волн 420, 530 и 570 нм, вызваны перфузией крови. Более низкая отражательная способность на 420 нм обусловлена сильным поглощением света кровью (полоса Соре гемоглобина). Очевидно, что более быстрое затухание на этой длине волны отражает кинетику перфузии крови из-за некоторой воспалительной реакции конъюнктивы и сосудов склеры глаза, вызванной действием света и осмотическим давлением глюкозы. Поскольку поглощение крови оказывает меньшее влияние на длинах волн от 630 до 700 нм, измеренные временные отклики в этом диапазоне длин волн можно использовать для *in vivo* оценок коэффициента диффузии глюкозы в склеральной ткани.

Из экспериментальных данных, представленных на рис. 9.16 и 9.17, можно видеть, что для измерений *in vivo* отражательная способность убывает вплоть до двух раз. Такое убывание сравнимо с исследованиями *in vitro* с иммерсией тразографом-60 (см. рис. 9.7 в). Измерения пропускания трудно провести в экспериментах *in vivo*, поэтому для оценки эффективности просветления при оптической иммерсии можно использовать результаты измерений коллимированного пропускания *in vitro*, которые

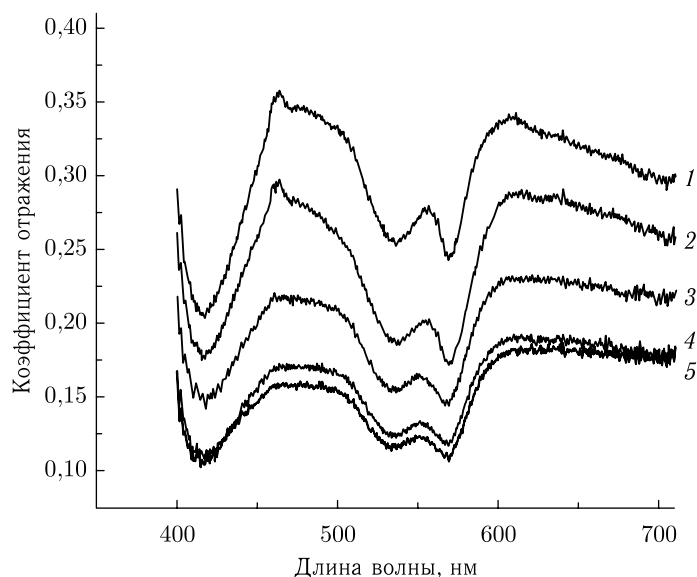


Рис. 9.16. Зависящие от времени спектры отражения *in vivo* склеры глаза кролика, измеренные одновременно с нанесением раствора 40%-й глюкозы: 1 — 1 мин; 2 — 4 мин; 3 — 21 мин; 4 — 25 мин и 5 — 30 мин после попадания нескольких капель глюкозы в глаз кролика [1625, 1729]

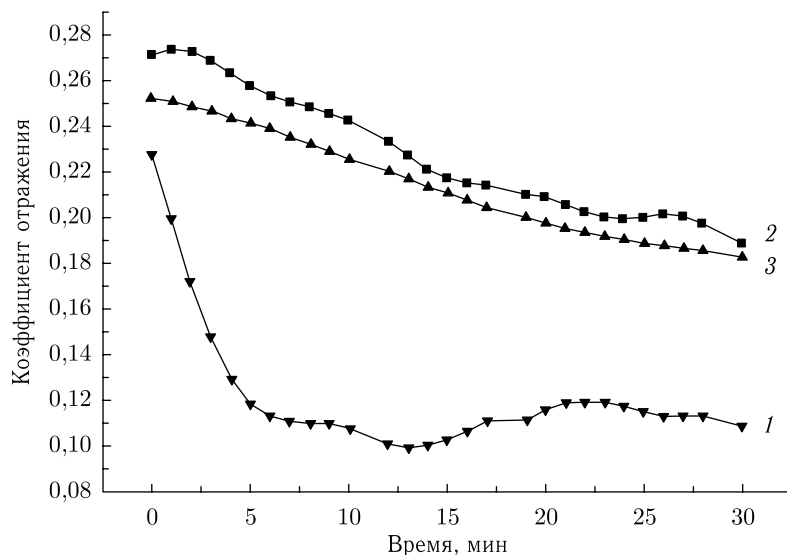


Рис. 9.17. Зависящая от времени отражательная способность *in vivo* склеры глаза кролика, измеренная одновременно с нанесением раствора 40%-й глюкозы: на длинах волн 420 нм (1), 630 нм (2) и 700 нм (3) [1625, 1729]

дают 26-кратное увеличение пропускания. С использованием моделирования методом Монте-Карло на основе экспериментальных данных и геометрии установки, использованной для измерений *in vivo* и *in vitro*, можно провести корректное сравнение эффективности просветления *in vivo* и *in vitro* [1696]. Рассчитанные отношения максимальной (ткань в начальном состоянии) диффузной отражательной способности R_d к минимальной (ткань в конце процедуры просветления) для измерений *in vitro* и *in vivo* демонстрируют одинаковые тенденции в зависимости от длины волны. Различия в абсолютной величине этого отношения ($\sim 1,2$ для *in vitro* и ~ 2 для *in vivo* на 700 нм), которое больше для случая *in vivo*, можно объяснить многослойной структурой живой ткани (состоящей из конъюнктивы, теноновой капсулы, самой склеры, цилиарной мышцы и цилиарного пигментированного эпителия), некоторые слои которой сильно поглощают свет. Живая ткань представляется более эффективно управляемой путем иммерсии из-за более сильного влияния поглощающих слоев, которые уменьшают плотность потока обратно рассеянных фотонов по мере того, как свет проникает в глубь ткани (из-за уменьшения коэффициента рассеяния), где поглощение максимально для данной специфической ткани. С другой стороны, меньшее рассеяние приводит к укорочению траектории миграции фотона и снижению вероятности его поглощения.

Другими причинами более эффективного управления являются перфузия крови и метаболическая активность живой ткани, что повышает эффективность ее проницаемости для просветляющего агента при физиологической температуре, несмотря на то что агент наносится только на внешнюю поверхность склеры. В общем случае скорость диффузии агента в ткани изменяется от своего минимального значения для химически фиксированных образцов ткани, когда формируются дополнительные связи между молекулами белка, затрудняющими перенос агента, возрастает до среднего уровня при переходе к свежим нефиксированным образцам ткани и достигает максимума при иммерсии *in vivo* [200].

Важно также, что в случае *in vivo* полное пропускание в 3–6 раз более эффективно управляется посредством иммерсии ткани, чем в случае *in vitro*, когда склера отделена от окружающих тканей. Полное пропускание передних слоев ткани глазного яблока, включая склеру, определяет энергию лазерного излучения, приложенную к ресничному телу, когда требуется его коагуляция. Коллимированное пропускание, в свою очередь, определяет эффективность лазерного облучения через склеру локального участка поверхности глазного дна, например необходимого для разрушения опухоли.

Зависящие от времени доли поглощенного света для различных слоев глаза кролика на 700 нм, рассчитанные методом Монте-Карло для ткани, пропитанной 40%-й глюкозой, показаны на рис. 9.18. Начальные значения коэффициентов рассеяния и поглощения для различных слоев ткани были взяты из работ [392, 393]. Зависящие от времени диффузное отражение, полное пропускание и поглощенные доли света при иммерсии ткани были рассчитаны на основе обсуждавшихся выше исследований *in vivo*. Из графиков на рис. 9.18 следует, что при просветлении из-за значительной прозрачности наружных слоев глаза кролика внутренние поглощающие слои оболочки глаза, такие как компоненты ресничного тела, хорошо освещаются и поэтому хорошо поглощают свет. Обнаружено, что как только доля света, поглощенного в конъюнктиве и склере уменьшается (за счет уменьшения рассеяния), в ресничном теле она заметно возрастает. Это подтверждает возможность использования ОПА для транссклерального селективного фоторазрушения ресничного тела [61, 769, 781, 1811].

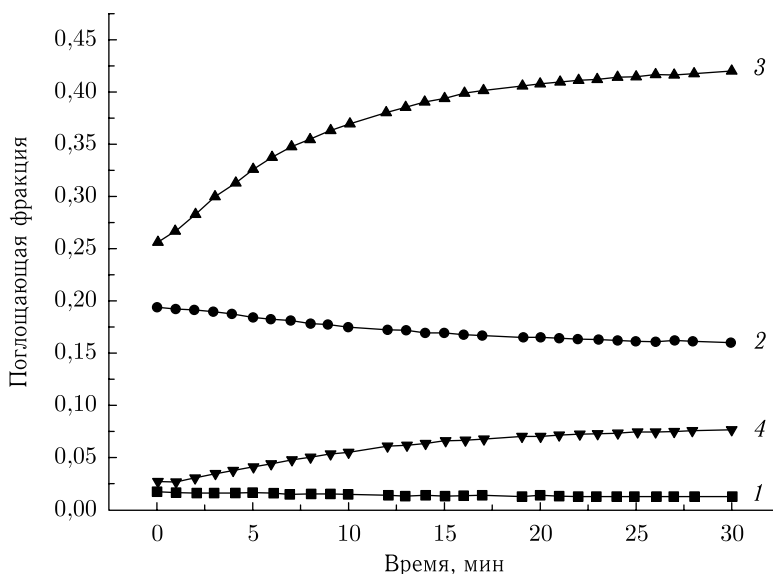


Рис. 9.18. Зависящие от времени доли поглощенного света с длиной волны 700 нм в различных слоях ткани глаза кролика, рассчитанные с использованием метода Монте-Карло для ткани, пропитанной раствором 40%-й глюкозы: 1 — конъюнктива; 2 — склера; 3 — цилиарная мышца; 4 — цилиарный пигментный эпителий [1696]

Показано, что применение ОПА к фиброзной ткани позволяет эффективно контролировать ее оптические характеристики. Кинетика оптического просветления склеральной ткани характеризуется временем отклика 5–10 мин, которое определя-

ется диффузионной способностью иммерсионного агента в ткани, состоянием ткани (интактная или фиксированная) и ее толщиной. Сжатие и набухание ткани может играть важную роль в процессе ее просветления. При продолжительном воздействии некоторых ОПА (например, глюкозы при $pH = 3,5$), сжатие ткани на первом этапе просветления может сменяться набуханием, которое, в свою очередь, может вызвать насыщение и даже слабое снижение оптического пропускания ткани.

Временные оптические характеристики при просветлении можно использовать для определения коэффициента диффузии эндогенных и экзогенных жидкостей в тканях человека. Полученные значения коэффициента диффузии глюкозы, тразографа, ПЭГ (6000) в интактной склере человека хорошо соответствуют значениям коэффициента диффузии малых молекул в воде [200].

9.3.4. Иммерсия твердой мозговой оболочки и скорость диффузии агентов.

Оптическое просветление твердой мозговой оболочки (*dura mater*) человека важно для оптической диагностики, фототерапии и лазерной хирургии мозга. *Dura mater* — типичная фиброзная ткань, которая демонстрирует при оптическом просветлении поведение, аналогичное склере и роговице глаза, дерме кожи или мышечной ткани, но имеет свое характерное время и степень просветления, определяемые ее структурой. Первые результаты исследования *in vitro* оптического просветления *dura mater* человека и кролика под действием растворов маннитола, глюкозы и глицерина при различных концентрациях представлены в работах [1293, 1439, 1634, 1652, 1688].

Рисунок 9.19 иллюстрирует временные изменения мутности *dura mater* кролика после нанесения глицерина [1439]. Под образцом *dura mater* располагался листок бумаги с написанными знаками. После применения глицерина в течение 1 мин знаки, невидимые через исходную ткань (рис. 9.19 а), можно было легко увидеть через образец (рис. 9.19 б). Результаты измерения спектров пропускания (рис. 9.19 в) подтвер-

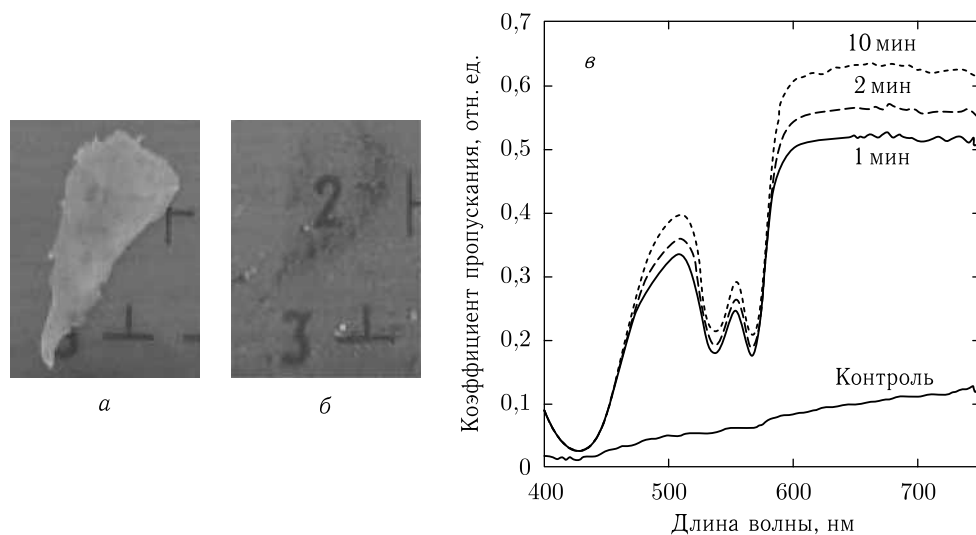


Рис. 9.19. Визуальные изменения первоначально мутной ткани твердой мозговой оболочки (*dura mater*) кролика и измеренные *in vitro* оптические спектры пропускания до и после эпидурального применения глицерина: а — оболочка в норме, помещенная над наблюдаемыми знаками и цифрами (2, 3), длина масштабного отрезка 1 мм; б — после одной минуты применения глицерина, длина масштабного отрезка 1 мм; в — спектры пропускания для *dura mater* в норме (контроль) и измеренные при применении глицерина в течение 1, 2 и 10 мин [1439]

ждают визуально обнаруженное снижение рассеяния. Данные рис. 9.19 *в* показывают рост пропускания в диапазоне длин волн 400–750 нм от времени, в течение которого на образец действовал глицерин. Характерное поглощение света гемоглобином крови, остатки которой находились на поверхности ткани, после применения глицерина стало намного более заметным (рис. 9.19 *в*). Это факт демонстрирует, что качество изображений, полученных методами на основе регистрации спектров поглощения гемоглобина (или какого-либо другого эндогенного или экзогенного поглотителя), можно существенно улучшить при уменьшении рассеяния в верхних слоях ткани. Исследования *in vivo* воздействия глюкозы и глицерина на твердую мозговую оболочку кролика при вскрытом черепе и эпидуральном нанесении агента также подтверждают концепцию эффективного оптического просветления фиброзной ткани [1439]. Полное оптическое просветление было достигнуто очень быстро, через 50 с после нанесения капли глицерина.

На рис. 9.20 представлены спектры коллимированного пропускания и временные зависимости спектральных составляющих для образцов *dura mater* человека, пропи-

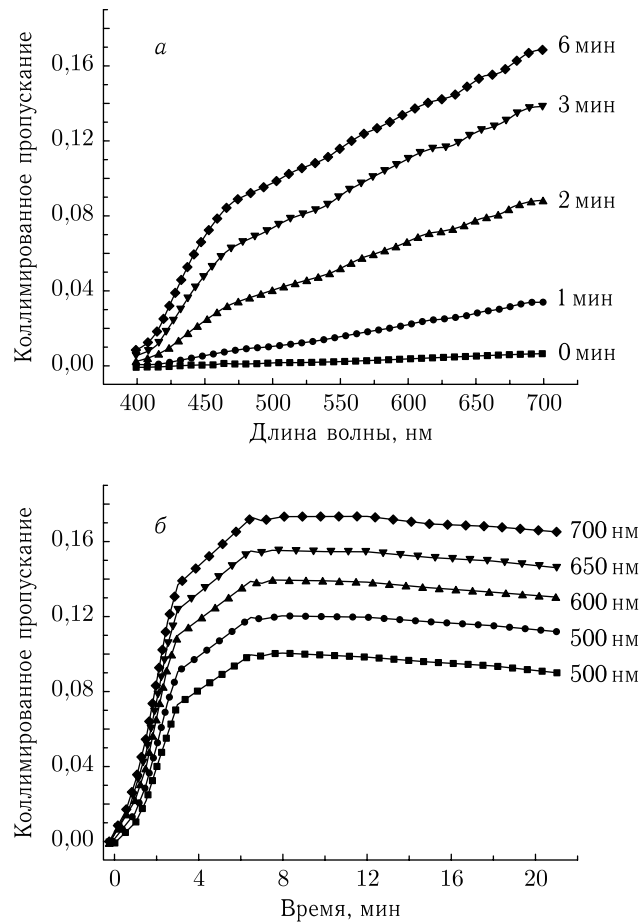


Рис. 9.20. Спектры коллимированного пропускания (а) и соответствующие спектральные временные зависимости (б), измеренные для образца *dura mater* человека, погруженного в раствор 40%-й глюкозы [1634, 1652]

таных раствором глюкозы. Хорошо видно, что глюкоза также очень эффективный агент для просветления *dura mater*. Используя такие измерения для глюкозы и маннитола, а также алгоритм, описанный в работах [1625, 1652], коэффициенты диффузии для растворов 40 %-й глюкозы и маннитола (0,16 г/мл) были найдены равными $D_G = (5,43 \pm 0,88) \cdot 10^{-6} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ и $D_M = (1,67 \pm 0,21) \cdot 10^{-6} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ [200, 1652].

9.4. Оптическое просветление кожи

9.4.1. Введение. Кожа имеет очень сложную структуру, схематически представленную на рис. 9.21 (цветная вклейка). Она имеет защитную функцию, предотвращая проникновение загрязнений и микроорганизмов внутрь тела. Самый внешний клеточный слой кожи — эпидермис, состоящий из рогового слоя (РС) (в основном, мертвые клетки) и четырех слоев живых клеток. Роговой слой представляет собой липидно-белковую двухфазную структуру толщиной всего 10–20 мкм на большей части поверхности тела. Из-за ороговения клеточных мембран, плотной упаковки клеток и липидных мостиков между ними РС является плотной средой, плохо пропускающей чужеродные молекулы [1819, 1820]. Высокая степень сопротивления РС, препятствующая свободной диффузии молекул, затрудняет поэтому трансдермальную доставку лекарственных препаратов и иммерсионных агентов, а также потерю воды кожей. Для понимания транспортных и барьерных функций кожи важно иметь информацию о распределении воды и ионов внутри различных слоев [1821, 1822]. Известно, что содержание воды влияет на различные физические характеристики кожи, такие как хрупкость, упругость, прочность на разрыв, вязкоупругость, барьерные свойства, электрическое сопротивление, теплопроводность и внешний вид. РС получает воду изнутри тела, однако вода может поступать и из окружающей среды. Изнутри тела вода поступает в РС из потовых желез и посредством диффузии из нижележащих тканей, хорошо снабженных водой. Диффузия *in vivo* воды через РС является пассивным процессом, который может быть модифицирован при наложении гиперосмотического агента. Содержание воды в самом глуболежащем слое РС находится в равновесии с соседним гидратированным зернистым слоем живого эпидермиса. А наружный клеточный слой находится в равновесии с окружающей средой и, естественно, существенно суше, чем глубокие роговые слои. Поэтому существует градиент концентрации воды, вызывающий трансэпидермальную потерю воды (ТЭПВ) (transepidermal water lost, TEWL).

Коэффициент диффузии D для потока воды через стационарный макромолекулярный гель (модель ткани) соответствует вязкому течению через среду с очень тонкими порами. Как было установлено, в сильно гидратированном РС D примерно на 4 порядка меньше, чем коэффициент самодиффузии воды [1821]. Коэффициент диффузии воды в РС возрастает от $\sim 3 \cdot 10^{-10}$ до $10^{-9} \text{ см}^2/\text{с}$, по мере того как влажность H растет от 46 до 81%. Среднее содержание воды в РС, согласно измерениям авторов работы [1822], составляет 54%, тогда как другие авторы пришли к существенно меньшему содержанию воды РС, от 15 до 40%. Для сравнения, скорость диффузии молекул с массой 119 в РС добровольцев находится в интервале от $\sim 10^{-10}$ до $3,5 \cdot 10^{-10} \text{ см}^2/\text{с}$ [1820]. Следует также отметить, что гидратация дермы не сильно отличается от гидратации жизнеспособных клеточных слоев эпидермиса [1822].

Дерма — следующий, более толстый слой кожи, который является фиброзной тканью, хорошо снабжаемой кровью, и, следовательно, она хорошо пропитывается экзогенными или эндогенными жидкостями (иммерсионными агентами, например). Подкожная ткань содержит большую часть слоя жировых клеток, который значительно менее проницаем для диффундирующих молекул, чем дерма. Такая специфическая структура кожи определяет методологию ее эффективного оптического

просветления, которое связано с иммерсией показателей преломления рассеивателей (компонентов кератиноцитов в эпидермисе, коллагеновых и эластиновых волокон в дерме) и базового вещества [57, 200, 306, 766, 1578, 1630, 1726]. Экспериментальные исследования оптического просветления кожи с использованием воды, глицерина, растворов глицерина в воде, глюкозы, пропиленгликоля, олеиновой кислоты, ДМСО (DMSO), солнцезащитных кремов, косметических лосьонов, гелей и фармацевтических препаратов были выполнены авторами работ [57, 200, 306, 383, 469, 555, 766, 826, 1336, 1418, 1547, 1578, 1610, 1613–1615, 1626–1632, 1634, 1635, 1638, 1640, 1643, 1645, 1653, 1691, 1695, 1702, 1703, 1706–1709, 1711, 1714, 1715, 1717–1724, 1726, 1730–1736, 1738, 1739, 1741, 1742, 1744, 1746–1757, 1760–1765, 1767, 1776, 1781, 1785–1791, 1801, 1802, 1808, 1809, 1823].

9.4.2. Спектральные измерения *in vitro*. Табл. 9.1 иллюстрирует эффективность воздействия различных иммерсионных агентов на пропускание отрывов кожи человека (толщиной 30–40 мкм), взятых у добровольцев методом приклеивания на стеклянную подложку с последующим отрывом верхних клеточных слоев эпидермиса [1726]. Из-за малой толщины образца с несколькими слоями сухих и живых кератиноцитов и подачи агента через слой живых клеток скорость и эффективность иммерсии были очень высокими.

Таблица 9.1
Эффективность действия ОПА на образец отрыва эпидермиса толщиной 30–40 мкм, выраженная как отношение средней прошедшей интенсивности до (I_A) и после (I_B) применения лосьона; n — показатель преломления применяемого лосьона [1726]

ОПА	Растворы глицерина-воды-мочевины					ДМСО 50 %	УЗИ-гель
n	1,449	1,380	1,356	1,354	1,348	1,396	1,337
I_A/I_B	12,8	3,7	4,9	5,9	4,1	7,9	5,3

Исследование *in vitro* кожи крысы под действием обезвоженного (100 %) глицерина при его нанесении на дермальную сторону образца кожи показало степенную зависимость от длины волны для приведенного коэффициента рассеяния μ'_s в области длин волн от 500 до 1200 нм [766], описываемую формулой (3.30), $\mu'_s \sim \lambda^{-h}$. Измерения показали, что до воздействия глицерина (контроль) $\mu'_s \approx 50 \text{ см}^{-1}$ на длине волны 500 нм, а $h = 1,12$. В процессе действия глицерина оба параметра уменьшаются (главным образом, из-за эффекта дегидратации): $\mu'_s \approx 30 \text{ см}^{-1}$ и $h = 1,09$ для 5 мин, $\mu'_s \approx 20 \text{ см}^{-1}$ и $h = 0,85$ для 10 мин, $\mu'_s \approx 12 \text{ см}^{-1}$ и $h = 0,52$ для 20 мин. Для образца, помещенного после действия глицерина в фосфатный буферный раствор на 20 мин, параметры частично восстанавливаются: $\mu'_s \approx 23 \text{ см}^{-1}$ и $h = 0,9$ (частичная регидратация).

На основе измерений в области пиков поглощения воды и с учетом сжатия ткани (уменьшения толщины на 21,5 %) при переходе от необработанной ткани к обработанной глицерином в течение 20 мин была оценена изначальная степень гидратации кожи на уровне 60 %. Процесс регидратации имел тенденцию к восстановлению толщины и мутности образца, однако в течение 20-минутной регидратации мутность (μ'_s) не достигла первоначального состояния. С учетом сравнительно короткого промежутка времени (~ 20 мин) для оптического просветления образцов кожи толщиной около 1 мм [766] и высокой вязкости и гигроскопичности глицерина его действие как гиперосмотического агента должно сводиться главным образом к вытягиванию интерстициальной воды из ткани и, с меньшей вероятностью, к замене воды и солей базового вещества ткани. Двадцати минут регидратации также недостаточно для

того, чтобы вода вновь вошла во все клетки и волокнистые структуры ткани, поэтому коэффициент рассеяния и параметр h для регидратированной кожи оказались несколько меньшими своих начальных значений.

В ходе измерений коллимированного пропускания тканей было осуществлено также более продолжительное воздействие глюкозы (до 6 ч) и глицерина (до 40 мин) на свежие образцы кожи крысы при комнатной температуре [1695, 1702, 1703]. Эти исследования проводились для выяснения механизмов оптического просветления кожи и оптимизации метода. Чтобы избежать повреждения ткани и обеспечить меньшую вязкость просветляющего агента, в качестве такового использовались 88 %-й раствор глицерина в воде и 40 %-я глюкоза, продаваемые в аптеках. Образцы кожи имели толщину 0,57–0,90 мм и площадь $1 \times 1 \text{ см}^2$, некоторые из них представляли собой цельную кожу, включая эпидермис, дерму и лежащий под дермой жировой слой, а у других жировой слой был удален. Волосы были удалены пинцетом, и иммерсионный агент поступал через обе поверхности образца при его помещении в специальную кювету. Рисунки 9.22 и 9.23 показывают типичные спектры коллимированного пропускания и кинетику оптического просветления. Хорошо видно, что необработанная кожа крысы мало прозрачна для видимого света. Воздействие как глюкозы, так и глицерина делает эту ткань в высокой степени прозрачной. Для образцов кожи с жировым слоем, выдержанных в растворе в течение 45 мин, хорошо видно возрастание коллимированного пропускания на длине волны 700 нм: в 15 раз для глюкозы (рис. 9.23 а) и в 10 раз для глицерина (рис. 9.23 в). Очевидно, что эффективность должна быть существенно выше при удалении жирового слоя. Действительно, пропускание возрастает примерно в 50 раз для раствора глюкозы на той же длине волны и в течение того же интервала времени (рис. 9.23 б). Дальнейшее увеличение пропускания и его насыщение имеют место при более продолжительном воздействии.

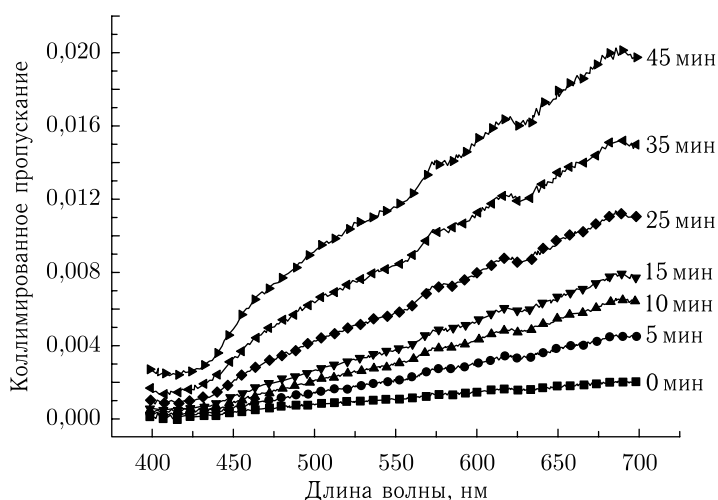


Рис. 9.22. Спектры коллимированного пропускания образца кожи крысы, измеренные через различные промежутки времени одновременно с пропитыванием раствором 88 %-го глицерина (толщина образца 0,9 мм) [1695]

В табл. 9.2 представлены характеристики (показатель преломления и осмольность) ряда химических агентов с различным потенциалом оптического просветления (ПОП), определяемым как отношение значений приведенного коэффициента

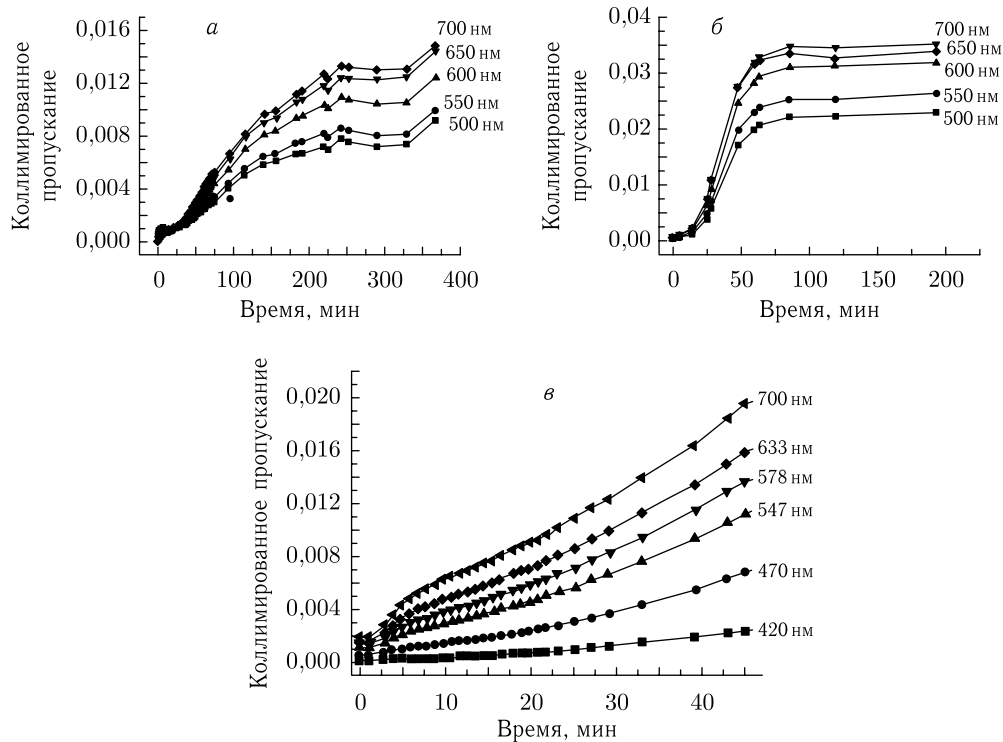


Рис. 9.23. Зависящее от времени коллимированное пропускание образцов кожи крысы (спустя 1 ч после аутопсии, волосы были удалены пинцетом), измеренное на различных длинах волн при погружении образцов в иммерсионный раствор: *а* — толщина образца 0,73 мм, с подкожным жировым слоем, иммерсионный агент — 40%-я глюкоза; *б* — толщина образца 0,57 мм, с удаленным подкожным жировым слоем, иммерсионный агент — 40%-я глюкоза; *в* — толщина образца 0,9 мм, с подкожным жировым слоем, иммерсионный агент — смесь глицерина с водой (88% об.) [1702, 1703]

рассеяния до и после воздействия агента, $\text{ПОП} \equiv \mu'_s(\text{до})/\mu'_s(\text{после})$ [1717]. ПОП был измерен *in vitro* после 20 мин воздействия агента при его аппликации на кожу человека со стороны дермы с использованием диффузионной ячейки Франца для исследования диффузии веществ через мембраны. Из табл. 9.2 следует, что не существует корреляции между ПОП и показателем преломления исследованных агентов ($n_{\text{ОПА}} = 1,43\text{--}1,48$); также отсутствует и корреляция с осмоляльностью (осмотической концентрацией раствора) в широком диапазоне ее изменения от 1643 до 26900 мосмоль/кг. Тем не менее, наибольшие значения ПОП от 2,4 до 2,9 обеспечивают именно агенты с наибольшими значениями показателя преломления и осмоляльностью, такие как глицерин, 1,4-бутандиол и 1,3-бутандиол.

Очевидно, что скорость проникновения ОПА в кожу намного меньше, чем в склеру или *dura mater*, которым достаточно 8–10 мин для насыщения растворами тразографа или глюкозы, что проявляется в насыщении временной характеристики оптического просветления. По сравнению со склерой и *dura mater*, при не удаленном жировом слое образца кожи не наблюдалось насыщения процесса оптического просветления вплоть до 6 ч воздействия ОПА. Это явление можно связать с низкой проницаемостью клеточных слоев эпидермальной и жировой ткани по отношению

Таблица 9.2

Характеристики ОПА и измеренный *in vitro* оптический просветляющий потенциал (ОПП) при воздействии агентов на дермальную сторону кожи человека в эксперименте с диффузионной ячейкой Франца; ОПП определен как отношение величин приведенного коэффициента рассеяния, измеренных до и через 20 мин после применения агента, $\text{ОПП} \equiv \mu'_s(0)/\mu'_s(20 \text{ мин})$ [1717]

ОПА	Показатель преломления	Осмоляльность, мосмоль/кг	ОПП
Глицерин	1,47	14,550	$2,9 \pm 0,8$
50% ТМР (триметилпропан)	1,43	6,830	$2,2 \pm 0,3$
100% ТМР	1,47	13,660	$2,1 \pm 0,7$
1,3-Бутандиол	1,44	22,050	$2,4 \pm 0,7$
1,4-Бутандиол	1,44	26,900	$2,8 \pm 0,5$
Этиленгликоль	1,43	22,640	$1,9 \pm 0,6$
MPDiol glycol (2-метил-1,3-пропандиол)	1,44	23,460	$2,3 \pm 0,2$
P-0062 ¹	1,48	1,643	$2,0 \pm 0,5$

¹ P-0062 — преполимер на основе полиэтиленгликоля, предложен в Калифорнийском университете, Ирвин, США.

к любым молекулам, что ослабляет оба потока — поток воды из ткани и поток иммерсионного агента извне внутрь ткани. Насыщение оптического пропускания может ожидать при наступлении равновесия в процессе диффузии агента и воды, т. е. когда концентрации воды и иммерсионного агента внутри и снаружи будут примерно равны. Для кожи с эпидермисом и жировым слоем насыщение не было достигнуто даже за 6 ч воздействия глюкозы, однако при удаленном жировом слое оно наступило уже через 1 ч.

Используя ранее обсуждавшийся алгоритм, описываемый формулами (9.1), (9.6), (9.14) и (9.17) и экспериментальные данные (см. рис. 9.23), можно оценить коэффициент диффузии воды в коже при воздействии глицерина. Такая оценка верна для агентов с большой осмотической силой, поскольку в этом случае в системе преобладает поток воды. Усредненное по шести образцам кожи крысы значение коэффициента диффузии при воздействии глицерина преимущественно со стороны дермы при 20 °C равно $(5,12 \pm 2,27) \cdot 10^{-7} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, что примерно в двадцать раз меньше, чем коэффициент диффузии воды в воде $D_w \approx 10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ (см. работу [1818]), или примерно в шесть раз меньше, чем диффузия воды в интактном хрусталике глаза человека, $D_w \approx 3,0 \cdot 10^{-6} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ (см. работу [1177]). Для образца, свободного от подкожного жира, действие 40%-й глюкозы характеризуется более высокой скоростью диффузии [200], $D = (3,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-6} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, что может объясняться более эффективным проникновением глюкозы в ткань.

С использованием инфракрасной спектроскопии (800–2200 нм), измерений потери массы и воды, а также трансдермального сопротивления кожи, сравнивалось действие таких усилителей проницаемости кожи, как диметилсульфоксид (ДМСО) и олеиновая кислота (мононенасыщенная жирная кислота) при нанесении просветляющего агента — пропиленгликоля (ПГ) на эпидермальную поверхность образцов свежей свинной кожи толщиной $1,52 \pm 0,18 \text{ мм}$ [1691]. Было показано, что по сравнению с ДМСО олеиновая кислота как усилитель проницаемости дает анало-

гичный синергетический эффект в увеличении оптического просветления. Учитывая соображения клинической безопасности, олеиновая кислота могла бы быть оптимальным выбором усилителя проницаемости для оптического просветления кожи, поскольку она хорошо известна как безопасный, свободный от побочных эффектов агент, а ДМСО обладает некоторой потенциальной токсичностью. После аппликации раствора олеиновой кислоты (0,1 М олеиновой кислоты и ПГ-40) полное пропускание образца кожи, измеренное на длине волны 1278 нм, увеличилось соответственно на 41 % и 58 % для 30 и 60 мин воздействия, в то время как диффузное отражение упало соответственно на 39 % и 47 %.

Разница в наблюдаемом поглощении (спектры диффузного отражения были преобразованы в наблюдаемое поглощение, $A = \log(1/R_d)$) между двумя длинами волн 1936 нм и 1100 нм была отнесена на счет изменения содержания воды при воздействии агентов [1336, 1636, 1637, 1676, 1690, 1691]. Важно, что раствор олеиновой кислоты обеспечивал наибольшую потерю воды в сравнении с другими растворами, 37 % и 46 % после 30 и 60 мин воздействия, соответственно. Для ДМСО-50 потеря воды составляла 15 % и 20 %; ПГ-80 — 20 % и 29 %; и ПГ-80 + ДМСО-50 — 34 % и 44 % после 30 и 60 мин воздействия соответственно. Однако потеря массы при применении раствора олеиновой кислоты была минимальной среди исследованных растворов. После 30 мин воздействия ПГ-80 вызвал потерю массы в 10,9 %, ПГ-80 + ДМСО-50 — 6,4 %, а олеиновая кислота (0,1 М) + ПГ-40 — 6,3 %. Большая потеря массы была получена после 60 мин применения этих агентов, ПГ-80 — 14,2 %, ПГ-80 + ДМСО-50 — 9,9 %, а олеиновая кислота (0,1 М) + ПГ-40 — 8,3 %. Сравнение данных по потере воды и массы дает замечательное подтверждение основной концепции оптического просветления как выравнивания показателей преломления за счет двух основных факторов: потока воды из ткани (дегидратация) и потока агента внутрь ткани (замещение интерстициальной воды агентом).

Ускоренного проникновения агентов можно также достичь при перфорировании рогового слоя кожи, например, путем создания решетки микрозон (островков) ограниченного термического повреждения рогового слоя, что на некоторое время нарушает высокое сопротивление кожи к проникновению просветляющих агентов и лекарственных препаратов [1718, 1719, 1752, 1801]. Терапевтическая медицинская установка с мощной лампой-вспышкой (EsteLux, Palomar Medical Technologies, Inc.) и специально спроектированный аппликатор с шаблоном из поглощающих центров (размер центра около 75 мкм, шаг решетки около 450 мкм) использовались для создания решетки островков повреждения рогового слоя кожи [1824]. Было испытано несколько выравнивающих показателей преломления агентов, включая глюкозу и глицерин, и продемонстрирована высокая степень просветления цельной кожи свиньи, крысы, цыпленка и человека *in vitro* и *in vivo* с применением 40 %-й глюкозы и 88 %-го раствора глицерина после перфорирования рогового с помощью аппликатора при воздействии несколькими оптическими импульсами (плотность энергии 14–36 Дж/см², длительность импульса 20 мс) [1718, 1719, 1825].

Для усиления проницаемости кожи используется также фракционная лазерная микроабляция (ФЛМА), которая осуществляется с помощью установки Palomar Lux2940 (Palomar Medical Products, США) на основе эрбиевого лазера ($\lambda = 2940$ нм) [1801]. Обычно применяется трехпиковый режим работы лазера с энергией в каждом импульсе ~ 1 Дж и длительностью 5 мс. Для перфорации кожи можно использовать различные насадки, обеспечивающие многопучковые режимы работы установки. Например, в работе [1801] использовалась насадка, с помощью которой в коже на участке площадью 6×6 мм создавалось 169 вертикальных микроканалов в форме конусов с расстоянием между каналами ~ 500 мкм, диаметром на поверхности ~ 100 мкм и глубиной канала ~ 200 мкм.

9.4.3. Спектральные измерения отражательной способности *in vivo*. Местное применение *in vivo* глицерина, глюкозы, рентгеноконтрастных веществ, пропиленгликоля, косметических лосьонов и гелей также делает кожу человека более прозрачной в период времени от нескольких минут до нескольких часов [1547, 1626, 1628, 1629, 1706, 1708]. Потеря воды или увеличение ее содержания с помощью увлажняющих веществ существенно влияет на оптические свойства кожи [1166, 1707–1710, 1820–1822]. В качестве метода прямого мониторинга содержания свободной, объемно-структурированной и связанной белками воды для оценки эффектов рассеяния с целью апробирования средств ухода за кожей используется отражательная спектроскопия ближнего ИК-диапазона [1708]. Следующие спектральные полосы в спектре отражения отвечают за воду: свободная вода — 1879 нм, объемно-структурированная вода — 1890 нм и вода, связанная белками, — 1909 и 1927 нм. Показано, что повышенная влажность окружающей среды ведет к увеличению уровня свободной воды в коже, в то время как увлажняющие средства, содержащие гидроксипропилцеллюлозу, пропиленгликоль, дипропиленгликоль и глицерин, вносят вклад в ослабление рассеяния света [1708]. В этих экспериментах регистрируется вода, находящаяся преимущественно в роговом слое, поскольку лишь малая часть отраженного света приходит от эпидермиса или нижележащих слоев.

Неинвазивное измерение гидратации рогового слоя (РС) можно выполнить с помощью инфракрасной спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения с фурье-преобразованием (ИКС НПВО ФП) (Attenuated Total Reflectance Fourier Transform InfraRed (ATR FTIR) spectroscopy) [1166, 1709, 1820]. Для определения содержания воды в РС используются три полосы поглощения: 3300 см^{-1} (3030 нм) — колебания O–H и N–H; 1645 см^{-1} (6079 нм), полоса амида I; и 1545 см^{-1} (6472 нм), полоса амида II. Интенсивность полосы амида I заметно увеличивается в присутствии воды из-за сильного поглощения воды на 1645 см^{-1} и изменений поглощения карбонила под влиянием воды, тогда как интенсивность полосы амида II обусловлена только белком. Отношение интенсивностей полос амида I и амида II, называемое еще фактором увлажнения, принято считать относительной мерой гидратации РС [1709]. Различные средства увлажнения РС на основе глицерина, пропиленгликоля, лактата натрия, натуральных растительных увлажнителей, липосом, бутиленгликоля, полиглицерилметакрилата и мочевины использовались в исследованиях гидратации РС *in vivo* [1709]. В зависимости от состава и концентрации максимальная гидратация РС могла быть достигнута за 0,5–2 ч после нанесения вещества на поверхность кожи. Для некоторых веществ заметный увлажняющий эффект можно было наблюдать в течение 8 ч после нанесения. Перспективным методом регистрации профиля распределения поглощения воды по глубине внутри кожи является двухволновая (1300 и 1450 нм) ОКТ [1710].

Для усиления проникновения ОПА через РС обычно применяется ряд процедур, таких как нагревание, электрофорез и сонофорез [1703, 1706, 1751, 1754–1757, 1801, 1819]. Для увеличения эффективности местного применения ОПА были разработаны желатиновые гели, содержащие просветляющие агенты (верографин, глицерин или глюкозу) [1706]. Скорость диффузии агента в геле может быть весьма высокой, что, в сочетании со сравнительно большим объемом геля, обеспечивает постоянную концентрацию ОПА, равную содержанию агента в геле на поверхности кожи. Для необработанной кожи добровольца наилучшая кинетика, т. е. скорость и степень просветления (17%), наблюдалась в случае геля с верографинном (рис. 9.24 а); после 40 мин наблюдения просветление все еще продолжалось с заметной скоростью, в то время как для геля с глицерином после 27 мин кривая насыщается. При применении геля с глюкозой в течение 40 мин просветление не наблюдалось.

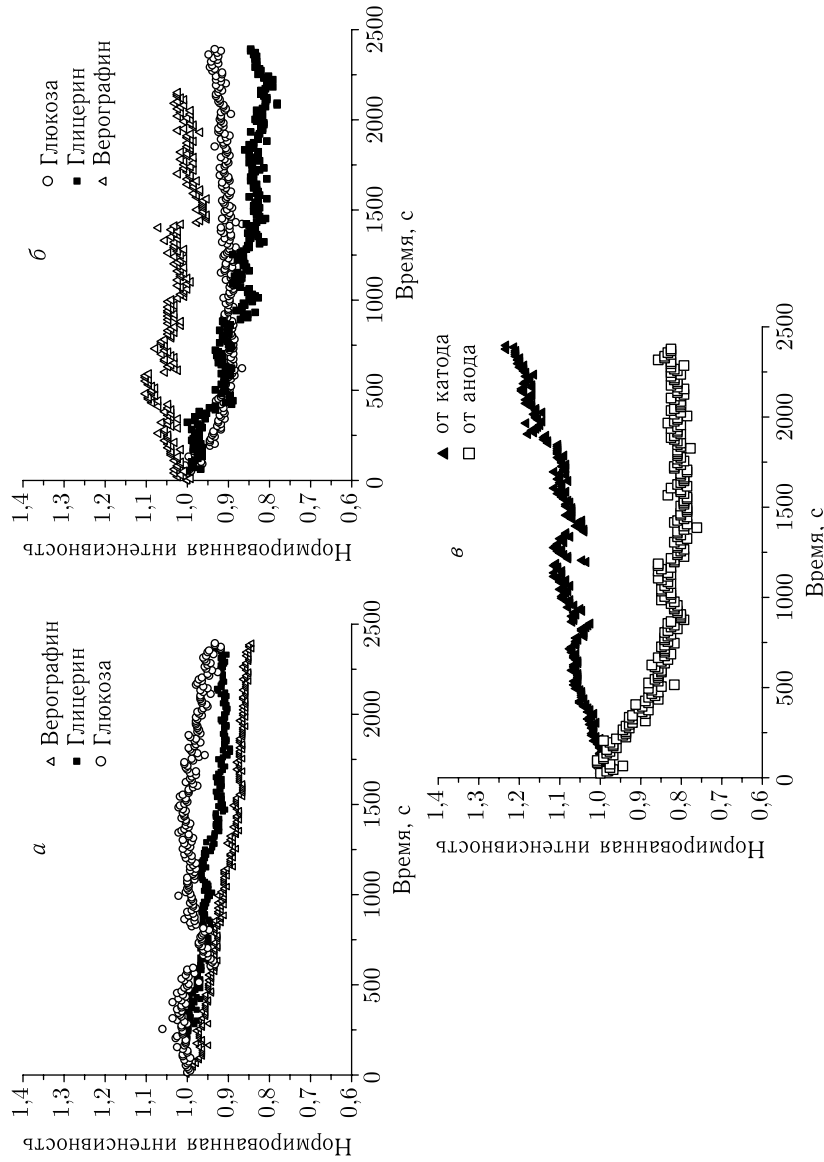


Рис. 9.24. Интенсивность рассеяния назад на длине волны 830 нм, измеренная с помощью волоконно-оптического зонда ($r_{sd} = 1,2$ мм, ВС-источник 0,2 мм и ВС-приемник 1 мм в диаметре), установленного перпендикулярно поверхности кожи при применении просветляющего геля (глюкоза: 3,9 мл 40 %-й глюкозы и 0,2 г желатина; глицерин: 1,3 мл глицерина, 0,1 г желатина и 2,6 мл дистиллированной воды; верографин: 2,6 мл верографина-60, 0,1 г желатина и 1,3 мл дистиллированной воды): *a* — к интактной коже; *б* — к коже после эпидермального отрыва клеем; *в* — при электрофорезе желатинового геля с глицерином (1,3 мл глицерина; 0,2 г желатина и 2,5 мл дистиллированной воды) [1706]

Поскольку барьерная функция кожи связана преимущественно с РС, измерения проводились на коже после отрывов с помощью липкой ленты ее верхнего слоя толщиной 30–50 мкм (рис. 9.24 б). Нанесение геля с глюкозой на кожу без наружного эпидермиса привело к быстрому спаду интенсивности отраженного света на 10%. Гель с глицерином дал лучшие результаты; за время наблюдения уменьшение отраженного сигнала достигало 20%, что в два раза больше, чем для необработанной кожи. Удивительно, но гель с верографинном не дал в этом случае какого-либо просветляющего эффекта.

Для усиления оптического просветления кожи человека также применялся электрофорез в сочетании с гелями с двойным содержанием желатина [1706]. На рис. 9.24 в показаны результаты для геля с глицерином. Когда активным электродом был анод, снижение оптического сигнала составило $\sim 20\%$. Это значение сравнимо с результатами для случая с отрывами, но время достижения минимального сигнала примерно вдвое меньше. Когда активный электрод присоединялся как катод, наблюдалось возрастание обратного рассеяния на протяжении всего времени измерений. Эффект был приписан развитию эритемы.

Можно заключить, что для местного применения гелей с глицерином и глюкозой эпидермальные отрывы и электрофорез приводят к усилению кинетики оптического просветления кожи человека *in vivo*. Наилучшие характеристики были получены при подаче глицерина со стороны анода. В случае глюкозы отрывы и электрофорез со стороны катода дают близкие результаты, однако аппликацию глюкозы необходимо прекращать через 1–12 мин во избежание ухудшения просветления за счет развития эритемы.

Применение глюкозы или глицерина путем инъекции внутрь кожи хомька или крысы приводят к снижению отражения и соответствующему возрастанию пропускания [766, 1634, 1643, 1645, 1695, 1702, 1703, 1741, 1823]. Этот эффект наблюдался на всех длинах волн в течение 15–18 мин после введения глюкозы [1643, 1645]. Наибольшая степень изменения отражения обнаружена на длинах волн от 580 до 750 нм, где преобладает рассеяние. На 16-й минуте отражение от кожи было минимальным (максимальное пропускание), оно уменьшалось примерно в 3,5 раза на 700 нм, затем ткань медленно возвращалась к своему нормальному состоянию — на 76-й минуте наблюдалось уменьшение отражения уже всего в 2 раза. Было показано, что инъекция глицерина оказывает более продолжительное оптическое просветляющее действие, но отражение снижалось немного меньше, чем при инъекции глюкозы. Это можно объяснить большей вязкостью глицерина и его, по преимуществу, непрямым действием через дегидратацию ткани. Исследовалась также реакция кожи крысы на инъекцию дистиллированной воды как модели агента, не оказывающего осмотического действия. Уменьшение отражения наблюдалось только в течение короткого времени (1-я минута) после инъекции. Оно происходило из-за намного более высокой прозрачности введенной воды по сравнению с окружающими тканями. На 2-й минуте вода диффундирует в объем ткани и ее прозрачность уменьшается — спектр отражения постепенно возвращается к начальному виду. Инъекция воды не вызывает иммерсионного просветления кожи.

Виртуальное окно прозрачности (ВОП) кожи диаметром около 4 мм имело время жизни примерно 30 мин для внутрикожной инъекции 40%-й глюкозы и более чем 60 мин для — 75%-го глицерина. Такое окно позволяет ясно видеть невооруженным глазом кровеносные микрососуды в коже [1643, 1644]. Белое кольцо набухания (отека) появляется вокруг ВОП после инъекции агента. Изображения кожи после внутрикожного введения глюкозы, глицерина и воды были записаны с помощью цифровой видеокамеры. Были измерены диаметр области отека (D_S) и ВОП (D_T), а также их отношение (D_S/D_T) (рис. 9.25) [1643]. Для глюкозы диаметр ВОП

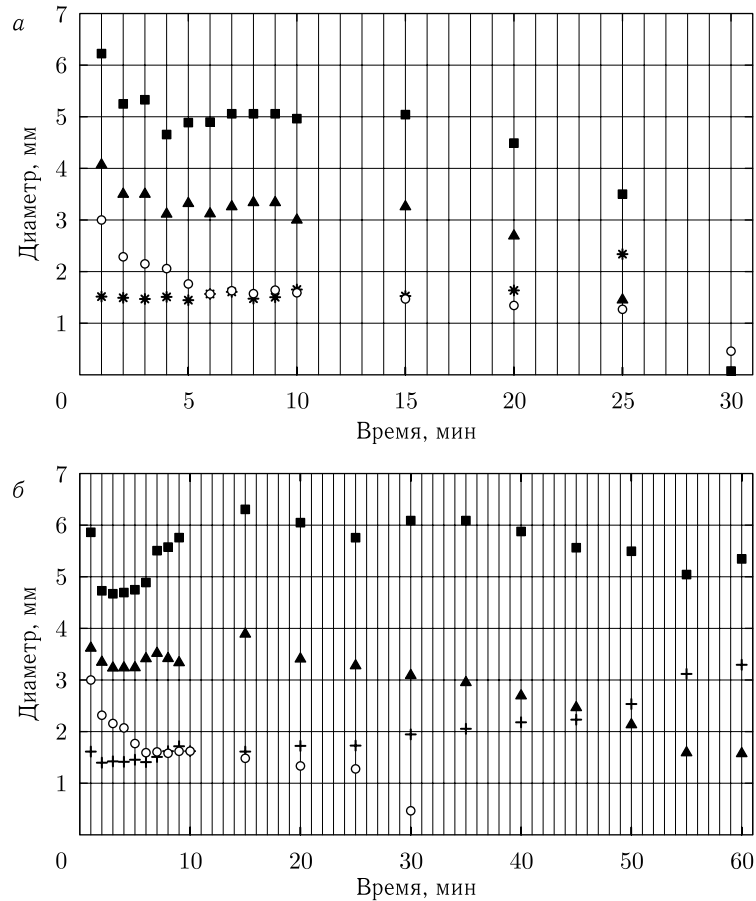


Рис. 9.25. Изменение реакции кожи на инъекцию раствора 40%-й глюкозы (а) и раствора 75%-го глицерина (б): \blacktriangle — диаметр виртуального окна прозрачности (ВОП) (D_T); \blacksquare — диаметр кольца набухания вокруг ВОП (D_S); *, + — отношение D_S/D_T ; \circ — диаметр участка набухания при инъекции дистиллированной воды [1643, 1645]

регистрировался начиная с 1 мин после инъекции. На 2-й минуте этот диаметр слегка уменьшился. В течение последующих 15 мин этот диаметр и диаметр отека не менялись. Начиная с 20-й минуты наблюдалось значительное уменьшение ВОП. Для глицерина диаметр ВОП был приблизительно таким же, но кольцо отека было больше, и как прозрачность, так и отек были видны в течение более длительного времени, чем при инъекции глюкозы (рис. 9.25 б). Инъекция дистиллированной воды вызывала лишь появление отека в области введения. Диаметр области отека медленно убывал, и отек исчезал через 30 мин после инъекции.

На рис. 9.26 показаны спектры отражения и соответствующие зависимости отражения от времени для нескольких спектральных компонентов, измеренные для здорового добровольца при внутривенной инъекции 40%-го раствора глюкозы [1630]. В спектрах отражения на фоне сигнала рассеяния, определяемого диффузным отражением от слоев кожи, хорошо видны полосы, обусловленные поглощением света кровью. В течение одного часа после инъекции глюкозы коэффициент отражения кожи уменьшается в среднем в 3,8 раза, после чего наступает слабый рост, отражающий

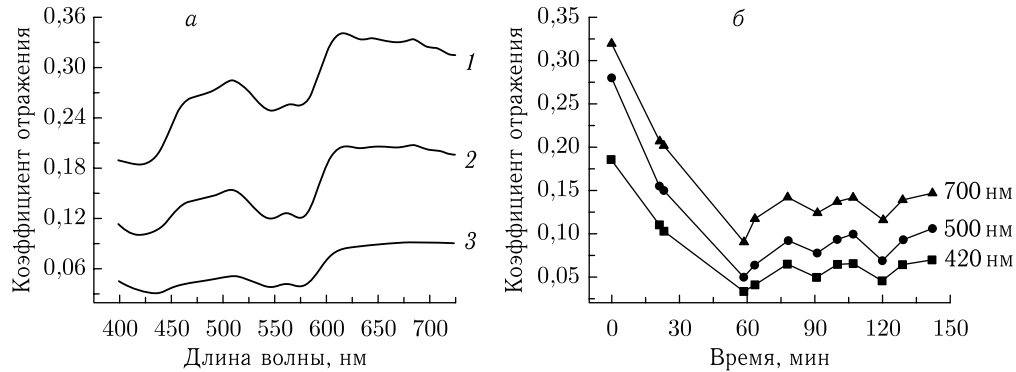


Рис. 9.26. Спектры отражения (а) кожи человека при гипердермальной инъекции 0,1 мл раствора 40 %-й глюкозы во внутреннюю сторону предплечья добровольца-мужчины для различных промежутков времени: 1 — интактная кожа; 2 — на 23 мин; 3 — на 60 мин после инъекции. Зависящий от времени коэффициент отражения (б) на трех длинах волн (420, 500 и 700 нм) [1630]

уход глюкозы из наблюдаемой области и возвращение отражательной способности кожи к первоначальному уровню. На основе этих результатов и обсуждаемой выше модели просветления кожи можно предположить, что основной вклад в просветление на первой стадии (первый час) дает согласование показателей преломления между коллагеновыми (и эластиновыми) волокнами дермы ($n \approx 1,46$) и интерстициальным пространством (первоначально $n \approx 1,36$), куда диффундирует глюкоза ($n = 1,39$). Рассчитанный по экспериментальным данным (рис. 9.26 б) коэффициент диффузии глюкозы в дерме равен $D_G = (2,56 \pm 0,13) \cdot 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$; это значение в 3,6 раза меньше, чем для диффузии глюкозы в воде при 37°C , $D_G \approx 9,2 \cdot 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$ и отражает характер затрудненной проницаемости дермы по отношению к глюкозе по сравнению с водой.

Для приложений важно, что кожа сохраняет свою прозрачность (низкое отражение) в течение нескольких часов после инъекции, что определяется диффузией глюкозы вдоль поверхности кожи, поскольку верхний и нижний слои — эпидермис и жировая ткань как клеточные слои — имеют намного меньшую проницаемость, чем дерма. Нетрудно оценить, что для того, чтобы эффект оптического просветления еще был наблюдаем для используемого волоконного датчика (рис. 9.11), глюкоза должна распространиться на расстояние не более, чем $l = 1,25\text{--}1,75 \text{ мм}$. Отсюда следует, что время диффузии (оптического просветления) составляет $\tau \approx l^2/D_G \approx 1,7\text{--}3,3 \text{ ч}$, что хорошо согласуется с экспериментальными данными (рис. 9.26 б).

Как хорошо видно на рис. 9.26 а, при просветлении дермы (снижении рассеяния) контраст полос поглощения гемоглобина существенно выше, чем в контрольном эксперименте, однако, при продолжительной иммерсии (кривая 3) контраст снова не очень велик. Этот результат очень важен для селективного контрастирования тканевых аномалий (опухолей), связанного с вариациями концентрации оксигенированного и полного гемоглобина или других вводимых поглотителей (например, красителя индоцианинового зеленого). Таким образом, существует оптимальное время иммерсии (для кожи человека при инъекции глюкозы — это примерно 60 мин), которое позволяет при общем пониженном рассеянии видеть поглощающие объекты в коже и более точно их локализовать. При более продолжительной иммерсии контраст может упасть из-за меньшего числа актов поглощения света в условиях рассеяния низкой кратности во всем исследуемом объеме.

9.4.4. Модуляционные измерения *in vivo*. Временной отклик кожи человека, обработанной просветляющим агентом, можно измерить с помощью волн фотонной плотности (частотно-модуляционным методом) [1626]. Интенсивность и фаза волн фотонной плотности, генерируемых лазерным диодом на длине волны 786 нм в коже добровольца, были измерены для разных глубин зондирования кожи (т. е. для нескольких расстояний между источником и приемником) [1626, 1628]. Для измерений с малым расстоянием между источником и приемником (1–3 мм), позволяющих исследовать тонкие слои ткани, был разработан специальный многоканальный волоконно-оптический зонд. Он использовался вместе с многоканальным волоконно-оптическим переключателем Discop. Временной отклик глубины модуляции и фазового сдвига модуляции интенсивности рассеянного назад света был измерен для кожи добровольца спустя некоторый промежуток времени после местного применения агента. Для каждого расстояния между источником и приемником измерения проводились в течение 10 с и усреднялись, что соответствует одной точке на рис. 9.27. Относительная амплитуда (нормированная на начальную амплитуду) и изменения фазы (текущая фаза минус начальная) в течение 20 мин местного применения глицерина показаны на рис. 9.27. Следует учитывать только изменения рассеяния, поскольку поглощение глицерина на данной длине волны пренебрежимо мало. Наблюдаемые изменения амплитуды и фазы не очень велики, что отражает низкую проницаемость эпидермальных клеточных слоев для любого химического агента. Тем не менее, эти измерения демонстрируют достаточную чувствительность модуляционного метода к малым изменениям коэффициента рассеяния кожи.

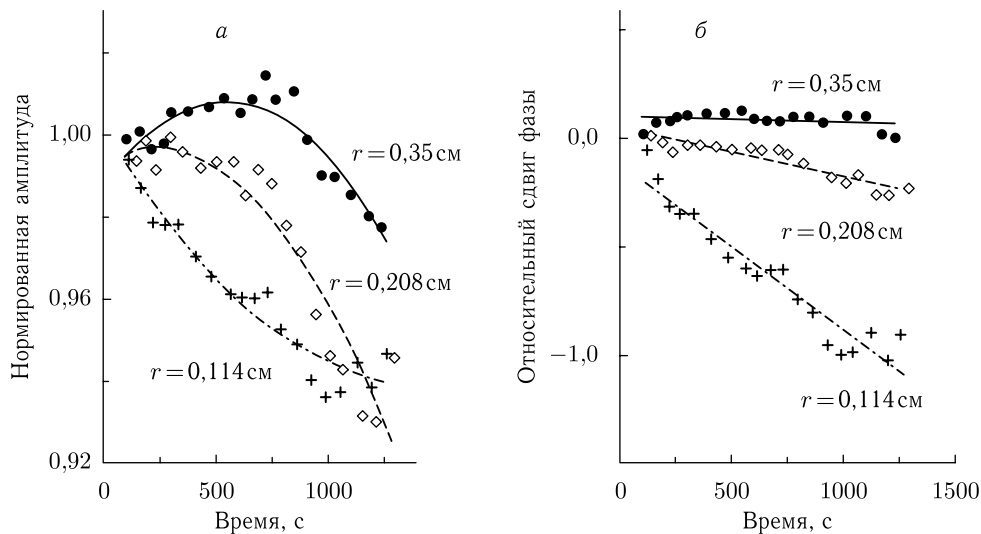


Рис. 9.27. Модуляционные измерения интенсивности рассеяния назад для малых расстояний между источником и приемником [1626, 1628]. Зависящие от времени изменения амплитуды (а) и фазового сдвига (б) сигнала для нескольких расстояний между источником и приемником для исследования *in vivo* предплечья человека при 20-мин местном воздействии глицерина

Для больших (2,5 см) расстояний между источником и приемником концы осветительного и принимающего волокон были вмонтированы в прорезиненную повязку, которая прибинтовывалась к поверхности предплечья руки человека во избежание артефактов от случайного движения. На поверхность руки наносился косметический гель с показателем преломления $n = 1,403$, и измерения фазы и амплитуды

переменной составляющей сигнала производились непрерывно. Одна измерительная точка соответствует одной секунде. Результаты измерений в течение 30 мин после нанесения геля показаны на рис. 9.28 а. Наблюдаемые временные квазипериодические флуктуации фазы и амплитуды оптического сигнала обусловлены, в основном, сердечными сокращениями.

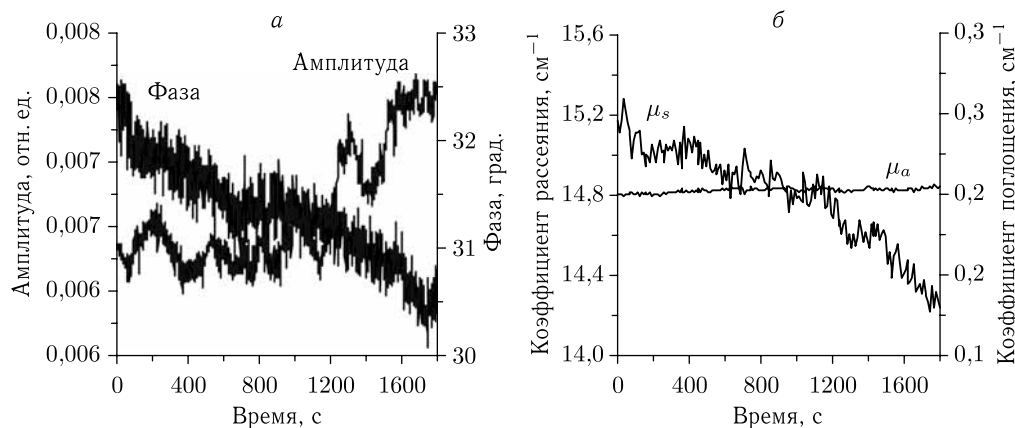


Рис. 9.28. Модуляционные измерения интенсивности рассеяния назад для больших расстояний между источником и приемником (2,5 см) [1626, 1628]. Исходные экспериментальные данные для фазы и амплитуды переменной составляющей оптического сигнала (а) и расчетные значения коэффициентов поглощения и рассеяния (б). В качестве просветляющего агента использовался косметический гель с показателем преломления $n = 1,403$

Результаты реконструкции оптических параметров ткани показаны на рис. 9.28 б. Начальные значения μ_s' и μ_a для кожи человека были взяты из табл. 7.1, а относительные изменения этих параметров — рассчитаны с помощью процедуры скользящего среднего для каждого пятисекундного интервала для исключения влияния сердечных сокращений. В результате получена соответствующая временная эволюция коэффициентов рассеяния и поглощения. Это исследование показывает, что в поглощении не происходит заметных изменений в течение времени действия геля. Небольшой рост поглощения, вероятно, можно объяснить увеличением содержания воды в коже из-за увлажняющего действия геля. Выбранное расстояние между источником и приемником (2,5 см) и соответствующий объем слишком велики, чтобы эффект согласования показателей преломления вблизи поверхности кожи при местном применении геля существенно повлиял на оптические характеристики всего объема зондируемой ткани. Тем не менее, наблюдаемое 6 %-е уменьшение коэффициента рассеяния, усредненного по большому исследуемому объему, означает, что коэффициент рассеяния поверхностных слоев кожи меняется существенно сильнее. По-видимому, согласование показателей преломления торцов оптических волокон и шероховатой поверхности кожи при нанесении геля также дает свой вклад в общее уменьшение коэффициента рассеяния.

9.4.5. ОКТ-визуализация. Типичный оптический когерентный томограф (ОКТ) использует волоконно-оптический интерферометр Майкельсона с возбуждением от широкополосного источника света (суперлюминесцентного диода), излучающего свет с центральной длиной волны 820 или 1300 нм и шириной полосы 25–50 нм. Такая система ОКТ обеспечивает аксиальное и поперечное разрешение 10–20 мкм в сво-

бодном пространстве с отношением сигнал–шум до 100 дБ (см. разд. 8.6) [109, 110, 127, 136, 142, 156].

ОКТ-сигнал представляет собой отражательную способность объекта $R(z)$ в зависимости от глубины z . Отражательная способность зависит от коэффициента отражения на заданной глубине $\alpha(z)$ и коэффициентов поглощения μ_a и рассеяния μ_s , или полного коэффициента ослабления $\mu_t = \mu_a + \mu_s$. Связь между $R(z)$ и μ_t , однако, весьма сложна из-за сильного и анизотропного рассеяния в ткани. Но для оптических глубин менее 4 отраженная мощность может приближенно описываться моделью однократного рассеяния [1336], т. е.

$$R(z) \approx I_0 \alpha(z) \exp(-\mu_t z), \quad (9.27)$$

где I_0 — оптическая мощность в пучке, падающем на поверхность ткани. Отсутствие множителя 2 в показателе экспоненты, несмотря на тот факт, что свет дважды проходит через образец — сначала от томографа в ткань, а затем обратно при отражении назад, обусловлено интерференционным характером сигнала ОКТ, из которого получают информацию об отражательной способности биоткани [1334–1336]. Оптическая глубина есть мера глубины, выраженная в средних длинах свободного пробега фотона $\sim 1/\mu_s$, т. е. $\mu_s z$. Величина $\alpha(z)$ определяется локальным показателем преломления и локальной способностью образца отражать (рассеивать) свет назад. Если предположить, что величина $\alpha(z)$ сохраняется постоянной в пределах некоторого интервала значений глубины Δz , то μ_t можно получить теоретически из измерений отражательной способности на двух различных глубинах z_1 и z_2 в пределах этого интервала:

$$\mu_t = \frac{1}{\Delta z} \ln \frac{R(z_1)}{R(z_2)}, \quad (9.28)$$

где $\Delta z = |z_1 - z_2|$. Так как при измерениях неизбежны разнообразные шумы, окончательный результат следует получать с помощью подгонки методом наименьших квадратов для улучшения точности определения величины μ_t .

Оптическое просветление (увеличение пропускания) ΔT с применением иммерсионного агента можно рассчитать по формуле

$$\Delta T = \frac{R_a - R_s}{R_s} \cdot 100\%, \quad (9.29)$$

где R_a и R_s — коэффициенты отражения от задней поверхности образца соответственно при действии на него просветляющего агента и без него (контроль).

Множественное рассеяние является фактором, существенно ограничивающим рабочие характеристики ОКТ: разрешение, глубину зондирования и локализацию. Для улучшения возможностей визуализации многократное рассеяние в ткани необходимо подавлять настолько это возможно. Перспективным для этой цели является иммерсионный метод при использовании биологически совместимых агентов, поскольку при иммерсии легко можно увеличить и глубину, и контраст ОКТ-изображений [136, 139, 146, 147, 200, 1057, 1306, 1338, 1336, 1521, 1547, 1623, 1624, 1631, 1633, 1636, 1638, 1673, 1677, 1721, 1759–1776, 1780, 1826].

В частности, ОКТ-визуализация в сочетании с иммерсией просветляющих агентов в ткань является перспективным методом для диагностики и мониторинга кожных заболеваний. Для иллюстрации кинетики оптического просветления кожи после применения глицерина через регулярные промежутки времени в течение 40 мин был записан ряд ОКТ-изображений (820 нм) образца кожи крысы (рис. 9.29) [1631]. Последовательность этих изображений ясно показывает действие как эффекта согласования показателей преломления, приводящего к увеличению глубины зондирования,

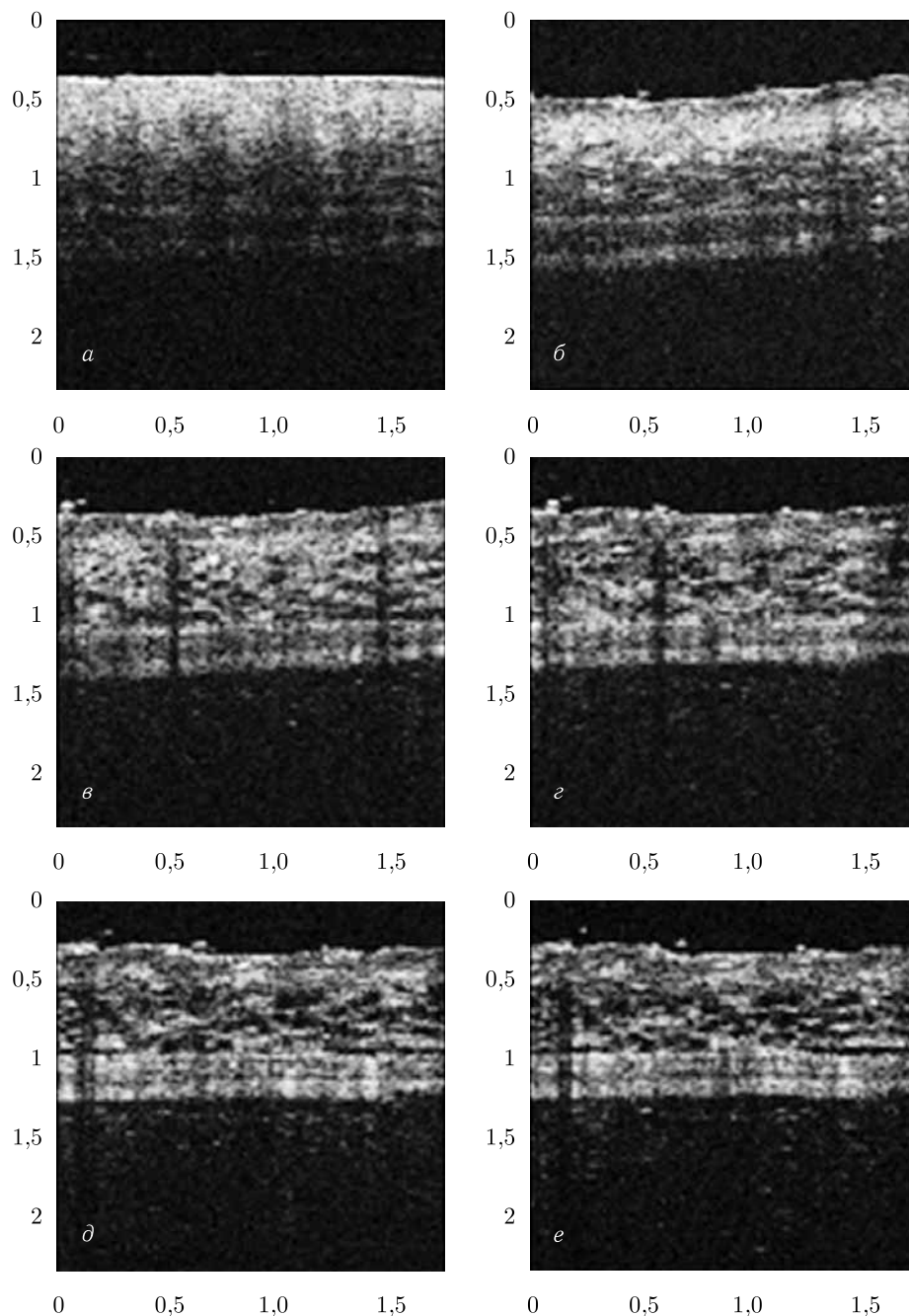


Рис. 9.29. Временные ОКТ-изображения ($\lambda = 820$ нм) спустя 0 (а), 3 (б), 10 (в), 15 (г), 20 (д) и 40 мин (е) после местного нанесения раствора 80%-го глицерина на кожу крысы. Изображения были получены сразу после сакрификации крысы, все размеры приведены в миллиметрах, вертикальная ось представляет глубину изображения [1631]

так и эффекта локальной дегидратации, улучшающего контраст изображения. Аналогичные результаты были получены Р. К. Вангом для свежей кожи свиньи и цыпленка на длине волны 1300 нм с применением растворов глицерина с концентрацией 50 % и 80 %. Подобным же образом ОКТ-изображение кожи человека с псориатической эритродермией, полученное через некоторое время после применения глицерина, отличается от первоначального изображения большей глубиной зондирования и более высоким контрастом (рис. 9.30, цветная вклейка), что позволило идентифицировать такое важное морфологическое явление, как акантоз [1306].

На основе ОКТ-визуализации кожи человека *in vitro* и *in vivo* была продемонстрирована возможность диагностики *in vivo* злокачественной меланомы, наблюдения субэпидермальных волдырей и управления рассеивающими свойствами кожи посредством местного применения глицерина [1547]. По оценкам авторов работы [1547] коэффициент рассеяния рогового слоя под действием глицерина уменьшался в два раза (рис. 9.31). Для эпидермиса и верхней части дермы коэффициент рассеяния снижался на 20 %. Для более глубоких слоев дермы это уменьшение составило лишь 5 %. Эффект увеличения как глубины зондирования, так и контраста изображений, был обнаружен в исследованиях оптического просветления кожи человека *in vivo* при местном применении 50%-го раствора пропиленгликоля [1632].

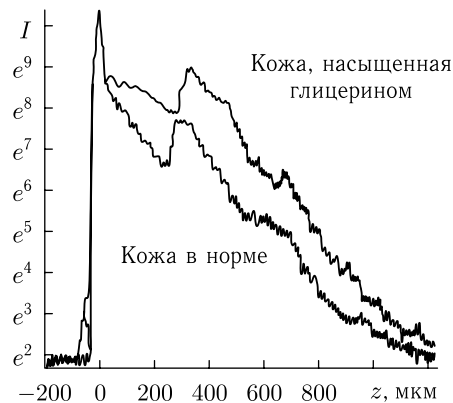


Рис. 9.31. Сигналы ОКТ (в координатах интенсивность–глубина), полученные для зондирования *in vivo* кожи кончика пальца человека. Верхняя кривая соответствует коже, насыщенной глицерином. Коэффициент рассеяния для кожи с глицерином понижен: для рогового слоя в два раза, для эпидермиса и верхней дермы на 20 %, для более глубоких слоев дермы на 5 % [1547]

ОКТ-изображения участка кожи добровольца при гипердермальной инъекции 40 %-й глюкозы позволили оценить кинетику коэффициента полного ослабления (см. формулу (9.28)) [1632]. С течением времени полное ослабление сначала падает, а затем постепенно возвращается к исходному состоянию. Такое поведение хорошо коррелирует со спектральными измерениями, показанными на рис. 9.26, и также отражает факт согласования показателей преломления на начальном этапе после инъекции глюкозы. Из измерений ОКТ-сигнала была найдена величина ослабления интенсивности светового пучка в ткани, $I/I_0 \sim \exp(-\mu_t z)$: для интактной кожи (0 мин) $I/I_0 \approx 0,14$, а при иммерсии на 13-й минуте $I/I_0 \approx 0,30$, т. е. интенсивность прошедшего света увеличилась в 2,1 раза, что также хорошо согласуется с результатами спектральных измерений.

Следует отметить, что высокая чувствительность сигнала ОКТ к иммерсии живых тканей глюкозой позволяет осуществлять мониторинг ее концентрации в биотканях

на физиологическом уровне [166, 991, 996, 1006–1008, 1191, 1192, 1650, 1684, 1761, 1765].

Хотя глицерин и глюкоза являются эффективными ОПА при их инъекции в дерму [766, 1632, 1645], в обычных условиях они не так хорошо проникают через интактную поверхность кожи при местном применении. Смесь липофильных полимеров на основе полипропиленгликоля (ППГ) и гидрофильных полимеров на основе полиэтиленгликоля (ПЭГ) может иметь определенные преимущества для оптического просветления кожи, благодаря действию липофильного компонента на роговой слой, а гидрофильного компонента — на живой эпидермис и дерму. Определенные преимущества имеет также малая осмотическая сила и сравнительно высокий показатель преломления смеси, который равен 1,47 и близок к показателю преломления рассеивающих компонентов эпидермиса и дермы. При исследовании кожи человека *in vivo* с помощью ОКТ и местном применении смеси полимеров в течение 90–120 мин было показано, что смесь может проникать в интактную кожу и улучшать ОКТ-изображения, давая возможность более ясно увидеть сосудистую сеть и волосяные фолликулы [1638]. Однако не следует ждать радикального увеличения глубины оптического просветления по сравнению с местным применением других просветляющих агентов, таких как глицерин, глюкоза, рентгеноконтрастные вещества и пропиленгликоль, по причине принципиальных ограничений диффузии химических агентов через интактные клеточные слои (см. табл. 9.2). Таким образом, для обеспечения быстрого и эффективного оптического просветления кожи необходимо применять хорошо известные или новые методы повышения эффективности доставки агента. Некоторые из них уже обсуждались выше, а другие будут представлены в следующем разделе.

9.4.6. Доставка просветляющих агентов, проницаемость кожи и функция резервуара. Общие принципы разработки косметических препаратов, позволяющие обеспечить их глубокое проникновение в кожу для улучшения ее физиологических свойств, широко обсуждаются в литературе (см. например [1827]). Как было показано выше, те же косметические препараты с коррекцией или даже без нее могут служить в качестве составов для оптической иммерсии. Это является наилучшим решением, поскольку иммерсионный состав одновременно улучшает и физиологические, и оптические свойства кожи. Однако значительное по величине сопротивление рогового слоя кожи для диффузии любых молекул существенно затрудняет введение иммерсионного агента непосредственно через поверхность кожи [1819].

Липиды определяют высокую проницаемость кремов и лосьонов в верхних слоях эпидермиса и волосяных фолликулах [1827]. Эфиры жирных кислот с одноатомными спиртами, такие как изопропилмирилат, изопропилпальмитат и изопропиллаурат, являются важными химическими компонентами глубокопроникающих кремов и лосьонов.

Технический лецитин (60% натуральных фосфолипидов, в основном фосфатидилхолин, 30–35% растительного масла, глицерин и др.) является основой многих увлажняющих (питательных) кремов благодаря его способности проникать глубоко в кожу.

Силиконовые мазь и масла — легко проникают в волосяные фолликулы при втирании, благодаря низкому поверхностному натяжению, не вызывают воспаления и не влияют на тепловой баланс кожи.

Эмульсии — масла в воде и вода в маслах, размер частиц более 0,1 мкм. Такие эмульсии, как масла в воде, распространены в косметике для глубокого проникновения в кожу в качестве проводников биологически активных веществ и др.

Питательные кремы легко проникают в глубокие слои эпидермиса и предотвращают трансэпидермальные потери воды (ТЭПВ). Увлажнение кожи может быть обеспечено за счет двух механизмов — осмотического и физиологического. В качестве увлажняющих веществ обычно используются лактат натрия, пирролидон-карбоновая кислота, производные аминокислот и сахаров, белки, мукополисахариды. Как гигроскопичный компонент часто используется глицерин (обычно менее 10 % состава). В настоящее время глицерин обычно заменяют пропиленгликолем.

В настоящее время на рынке косметической продукции имеется множество кремов и лосьонов, обеспечивающих достаточно глубокое пропитывание кожи. Во многих косметических эмульсиях, гелях, лосьонах для увлажнения кожи используются гиалуроновая кислота (наилучшая для предотвращения ТЭПВ), морской коллаген (также хорош для этой цели), липосомы и наносферы — липидные частицы (для доставки биологически активных веществ в глубокие слои эпидермиса и волосяные фолликулы). Как правило, кремы на основе липосом и наносфер применяются после пилинговых кремов, например кремов, содержащих альфа-гидроксикислоты (АНА), или абразивных кремов, которые позволяют сделать рельеф кожи более гладким и проницаемым для липосом и наночастиц.

Липосомы были предложены как транспортное средство для введения лекарственных препаратов в кожу и через кожу, однако о характере взаимодействия между липосомами и кожей человека пока известно очень мало. В работе [1828] была осуществлена визуализация процесса проникновения липосом через кожу человека *in vitro* с использованием конфокального микроскопа. Липосомы готовились из фосфолипидов в разных составах и метились флуоресцентным маркером двойного липидного слоя. Липосомы, содержащие ДОФЭ (диолеилфосфатидилэтаноламин) (DOPE, dioleoylphosphatidylethanolamine), проникали в роговой слой глубже, чем без него. Липосомы, содержащие ДОФЭ, могут растворяться или смешиваться с липидами кожи *in vitro* и разрыхлять двойные липидные слои рогового слоя. Среди факторов, не влияющих на проницаемость рогового слоя, были отмечены отрицательный заряд, включения холестерина и длина ацильной цепи у фосфолипидов. Способность к растворению у липосомных составов является необходимым условием их проникновения в кожу. Размеры липосом, измеренные методом квазиупругого рассеяния, лежат в интервале 40–76 нм. Глубина проникновения в кожу за 72 ч составила 2–38 мкм. Нужно заметить, что эффективное растворение липосом, содержащих ДОФЭ, с двойным липидным слоем рогового слоя происходит в течение нескольких минут [1828].

Окклюзия (наложение повязки или крема, затрудняющего свободное испарение воды с поверхности кожи) усиливает чрескожное поглощение многих химических соединений [1819]. Этот эффект сравнительно независим от структуры соединения. Например, гидратация рогового слоя усиливает диффузию воды, а также чрескожное поглощение спиртов, фенолов и стероидов, образующих гомологические ряды. Окклюзия приводит к трехкратному увеличению чрескожного поглощения нескольких стероидов, применяемых в виде растворов в ацетоне. Окклюзия уменьшает или блокирует ТЭПВ и испарение летучих растворителей или соединений с поверхности кожи. В свою очередь, это ведет к чрезвычайно большому (300–400 %) росту содержания воды в роговом слое. Применение большинства трансдермальных препаратов вызывает частичную или полную окклюзию. Частичная окклюзия также может быть получена с препаратами на основе вазелина, мазей или кремов, в то время как лосьоны обладают меньшим изолирующим действием. Кроме того, увеличение содержания воды в роговом слое и усиление чрескожного поглощения может быть достигнуто с помощью ванночек. Влияние окклюзии на содержание воды в роговом

слое имеет сравнительно временный характер, и в типичном случае все возвращается к «нормальному» состоянию в пределах 15 мин после снятия непроницаемой оболочки. Поскольку параметр ТЭПВ также возвращается на нормальный уровень, уменьшение барьерной активности, скорее всего, также носит временный характер.

Потребление воды роговым слоем в условиях окклюзии преимущественно локализовано в корнеоцитах. Оказывается, что гидратация оказывает очень слабое действие на структуру или свойства межклеточных липидов. Полная гидратация рогового слоя путем окклюзии провоцирует образование заполненных водой объемов (пулов), связанных с неоднородными структурами. Эти структуры можно рассматривать как водяные микроканалы, которые сокращают длину диффузии и уменьшают сопротивление для гидрофильных соединений. Однако как липофильные, так и амфифильные препараты также могут выиграть от наличия каналов.

Итак, возможный механизм действия окклюзии состоит в том, что набухание корнеоцитов непосредственно меняет барьерную функцию кожи. Набухание корнеоцитов может создавать альтернативный путь проницаемости путем облегчения проникновения в корнеоциты, увеличения способности соединений диффундировать через корнеоциты или за счет сопутствующего изменения структуры небольшого липидного компонента.

В общем случае усилители проницаемости кожи действуют на уровне рогового слоя [1819]. Молекулярная основа их действия может быть отнесена к 1) увеличению распределения (растворения) соединений в роговом слое; 2) увеличению способности соединений диффундировать через роговой слой и 3) изменению пути проникновения.

Исследования *in vitro* пассивного переноса полярных молекул, таких как мочевины, маннитол, сахароза и раффиноза, сквозь интактную и обработанную в течение двух часов этиловым спиртом эпидермальную мембрану человека (ЭМЧ) и теоретический анализ заторможенной диффузии показали, что пути проницаемости ЭМЧ можно характеризовать пористостью мембраны [1829]. Оценки эффективных радиусов пор для интактной ЭМЧ дали значения в интервале 1,5–2,5 нм, а для обработанной этиловым спиртом примерно в тех же пределах — 1,5–2,0 нм. Поэтому примерно 100-кратное увеличение проницаемости для обработанной этиловым спиртом ЭМЧ по сравнению с интактной было объяснено возросшей пористостью ЭМЧ при экстракции липидов в результате действия спирта, создающего большое количество пор с малым эффективным радиусом.

Было обнаружено, что проницаемость больших молекул (8000 Da¹⁾) меньше, чем малых (~200 Da) [1830]. Исследование проникновения макромолекул (до 18000 Da) через ЭМЧ, обработанную этиловым спиртом в течение 2 ч, дало оценку эффективного размера поры для данной биологической мембраны в интервале 2,2–5,4 нм [1830]. Приблизительно вдвое большие радиусы пор, полученные в исследованиях молекул большего размера, могут отражать наличие распределения пор по радиусам, из-за которого эксперименты с большими молекулами дают больший средний радиус поры, чем тот, который определяется при исследовании проникновения молекул меньших размеров [1829].

Такое поведение проницаемости кожи наблюдалось также при местном применении этилового спирта [1831–1834]. В этих исследованиях этиловый спирт понижал барьерную функцию рогового слоя из-за взаимодействия с межклеточными липидами, что приводило к увеличению проницаемости рогового слоя по отношению

¹⁾ Da — дальтон — единица массы, равная 1/12 массы изотопа углерода ¹²C, или углеродная атомная единица массы: 1 а. е. м. = 1,6603 · 10⁻²⁷ кг.

к местно применяемым веществам, включая аспирин. Анализировалось также влияние смеси этилового спирта с пропиленгликолем на макроскопические барьерные свойства кожи [1832].

Было также исследовано испарение этилового спирта через кожу после его орального приема внутрь (от 0,30 до 0,52 г на 1 кг веса тела) на участках кожи, различающихся по толщине рогового слоя, плотности волосяных фолликул и потовых желез [1835]. Селективная закупорка кожных придатков не оказывала существенного влияния на испарение этилового спирта. Это означает, что его испарение происходит главным образом через липидные слои рогового слоя. Таким образом, можно ожидать, что наличие спирта в организме может повлиять на проникновение наочно применяемых препаратов. Однако исследование, проведенное в работе [1035], не выявило такого влияния на проникновение в кожу УФ-защитного препарата. Предположительно, концентрация этилового спирта в роговом слое была слишком мала (теоретический максимум составлял 1,7 мг на 1 см² поверхности кожи), чтобы заметно повлиять на ее проницаемость. Поэтому действие местно применяемых препаратов не должно меняться в результате приема однократной дозы этилового спирта в 31,2 г, как это было в исследовании [1835], хотя более высокие дозы алкоголя в организме могут существенно нарушить естественную барьерную функцию кожи.

Проницаемость биологических мембран можно увеличить не только этанолом, но и целым рядом других химических агентов [1815, 1819]. Например, такой полиеновый антибиотик, как амфотерицин В, обеспечивает увеличение проницаемости клеточной мембраны для воды в 2 раза, для глицерина в 44 раза, а для мочевины в 200 раз [1815].

Диметилсульфоксид (ДМСО) — полярный рН-нейтральный растворитель — также является хорошим усилителем проницаемости [1637, 1727, 1735, 1736, 1819]. Это натуральное вещество, выделяемое из древесины, имеет уникальную способность проникать в живые ткани, образовывать ассоциаты с водой, белками, углеводами, нуклеиновыми кислотами, ионными веществами и другими составляющими живых систем. Оно имеет гигроскопические и противовоспалительные свойства и сертифицировано FDA (Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США) как предохраняющее вещество при трансплантации органов и лечении интерстициального цистита [1836].

Концентрация ДМСО примерно 60 % требуется для нарушения барьерной функции кожи человека и усиления ее проницаемости в 20–200 раз [1819]. ДМСО дает необратимые нарушения структур рогового слоя, возможно из-за растворения межклеточных липидов и/или денатурации белков. К сожалению, ДМСО имеет некоторые побочные эффекты, такие как раздражение кожи, характерный вкус и запах продуктов его окисления. Некоторые другие полярные рН-нейтральные растворители также экспериментально исследовались как усилители проницаемости, но только один из них — децилметилсульфоксид — нашел применение на практике [1819].

Существует множество поверхностно-активных веществ, снижающих барьерную функцию кожи и подразделяемых на неионные, анионные и катионные в зависимости от их заряда при физиологическом рН [1753, 1757, 1768, 1819]. Некоторые ненасыщенные жирные кислоты увеличивают трансдермальное поглощение агентов посредством понижения барьерной функции кожи, а также увеличения термодинамической активности соединений в некоторых рецептурах [1819]. Олеиновая кислота (C18), относящаяся к мононенасыщенным жирным кислотам, часто используется как хороший усилитель проницаемости для множества полярных и умеренно липофильных соединений [1691, 1746, 1819]. Олеиновая кислота усиливает ТЭПВ *in vivo* примерно в 1,5–2 раза, что согласуется с общим снижением барьерной функции кожи. Имеется

хорошо установленная синергия между усилительной активностью олеиновой кислоты и пропиленгликоля в качестве растворителей [1691, 1748, 1819].

Метод отрывов рогового слоя представляет собой простейший способ физического усиления чрескожного поглощения химических соединений (см. рис. 9.24 б) [1706, 1819]. Хотя метод отрывов не всегда годится в терапевтических приложениях, так как вызывает раздражение кожи, он является очень полезным научным инструментом для оценки максимального чрескожного поглощения агента, которое можно ожидать при местном применении [1837–1839].

Ультразвук (фонофорез или сонофорез) обеспечивает усиленное поглощение низкомолекулярных соединений, а также белков, таких как инсулин [1751, 1754–1757, 1801, 1819]. Непрерывное или импульсное воздействие ультразвуком с частотой от 20 кГц до 10 МГц и интенсивностью до 3 Вт/см² может применяться продолжительностью до 10 мин. Интенсивность ограничена выделением тепла в биоткани. Усилительное действие высокочастотного ультразвука (5–10 МГц) связано с наведением конвективных путей через волосяные фолликулы и разрушением межклеточных липидных пластинок (мостиков). Важную роль в проницаемости рогового слоя играет явление кавитации, при котором в роговом слое образуются малые пузырьки воздуха.

Низкочастотный ультразвук может быть особенно подходящим для усиления проницаемости кожи [1819]. Например, при исследовании эффективности снижения уровня глюкозы в крови под действием инсулина, вводимого местным образом через кожу безволосых крыс, применение ультразвука с частотой 20 кГц в течение 1 ч приводило к 100-кратному увеличению ТЭПВ и существенному проникновению инсулина в кровь животного.

Ионофорез усиливает чрескожное поглощение агентов при приложении умеренного (0,5 В/см²) электрического напряжения поперек кожи (см. рис. 9.24 в) [1706, 1819]. Действие ионофореза не ограничено только движением заряженных ионов, поток нейтральных молекул через кожу также усиливается за счет процесса, который называется электроосмосом. Он возникает в результате совместного действия снижения барьера рогового слоя и индуцированного конвективного потока сольвента. Оказалось, что ионофорез стимулирует прохождение молекул через придатки кожи — волосяные фолликулы и потовые железы. Количественное сравнение потока ионов через придатки кожи и через межклеточную липидную среду при ионофорезе дает от 50 до 95 % эффективности за счет придатков [1819]. Усиление чрескожного поглощения изучалось для большого количества агентов [1819]. Эффект существует во время и после действия тока и полностью исчезает только спустя примерно 24 ч. В исследованиях *in vitro* было найдено, что после клинически значимого воздействия 0,16 мА/см², заметно увеличивающего проницаемость кожи человека, в течение 1 ч после воздействия проницаемость уменьшается в 10 раз.

При более высоких напряжениях (5–200 В/см²), подаваемых в виде коротких импульсов, может происходить электропорация биологических мембран [1819], которая также способствует проникновению агента в ткань.

Лазерно-индуцированные волны напряжения (фотомеханические волны) также могут повышать проницаемость рогового слоя [1840–1843]. Впервые этот эффект был продемонстрирован для δ -аминолевулиновой кислоты [АЛК (ALA)]. Проницаемость рогового слоя зависит от величины пикового механического напряжения. Порог начала проницаемости наблюдается при давлении ~ 380 бар и растет с увеличением пикового напряжения. Эффективность транспорта АЛК через роговой слой имеет нелинейную зависимость от пикового напряжения. Небольшое увеличение пикового напряжения от 440 до 500 бар (14 %) вызывало рост интенсивности флуоресценции (концентрации протопорфирина IX, индуцированного применением АЛК) примерно на 200 %. Применение волн напряжения не вызывает боли или дискомфорта и не

влияет на структуру и жизнеспособность кожи. Изменение проницаемости рогового слоя носит временный характер, и барьерная функция восстанавливается в течение нескольких минут. Возросшая проницаемость позволяет макромолекулам диффундировать через роговой слой в эпидермис и дерму. Максимальный размер частиц, которые могли пройти через роговой слой, составлял 100 нм в диаметре [1840]. Таким образом, лазерно-индуцированные волны напряжения могут усиливать трансдермальную доставку крупных частиц и молекул, таких как новейшие зонды (углеродные, золотые и меланиновые наночастицы, квантовые точки, инкапсулированные молекулярные зонды), инкапсулированные лекарственные препараты или плазмидная ДНК. Комбинированное действие лазерно-индуцированных волн напряжения и анионных поверхностно-активных веществ, таких как лаурилсульфат натрия (2%), увеличивало проникновение наночастиц через роговой слой [1840]. Применение лаурилсульфата натрия увеличивает размер каналов в биологической мембране, а также задерживает восстановление барьерной функции рогового слоя. Синергизм действия света и поверхностно-активного вещества проявлял себя в значительном сокращении интервала времени для обеспечения одинаковой проницаемости рогового слоя: всего 5 мин применения лаурилсульфата натрия было достаточно при действии отдельного лазерного импульса ($\sim 7 \text{ Дж/см}^2$), обеспечивающего пиковое напряжение $\sim 600 \text{ бар}$ и длительность импульса механического напряжения $\sim 250 \text{ нс}$ вместо нескольких часов без лазерного импульса.

Было также показано, что волны лазерно-индуцированного напряжения увеличивают проницаемость плазменной мембраны клеток. Увеличение проницаемости структур кожи делает возможным введение макромолекул в роговой слой, цитоплазму живых эпидермальных клеток и волокнистую структуру дермы. Эти волны напряжения потенциально способны доставлять химические соединения в глубоколежащие слои кожи местно и неинвазивно.

В качестве возможного механизма увеличения проницаемости кожи путем создания решетки микрозон ограниченного теплового повреждения рогового слоя несколькими последовательными оптическими импульсами [1718, 1719, 1801, 1825], помимо прямой фракционной абляции верхних слоев рогового слоя в области микрозон, для более глубоких слоев рогового слоя и верхних слоев живого эпидермиса может рассматриваться индуцированный локальным нагревом фазовый переход межклеточных липидов из фазы геля в жидкокристаллическую фазу [1361, 1844].

Разрабатываются также альтернативные методики доставки агентов в кожу с помощью безыгольной инъекционной пушки и лазерной абляции поверхности кожи, а также их комбинации [1720, 1721]. Например, для усиления проникновения такого просветляющего агента, как глицерин, в кожу хомяка и крысы *in vivo* использовался диодный лазер с длиной волны 980 нм в сочетании с искусственным поглотителем на поверхности кожи [1721]. Такая технология обеспечивает существенное нагревание поверхности кожи, приводящее к разрушению кератиноцитов и, возможно, абляции поверхности кожи в пределах 20 мкм по толщине на площади сканирования лазерного пучка 16 мм². В результате более эффективного действия глицерина в этом случае было обеспечено увеличение проникновения ближнего ИК-излучения с длиной волны 1290 нм на 36% в кожу грызунов *in vivo* при поверхностной плотности энергии лазерного импульса менее 96 Дж/см². Более высокие плотности энергии приводили к нежелательной тепловой денатурации тканей кожи.

Абляцию рогового слоя можно обеспечить непосредственно с помощью импульсного эрбиевого лазера с длиной волны 2790–2940 нм, соответствующей полосе сильного поглощения воды [1845, 1846]. Например, лазерная абляция 12,6% площади поверхности рогового слоя кожи свиньи вызвала рост проницаемости P_a в 2,8 и 2,1 раза для ³H-гидрокортизона и ¹²⁵I- γ -интерферона соответственно [1845]. Эти

исследования показывают, что импульсный (длительность импульса 250 мкс) лазер с длиной волны 2790 нм и плотностью потока энергии 1 Дж/см² может надежно и точно удалять роговой слой за 10–14 импульсов, усиливая проникновение больших молекул, таких как ¹²⁵I- γ -интерферон, которые не проникают через интактную кожу.

Лазерная абляция с помощью эрбиевого лазера оказалась наиболее эффективной для проведения АЛК через образцы кожи свиньи по сравнению с микродермабразией, ионофорезом и электропорацией [1846]. Плотность энергии лазерного излучения играет важную роль в управлении потоком проводимого агента, вызывая усиление проницаемости в 2–246 раз по отношению к контрольным образцам. Микродермабразия увеличивала проницаемости кожи для АЛК в 5–15 раз, а электропорация и ионофорез — соответственно в 2 и 15 раз. Применение электропорации или ионофореза как дополнительного средства при лазерной абляции или микродермабразии приводило к чрезвычайно сильному синергетическому эффекту в повышении проницаемости кожи для АЛК.

Для многоточечной перфорации кожи перспективна фракционная лазерная микроабляция (ФЛМА) с помощью многопучкового эрбиевого лазера ($\lambda = 2940$ нм) с регулируемой конфигурацией пучков (точки или полосы), поперечных размеров и глубины повреждений кожи [1801].

Роговой слой функционирует не только как барьер против проникновения просветляющих агентов в кожу, но также как резервуар для применяемых веществ [1847, 1848]. Придатки кожи, в частности сальные железы, также могут служить резервуарами для просветляющих агентов [1653–1655, 1837, 1849]. Поэтому для развития технологии местного применения просветляющих агентов фундаментальный интерес представляет знание резервуарной функции рогового слоя. С использованием лазерной конфокальной сканирующей микроскопии и метода кожных отрывов с помощью липкой ленты была исследована *in vivo* долговременная резервуарная функция кожи человека в зависимости от полярности применяемого состава [1847, 1848]. Исследовались составы с различными физико-химическими свойствами. Однако только для гидрофильного флуоресцеина натрия, растворенного в пропиленгликоле, фолликулы показали долговременные резервуарные свойства. Сообщалось также о фолликулярном проникновении красителей, применяемых в эмульсиях [1837] или растворителях, таких как этанол или глицерин [1653–1655], или микросферах размером 5 мкм, содержащих краситель и взвешенных в силиконовом масле в массовой концентрации 4% [1849]. Имеются сведения о глубине проникновения и резервуарной функции кожи человека, полученные *in vivo* для метиленового синего и индоцианинового зеленого, растворенных в этаноле/глицерине [1653–1655]. Эти исследования были направлены на коррекцию функционирования сальных желез в процессе фотодинамической терапии акне; наиболее интенсивное окрашивание сальных желез было достигнуто после 15–20-минутного массажа и прогревающих процедур. В исследованиях *in vivo* было также показано, что высокопористые нейлоновые микросферы, взвешенные в силиконовом масле, обеспечивают глубину проникновения метиленового синего в кожу безволосой крысы до 150 мкм за 2 ч и 400 мкм за 26 ч [1849].

Результаты исследований, описанных в работах [1653–1655] и [1847–1849], привели к предположению, что чем лучше проникновение в роговой слой и фолликулы, тем дольше сохраняется резервуар с красителем. Для высвобождения красителя из резервуара имеется два основных пути: 1) отшелушивание рогового слоя и выделение кожного сала; 2) проникновение в окружающую живую ткань.

В заключение следует заметить, что для местно применяемых фильтров УФ-излучения эффективность может резко снижаться при неправильном выборе косме-

тического состава, служащего базовым материалом для такого фильтра. Важными могут оказаться два эффекта: 1) уменьшение рассеяния света в роговом слое из-за оптической иммерсии и 2) неоднородное распределение применяемых веществ при их нанесении. Оба ведут к уменьшению эффективности УФ-фильтров: первый из-за меньшего числа актов взаимодействия мигрирующих фотонов в коже с солнцезащитным материалом при меньшем рассеянии, а второй — из-за формирования островков, свободных от солнцезащитного вещества, которые не блокируют УФ-излучение. Вторая проблема анализируется детально в работе [1839].

9.5. Оптическое просветление тканей пищеварительного тракта

9.5.1. Спектральные измерения. Оптическое просветление тканей желудка можно осуществить при воздействии ОПА на его слизистую оболочку. Слизистая оболочка состоит, в основном, из эпителия и соединительной ткани, лежащей непосредственно под эпителием. Структура слизистой оболочки аналогична структуре кожи с ее клеточным эпидермальным и фиброзным дермальным слоями. Однако отсутствие верхнего слоя мертвых клеток, такого как роговой слой кожи, делает нормальную слизистую оболочку более проницаемой для химических агентов. Исследования оптического просветления тканей желудка представлены в работах [1336, 1636, 1637, 1676, 1677, 1691]. Измерялись пропускание и диффузное отражение в диапазоне длин волн от 800 до 2200 нм для замороженных/оттаявших и свежих срезов слизистой оболочки желудка свиньи толщиной 1,2–1,6 мм, взятых в области кардиального отверстия и привратника желудка. Иммерсионные растворы (глицерин/ДМСО/вода) различной концентрации прикладывались к эпителиальной поверхности образца, а затем снимались спектры с интервалом по времени 5, 10, 20 и 30 мин. Разница в поглощении, рассчитанная на основании измерений диффузного отражения на двух длинах волн, 1936 и 1100 нм, использовалась для определения содержания воды в ткани. Некоторые результаты этих исследований представлены на рис. 9.32. Из рис. 9.32 *а* и 9.32 *б* можно видеть, что по всему диапазону длин волн пропускание растет со временем, а диффузное отражение снижается в диапазоне 800–1370 нм. Наибольший рост пропускания наблюдается на длине волны 1278 нм, а наибольший спад отражения — на 1066 нм.

Было обнаружено, что между оптическим просветлением и десорбцией воды существует сильная корреляция [1636, 1637, 1676, 1690, 1691]. Через 30 мин после применения 80%-й глицерин вызывал 15% потери воды, а 50%-й глицерин и 50%-й ДМСО — 9% и 7% соответственно. Изменение оптического просветления аналогично изменению десорбции воды. Потеря воды была максимальной (~19%) и оптическое пропускание на длине волны 1278 нм также было максимальным (~30%) для смеси 50%-го глицерина и 30%-го ДМСО.

Ослабление рассеяния и снижение поглощения воды позволяют получить более выраженные полосы поглощения других компонентов ткани. В частности, это демонстрируют спектры поглощения (1400–2200 нм), снятые при воздействии 50%-го раствора ДМСО (рис. 9.32 *в*). Главной особенностью этих спектров является наличие полос вблизи длин волн 1450 и 1936 нм, соответствующих первому обертому валентного колебания ОН молекулы воды и комбинации валентного колебания ОН и деформационного колебания НОН молекулы воды соответственно. Применение ДМСО заметно меняет спектр поглощения ткани, в том числе через 5 мин после начала воздействия ДМСО проявляются пики на длинах волн 1730 и 1675 нм, что обусловлено подавлением рассеяния за счет иммерсии и уменьшением поглощения за счет дегидратации. Эти пики могут соответствовать разрешенным колебаниям СН-групп молекул липидов и белков.

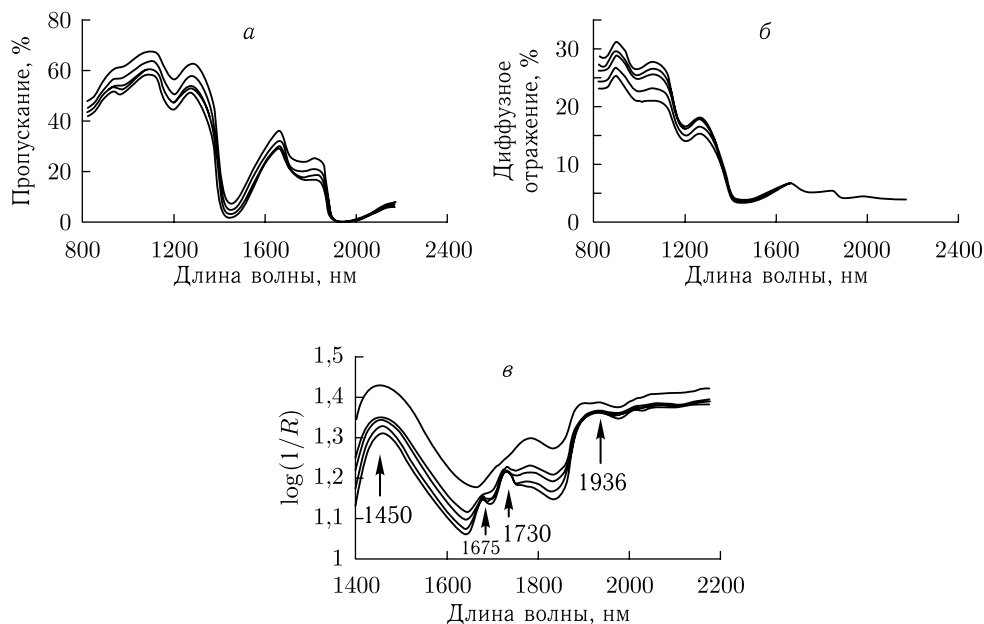


Рис. 9.32. Изменения оптических свойств слизистой оболочки привратника желудка свиньи до и после применения иммерсионного раствора; измерения с помощью спектрофотометра с интегрирующей сферой через промежутки времени 0, 5, 10, 20 и 30 мин (*a* — снизу вверх, *б* и *в* — сверху вниз) соответственно: *a* — полное пропускание и *б* — диффузное отражение в диапазоне 800–2200 нм после местного применения раствора 80%-го глицерина к эпителиальной поверхности образца толщиной $1,6 \pm 0,2$ мм [1336, 1636]; *в* — спектры ослабления, рассчитанные по данным измерений диффузного отражения в диапазоне 1400–2200 нм после применения раствора 50%-го ДМСО, толщина образца $1,15 \pm 0,12$ мм [1637]

9.5.2. ОКТ-визуализация. Исследования *in vitro* оптического просветления тканей пищеварительного тракта, таких как желудок, пищевод и слизистая оболочка толстой кишки, проводились также с применением метода ОКТ-визуализации [1632, 1633, 1636, 1677, 1774]. На рис. 9.33 показаны два типичных ОКТ-изображения ткани дна желудка человека, одно для интактной ткани, другое для обработанной 80%-м раствором пропиленгликоля. При воздействии агента изображение стано-

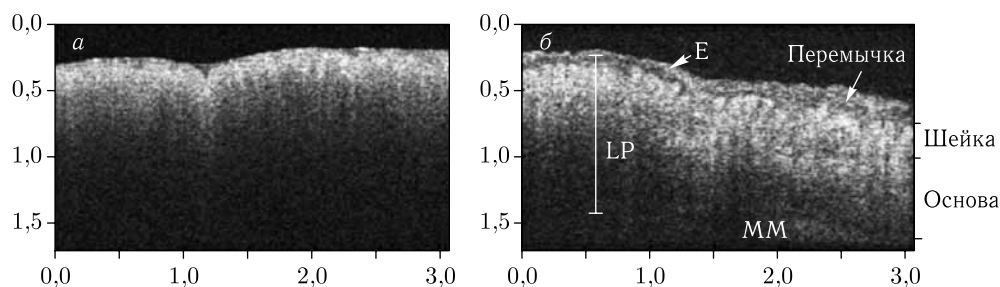


Рис. 9.33. ОКТ-изображения свежей ткани желудка человека (дно) в норме: без применения (*a*) и с местным применением (*б*) 80%-го раствора пропиленгликоля; Е — эпителий, LP — *lamina propria* (собственная тонкая пластинка слизистой оболочки), ММ — *muscularis mucosae* (мышечная ткань слизистой) [1632]

вится более четким с превосходной дифференциацией эпителия, области перешейка, *lamina propria* (собственная тонкая пластинка слизистой оболочки) и мышечной ткани [1632, 1633].

На рис. 9.34 показаны ОКТ-изображения, полученные в М-режиме (ОКТ-сигнал для повторяющихся А-сканирований в глубь ткани как функция времени) для образца ткани желудка свиньи с применением глицерина как просветляющего агента [1677]. Хорошо видно, что со временем глубина проникновения света в ткань растет — фактически изображение показывает распространение фронта просветления. При этом сама ткань сжимается, что обусловлено ее дегидратацией, индуцированной глицерином.

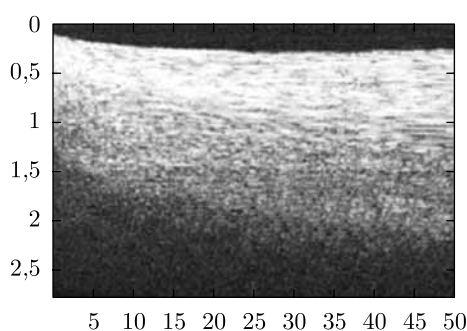


Рис. 9.34. Последовательность повторяющихся А-сканов ОКТ ткани желудка свиньи при местном применении раствора глицерина. Горизонтальная и вертикальная оси представляют время (мин) и глубину изображения (мм) соответственно; регистрация ОКТ-сигнала начинается примерно через 0,5 мин после начала применения агента [1677]

Следует отметить, что обсуждаемые эксперименты проводились на биологических тканях *in vitro*. Очевидно, что кинетика процессов при оптическом просветлении в случае *in vivo* может несколько отличаться; в частности, благодаря саморегуляции клеток и влиянию кровообращения в живых тканях должна происходить меньшая дегидратация ткани, обусловленная действием гиперосмотических просветляющих агентов. Существенные отличия в характере просветления биотканей — его эффективности и постоянной времени просветления, имеют место для здоровой и патологической ткани, что важно не только для оптимизации применения оптических методов диагностики и терапии, но и для более надежной дифференциации патологий [1769–1775].

9.6. Другие перспективные оптические методы

9.6.1. Поляризационные измерения. Кинетику поляризационной структуры изображения ткани при иммерсии легко наблюдать с использованием простой оптической схемы с освещающим источником «белого» света и образцом ткани, помещенным между двумя параллельными или скрещенными поляризаторами. Рисунок 9.35 иллюстрирует эволюцию поляризационных изображений в процессе оптического просветления склеры [654, 1726]. В таких экспериментах слой ткани «работает» как фазовая пластинка (или набор фазовых пластинок) [653, 1698, 1850–1852], линейное двулучепреломление которой зависит от координат и времени. По мере того как рассеяние ослабляется из-за согласования показателей преломления случайных рассеивателей и базового вещества, двулучепреломление фибриллярной структуры

склеры в большей степени влияет на пропускание оптической системы. Пространственные неоднородности изображения могут возникать из-за пространственных вариаций толщины и структуры образца, которые влияют непосредственно на локальный фазовый сдвиг между ортогональными компонентами оптического поля, а также за счет неравномерности в пропитывании образца агентом (см. гл. 2) [622].

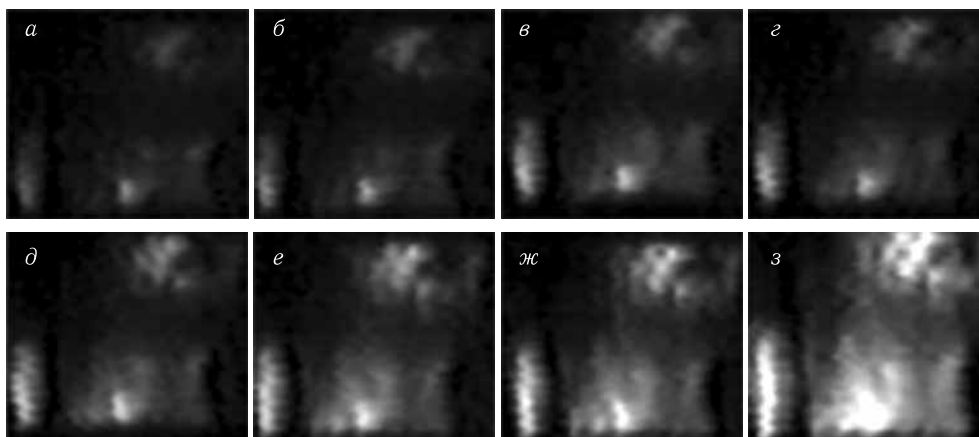


Рис. 9.35. Поляризационные изображения образца склеры (источник белого света, скрещенные поляризаторы). Изображения слева направо соответствуют 4; 5; 6; 7; 8; 9; 9,5 и 10 мин местного воздействия раствора тразографа-60. Поддерживающие образец проволочки хорошо видны через просветленную ткань [654, 1726]

При уменьшении рассеяния степень линейной поляризации света, распространяющегося в склере, повышается. Это ясно видно из экспериментальных графиков на рис. 9.10 и 9.36 [1697]. Как только происходит иммерсия ткани, число актов рассеяния снижается и остаточная степень поляризации проходящего линейно поляризованного света увеличивается. В результате кинетика среднего пропускания ткани и степени поляризации прошедшего света одинакова (см. рис. 9.10). Из рис. 9.10 и 9.36 следует, что оптическое просветление ткани ведет к росту длины деполаризации [36, 135, 138, 595, 650, 738, 1851, 1853]. Из-за меньшего рассеяния более длинных волн степень поляризации для них наибольшая. Поляризационная визуализация — важный инструмент для обнаружения подповерхностных структурных нарушений ткани, но она эффективна только для глубин, меньших чем длина деполаризации [36, 594, 595]. Оптическое просветление может дать возможность существенно увеличить глубину поляризационной визуализации.

Контраст изображения $C(t) = B(t)/B_{\max}$ (где $B(t)$ — текущая яркость образца, а B_{\max} — ее максимальное значение), характеризующее пропускание линейно поляризованного света через образец ткани, использовался для количественной оценки процесса диффузии агента в ней. Для измерений используется простой цифровой поляризационный микроскоп белого света [621]. Исследовались срезы различных соединительных и сосудистых тканей толщиной 0,1–1,5 мм. Иммерсионный раствор подогревался до 36–40 °С и наносился на поверхность образца ткани в виде капель. Представленные на рис. 9.37 экспериментальные данные демонстрируют различие скоростей оптического просветления для образцов вены и аорты, что связано с различиями во взаимодействии этих тканей с иммерсионным агентом. Более плотная аорта менее проницаема для агента, чем вена, поэтому его действие на аорту можно увидеть только спустя несколько часов. В то время как для вены достаточно

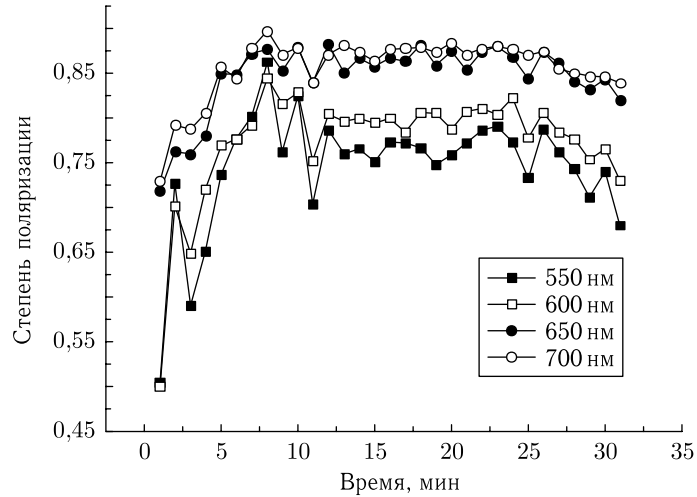


Рис. 9.36. Зависящая от времени степень поляризации $(I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp})$ коллимированного пучка света, прошедшего образец ткани; измерения *in vitro* на различных длинах волн для склеры глаза кролика при пропитывании раствором 40 %-й глюкозы [1697]

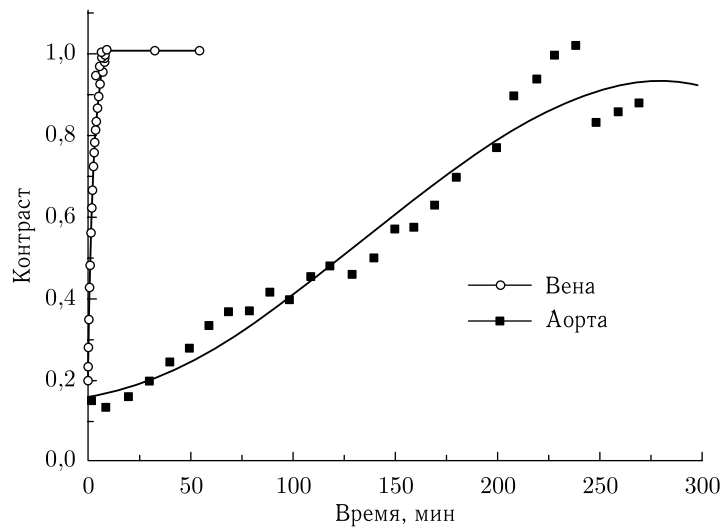


Рис. 9.37. Экспериментальные временные зависимости для контраста изображения в линейно поляризованном свете, пропущенном через образцы сосудистой ткани (аорты и вены — *vena cava inferior*), измеренные с помощью цифрового поляризационного микроскопа белого света при местном применении раствора тразографа-60 [621]

10 мин для полного просветления. Однако, в конце концов, обе ткани переходят из начального состояния (высокая степень мутности — режим многократного рассеяния, высокая степень депolarизации) при $t = 0$ в более прозрачное состояние (рассеяние низкой кратности — низкая степень депolarизации), $C(t) \rightarrow 1$.

Ослабление рассеяния при оптической иммерсии дает возможность регистрировать поляризационную анизотропию тканей более просто и отделять влияние рассея-

ния света на поляризационные свойства ткани от влияния собственного двулучепреломления. С использованием иммерсии можно также изучать двулучепреломление формы, однако при сильной иммерсии средний показатель преломления тканевой структуры близок к показателю преломления базового вещества, и двулучепреломление формы может быть слишком малым для регистрации, поскольку и рассеяние, и двулучепреломление основаны на рассогласовании показателей преломления: рассеяние — на нерегулярных вариациях показателя преломления, а двулучепреломление — на регулярных (см. соотношения (2.2) и (2.3)).

При уменьшении рассеяния двулучепреломление ткани можно измерить более точно, в частности, двулучепреломление формы и материала можно отделить друг от друга. Например, для образца склеры, прозрачность которого вызвана действием раствора глюкозы с высокой концентрацией (около 70%), измеренная оптическая анизотропия [622] $\Delta n = (n_e - n_o)$ была равна $\approx 10^{-3}$. Это в 1,5–4,5 раз меньше, чем для других двулучепреломляющих тканей, описанных в гл. 2, и объясняется, в основном, сокращением вклада двулучепреломления формы при оптической иммерсии.

Дополнительные измерения коллимированного пропускания позволяют оценить показатель преломления базового вещества прозрачной биоткани n_2 с помощью выражений, вытекающих из теории переноса излучения и теории Ми (см. формулы (9.1) и (9.16)). Для образца склеры глаза человека, пропитанного 70%-м раствором глюкозы, величина n_2 была оценена как 1,39. С использованием этой величины, значения показателя преломления гидратированного коллагена $n_1 = 1,47$ и $\Delta n = 10^{-3}$ из формулы (2.2) была найдена объемная доля коллагена $f_1 \approx 0,32$, что хорошо согласуется с оценкой, сделанной в разд. 3.6.

Данные рис. 9.10 иллюстрируют обратимость влияния иммерсии на поляризацию. Для измерений использовался поляризационный спекл-микроскоп, работающий в режиме пропускания [555, 1694]. Образец освещался линейно поляризованным сфокусированным лазерным пучком, который сканировался вдоль отрезка длиной 1,5 мм по поверхности образца для усреднения спекл-модуляции в дальней зоне, где располагались анализатор и фотоприемник. Регистрировались две ортогональные линейно поляризованные компоненты прошедшего света. Видно, что первоначально образец имеет низкое пропускание с одинаковыми интенсивностями компонентов $\langle I_{\parallel} \rangle = \langle I_{\perp} \rangle$, что характерно для многократного рассеяния (полная деполаризация). На 14-й минуте воздействия агента $\langle I_{\parallel} \rangle$ существенно преобладает над $\langle I_{\perp} \rangle$, поскольку биоткань становится менее рассеивающей. Последующее действие физиологического раствора, вымывающего иммерсионный агент, возвращает ткань в ее первоначальное состояние, к 22-й минуте она снова становится сильно рассеивающей и разница между интенсивностями ортогонально поляризованных компонентов исчезает. Повторное применение иммерсионного агента снова делает биоткань менее рассеивающей и более поляризационно-чувствительной с максимумом, достигаемым на 28-й минуте.

Данные рис. 9.38 демонстрируют обратимое просветление и даже потерю двулучепреломления у сухожилия хвоста грызуна при применении глицерина (концентрация 13 М) [1578]. Темный фон на каждом изображении показывает ослабление падающего света при скрещенных поляризаторах в поляризационном микроскопе, с помощью которого проводились исследования. Характерные полосатые структуры, наблюдаемые в образце сухожилия, отражают упорядоченное расположение волокон. Распределение яркости по структуре соответствует распределению фазового сдвига между ортогональными компонентами поля (см. соотношение (2.1)), а равномерная яркость фона соответствует рассеянию света. Спад пропускания на краях образца и появление ярких пятен в его центре в процессе действия глицерина отражают

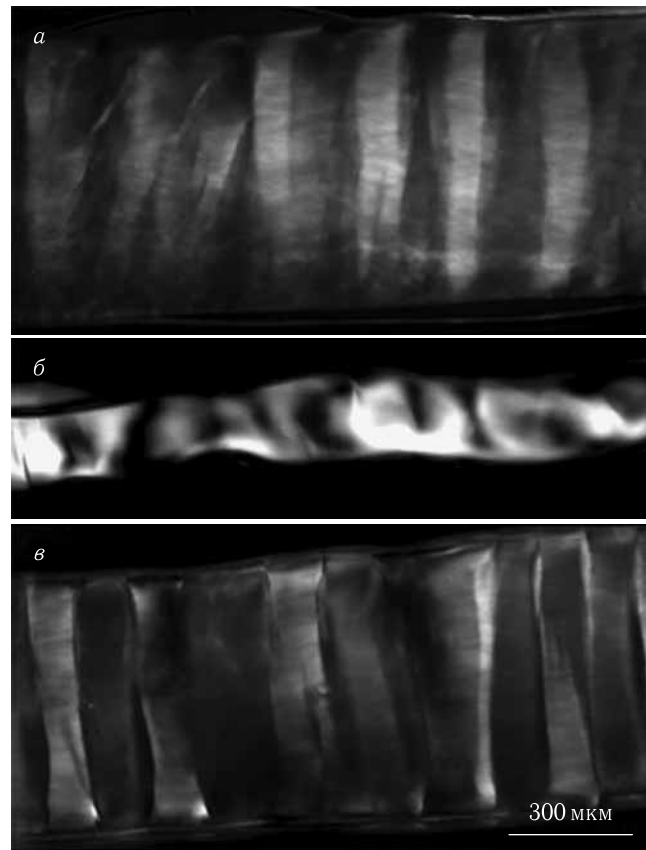


Рис. 9.38. Обратимая потеря мутности и двулучепреломления в сухожилии хвоста грызуна вслед за применением глицерина (13 М), наблюдаемые с помощью микроскопии поляризованного света в скрещенных поляризаторах: *а* — до применения глицерина (полосчатые структуры, наблюдаемые в изображении сухожилия, отражают упорядоченную организацию волокон); *б* — при применении глицерина (потеря пропускания на краях образца и яркие пятна в середине указывают на наличие частичного согласования показателей преломления коллагеновых волокон и окружающего вещества; полное согласование по краю образца приводит к полной потере рассеяния и двулучепреломления формы, а в середине образца показатели преломления согласованы частично, в основном для мелких рассеивающих частиц, поэтому подавляется рассеяние (потеря мутности), а двулучепреломление формы сохраняется) *в* — образец ткани после регидратации в физиологическом растворе (рисунок был любезно предоставлен Элвином Т. Йе и Бернардом Чои)

согласование показателя преломления коллагеновых волокон (не видны из-за их малого диаметра). Полное согласование показателей преломления на краях наступает раньше, чем в середине образца, и приводит полному исчезновению рассеяния и двулучепреломления в этой области. В центральной области образца согласование показателей преломления наступает не полностью, уменьшается, в основном, рассеяние (потеря мутности), поэтому яркие и темные области, соответствующие некоторому фазовому сдвигу, хорошо видны. Сжатие ткани под действием глицерина из-за дегидратации, как и высказанная в качестве гипотезы авторами работы [1578] обратимая диссоциация коллагеновых волокон, могут влиять на формирование струк-

туры изображения. Регидратация образца ткани в физиологическом растворе делает полностью видимой полосатую структуру в скрещенных поляризаторах, что связано с восстановлением двулучепреломления и мутности ткани примерно до начального состояния.

Практически все здоровые соединительные и сосудистые ткани обладают оптической анизотропией, типичной для одноосных или двuosных кристаллов [621, 622, 653, 1698]. Патологические ткани, как правило, имеют изотропные оптические свойства [29, 594, 595].

Поведение обратно отраженного циркулярно-поляризованного света от рассеивающей среды в условиях ее оптического просветления экспериментально (на фантомах) исследовано в работе [738]. Для удобной интерпретации результатов эксперимента авторы предлагают использовать формализм сферы Пуанкаре. Была продемонстрирована высокая чувствительность параметров отраженного циркулярно-поляризованного света к изменению рассеивающих свойств среды.

9.6.2. Конфокальная микроскопия. Увеличение прозрачности верхних слоев ткани позволяет улучшить глубину проникновения, контраст и пространственное разрешение изображений также и в отражательной конфокальной микроскопии [351, 1521, 1525, 1679]. Путем моделирования аппаратной функции конфокального микроскопа методом Монте-Карло было показано, что при просветлении тканей кожи оказывается возможным исследовать более глубокие слои, чем обычно, вплоть до ретикулярной дермы (*reticular dermis*) (рис. 8.20) [1521]. Результаты моделирования показывают, что через 20 мин после внутрикожной инъекции глицерина или глюкозы, когда соответствующий просветляющий агент распределится за счет диффузии в объеме ткани, можно зарегистрировать сигнал от слоев кожи, расположенных в два раза глубже, чем без инъекции.

Значительное улучшение параметров сигнала конфокального микроскопа при воздействии глицерина хорошо видно из аксиальных профилей регистрируемого сигнала (аппаратной функции), теоретически рассчитанных для трех различных фокусировок в глубину кожи (рис. 9.39) [351].

9.6.3. Регистрация флуоресценции. Флуоресценция является одним из простых и эффективных средств диагностики и мониторинга биологических тканей и клеток. Однако в ряде случаев рассеяние может сильно корректировать спектры флуоресценции от глубоколежащих хромофоров или вообще полностью не пропускать слабое свечение из ткани или возбуждающее излучение в глубь ткани. Поэтому метод оптического просветления оказывается полезным и в случае флуоресцентной диагностики [1418, 1640–1642, 1785–1789]. Так, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* при местном применении гиперосмотических ОПА, таких как безводный глицерин (13 М, $n = 1,47$) и чистый ДМСО (14 М, $n = 1,47$), а также глюкоза высокой концентрации (7 М, $n = 1,46$), было продемонстрировано существенное улучшение параметров сигнала флуоресценции, проходящего через кожу [1418]. Измерение флуоресценции производилось для кожи спины хомяка с нанесением ОПА на субдермальную сторону кожи. Источником флуоресценции служила родаминовая флуоресцентная пленка, расположенная на той же субдермальной стороне кожи. Флуоресценция возбуждалась импульсом лазера на красителе с длиной волны 542 нм, подаваемым через эпидермальную сторону кожи с помощью волоконно-оптического жгута, и регистрировалась на длинах волн, больше 565 нм, посредством приемного жгута со стороны той же эпидермальной поверхности.

В исследованиях *in vivo* использовалось специальное окно, вживленное под частично отделенный лоскут кожи на участке, свободном от крупных кровеносных сосудов. Примерно одинаковое увеличение проходящего излучения флуоресценции

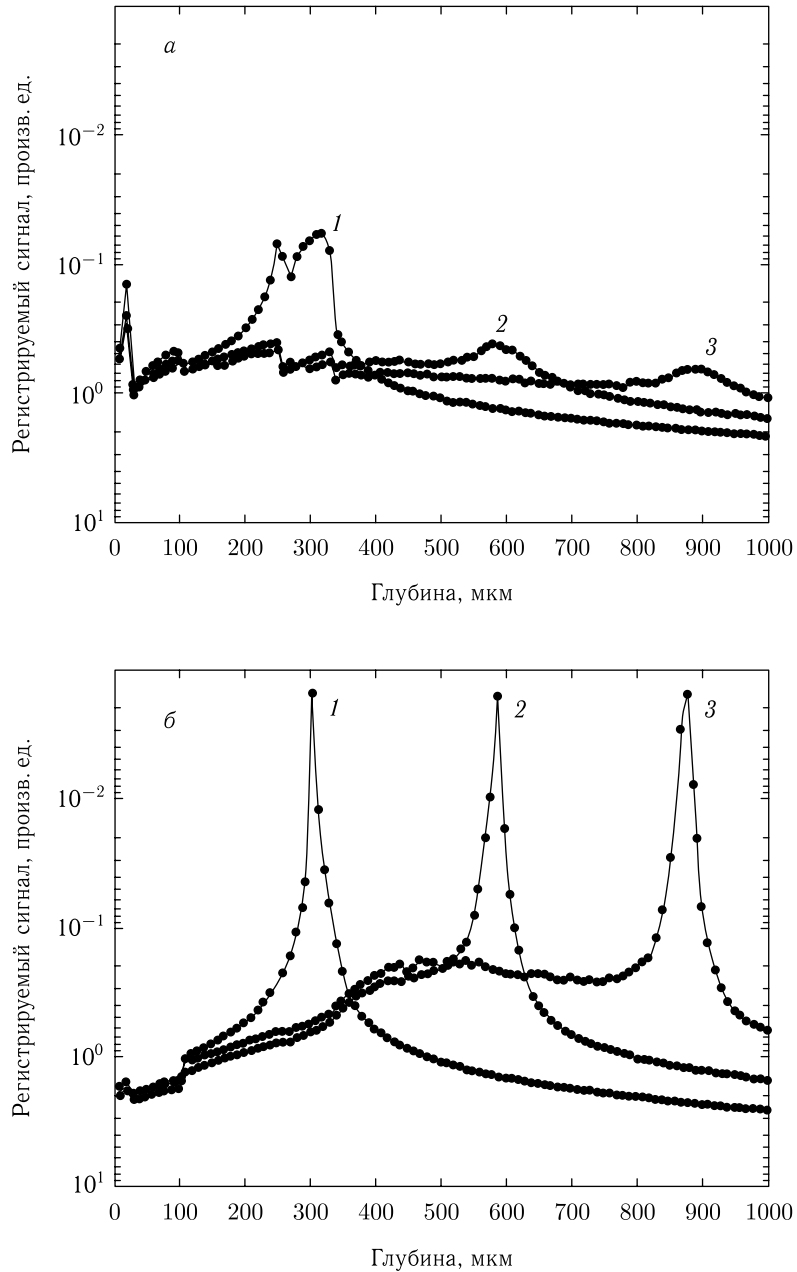


Рис. 9.39. Аксиальный профиль распределения сигнала конфокального микроскопа перед применением (а) и через 20 мин после применения (б) глицерина (интрадермальная инъекция), рассчитанный методом Монте-Карло для фокусировки конфокального микроскопа на 300 мкм (1), 600 мкм (2) и 900 мкм (3) в глубину кожи. Параметры конфокального микроскопа: диаметр линзы 5 мм, фокусное расстояние 10 мм, диаметр точечного отверстия 10 мкм, высота линзы над поверхностью объекта 9,7 мм (см. рис. 8.19) [351]

достигалось *in vitro* и *in vivo* (рис. 9.40). В среднем рост интенсивности флуоресценции наблюдался до 100 % через 20 мин после применения глюкозы и глицерина и до 250 % — после применения ДМСО. Существенно больший рост в случае ДМСО, по-видимому, связан с его вдвое большей осмолярностью, по сравнению с глицерином и глюкозой в используемых концентрациях.

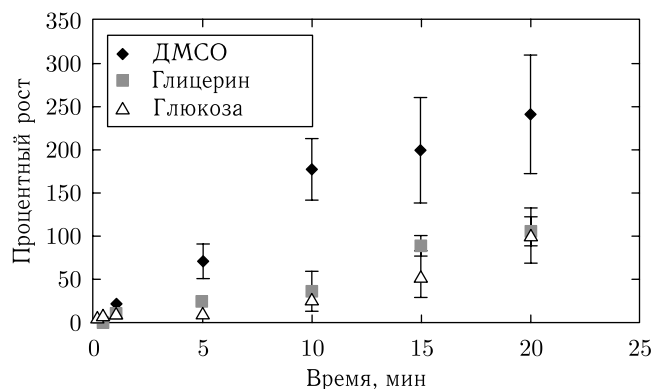


Рис. 9.40. Поведение сигнала флуоресценции (прирост сигнала в процентах) при исследовании *in vivo* кожи спины хомяка с нанесением ОПА на субдермальную сторону кожи. Источником флуоресценции служила родаминовая флуоресцентная пленка, расположенная на той же субдермальной стороне кожи. ОПА: 100%-й глицерин, 100%-й ДМСО и 7 М-я глюкоза [1418]

В экспериментах *in vitro* с образцом свежей свиной кожи при местном применении 50%-го глицерина в течение 30 мин было продемонстрировано значительное повышение чувствительности (~5 раз) и пространственного разрешения (~3 раза) при детектировании слабоизлучающих флуоресцентных зондов (широкополосная сине-фиолетовая хемилюминесценция с центральной длиной волны 425 нм) через слой ткани толщиной 3 мм [1642]. Большая эффективность переноса излучения люминесценции через кожу при ее иммерсии в этом случае связана с более высоким начальным рассеянием и поглощением кожи на меньших длинах волн. Согласование показателей преломления эффективно подавляет рассеяние, что снижает и поглощение, поскольку в среде мигрирует меньшее количество фотонов.

Было также показано теоретически, что путем согласования показателей преломления в области соприкосновения кожи и волоконно-оптического флуоресцентного датчика можно улучшить контраст и пространственное разрешение флуоресцентного сигнала от кожи в пределах небольшого измерительного объема [1641].

Описанные выше эксперименты убедительно показывают, что за счет увеличения пропускания слоя кожи при оптической иммерсии, интенсивность света от источника флуоресценции, помещенного за слоем кожи, может существенно возрастать. Чаще, однако, флуорофоры распределены в толще слоя ткани, или многослойная ткань содержит несколько различных флуорофоров. В этом случае поведение сигнала флуоресценции при оптической иммерсии не столь очевидно, поскольку интенсивность испускания флуоресценции зависит от сечения поглощения возбуждающего света флуоресцирующими центрами. Это сечение снижается с ослаблением многократного рассеяния. Поэтому при оптическом просветлении ткани иногда вместо усиления сигнала флуоресценции можно наблюдать и его ослабление [1640, 1788]. Очевидно, что это зависит от глубины залегания флуорофора и того, какой именно слой ткани оптически просветляется.

Рисунок 9.41 показывает, что флуоресценция действительно может ослабляться при уменьшении рассеяния в ткани [1640]. Эти данные были получены *in vivo* для кожи человека при внутридермальной инъекции иммерсионной жидкости — тразографа-76. Такое поведение сигнала автофлуоресценции означает, что основной флуорофор (коллаген) находится в дерме, куда был введен иммерсионный агент. Однако со временем, благодаря более глубокому проникновению возбуждающего света и меньшему ослаблению индуцируемой флуоресценции верхними слоями кожи, интенсивность флуоресценции возрастает. Оптическое просветление можно использовать как метод для дифференцировки и нахождения распределения эндогенных и экзогенных флуорофоров в биотканях.

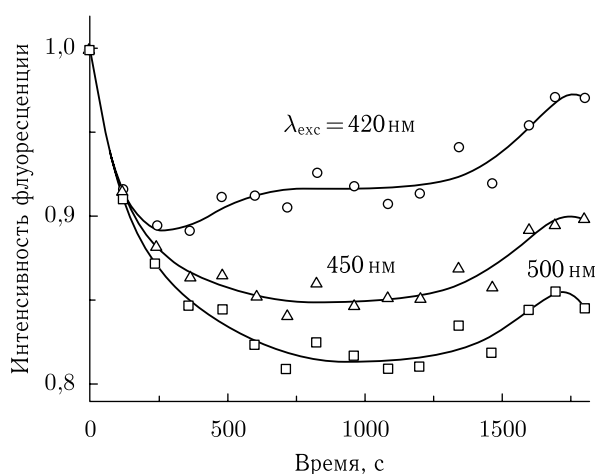


Рис. 9.41. Кинетика *in vivo* интенсивности автофлуоресценции кожи человека ($\lambda_{\text{exc}} = 337 \text{ нм}$) после интрадермальной инъекции 0,1 мл раствора тразографа-76. Значения интенсивности при различных длинах волн излучения нормированы на соответствующие начальные значения [1640]

Повышение чувствительности и пространственной разрешающей способности биолюминесцентных и флуоресцентных методов визуализации с помощью оптического просветления обсуждается в работах [1785, 1788]. Возможность практического применения метода для детектирования сальмонеллы (*salmonella typhimurium*) непосредственно через кожу свиньи при накожной аппликации глицерина продемонстрирована авторами работы [1786]. Эффективная флуоресцентная визуализация биоткани при иммерсионном просветлении кожи, необходимая для надежного сопровождения хирургического вмешательства, представлена в работе [1787].

Новые возможности для получения трехмерных изображений структурных элементов различных биотканей с помощью флуоресцентной конфокальной микроскопии при просветлении исследуемых образцов представлены в работах [1794–1796, 1798, 1854].

9.6.4. Двухфотонная сканирующая флуоресцентная микроскопия. Одно из новых направлений в спектроскопии биотканей связано с многофотонной сканирующей флуоресцентной микроскопией (см. разд. 5.2) [114, 122, 131, 137, 1123–1162, 1099–1102, 1797]. Было, однако, показано, что рассеяние существенно уменьшает глубину зондирования в многофотонной флуоресценции до значений, меньших чем в эквивалентном случае однофотонной флуоресценции, оставляя при этом разрешение практически неизменным [1132, 1138]. Это происходит главным образом

из-за дефокусировки возбуждающего пучка в рассеивающей среде. Хотя некоторое увеличение глубины зондирования можно получить за счет оптимизации формы и частоты повторений импульсов [1139], подавление рассеяния представляется более эффективным средством для повышения глубины зондирования и контраста изображения [1609, 1610]. Двухфотонная флуоресцентная микроскопия позволяет получать изображения кожи человека *in vivo* с высоким пространственным разрешением [1140, 1141]. Очевидно, что данный метод применим ко многим другим тканям, однако его глубина зондирования ограничена; например, для кожи это обычно 20–30 мкм.

Впервые улучшение двухфотонного сигнала по глубине с использованием оптической иммерсионной техники с такими гиперосмотическими агентами, как глицерин, пропиленгликоль и глюкоза, было продемонстрировано авторами работы [1610] в экспериментах *ex vivo* с кожей человека. Изображения толстых (150 мкм) срезов дермы, иссеченных в ходе пластической операции, были получены в течение того же дня. Изображения объединялись в стеки, каждый из которых включал четыре изображения площадью в 100 мкм^2 с глубины в 20, 40, 60 и 80 мкм от поверхности образца. Перед измерениями образец погружался в 0,1 мл фосфатного буферного раствора (ФБР) для предотвращения обезвоживания и сжатия. Затем образец погружался в 0,5 мл ОПА и один стек изображений регистрировался каждые 30 с в течение 6–7 мин. После чего образец снова помещали в 0,1 мл ФБР для наблюдения обратимости процесса просветления. Глицерин и пропиленгликоль использовались в обезвоженной форме, а глюкоза — в виде концентрированного водного раствора (5 М). Верхний предел сжатия ткани был оценен в 2% в процессе 6–7 мин применения ОПА.

Средний контраст каждого изображения (C) и относительный контраст (RC) определялись как [1610]

$$C = \sum_{i,j=1}^{N_{\text{lines}}} |I_{ij} - \langle I_{ij} \rangle|, \quad RC(\%) = 100 \frac{C[\text{ОПА}] - C[\text{ФБР}]}{C[\text{ФБР}]},$$

где $\langle I_{ij} \rangle$ — средняя интенсивность ближайших восьми пикселей, $N_{\text{lines}} = N - 2$ с $N = 500$; $C[\text{ОПА}]$ и $C[\text{ФБР}]$ вычисляются соответственно для иммерсии образца в ОПА и в ФБР. Контраст C , как следует из настоящего определения, линейно зависит от интенсивности флуоресценции и изменяется в соответствии со структурой изображения. Поэтому его назначение состоит, главным образом, в сравнении изображений одного и того же образца на одной глубине с сохранением того же поля зрения. Для сравнения разных изображений потребовалась бы нормировка полной интенсивности. Относительный контраст RC также служит для сравнения.

На рис. 9.42 *a* (цветная вклейка) показаны два типичных стека изображений: первый получен для образца, погруженного в ФБР, а второй получен через 7 мин после применения глицерина. На изображениях видна соединительная ткань дермы человека, которая преимущественно образована коллагеновыми и эластиновыми волокнами. Ясно видно улучшение контраста, а также увеличение глубины зондирования (с 40 до 80 мкм) и полной интенсивности (т. е. интенсивности, просуммированной по всем пикселям, рис. 9.42 *б*). Графики соответствующих уровней абсолютного и относительного контраста представлены на рис. 9.42 *a* и *г*. RC имеет значение 215% при глубине 40 мкм и резко возрастает с увеличением глубины.

Влияние на более глубокие слои сильнее из-за кумулятивного эффекта ослабления рассеяния в поверхностных слоях образца ткани, который вызывает меньшее ослабление падающего и регистрируемого флуоресцентного света. Контраст также зависит от интенсивности флуоресценции, которая пропорциональна квадрату интенсивности возбуждения и в основном определяется возможностями фокусировки

возбуждающего пучка. Лучшая фокусировка (меньшее размытие фокусируемого пучка) достигается в менее рассеивающих средах.

Экспериментально было показано, что применение каждого ОПА (глицерина, пропиленгликоля и глюкозы) приводило к усилению контраста с различной степенью эффективности и насыщения. Кинетика и конечный уровень контраста зависят от вида ОПА и глубины зондирования ткани. Насыщение контраста наступает быстрее всего в поверхностных слоях образца. Это согласуется с диффузионной моделью проникновения агента с поверхности в глубь ткани (см. формулы (9.2), (9.6) и (9.7)), т.е. если контраст пропорционален концентрации агента, то время насыщения на данной глубине пропорционально глубине. Как следует из данных работы [1610]¹⁾, глицерин наиболее эффективен в отношении уровня насыщения ($RC = 49,7\%$ на глубине 20 мкм, $\sim 304\%$ на глубине 40 мкм, $\sim 1900\%$ на глубине 60 мкм и $\sim 9260\%$ на глубине 80 мкм), но действует наиболее медленно. Пропиленгликоль дает $RC \sim 64\%$ на глубине 20 мкм, $\sim 1090\%$ на глубине 40 мкм, $\sim 5640\%$ на глубине 60 мкм и $\sim 447\%$ на глубине 80 мкм. Глюкоза (5М) дает наихудший результат с $RC = 10,9\%$ на глубине 20 мкм, $\sim 134\%$ на глубине 40 мкм, $\sim 471\%$ на глубине 60 мкм и $\sim 406\%$ на глубине 80 мкм, но диффундирует в три раза быстрее, чем глицерин, и в пять раз быстрее, чем пропиленгликоль. Разбавленные агенты обеспечивали сходные тенденции в улучшении контраста и увеличении глубины зондирования, причем эффективность в отношении обеих характеристик росла с увеличением концентрации ОПА.

В действии трех различных ОПА была обнаружена дополнительная специфика: для пропиленгликоля и глюкозы было обнаружено лишь замедление роста контраста вслед за добавлением ФБР, а не снижение его, как это имело место для глицерина. Такое поведение можно связать с меньшим включением механизма дегидратации в оптическое просветление для пропиленгликоля и глюкозы и большим количеством этих агентов, проникающих в ткань в результате диффузии, по сравнению с глицерином.

Эти данные, как и данные линейной спектроскопии, показывают, что согласование показателей преломления является главным механизмом уменьшения рассеяния в ткани и улучшения двухфотонного сигнала. В отличие от однофотонной флуоресцентной спектроскопии (см. рис. 9.41), для которой интенсивность флуоресценции может падать при подавлении многократного рассеяния, сигнал двухфотонной флуоресценции всегда увеличивается благодаря меньшему размытию сфокусированного пучка и меньшему ослаблению сигнала вышележащими оптически просветленными слоями ткани.

Из-за сильного рассеяния исследуемых биотканей глубина зондирования современных нелинейных микроскопов не превышает 300 мкм, однако применение технологии оптического просветления за счет замены воды в биотканях другими жидкостями с показателем преломления, близким к показателю преломления белков, позволяет существенно снизить рассеяние и получить глубину зондирования, превышающую 2 мм [1609].

9.6.5. Генерация второй гармоники. Оптическое просветление представляется перспективным для улучшения регистрируемых сигналов в многофотонной спектроскопии, нелинейной спектроскопии и визуализации тканей, в том числе при генерации второй гармоники [1578, 1579, 1611, 1792, 1793, 1797]. С другой стороны, нелинейные методы могут быть полезны для понимания молекулярных механизмов оптического просветления тканей при иммерсии и дегидратации.

¹⁾ Числовые данные для значений RC были предоставлены Сэмпсоном.

В коже генерация второй гармоники (ГВГ) (см. разд. 8.7) обеспечивается, в основном, дермой, благодаря ее основному компоненту — коллагену, обладающему значительной нелинейной восприимчивостью. Очевидно, что благодаря оптическому просветлению ослабление рассеяния в эпидермисе для падающего длинноволнового света (800 нм) и особенно для коротковолнового света второй гармоники (400 нм) может привести к улучшению ГВГ-изображений коллагеновых структур дермы.

При воздействии 100 %-го глицерина на образцы дермы кожи и сухожилия хвоста грызунов, а также на слой искусственной ткани (имплантат) была достигнута высокая эффективность оптического просветления ткани в диапазоне длин волн от 400 до 700 нм, однако сигнал ГВГ значительно деградировал в ходе применения глицерина и возвращался к исходному состоянию после регидратации ткани в физиологическом растворе [1578]. Потерю сигнала ГВГ авторы работы [1578] связали с обратимой диссоциацией коллагеновых волокон и соответствующей потерей организации волокон под действием глицерина. Такое объяснение несколько противоречиво, поскольку меньшая степень организации коллагеновых волокон должна приводить к меньшему оптическому пропусканию [654]. Поскольку при применении глицерина оптическое просветление во многом определяется дегидратацией ткани, объяснение, следующее из данных работы [1579], представляется более адекватным. С использованием ГВГ-поляриметрии отражательного типа в работе [1579] было показано, что поляризационная диаграмма сигнала ГВГ (зависимость интенсивности сигнала ГВГ от угла поляризации) для дермы кожи цыпленка почти не менялась (рис. 9.43), а интенсивность сигнала ГВГ уменьшалась примерно до четверти при дегидратации ткани. Авторы выдвинули гипотезу, что снижение интенсивности сигнала ГВГ есть результат изменения линейных оптических свойств, т. е. эффективности рассеяния, а не эффективности генерации второй гармоники в тканях. Как следует из рис. 9.43, при фиксации ткани формалином ее ГВГ-поляризационные диаграммы остаются почти неизменными, однако интенсивность ГВГ-сигнала увеличивается. Поскольку фиксация ткани формалином индуцирует процесс образования поперечных сшивок коллагена, этот результат может означать, что образование поперечных сшивок не влияет на ориентацию коллагеновых волокон, но вносит вклад в интенсивность сигнала ГВГ [1579]. Эти два примера хорошо иллюстрируют зависимость сигнала ГВГ от рассеяния в образце, которое уменьшается при дегидратации ткани и увеличивается при ее фиксации. Таким образом, для исследования структуры ткани (ориентации коллагена) с помощью ГВГ можно применять один из методов, обеспечивающих снижение влияния рассеяния света, такой как ГВГ-поляриметрия [1579] или техника оптической иммерсии [1792], или их комбинация [1793]. Например, при получении ГВГ-изображений мышечной ткани после аппликации 50 %-го водного раствора глицерина глубина зондирования ткани по уровню $1/e$ увеличивается в три раза: с 70 до 210 мкм [1792].

9.6.6. Колебательная, КР- и КАСКР-спектроскопия. Инфракрасная колебательная спектроскопия в основном используется для мониторинга диффузии просветляющих агентов в биотканях, поскольку многие ОПА имеют в средней ИК-области характерные пики поглощения отличные от пиков воды и могут быть идентифицированы на фоне спектра воды, что затруднительно сделать в ближней ИК-области [1231, 1735]. Дегидратация биоткани при ее иммерсионном просветлении может помочь при идентификации биологически важных молекул в биоткани по их характерным ИК-спектрам на сниженном фоне ИК-спектра воды. Ткань, действительно, становится несколько более прозрачной и в этой области спектра, но, в основном, не за счет уменьшения рассеяния, а за счет уменьшения поглощения, связанного с потерей воды.

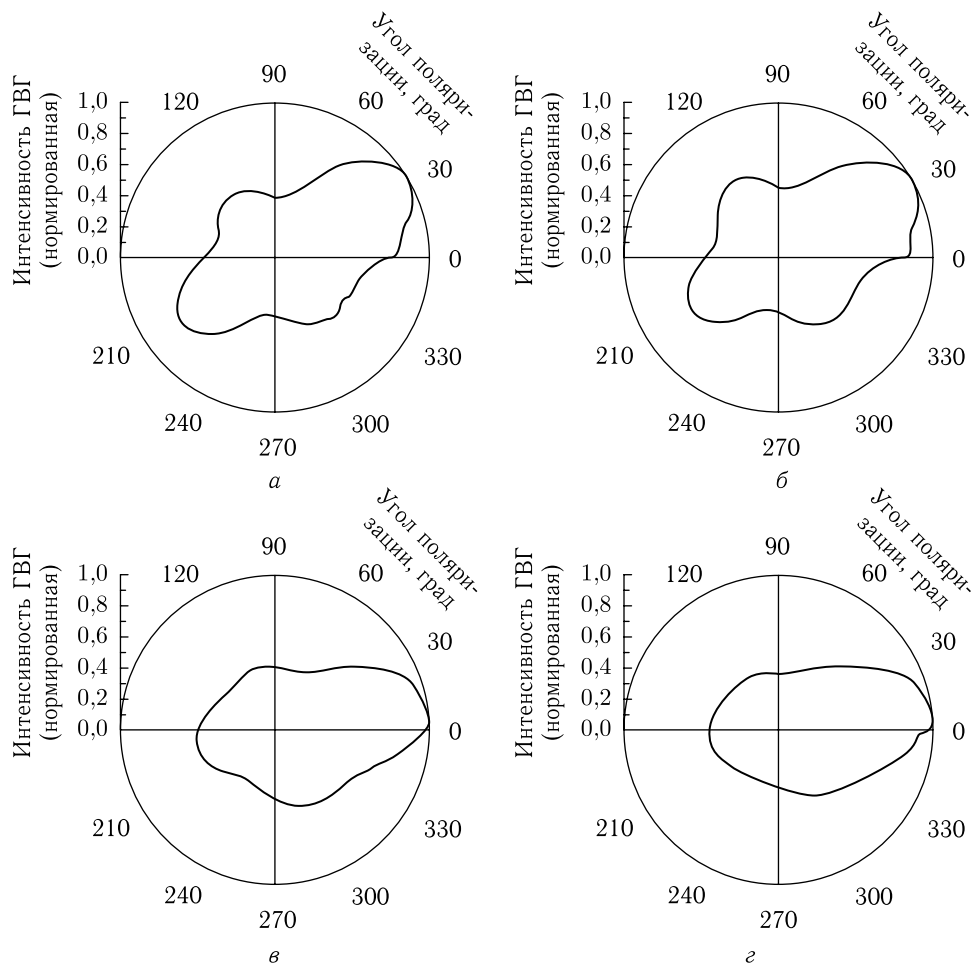


Рис. 9.43. Диаграммы направленности для сигнала генерации второй гармоники (ГВГ), полученные для образцов дермы кожи цыпленка [1579]: а и б — распределения сигнала ГВГ до фиксации и через 5 ч после фиксации образца формалином; в и г — до и через 13 ч после высушивания образца на воздухе

Так, в работе [1231] для измерения инфракрасных спектров поглощения в диапазоне 2–15 мкм компонентов биотканей и их фантомов (воды, полиакриламида, Интралипида, коллагеновых гелей), а также гипертонических просветляющих агентов (глицерина, 1,3-бутиленгликоля, триметилпропана, Toriscage) использовалась ИК-фурье-спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения. Кинетика проницаемости ДМСО и глицерина в кожу свиньи в эксперименте *in vitro* изучалась авторами работы [1735] с помощью визуализации пространственно-временного распределения ОПА в биоткани методом ИК-фурье-спектроскопии [1735].

Конфокальная спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) также используется для мониторинга *in vivo* проницаемости просветляющих агентов и усилителей проницаемости в роговой слой кожи, в частности ДМСО [1727]. Существенного усиления обычно не детектируемых КР-сигналов от внутренних биотканей можно добиться путем оптического просветления поверхностных слоев ткани, закрывающих

объект исследования [1790, 1791]. Так была реализована *in vivo* чрезкожная спектроскопия берцовой кости крысы при просветлении кожи глицерином [1790]. Процесс оптического просветления кожи свиньи изучался *in vitro* с помощью КР-микроспектроскопии [1791].

Нелинейная КР-спектроскопия также находит свое применение при изучении механизмов оптического просветления; например, в работе [1601] сигнал КАСКР служил в качестве опорного при изучении воздействия ДМСО на структуру коллагена и соответственно потерю сигнала второй гармоники и уменьшения рассеяния света кожи человека.

9.6.7. Терагерцовая спектроскопия. Терагерцовый (ТГц) частотный диапазон, занимающий промежуточное положение между ИК и микроволновым диапазоном частот (частота $\nu = 1$ ТГц соответствует длине волны в свободном пространстве $\lambda = 300$ мкм) является перспективным для применений в биологии и медицине, поскольку многие колебательные переходы биомолекул находятся именно в этом диапазоне, рассеяние излучения не так сильно, как в видимой и ближней инфракрасной областях, показатели преломления компонентов биоткани сильно различаются между собой, а возбуждение сверхкороткими импульсами позволяет исследовать широкий диапазон частот за одно измерение и обеспечивать высокое разрешение по времени [6, 1855–1859]. ТГц-спектроскопия позволяет в одном измерении определять комплексный показатель преломления исследуемой среды, что важно для создания функционального ТГц-томографа с высокой чувствительностью к изменению концентрации метаболитов и точным маркированием границ патологического процесса. Поэтому развитие спектроскопических методов исследования биологических тканей в ТГц-диапазоне частот, обеспечивающих детектирование и визуализацию метаболических и патологических процессов, вызывает последние годы высокий интерес, особенно как дополнительный канал получения информации в мультимодальных системах в сочетании с оптическими методами [1858, 1859].

В таких приложениях применение иммерсионного просветления биоткани решает многие проблемы применения оптических методов за счет обратимого снижения рассеяния света, а сопутствующая дегидратация биоткани способствует большей проницаемости ТГц-излучения за счет также обратимого снижения поглощения воды, содержащейся в биоткани. Прямые измерения *in vitro* влияния дегидратации мышечной ткани свиньи при иммерсии образца в глицерине в течении 30 мин показали существенное снижение поглощения терагерцового излучения в области 0,1–1,5 ТГц, измеренное методом нарушенного полного внутреннего отражения (см. рис. 9.44)

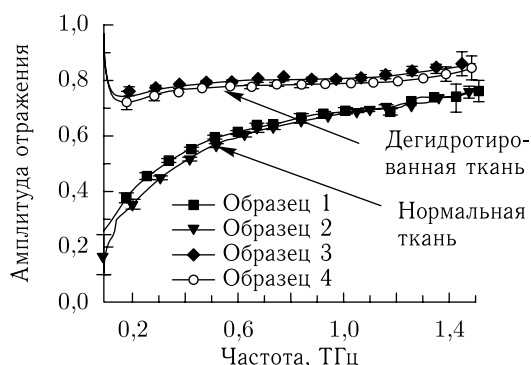


Рис. 9.44. Отражательная способность терагерцового излучения от образца мышечной ткани в условиях иммерсии в растворе глицерина (дегидратация) [1855]

[1855]. При этом потеря массы образца составила 10% от его исходной массы, а интегрированное по видимому спектру пропускание возросло на 5%. Этот эксперимент также демонстрирует высокую чувствительность ТГ-диапазона к концентрации воды в биотканях, что, по-видимому, может служить одним из критериев распознавания патологии [1859]. Влияние дегидратации при вымораживании (лиофилизации) образцов ткани ряда органов крысы (почки, диафрагма, печень, прямая кишка, желудок) на ТГ-спектры в диапазоне 0,4–2,2 ТГц исследовалось в работе [1857]

9.7. Визуализация клеток и клеточных потоков

9.7.1. Визуализация кровотока. В исследованиях *in vivo* кожи хомяка [766, 1644] или крысы [1645] просветление позволяет наблюдать невооруженным глазом кровеносные микрососуды и их разветвленную сеть. Окно виртуальной прозрачности в коже может создаваться посредством нанесения капель глицерина на субдермальную сторону кожи при наблюдении со стороны дермы через специальное окно, вживленное под частично отделенный лоскут кожи [1644]. Внутридермальная инъекция глицерина [766, 1645] или 40%-й глюкозы [1645] также оказывается эффективной даже при наблюдении через эпидермальную поверхность кожи (см. рис. 9.25). В исследовании *in vitro* жировой ткани человека местное применение раствора пропиленгликоля (ПГ) (50–80% в воде) позволило увидеть кровеносные микрососуды, которые не были видны в ткани до ее просветления [1673].

Кроме улучшенной визуализации сети кровеносных сосудов иммерсионные агенты могут оказывать влияние на функционирование кровеносных микрососудов [766, 1439, 1644, 1645, 1486, 1487]. С одной стороны — это является побочным действием и его нужно избегать или учитывать при выборе иммерсионного агента, а с другой стороны — это открывает возможность управления функционированием ткани. В частности, было исследовано поведение микрососудов брыжейки крысы под местным действием глицерина и глюкозы [1645]. Местное применение 75%-го глицерина в течение начального периода 1–3 с приводило к замедлению кровотока во всех микрососудах (артериолах, венах и капиллярах). Через 20–25 с наступал стаз, сосуды расширялись в среднем на 30%, происходил внутрисосудистый гемолиз, через 1 мин после начала применения агента диаметры сосудов увеличивались еще больше, до 40%. К шестой минуте стаз поддерживался во всех сосудах, но диаметры сосудов слегка уменьшались. Такие изменения микроциркуляторного русла были строго локализованы в пределах области нанесения глицерина. Местное применение глюкозы также снижало скорость кровотока в микрососудах. Например, под действием 40%-й глюкозы в венуле диаметром 11 мкм с начальной скоростью кровотока 1075 мкм/с скорость понижалась до 510 мкм/с через 3 с после применения глюкозы и до 202 мкм/с через 5 с. При действии глицерина также происходило расширение сосудов и стаз кровотока во всех сосудах (артериолах, венах, капиллярах и шунтах) поддерживался в течение 20–30 с, но не обнаруживался внутрисосудистый гемолиз, и в просвете микрососудов можно было видеть лишь агрегаты эритроцитов. Степень расширения сосудов при применении глюкозы была выше, чем для глицерина, средний диаметр возрастал на 30% к 30-й секунде после применения глюкозы, а к 4-й минуте он увеличивался в среднем в 2,5 раза. Между 3-й и 5-й минутами в некоторых микрососудах снова появлялся кровоток, при этом его скорость была заметно ниже, чем в контрольных измерениях. Изменения кровотока также были локальными, но происходили на большей площади, чем при аппликации глицерина, примерно $1 \times 1 \text{ см}^2$; в других частях брыжейки не было никаких изменений в функционировании кровеносных микрососудов. Естественно, что уменьшение концентрации глюкозы и соответствующая потеря гиперосмотической способности агента

приводили к более мягкому действию глюкозы на циркуляцию крови, в частности, для 20 %-й глюкозы не наблюдалось стаза и после 3–4 мин ее применения кровотоков во всех сосудах не отличался заметно от первоначального.

Сосудистая сеть под твердой мозговой оболочкой (ТМО) также становилась видимой после обработки глицерином в эксперименте *in vivo* на кролике [1439, 1486, 1487]. Отражательная способность уменьшалась как функция времени воздействия глицерина, что подтверждало визуальные наблюдения. Оболочка возвращалась в почти естественное состояние через 1 мин после прекращения действия агента. Изображения, характеризующие изменения распределения скорости церебрального кровотока под действием глицерина, показаны на рис. 9.45. Глицерин наносился вокруг области иссечения ТМО, в результате диффузии через ТМО в ткани мозга глицерин влиял на скорость церебрального кровотока. Данные рис. 9.46 иллюстрируют пространственно-временные характеристики изменений церебрального кровотока. Под действием глицерина скорость кровотока в сосудах сначала уменьшалась, в то время как кровеносные сосуды, лежащие под ТМО, становились все лучше видимыми. После прекращения действия агента скорость кровотока возрастала почти до исходного состояния, а ТМО восстанавливала свои рассеивающие свойства.

Рисунок 9.46 для четырех различных сосудов (рис. 9.45) показывает временной ход изменений, выражаемых отношением измеренной скорости кровотока в условиях действия глицерина к скорости в контрольном состоянии. Сосуд 2 — артериола; сосуды 1, 3 и 4 — вены. Скорость кровотока в сосуде 2 (артериоле) начинала убывать после 20 с применения глицерина, тогда как в других сосудах (венах) он убывал сразу после применения глицерина. Скорость кровотока в сосуде 1 убывала медленнее, чем в других сосудах. После применения глицерина скорость кровотока во всех сосудах уменьшалась до 70 %–80 % от базового значения.

Примеры модификации сосудистой сети субдермальной стороны кожи хомька *in vivo* при наблюдении через специальное окно, вживленное под частично отделенный лоскут кожи, показаны на рис. 9.47 а (цветная вклейка). До аппликации глицерина наиболее крупная артериола А имеет диаметр (просвет) 97 ± 18 мкм, а наиболее крупная вена В — 188 ± 21 мкм. Диаметры ветвей а и в составляют 92 ± 18 мкм и 181 ± 21 мкм, соответственно. На рис. 9.47 б показаны кровеносные сосуды спустя 10 мин после наложения 100 %-го глицерина. На изображении теперь можно различить самые тонкие ветви артериол и венул. Очевидно, это происходит из-за просветления ткани (дермы), лежащей вокруг сосудов, а также может объясняться их расширением под действием агента. Ветвь вены в расширяется до 259 ± 19 мкм. Однако наиболее крупные сосуды и ветвь артериолы а не испытывают заметного расширения. Через двадцать минут главная ветвь вены В выглядит очень темной и испытывает окклюзию (рис. 9.47 в). Диаметры сосудов А и В составляют соответственно 97 ± 18 мкм и 189 ± 20 мкм, а диаметры ветвей а и в — 141 ± 17 мкм и 259 ± 21 мкм.

Оптическое просветление пронизанной сосудами биоткани может иметь некоторые важные биомедицинские приложения, связанные с исследованием структуры и функционирования кровеносной системы, включая соотношение диаметров артериол и венул, плотность капилляров, углы бифуркации сосудов и т. п. Эти параметры могут быть важны в изучении физиологии и патологических изменений в организме, а также для диагностики и лечения ряда сосудистых заболеваний, диабета и раковых опухолей. Кроме того, действие оптического просветления в сочетании с временным и местным прекращением кровотока в микрососудах в области обработки может существенно помочь при лазерной или ламповой фототермической сосудистой терапии [1644] за счет более глубокого проникновения света в ткань и снижения эффекта естественного охлаждения в зоне коагуляции за счет микроциркуляции

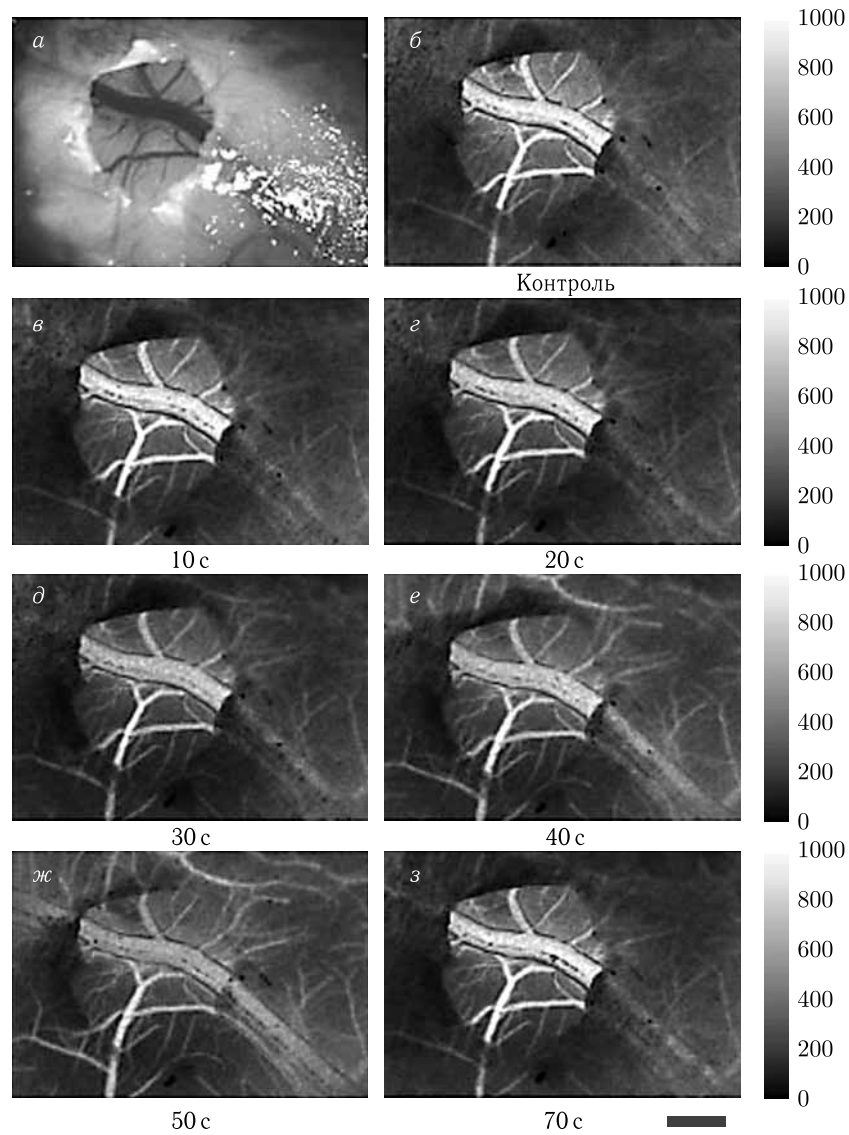


Рис. 9.45. Изображения *in vivo* мозгового кровотока кролика после эпидурального введения глицерина вокруг области иссечения твердой мозговой оболочки (ТМО): *а* — изображение исследуемой области в белом свете, видна иссеченная область, через которую хорошо видны сосуды на поверхности головного мозга; *б-з* — карты скорости кровотока (сигнала, пропорционального скорости кровотока) при действии глицерина; изображения соответствуют моментам времени, показанным на рис. 9.46; *б* — изображение скорости кровотока перед применением глицерина (контроль), видны четыре сосуда; *в* — действие глицерина в течение 10 с, видимых изменений скорости кровотока не наблюдается; *г* — 20 с, скорость кровотока начинает убывать; *д* — 30 с, кровеносные сосуды за ТМО видны яснее; *е* — 40 с, скорость кровотока уменьшилась, а прозрачность ТМО возросла; *ж* — 50 с, сквозь ТМО стало видно больше сосудов, а скорость кровотока уменьшилась значительно; *з* — 70 с, скорость кровотока увеличилась, а ТМО снова стала мутной. Длина масштабного отрезка 1 мм [1439]

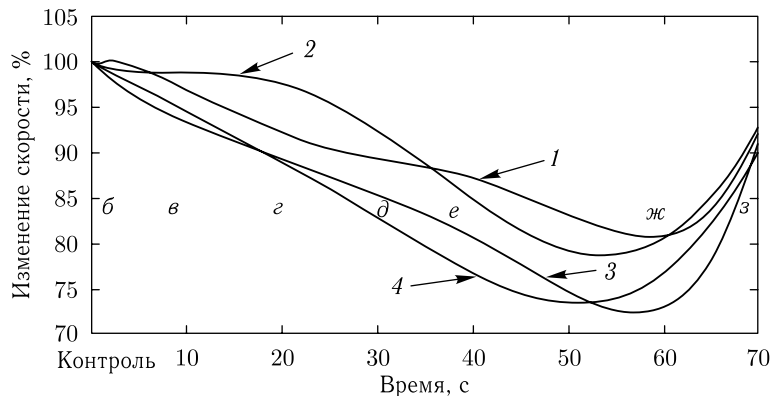


Рис. 9.46. Временной ход изменения относительной скорости кровотока в сосудах 1, 2, 3 и 4, показанных на рис. 9.45 б, до и после применения глицерина. В сосуде 2 (артериоле) скорость кровотока начала убывать после 20 с, в то время как в других сосудах (венулах) скорость кровотока убывала сразу после начала применения глицерина. Уменьшение скорости кровотока в этих сосудах составило от 20 % до 30 %; б–з обозначают моменты времени, соответствующие изображениям на рис. 9.45 б–з [1439]

крови, интенсивность которой уменьшается под действием многих ОПА. Все эти причины приводят к значительному интересу исследователей к проблеме взаимодействия ОПА с кровеносным микроциркуляторным руслом и лимфатической сосудистой системой [972, 973, 1439, 1643–1645, 1777–1781, 1784, 1860–1863].

Следует отметить исключительно важные достижения в оптическом просветлении костей черепа [1342, 1343, 1784, 1860], что открыло возможность для визуального наблюдения *in vivo* церебрального кровотока [1784] и количественной его оценки с использованием полнопольной спекл-визуализации [1784, 1860].

9.7.2. Оптическое просветление крови. Рассогласование показателей преломления между цитоплазмой эритроцитов и плазмой крови вызывает сильное рассеяние света кровью, что, в частности, не позволяет получать высококачественные изображения внутрисосудистых структур через слой цельной крови. Показатель преломления цитоплазмы эритроцита в основном определяется содержанием гемоглобина в клетке [48]. Определенную роль в рассогласовании показателей преломления эритроцита и плазмы крови может играть оксигенация гемоглобина [1362] и его гликирование (см. разд. 7.9) [767, 1057]. Рассеивающие свойства крови также зависят от объема и формы эритроцитов, которые определяются осмолярностью плазмы крови [48, 1699] и способностью к агрегации и дизагрегации [1331, 1647, 1700, 1701, 1864–1866].

Пригодность метода согласования показателей преломления в качестве способа преодоления ограниченного пропускания света кровью для получения четких ОКТ-изображений находящейся за слоем крови биоткани была продемонстрирована для циркулирующей, покоящейся или седиментирующей крови [1331, 1646, 1647, 1700, 1701]. Для повышения показателя преломления плазмы крови и его приближения к показателю преломления цитоплазмы эритроцитов с целью увеличения глубины зондирования ОКТ использовались глюкоза, низко- и высокомолекулярные декстраны, рентгеноконтрастные вещества, глицерин и некоторые другие биологически совместимые агенты. ОКТ и другие неинвазивные методы визуализации, такие как отражательная спектрофотометрия, поляризационно-чувствительная, флуоресцентная, многофотонная и КР-спектроскопия, которые уже продемонстрировали свои

исключительные возможности применения в биомедицинской диагностике [126–144], могут получить существенные дополнительные преимущества в ранней диагностике сосудистых заболеваний при оптическом просветлении крови.

Нормальная кровь человека является рассеивающей системой, состоящей примерно из 43 объемных процентов рассеивающих частиц (99 % эритроцитов, 1 % лейкоцитов и тромбоцитов) и 57 объемных процентов плазмы [48, 1311]. В нормальном физиологическом состоянии гематокрит (Hct), определяемый как объемная доля клеток в цельной крови, находится в интервале от 36,8 % до 49,2 % [48]. Распространение света в такой среде можно изучать в рамках модели рассеяния и поглощения света отдельными частицами с учетом межчастичной корреляции и полидисперсности.

Как уже отмечалось, осмолярность плазмы является важным фактором в изменениях рассеивающих свойств крови [48, 1009, 1331]. Влияние глюкозы, глицерина, тразографа и пропиленгликоля, являющихся гиперосмотическими агентами, приводит к значительному изменению осмолярности плазмы крови. Изменение осмолярности индуцирует вариации объема эритроцитов из-за водного обмена и, следовательно, оказывает воздействия на концентрацию гемоглобина внутри эритроцитов и их показатель преломления. Было показано, что раствор глюкозы с концентрацией менее 20 % приводил к усилению рассеяния света кровью из-за осмотической дегидратации эритроцитов [1009]. При более высоких концентрациях глюкозы, выше 40 %, наблюдалось значительное оптическое просветление за счет значительного роста показателя преломления плазмы крови, однако такие концентрации могут вызывать агрегацию эритроцитов [1331].

Метод ОКТ позволяет проводить измерения коэффициента оптического отражения или рассеяния назад $R(z)$ от эритроцитов в зависимости от аксиального расстояния, или глубины, z . Отражение зависит от оптических свойств крови, т. е. коэффициентов поглощения μ_a и рассеяния μ_s или коэффициента полного ослабления $\mu_t = \mu_a + \mu_s$. Связь между $R(z)$ и μ_t , однако, весьма сложна из-за сильного и анизотропного рассеяния в крови. Тем не менее, для оптических толщин (глубин) $\mu_s z < 4$ отраженная мощность может быть приближенно описана формулой (9.27). Величина $\alpha(z)$ связана с локальным значением показателя преломления и способностью компонентов крови к обратному рассеянию. Если величина $\alpha(z)$ поддерживается постоянной, для чего необходимо по крайней мере обеспечить ламинарность потока при измерениях в условиях движущейся крови, либо проведение измерений до начала седиментации в случае нециркулирующей крови, то μ_t можно получить теоретически из измерений на двух разных глубинах z_1 и z_2 (см. формулу (9.28)). Оптическое просветление (увеличение пропускания) ΔT посредством применения агента можно оценить с использованием соотношения (9.29), где R_a — коэффициент отражения от задней поверхности кюветы, в которой находится кровь с агентом, а R_s — то же самое для контрольного образца крови (цельная кровь с физиологическим раствором).

Для получения изображений отражателя через циркулирующую кровь *in vitro* использовалась ОКТ-система, работающая на длине волны 1300 нм [1646]. В качестве иммерсионных веществ брались декстран (групповой показатель преломления — 1,52) и рентгеноконтрастное вещество — контраст IV (групповой показатель преломления — 1,46). Система обеспечивала циркуляцию крови *in vitro* по прозрачному трубопроводу, воспроизводя коронарный кровоток. Кровь с Hct ~ 35 % прокачивалась через замкнутую систему трубок перфузионным насосом. Скорость потока составляла 200 мл/мин, что примерно равно пиковому значению скорости кровотока в коронарной артерии. Диаметр трубки составлял 6 мм, т. е. примерно равнялся диаметру нормальной коронарной артерии взрослого человека. Отражатель помещался в трубку, отображаемая часть отражателя располагалась примерно в 2 мм ниже внутренней

поверхности трубки. Когда кровь вводилась в систему и начинала циркулировать, осуществлялась ОКТ-визуализация отражателя. Полная интенсивность сигнала от рефлектора использовалась для оценки пропускания (см. соотношение (9.29)). Чем больше рассеяние света кровью, тем слабее сигнал от отражателя.

После получения линии отсчета для крови к ней добавлялись пробные вещества: декстран (0,25 г/мл в нормальном физиологическом растворе), контраст IV или нормальный физиологический раствор [1646]. Гематокрит и концентрация эритроцитов измерялись до и после экспериментов. Все вещества добавлялись в объеме 40 мл до полного объема образца крови в 260 мл. Для контрольного образца с физиологическим раствором был замечен рост интенсивности сигнала на $7 \pm 3\%$, что не является статистически значимым эффектом. Увеличение ΔT на $69 \pm 12\%$ было отмечено для декстрана, что статистически достоверно отличается от контрольного эксперимента с физиологическим раствором ($p < 0,005$). Для контраста IV был отмечен рост на $45 \pm 4\%$, что также статистически достоверно отличается от контрольного эксперимента ($p < 0,001$).

Путем ОКТ-визуализации в присутствии в системе физиологического раствора, крови (Hct = 35%) или крови, подвергнутой лизису (Hct < 1%), было прямо показано, что именно рассогласование показателей преломления внутриклеточного вещества эритроцитов и внеклеточной среды, а не поглощение света мембранами или гемоглобином является основным источником ослабления ближнего ИК-излучения кровью. В присутствии крови отражатель не обнаруживался. Однако после лизиса эритроцитов интенсивность сигнала возвращалась к значениям, которые незначительно отличались от значений, полученных для физиологического раствора. Тот факт, что клеточные мембраны не являются основным источником рассеяния, не удивителен, поскольку они слишком малы по сравнению с длиной волны, чтобы значительно рассеивать свет (см. рис. 6.2 и 6.3).

В случае применения декстрана эффект соответствовал концепции согласования показателей преломления. При использовании контраста IV было отмечено небольшое, но значимое уменьшение объема эритроцитов, но не их количества, которое регистрировалось по снижению гематокрита по сравнению с контрольным экспериментом для физиологического раствора. Таким образом, некоторое улучшение пропускания может происходить и из-за снижения объема клеток. Наблюдаемое отсутствие улучшения пропускания при добавлении физиологического раствора (40 мл) согласуется с данными работы [48], из которых следует, что для наблюдения заметного увеличения пропускания необходимо разбавить кровь до гематокрита ниже 10%.

Описаны также исследования характера рассеяния света седиментирующей кровью при ее иммерсии различными биологически совместимыми веществами (физиологический раствор, глюкоза, глицерин, пропиленгликоль, тразограф и декстраны разного молекулярного веса) [1331, 1647, 1700, 1701]. Для получения изображений отражателя через слой нециркулирующей свежей цельной крови применялись две ОКТ-системы, работающие на длинах волн 820 и 1310 нм. ОКТ-система на 820 нм обеспечивала аксиальное разрешение 12 мкм в свободном пространстве, что давало возможность визуализации с разрешением на уровне отдельных эритроцитов или их небольших агрегатов. Было показано, что для нециркулирующей крови важную роль в просветлении крови играет седиментация, а ОКТ позволяет осуществлять довольно точный мониторинг седиментации и агрегации.

В описываемых экспериментах венозная кровь забиралась у здоровых добровольцев и стабилизировалась препаратами цитрата натрия (9NC Coagulation Sodium Citrate 3,2%) или этилендиаминтетрауксусной кислоты (K2E EDTA K2). Образцы крови в основном приготавливались немедленно после взятия крови путем осторожного смешивания крови и агента (для агентов в жидком состоянии) или растворов агента

в физиологическом растворе (для агентов в твердом состоянии) путем медленного вращения вручную в течение 1 мин перед каждым ОКТ-измерением. Несколько образцов перед измерениями хранилось до 24 ч после взятия крови. Исследовались 4 группы образцов крови с различными значениями гематокрита.

Несколько разных плоских стеклянных или пластиковых кювет толщиной от 0,2 до 2 мм использовалось для размещения образцов крови. В некоторых случаях для усиления отражения от нижней поверхности кюветы использовался металлический отражатель. Кювета, содержащая образец крови, располагалась перпендикулярно пробному пучку на столике поступательного перемещения в пробном плече интерферометра. Амплитуда отраженного света получалась как функция глубины для проекции одной точки, выбранной на поверхности образца вдали от краев кюветы. Результатом является измерение коэффициента оптического отражения или рассеяния назад, $R(z)$, от эритроцитов в зависимости от аксиальной координаты, или глубины, z , описываемого формулой (9.27). Коэффициент полного ослабления μ_t и увеличение пропускания ΔT (оптическое просветление) за счет применения агента были вычислены по формулам (9.28) и (9.29) соответственно. Использовалось усреднение по нескольким десяткам результатов z -сканирования.

Коэффициент рассеяния μ_s и приведенный коэффициент рассеяния μ'_s крови зависят от рассогласования усредненных показателей преломления плазмы крови и цитоплазмы эритроцитов. Отношение $n_{RBC}/n_{bp} \equiv m$ определяет коэффициент рассеяния, n_{RBC} — средний показатель преломления цитоплазмы эритроцитов, а n_{bp} — средний показатель преломления плазмы крови. Для модели ансамбля эритроцитов как монодисперсной системы невзаимодействующих рассеивающих диэлектрических сфер радиуса a , освещаемой светом ближнего ИК с длиной волны λ , где $5 < 2\pi a/\lambda < 50$, фактором анизотропии рассеяния $g > 0,9$ и $1 < m < 1,1$; приведенный коэффициент рассеяния μ'_s описывается соотношением (7.27).

Плазма крови содержит до 91 % воды, 6,5–8 % (около 70 г/л) различных белков и около 2 % низкомолекулярных соединений. Из-за низкой концентрации и относительно низкого показателя преломления низкомолекулярных химических соединений средний показатель преломления плазмы крови (фона) можно оценить как взвешенное среднее показателей преломления воды (92%), n_w , и белков (8%), n_p :

$$n_{bp} = f_w n_w + (1 - f_w) n_p, \quad (9.30)$$

где f_w — объемная доля воды в плазме; $n_w = 1,329$ на 800 нм, а показатель преломления белков можно взять равным $n_p = 1,470$ [1360]. Поскольку приблизительно 92 % всей плазмы составляет вода, из соотношения (9.30) следует, что $n_{bp} = 1,340$. Приведенная ранее эмпирическая формула (7.33) может использоваться для оценки показателя преломления плазмы крови в диапазоне длин волн от 400 до 1000 нм. Показатель преломления цитоплазмы эритроцитов, определяемый связанным в клетке раствором гемоглобина, можно найти из соотношения (7.34). Как следует из формулы (7.27), можно ожидать уменьшения коэффициента рассеяния μ'_s примерно в 10 раз, когда показатель преломления плазмы крови меняется от $n_{bp} = 1,340$ до 1,388, а показатель преломления цитоплазмы эритроцитов сохраняется постоянным, $n_{RBC} = 1,412$ (для концентрации гемоглобина в цитоплазме 400 г/л) [48].

Для слегка разбавленной крови (Hct \sim 35 %) оптическое просветление было обнаружено только с декстраном, молекулярный вес которого $M = 500\,000$, при концентрации в образце крови 0,325 г/дл и с глицерином с объемной долей 13 %. Значения ΔT , характеризующие оптическое просветление, составляли от 20,2 до 78,4 % для декстрана и от 13,7 до 95 % для глицерина в зависимости от времени хранения образца крови (табл. 9.3). Минимальное и максимальное значения были

обнаружены для образцов крови, которые хранились короткое (1–3 ч) и длительное (24 ч) время соответственно. При длительности хранения крови 4–6 ч $\Delta T = 46,5\%$ для декстрана и $74,5\%$ для глицерина. Очевидно, что при высокой концентрации эритроцитов в образце взаимодействие использованных агентов с кровью существенно зависит от физико-химических параметров крови, которые могут изменяться при продолжительном хранении (гемолиз). Поэтому все остальные измерения делались, по возможности, сразу после взятия крови.

Для крови, разбавленной физиологическим раствором до $56,5\%$, образцы крови с тразографом-60, пропиленгликолем и глицерином имели меньший коэффициент полного ослабления, чем в контрольном измерении. Оптическое просветление ΔT составляло от $45,3\%$ до $117,1\%$ при измерении немедленно после смешивания, когда седиментация не критична для оптических свойств слоя крови (табл. 9.3). Минимальное ослабление (примерно половина от контрольного) и максимальное усиление пропускания ($\Delta T = 117,1\%$) были обнаружены при применении глицерина. Пропиленгликоль также оказался хорошим усилителем прозрачности крови ($\Delta T = 77,2\%$).

Аналогичное влияние на прозрачность и уменьшение рассеяния было продемонстрировано путем применения декстрана различного молекулярного веса. В табл. 9.3 показано, что все три использованных декстрана А, В и С уменьшали величину ослабления (рассеяния) в крови по сравнению с физиологическим раствором. Оптическое просветление ΔT лежало в интервале от $52,1\%$ до $150,5\%$. Оказалось, что декстран с наибольшим молекулярным весом оказывает намного более сильное действие на увеличение пропускания сразу после смешивания. Образец крови, смешанной с агентом с большим показателем преломления, например декстраном С, давал большее отражение от металлической поверхности, чем агенты с меньшим показателем преломления, такие как физиологический раствор (контроль) и декстран А. Результаты хорошо поддерживают гипотезу о том, что эффект согласования показателей преломления важен для просветления крови, разбавленной на 50% .

Из табл. 9.3 можно увидеть, что декстраны С и В при концентрации $2,43$ г/дл в 35% -й разбавленной крови являются эффективными агентами для уменьшения ослабления света кровью по сравнению с контрольным физиологическим раствором, обеспечивающими уменьшение коэффициента полного ослабления от $37,1$ см⁻¹ для контрольного физиологического раствора до $31,2$ см⁻¹ и $29,7$ см⁻¹ соответственно. Оптическое просветление ΔT для декстранов С и В было примерно 90% и 100% . Интересно, что декстран С, обеспечивающий больший показатель преломления, имел меньший эффект, чем декстран В той же концентрации. Более того, увеличение концентрации (преломляющей силы) не всегда позволяет достичь большего оптического просветления: декстран С с концентрацией $0,5$ г/дл имел больший эффект, чем с концентрацией 5 г/дл в образцах с 20% крови и 80% физиологического раствора.

Изменения рассеивающих свойств при добавлении декстрана можно прежде всего объяснить с помощью гипотезы согласования показателей преломления. Видно, что рассеяние можно ослабить, когда показатель преломления плазмы увеличивается. Показатель преломления раствора декстрана в физиологическом растворе увеличивался с концентрацией во всех группах декстранов различного молекулярного веса. Измеренные показатели преломления образцов крови с декстранами находились в хорошем согласии с теоретическими значениями, рассчитанными по формуле $n = c_b n_b + (1 - c_b) n_{\text{saline}}$, где c_b — объемная доля (20%) цельной крови в разбавленном образце, а n_{saline} — показатель преломления физиологического раствора с декстраном или без них. Как ожидается, показатель преломления крови с декстраном растет по мере того, как концентрация добавляемого декстрана увеличивается, благодаря росту показателя преломления базового вещества образца.

Таблица 9.3

Коэффициент полного ослабления и увеличение пропускания ΔT (%) образцов крови, разбавленных физиологическим раствором и добавленными агентами; рН для всех растворов составлял примерно 7,5; декстран А ($M = 10\,500$); декстран В ($M = 65\,500$), и декстран С ($M = 473\,000$)

Агент	Концентрация, об. % или г/дл	Нст, %	μ_t , см ⁻¹	ΔT , %	Примечания
Физиологический раствор (ФР)	13 % (контроль)	35	61 (3)	—	От 1 до 24 часов после взятия крови; декстран-сульфат, $M \approx 500,000$ [1700]
Глицерин	13 %	35	51 (5)	13,7–95,0	
Декстран	0,325 г/дл	35	55 (5)	20,2–78,4	
ФР	35 % (контроль)	26	37,1 (1,3)	—	Мужчина-доброволец 24 года [1647]
Декстран А	2,43 г/дл	26	38,2 (2,4)	11,9 (8,3)	
Декстран В	2,43 г/дл	26	29,7 (3,6)	100,1 (20,2)	
Декстран С	2,43 г/дл	26	31,2 (1,8)	86,7 (29,1)	
ФР	56,5 % (контроль)	17,4	42	—	Женщина-доброволец 35 лет [1331, 1700]
Тразограф-60	6,5 % + 50 % ФР	17,4	26	45,3	
Пропиленгликоль	6,5 % + 50 % ФР	17,4	26	77,2	
Глицерин	6,5 % + 50 % ФР	17,4	20	117,1	
Глюкоза	1,62 г/дл	17,4	57	45,3	
Декстран А	1,62 г/дл	17,4	43	47	
Декстран В	1,62 г/дл	17,4	54	44,6	
Декстран С	1,62 г/дл	17,4	58	20,5	
ФР	56,5 % (контроль)	17,4	36,5	—	Мужчина-доброволец, 35 лет [1331]
Декстран А	1,62 г/дл	17,4	29,5	52,1	
Декстран В	1,62 г/дл	17,4	30,0	110,6	
Декстран С	1,62 г/дл	17,4	32,5	150,5	
ФР	56,5 % (контроль)	17,4	25,6 (1,6)	—	Мужчина-доброволец, 23 года [1647]
Декстран А	1,62 г/дл	17,4	22,5 (2,4)	20,5 (4,2)	
Декстран В	1,62 г/дл	17,4	19,0 (3,8)	44,5 (3,4)	
Декстран С	1,62 г/дл	17,4	14,3 (4,3)	47,0 (9,7)	

Таблица 9.3 (окончание)

Агент	Концентрация, об. % или г/дл	Ист, %	μ , см ⁻¹	ΔT , %	Примечания
ФР	80 % (контроль)	8	13,5	—	Мужчина-доброволец, 36 лет; гемоглобин: начальный — 175 г/л, разбавленный — 37 г/л; вначале процесса седиментации крови [1647]
Декстран А	1 г/дл	8	17,5 (0,9)	11,4 (6,2)	
Декстран А	5 г/дл	8	14,3 (1,2)	11,3 (3,3)	
Декстран А	10 г/дл	8	12,2 (1,8)	49,4 (12,1)	
Декстран В	1 г/дл	8	14,2 (1,5)	21,1 (5,4)	
Декстран В	5 г/дл	8	13,0 (2,8)	49,0 (26,2)	
Декстран В	10 г/дл	8	11,5 (1,3)	76,8 (21,2)	
Декстран С	0,5 г/дл	8	10,0 (1,6)	106,3 (39)	
Декстран С	5 г/дл	8	13,3 (0,7)	67,0 (5,8)	
Декстран А	1 г/дл	8	—	90	Мужчина-доброволец, 36 лет; гемоглобин: начальный — 175 г/л, разбавленный — 37 г/л; по сравнению с контрольным значением для ФР при пропускании света после 10 мин седиментации крови ($\Delta T_{\text{декст}}/\Delta T_{\text{ФР}}$) % [1647]
Декстран А	5 г/дл	8	—	61	
Декстран А	10 г/дл	8	—	32	
Декстран В	1 г/дл	8	—	144	
Декстран В	5 г/дл	8	—	126	
Декстран В	10 г/дл	8	—	18	
Декстран С	0,5 г/дл	8	—	285	
Декстран С	2 г/дл	8	—	133	
Декстран С	5 г/дл	8	—	15	

Нужно заметить, что коэффициент полного ослабления при добавлении глюкозы и декстранов не менялся значительно по сравнению с контролем, тем не менее, было обнаружено увеличение пропускания порядка 45 % для глюкозы и 52–150 % для декстранов. Одновременное увеличение ослабления и пропускания декстранами В и С по сравнению с А показывает не только важность согласования показателей преломления для оптического просветления слоя крови, но существенность агрегации эритроцитов, определяющей индикатрису рассеяния. Молекулы декстрана являются нейтральными полимерами. Декстраны с высоким молекулярным весом используются для искусственной стимуляции агрегации путем образования мостиков между поверхностями соседних клеток после адсорбции на них агента. Декстраны с низким молекулярным весом предотвращают нормальную агрегацию крови. Из микроскопии мазков крови можно видеть, что в крови, разбавленной декстраном С, появляются «монетные столбики» (неустойчивые агрегаты эритроцитов), а при смешивании крови с декстраном А, имеющим малый молекулярный вес, агрегаты не образуются [1683, 1684, 1700, 1701]. Меньшая скорость седиментации крови с декстранами В и С и большая — с декстраном А по сравнению с цельной кровью или кровью, разбавленной физиологическим раствором, также отражает агрегационную способность различных декстранов [1331]. Высокомолекулярный декстран С сильно изменяет мор-

фологию и размеры рассеивающих частиц (эритроцитов и их агрегатов). Нормальные эритроциты — двояковогнутые диски диаметром 8 мкм и толщиной 2 мкм, когда они находятся в изотоническом растворе. Известно, что размеры, форма и ориентация эритроцитов вносят вклад в характеристики рассеяния назад [1864–1866]. Агрегация приводит к уменьшению рассеивающих поверхностей, что в свою очередь вызывает снижение сигнала обратного рассеяния [1865]. Можно заключить, что большее усиление пропускания декстраном С сильно зависит от изменения рассеяния (согласования показателей преломления), сопровождающегося агрегацией эритроцитов.

Некоторое расхождение между μ_t и ΔT можно также объяснить тем фактом, что для их оценки использовались различные алгоритмы: μ_t определялся как единственный параметр рассеяния, а ΔT определялось как экспериментальная величина, которая отвечает за многократное рассеяние и поэтому более чувствительна к ослаблению рассеяния. Показано, что иммерсия ведет в первую очередь к уменьшению числа актов рассеяния и лишь потом к появлению баллистических фотонов (см. рис. 9.4–9.6) [791]. Например, для рассеивающей системы, описанной в работе [791], у которой в нормальном несогласованном состоянии с $n_s = 1,47$ для рассеивающих частиц и $n_0 = 1,35$ для базового материала полное пропускание на 800 нм составляет 10 %, после согласования показателей ($n_0 = 1,41$) полное пропускание возрастает до 45 %, но число актов рассеяния (порядка 10–15) остается еще высоким (см. рис. 9.5 в).

Нужно заметить, что для свежих эритроцитарных концентратов, движущихся с физиологической скоростью, при насыщении кислородом порядка 98 % изменение Hct от 0,4 до 0,2 вызывает уменьшение транспортного коэффициента рассеяния μ'_s , измеренного с помощью интегрирующей сферы на длине волны 633 нм, от 16,8 до 8,8 см⁻¹ [48]. Соответствующие изменения коэффициента рассеяния μ_s и фактора анизотропии g составляют: μ_s от 850 до 800 см⁻¹ и g от 0,980 до 0,989. Более чем в 10 раз меньшее значение коэффициента полного ослабления, измеренное методом ОКТ (см. табл. 9.3), по сравнению с величиной коэффициента рассеяния, измеренной методом интегрирующей сферы, для образцов крови с примерно одинаковым гематокритом, также свидетельствует об ограниченной способности алгоритма, основанного на однократном рассеянии, дать правильное значение полного коэффициента ослабления. Другая причина сильного расхождения между данными по μ_t и ΔT может быть вызвана пространственными вариациями коэффициента отражения образца крови $\alpha(z)$, связанными с изменениями локального показателя преломления отражения назад в образце крови.

Седimentация увеличивает прозрачность слоя крови, поскольку по мере осаждения эритроцитов уменьшается объемное отражение. Как ожидается, неразбавленный образец крови дает наименьшее отражение от металлической пластинки из-за максимальной концентрации рассеивающих частиц (эритроцитов) и более низкой скорости седimentации [1331, 1700, 1701]. Для крови, слегка разбавленной физиологическим раствором с добавлением низкомолекулярного декстрана А, отражение от металлической пластинки в глубине образца крови растет, так как и разбавление физиологическим раствором, и добавление декстрана вызывает более интенсивную седimentацию. Декстран В, имеющий средний молекулярный вес, дает увеличение отраженного сигнала по сравнению с контрольным уровнем (кровь, разбавленная физиологическим раствором) только в течение первых 4 мин. Этот результат отражает конкуренцию между двумя процессами: согласованием показателей преломления, которое важно в начале процесса, особенно для декстрана, и седimentации, которая более важна для контрольного образца после того, как прошло некоторое время. Высокомолекулярный декстран С дает рост отражения от металлической пластинки

по сравнению с контрольным образцом только на короткое время в начале седиментации, когда доминирует эффект согласования показателей преломления. Такое поведение означает, что по истечении некоторого времени седиментация эритроцитов может быть более важной для увеличения отражения, чем эффект согласования показателей преломления, который обеспечивается декстранами с высоким молекулярным весом. Этот результат ясно виден из профилей отражения по глубине, представленных на рис. 9.48, на которых видны три главных пика, меняющихся со временем. Первый пик не зависит от времени и возникает из-за отражения на границе раздела между передней поверхностью кюветы и поверхностью крови. Второй пик, широкий и имеющий структуру, обусловлен отражением на границе эритроциты–плазма (внутри этого широкого пика можно видеть агрегаты). Третий пик обусловлен отражением от металлического отражателя на задней стенке кюветы. Качественно разность первого и третьего пиков по высоте показывает изменения пропускания слоев крови, а второй пик связан с коэффициентом ослабления данного слоя.

Для выяснения роли агрегации эритроцитов в оптическом просветлении и учета зависимости агрегации от времени образцу крови давали осесть после добавления декстранов перед проведением измерений. В табл. 9.3 показано влияние декстранов по сравнению с контрольным образцом (физиологический раствор) на пропускание света для образца с 20 % крови и 80 % физиологического раствора через 10 мин седиментации. Можно видеть, что влияние декстрана на пропускание света отличается от того, которое было видно сразу после смешивания декстрана с кровью (соответствующие верхние строки). При более низкой концентрации (0,5 г/дл) декстран С по-прежнему оказывал наиболее сильное действие на снижение рассеяния света в крови (в 2,8 раза по сравнению с контрольным образцом). Однако просветляющее действие наивысших концентраций декстрана (5 г/дл) и декстрана В (10 г/дл) было намного ниже, чем у физиологического раствора в контрольном образце, что удивительно. Вначале они оба имели очень высокую способность к оптическому просветлению со значениями ΔT , равными 67,5 % и 76,8 % соответственно. Кроме того, эффект убывал с ростом содержания декстрана в крови во всех трех группах, вопреки ожиданиям, основанным на гипотезе согласования показателей преломления.

Уменьшение агрегационной способности декстрана с концентрацией хорошо объясняет то, что пропускание света в меньшей степени убывает с ростом концентрации декстрана обоих типов (среднего и большого молекулярного веса). В некотором диапазоне концентраций декстраны С и В индуцировали агрегацию эритроцитов. Известно, что декстраны оказывают двухфазное действие на агрегацию эритроцитов: они индуцируют агрегацию при низких концентрациях и дизагрегацию при высоких [1867]. Например, с декстраном В максимальный размер агрегатов получается примерно при 3 %-й концентрации, выше которой размер падает. В ОКТ-измерениях [1647] концентрации 2 г/дл декстрана С и 5 г/дл декстрана В в смеси 20 % крови и 80 % физиологического раствора оказались критическими для влияния на агрегацию эритроцитов. Их агрегационная способность стала меньше, чем при 0,5 г/дл декстрана С и 1 г/дл декстрана В. Когда концентрация возрастала до 5 г/дл для декстрана С и 10 г/дл для декстрана В, они стимулировали дизагрегацию. Вот почему клетки были намного меньше упакованы, чем в контрольном образце, что объясняет пониженное пропускание света. Хотя согласование показателей преломления предполагает повышение пропускания, видно, что эффекты агрегации и дизагрегации в этом случае преобладают.

Поведение эритроцитов в потоке зависит от процессов агрегации и дизагрегации, ориентации и деформации. Для нормальной крови «монетные столбики» (неустойчивые агрегаты эритроцитов) легко распадаются на отдельные клетки с увеличением кровотока (напряжения сдвига в потоке). Однако в некоторых патологических случа-

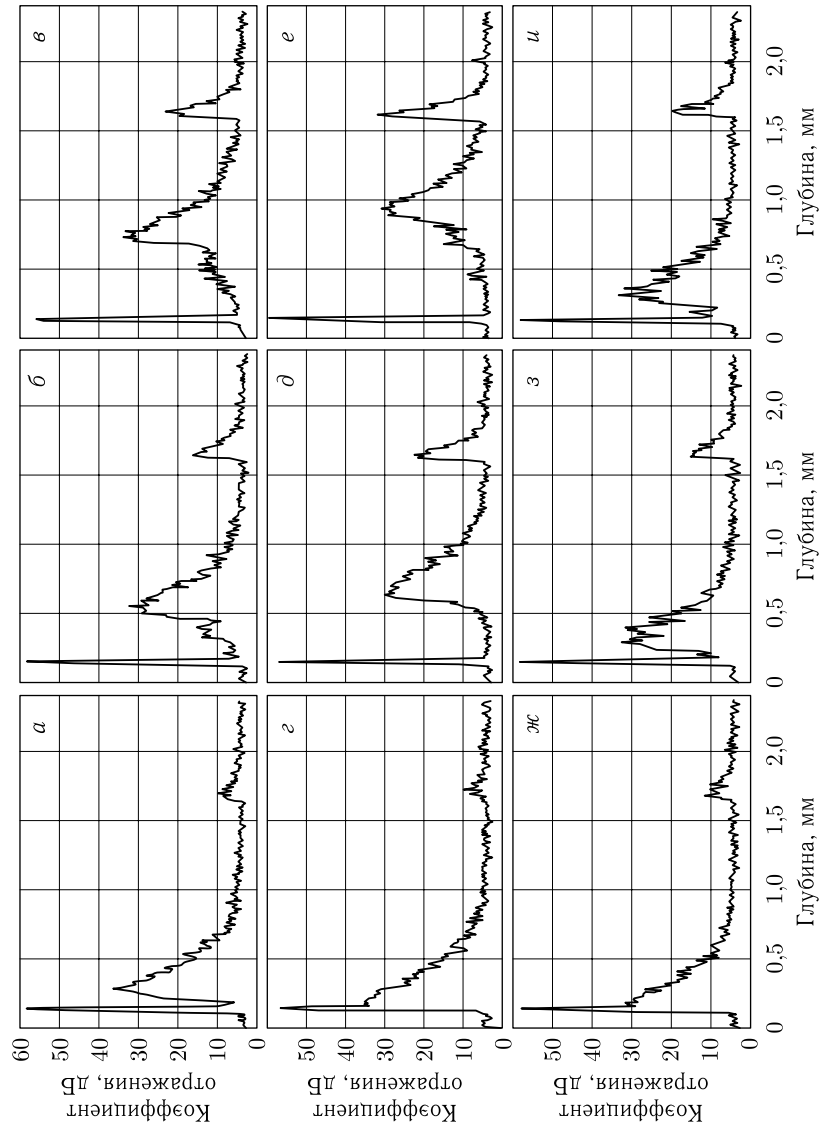


Рис. 9.48. ОКТ-сигналы отражения по глубине, измеренные для слегка разбавленной цельной крови (13 % объемная фракция физиологического раствора, гематокрит $\sim 35\%$, концентрация декстрана в образце крови 3,25 г/дл): а, г, ж — в начале процесса седиментации; б, д, з — на 5 мин; а, в, е, и — на 10 мин при добавлении: а-в — только физиологического раствора, г-е — декстрана А и ж-и — декстрана С. Первый пик индуцирован отражением на границе стекло-кровь, второй широкий пик, имеющий структуру, обусловлен отражением на границе эритроциты-плазма, а третий пик — отражением от металлического отражателя [1331]

ях капиллярное кровообращение серьезно нарушается из-за формирования уже трудно распадающихся агрегатов вида «монетных столбиков». Повышенная способность эритроцитов к агрегации наблюдалась в различных патологических состояниях, таких как диабет и инфаркт миокарда, или после травмы [1868]. Свойства агрегации и дизагрегации крови человека можно использовать для характеристики гемореологического статуса больного при различных заболеваниях [1866]. В этой связи методология управления оптическими параметрами крови посредством оптического просветления с использованием молекул со специфическим действием на эритроциты и плазму может быть полезной при мониторинге параметров крови в потоке.

Очевидно, что согласование показателей преломления не является единственным фактором, влияющим на оптическое пропускание в этих экспериментах. Степень агрегации, конечно, оказывает влияние, но и другие факторы, такие как гематокрит, способ упаковки эритроцитов, форма агрегатов, разброс их размеров и флуктуации всех этих параметров во времени и пространстве — все может давать свой вклад.

Нужно заметить, что осмолярность плазмы крови также является важным фактором в изменении рассеивающих свойств крови и, следовательно, в управлении просветлением и улучшении контраста ОКТ-изображений, получаемых в толще слоя крови или за ним. В обсуждаемых экспериментах осмолярность плазмы была различной для каждого добавляемого агента. Вариации осмолярности плазмы приводят к изменениям формы эритроцитов: сжатию (акантоциты), когда плазма гиперосмотическая, и набуханию (сфероциты), когда она гипоосмотическая. Для образцов разбавленной крови ($Hct = 7,5\%$) коэффициент рассеяния μ_s слегка убывает ($\sim 10\%$) с ростом осмолярности в интервале от 225 до 450 мосмоль/л; фактор анизотропии снижается с 0,995 до 0,991, и, соответственно, приведенный (транспортный) коэффициент рассеяния μ'_s линейно растет вплоть до 70% с ростом осмолярности [48]. Такое сильное влияние на рассеивающие свойства разбавленной крови вызвано не только изменениями формы клеток, но и изменениями показателя преломления раствора гемоглобина в клетке можно вычислить по формуле (7.34). Предполагая средний объем эритроцита равным 90 мкм^3 , а концентрацию внутриклеточного гемоглобина — 350 г/л для изотонических условий, можно рассчитать значения показателей преломления и эквивалентных диаметров сфер (см. табл. 9.4). Эта таблица ясно показывает, что осмолярность разбавленной крови может существенно влиять на ее рассеивающие свойства. Согласование показателей преломления легче достигается в условиях низкой осмолярности, однако для ОКТ-визуализации эритроцитов и их агрегатов предпочтительны гипертонические условия.

Из вышеописанного анализа экспериментальных данных следует, что для теоретического описания распространения света в иммерсированной крови нужно рассмат-

Таблица 9.4

Параметры эритроцитов в зависимости от осмолярности раствора крови [48]

Осмолярность, мосмоль/л	Hct, %	Объем эритроцита, мкм^3	Содержание гемоглобина в эритроците, г/л	Показатель преломления (589 нм)	Эквивалентный диаметр сферы, мкм
250 (гипотонический)	8,1	96,7	325	1,397	5,70
300 (изотонический)	7,5	90,0	350	1,402	5,56
400 (гипертонический)	6,6	78,6	400	1,412	5,32

ривать ее как оптически неоднородную среду с многократным рассеянием, определяемым рассеивающими и поглощающими свойствами отдельных частиц (эритроцитов), концентрационными эффектами и полидисперсностью клеточной суспензии. Размер и комплексный показатель преломления ($n' + in''$) эритроцитов и компонентов плазмы крови определяют коэффициенты поглощения μ_a и рассеяния μ_s , а также фактор анизотропии рассеяния g . Размер, форма и оптические параметры клеток крови, а также оптические свойства суспензии крови представлены в разд. 7.10 и табл. 7.2, 7.3 и 9.4. Средний объем эритроцита в изотонической среде равен 94 ± 14 мкм³, а распределение объемов занимает интервал от 30 до 200 мкм³ (см. работы [48, 1311, 1325, 1869, 1870]). Концентрация гемоглобина в крови, подвергнутой гемолизу, находится между 134 и 173 г/л. Каждый эритроцит содержит примерно 29 пг гемоглобина. Концентрация гемоглобина внутри эритроцита лежит в интервале от 300 до 360 г/л. Действительная часть показателя преломления эритроцита очень близка к 1,4 в диапазоне длин волн от 400 до 1200 нм [275, 1325, 1391, 1869].

Фазовая функция и сечение рассеяния для отдельного эритроцита зависят от его ориентации [225]. Хотя во многом характеристики рассеяния света большим числом случайно распределенных несферических частиц очень близки к характеристикам рассеяния системой случайно распределенных сферических частиц эквивалентного объема [48, 1871]. Поэтому расчеты можно проводить на модели однородных сфер с объемом, равным объему реальных эритроцитов. Такая модель обеспечивает большую простоту вычислений, чем строгая теория, учитывающая несферичность частиц [211], и позволяет простейшим образом учесть полидисперсность частиц, в частности, на основе данных, представленных в работе [1325] (см. рис. 9.49). Присутствие крупных частиц в распределении можно связать с малыми агрегатами эритроцитов.

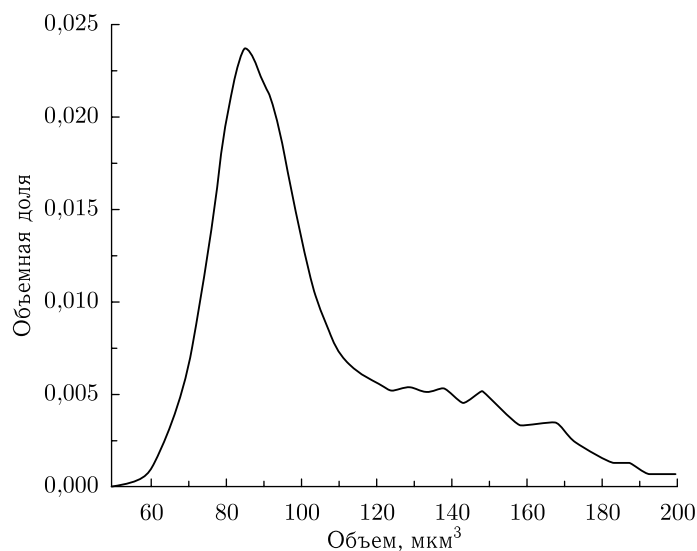


Рис. 9.49. Функция распределения сферических частиц, моделирующих эритроциты в крови [1325]. Объемная доля эритроцитов в крови (гематокрит) равна 45%, что соответствует венозной крови взрослого мужчины

Очевидно, что концентрация гемоглобина C_{Hb} в эритроците коррелирует с его объемом V_{RBC} . В соответствии с данными работы [1869] такая зависимость определяется как

$$C_{\text{Hb}} = 0,72313 - 0,00451V_{\text{RBC}}, \quad (9.31)$$

где C_{Hb} — концентрация гемоглобина в г/мл, а V_{RBC} — объем эритроцита в $\mu\text{м}^3$.

Спектральная зависимость действительной части показателя преломления эритроцита представлена на рис. 7.12 [225, 1325], а спектральную зависимость для мнимой части можно рассчитать по данным, представленным на рис. 7.11. Обе части показателя преломления пропорциональны концентрации гемоглобина в эритроците; действительная часть определяется формулой (7.34) с $\beta_{\text{Hb}} = 0,001942$ дл/г на длине волны 589 нм [48] и $\beta_{\text{Hb}} = 0,00284$ дл/г на длине волны 640 нм [225], а мнимая часть — выражением

$$n'' = \alpha_{\text{Hb}}C_{\text{Hb}}, \quad (9.32)$$

где α_{Hb} — спектрально-зависимый коэффициент, равный $1,477 \cdot 10^{-6}$ дл/г на 640 нм [225].

Так как концентрация солей, сахаров и других органических и неорганических компонентов в цитоплазме эритроцита пренебрежимо мала по сравнению с содержанием гемоглобина, можно считать его растворенным в воде (см. формулу (7.34)), поэтому спектральная зависимость показателя преломления среды, в которой растворен гемоглобин, определяется водой, $n_w(\lambda)$. Для более точного описания показателя преломления этой среды $n_0(\lambda)$, когда учитываются органические компоненты, вместо $n_w(\lambda)$ можно использовать $n_0(\lambda) = n_w(\lambda) + 0,007$ [1010].

Спектральную зависимость действительной части показателя преломления плазмы крови можно описать эмпирической формулой (7.33). Так как плазма крови состоит на 91 % из воды и содержит лишь 6,5–8 % (около 70 г/л) белков (гемоглобина, альбумина и глобулина) и около 2 % низкомолекулярных соединений, мнимой частью ее показателя преломления можно пренебречь и не учитывать ее в вычислениях.

Для дальнейших расчетов коэффициентов рассеяния и поглощения и фактора анизотропии рассеяния используется теория Ми, справедливая для однородной сферической частицы. Соответствующие выражения для сечений рассеяния и поглощения и фактора анизотропии даются формулами (3.53), (3.54) и (3.55). Для полидисперсной системы плотноупакованных частиц, каковой является цельная кровь, коэффициенты поглощения и рассеяния, а также фактор анизотропии рассеяния определяются как (см. формулы (3.24) и (3.27)) [222]

$$\mu_a = \sum_{i=1}^{N_{\text{RBC}}} N_i \sigma_{a_i}, \quad (9.33)$$

$$\mu_s = F(\text{Hct}) \sum_{i=1}^{N_{\text{RBC}}} N_i \sigma_{s_i}, \quad (9.34)$$

$$g = \frac{\sum_{i=1}^{N_{\text{RBC}}} \mu_{s_i} g_i}{\sum_{i=1}^{N_{\text{RBC}}} \mu_{s_i}}, \quad (9.35)$$

где $F(\text{Hct})$ — функция упаковки эритроцитов (см. соотношения (3.21), (3.22) и (3.23)) [275, 762, 763], учитывающая эффекты межчастичной корреляции; Hct — гематокрит; N_{RBC} — количество диаметров эритроцитов (объемных долей);

$N_i = f_{RBCi}/V_{RBCi}$ — число эритроцитов в единичном объеме крови; f_{RBCi} — объемная доля эритроцитов с объемом $V_{RBCi} = (4/3)\pi a_i^3$ (см. рис. 9.49), где a_i — радиус отдельной сферической частицы эквивалентного объема.

При применении глюкозы как иммерсионного агента нужно учитывать спектральную зависимость показателя преломления плазмы крови, измененную добавлением раствора глюкозы в воде (см. соотношения (7.39) и (6.5)):

$$n_{bp+gl}(\lambda) = n_{bp}(\lambda) + 0,1515 \cdot C_{gl}, \quad (9.36)$$

где $n_{bp}(\lambda)$ — показатель преломления плазмы крови, определяемый из соотношения (7.33), C_{gl} — концентрация глюкозы в г/мл. Поскольку глюкоза не имеет сильных полос поглощения в спектральном диапазоне от 400 до 1000 нм, ее поглощением можно пренебречь. Можно также предположить, что молекулы глюкозы не связываются с белками в плазме крови и гемоглобином в эритроцитах в течение ограниченного времени (максимум несколько минут) их взаимодействия.

Как уже обсуждалось, эритроциты очень чувствительны к изменениям осмолярности плазмы крови (см. табл. 9.4). При ее росте за счет дегидратации клетки объем эритроцита уменьшается, концентрация гемоглобина в клетке растет, а с ней растет и показатель преломления. Введение глюкозы в кровь вызывает линейный рост осмолярности плазмы с увеличением концентрации глюкозы вплоть до значения 6000 мосмоль/л, соответствующего концентрации глюкозы в плазме крови 1,0 г/мл. Реально такие большие концентрации глюкозы можно применять на больных лишь локально, в окрестности участка стенки сосуда, исследуемого спектроскопически или подлежащего оптической визуализации. С использованием данных работы [48] было предложено следующее эмпирическое соотношение для описания связи объема эритроцита с осмотической концентрацией [1009]:

$$V_{RBC}(osm) = V_{RBC}(300) \left(0,463 + 1,19 \exp \left\{ -\frac{osm}{376,2} \right\} \right), \quad (9.37)$$

где $V_{RBC}(osm)$ — объем эритроцита в $\mu\text{м}^3$ при данной осмотической концентрации, выраженной в мосмоль/л, а $V_{RBC}(300)$ — объем эритроцита при изотонической осмотической концентрации $osm = 300$ мосмоль/л. При введении глюкозы локальный Hct убывает. Если до введения глюкозы Hct был 45% при $osm = 300$ мосмоль/л, то при $C_{gl} = 0,05$ г/мл, $osm = 580$ мосмоль/л и Hct = 32%; при $C_{gl} = 0,1$ г/мл, $osm = 850$ мосмоль/л и Hct = 26%; а при $C_{gl} = 0,2$ г/мл, $osm = 1400$ мосмоль/л и Hct = 22%. При дальнейшем увеличении концентрации глюкозы (0,3–1,0 г/мл) Hct $\approx 21\%$ остается постоянным, несмотря на линейный рост осмолярности плазмы крови (2000–6000 мосмоль/л).

Результаты моделирования возможности управления рассеивающими свойствами цельной крови при иммерсии (местное внутрисосудистое введение) раствором глюкозы различных концентраций с учетом функции упаковки эритроцитов, взятой в виде $F(Hct) = 1 - Hct$ (см. соотношение (3.21)), полидисперсности (150 объемных долей в распределении по объемам (размерам), рис. 9.49), влияния осмотической концентрации и гематокрита представлены на рис. 9.50. Были рассчитаны коэффициент рассеяния и фактор анизотропии рассеяния. Поведение коэффициента рассеяния в зависимости от концентрации и длины волны (рис. 9.50 а) определяется: 1) изменением осмолярности плазмы крови (рост рассеяния на всех длинах волн вдали от полосы Соре из-за уплотнения эритроцитов и увеличения их показателя преломления при низких концентрациях глюкозы, см. табл. 9.4); 2) снижением гематокрита крови (играет некоторую роль в уменьшении рассеяния при концентрациях глюкозы менее 0,3 г/мл); 3) согласованием показателей преломления, это главный эффект (существенное уменьшение рассеяния для концентраций глюкозы от 0,5 до 0,7 г/мл

в зависимости от длины волны), это и 4) дисперсией вблизи полос поглощения гемоглобина (в пределах сильной полосы Сорс на 415 нм она не позволяет получить заметного сокращения рассеяния и слегка меняет положение провала и глубину ослабления рассеяния для других более слабых полос поглощения гемоглобина, 542 и 575 нм).

Максимальное ослабление рассеяния соответствует 900 нм, где влияние полос дисперсии гемоглобина минимально, однако в этом случае требуется наибольшая концентрация глюкозы — 0,7 г/мл. Рост коэффициента рассеяния при более высоких концентрациях глюкозы обусловлен рассогласованием показателей преломления, когда показатель преломления эритроцитов становится меньше, чем показатель плазмы крови, измененный добавлением глюкозы. Те же факторы определяют поведение параметра анизотропии рассеяния (рис. 9.50 б): сжатие эритроцитов вызывает уменьшение g -фактора при малых концентрациях глюкозы, согласование показателей преломления вызывает его рост при умеренных концентрациях, а дальнейшее рассогласование приводит к его уменьшению при больших концентрациях. Для приложений, особенно при использовании ОКТ-эндоскопии, важную роль играет конкуренция между ослаблением рассеяния и увеличением g -фактора. Транспортный коэффициент рассеяния $\mu'_s = (1 - g)\mu_s$ уменьшается, и средняя транспортная длина свободного пробега фотона $l_{tr} \approx 1/\mu'_s$ резко увеличивается, в результате чего большее количество фотонов, несущих информацию о скрытом объекте (например, тонкостенной бляшке в коронарной артерии), может быть зарегистрировано. Из данных, показанных на рис. 9.50, следует, что для длины волны 900 нм коэффициент рассеяния крови меняется от 1200 см^{-1} до примерно 50 см^{-1} , а g -фактор — от 0,991 до 0,994 при иммерсии глюкозы, так что транспортная длина свободного пробега увеличивается более чем в 35 раз. Соответственно, глубина деполяризации для крови [560, 583, 650], пропорциональная l_{tr} , должна быть намного больше при оптическом просветлении.

Описанный метод моделирования крови при иммерсии применим для любого другого биосовместимого иммерсионного агента, такого как декстран, глицерин, тразограф (табл. 9.3). В просветлении крови существует альтернативная возможность использования локального гемолиза крови, который можно обеспечить в окрестности волоконно-оптического измерительного эндоскопического зонда [1359]. В этом методе иммерсионным агентом является свободный гемоглобин, который в больших количествах токсичен для организма, но на локальном уровне вполне может быть использован как иммерсионный агент. Для моделирования оптических свойств должны учитываться все ранее обсуждавшиеся эффекты. Локальное увеличение концентрации гемоглобина в плазме может приводить к локальному изменению ее осмотической концентрации [1009]:

$$\text{osm}' = \text{osm} + \frac{C_{\text{брНб}}}{M_{\text{Нб}}}, \quad (9.38)$$

где osm' — осмотическая концентрация плазмы в физиологическом состоянии (280–300 мосмоль/л), $C_{\text{брНб}}$ — концентрация гемоглобина плазмы, г/л, $M_{\text{Нб}}$ — молярная масса гемоглобина ($M_{\text{Нб}} = 66500 \text{ г/М}$). Ожидаемое изменение объема эритроцита, рассчитанное по эмпирической формуле (9.37), не превышает 0,1 % при гемолизе менее 20 %. Для простоты полидисперсность эритроцитов можно учесть на основе шестифракционной модели крови (табл. 9.5) [1872], которая коррелирует с более полным распределением, показанным на рис. 9.49.

Расчеты коэффициента поглощения, коэффициента рассеяния и фактора анизотропии рассеяния цельной крови при нормальных условиях и при локальном гемолизе были выполнены с использованием формул (9.33)–(9.35) с упаковочной функцией

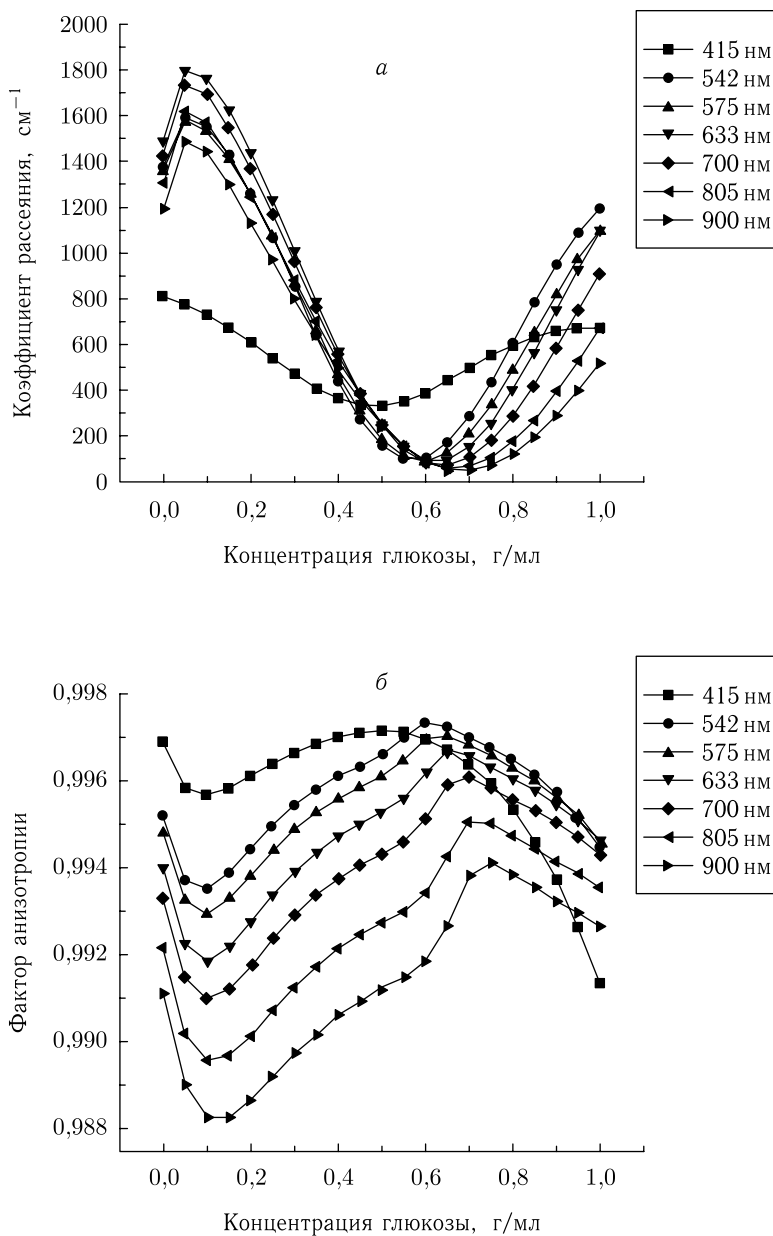


Рис. 9.50. Теоретическое моделирование оптического просветления крови при инъекции глюкозы внутрь сосуда. Показаны рассчитанные зависимости для коэффициента рассеяния (а) и фактора анизотропии рассеяния (б) от концентрации глюкозы в крови [1010]. Начальный гематокрит крови 45 %, концентрация гемоглобина в эритроцитах 322 г/л; при моделировании использовались 150 объемных фракций эритроцитов с различными размерами (объемами) в соответствии с функцией распределения эритроцитов по объемам, представленной на рис. 9.49

Таблица 9.5

Распределение по размерам эквивалентных сферических частиц, моделирующих эритроциты [1872]

Объемная фракция, %	4	14	30	32	14	6
Радиус, мкм	1,2 ± 0,2	1,7 ± 0,3	2,2 ± 0,2	2,7 ± 0,3	3,4 ± 0,4	4,3 ± 0,5

$F(Hct) = (1 - Hct)(1,4 - Hct)$. В отличие от малых изменений коэффициента поглощения, наблюдались более значительные изменения рассеивающих свойств крови при возрастании концентрации свободного гемоглобина в плазме. Весьма гладкий по спектру спад коэффициента рассеяния для всех длин волн был обнаружен при выделении свободного гемоглобина в ходе гемолиза [1359]. При степени гемолиза 20% рассчитанный спад коэффициента рассеяния для длин волн 633 нм и 820 нм составил 40%, в то время как фактор анизотропии на 633 нм увеличился с 0,9940 до 0,9952, а на 820 нм — с 0,9919 до 0,9929.

Описанный метод может быть реализован не только при гемолизе крови, но и при локальной инъекции свободного гемоглобина. Гемоглобин может также служить сильным просветляющим агентом в том случае, когда просветление необходимо в спектральном диапазоне, далеком от сильных собственных полос поглощения гемоглобина. С другой стороны, высокая чувствительность рассеивающих свойств крови к гемолизу эритроцитов может быть использована для разработки эффективной оптической технологии мониторинга *in vivo* гемолиза крови в сосудах.

Прямое экспериментальное доказательство возможности оптической иммерсии эритроцита в растворе гемоглобина представлено в работе [252]. Измерения были проведены на отдельных эритроцитах с помощью фазового микроскопа.

9.7.3. Исследование клеток. Метод оптической иммерсии является важным для исследования преломляющих и рассеивающих свойств живых клеток [158, 216, 245, 264, 1360, 1383, 1619, 1620, 1699, 1715, 1716, 1799, 1800, 1873]. Для измерения клеточной рефракции этот метод используется с 50-х годов прошлого века [1360, 1383, 1619]. Он успешно применялся в сочетании с фазовой рефрактометрией для изучения распределения воды и сухих веществ в клетках животных (механизмов ороговения клеток), для исследования механизмов подвижности животных клеток, связанных с перераспределением воды, для исследования проницаемости клеток, их повреждения и гибели, а также жизнеспособности и цикла роста бактерий, грибов, дрожжей и спор. Некоторые гематологические приложения иммерсионного метода в исследованиях клеточных суспензий обсуждались выше в разд. 9.7.2.

При исследовании клеток требования к иммерсионным агентам должны быть несколько иными, чем при оптическом просветлении биотканей, где во многих приложениях только повреждение клеток является критичным и гиперосмотическое действие агентов обеспечивает один из ведущих механизмов просветления ткани. В общем случае иммерсионное вещество (ИВ), используемое для рефрактометрии живых клеток, должно удовлетворять следующим требованиям [1360, 1383].

1. ИВ должно быть нетоксичным, не влияющим на структуру и функции живых клеток, т. е. химически инертным и не влияющим на какие-либо химические компоненты клетки.

2. Оно должно быть изотоническим, т. е. не вызывать никаких изменений объема клетки. Сжатие или набухание клетки, индуцированное перемещением воды из клетки в окружающую среду или наоборот, сопровождается соответствующими изменениями показателя преломления клетки, и его измеренное значение не будет истинным. Изотоническое свойство является характеристикой клетки в растворе,

связанной с такой физической характеристикой раствора, как его изоосмотическое свойство, но эти характеристики могут и не совпадать. Для обеспечения изоосмотических и изотонических условий ИВ должно оказывать низкое осмотическое давление, т.е. состоять из растворенных частиц с большим молекулярным весом и размерами. Например, осмотическое давление 10%-го водного раствора сывороточного альбумина быка (САБ) эквивалентно давлению 0,08%-го водного раствора хлорида натрия (NaCl).

3. ИВ не должно проникать в клетку, когда исследуется показатель преломления цельной клетки. Иначе при иммерсии клетки в среде с более высоким показателем преломления это вещество, проникая в клетку, будет выравнять показатели преломления внутри и вне ее, и результат измерения показателя преломления клетки будет далек от истинного значения. Поэтому во многих случаях ИВ должно иметь макромолекулярную структуру для предотвращения его проникновения в клетку. Однако, в некоторых особых случаях, когда объектом исследования являются внутриклеточные органеллы, можно использовать иммерсионные агенты с контролируемой проницаемостью.

4. ИВ должно свободно растворяться в воде так, чтобы показатель преломления раствора мог быть равным или большим, чем у исследуемой части клетки. Для клеток животных показатель преломления находится в интервале от 1,350 до 1,426 (см. табл. 9.6), а для бактериальных клеток от 1,360 до 1,420 [1383]. Значения показателя преломления ИВ должны быть переменными в этих пределах с шагом 0,002–0,005. Лучшим решением является выбор двух хорошо смешивающихся друг с другом растворов, одного с минимальным показателем преломления, а другого с максимальным для исследуемого диапазона. Очень важно, чтобы для каждого смешивания ИВ сохраняло свои изотонические свойства. Очевидно, что это требование можно удовлетворить, если оба раствора имеют низкое осмотическое давление и при их смешивании не происходит особых химических реакций, вызывающих его рост.

5. ИВ должно быть оптически прозрачным и изотропным, т.е. должны быть обеспечены условия наименьшего поглощения и рассеяния в нужном для измерений диапазоне длин волн, а также наименьшее линейное двулучепреломление и хиральность.

6. ИВ должно быть стабильным в интервале температур от комнатной до физиологической и не менять своих оптических свойств при продолжительном хранении.

Такие требования выполняются наиболее полно для водных растворов альбумина и водно-глицериновых желатиновых гелей [1360, 1383]. Пятая фракция сывороточного альбумина быка и человека содержит в основном альбумин и около 3% или менее α -глобулина, 0,5% β -глобулина [1383], а его показатель преломления имеет линейную зависимость от концентрации с инкрементом $\beta_p = 0,00185$ (формула (7.34)). Некоторое отклонение от линейности наблюдается для высоких концентраций, что, возможно, связано с относительно высокой вязкостью. Для микробиологических исследований растворы белков обычно готовят с показателем преломления в интервале от 1,360 до 1,420 с шагом 0,002 на основе 0,5–0,6% раствора NaCl в дистиллированной воде [1383].

Водно-глицериновые желатиновые гели применимы, когда подвижность клеток не позволяет провести точные измерения с растворами белков [1383]. Такие гели фиксируют и иммобилизуют клетку, сохраняя ее жизнеспособность, они оптически прозрачны, имеют низкое двулучепреломление и высокую стабильность оптических свойств при правильной эксплуатации и низкое осмотическое давление. Наборы изотонических гелей для исследований готовятся путем разбавления концентрированных бессолевых и очищенных желатиновых гелей с мутностью $0,5 \times 10^{-3} \text{ см}^{-1}$ в 0,2%-м стерильном растворе глицерина и в 0,5%-м растворе NaCl с рН

7,0–7,2; можно использовать также другие составы с 1%-м глицерином и 0,5%-й глюкозой или 10%-й сахарозой. С использованием растворов белков и желатиновых гелей в качестве иммерсионных веществ и фазово-контрастной микроскопии с эффективным подавлением фонового света, были измерены показатели преломления многочисленных бактерий таких семейств, как *Coccaceae*, *Bacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Spirillaceae* и *Proactinomycetaceae* [1383]. На основе измерений рефракции были исследованы концентрация сухих веществ и воды в бактериальных клетках, их плотность, цикл роста бактерий, а также регидратация высушенных путем сублимации бактериальных клеток и гидратация спор. Была также произведена дифференциация жизнеспособных и мертвых клеток в препаратах, высушенных путем сублимации, а также определен процент жизнеспособных спор.

Эффект оптического просветления наиболее просто можно продемонстрировать путем анализа полученных с помощью фазового микроскопа изображений бактериальных клеток, содержащих только цитоплазму и клеточную стенку [1383]. Если биологический объект однороден, согласование его показателя преломления с показателем преломления окружающей среды делает его оптически невидимым. В случае бактерий, содержащих только цитоплазму и клеточную стенку, согласование показателей цитоплазмы и внеклеточной жидкости убирает изображение цитоплазмы и резко обостряет изображение стенки за счет прохождения света через нее. В случае, если показателем внеклеточной жидкости можно управлять посредством добавления подходящего агента, исчезновение видимости цитоплазмы и резкое усиление яркости мембраны можно использовать как эффективное средство измерения показателя преломления цитоплазмы и мониторинга жизнеспособности клетки. Рисунок 9.51 иллюстрирует эффект оптического просветления.

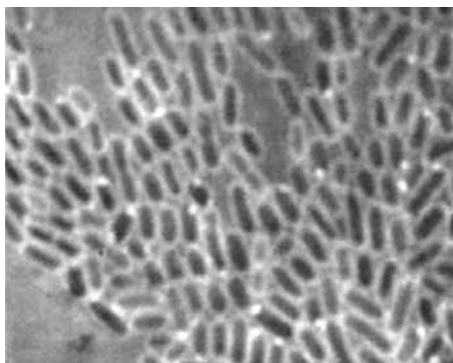


Рис. 9.51. Влияние согласования показателя преломления внеклеточной жидкости с показателем преломления цитоплазмы на изображение клеток дизентерийных бактерий с помощью фазово-контрастного микроскопа. Видно резкое усиление яркости стенки клеток (работа [1383, с. 70])

В качестве перспективного метода для детального исследования эффекта оптического просветления в клетках и его возможных приложений был предложен конечно-разностный временной подход (Finite-Difference Time-Domain, FDTD) [1716]. В работе [1716] представлены результаты 3D- и 2D-моделирования с помощью этого подхода прохождения света через биологическую клетку, состоящую только из цитоплазмы и мембраны. Рассчитанные 2D-распределения и два сечения фазы E_z -компоненты поля излучения, рассеянного вперед через биологическую клетку в ближнем поле, показаны на рис. 9.52. Хорошо видно, что согласование показателей преломления

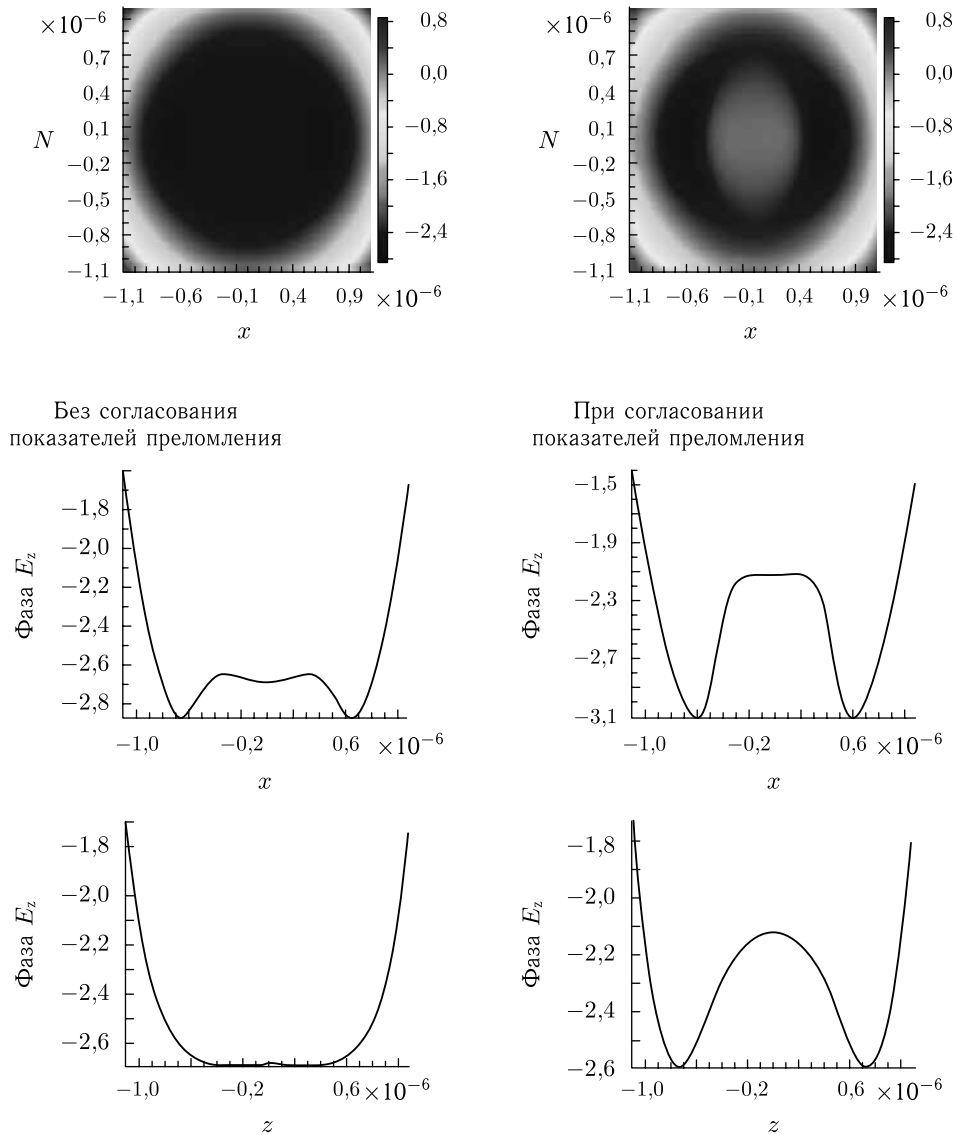


Рис. 9.52. Моделирование рассеяния света биологическими клетками в контролируемой внеклеточной среде с помощью конечно-разностного временного подхода (FDTD) [1715, 1716]. Рассчитанные двумерные распределения и два сечения фазы составляющей светового поля E_z в ближнем поле биологической клетки, содержащей только цитоплазму и клеточную стенку. Ясно видно, что согласование показателей преломления (графики справа) существенно увеличивает фазовый контраст клеточной стенки. Радиус клетки 0,72 мкм, толщина стенки 0,06 мкм, показатель преломления цитоплазмы 1,36, мембраны — 1,47. Асимметрия обусловлена z -поляризацией падающего излучения. Моделирование проводилось с помощью программного обеспечения FDTD, коммерческого продукта Lumerical Solutions Inc., Vancouver, BC, Canada

(графики справа) значительно увеличивает фазовый контраст клеточной мембраны, как следует из экспериментальных данных рис. 9.51. Интенсивность изображения в фазовой микроскопии прямо пропорциональна фазе, накопленной световым пучком в результате его распространения через клетку. Вычисления производились для типичных параметров микробной клетки: диаметр клетки 1,44 мкм, толщина мембраны 0,06 мкм, показатель преломления цитоплазмы 1,36, мембраны — 1,47. Шаг сетки (размер ячейки) моделирования составлял 0,02 мкм, а показатель преломления внеклеточной жидкости брался равным 1,33 и 1,36 для условий рассогласования и согласования показателей преломления соответственно.

Экспериментально определенные отношения интенсивностей рассеяния от клеток (клон фибробластов крысы MR1; $\sim 10^5$ клеток/мл), погруженных в среду с низким и высоким показателем преломления, представлены в работе [216]. В качестве среды с низким показателем преломления $n = 1,332$ в обоих случаях брался фосфатный буферный раствор (ФБР). Средами с высоким показателем преломления служили сывороточный альбумин быка в ФБР ($n = 1,345$) и овальбумин в ФБР ($n = 1,343$). Интенсивность света, рассеянного под малыми углами ($< 20^\circ$) существенно выше, когда клетки погружены в ФБР с низким показателем преломления, чем при иммерсии в растворе белка с более высоким показателем преломления. Можно сделать вывод, что имеет место значительное рассеяние на малые углы от клеточных структур, находящихся в контакте с ИВ. Однако для больших углов ($> 40^\circ$) влияние увеличения показателя преломления ИВ на рассеяние света намного меньше. Следуя оценкам авторов работы [216], можно определить процент рассеяния света внутриклеточными структурами. Учитывая, что отношение интенсивностей рассеяния от клеток, взвешенных в ИВ с низким и высоким показателем преломления, для углов больше 40° равно 1,3, можно оценить долю света, рассеянного частицами внутри клетки. Интенсивность рассеяния в ИВ с низким показателем преломления равна $I_{nc} + I_c$, где I_{nc} и I_c — интенсивности рассеяния от структур, не контактирующих и контактирующих с ИВ соответственно. В ИВ с высокой рефракцией рассеяние от частиц, контактирующих с ИВ, уменьшается примерно в 2,1 раза и интенсивность рассеяния равна $I_{nc} + 0,48 \cdot I_c$. Таким образом, относительная доля рассеяния от внутриклеточных компонентов при иммерсии в ФБР равна $I_{nc}/(I_{nc} + I_c) \approx 0,55$, поскольку $(I_{nc} + I_c)/(I_{nc} + 0,48 \cdot I_c) \approx 1,3$.

9.8. Некоторые применения метода иммерсии биотканей

9.8.1. Измерение содержания глюкозы в биоткани. Неинвазивный и непрерывный мониторинг концентрации глюкозы в крови и биотканях — одно из наиболее многообещающих приложений оптики в медицине. Основная трудность, препятствующая развитию и клиническому применению неинвазивного оптического датчика содержания глюкозы в крови, связана с очень низким уровнем сигнала, создаваемого молекулами глюкозы. Результатом этого является низкая чувствительность и специфичность мониторинга глюкозы [105, 138, 166].

Концепция неинвазивного определения глюкозы в крови с использованием рассеивающих свойств крови, в качестве альтернативы спектроскопии поглощения и поляризационно-чувствительным методам [105, 166, 991], для мониторинга физиологических концентраций глюкозы в крови больных диабетом находится в стадии интенсивного обсуждения [166, 467–469, 991–999, 1006–1008, 1191, 1192, 1387–1389, 1622, 1650, 1683, 1684, 1761, 1765, 1874–1877]. Многие из рассмотренных в разд. 9.7.2 параметров крови, таких как размер эритроцитов, показатель преломления, упаковка, агрегация, меняются при изменениях содержания глюкозы в крови и важны для ее мониторинга у больных диабетом. Действительно, при физиологических концен-

трациях глюкозы от 40 до 400 мг/дл роль некоторых эффектов может меняться, а другие эффекты, например скорость проникновения глюкозы внутрь эритроцита и последующее гликирование гемоглобина, также могут быть важными [1387–1389, 1650, 1681, 1878] (см. разд. 7.11 и рис. 7.14).

Попытки неинвазивного определения глюкозы с использованием рассеяния света компонентами кожной ткани предпринимались в ближнем ИК-диапазоне с помощью модуляционного отражательного метода с временным разрешением [467] и метода диффузного отражения с пространственным разрешением [469, 1875]. Оба подхода основаны на связи концентрации глюкозы с величиной рассогласования показателей преломления между интерстициальной жидкостью и волокнами биоткани и, следовательно, приведенного коэффициента рассеяния биоткани μ'_s . Эксперимент с фиксацией концентрации глюкозы (концентрации вводимых глюкозы и инсулина подбираются так, чтобы обеспечить постоянство концентрации глюкозы в течение всего промежутка времени измерений [991]) показал, что $\delta\mu'_s$ на длине волны 650 нм качественно отслеживает концентрацию глюкозы в крови добровольца, больного диабетом (рис. 9.53) [469]. Расстояние r_{sd} между облучающим и приемным волоконными световодами находилось в интервале от 1 до 10 мм, что соответствует примерно 0,5–5 мм глубине зондирования ткани, для которой определялась величина μ'_s . Дрейф μ'_s , не зависящий от содержания глюкозы, не давал возможности провести достоверный статистический анализ и был отнесен авторами на счет влияния других физиологических процессов, дающих вклад в $\delta\mu'_s$ [469]. Изменения μ'_s происходили не только за счет изменений показателя преломления интерстициальной жидкости, вызванных возрастанием концентрации глюкозы.

Пространственно разрешенные измерения отражения (на 800 нм и при $r_{sd} = 0,8–10$ мм) при оральной пробе на толерантность к глюкозе производились на пяти здоровых добровольцах и 13 добровольцах, больных диабетом типа 2, с использо-

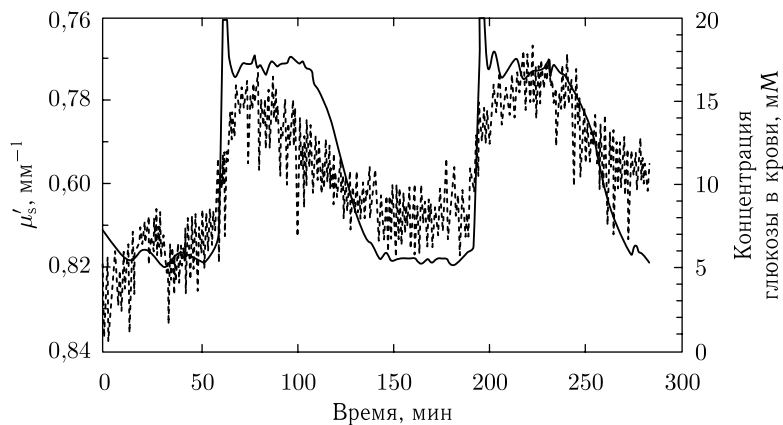


Рис. 9.53. Приведенный коэффициент рассеяния на длине волны 650 нм (точки) и концентрация глюкозы в крови (сплошная линия), измеренные у добровольца с инсулин-зависимой формой диабета в ходе эксперимента с двойной фиксацией концентрации глюкозы в крови [469]. Многоканальный волоконно-оптический отражательный спектрометр с пространственным разрешением на основе ПЗС-линейки и программное обеспечение на основе нейронной сети использовались для определения оптических параметров ткани. Данные измерений коэффициента отражения накапливались с 15-секундным интервалом в течение 5 ч; в ходе эксперимента осуществлялся мониторинг комнатной температуры и температуры кожи добровольца, который оставался настолько неподвижным, насколько это было возможно, не пил и не принимал пищу

ванием оптического датчика, приложенного к коже живота [1875]. У добровольцев, больных диабетом, в 80 % случаев наблюдалась связь между концентрацией глюкозы в крови и величиной $\delta\mu'_s$, а в остальных 20 % корреляции не наблюдалось. Для добровольцев без диабета 73 % случаев соответствовали калибровке для μ'_s как функции концентрации глюкозы. Слабая корреляция между измеренными значениями $\delta\mu'_s$ и концентрацией глюкозы в этих экспериментах могла быть связана с высокой чувствительностью использованного зонда, имевшего большую глубину зондирования, к сосудистым эффектам действия глюкозы, индуцирующего временные изменения кровотока в коже и подкожных слоях ткани [991].

Отклик не болеющего диабетом мужчины на введение глюкозы в количестве 1,75 г на 1 кг веса тела (стандартный тест на толерантность к глюкозе) определялся при непрерывном мониторинге произведения $n\mu'_s$, измеряемого на мышечной ткани бедра с помощью портативного модуляционного спектрометра (рис. 9.54) [467]. Показатель преломления n модифицированной глюкозой интерстициальной жидкости определяется формулой (7.39). По мере роста содержания глюкозы в крови величина $n\mu'_s$ убывает. На рис. 9.54 б показан корреляционный график, построенный по данным рис. 9.54 а. Он хорошо согласуется с простой физической моделью, основанной на приближении Рэлея–Ганса и учитывающей согласование показателей преломления. Ключевыми факторами успеха такого подхода являются точность измерений приведенного коэффициента рассеяния при использовании модуляционного спектрометра ближнего ИК-диапазона [467]. Очевидно, что и другие физиологические эффекты, имеющие отношение к изменению концентрации глюкозы, могут вызывать наблюдаемые изменения μ'_s , и, как уже отмечалось, влияние глюкозы на кровотоки в ткани может быть одним из источников ошибок при измерении μ'_s .

Так называемая спектроскопия окклюзии — подход, основанный на управляемом рассеянии света эритроцитами [991, 1683, 1684, 1877]. Этот метод подразумевает применение окклюзии кровеносных сосудов пальца для замедления кровотока с целью минимизации сдвиговых сил в потоке, что позволяет эритроцитам образовывать агрегаты. В условиях окклюзии регистрируются изменения рассеяния. Окклюзия не влияет на остальные компоненты ткани, в то время как агрегаты эритроцитов по рассеивающим свойствам отличаются от отдельных эритроцитов и остальной ткани. Как уже обсуждалось, изменения концентрации глюкозы влияют на показатель преломления плазмы крови и, следовательно, на рассеяние света кровью при окклюзии из-за согласования или рассогласования показателей преломления агрегатов и плазмы крови. Окклюзионная спектроскопия отличается от спектроскопии отражения с пространственным или временным разрешением тем, что в ней измеряется глюкоза в крови, а не в интерстициальной жидкости. Спектроскопия окклюзии была опробована на человеке с применением гиперинсулинемического-гипогликемического теста [1684]. Этот метод открывает принципиальную возможность прямого измерения вариаций показателя преломления плазмы крови, однако в клинических исследованиях требуется учет многих других факторов, влияющих на рассеяние света эритроцитами и их агрегатами. К таким факторам относятся: 1) сложность явления агрегации эритроцитов и его зависимости от концентрации глюкозы, патологических состояний и других заболеваний [991, 1864, 1865]; 2) влияние глюкозы на форму и структуру эритроцита.

Для неинвазивного определения концентрации глюкозы в биотканях был предложен ОКТ-метод [991, 1006–1008, 1874, 1876, 1879, 1880]. Высокое пространственное разрешение метода ОКТ может обеспечить большую чувствительность, точность и специфичность мониторинга концентрации глюкозы, благодаря точно измеренно индуцированным глюкозой изменениям оптических свойств интересующего слоя биоткани (дермы). В отличие от метода диффузного отражения, ОКТ позволяет

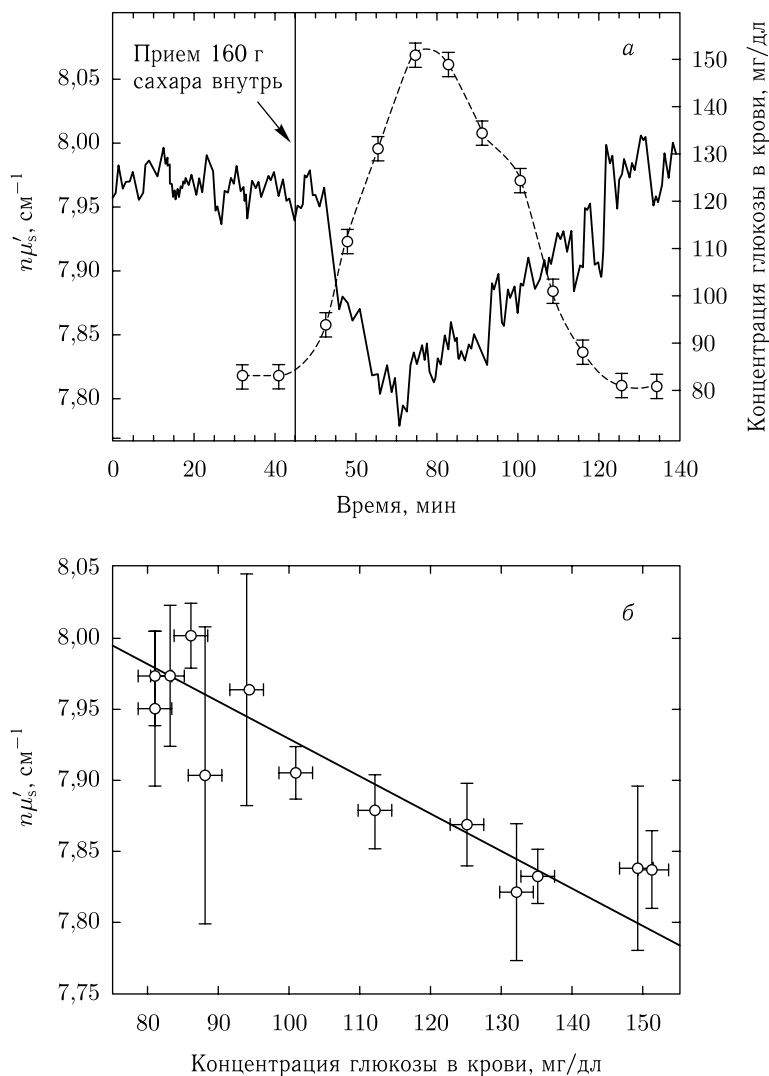


Рис. 9.54. Тест на толерантность к глюкозе, проведенный для добровольца с помощью портативного модуляционного (120 МГц) спектрометра ближнего ИК-диапазона (850 нм) [467]: *a* — за время $t = 45$ мин испытуемый повышал уровень глюкозы в крови при принятии 160 г сахара в виде пищи (1,75 г/кг веса тела); сплошная кривая — результат измерения $n\mu'_s$ на бедре, n определяется формулой (7.39); незаполненные кружки показывают концентрацию глюкозы в крови, определенную домашним измерителем глюкозы в крови; данные, получаемые каждые 30 с, усреднялись по 5 измерениям для построения графика; *b* — соответствующая графику (*a*) корреляция между измеренной концентрацией глюкозы в крови и произведением $n\mu'_s$, усредненным по интервалу времени 2,5 мин, середина которого соответствует моменту прокалывания пальца для взятия пробы крови на глюкозу. Ошибка $n\mu'_s$ определялась как стандартное отклонение по пяти измерениям, усреднение которых давало одну точку. Ошибка в определении концентрации глюкозы оценивалась в $\pm 2,5$ мг/дл. Сплошная линия — теоретический расчет в соответствии с моделью Рэлея–Ганса

с разрешением по глубине получить качественную и количественную информацию об оптических свойствах трех основных слоев кожи человека: рогового слоя эпидермиса, слоя шиповидных клеток (живой эпидермис) и соединительной ткани дермы. Дерма — единственный слой кожи, содержащий развитую сеть кровеносных микрососудов. Поскольку концентрация глюкозы в интерстициальной жидкости тесно связана с концентрацией глюкозы в крови, можно ожидать индуцированных глюкозой изменений сигнала ОКТ, регистрируемого от дермальной области кожи. Было предложено два метода измерения и мониторинга концентрации глюкозы в ткани на основе ОКТ: 1) мониторинг коэффициента рассеяния ткани μ_s как функции концентрации глюкозы в крови с использованием амплитудной системы ОКТ [1006–1008] и 2) измерение индуцированных глюкозой изменений показателя преломления Δn с использованием двухканального волоконно-оптического поляризационного фазочувствительного низкокогерентного рефлектометра [1874].

Эксперименты проводились с помощью портативной амплитудной системы ОКТ с центральной длиной волны 1300 нм, мощностью низкокогерентного источника излучения 0,5 мВт и длиной когерентности 14 мкм; поперечное разрешение ОКТ составляло 12 мкм [1006–1008, 1879]. Авторы сообщают о результатах, полученных на фантоме (водная суспензия из полистироловых микросфер и молока), животных [27 новозеландских кроликов и 13 безволосых юкатанских микросвиней (*Yucatan micropigs*)] и человеке (двадцать здоровых добровольцев в 24 экспериментах). ОКТ-изображения получались от кожи (ухо кролика, область спины у микросвиньи, рука человека). Крутизна сигнала ОКТ вычислялась на глубине в пределах 150–900 мкм. Применение глюкозы осуществлялось посредством: 1) внутривенной болюсной (ударной дозы) инъекции для быстрого увеличения концентрации глюкозы в крови; 2) внутривенной капельной инъекции для медленных управляемых изменений концентрации глюкозы в крови в экспериментах на животных; 3) стандартного орального теста на толерантность к глюкозе (ОТТГ) в исследованиях на человеке. Образцы крови исследовались при помощи анализаторов глюкозы в крови OneTouch (Lifescan Inc., Milpitas, CA), HemoCue (Ryan Diagnostic, Inc., Naperville, IL) и Vitros 950 (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, NJ).

Сначала получается ОКТ-изображение слоев кожи и оценивается сигнал ОКТ как функция глубины зондирования. Крутизна части графика, относящейся к слою дермы, используется для вычисления μ_s . Для эксперимента с кожей животного под анестезией ОКТ-изображения показывают, что глюкоза влияет на согласование показателей преломления в коже и уменьшает μ_s [1879]. Таким образом была определена крутизна зависимости сигнала ОКТ от глубины и установлена ее корреляция с концентрацией глюкозы в крови (рис. 9.55).

Типичные результаты клинических исследований показаны на рис. 9.56. ОКТ-изображения и образцы крови брались из левого и правого предплечья. Хорошая корреляция между концентрацией глюкозы в крови и снижением крутизны сигнала ОКТ наблюдалась на глубине 200–600 мкм во время ОТТГ. Измерения, соответствующие слоям эпидермиса и верхней дермы, либо не показали изменений крутизны сигнала ОКТ при вариациях концентрации глюкозы в крови, либо эти изменения были очень малы. Наиболее вероятной причиной этого представляется градиент убывания концентрации глюкозы от кровеносных микрососудов дермы к роговому слою. Поэтому чувствительность и точность ОКТ-измерений концентрации глюкозы в крови должна быть максимальной в областях развитой сети кровеносных микрососудов, т. е. в области дермы.

Сравнение результатов, полученных на коже уха кролика при болюсной инъекции глюкозы и на коже микросвиньи при фиксации глюкозы, показало, что крутизна сигнала ОКТ менялась примерно на 8%/мМ в первом случае и на 2%/мМ во

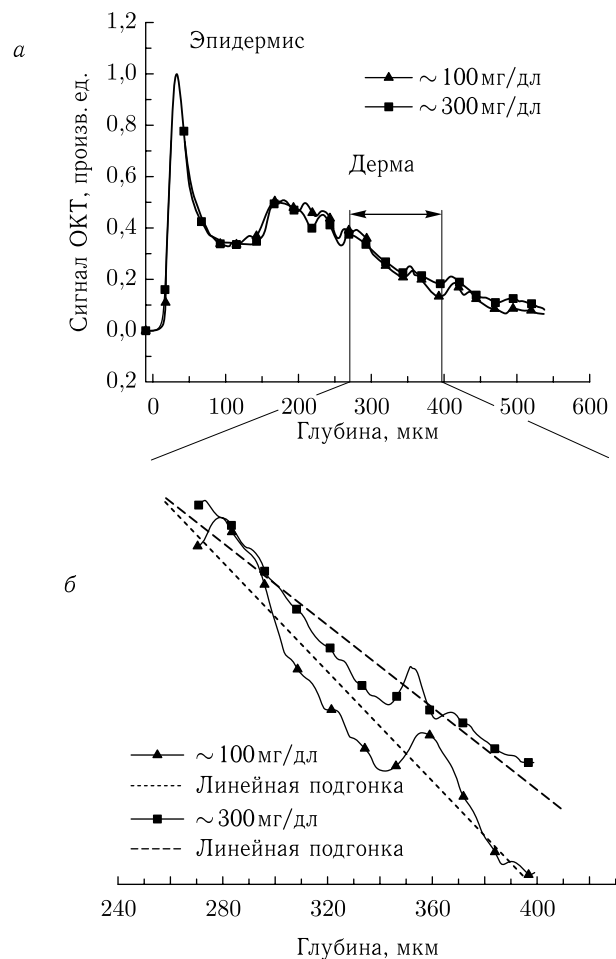


Рис. 9.55. Характерные сигналы ОКТ от кожи юкатанской микросвиньи (*Yucatan micropig*) в течение эксперимента с фиксацией концентрации глюкозы при низкой и высокой концентрации глюкозы в крови (а) и часть ОКТ-сигнала в области дермы с линейной подгонкой (б) [1008]

втором. Это предполагает возможность физиологического отклика ткани на резкий рост концентрации определяемого вещества в интерстициальной жидкости в ходе экспериментов с болюсной инъекцией глюкозы.

Результаты, полученные на фантомах, животных и в клинических исследованиях, демонстрируют потенциальные возможности ОКТ для обнаружения малых изменений коэффициента рассеяния рассеивающих сред под влиянием глюкозы с высокой точностью и чувствительностью. Необходимы, однако, дополнительные исследования в следующих направлениях: 1) снижение шума, связанного со спеклами и неоднородностью ткани; 2) развитие алгоритмов и методов для компенсации артефактов движения; 3) апробация системы в клинических исследованиях с участием больных диабетом. Хотя, скорее всего, датчики глюкозы на основе ОКТ потребуют калибровки с помощью известных и широко применяемых инвазивных датчиков глюкозы, они, тем не менее, помогут резко сократить число инвазивных измерений и обеспечат возможность непрерывного мониторинга концентрации глюкозы в крови.

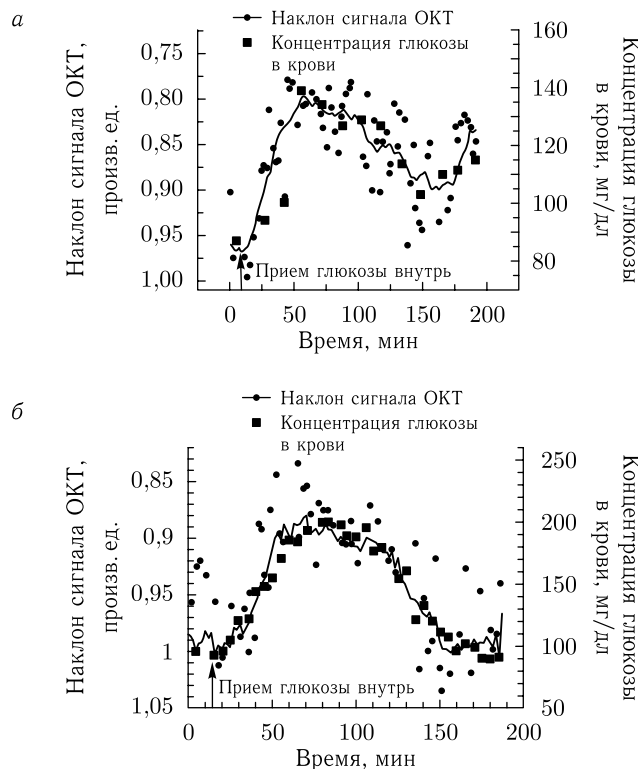


Рис. 9.56. Крутизна сигнала ОКТ и концентрация глюкозы в крови в зависимости от времени. ОКТ-изображения и образцы крови были получены от кожи левого (а) и правого (б) предплечья добровольца во время орального теста на толерантность к глюкозе (ОТТГ) [1007]

Ставился вопрос о специфичности метода ОКТ в применении к мониторингу концентрации глюкозы в ткани [1008]. Был проведен экспериментальный и теоретический анализ влияния нескольких физических и физиологических параметров (таких как изменение разности показателей преломления между интерстициальной жидкостью и рассеивающими центрами и структурные модификации в ткани из-за изменений концентрации глюкозы) на крутизну сигнала ОКТ. Полученные результаты показывают, что: 1) вариации нескольких метаболитических веществ в организме способны влиять на разницу показателей преломления между интерстициальной жидкостью и рассеивающими центрами в ткани, однако действие глюкозы примерно на один или два порядка сильнее; 2) рост концентрации глюкозы в интерстициальной жидкости в физиологическом диапазоне (3–30 мМ) может уменьшить коэффициент рассеяния на 0,22%/мМ из-за изменения объема клеток; 3) стабильность крутизны сигнала ОКТ зависит от неоднородности ткани и артефактов, связанных с движением; 4) умеренные флуктуации температуры кожи (± 1 °C) не снижают точности и специфичности датчика глюкозы на основе ОКТ, однако существенный нагрев или охлаждение (несколько градусов) заметно меняет крутизну сигнала ОКТ. Эти результаты означают, что ОКТ может обеспечить достаточную специфичность мониторинга концентрации глюкозы при нормальных физиологических условиях.

Дифференциальный фазоконтрастный метод на основе ОКТ также использовался для мониторинга изменений оптических параметров биоткани, вызванных глюко-

зой [1874]. В то время как амплитудный метод ОКТ использует регистрацию и анализ интенсивности оптического излучения, отраженного назад, фазочувствительный метод ОКТ использует фазовую информацию, получаемую при зондировании образца одновременно двумя совмещенными низкокогерентными пучками. Изменения показателя преломления образца проявляются в разности фаз $\Delta\varphi$ между двумя пучками. Эти методом можно измерить разность хода между пучками (выражаемую через разность фаз как $(\lambda/4\pi)\Delta\varphi$) в масштабе ангстрем/нанометр в прозрачных и рассеивающих средах. Авторы работы [1874] изучали концентрационно-зависимые изменения фазы, $d\varphi/dC$, и показателя преломления, dn/dC , в водных растворах глюкозы, других метаболитов, таких как CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl , KCl , KHCO_3 , мочевины, сывороточного альбумина быка и глобулина, в прозрачных и рассеивающих тканеподобных средах. Полученные результаты показали, что: 1) измеренные значения показателя преломления находятся в хорошем согласии с литературными данными, полученными на обычном рефрактометре белого света в видимом диапазоне; 2) влияние глюкозы на dn/dC примерно на один–четыре порядка больше, чем влияние других анализируемых веществ в физиологических концентрациях; 3) хорошее согласие результатов, полученных в прозрачных и рассеивающих средах, позволяет применять метод для измерений *in vivo*; 4) фазоконтрастный метод ОКТ обладает высокой чувствительностью (меньше одного мМ) при измерении концентрации глюкозы.

Как и в других методах, основанных на рассеянии, регистрируемым явлением в ОКТ является влияние глюкозы на показатель преломления интерстициальной жидкости. Хотя метод ОКТ не учитывает изменения показателя преломления, связанные с циркуляцией крови и изменениями температуры, по сравнению с другими оптическими методами, в которых используется сравнительно большой исследуемый объем, охватывающий несколько слоев ткани [467–469, 991, 1875], ОКТ имеет существенное преимущество, поскольку глубина зондирования ограничена определенным слоем дермы и исключен нежелательный сигнал от других слоев ткани. Точный выбор участка зондирования очень важен при мониторинге глюкозы в биоткани, поскольку усвоение глюкозы различно в разных слоях ткани, являясь наименьшим в соединительных тканях и гладких мышцах и наибольшим в жировой ткани и скелетных мышцах [1881]. Кроме того, необходимо учитывать, что при быстрых изменениях глюкозы в крови существует время запаздывания порядка 10–25 мин между изменениями концентрации глюкозы в крови и в тканях кожи [1881].

Важно, что концентрация глюкозы в крови меняет термически модулированные сигналы от кожи [991, 1661]. Это происходит из-за некоторых физиологических и физических эффектов, индуцируемых в коже при модуляции температуры. Модуляция температуры влияет, в основном, на кровообращение в сосудах кожи (физиологический эффект), а изменение концентрации глюкозы — на рассеяние света в коже (физический эффект). Экспериментальная установка, основанная на измерении термооптического отклика кожи человека, была использована для регистрации сигнала от предплечья добровольцев [1271, 1661]. Была установлена корреляция между концентрацией глюкозы в крови и сигналом локального оптического отражения на длинах волн между 590 и 935 нм при модуляции температуры кожи. В этом диапазоне длин волн нет полос поглощения глюкозы, так что коэффициент поглощения кожи μ_a по большей части определяется поглощением крови, отражающим изменения гемодинамики в кожной ткани. Очевидно, что μ'_s является мерой разницы показателей преломления между интерстициальной жидкостью и соединительными волокнами ткани.

Данные о локальном оптическом отражении непрерывно собирались в течение 90-минутного периода, когда оптический зонд контактировал с кожей, а температура поверхности кожи пошагово менялась от 22 °C до 38 °C, проходя 15 циклов

температурной модуляции [991, 1661]. Каждый цикл содержал следующие шаги: кожа приводилась в равновесие в течение 2 мин при температуре зонда 22 °С, потом температура поднималась до 38 °С в течение 1 мин, поддерживалась 2 мин на этом уровне, а затем понижалась до 22 °С в течение последующей 1 мин. На каждом температурном уровне (в течение двухминутного окна) снималось четыре пакета оптических данных и определялись значения μ_a и μ'_s . Температурная модуляция от 22 °С до 38 °С вызывала периодический набор изменений показателя преломления кожи и параметров кровеносных сосудов, приводя к периодическим изменениям отражательной способности кожи [991, 1661]. Четырехчленное линейное выражение использовалось для подгонки методом наименьших квадратов экспериментальных данных для отражательной способности и содержания глюкозы:

$$[\text{Glucose}] = a_0 + \sum_i a_i \cdot R'_i(r, \lambda, T). \quad (9.39)$$

Параметр отражения $R'(r, \lambda, T)$, определенный выражением (9.39), равен натуральному логарифму от измеренной локальной отражательной способности. Тридцать две последовательности R' (при $T_{22} \text{ °С}$) = $\ln R(r, \lambda, T_{22} \text{ °С})$ и R' (при $T_{38} \text{ °С}$) = $\ln R(r, \lambda, T_{38} \text{ °С})$ были использованы для линейной корреляции по методу наименьших квадратов. Для каждого 2-часового теста на толерантность к пище измеренные температурные последовательности содержали 20 точек данных [991, 1661]. Корреляция между значениями глюкозы и оптическими сигналами в этом спектральном диапазоне была приписана влиянию глюкозы на показатель преломления и гемодинамический отклик кожи; коэффициент корреляции находился в интервале от 0,69 до 0,94 у двух добровольцев, проходивших исследование по 6 дней каждый.

Метод термооптического отклика по сравнению с измерениями оптического отражения при сравнительно больших расстояниях между источником и приемником [467–469, 1875] имеет некоторые преимущества, обусловленные более высоким пространственным разрешением, поскольку благодаря конструкции зонда (близкое расположение приемника и источника) он ограничивает глубину зондирования областью дермы и использует контроль температуры поверхности кожи.

9.8.2. Прецизионная лазерная хирургия. Фемтосекундные лазерные импульсы используются для прецизионного подповерхностного фоторазрушения прозрачных тканей, например роговицы глаза [781, 1811]. Высокие интенсивности, необходимые для фоторазрушения, достигаются в фокусе лазерного пучка при пиковой мощности. Локализация оптического пробоя может контролироваться так, чтобы она происходила только в фокусе пучка, где интенсивность превосходит пороговый уровень разрушения. Если лазер сфокусирован в точку, лежащую за поверхностью ткани, происходит подповерхностное разрушение только в фокусе. В слоях ткани, через которые проходит фокусируемое излучение, не возникает никаких повреждений. В противоположность прозрачным, мутные ткани рассеивают свет, расширяя импульс в пространстве и времени, тем самым разрушая острую фокусировку и удлиняя импульс, т. е. нарушая необходимые условия для прецизионного фоторазрушения [781, 1811]. Такие же проблемы типичны для нелинейной спектроскопии, включая многофотонную флуоресцентную микроскопию и ГВГ-визуализацию [1123–1132, 1576–1580, 1662].

Возможности фокусировки света через рассеивающую среду ограничены, особенно при длинах волн меньше, чем 1300 нм. Однако, как было уже показано, метод оптического просветления с применением подходящего иммерсионного агента может быть использован для временного уменьшения рассеяния ткани, что может оказаться эффективным средством в прецизионной лазерной хирургии. В частности, концепция прецизионного фоторазрушения просветленной ткани была продемонстрирована на

примере склеры глаза человека [781, 1811]. В работе [781] фемтосекундные импульсы с энергией примерно 5 мДж от двух лазерных источников, 1060 нм (500 фс) и 775 нм (150 фс), с частотой повторения 1 кГц использовались для подповерхностного разреза в склере *in vitro*. Пучок фокусировался в пятно размером 1,5 мкм (775 нм) или 5 мкм (1060 нм) и сканировался под поверхностью ткани на различных глубинах для получения пробных разрезов.

Для обеспечения прозрачности образцы ткани пропитывались в течение 15 мин рентгеноконтрастным веществом на основе сахаров — гипак-76 (huraque-76). Измеренные спектры аксиального пропускания нормальной и обработанной гипаком-76 склеральной ткани (регистрировался свет, рассеянный вперед внутри узкого конуса вокруг направления падающего пучка), а также спектры физиологического раствора и просветляющего агента, приведены на рис. 9.57. Как видно, пропускание склеры никогда не превышает 10% с широким максимумом на 1600–1800 нм. Для склеры, обработанной гипаком-76, пропускание значительно увеличивается по всему спектру, особенно для ближнего ИК-излучения от 800 до 1350 нм. Окно прозрачности также создается между двумя сильными полосами поглощения воды от 1500 до 1800 нм. Пропускание на 775 и 1060 нм превышает 60%.

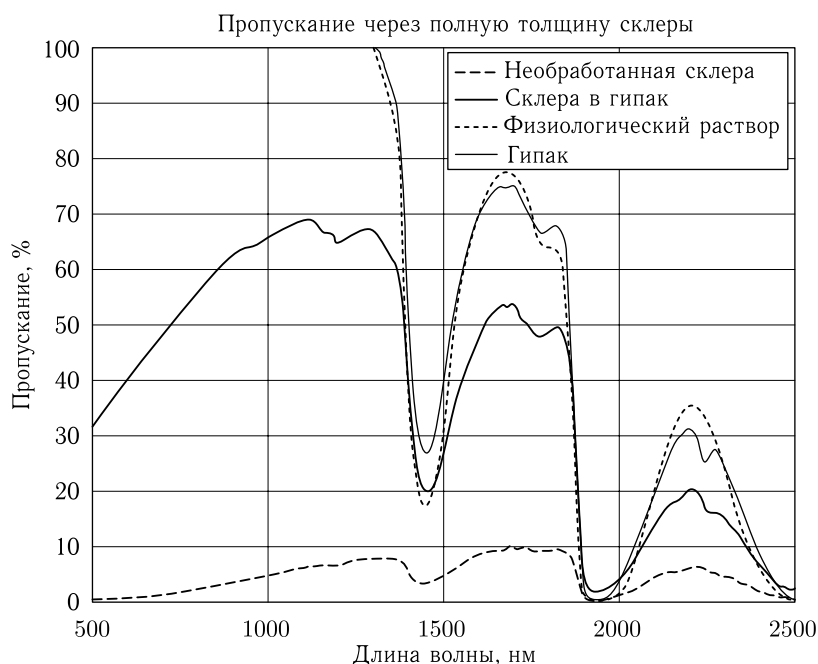


Рис. 9.57. Спектры пропускания образцов склеры в норме и под действием гипак-76 (huraque-76), а также спектры физиологического раствора и гипак-76 [781]. Все образцы имели толщину приблизительно 0,5 мм

Разница в пропускании при просветлении, как ожидается, не должна непосредственно влиять на эффективность фоторазрушения, поскольку фоторазрушение при использовании сверхкоротких импульсов зависит от интенсивности импульса, а не от линейного поглощения, которое может меняться при переходе ткани из режима многократного рассеяния к однократному режиму. Поэтому временные спектральные окна с меньшим рассеянием и поглощением дают возможность сфокусированному

пучку на время вмешательства проникать в глубь ткани с меньшим ослаблением и искажениями, повышая тем самым эффективность прецизионной лазерной хирургии.

Как и ожидалось, на длине волны 775 нм поперечный размер распределения интенсивности в непросветленной склере не меняются от положения фокусирующей линзы, поскольку рассеяние очень велико. Образующийся в ткани пучок во много раз шире, чем на воздухе, и сильно спекл-модулирован (см. рис. 9.8) [555]. На большей длине волны, 1060 нм, из-за меньшего рассеяния распределение более узкое, но все равно сильно уширено. Поэтому фокусировка на заднюю поверхность ткани невозможна на этих длинах волн, и оптический пробой непросветленной склеры возможен только вблизи передней поверхности [781]. После обработки ткани гипаком-76 размер пятна уменьшается почти до своих размеров в нерассеянном пучке на обеих длинах волны, так что сильная фокусировка пучка позволяет осуществить контролируемое фоторазрушение уже задней поверхности. Экспериментально было продемонстрировано несколько типов внутрисклеральных разрезов с применением технологии оптического просветления, таких как создание канала на части толщины склеры, что можно использовать для осуществления транссклеральной процедуры, аналогичной глубокой склеротомии, когда блок ткани с внутренней поверхности склеры удаляется с минимальными повреждениями наружных слоев, или для изменения механических свойств склеры с целью лечения псевдобиопии. Создание канала на всю толщину склеры может быть полезным для дренирования водянистой влаги при лечении глаукомы, а создание решетки пор в ткани склеры — для изменения ее объемных свойств, включая гидравлическую проводимость; создание склерального кармана может быть полезным для вживления имплантата при лечении старческой дальнозоркости [781, 1811].

ОПА использовал в лазерной сосудистой хирургии для лечения кожных сосудистых патологий [1808], а также при неинвазивной лазерной коагуляции семенных протоков собаки [1808].

Иммерсионное оптическое просветление также перспективно при сопровождении лазерных и нелазерных хирургических вмешательств, когда флуоресцентная или оптическая отражательная визуализация используется для сопровождения операции [1787].

9.9. Другие методы управления оптическими свойствами биотканей

9.9.1. Компрессия и растяжение биоткани. Как уже говорилось в разд. 9.1, сжатие (компрессия) или растяжение мягкой ткани вызывает значительное увеличение ее оптического пропускания [1617]. Главные причины этого таковы: 1) увеличенная оптическая однородность ткани из-за устранения крови и интерстициальной жидкости из места сжатия (см. выражение (7.27)); 2) более тесная упаковка компонентов ткани, которая вызывает меньшее рассеяние благодаря кооперативным (интерференционным) эффектам (см. гл. 3) [654, 1616], и 3) меньшая толщина ткани. Механизмы, лежащие в основе эффектов оптического просветления и изменения отражения света мягкими тканями при сжатии и растяжении, были предложены в ряде теоретических и экспериментальных исследований [61, 62, 495, 654, 768, 769, 1059, 1068, 1257, 1616, 1657, 1670, 1678, 1803–1807].

Следует, однако, подчеркнуть, что индуцированные сжатием эффекты в тканях, содержащих мало крови, таких как склера, характеризуются выраженной инерцией (несколько минут) из-за сравнительно медленной диффузии воды из сжатого участ-

ка [569]. Было сделано предположение, что компрессия склеры может вытеснять воду из пространства между коллагеновыми волокнами, увеличивая концентрацию белков и мукополисахаридов. Поскольку указанные белки и сахара имеют показатель преломления, более близкий к показателю преломления коллагеновых волокон, можно создать среду с высокой степенью согласования показателей преломления. С другой стороны, компрессия уменьшает толщину образца d , что может увеличивать эффективную концентрацию рассеивающих частиц внутри ткани [1257]. Следовательно, компрессия может дать некоторый вклад в увеличение коэффициента рассеяния биоткани μ_s . Однако полное действие на изменение оптических свойств, пропорциональное произведению $\mu_s d$, как правило, характеризуется меньшим рассеянием.

Иногда увеличение концентрации рассеивающих частиц может доминировать над снижением разности показателей преломления рассеивателей и их окружения [1257]. Кроме того, сокращение толщины ткани вызывает рост локальной концентрации хромофоров (для бескровенной ткани или образцов ткани с агрегированной или коагулированной кровью), т. е. растет коэффициент поглощения. Однако в целом, несмотря на увеличение коэффициентов рассеяния и поглощения, ткань становится более прозрачной за счет существенного уменьшения ее толщины.

Авторы работы [1257] наблюдали выступание жидкости вокруг образца при компрессии. При умеренной компрессии выжималась только некоторая часть внеклеточной жидкости, в основном по краям образца ткани через участки срезов. При таких давлениях, недостаточных для разрушения клеточных стенок, внутриклеточные жидкости сохраняются в клетках по объему образца. Поэтому при сжатии толщина ткани уменьшается, а объемная концентрация воды увеличивается. Этим можно объяснить увеличение коэффициента поглощения на длинах волн полос поглощения воды при сжатии [1257]. Изменялись оптические параметры образцов кожи человека, аорты быка, склеры быка и свиньи в спектральной области от 400 до 1800 нм с использованием метода интегрирующей сферы и обратного метода добавления – удвоения для определения коэффициента поглощения и приведенного коэффициента рассеяния. Диффузное отражение и пропускание образцов этих тканей размером 2×2 см² измерялись без давления и при давлении 0,1, 1, и 2 кг/см², равномерно распределенном по поверхности образца. В общем случае наблюдалось снижение отражения, в то время как коэффициенты пропускания, поглощения и рассеяния увеличивались из-за компрессии. Некоторые из этих данных для кожи человека представлены в табл. 7.1. Как было объяснено ранее, величина рассеяния зависит от разности показателей преломления, а также от концентрации рассеивающих частиц и расстояний между ними. Вдоль направления нагрузки расстояние между компонентами биоткани уменьшается, и из-за утечки воды из области сжатия достигается лучшее согласование показателей преломления; оба эффекта уменьшают усредненное рассеяние света (пропускание растет, а отражение падает). С другой стороны, компрессия уменьшает толщину образца, что может увеличивать эффективную концентрацию рассеивающих частиц и хромофоров внутри ткани. В экспериментах с равномерно распределенным давлением влияние роста концентрации рассеивающих частиц преобладало над уменьшением разности показателей преломления и эффектом упаковки рассеивающих компонентов. Следует заметить, что относительный баланс вкладов перечисленных механизмов может меняться при точечной компрессии [392, 393, 769]. Для понимания оптических свойств сжатой биоткани важны исследования с временным разрешением в течение нескольких минут [769].

Спектральными свойствами кожи можно эффективно управлять с помощью внешнего локального давления в экспериментах *in vivo*, когда под действием УФ-излучения развивается эритема (покраснение кожи) [1059, 1068, 1656]. На рис. 9.58 показана оптическая плотность, найденная из измеренных *in vivo* спектров отражения

от кожи человека с эритемой при различных значениях локального механического давления. На третий день после УФ-облучения развитая эритема видна как увеличенная оптическая плотность в спектральном диапазоне 520–580 нм из-за увеличенного объема крови в коже. Гемоглобин крови блокирует рассеяние назад от глубоких слоев кожи. Для более длинных волн, от 600 до 700 нм, увеличенный объем крови вызывает рост рассеяния света тканью, который виден как уменьшение оптической плотности. При давлениях $(8,4-14) \cdot 10^5$ Па кровь покидает сжимаемую область кожи, поэтому спектральная зависимость становится более гладкой из-за меньшего поглощения в области 520–580 нм и меньшего рассеяния в области 600–700 нм.

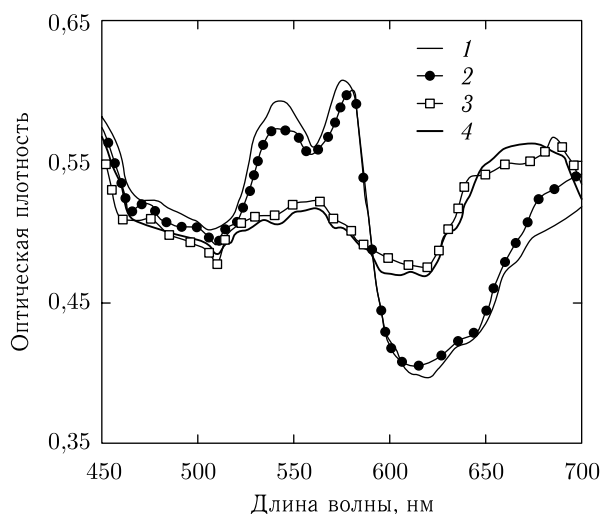


Рис. 9.58. Спектральные распределения оптической плотности кожи добровольца с эритемой (три дня после УФ-облучения) для различных значений внешнего механического давления: 1 — без давления; 2 — $5,6 \cdot 10^4$ Па; 3 — $8,4 \cdot 10^4$ Па; 4 — $1,4 \cdot 10^5$ Па [1059, 1656]

Аналогичная технология с несколько меньшей величиной внешнего давления 3×10^5 Па использовалась для определения *in vivo* содержания каротиноидов в коже человека по виду спектра отражения в области 467–515 нм после компрессии [1319].

Интенсивность автофлуоресценции кожи также хорошо управляема при приложении к участку кожи локального давления. Как следует из рис. 9.59, внешнее давление в пределах от 0 до $1,4 \cdot 10^5$ Па заметно меняет выход флуоресценции с длиной волны 460 нм при индуцированной эритеме. За счет более эффективного ослабления света флуоресценции гемоглобином крови при более интенсивной эритеме (14 дней после УФ-облучения) сдавливание кожи более эффективно контролирует (увеличивает) выход света флуоресценции.

Как было также показано, наложение сдавливающей манжеты на верхнюю часть руки здоровых добровольцев при уровнях давления 0, 20, 30, 40 и 60 мм рт. ст. не меняло заметно уровень оксигемоглобина или меланина в предварительно облученной УФ-светом коже внутренней стороны предплечья (т. е. индуцированной эритемы и меланиновой пигментации), как это следует из спектральных исследований [1670]. Напротив, деоксигемоглобин вносил значительный вклад в видимый цвет кожи. Накопление крови в ткани при окклюзии или эритеме, выражающееся в росте деоксигемоглобина, дает вклад в то, что визуально воспринимается как пигментация. Показатель оксигемоглобина возрастал самое большее в течение одного дня после

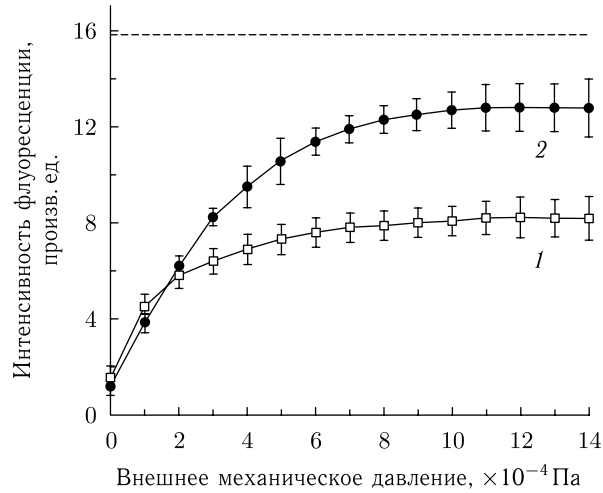


Рис. 9.59. Автофлуоресценция (АФ) кожи добровольца с эритемой ($\lambda_f = 460$ нм) в зависимости от приложенного внешнего давления в: 1 — 7 дней после УФ-облучения (менее развитая эритема); 2 — 14 дней после УФ-облучения (более развитая эритема). Интенсивность АФ кожи добровольца, измеренная в отсутствие эритемы и давления (пунктирная прямая линия), представлена для сравнения [1059, 1068]

УФ-облучения, что хорошо коррелирует с клинической оценкой эритемы, а затем экспоненциально убывал до базового уровня. Содержание меланина заметно росло на 7 день и оставалось относительно постоянным в течение последующих 3 недель, что хорошо коррелирует с клинической оценкой пигментации (загара). Деоксигемоглобин слегка увеличивался в 1-й день и оставался повышенным в последующие 2 недели. Таким образом, он умеренно коррелировал с клинической оценкой эритемы только в первый день, хотя он вносит заметный вклад в то, что клинически воспринимается как загар на 7-й и 14-й день. Приложение давления ниже диастолического уровня увеличивало концентрацию деоксигемоглобина, измеряемую с помощью спектроскопии диффузного отражения. Местное применение H_2O_2 снижало уровень деоксигемоглобина, что совпадало по времени с видимым побледнением кожи.

Распространение света в коже человека при механическом растяжении исследовалось *in vivo* с использованием стационарной диффузной рефлектометрии с переменным расстоянием между источником и приемником r_{sd} [495]. Кожа на исследуемом участке удерживалась в натянутом состоянии при ее механическом растяжении в определенном направлении с последующей фиксацией на алюминиевом кольце с помощью двухсторонней липкой ленты. Для средних и больших расстояний между источником и приемником ($r_{sd} = 2$ и 7 мм) было обнаружено, что анизотропия распространения света следовала направлению растяжения. Направление растяжения определяет направление, в котором наблюдается максимальный сигнал отражения при расстоянии между источником и приемником более 2 мм. Таким образом, коэффициент рассеяния минимален при измерении вдоль направления растяжения, поскольку интенсивность для удаленного приемника максимальна. Было проведено также моделирование методом Монте-Карло с учетом анизотропии коэффициента рассеяния, вызванной различным взаимодействием фотонов со средой при их миграции вдоль волокон ткани и поперек них и описываемой формулой (7.16) с долей рассеивающих частиц (цилиндров), ориентированных в преимущественном направлении, равной $f = 0,35$ [495]. Как следует из (7.16), сечение рассеяния из-

меняется в зависимости от косинуса угла между направлением падающего фотона и осью цилиндра. Оно максимально для перпендикулярного падения и минимально для параллельного. Моделирование методом Монте-Карло показало, что для малых расстояний между источником и приемником регистрируемый сигнал намного выше (коэффициент рассеяния также выше) для направления, перпендикулярного по отношению к преимущественному направлению коллагеновых волокон. Для более удаленного приемника сигнал выше в параллельном направлении (коэффициент рассеяния ниже). Такие коррелированные или антикоррелированные зависимости между интенсивностью отражения назад и коэффициентом рассеяния для малых и больших расстояний, между источником и приемником соответственно, следуют также из данных, показанных на рис. 9.28.

Из данного анализа следует, что за счет натяжения кожи коэффициентом рассеяния и соответствующими величинами отражения и пропускания можно эффективно управлять. С другой стороны, интактная кожа имеет свою собственную анизотропию, которая, как считается, обусловлена преимущественной ориентацией коллагеновых волокон в дерме, описываемой линиями натяжения Лангера [495]. Так, различие приведенного коэффициента рассеяния кожи человека достигает двух раз при различных направлениях распространения в том же месте (см. табл. 7.1). При внешнем растяжении более существенное подавление рассеяния ожидается вдоль направления естественного механического напряжения.

Измерения деформаций и приложенных нагрузок и оценка биомеханических свойств ткани важны во многих областях медицины, включая мониторинг механических напряжений в закрывающихся ранах, полнослойных кожных лоскутах и эспандерах тканей [1678]. Такие измерения можно обеспечить путем регистрации отражения поляризованного света, они должны позволить хирургам более успешно лечить раны с минимальным образованием рубцовой ткани и максимальной скоростью заживления за счет понимания того, насколько кожа может быть растянута на каждом шаге лечения. Эксперименты *in vivo* на человеке показали, что зеркальное отражение от кожи также меняется с растяжением [1678]. Для малых растяжений зеркальная отражательная способность, измеренная для пучка He-Ne-лазера ($\lambda = 633$ нм) с углом падения 45° , линейно растет с растягивающей нагрузкой. Линейное соотношение между приложенным растяжением и отражением поляризованного света можно понять, если поверхность кожи в состоянии покоя аппроксимировать синусоидальным профилем. Растяжение уменьшает амплитуду и увеличивает пространственный период профиля кожной поверхности, делая ее более гладкой и плоской, что приводит к соответствующему росту отражения. У 10 испытуемых с различными кожными осложнениями наклон зависимости отражательной способности (нормированной на максимальное значение) от относительного растяжения (выраженного в процентах) лежал в интервале от 0,0074 до 0,0391 (1%) с линейным коэффициентом корреляции R^2 от 0,88 до 0,99. Для более значительных деформаций (относительное растяжение 8,8 %, или 5 мм) у обследованных субъектов зависимость насыщалась и даже спадала. Опыты с растяжением в двух перпендикулярных направлениях (параллельно и перпендикулярно продольной оси предплечья) дают хорошую корреляцию между растяжением и интенсивностью отраженного света и показывают, что кожа обладает анизотропными свойствами, которые можно обнаружить по отражению света. Например, наклон, измеренный в направлении, параллельном продольной оси предплечья, составил $0,0095 \pm 0,0002$ (1%), а в перпендикулярном $0,0065 \pm 0,0008$ (1%) [1678].

Локальная компрессия биоткани, совмещенная с оптическим зондом ОКТ-системы визуализации, позволяет получить существенную дополнительную информацию

об исследуемой патологии как по глубине зондирования, так и по кинетике отклика на компрессию ткани [1803–1807].

9.9.2. Температурные эффекты и коагуляция ткани. Воспроизводимое влияние температуры между 25 °С и 40 °С на приведенный коэффициент рассеяния дермы и субдермы было обнаружено в исследованиях *ex vivo* в ближнем ИК-диапазоне [333, 334]. Для дермы относительное изменение приведенного коэффициента рассеяния продемонстрировало рост $((4,7 \pm 0,5) \cdot 10^3 \text{ }^\circ\text{C}^{-1})$, а для субдермы — убывание $((-1,4 \pm 0,28) \cdot 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}^{-1})$. Абсолютные величины коэффициентов представлены в табл. 7.1. Была выдвинута гипотеза, что наблюдаемые положительные и отрицательные температурные коэффициенты рассеяния для дермы и субдермы связаны с различиями в их структурных компонентах. Было предположено, что основные рассеивающие компоненты субдермы — липиды в мембранах и вакуолях. Известно, что при некоторых температурах липиды претерпевают фазовые изменения, которые меняют их ориентацию, подвижность и порядок упаковки [1361, 1819, 1820]. Гликолипиды, обнаруженные в мембранах клеток человека, претерпевают фазовые переходы в температурном интервале от 25 °С до 45 °С, а именно переход с ростом температуры из фазы геля через устойчивую кристаллическую фазу в фазу жидкого кристалла. Уменьшение коэффициента рассеяния, экспериментально наблюдаемое с ростом температуры, таким образом, согласуется с возрастанием текучести, которое, как известно, происходит в липидах с ростом температуры. Модификация структуры коллагеновых волокон дермы, вызванная возрастанием температуры, возможно через изменения гидратации, является наиболее приемлемым объяснением увеличения рассеивающих свойств [333, 334]. Как утверждается авторами работ [333, 334], обнаруженный положительный температурный коэффициент, по преимуществу для белковых тканей, и отрицательный — по преимуществу для липидных открывает интересные возможности в исследовании тканей, в которых отношение содержания белков и липидов промежуточное, например тканей мозга.

Температурные изменения коэффициента поглощения μ_a и приведенного коэффициента рассеяния μ'_s кожи предплечья человека были определены также в ходе исследований *in vivo* для двух значений температуры поверхности кожи, 22 °С и 38 °С [1271] (см. данные табл. 7.1). Довольно значительный рост μ_a , на 16–21 %, и намного более слабое увеличение μ'_s , на 2,7–4,6 %, были обнаружены при изменении температуры от 22 °С до 38 °С для длин волн 950–590 нм.

Низкоинтенсивное лазерное излучение, применяемое для спектроскопии (диагностики) или терапии, может нагревать биоткань и, следовательно, искажать результаты измерений оптических свойств ткани или индуцировать неконтролируемые изменения фотобиологического отклика ткани из-за локального нагрева. Рост температуры кожи человека при облучении лазером непрерывного действия можно оценить на основе экспериментальных и теоретических результатов, представленных в работах [323–325, 1660]. Экспериментально было обнаружено, что для лазерного излучения на длине волны 789 нм, направляемого на поверхность кожи предплечья добровольца посредством 1 мм оптического волокна, температура линейно возрастала с уровнем мощности как $(0,101 \pm 0,001) \text{ }^\circ\text{C}/\text{мВт}$ на глубине 0,5 мм, как $(0,038 \pm 0,001) \text{ }^\circ\text{C}/\text{мВт}$ на глубине 1 мм и как $(0,029 \pm 0,0005) \text{ }^\circ\text{C}/\text{мВт}$ на глубине 1,5 мм при мощности излучения до 10 мВт [1660].

Сочетание метода Монте-Карло для вычисления распределения плотности потока света и адаптивного метода конечных элементов для решения уравнения теплообмена было использовано для исследования процесса гипертермии, индуцированной путем чрескожного облучения He-Ne-лазером (633 нм) [323–325]. Было показано, что величина нагретого объема ткани, глубина и температура нагрева

эффективно контролируются выбором граничных условий свободно-конвективного типа на поверхности кожи, мощностью, радиусом и формой падающего лазерного пучка. Для моделирования была использована четырехслойная модель кожи человека (эпидермис, верхняя дерма, сплетение сосудов, нижняя дерма) с оптическими и теплофизическими параметрами, взятыми из литературы (см. табл. 1.1, 4.1, 7.1). Моделирование производилось для гауссовых и прямоугольных профилей пучка при интенсивностях, не вызывающих коагуляции. Меняя коэффициент теплопередачи A от режима свободной конвекции при начальной температуре поверхности кожи $34\text{ }^\circ\text{C}$, $A = 0,009\text{ Вт}/(\text{см}^2 \cdot \text{К})$, к режиму слабой, $A = 0,004\text{ Вт}/(\text{см}^2 \cdot \text{К})$, и сильной теплоизоляции, $A = 0,0005\text{ Вт}/(\text{см}^2 \cdot \text{К})$, исследовали влияние теплопроводности на распределение температуры в ткани. Для гауссова падающего пучка мощностью 25 мВт и диаметром 1 мм максимальная температура достигалась на глубине $0,20\text{ мм}$, $0,18\text{ мм}$ и $0,10\text{ мм}$ и была равна соответственно $36,7\text{ }^\circ\text{C}$, $41,3\text{ }^\circ\text{C}$ и $42,8\text{ }^\circ\text{C}$ для трех приведенных выше коэффициентов теплопередачи. На глубине 1 мм рассчитанная температура по мере роста степени изоляции составляла $37,7\text{ }^\circ\text{C}$, $38,1\text{ }^\circ\text{C}$ и $38,5\text{ }^\circ\text{C}$. Нужно заметить, что упоминавшиеся выше экспериментальные данные [1660] хорошо согласуются с результатами моделирования при граничных условиях свободно-конвективного типа на поверхности кожи. Из экспериментов следует, что для мощности лазерного пучка 25 мВт ожидаемый рост температуры на глубине 1 мм составляет $(0,038\text{ }^\circ\text{C}/\text{мВт}) \times 25\text{ мВт} = 0,95\text{ }^\circ\text{C}$. В свою очередь, расчет показывает, что под действием лазерного излучения температура возрастает от начального значения $36,4\text{ }^\circ\text{C}$ до $37,7\text{ }^\circ\text{C}$, т.е. на $1,1\text{ }^\circ\text{C}$. Несколько более высокое теоретическое значение можно объяснить более короткой длиной волны использованного в расчетах излучения, которое сильнее поглощается хромофорами ткани.

Потеря воды биотканью из-за температурных эффектов (замораживание в холодильнике или нагрев без коагуляции) существенно влияет на оптические свойства. Например, при исследовании *in vitro* аорты человека коэффициент поглощения возрастал на $20\text{--}50\%$, особенно в видимом диапазоне, когда в среднем $46,4\%$ полного веса ткани терялось в результате обезвоживания при длительном замораживании образца ткани в холодильнике [764, 765]. Потеря веса сопровождалась усадкой ткани в среднем на $19,5\%$ по толщине. Прежде всего из-за сжатия (более плотной упаковки компонентов ткани) коэффициент поглощения увеличивался в спектральном диапазоне $400\text{--}1300\text{ нм}$. Наблюдалось лишь слабое увеличение приведенного коэффициента рассеяния на $2\text{--}15\%$ в видимом диапазоне, также из-за более плотной упаковки компонентов ткани.

Наклон зависимости от длины волны приведенного коэффициента рассеяния μ'_s , который пропорционален λ^{-h} (см. соотношение (3.29)), является хорошим тестовым параметром, отражающим изменение морфологии ткани при нагреве или замораживании. В табл. 3.2 приведены экспериментальные значения параметра h для нормальной, дегидратированной и коагулированной аорты человека при исследованиях *in vitro* в спектральном диапазоне $400\text{--}1300\text{ нм}$ [764, 765]. Дегидратация ткани (путем медленного замораживания) увеличивает наклон (h) с $1,15$ (контроль) до $1,22$, что отражает более плотную упаковку рассеивающих элементов при сжатии ткани. Нагрев образца в течение 5 мин на бане из физиологического раствора при температурах, близких к порогу коагуляции ткани, может увеличить h , например для $60\text{ }^\circ\text{C}$ от $1,21$ (контроль) до $1,28$ (возможно, из-за локальной коагуляции белков), или уменьшить h , например для $70\text{ }^\circ\text{C}$ от $1,30$ (контроль) до $1,10$ (возможно, из-за более обширной коагуляции белков). Этот результат отражает тот факт, что денатурация коллагена начинает определять поведение ткани между $55\text{ }^\circ\text{C}$ и $70\text{ }^\circ\text{C}$ [764]. Из-за неоднородности ткани аорты ее компоненты могут достигать различных конечных состояний к концу 5-минутного нагрева. При нагревании до $100\text{ }^\circ\text{C}$ на бане из

физиологического раствора h сократилось с 1,38 (ткань в норме) до 1,06 (нагретая ткань), а для нагретых образцов, предварительно завернутых в алюминиевую фольгу, h уменьшалось с 1,26 до 1,03.

При нагревании ткани на бане может происходить увеличение коэффициента поглощения, достигающее 28 % (60 °С), или уменьшение, достигающее 22 % (70 °С), на выбранных длинах волн. В то же время приведенный коэффициент рассеяния всегда увеличивался при всех температурах нагрева, его увеличение находилось в широком диапазоне от 1,1 до 76 % в зависимости от длины волны, менявшейся в интервале от 350 до 1320 нм, и температуры нагрева. При температуре 60 °С рост был довольно плавным, 16–19 % в данном диапазоне длин волн. При 70 °С рост μ'_s не был столь плавным и менялся от 1,1 до 24,8 %. Нагрев до 100 °С давал рост приведенного коэффициента рассеяния до 22–76 %, однако обертывание ткани в фольгу снижало эти значения до 15–54 %. Такое сложное поведение рассеивающих и поглощающих свойств предкоагулированных и коагулированных тканей отражает их неоднородность, специфику процесса денатурации белков, приводящего к образованию грубых и мелких гранул термически коагулированного клеточного белка и повреждению некоторых хромофоров ткани, а также процессов взаимодействия нагретого физиологического раствора с тканью, приводящих к изменению скорости диффузии физиологического раствора и хромофоров [764].

Следуя работе [764]¹⁾, можно убедиться в том, что ткань переходит из нормального состояния в денатурированное между 60 °С и 70 °С и что при ~ 60 °С некоторые изменения в оптических свойствах, вызванные тепловым повреждением, все еще обратимы, даже если термический порог коагуляции белков превышен. В общем случае сложное поведение оптических свойств ткани при нагревании можно объяснить изменениями ее морфологии. Для моделирования оптических свойств нагретых тканей модификация морфологии выражается в таких понятиях, как изменение распределения размеров рассеивающих частиц, разности показателей преломления частиц и интерстициальной жидкости, упаковки частиц и концентрации хромофоров.

Нагрев длинными лазерными импульсами также может индуцировать обратимые и необратимые изменения оптических свойств ткани [765, 1662]. Полное пропускание убывает, а диффузное отражение растет у образцов как свежей, так и у предкоагулированной кожи человека и аорты собаки при облучении импульсами Nd:YAG-лазера с длительностью 0,2 мс, длиной волны 1064 нм, частотой повторения 10 Гц (20 импульсов по 0,9 Дж/импульс) и размером пятна 1,5 мм [765]. В целом поведение оптических характеристик носит нелинейный характер, возможные механизмы которого перечислены в табл. 9.6.

При облучении *in vitro* слоя искусственной ткани (имплантат кожи), единичным импульсом лазера на перовските ($\lambda = 1341$ нм) с плотностью энергии 20 Дж/см² и длительностью 20 мс были обнаружены области термического повреждения, характеризующиеся пониженным рассеянием, что было видно на ОКТ-изображениях, и в виде потери ГВГ-сигнала [1662]. Такое поведение было интерпретировано авторами работы [1662] как дезинтеграция коллагеновых волокон при термической денатурации белков ткани, которая может восстанавливаться при заживлении ткани.

Лазерная абляция или коагуляция обычно сопровождается изменением нормальных оптических свойств ткани [765, 1712]. Например, абляция ткани аорты с использованием эксимерного лазера (308 нм) приводит к росту оптической плотности в 2,3–3,7 раза по сравнению с необработанным материалом [1712]. Опубликованные результаты по оптическим свойствам коагулированных тканей представлены

¹⁾ Поправки представлены в работе [3, с. 379].

Таблица 9.6

Возможные механизмы, ответственные за обратимые изменения в оптическом отклике биологических тканей на лазерное воздействие с длинным импульсом [765]

Механизм	Описание	Оптический отклик
Тепловая линза: $n(T) = n(273 \text{ K}) + \Delta T(r, z, t)(dn/dT)$	Возникновение градиента показателя преломления за счет неоднородного нагрева	Уменьшение T_t и увеличение R_d
Температурная зависимость приведенного коэффициента рассеяния: $\mu'_s(T) = \mu_s(T)[1 - g(T)]$	Изменения размеров и/или формы рассеивателей за счет увеличения температуры	Увеличение T_t и уменьшение R_d (поскольку μ'_s уменьшается)
Транспорт воды	Временная локальная дегидратация в течение лазерного нагрева	Увеличение T_t и уменьшение R_d
Тепловое расширение	Уменьшение плотности ткани и увеличение ее толщины за счет теплового расширения	Уменьшение T_t и увеличение R_d

в табл. 7.1. Несмотря на некоторые вариации в зависимости от типа ткани, длины волны и технологии приготовления образцов, общая тенденция состоит в увеличении коэффициентов как рассеяния, так и поглощения на величину от нескольких десятков до двух–трех сотен процентов при коагуляции тканей.

Температуры ниже физиологической (+12 °С) иногда вызывают так называемую холодовую катаракту, т. е. резкое увеличение коэффициента рассеяния из-за агрегации белков [1470, 1681]. Этот процесс обратим при повышении температуры.

Криогенные температуры, используемые в криохирургии, также могут менять рассеивающие свойства биоткани из-за локальных изменений показателя преломления, например на границе между жидкой и замороженной водой в ткани [1669]. Соответствующие подповерхностные морфологические изменения ткани наблюдались при замораживании до –80 °С кожи хомяка *in vivo*.

Отметим, что дегидратация биоткани за счет тепловой обработка (подсушивание на воздухе или в потоке теплого воздуха) [178, 1386, 1752] или ее лиофилизация при вымораживании [1857] используется для выявления механизмов просветления и структурных особенностей биотканей.

9.9.3. Отбеливание ткани. Иногда для обеспечения более контрастного изображения внутриклеточных компонентов эпителиальных тканей вместо оптического просветления предпочтительнее использовать индуцированное увеличение мутности (отбеливание) [1663–1671, 1679, 1812–1814]. Например, фундаментальной частью кольпоскопического обследования является использование уксусной кислоты, при нанесении которой на шейку матки возникают временные эффекты отбеливания в эпителиальных тканях [1668]. Пространственные и временные вариации отбеливания под действием уксусной кислоты являются основой визуальной диагностики при определении локализации наиболее тяжелых диспластических изменений. Этот эффект создает дифференциальную яркость диспластической ткани по сравнению с нормальной и кроме заболеваний шейки матки используется для скрининга кожи и других эпителиальных тканей.

Повышенная яркость ядер усиливает контраст и заметно улучшает выявляемость морфологических изменений ядер при раковых поражениях базальных клеток [1671]. При нормальных условиях ядро клетки содержит диффузную сеть тонких хромати-

новых волокон, имеющих типичный диаметр 30–100 нм и занимающих небольшой объем внутри. Из-за малых размеров и небольшой разницы между показателем преломления хроматина, который может быть оценен как 1,39, и показателем преломления окружающих компонентов (цитоплазмы клетки и интерстициальной жидкости), равным примерно 1,35, ее вклад в обратное рассеяние мал. Уксусная кислота вызывает объединение хроматина в толстые волокна диаметром 1–5 мкм; уплотненный хроматин заполняет значительную часть внутриядерного объема [1671], вероятно также некоторое увеличение его показателя преломления [1668], поэтому сигнал обратного рассеяния от ядер увеличивается и они выглядят более яркими. После промывания образцов *ex vivo* эпидермиса человека 5%-м раствором уксусной кислоты в течение трех минут ядра клеток эпителия выглядят яркими на изображениях, полученных методом отражательной конфокальной микроскопии [1671].

Временная кинетика процесса отбеливания уксусной кислотой, измеренная по отраженному свету, показывает максимальный уровень сигнала в течение первых 1–2 мин с дальнейшим уменьшением в течение последующих 5–10 мин. Это позволяет ясно отличить развитую внутриэпителиальную неоплазию шейки матки (CIN 2/3) от нормально цервикального эпителия при анализе отношения интенсивностей рассеянного назад зеленого и синего света [1668]. Нормировка отражения зеленого света на отражение красного сохраняет кинетику в отраженном сигнале, указывая на то, что отраженный свет претерпевает спектральные изменения. Отбеливание уксусной кислотой в CIN 2/3 цервикальной ткани *in vivo* вызывает рост исходной отражательной способности на 20–80%. Напротив, зрелый чешуйчатый эпителий показывает рост отражения лишь примерно на 5%, более того отражательная способность постоянна во времени после применения уксусной кислоты.

9.10. Заключение

Эта глава показывает, что технология оптической иммерсии позволяет эффективно управлять оптическими свойствами биотканей и крови. Такое управление приводит к существенному сокращению рассеяния и, как следствие, вызывает намного более высокое пропускание (оптическое просветление), появление большого количества минимально рассеянных (снейк) и баллистических фотонов, позволяющих успешно применять когерентные и поляризационные методы получения изображений. Кинетика оптического просветления, определяемая кинетикой согласования показателей преломления, характеризуется временем отклика 5–30 мин, которое, в свою очередь, зависит от скорости диффузии иммерсионного агента в слое ткани, скорости диффузии воды и толщины слоя ткани. Набухание и сжатие тканей и клеток может играть важную роль в процессе просветления ткани при применении гиперосмотических жидкостей.

Отражательная спектрофотометрия и модуляционные измерения для тканей *in vivo* при иммерсии показывают, что методика согласования показателей преломления с применением соответствующего просветляющего агента может успешно использоваться в спектроскопии и визуализации тканей и органов, когда требуется радикальное ослабление рассеяния. Гипердермальная инъекция глюкозы вызывает существенное просветление кожи человека. Для таких тканей, как склера или роговица, нескольких капель разбавленной водой глюкозы или глицерина достаточно для обеспечения сильного и продолжительного просветления. В экспериментах *in vivo* пропитывание тканей ОПА более эффективно, чем при исследовании *in vitro*, из-за более высокой скорости диффузии агента при физиологической температуре и вовлечения кровеносных и лимфатических микрососудов в процесс распределения агента.

Однако в этом случае в измеренных спектрах возможны изменения под действием некоторых физиологических реакций живых тканей на гиперосмотические растворы.

Специфическую кинетику оптических характеристик можно использовать для определения коэффициента диффузии и концентрации эндогенных (метаболических) и экзогенных (просветляющие агенты) жидкостей в склере, коже и других тканях человека. Это особенно важно при идентификации здоровой и патологической тканей, кинетики которых существенно различаются.

Иммерсионный метод имеет большие потенциальные возможности в неинвазивной медицинской диагностике с использованием ОКТ из-за малой толщины слоев ткани, обычно исследуемых в ОКТ, что позволяет быстро пропитывать нужный участок ткани при местном применении иммерсионной жидкости. Известно, что обычно ОКТ позволяет получать изображения внутренних тканей организма, таких как стенка кровеносного сосуда, пищевод, желудок, шейка матки и толстая кишка, на глубину около 1–2 мм. Иммерсионное оптическое просветление может обеспечить в два–три раза большую глубину зондирования, что существенно для эффективной диагностики с применением ОКТ.

Метод просветления ткани удобен, прост и дешев для диагностических целей, в частности, его можно применять для мониторинга *in vivo* микроциркуляции крови. Он может быть полезен для изучения структуры и функции кровеносных микрососудов — диаметров артериол и венул, плотности капилляров, углов бифуркации и т. д.

Оптическое просветление перспективно в различных методах линейной и нелинейной спектроскопии, микроскопии и визуализации тканей (КР, конфокальной, флуоресцентной, лазерной сканирующей, ближнепольной, многофотонной, ГВГ и др.), возможности которых сильно ограничены из-за рассеяния света. Важные результаты были получены по усилению флуоресцентного сигнала при оптической иммерсии ткани. Важно отметить, что ослабление рассеяния света может помочь при дифференциации различных флуорофоров в глубине ткани, например кожи.

В экспериментах *in vitro* доказано, что согласование показателей преломления может улучшить оптическую глубину проникновения для цельной крови. Нужно учитывать, что оптическое просветление крови определяется не только эффектом согласования показателей преломления, но и изменениями размеров эритроцитов и их способностью к агрегации при добавлении химических агентов.

Многие исследованные агенты и методы их доставки имеют свои преимущества и недостатки. Главным недостатком является осмотический стресс, который происходит при высоких концентрациях гиперосмотического агента и низкой проницаемости клеточных структур ткани для просветляющих агентов. Поэтому необходимы поиски новых агентов и способов их доставки.

Концепция и технология оптического просветления применима не только к мягким тканям и крови, но также и к твердым тканям. К настоящему времени были исследованы сухожилия [621, 622, 1578] (см. рис. 9.38), кости черепа [1342, 1343, 1784, 1860], зубы [750, 751, 1341, 1705] и ногти [1235].

В заключение отметим, что помимо иммерсионного и компрессионного просветления биотканей разрабатываются более сложные оптические методы подавления рассеяния и улучшения качества изображений биотканей за счет применения метода обращения волнового фронта (optical phase conjugation) [1612, 1882, 1883], интенсивно развиваемого на протяжении последних десятилетий для технических применений [1884].

Часть II

**МЕТОДЫ РАССЕЯНИЯ СВЕТА
И МЕДИЦИНСКАЯ ДИАГНОСТИКА**

СПЕКТРОСКОПИЯ И ВИЗУАЛИЗАЦИЯ БИОТКАНЕЙ В СТАЦИОНАРНОМ РЕЖИМЕ

Обсуждаются особенности оптического спектрального диффузионного метода и спектроскопии рассеяния. Представлены два типа методов и измерительных устройств: спектроскопические — для мониторинга локальных параметров биологических тканей — и томографические — для получения изображений их структурных или функциональных изменений. Описан ряд методов, основанных на зондировании биоткани светом от источника с постоянной интенсивностью. Представлено несколько примеров измерительных и визуализирующих устройств, работающих в непрерывном режиме, и результаты соответствующих клинических исследований.

10.1. Методы и устройства для *in vivo* спектроскопии и визуализации биотканей

Для исследования *in vivo* объемных биотканей (например, тканей молочной железы) коллимированное пропускание света можно описать экспоненциальным законом, аналогичным уравнению (1.1), однако необходимо учесть, что из-за многократного рассеяния эффективный путь миграции фотона, прежде чем он будет поглощен, должен быть больше, чем толщина биоткани [414]. Для слоя толщиной d можно использовать диффузионное уравнение для получения средней длины пробега L фотонов [398]:

$$L = \frac{\mu_{\text{eff}}}{2\mu_a\mu'_s} \cdot \frac{(\mu'_s d - 1) \exp\left(\frac{2\mu_{\text{eff}}}{\mu'_s}\right) - (\mu'_s d + 1)}{\exp\left(\frac{2\mu_{\text{eff}}}{\mu'_s}\right) - 1}, \quad (10.1)$$

где μ_{eff} определяется формулой (1.18). Используя уравнение (1.1) для согласованных границ ($n = 1$), можно записать коллимированное пропускание в виде [414]

$$T_c(\lambda) = x_1 \exp[-\mu_a(\lambda)L(\lambda)x_2], \quad (10.2)$$

где $L(\lambda)$ отражает зависимость $\mu_a(\lambda)$ и $\mu'_s(\lambda)$ от длины волны; x_1 учитывает многократно рассеянные, но не поглощенные фотоны, которые не попадают на приемник, а также геометрию измерений, а x_2 компенсирует ошибку измерения толщины d и неточность приведенного коэффициента рассеяния μ'_s .

Полуэмпирическая формула (10.2) успешно применялась для подгонки по данным измерений *in vivo* спектров пропускания молочной железы и оценки концентраций основных поглотителей: воды (H_2O), жира (f), деоксигемоглобина (Hb) и оксигемоглобина (HbO_2) [414]:

$$\mu_a = c_{\text{H}_2\text{O}}\sigma_{\text{H}_2\text{O}} + c_f\sigma_f + c_{\text{Hb}}\sigma_{\text{Hb}} + c_{\text{HbO}_2}\sigma_{\text{HbO}_2}, \quad (10.3)$$

где σ_i — сечение поглощения i -го компонента.

Посредством вариации концентраций четырех компонентов биоткани авторы работы [414] успешно аппроксимировали измеренные спектры формулой (10.2) с коэффициентами корреляции лучше 0,99. На рис. 10.1. показан спектрометр для измерений *in vivo* спектров коллимированного пропускания молочной железы и некоторые примеры измеренных и подогнанных спектров для нормальной и патологической (раковая опухоль) ткани. В типичном случае спектры при карциноме демонстрируют меньшее пропускание, чем контрольные спектры (здоровая ткань при той же толщине молочной железы). Результаты подгонки показывают, что это, как правило, связано с повышением перфузии биоткани кровью (более высокие значения отношения Hb/HbO_2 при карциноме). В диапазоне длин волн от 900 до 1000 нм спектры сильно различаются из-за измененного содержания воды и жира в карциноме по сравнению со здоровой тканью молочной железы. Большинство мастопатий и карцином демонстрируют повышенную концентрацию воды и больший объем крови в области поражения. Сравнение здоровых и раковых участков дает слегка более низкую концентрацию оксигемоглобина для опухоли. К сожалению, полученная специфичность недостаточна, поскольку не удается отличить доброкачественную мастопатию от злокачественной карциномы по содержанию воды, объему крови и степени оксигенации [414]. Более поздние исследования показывают, что один из возможных путей дифференциации злокачественной и доброкачественной опухоли оптическим методом — это более тонкое определение содержания воды с нахождением относительного содержания свободной и связанной воды в биоткани. Например, для рака молочной железы экспериментально было обнаружено, что патологические ткани содержат больше свободной воды, чем связанной, а индекс содержания связанной воды обратно пропорционален гистологической градации роста опухоли [1885]. Один из спектроскопических методов определения свободной и связанной воды в коже описан в разд. 9.4.3.

Спектрометрия пропускания в ближнем ИК-диапазоне наиболее успешна в своем применении к исследованию головы новорожденных с целью определения степени оксигенации головного мозга, что обусловлено в значительной степени малостью размеров головы, тонкостью внешних тканей и черепа и сравнительно невысоким коэффициентом рассеяния мозга младенца [55, 511, 542]. Разработка охлаждаемых ПЗС-матриц, быстрое развитие методов и аппаратуры, обеспечивающих необходимое пространственное и временное разрешение существенно расширили область исследований и медицинских приложений спектроскопии ближнего ИК-диапазона. В настоящее время имеется более 500 промышленных клинических приборов спектроскопии ближнего ИК-диапазона для мониторинга и визуализации пространственного распределения степени оксигенации, концентрации окисленных цитохромов и гемодинамики биотканей.

Для многих тканей измерения *in vivo* возможны только в геометрии обратного рассеяния. Соответствующие соотношения можно записать на основе диффузионного приближения. Для полубесконечной среды при расположении облучающего и приемного оптических волоконных световодов (ВС) нормально к поверхности образца на расстоянии r_{sd} между центрами торцов ВС (см. рис. 10.2) и согласованных показателях преломления биоткани и материала ВС (зеркальным отражением на поверхности можно пренебречь) отраженный поток дается выражением (7.13) [1275]. Более общее выражение, справедливое в условиях рассогласования показателей преломления, представлено формулой (1.33) [297, 298].

Для спектроскопии и томографии рассеяния назад, кроме измеренного коэффициента отражения, определенного формулами (1.33) и (7.13), нужно знать, с какой глубины приходит оптический сигнал. Эта глубина определяется функцией распределения траекторий, мигрирующих от источника к приемнику фотонов [1886, 1887].

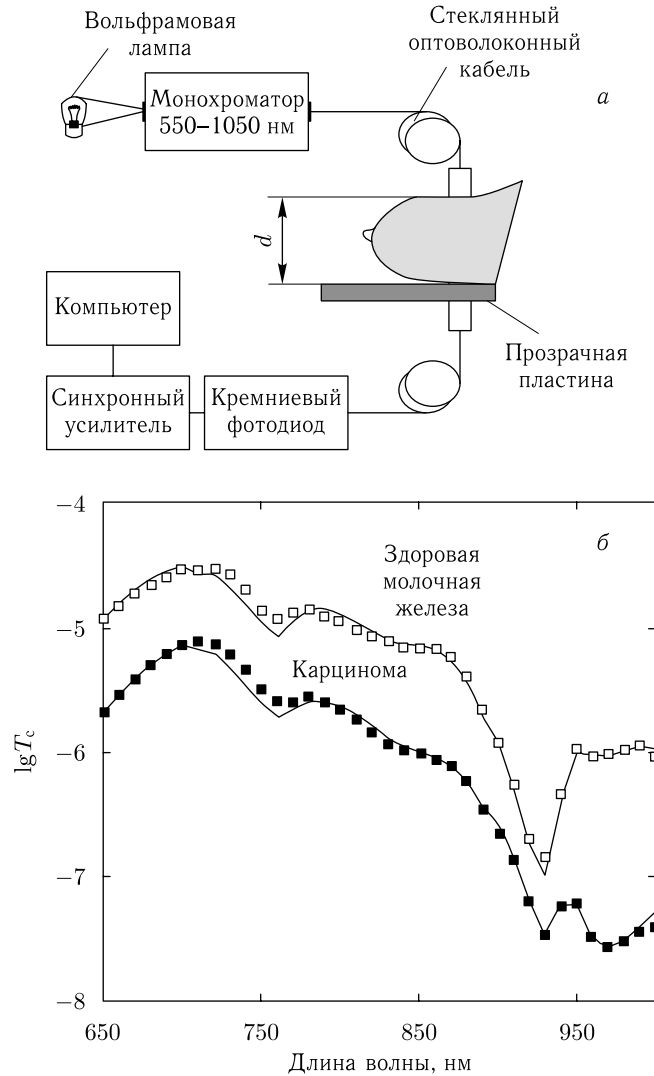


Рис. 10.1. Схема спектрофотометрической системы для измерений *in vivo* спектров пропускания тканей молочной железы (а) [414]. Экспериментальные спектры и спектры, полученные путем соответствующей теоретической подгонки параметров, снятые для молочной железы с раковой опухолью внутри области карцинома и для здоровой железы той же пациентки в такой же области, где была обнаружена карцинома (56 лет, толщина груди 60 мм) (б)

Это пространственное распределение для однородной рассеивающей среды имеет форму «банана» (см. рис. 10.2 б). В пределе слабого поглощения средняя линия «банана» (линия наиболее вероятного направления миграции фотонов) описывается уравнением [1886, 1887]:

$$z \approx \left[\frac{1}{8} \left(\left\{ \left[x^2 + (r_{sd} - x)^2 \right]^2 + 32x^2(r_{sd} - x)^2 \right\}^{1/2} - x^2 - (r_{sd} - x)^2 \right) \right]^{1/2}, \quad (10.4)$$

$$0 \leq x \leq r_{sd}.$$

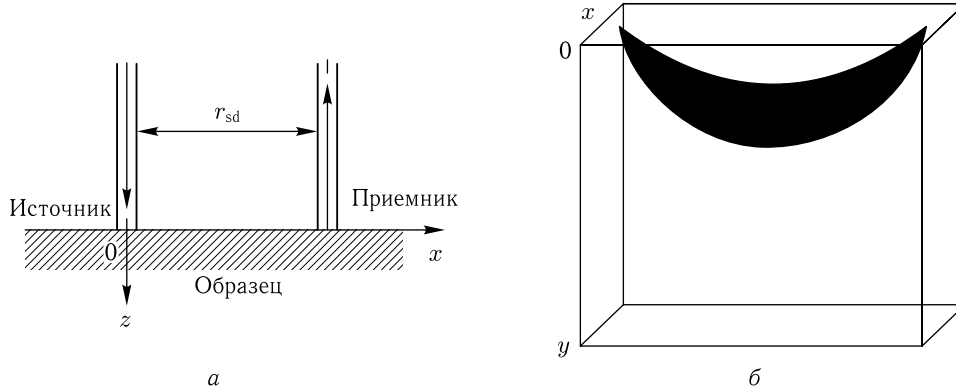


Рис. 10.2. Геометрия волоконно-оптического эксперимента по исследованию рассеяния назад для модели полубесконечной среды (а) и «бананоподобная» область распределения траекторий фотонов (б) [1886, 1887]

При $x = r_{sd}/2$ средняя линия «банана» достигает наибольшей глубины:

$$z^{\max} \approx \frac{r_{sd}}{2\sqrt{2}}. \quad (10.5)$$

Вместо соотношения (10.2), справедливого для описания исследований *in vivo* при просвечивании биоткани или органа, используя формулы (7.13) и (10.4), можно записать модифицированный закон Беера–Ламберта для описания оптического ослабления в геометрии отражения [1886, 1887]:

$$\frac{I}{I_0} = \exp(-\varepsilon_{ab}c_{ab}r_{sd}DPF - G_s), \quad (10.6)$$

где I_0 — интенсивность падающего света, I — интенсивность регистрируемого света, ε_{ab} — коэффициент поглощения в $\text{мкмоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, c_{ab} — концентрация поглотителя в мкмоль , r_{sd} — расстояние между источником света и приемником, DPF — дифференциальный фактор длины пути, учитывающий рост протяженности пути миграции фотона из-за рассеяния, и G_s — фактор ослабления, учитывающий рассеяние и геометрию биоткани.

При условии, что r_{sd} , DPF и G не меняются при проведении измерений, например, при оценке полного гемоглобина или степени его оксигенации в биоткани, изменения концентрации поглощающей среды можно вычислить по измеренным изменениям оптической плотности (OD), $\Delta(\text{OD}) = \Delta[\lg(I_0/I)]$:

$$\Delta c_{ab} = \frac{\Delta(\text{OD})}{\varepsilon_{ab}r_{sd}DPF}. \quad (10.7)$$

При оптической визуализации измеряют изменения оптической плотности [499, 1886, 1887]

$$\Delta(\text{OD}) = \lg\left(\frac{I_0}{I_{\text{test}}}\right) - \lg\left(\frac{I_0}{I_{\text{rest}}}\right) = \lg(I_{\text{rest}}) - \lg(I_{\text{test}}), \quad (10.8)$$

где I_{rest} и I_{test} — интенсивность света, регистрируемая, когда объект (например, мозг или скелетная мышца) находится в состоянии покоя и когда он подвергается тесту (например, индуцированная активность мозга — воздействие холодом на конечности или зрительный тест, физическая нагрузка на мышцу). Например, на основе регистрации пространственно-зависимых изменений OD на длинах волн 760 и 850 нм можно получить изображения в виде пространственного распределения

поглощательной способности биоткани на этих двух длинах волн или в виде функционального изображения (распределение степени оксигенации гемоглобина (oxy) и объема крови — полного гемоглобина ($total$)) в соответствии с алгоритмом:

$$\Delta(OD)_{oxy} = \Delta(OD)_{850} - \Delta(OD)_{760}, \quad (10.9)$$

$$\Delta(OD)_{total} = \Delta(OD)_{850} + k_{bvo}\Delta(OD)_{760}, \quad (10.10)$$

где $(OD)_{850}$ и $(OD)_{760}$ — оптические плотности, измеренные на длинах волн 850 и 760 нм, а k_{bvo} — модифицирующий фактор, позволяющий снизить влияние перекрестных помех между изменениями объема крови и степени оксигенации. Этот фактор определяется при калибровке на образцах крови.

Спектры поглощения окси- и дезоксигемоглобина и воды в ближней ИК-области представлены на рис. 10.3 [4]. Полоса воды на длине волны вблизи 980 нм может быть использована как внутренний эталон для оценки абсолютных концентраций компонентов крови в биоткани *in vivo*, поскольку содержание воды в биоткани меняется сравнительно медленно и его можно определить независимо с помощью других неинвазивных методов или при биопсии уже после проведенного исследования в динамике [466, 1888, 1889].

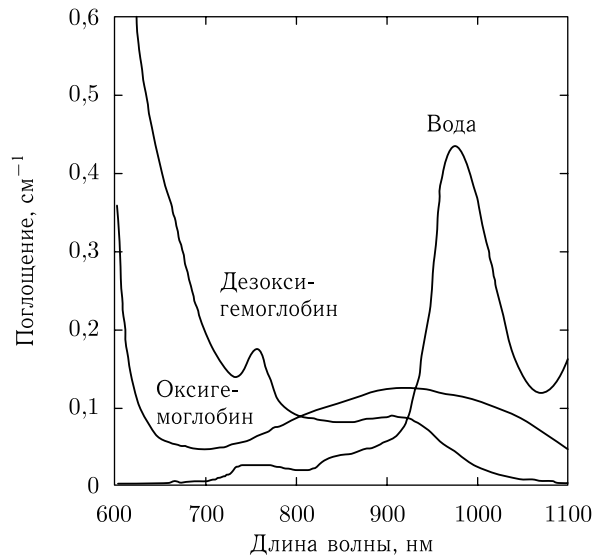


Рис. 10.3. Спектры поглощения трех доминирующих хромофоров биотканей в ближней ИК-области: окси- и дезоксигемоглобина и воды; концентрация как окси- так и дезоксигемоглобина взята равной 50 мкМ, что соответствует типичным значениям для кровоснабжаемых биотканей [429]

10.2. Пример системы для спектроскопии биотканей

Типичная экспериментальная система для спектроскопии обратного рассеяния *in vivo* и соответствующие спектры нормальных и патологических тканей показаны на рис. 10.4 [47, 94, 95]. Рисунок 10.4 б представляет пример спектров, снятых на толстой кишке одного пациента. Полосы поглощения принадлежат оксигемоглобину (ясно видны полосы *Sore* и *Q*-полосы). Участок 400–440 нм содержит полосу *Sore*

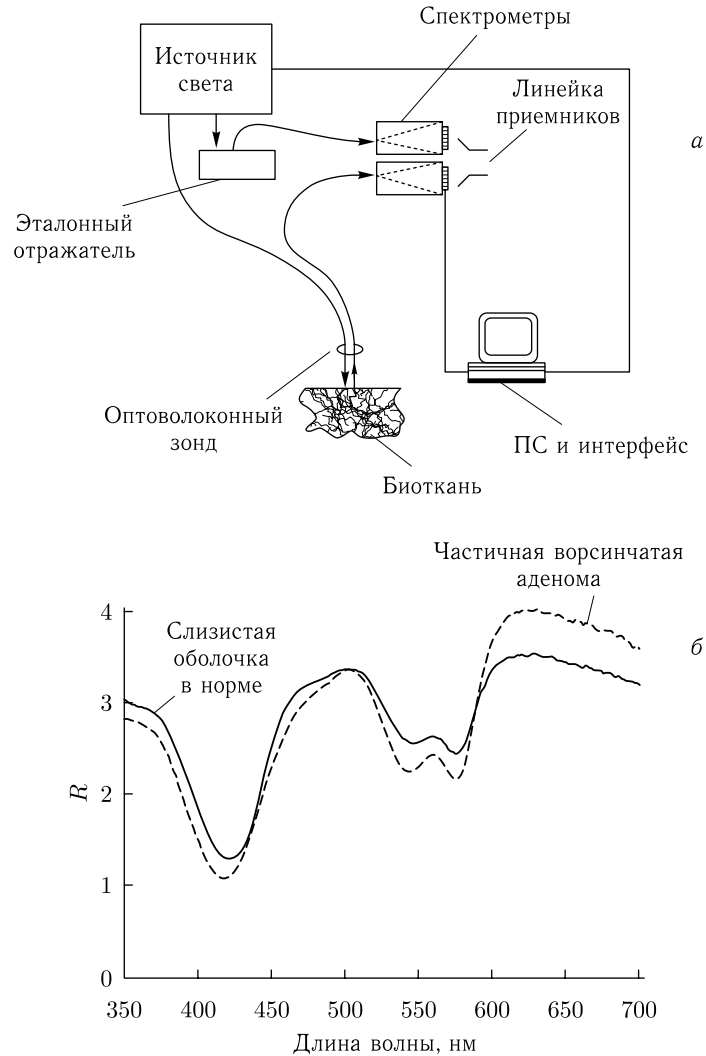


Рис. 10.4. Схема экспериментальной системы для измерения спектров отражения внутренних органов *in vivo* (а) [47]. Типичные спектры биотканей, показанные в качестве примера для двух различных измерений в толстой кишке одного пациента (спектры были нормированы на один и тот же полный сигнал, проинтегрированный от 350 до 700 нм) (б)

гемоглобина, но показывает также некоторое поглощение от таких соединений, как флавиномононуклеотид, бета-каротин, билирубин и цитохромы. Участок 540–580 нм соответствует Q -полосе поглощения гемоглобина с минимальным поглощением за счет цитохромов и других компонентов. На основе измерения спектральных различий между нормальной и патологической тканью можно предложить соответствующие спектральные «идентификаторы». Такие спектральные «идентификаторы» для медицинской диагностики *in vivo* обычно используют отношения коэффициентов отражения, проинтегрированные по выбранным спектральным полосам, или крутизну спектра выбранных полос.

В литературе описано много разнообразных систем для диффузионной спектроскопии или «оптической биопсии» различных патологий биотканей и органов на основе источников непрерывного излучения [1, 3, 5, 6, 10, 14, 16, 23, 32, 33, 47, 50, 55, 88, 89, 91, 100, 129, 130, 134, 169, 174, 183, 196, 197, 206, 369, 466, 499, 511, 539, 1313, 1315, 1889–1899]. Современные тенденции мультимодальности медицинских диагностических технологий и устройств нашли свое воплощение и в диффузионной спектроскопии, которая используется совместно, например, с магниторезонансной томографией (МРТ) [1895], КР-спектроскопией [1897] или флуоресцентной визуализацией с разрешением во времени [1892]. Неинвазивная оксиметрия [511, 466, 1889, 1890, 1894, 1898], региональный мониторинг полного гемоглобина [1896] или содержания каротиноидов в коже [1319, 1897], диагностика рака молочной железы [1891] и рака кожи [1892], диагностика атеросклеротических бляшек [1898] находятся в центре внимания исследователей. Кроме отражательной диффузионной спектроскопии широко используется флуоресцентная диффузионная спектроскопия при возбуждении эндогенных или экзогенных флуорофоров (см. например, работы [129, 130, 134, 147, 206, 466, 511, 1058, 1059]).

10.3. Пример системы визуализации

В спектроскопической системе, перекрывающей весь ближний ИК-диапазон, которая описана в работе [1899], голова человека освещается светом галогеновой лампы, излучающей непрерывный спектр (см. рис. 10.5 а). Свет, рассеянный назад, регистрируется и подвергается спектральному анализу с помощью промышленного спектрографа на основе дифракционной решетки с ПЗС-приемником, охлаждаемым жидким азотом. Система обеспечивает спектральное разрешение 5 нм в диапазоне 700–1000 нм; спектры снимаются через каждые 100 мс. Рисунок 10.5 б иллюстрирует изображение, полученное с помощью этого оптического устройства и алгоритма, описываемого формулами (10.9) и (10.10). Он показывает фокальный рост полного гемоглобина в ответ на зрительную стимуляцию стационарным многоцветным додекаэдром. Область пикового отклика четко сфокусирована и имеет размеры примерно $0,5 \times 0,5$ см.

В литературе описано много простых и надежных схем для оптической отражательной диффузионной визуализации различных патологий биотканей на основе источников непрерывного излучения [1, 3, 6, 14, 23, 32, 33, 55, 88, 89, 129, 130, 139, 183, 196, 197, 206, 466, 511, 532, 1900–1903]. Также широко используется флуоресцентная диффузионная флуоресцентная визуализация при возбуждении эндогенных или экзогенных флуорофоров (см., например, работы [129, 130, 134, 147, 206, 466, 511, 954, 1058, 1059, 1900, 1901, 1904]).

10.4. Спектроскопия рассеяния света

Спектроскопия рассеяния света (СПС) обеспечивает структурную и функциональную информацию о биологической ткани. Эта информация, в свою очередь, может быть использована для диагностики и мониторинга заболеваний. Такой метод идентификации и характеристики патологических изменений биологических тканей дает информацию на клеточном и субклеточном уровне [47, 61, 94, 95, 129, 130,

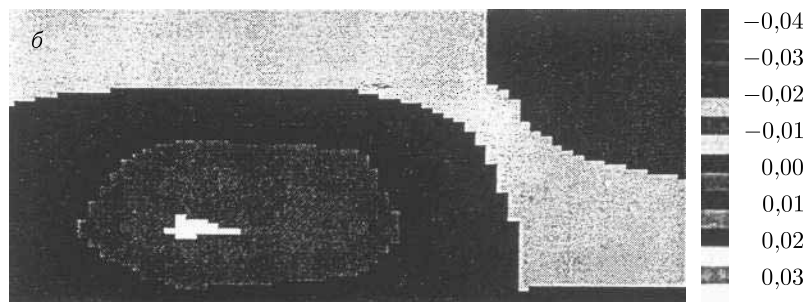
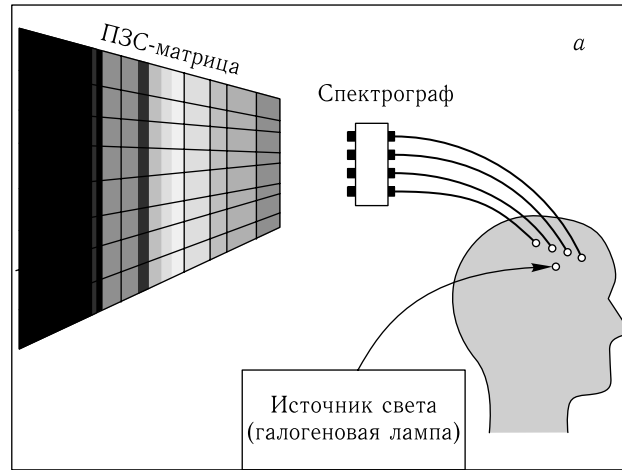


Рис. 10.5. Спектроскопическая БИК-система визуализации с ПЗС-матрицей (а) [1899]. Функциональное изображение изменения объема крови (полного гемоглобина) (см. соотношения (10.9) и (10.10)) во время зрительной стимуляции (стационарный додекаэдр), регистрируемое в области затылочной коры головного мозга (б)

216, 236, 272, 662, 791, 809, 825, 1163, 1326–1330, 1905, 1906]. Одним из важных приложений биомедицинской спектроскопии является, например, неинвазивное обнаружение ранних стадий эпителиального рака человека [272, 825, 1163, 1327–1329, 1905, 1906]. Увеличение, уплотнение и гиперхроматичность клеточных ядер являются общими признаками всех типов предраковых и ранних раковых состояний. СРС можно использовать для обнаружения ранних структурных изменений биоткани, связанных с появлением раковых клеток и другими заболеваниями, в различных органах, таких как пищевод, толстая кишка, шейка матки, полость рта, легкие и мочевого пузыря [825, 1163, 1328, 1329, 1905, 1906]. Ранняя диагностика катаракты хрусталика глаза и других офтальмологических заболеваний также может осуществляться с помощью СРС [809].

Клетки и биоткани имеют сложную структуру с весьма широким разбросом размеров рассеивающих элементов: от нескольких нанометров до 7–10 мкм (размер ядра клетки) и до 20–50 мкм (размер самой клетки). Большинство субклеточных органелл неоднородны и имеют сложную форму и структуру, тем не менее, их можно рассматривать как рассеивающие «частицы» (см. гл. 1). Разнообразные структуры

клеточных органелл малы по сравнению с длиной волны. Рассеяние света такими частицами известно как рэлеевское рассеяние и характеризуется широким угловым распределением, а также зависимостью сечения от линейного размера частицы a как a^6 и от длины волны света λ как λ^{-4} . Когда частица недостаточно мала, можно использовать теорию связанных диполей или другие подходы типа приближения Рэля–Ганса (ПРГ). ПРГ особенно хорошо применимо к частицам, размеры которых сравнимы с длиной волны, и может быть полезным при изучении рассеяния света малыми органеллами, такими как митохондрии, лизосомы и т. п. В ПРГ преобладает рассеяние в направлении вперед, полная рассеянная интенсивность растет с ростом относительного показателя преломления частицы m как $(m - 1)^2$, а с ее размером как a^6 .

Рассеяние света частицей, размеры которой много больше длины волны, например ядром клетки, можно описать в рамках приближения Ван де Хюльста, которое позволяет получить амплитуды рассеяния в направлениях, близких к направлению вперед (см. формулу (7.28)). Для крупных частиц диаграмма направленности рассеяния сильно вытянута вперед, ширина ее первого (главного) лепестка примерно λ/a ; чем крупнее частица, тем интенсивнее и уже первый лепесток. Интенсивность рассеяния вперед испытывает колебания с изменением длины волны. Происхождение этих колебаний связано с интерференцией лучей света, проходящих через центр частицы, с лучами, не взаимодействующими с ней. Частота этих колебаний пропорциональна $a(m - 1)$, так что она растет с увеличением размера частицы и ее показателя преломления. Интенсивность рассеянного света имеет пик также в обратном направлении, однако этот пик значительно меньше, чем направленный вперед.

Эти результаты хорошо согласуются с результатами строгой теории, разработанной для сферических частиц (теорией Ми) [214]. Для дискриминации особенностей клеточной структуры, связанных с патологией, можно использовать различие в рассеянии света. Структуры крупных размеров с высоким показателем преломления дают пики интенсивности рассеянного света в прямом и обратном направлениях, в отличие от более мелких и оптически «мягких» структур, рассеивающих свет более равномерно. Перельман и др. [216, 272, 1163, 1327] изучали упругое рассеяние света от плотно упакованных слоев нормальных и опухолевых (Т84) клеток кишечника человека в препарате на предметном стекле в буферном растворе (см. рис. 1.2). Диаметры нормальных клеток лежали в интервале от 5 до 7 мкм, а клеток опухоли — от 7 до 16 мкм. Отражательная способность образцов демонстрировала четкие спектральные особенности. Предсказания теории Ми подгонялись под наблюдаемый спектр. Процедура подгонки включала три параметра: средний размер ядра, стандартное отклонение размера (предполагалось гауссово распределение по размерам) и относительный показатель преломления. Сплошная линия на рис. 10.6 — распределение, извлеченное из данных, а штриховая линия — соответствующее распределение размеров, измеренное с помощью оптической микроскопии. Рассчитанные и измеренные распределения, как для нормальных образцов клеток, так и для клеток Т84, хорошо согласуются друг с другом, что отражает правильность описанной выше физической картины и хорошую точность метода извлечения информации.

В биологических тканях фотоны, возвратившиеся после одного акта рассеяния в направлениях, близких к направлению назад, образуют так называемую однократно рассеянную компоненту. Фотоны, возвратившиеся после многократных актов рассеяния, обеспечивают диффузное отражение. Спектры как однократно рассеянного, так и диффузного сигналов содержат ценную информацию о свойствах биоткани; однако это информация различного типа. Однократно рассеянная компонента чувствительна к морфологии верхнего слоя клеток, который для любой слизистой

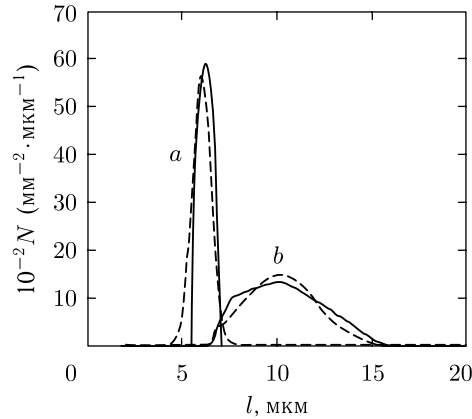


Рис. 10.6. Распределение размеров ядер в образцах, представленных на рис. 1.2: *a* — нормальные клетки кишечника; *b* — раковые клетки Т84. В каждом случае сплошная линия — распределение, реконструированное из экспериментальных данных с использованием теории Ми, а штриховая линия — распределение, измеренное с помощью оптической микроскопии (из работы [272])

оболочки почти всегда включает эпителий или ограничен им. Ее спектроскопические особенности связаны с микроархитектурой эпителиальных клеток, размером, формой и показателем преломления их органелл, включений, компонентов и неоднородностей внутри органелл. Поэтому анализ этой компоненты может быть полезен при диагностике заболеваний, ограниченных эпителием, таких как прединвазивные стадии эпителиальных раков, дисплазий и карцином *in situ* (CIS) [825, 1163, 1328, 1329, 1905, 1906]. Диффузная компонента также содержит информацию о рассеивающих и поглощающих центрах в биоткани, соответствующие диагностические возможности обсуждались выше в данной главе и сводятся в основном к определению содержания гемоглобина в биоткани и его насыщению кислородом.

Однократно рассеянная компонента более важна при диагностике начальных стадий предраковых поражений эпителия, тогда как диффузная компонента несет ценную информацию о более развитых стадиях заболевания. Однако акты однократного рассеяния нельзя непосредственно наблюдать в тканях *in vivo*, поскольку лишь незначительная часть падающего света рассеивается точно назад. Для выделения однократного рассеяния было предложено несколько методов. Полевая спектроскопия рассеяния света [1330] и спектральная оптическая когерентная томография (ОКТ) [142] были разработаны для получения двумерных спектроскопических и томографических изображений. В этих обобщениях обычной (амплитудной) ОКТ информация о спектральном составе обратно рассеянного света получается путем регистрации и обработки интерферометрического сигнала ОКТ. Эти методы позволяют измерить спектр обратно рассеянного света либо на нескольких дискретных длинах волн [1329], либо в сплошной полосе доступных оптических частот от 650 до 1000 нм одновременно [142].

Развит также намного более простой поляризационно-чувствительный метод, основанный на том факте, что первоначально поляризованный свет теряет свою поляризацию в процессе прохождения через рассеивающую ткань [216]. С таким же успехом можно использовать обычный метод обратного рассеяния с пространственным разрешением, если расстояние между источником и приемником достаточно мало [272]. В этом случае однократно рассеянная компонента (2–5%) должна вы-

читаться из полного спектра отражения, для чего можно воспользоваться моделью на основе диффузионного приближения путем ее подгонки к крупномасштабным спектральным особенностям диффузной компоненты.

Зониос и др. исследовали возможность использования спектроскопии диффузно отражения для диагностики *in vivo* предраковых поражений кишечника — аденоматозных полипов [1330]. На рис. 10.7 показаны типичные спектры диффузного отражения: один от участка аденоматозного полипа, другой — от участка нормальной слизистой оболочки. Легко видеть существенные спектральные различия, особенно в коротковолновой области спектра, где наиболее заметной спектральной особенностью является впадина вблизи 420 нм, соответствующая поглощению гемоглобина. Эта впадина более выражена в спектре аденоматозного полипа. Как и более выраженные провалы вблизи 542 и 577 нм, также характерные для поглощения гемоглобина, эта впадина является индикатором повышенного содержания гемоглобина в аденоматозной ткани.

Очевидно, различия между этими спектрами возникают из-за изменений рассеивающих и поглощающих свойств биотканей. Как провалы поглощения, так и наклоны спектров являются чувствительными функциями коэффициентов поглощения и рассеяния, что позволяет естественным образом ввести обратный алгоритм, чувствительный к этим спектральным особенностям. Авторы количественно описали поглощающие и рассеивающие свойства с использованием диффузионной модели, обсуждавшейся в разд. 1.1.2. Аналогичное уравнению (1.33) уравнение [1330] подгонялось к данным измерений с использованием метода минимизации Левенберга–Маркардта. Таким образом были получены полная концентрация гемоглобина c_{Hb} и насыщение гемоглобина кислородом α . Также для каждой длины волны λ от 360 нм до 685 нм был найден оптимальный приведенный коэффициент рассеяния $\mu'_s(\lambda)$. Было обнаружено, что $\mu'_s(\lambda)$ имеет спектральную зависимость, напоминающую прямую линию, спадающую с ростом длины волны λ . Наклон $\mu'_s(\lambda)$ уменьшается с ростом эффективного размера рассеивающих частиц d_s (рис. 10.7 б). Это позволяет определить эффективный размер частиц по известной зависимости $\mu'_s(\lambda)$. Модельные подгонки, показанные на рис. 10.7 а, находятся в очень хорошем согласии с экспериментальными данными.

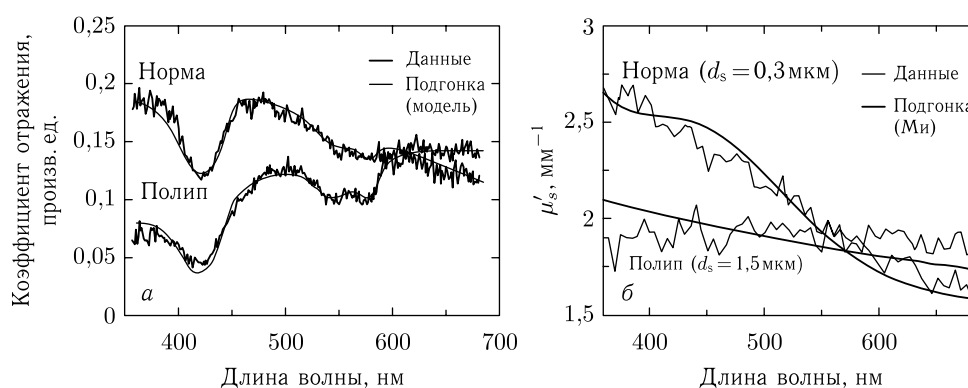


Рис. 10.7. Анализ диффузного отражения: а — измеренные спектры отражения (линии с шумами) и модельная подгонка (гладкие линии); б — спектры рассеяния, полученные из измерений отражения (линии с шумами), и соответствующие спектры, рассчитанные по теории Ми (гладкие кривые). Показаны эффективные размеры рассеивающих частиц d_s (из работ [1327, 1330])

Возможность диагностировать с помощью СРС дисплазию и CIS была проверена в ходе исследований *in vivo* на человеке для четырех различных органов и трех типов эпителия: цилиндрического эпителия толстой кишки и пищевода Баррета, переходного эпителия мочевого пузыря и стратифицированного чешуйчатого эпителия полости рта [1328]. Все клинические исследования проводились во время рутинных процедур массового эндоскопического обследования или наблюдения. Во всех исследованиях волоконно-оптический зонд подавал свет от ксеноновой дуговой лампы на поверхность биоткани и собирал возвращаемый свет. Кончик зонда слегка прикасался к исследуемой биоткани. Немедленно после измерения из того же места бралась биопсия. Анализировался спектр отраженного света и определялось распределение ядер по размерам. Как при дисплазии, так и при CIS присутствует повышенный процент увеличенных ядер и, в среднем, наблюдается большая плотность их числа, что можно использовать как основу для спектроскопической диагностики патологий ткани.

Глава 11

СПЕКТРОСКОПИЯ И ТОМОГРАФИЯ С РАЗРЕШЕНИЕМ ВО ВРЕМЕНИ И ПРОСТРАНСТВЕ

Обсуждаются особенности оптического спектрального диффузионного метода с разрешением во времени и пространстве. Анализируются методы и аппаратура для таких исследований, особенно перспективные для измерений *in vivo*. В соответствии с основными принципами, сформулированными в гл. 1, здесь рассматриваются четыре типа методов и устройств с временным разрешением: временные на основе ультракоротких лазерных импульсов, модуляционные, использующие свет с модулированной интенсивностью и узкополосную гетеродинную регистрацию, метод фазированных решеток на основе интерференции диффузионных волн фотонной плотности, а также метод, использующий зондирование биоткани пространственно-модулированным световым пучком.

11.1. Методы и устройства для импульсных измерений

На рис. 11.1. представлена одна из разработанных лазерных систем с разрешением во времени для измерений *in vivo* оптических свойств молочной железы [414]. Эта система состоит из титан-сапфирового лазера с синхронизацией мод с длиной волны 800 нм, длительностью импульса 80 фс и частотой повторения 82 МГц. Зондирующий лазерный пучок просвечивает молочную железу, и рассеянное вперед излучение регистрируется камерой с синхронной разверткой, так называемой стрик-камерой (фотокатод S1, Hamamatsu C3681). Для увеличения пропускания биоткани, придания ей большей однородности и обеспечения стабильных граничных условий молочная железа слегка сжималась между двумя прозрачными пластинами. Степень сжатия гораздо меньше, чем в общепринятой рентгеновской маммографии, поскольку необходимо избегать какого-либо влияния изменения перфузии крови на поглощающие свойства ткани. Рассеянный свет отображался на щель стрик-камеры с увеличением 1:1. Щель имела размеры 50 мкм × 6 мм, а числовая апертура оптики камеры была равна 0,22. Для обеспечения привязки по времени опорный лазерный пучок задерживался с помощью оптической линии задержки и также отображался на щель стрик-камеры; триггерный пучок синхронизировал работу стрик-камеры. Принципы работы стрик-камеры и другого оборудования, используемого в импульсном методе с временным разрешением, детально описаны в работах [427–429, 511, 538, 540].

Временной профиль интенсивности света, падающего на камеру, записывался с разрешением около 10 пс и отображался как пространственный профиль. Точная коррекция затенения и вычитание темнового фона производились при каждом измерении дисперсионной кривой. Для измерений *in vivo* пробный лазерный пучок с полной мощностью от 100 до 150 мВт расширялся до диаметра 10 мм для поддержания плотности мощности ниже максимально разрешенной стандартами безопасности, составляющей 200 мВт/см².

На рис. 11.2 показаны нормированные кривые временной дисперсии импульсов для трех пациенток T_1 , T_2 и T_3 и соответствующие результаты теоретической

подгонки в соответствии с диффузионной моделью (см. уравнение (1.42)). Кривые временного отклика биоткани охватывают типичный временной интервал порядка 6 нс при среднем времени пролета фотонов немного более 2 нс. Благодаря сильному рассеянию и слабому поглощению, большинство фотонов проходят расстояние примерно в десять раз большее, чем сама толщины сжатой молочной железы. Сигналы T_1 и T_2 ($d = 45$ мм) превосходят шумовой фон для времени пролета около 510 пс, что более чем вдвое больше минимального времени пролета баллистического фотона (показатель преломления биоткани 1,4). Для более толстого слоя биоткани T_3 ($d = 59$ мм) это время сдвигается до 830 пс, что примерно втрое больше, чем для баллистических фотонов.

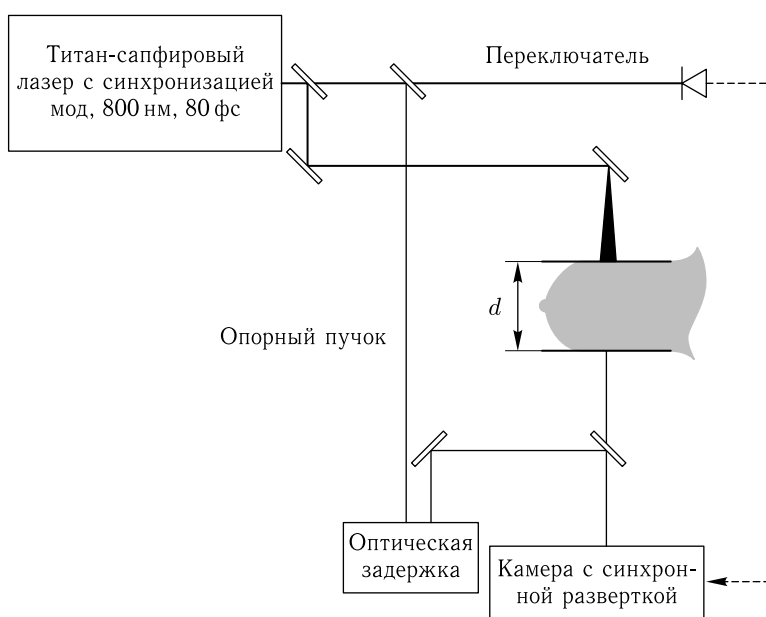


Рис. 11.1. Схема установки с временным разрешением для просвечивания *in vivo* тканей молочной железы [414]

Измерения в различных локализациях молочной железы отражают влияние морфологических и физиологических различий в различных частях органа (разные типы ткани, разные объемы крови и степень ее оксигенации) и служит основой для диффузной оптической маммографии (см. рис. 11.2 б) [538]. Следует заметить, что слегка отличающиеся граничные условия и степень сжатия, а также неоднородность и поверхностная пигментация могут быть критичными для получения надежных маммограмм. В табл. 7.1 представлены результаты измерений *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* оптических параметров молочной железы и некоторых других тканей, выполненные рассмотренными здесь и некоторыми другими оптическими методами.

Алгоритмы для решения обратной задачи по определению μ_a и μ'_s , следующие из уравнений (1.41) и (1.42), могут успешно использоваться не только для спектроскопии биотканей, но и для томографии. Для целей томографии большая скорость реализации этих алгоритмов дается ценой отказа от измерения абсолютных концентраций поглотителей и абсолютных величин коэффициентов рассеяния (хотя это и желательнее). В общем случае визуализация нацелена на обнаружение патологии или локализации поражений. Обнаружение патологии достигается путем записи

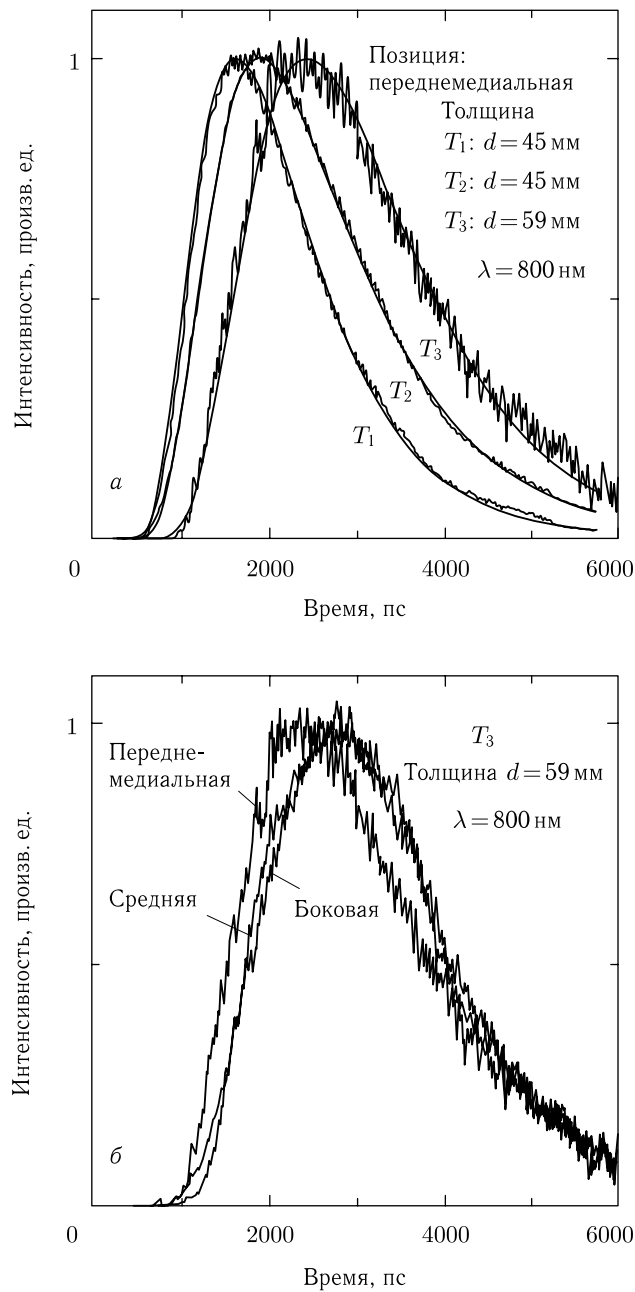


Рис. 11.2. Измеренные *in vivo* нормированные кривые временного отклика прошедшей интенсивности лазерного излучения для тканей молочной железы трех женщин-добровольцев (T_1 , T_2 и T_3 ; толщина d) и соответствующие кривые теоретической подгонки: *a* — измерения для одного и того же расположения оптического датчика для трех женщин (три железы); *б* — измерения для одной железы одной из женщин в трех различных положениях датчика [414]

двумерного изображения с достаточным контрастом, в то время как локализация требует оптического деления на слои и томографической реконструкции для получения трехмерного изображения, по которому определяются размер, форма и положение скрытого объекта [413].

Системы получения изображений обычно используют 2D- или 3D-сканирование узкого лазерного пучка или подвижного оптического столика, на котором закреплен объект исследования. Несканирующие системы наиболее устойчивы и, соответственно, намного больше подходят для медицинских приложений. Такие несканирующие системы имеют многоканальные волоконно-оптические устройства с фиксированным положением каждого источника и приемника света, либо малощумящие высокочувствительные ПЗС-камеры с многоканальной платой оптического усиления [1, 6, 511, 518, 538, 540]. В любом случае процедура измерения усложняется за счет выборки интенсивности каждого пикселя как функции времени для получения пространственно-временной карты распределения интенсивности. Изображение численно реконструируется путем приписывания каждому пикселю интенсивности, измеренной за выбранное время интегрирования [413].

Для визуализации тканей молочной железы в клинических условиях был спроектирован многоканальный имиджер/спектрометр ближнего ИК- (БИК) диапазона (см. рис. 11.3а) [1907]. Устройство использует две длины волны, 780 нм и 830 нм, средняя мощность каждого излучающего лазерного диода около 40 мВт с частотой повторения импульсов 5 МГц при длительности каждого импульса около 50 пс. Для проведения исследований был взят высокочувствительный фотоумножитель R5600U-50 на GaAs. Для усиления контраста изображений карциномы использовалось внутривенное вливание Инфрасуанина (Infracyanine[®]25, IC25), контрастного агента для БИК-диапазона на основе разрешенного для проведения ангиографических исследований красителя индоцианинового зеленого. Изменения оптического поглощения рассчитывались с помощью следующего соотношения:

$$\Delta\mu_a = -\frac{2}{c\Delta t^2} \int_{t_1}^{t_2} \ln \frac{J_2(r, t)}{J_1(r, t)} dt, \quad (11.1)$$

где c — скорость света в среде, Δt — временное разрешение при анализе высоты импульса, многоканальным анализатором (МСА, Hamamatsu Inc.); J_1, J_2 — измеренный фототок до и после инъекции IC25 соответственно, а t_1, t_2 определяют ширину кривой $J_{1,2}$, развернутой во времени. Уравнение (11.1) дает точные значения $\Delta\mu_a$ для малых изменений поглощения.

Относительные смещения источников и приемников света и положение проекционной плоскости и патологии (карцинома — черная сфера) показаны на рис. 11.3б. Вычисление разностей коэффициента поглощения вдоль прямых линий, соединяющих пары «источник–приемник», разделенные сравнимыми расстояниями (показаны ромбиками на рис. 11.3б), позволяет оценить распределение IC25 в биоткани. Тестирование на пациентах проводилось одновременно с обследованием с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) по стандартному протоколу.

Рисунок 11.4 иллюстрирует возможности оптической маммографии с разрешением во времени в сравнении с МРТ. Измерения проводились у пациентки (белый цвет кожи, 70 лет) с диагнозом проникающая карцинома протока примерно 10 мм в диаметре. Для представленного изображения использовались 6 источников и 8 приемников оптического излучения. Нетрудно видеть хорошее соответствие между МРТ- и БИК-изображениями. На изображении для длины волны 780 нм видны два объекта, что можно отнести за счет влияния шумов измерений или

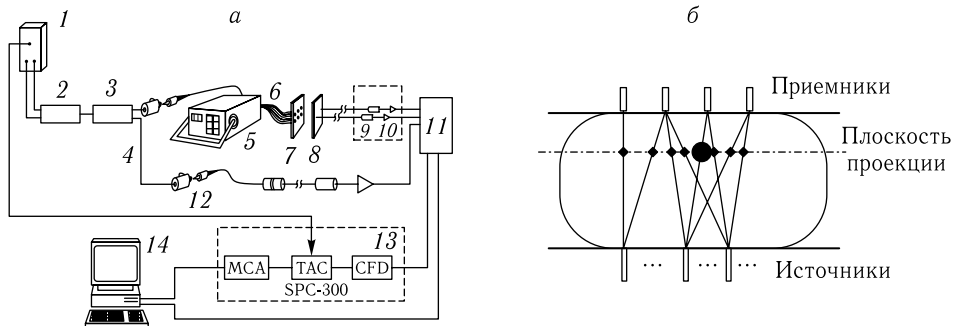


Рис. 11.3. Многоканальный БИК-визуализатор/спектрометр с временной корреляцией и счетом фотонов (а): 1 — два лазерных диода; 2 — смеситель сигналов двух длин волн; 3 — 19:1 делитель сигнала; 4 — опорное плечо; 5 — 1 × 24 оптический волоконный переключатель DiCon; 6 — градиентные оптические волокна длиной 10 м; 7 — сжимающие пластины; 8 — восемь волоконно-оптических жгутов со ступенчатым показателем преломления длиной 10 м каждый; 9 — ФЭУ; 10 — блок усиления; 11 — маршрутизатор; 12 — аттенуатор; 13, система счета фотонов SPC-300 с использованием 8-канального мультиплексора SRT-8; 14 — ПК на базе процессора Intel Pentium; CFD, дискриминатор следящего порога; МСА, многоканальный анализатор; ТАС, преобразователь «время-амплитуда». Относительное расположение источников и приемников света, проекционной плоскости и патологии (карцинома, черная сфера) (б) [1907]

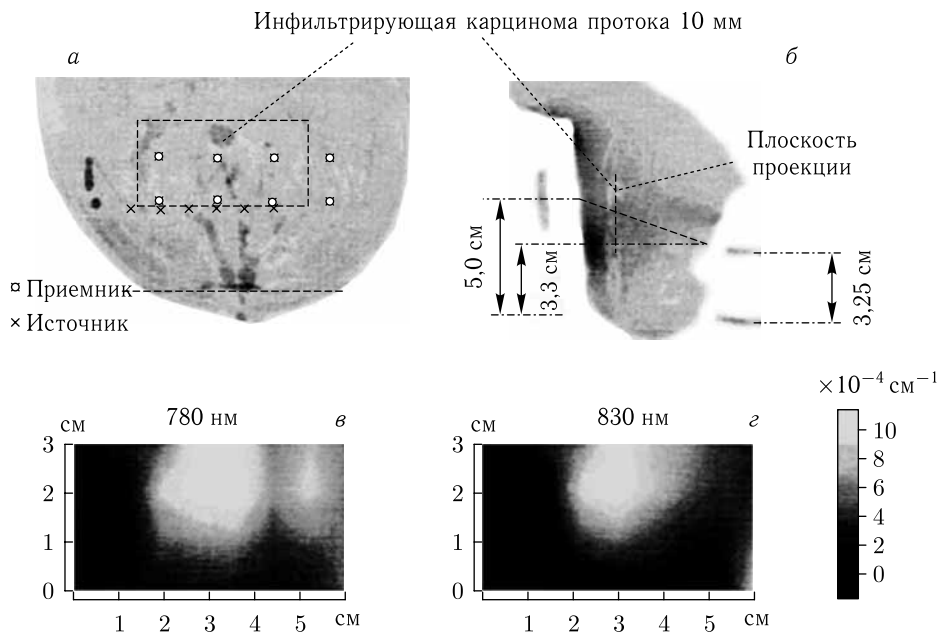


Рис. 11.4. Одновременная регистрация изображений с помощью МРТ и БИК-системы: а — 70-летняя пациентка с инфильтрирующей карциномой протока (изображение сагиттального сечения с помощью МРТ с быстрым спиновым эхо); б — та же пациентка, аксиальное изображение с помощью МРТ со спиновым эхом; в — проекционные БИК-изображения на длинах волн 780 нм и г — 830 нм [1907]

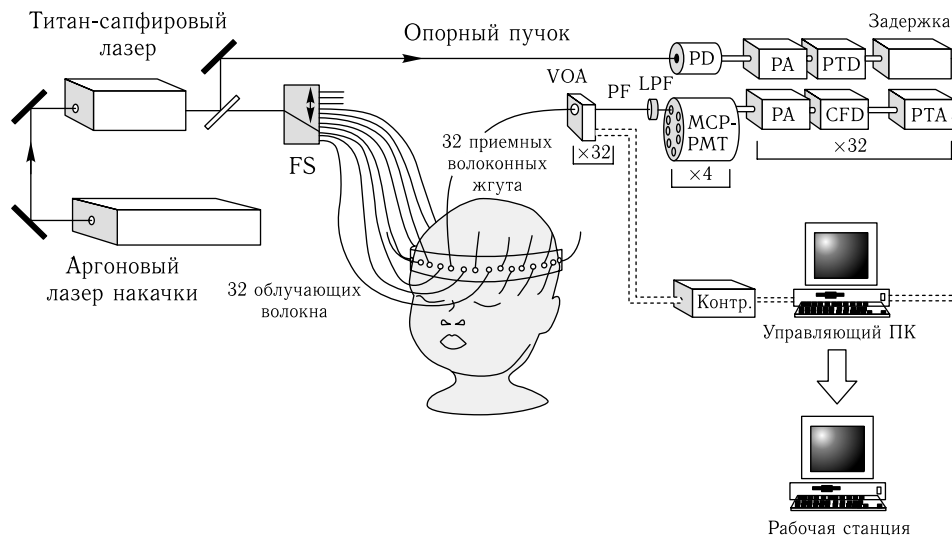


Рис. 11.5. Схема визуализирующей системы MONSTIR: FS — волоконный переключатель; VOA — переменный оптический аттенюатор; PF — полимерное волокно; LPF — фильтр, пропускающий длинноволновую часть спектра; MCP-PMT — ФЭУ на основе многоканальной пластинки; PA — предусилитель; CFD — дискриминатор постоянной составляющей; PTA — пикосекундный временной анализатор; PD — фотодиод; PTD — пикосекундный временной дискриминатор [524]

за счет проявления неидентифицированных физиологических изменений, поскольку именно для этой длины волны, благодаря более сильному поглощению (12%) IC25 по сравнению с длиной волны 830 нм, ожидается более высокая чувствительность к физиологическим изменениям.

Существенно более сложная система для оптической томографии с временным разрешением, использующая 32 канала и спроектированная для получения изображений мозга новорожденных и молочной железы, показана на рис. 11.5 [524]. Это многоканальная оптоэлектронная БИК-система для реконструкции изображений с временным разрешением [multichannel optoelectronic near-infrared system for time-resolved image reconstruction (MONSTIR)]. Свет от мощного пикосекундного импульсного лазера последовательно направляется в один из 32 волоконных световодов, подводящих излучение к поверхности исследуемого объекта. Система регистрации используется для записи временного распределения света, возбуждающего биоткань в определенных местах вокруг объекта с временным разрешением около 8 пс и скоростью счета фотонов до 10^5 в секунду в одном канале. Это осуществляется с использованием 32 полностью симплексных сверхбыстрых фотоприемников, работающих в режиме счета фотонов. Рассеянные фотоны собираются 32 волоконными жгутами с малой дисперсией и большим диаметром (2,5 мм), которые соединены с 32 переменными оптическими аттенюаторами (ПОА) с шаговым приводом. ПОА необходимы, чтобы защитить фотоприемники от насыщения или повреждения и гарантировать работу системы в режиме счета отдельных фотонов, поскольку динамический диапазон интенсивностей света в окрестности объекта очень велик. Свет, пропущенный через ПОА, собирается коротким полимерным моноволоконным диаметром 3,0 мм и направляется через фильтр, блокирующий видимый свет, на фотокатоды четырех сверхбыстрых восьми-анодных ФЭУ на основе микроканальной

пластинки (MCP-PMT). Результирующий электронный импульс предварительно усиливается, преобразуется в логический импульс, гистограмма времен прилета фотонов записывается и передается в управляющий компьютер. Специальный программный пакет TOAST (time-resolved optical absorption and scattering tomography — оптическая томография поглощения и рассеяния с временным разрешением) используется для реконструкции томографических изображений пространственного распределения поглощения и рассеяния [543].

В продаже имеется портативная трехволновая спектроскопическая система для спектроскопии с временным разрешением (СВР) БИК-диапазона (TRS-10, Hamamatsu Photonics К.К., Japan) [1908]. В системе СВР для приема используется техника счета отдельных фотонов с временной корреляцией. Система управляется компьютером через цифровой I/O интерфейс, состоящий из импульсного пикосекундного (около 100 пс) трехволнового (761, 795 и 835 нм) лазерного источника света, приемной головки, работающей в режиме счета отдельных фотонов, и схем обработки сигналов измерений с временным разрешением. Средняя мощность источника света порядка 150 мкВт на каждой длине волны при частоте повторений 5 МГц. Инструментальный отклик системы СВР, включающей осветительное волокно длиной 3 м (градиентный волоконный световод с диаметром сердцевины 200 мкм) и трехметровое приемное волокно (волоконный жгут диаметром 3 мм) составлял около 150 пс (полная ширина по полувысоте) на каждой длине волны. Эта система использовалась для оценки коэффициента поглощения и приведенного коэффициента рассеяния тканей головы в модельном эксперименте при гипоксии у поросенка [1908]. Измерения абсолютных значений коэффициента поглощения на трех длинах волн позволяют оценить концентрацию гемоглобина и степень его насыщения кислородом в тканях головного мозга.

11.2. Модуляционные методы и устройства

Заметный прогресс в исследовании биотканей и молекул, важных для биологии, с использованием модуляционных методов создал основу для разработки и промышленного выпуска спектрометров нового типа (например, ISS[®] Fluorescence & Analytical Instrumentation). Типичная схема модуляционного спектрометра для исследования тканей показана на рис. 11.6 [1–4, 6, 427–429, 437, 438, 511, 538, 540]. Такие измерительные системы используют гетеродинный принцип (два фотоумножителя с гетеродинированием на одном из первых диодов) для переноса измеряемого модуляционного сигнала в низкочастотный диапазон (100 Гц для представленной системы), где фазовые измерения можно производить с существенно большей точностью.

Нужно упомянуть также модели компактных и сравнительно недорогих устройств — модуляционных спектрометров — для неинвазивного определения насыщения гемоглобина крови кислородом, мониторинга оптических параметров тканей и локализации рассеивающих неоднородностей в глубине ткани. Такие спектрометры включают диодные лазеры в качестве источников излучения на одной или двух длинах волн и фотоумножитель с гетеродинированием на одном из первых диодов или быстродействующий полупроводниковый фотоприемник с усилителем высокой (модуляционной) частоты [429, 453, 454, 511]. В частности, компания NIM Inc. производит двухволновый прибор RMD 3000b с длинами волн 760 и 810 нм и фиксированной частотой модуляции 200 МГц для неинвазивного количественного определения насыщения гемоглобина кислородом [1909]. Компания Carl Zeiss Jena производила более сложную и универсальную систему, работающую на длине волны 685 нм с двумя фиксированными частотами модуляции, равными

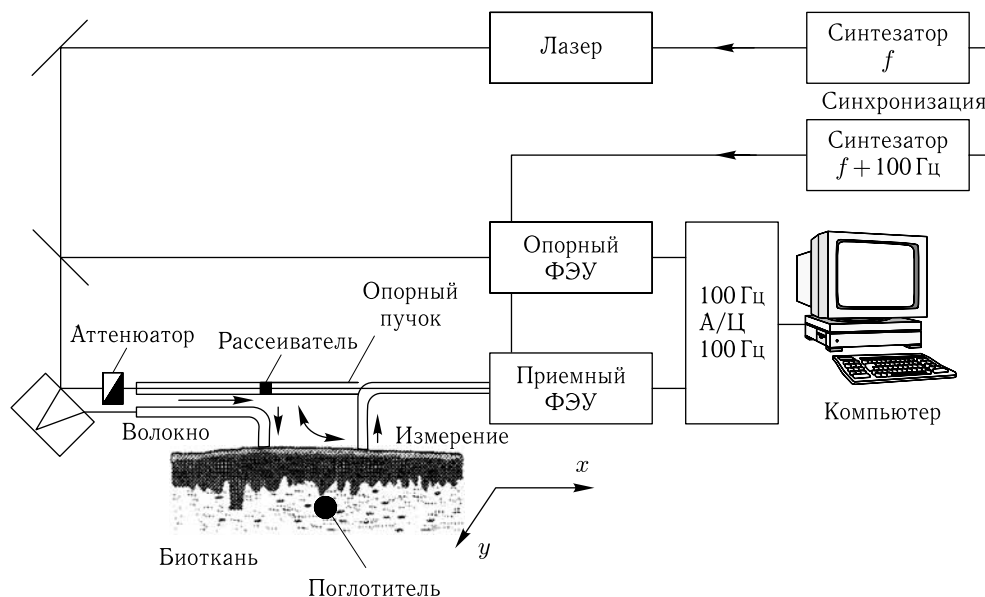


Рис. 11.6. Типичная схема модуляционного спектрометра рассеянного света или системы визуализации на основе регистрации волн фотонной плотности (при условии, что обеспечено двумерное сканирование зондирующего и приемного волокон) [1, 3]

110 и 220 МГц. Эта система также включает управляемый компьютером оптический стол, обеспечивающий режим просвечивания биоткани [453, 454]. Более простая и универсальная исследовательская система была разработана в Саратовском университете [547]. Эта система включает квантово-размерные лазеры (длины волн 790 и 840 нм), гарантирующие высокоэффективную модуляцию лазерного излучения по цепи питания с низким уровнем шумов в диапазоне 100–1000 МГц, набор оптических волокон и управляемый компьютером оптический стол, позволяющий обеспечить различную геометрию эксперимента. Приемный блок содержит лавинный фотодиод с высокочастотным усилителем (20 дБ). Полный динамический диапазон приемного блока вместе со спектроанализатором или сетевым анализатором составляет 70 дБ.

С точки зрения медицинских применений, требования к системе измерения фазы очень высоки (лучше 0,03 град в полосе шириной 2 Гц) и близки к требованиям, предъявляемым к многочастотным многоволновым волоконно-оптическим коммуникационным системам (мультиплексирование с разделением по времени (МРВ) и мультиплексирование с разделением по длинам волн (МРДВ)) [4]. Коммуникационные системы работают при существенно более высоких частотах модуляции, чем медицинские, хорошо продвинуты в применении цифрового оборудования и имеют высокую степень мультиплексирования. Последние две особенности могут быть очень полезны для проектирования нового поколения медицинского оборудования. В то время как требования к медицинским системам в настоящее время весьма скромны (три длины волны и две частоты модуляции). Для создания оптических томографов первого поколения, обеспечивающих пространственное разрешение на уровне 1 см^{-3} , необходимо увеличение мультиплексирования до 16/32 каналов. Для обеспечения разрешения намного лучше, чем 1 см^{-3} , ожидается использование 10^3 комбинаций источник–приемник [4].

Фазовые системы делятся на гомодинные и гетеродинные, что означает, соответственно, что они либо не преобразуют, либо преобразуют высокую частоту (ВЧ) прежде, чем производить фазовые измерения. Гетеродинные системы получили название устройств с кросс-корреляцией, или устройств измерения фазовой задержки (УИФЗ). Эти приборы предназначены для измерения оптических свойств ткани (μ_a и μ'_s) с точностью до 5% и насыщения гемоглобина кислородом с точностью до 3% в диапазоне 40–80%, что требует следующей точности измерения фазы и амплитуды модуляционного сигнала [4]:

- фазовый и амплитудный шум в полосе шириной 2 Гц должны быть соответственно ниже $0,03^\circ$ и 0,1% от полного сигнала на несущей частоте 50–200 МГц;
- ослабление принимаемого сигнала по сравнению с исходным может быть более 100 дБ с ошибкой фазы из-за связи радиочастот не более $0,03^\circ$;
- амплитудно-фазовые перекрестные помехи должны быть ограничены и при ослаблении сигнала в 10 дБ вызывать фазовую ошибку не более $0,03^\circ$;
- многочастотный режим за счет перекрестных помех (при ослаблении 50 дБ) может вносить ошибку по фазе не более $0,03^\circ$;
- оптическое мультиплексирование с использованием источников света на разных длинах волн может вносить фазовую ошибку от перекрестных помех не более $0,03^\circ$;
- ширина полосы выходного сигнала должна быть в пределах от 0,2 до 2 Гц или, в особых случаях исследований мозга, до 40 Гц;
- должна быть доступна достаточная информация, извлекаемая из многочастотного или многоволнового режима работы.

На рис. 11.7 представлены 4 типа УИФЗ, адаптированных к исследованию оптических характеристик биотканей [4]: две из них гомодинные (*a* и *b*), а две гетеродинные (*в* и *г*). Система по схеме *a* использует синфазный/квадратурный (IQ) демодулятор; а система по схеме *b* — фазовый детектор нулевого пересечения. Система *в* использует модуляцию амплитуды на двух близких высоких частотах, f_1 и f_2 , а *г* использует модуляцию одной боковой полосы (ОБП): f_1 — высокая частота (ВЧ), а f_2 — звуковая частота; обе системы имеют фазовые детекторы нулевого пересечения.

Ряд систем измерения фазы описан в работах [1, 4]. Амплитудные измерения сравнительно просты, но иногда они не обеспечивают требуемой точности, например, из-за влияния постороннего света. Фазовые измерения независимы от изменений амплитуды и могут быть произведены с приемлемой точностью. Более того, фазовые измерения на нескольких длинах волн сами по себе достаточны для оценки изменений таких важных величин, как концентрация гемоглобина и степень его оксигенации. Одновременные амплитудные и фазовые измерения используются для определения абсолютных значений коэффициентов поглощения.

Основная схема гомодинной системы с IQ-демодулятором представлена на рис. 11.7*a*. Для определения фазового сдвига (разности фаз между опорным и регистрируемым сигналом) используется лазерный диод, оптический приемник, усилитель и узкополосный фильтр. Принцип работы IQ-демодулятора показан на рис. 11.8. Он включает 90° -й делитель (гибрид), два двойных балансных смесителя (ДБС) и 0° -й делитель. В демодуляторе несущая частота (как опорный сигнал) восстанавливается из входящего модулированного оптического сигнала и загружается в 90° -й делитель, а модулированный (исследуемый) сигнал в 0° -й делитель.

Работая как умножитель, синфазный смеситель производит выходной сигнал [4, 1910]:

$$I(t) = \sin(\omega t) \cdot 2A \sin(\omega t + \Delta\Phi) = A \cos \Delta\Phi - A \cos(2\omega t + \Delta\Phi), \quad (11.2)$$

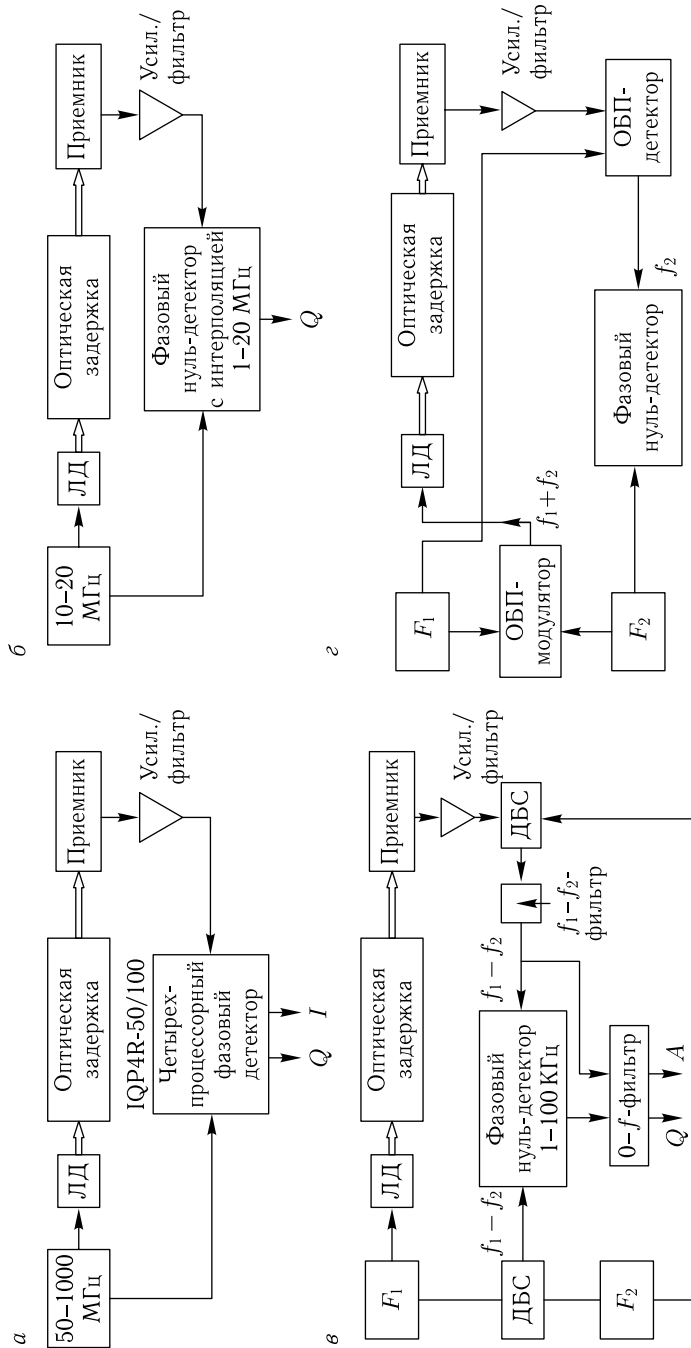


Рис. 11.7. Четыре типа устройств для измерения задержки оптического сигнала при его распространении в ткани: *a*, *б* — гомодинные системы (*a* — с IQ-демодулятором, *б* — с фазовым детектором нулевого пересечения); *в*, *г* — гетеродинные системы (*в* — с амплитудной модуляцией, *г* — использует модуляцию одной боковой полосы (ОБП)); F_1 — радиочастота; F_2 — частота гетеродина (аудио); используется верхняя боковая полоса $f_1 + f_2$; ЛД — лазерный диод; ДБС — двойной балансный смеситель [4]

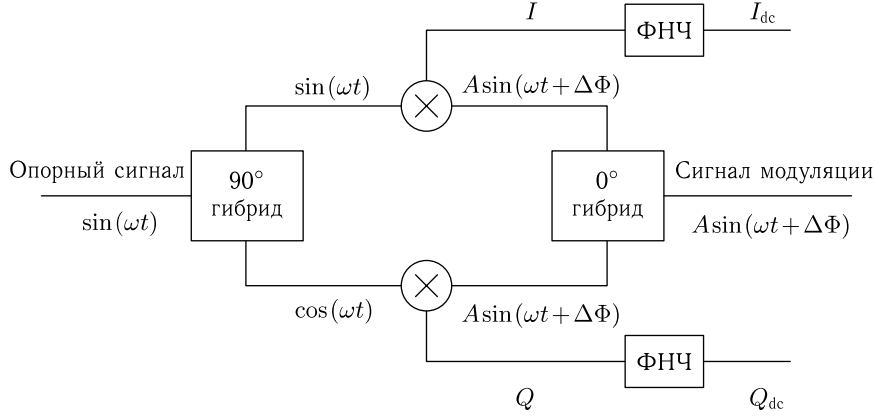


Рис. 11.8. Схема IQ-демодулятора — фазового и амплитудного детектора [1910]; ФНЧ — фильтр нижних частот

где $\sin(\omega t)$ — сигнал несущей частоты, $2A \sin(\omega t + \Delta\Phi)$ — модулированный сигнал, а фазовая задержка $\Delta\Phi$ обусловлена рассеивающей средой.

Квадратурный смеситель вырабатывает выходной сигнал

$$Q(t) = \cos(\omega t) \cdot 2A \sin(\omega t + \Delta\Phi) = A \sin \Delta\Phi + A \sin(2\omega t + \Delta\Phi). \quad (11.3)$$

В соотношениях (11.2) и (11.3) $A \sin \Delta\Phi$ и $A \cos \Delta\Phi$ — постоянные сигналы, несущие информацию о медленных изменениях амплитуды (A) и фазы ($\Delta\Phi$) сигнала, связанных с взаимодействием света с рассеивающей средой; $A \sin(2\omega t + \Delta\Phi)$ и $A \cos(2\omega t + \Delta\Phi)$ — высокочастотные компоненты, которые блокируются фильтрами низкой частоты (ФНЧ). Регистрируемые после фильтрации сигналы I_{dc} и Q_{dc} используются далее для расчета фазы и амплитуды:

$$\Delta\Phi = \text{arctg} \left(\frac{Q_{dc}}{I_{dc}} \right), \quad A = (Q_{dc}^2 + I_{dc}^2)^{1/2}. \quad (11.4)$$

Для геометрии рассеяния назад, такой как показана на рис. 10.2, аналитические выражения для фазового сдвига $\Delta\Phi$ и амплитуды модуляции A в диффузионном приближении определяются следующим образом [4, 453, 454]:

$$\Delta\Phi = r_{sd} \left\{ \frac{[(\mu_a c)^2 + \omega^2]^{1/2} - \mu_a c}{D} \right\}^{1/2} + \Delta\Phi_0, \quad (11.5)$$

$$A = \left(\frac{A_0}{4\pi D r_{sd}} \right) \exp \left\{ -r_{sd} \left[\frac{[(\mu_a c)^2 + \omega^2]^{1/2} + \mu_a c}{2D} \right]^{1/2} \right\}, \quad (11.6)$$

где r_{sd} — расстояние между источником и приемником, A_0 и $\Delta\Phi_0$ — начальная амплитуда и фаза за счет инструментального отклика, $D \approx c/(3\mu'_s)$, а c — скорость света в среде.

Для сравнительно малых частот модуляции, когда $\omega < \mu_a c$, фазовый сдвиг является линейной функцией частоты:

$$\Delta\Phi = \frac{r_{sd}\omega}{2(D\mu_a c)^{1/2}} + \Delta\Phi_0 \approx \frac{r_{sd}\omega}{2c} \left(\frac{3\mu'_s}{\mu_a} \right)^{1/2} + \Delta\Phi_0, \quad (11.7)$$

Для относительно больших частот, когда $\omega > \mu_a c$ ($\omega/2\pi \leq 500$ МГц),

$$\Delta\Phi = r_{sd} \left(\frac{\omega}{2D} \right)^{1/2} + \Delta\Phi_0 \approx r_{sd} \left(\frac{3\omega\mu'_s}{2c} \right)^{1/2} + \Delta\Phi_0. \quad (11.8)$$

Величины A_0 и $\Delta\Phi_0$ можно получить путем калибровки измерительной системы с помощью стандартной модели биоткани (фантома) с известными значениями μ'_s и μ_a . Затем после калибровки экспериментальной установки, можно вычислить оптические параметры исследуемой биоткани из измеренных амплитуды и фазового сдвига на основе уравнений (11.5) и (11.6), используя следующие итерационные формулы:

$$\mu_a = \frac{r_{sd}^4 \omega^2 - 4D^2 (\Delta\Phi - \Delta\Phi_0)^4}{4cD (\Delta\Phi - \Delta\Phi_0)^2 r_{sd}^2}, \quad \mu'_s = \frac{c}{3D} - \mu_a, \quad (11.9)$$

$$D = -\frac{r_{sd}^2 \omega}{2 (\Delta\Phi - \Delta\Phi_0) \left[\ln(A) + \ln\left(\frac{4\pi D r_{sd}}{A_0}\right) \right]}.$$

Итак, гомодинная система измеряет разность фаз между опорным и исследуемым сигналом. Аналоговый IQ-демодулятор (см. рис. 11.8) позволяет достичь точности $\sim 0,2^\circ$ по фазе и $\sim 0,5$ дБ по амплитуде при несущей частоте, равной 140 МГц [4, 1910].

Гетеродинный принцип характерен для многих коммуникационных систем. Поскольку ошибка измерения фазы уменьшается с понижением несущей частоты, а ширина полосы приемника постоянна, приборы, рассчитанные на более низкие частоты, могут иметь более высокую точность. Нелинейное смешивание двух сигналов с разными частотами f_1 и f_2 дает сигналы суммарной и разностной частот, один из которых, а именно $(f_1 - f_2)$, выделяется, усиливается, фильтруется и подается на фазовый детектор в качестве опорного (см. рис. 11.7 в). Распространение сигнала, модулированного на частоте f_1 , через оптическую систему, биологическую ткань, оптический детектор и усилитель/фильтр ведет к изменениям фазы и амплитуды. Сигнал на промежуточной частоте $(f_1 - f_2)$, обычно в диапазоне 1–100 кГц) выделяется на следующем смесителе и служит измеряемым сигналом для фазового детектора. Промежуточная частота должна быть достаточно высокой, чтобы избежать проблемы низкочастотного шума, который быстро затухает с ростом частоты как $1/f$, однако нельзя выбирать эту частоту очень высокой, поскольку при этом возрастают погрешности фазового детектирования с нулевым пересечением. Недостатком гетеродинной системы является то, что генераторы F_1 и F_2 должны иметь высокую степень фазовой когерентности, определяемой необходимой точностью измерений.

Система ОБП (см. рис. 11.7 з) обеспечивает как эффективную модуляцию света, так и эффективную регистрацию сигнала. Она имеет важные достоинства: 1) модуляция несущей и модуляция лазерного диода присутствуют только, когда гетеродин (F_2) активирует выбранную боковую частоту, этим обеспечивается возможность эффективного управления ВЧ-сигналом; 2) частота гетеродина может лежать в удобном звуковом диапазоне; 3) вся ВЧ-мощность заключена в одной узкой полосе частот.

В качестве примера рассмотрим более подробно работу двухволновой гетеродинной системы с IQ-демодуляцией, представленной на рис. 11.9 [4, 1910]. БИК-системы с двумя длинами волн оптического излучения обычно используются для измерения степени насыщения кислородом гемоглобина крови живых тканей. Два ВЧ-генератора работают на слегка различающихся частотах, а именно 140,00 и 140,01 МГц, и обеспечивают задающие сигналы для двух лазерных диодов с различными длинами волн. Два лазерных пучка комбинируются и направляются одновременно по волоконному световоду на исследуемую ткань. Рассеянное тканью излучение на обеих длинах волн собирается волоконным световодом и направляется на фотокатод ФЭУ, где происходит детектирование оптических сигналов. После усиления сигналы детектирования поступают в каждый IQ-демодулятор в одно и то же время, при этом

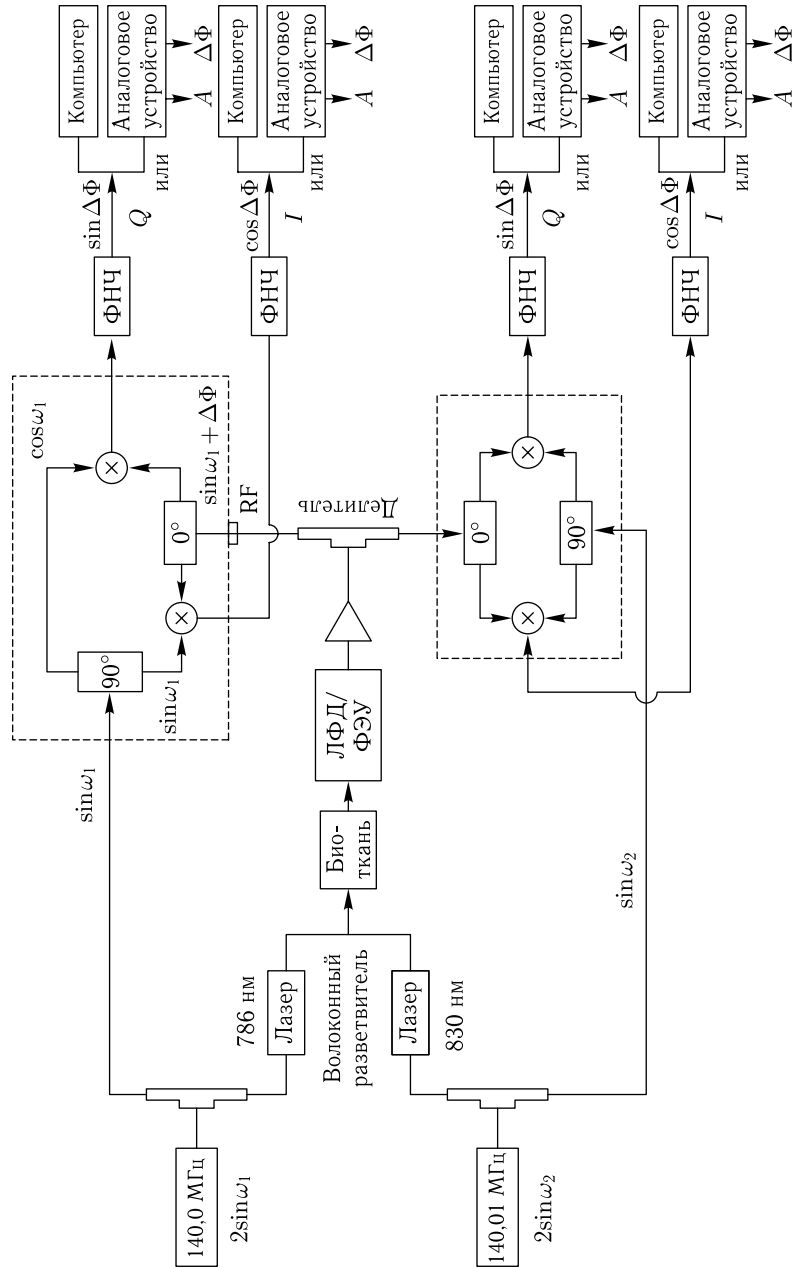


Рис. 11.9. Двухволновая фазово-модуляционная спектроскопическая система, работающая на 140 МГц с использованием IQ-демодуляции (детали в тексте) [4]

распознавание сигналов, соответствующих различным длинам волн, обеспечивается их кодировкой разными высокими частотами.

Если канал 1 характеризуется ВЧ-сигналом $\sin(\omega_1 t)$ и детектируемым сигналом $2A_1 \sin(\omega_1 t + \Delta\Phi_1)$, а канал 2 — $\sin(\omega_2 t)$ и $2A_2 \sin(\omega_2 t + \Delta\Phi_2)$, то IQ-сигналы для каждого канала можно выразить следующим образом [1910]:

$$\begin{aligned} I_1(t) &= [2A_1 \sin(\omega_1 t + \Delta\Phi_1) + 2A_2 \sin(\omega_2 t + \Delta\Phi_2)] \cdot \sin(\omega_1 t) = \underline{A_1 \cos \Delta\Phi_1} - \\ &\quad - A_1 \cos(2\omega_1 t + \Delta\Phi_1) + A_2 \cos[(\omega_1 - \omega_2)t + \Delta\Phi_2] - A_2 \cos[(\omega_1 + \omega_2)t + \Delta\Phi_2], \\ Q_1(t) &= [2A_1 \sin(\omega_1 t + \Delta\Phi_1) + 2A_2 \sin(\omega_2 t + \Delta\Phi_2)] \cdot \cos(\omega_1 t) = \underline{A_1 \sin \Delta\Phi_1} + \\ &\quad + A_1 \sin(2\omega_1 t + \Delta\Phi_1) + A_2 \sin[(\omega_1 - \omega_2)t + \Delta\Phi_2] + A_2 \sin[(\omega_1 + \omega_2)t + \Delta\Phi_2], \end{aligned} \quad (11.10)$$

$$\begin{aligned} I_2(t) &= [2A_1 \sin(\omega_1 t + \Delta\Phi_1) + 2A_2 \sin(\omega_2 t + \Delta\Phi_2)] \cdot \sin(\omega_2 t) = \underline{A_2 \cos \Delta\Phi_2} - \\ &\quad - A_2 \cos(2\omega_2 t + \Delta\Phi_2) + A_1 \cos[(\omega_1 - \omega_2)t + \Delta\Phi_1] - A_1 \cos[(\omega_1 + \omega_2)t + \Delta\Phi_1], \\ Q_2(t) &= [2A_1 \sin(\omega_1 t + \Delta\Phi_1) + 2A_2 \sin(\omega_2 t + \Delta\Phi_2)] \cdot \cos(\omega_2 t) = \underline{A_2 \sin \Delta\Phi_2} + \\ &\quad + A_2 \sin(2\omega_2 t + \Delta\Phi_2) + A_1 \sin[(\omega_1 - \omega_2)t + \Delta\Phi_1] + A_1 \sin[(\omega_1 + \omega_2)t + \Delta\Phi_1]. \end{aligned}$$

Эта система использует два низкочастотных фильтра (НЧФ): один с полосой 0–1,9 МГц, чтобы не пропустить высокочастотные компоненты ($2\omega_1$, $2\omega_2$, $\omega_1 + \omega_2$) в каждом канале, другой — с полосой 0–10 кГц, чтобы блокировать низкочастотную компоненту ($\omega_1 - \omega_2 = 10$ кГц). Согласно соотношениям (11.10), такая фильтрация позволяет разделить комбинированный сигнал на два сигнала для каждой длины волны, и каждый канал сам по себе содержит только I- и Q-сигналы (см. подчеркнутые члены в уравнениях (11.10)). Тем не менее, эффекты смещения третьего порядка могут оказывать некоторое воздействие на низкочастотную кросс-корреляцию между каналами. Экспериментально было показано, что перекрестные помехи между каналами (фазовые или амплитудные изменения в одном канале, вызванные изменениями амплитуды в другом канале) для фазы меньше $1,4^\circ/\text{дБ}$, а для амплитуды меньше $3,8$ мВ/дБ.

Для более эффективного разделения сигналов можно использовать быстрое преобразование Фурье. Намного более простым решением является использование управления системой в режиме разделения времени. Разделение по времени под управлением компьютера гарантирует, что в одно и то же время оптический сигнал лишь с одной длиной волны может пройти через всю систему. Таким путем перекрестные помехи между каналами можно сократить для фазы до $0,1^\circ/\text{дБ}$ и для амплитуды до $0,5$ мВ/дБ [4].

11.3. Метод фазированной решетки для интенсивности

В БИК-диапазоне длина волны диффузных волн фотонной плотности в биотканях равны 5–14 см для частот модуляции от 500 до 100 МГц (см. формулы (1.53) и (1.54)). Это означает низкое пространственное разрешение при визуализации с помощью одного источника в комбинации с одним детектором, несмотря на высокую точность фазовых и амплитудных измерений. Метод интерференции волн фотонной плотности, описанный впервые в работе [459] (называемый также методом взаимного гашения фазы и амплитуды или методом фазированной решетки) весьма перспективен для улучшения пространственного разрешения модуляционного метода [4, 53, 470].

Концепцию этого метода иллюстрирует рис. 11.10. Она основана на использовании либо двух источников и одного приемника, либо одного источника и двух приемников, чтобы амплитудные и фазовые характеристики можно было обратить в нуль и система стала дифференциальной. Если использовать равные амплитуды источников с фазами 0° и 180° , то при соответствующем положении приемника амплитуда сигнала обращается в нуль, а сдвиг фазы принимает промежуточное между 0° и 180° значение, т. е. 90° :

$$A \sin(\omega t + 0^\circ) + A \sin(\omega t + 180^\circ) = 2A \cos(90^\circ) \cdot \sin(\omega t + 90^\circ), \quad (11.11)$$

где ω — частота модуляции света.

В неоднородной среде наблюдаемая амплитуда может слегка смещаться от нуля, а сдвиг фазы — от 90° (см рис. 11.11). Этот метод предельно чувствителен к возмущению исследуемой среды при внедрении поглощающего или рассеивающего объекта. Для поглощающей неоднородности было достигнуто пространственное разреше-

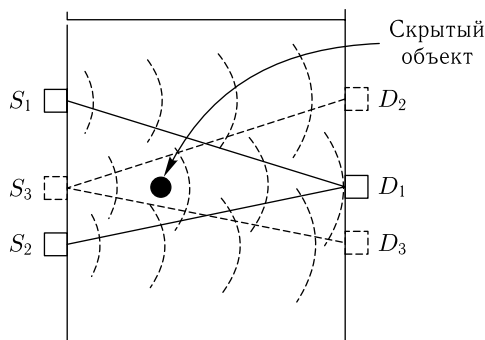


Рис. 11.10. Геометрия метода взаимного погашения амплитуды и фазы волн фотонной плотности; два источника (S_1 и S_2) и один приемник (D_1), или два приемника (D_2 и D_3) и один источник (S_3) [1913]

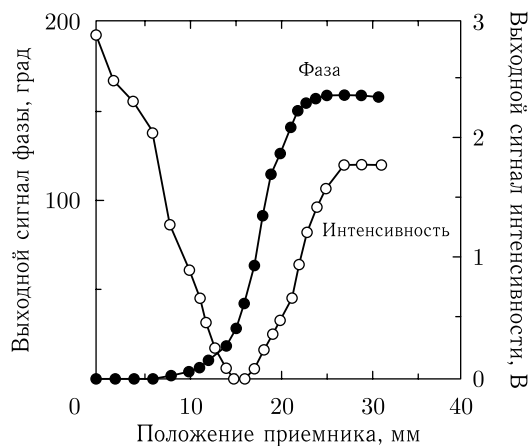


Рис. 11.11. Демонстрация существования нулевой амплитуды и промежуточной фазы волн фотонной плотности для измерительной системы типа фазированной решетки для исследования мозга взрослого человека. Приемник сканируется между двумя источниками, расположенными на расстоянии 4 см от приемника и возбуждаемыми ВЧ-сигналами на частоте 200 МГц с фазовым сдвигом 180° [1911]

ние около 1 мм, такое же разрешение ожидается для рассеивающей неоднородности. Другое достоинство метода состоит в том, что вблизи нуля система сравнительно нечувствительна к амплитудным флуктуациям обоих источников света. С другой стороны, таким методом нельзя зарегистрировать крупномасштабные неоднородности, охватывающие область прохождения обоих оптических путей. Амплитудный сигнал не так полезен при визуализации, поскольку он не позволяет однозначно определять положение объекта (см. рис. 11.11). Правда, эту неоднозначность можно ликвидировать при дальнейшей обработке. Фазовый же сигнал позволяет однозначно определять положение объекта без дальнейшей обработки (см. рис. 11.11), при этом фазовый шум не превышает $0,1^\circ$ (отношение сигнал–шум более 400) при ширине полосы 1 Гц [4].

Для получения оптимальных результатов система с измерением фазы модуляции требует измерительной технологии ОБП (см. рис. 11.7 з). В представленной на рис. 11.12 системе на основе фазированной решетки с длиной волны 780 нм и частотой модуляции 50 МГц используются девять источников и четыре приемника [1911]. Число источников и приемников может быть легко увеличено, более того, можно

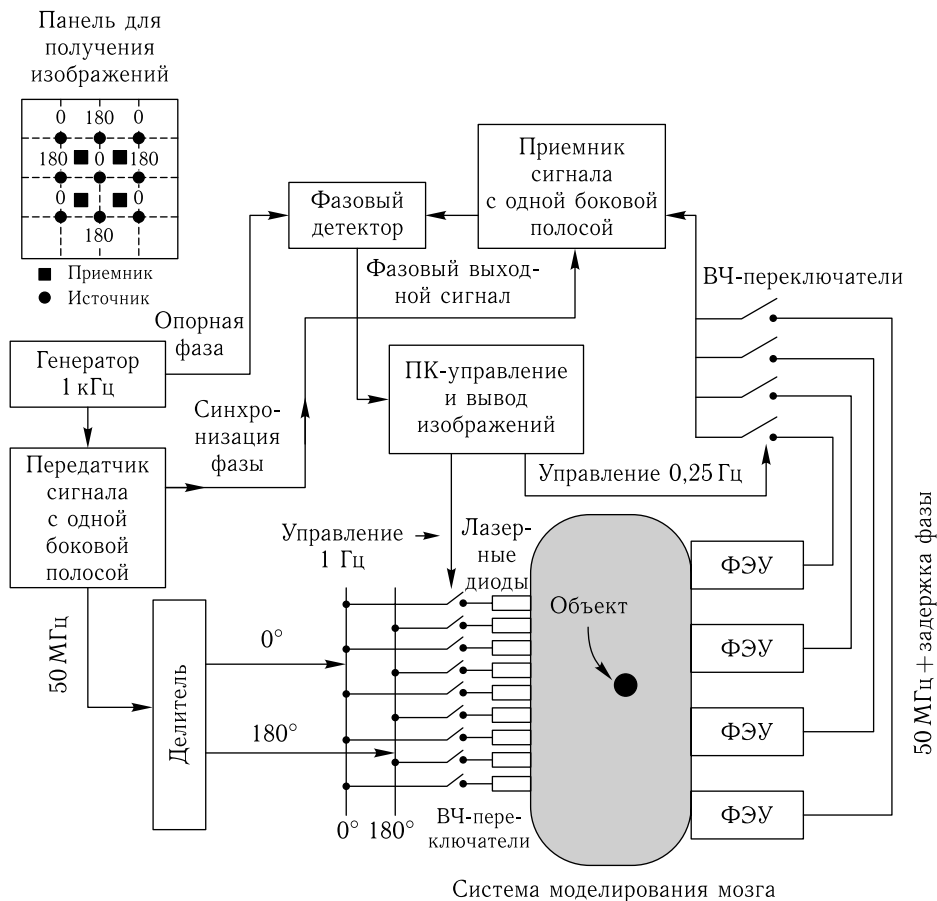


Рис. 11.12. Одноволновая (780 нм) система визуализации типа фазированной решетки с частотой модуляции 50 МГц и выделением одной боковой полосы (ОБП) [1911]

увеличить число комбинаций источников и приемников, просто сдвигая панель приемников в двух измерениях по отношению к исходному положению на половину минимального расстояния между источником и приемником, равного 2,5 см. Размеры панели для получения изображений 9×4 см (см. верхнюю левую часть рис. 11.12).

Гетеродин с частотой 1 кГц модулирует ОБП-генератор, работающий на частоте 50 МГц, выходной ВЧ сигнал от которого направляется на фазовый делитель/инвертор $0^\circ/180^\circ$, а затем на девять переключателей, соответствующих девяти источникам света, фаза которых последовательно переключается с 0° на 180° и обратно с частотой 1 Гц. Четыре ФЭУ последовательно соединены с ОБП-приемником, настроенным на частоту 50 МГц (чувствительность 0,5 мВ), а выходной сигнал приемника на аудиочастоте 1 кГц направляется на фазовый детектор нулевого пересечения, который уже выдает последовательность сигналов, пропорциональных фазе. Через управляющий компьютер фазовый детектор соединен с компьютером для цифровой обработки сигналов и получения изображения (не показан). Передатчик и приемник синхронизированы по фазе на ВЧ. Фазовый шум системы ниже $0,1^\circ$ (ширина полосы 1 Гц). Полный набор данных от 16 комбинаций приемников и источников получается каждые 16 с.

Рисунок 11.13 иллюстрирует возможность тестирования нейрососудистой связи в мозге человека при использовании одноволновой (780 нм) измерительной системы на основе фазированной решетки, работающей на частоте 50 МГц. Изображение показывает приращение фазового сдвига, вызванное прикосновением контралатерального пальца. Калибровка на моделях подтверждает, что этот сигнал возникает из-за возрастания концентрации гемоглобина в определенной части мозга при прикосновении пальца [1911].

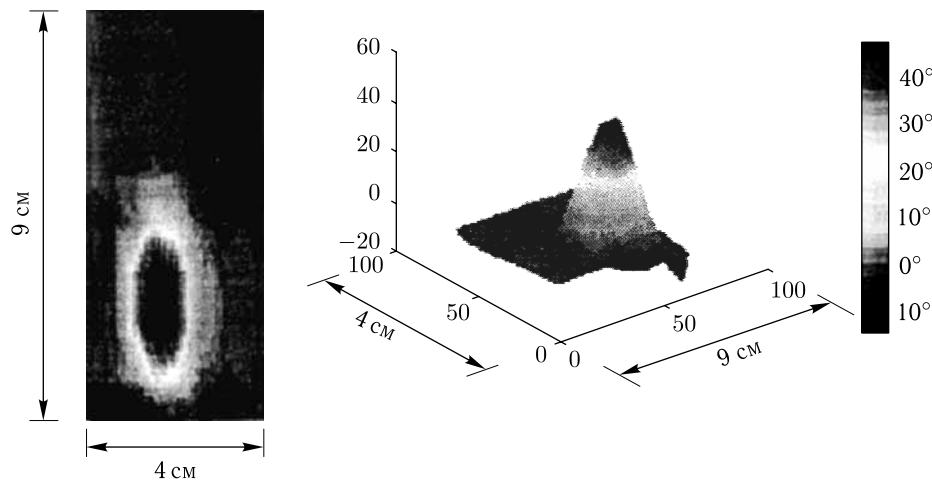


Рис. 11.13. Изображение, полученное с помощью системы с фазированной решеткой на частоте 50 МГц, представленной на рис. 11.12, при тестировании мозга взрослого человека (светлые волосы). Производилась теменная стимуляция прикосновением контралатерального пальца в течение 48 с [1911, 1913]

Более универсальная и комплексная визуализирующая система типа фазированной решетки, которую можно использовать для тестирования функций мозга новорожденных, описана в работе [1912]. Вместо лазерных диодов на одной длине волны использовался набор из 18 лазерных диодов на двух длинах волн (750 и 830 нм) мощностью 20 мВт. Длина волны была сдвинута с 780 до 750 нм, так как на длине

волны 750 нм детектируемый сигнал выше более чем вдвое из-за разницы в коэффициентах экстинкции света. Прием оптических сигналов осуществлялся четырьмя ФЭУ (ТО8, Hamamatsu). Использовались два независимых фазометра и два ОБП приемника/передатчика с частотами 50 и 52 МГц. Размер оптического зонда был несколько больше (10×5 см), поскольку в каждой точке расположено два лазера, однако расстояние между источником и приемником такое же, 2,5 см (см. рис. 11.12). Визуализирующая система типа фазированной решетки на двух длинах волн может использоваться для тестирования функции мозга новорожденных и ее связи с некоторыми неврологическими расстройствами путем мониторинга метаболической активности, которая обнаруживается по изменениям концентрации кислорода или по потреблению глюкозы клетками мозга.

Другая система визуализации на двух длинах волн (750 и 830 нм), использующая простой метод компенсации амплитуд (см. рис. 11.11) использовалась для получения изображений молочной железы [1913]. Оптический зонд системы состоит из 9 лазерных диодов и 21 кремниевый фотоприемника. При измерениях в течение одной миллисекунды осуществляется последовательный проход по всем источникам и приемникам. В результате каждые 8 с регистрируется высококачественное изображение опухоли молочной железы. В качестве примера на рис. 11.14 представлены четыре изображения *in vivo* больной и здоровой молочной железы. За счет получения разностного изображения левой и правой молочной железы исключается большая часть фона и отображаются лишь сильные разностные сигналы, совпадающие с ожидаемым положением опухоли. Из-за практической идентичности оптических свойств левой

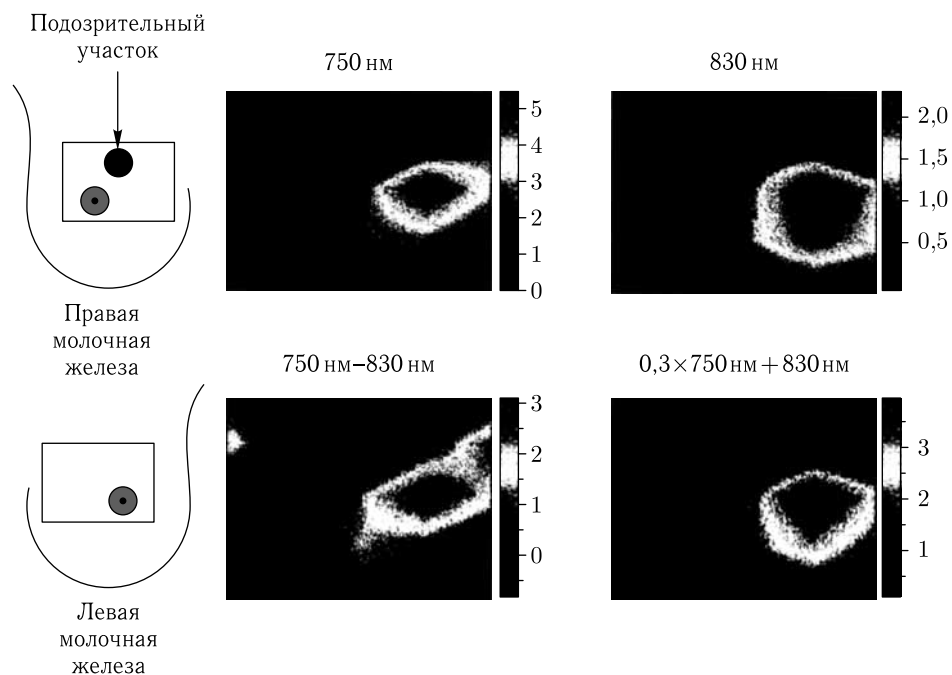


Рис. 11.14. Четыре *in vivo* изображения правой молочной железы с опухолью за вычетом опорного изображения здоровой левой молочной железы на длинах волн 750 нм и 830 нм и два рассчитанных изображения: разность значений на каждом пикселе ($750 \text{ нм} - 830 \text{ нм}$) — отображение дезоксигенации; и взвешенная сумма значений на каждом пикселе ($0,3 \cdot 750 \text{ нм} + 830 \text{ нм}$) — отображение объема крови [1913]

и правой молочной железы вне зоны патологии на изображении не видно даже следов соска. Однако благодаря сильным различиям в степени оксигенации и полном объеме крови опухоли и аналогичной нормальной ткани, опухоль хорошо контрастируется по этим двум признакам.

Пределные возможности локализации макронеоднородностей, скрытых в глубине сильно рассеивающей среды, с помощью систем визуализации типа фазированной решетки обсуждаются в работе [430].

11.4. Измерения *in vivo* и примеры клинических исследований

Рассмотрим кратко несколько спектроскопических и томографических модуляционных систем, демонстрирующих достижения в области оптической диагностики *in vivo* и нашедших применение в клинических исследованиях. Выше было показано, что для определения абсолютных значений коэффициента поглощения и приведенного коэффициента рассеяния нужно обеспечить измерение амплитуды и фазы модуляции для нескольких частот модуляции. В частности для измерений *in vivo* оптических параметров биологических тканей можно использовать портативный широкополосный (0,3–1000 МГц) модуляционный спектрометр, работающий на четырех фиксированных длинах волн (674, 811, 849 и 956 нм) [432, 434] (см. рис. 11.15). Ключевым компонентом спектрометра является сетевой анализатор (8753С, Hewlett Packard), который используется для развертки модуляции в диапазоне 0,3–1000 МГц. ВЧ-сигнал от сетевого анализатора накладывается на постоянный ток цепи питания каждого из четырех диодных лазеров путем подачи тока смещения и ВЧ-переключения. Четыре градиентных волоконных световода диаметром 100 мкм соединяют

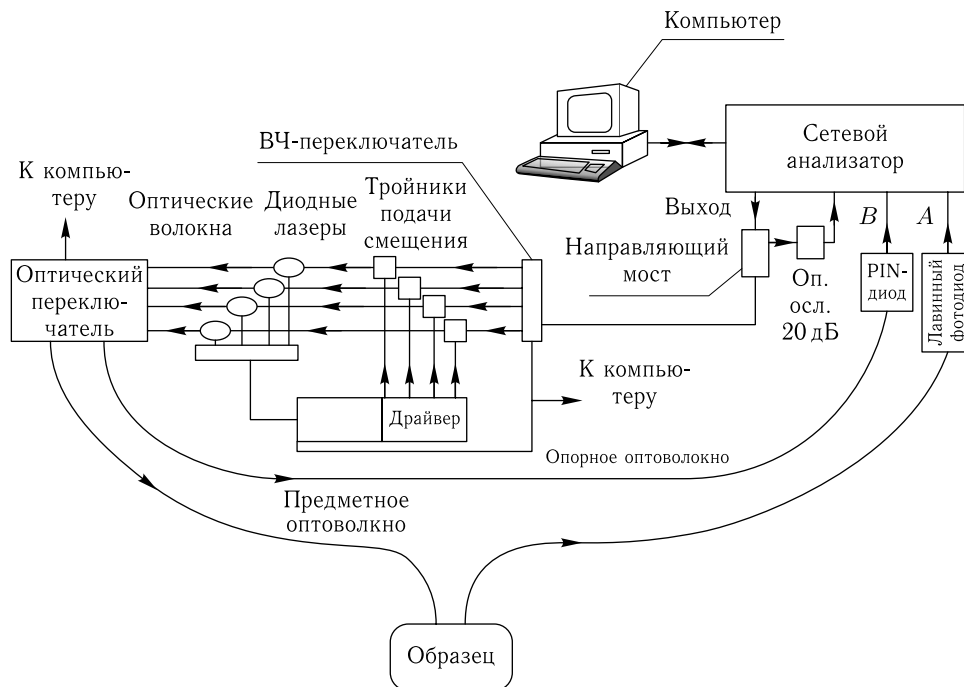


Рис. 11.15. Многоволновый многочастотный и многоканальный модуляционный спектрометр [432, 434]

каждый источник света с оптическим мультиплексором 8×8 (GP700, DiCon Instruments). При измерениях динамическая опорная фаза и компенсация флуктуаций источника в реальном времени обеспечиваются волоконно-оптическим ответвлением, направляющим часть выходного сигнала источника (5%), минуя объект исследования, непосредственно на PIN-фотодиод (1 ГГц), соединенный с сетевым анализатором через приемный канал В.

Свет направляется на исследуемую ткань посредством восьми освещающих волокон, соответствующих восьми различным положениям источника света. Лавинный фотодетектор (ЛФД) (С5658, Hamamatsu) используется для регистрации рассеянного оптического сигнала. Как ЛФД, так и концы освещающих оптических волокон находятся в прямом контакте с поверхностью кожи пациента. Оптическая мощность, направляемая на кожу, равна приблизительно 10–30 мВт, что примерно в 10 раз меньше порога термического повреждения для используемых волокон и длин волн. С помощью оптического (8×8)-мультиплексора можно было обеспечить направление вплоть до восьми отдельных источников излучения на восемь отдельных измерительных позиций на объекте. Время измерения зависит от требуемой точности, числа выполняемых проходов, а также ВЧ/оптического времени переключения. При исследованиях на человеке примерно 0,5 с требовалось для одного прохода по всему диапазону частот модуляции вплоть до 1 ГГц. Однако полное время, затрачиваемое для четырех лазерных диодов (два прохода на один лазер), включая передачу данных, отображение и переключение источников составляет уже примерно 40 с. Расстояние между источником и приемником при измерениях на человеке было фиксировано и равно 1,7; 2,2 или 2,7 см.

Результаты экспериментального исследования трех пациентов с использованием разработанного модуляционного спектрометра представлены в табл. 7.1 и 11.1. Таблица 11.1 также показывает рассчитанные физиологические параметры живой ткани, такие как абсолютная концентрация деокси- и оксигемоглобина, полное содержание гемоглобина и воды. Предполагалось, что хромофоры, вносящие вклад в коэффициент поглощения μ_a у человека — это главным образом окси- и деоксигемоглобин и вода. Поэтому концентрация каждого компонента ткани определяется из измерений μ_a на трех различных длинах волн (674, 811 и 956 нм) в соответствии со следующей системой трех уравнений:

$$\varepsilon_{\text{Hb}}(\lambda_i)c_{\text{Hb}} + \varepsilon_{\text{HbO}_2}(\lambda_i)c_{\text{HbO}_2} + \varepsilon_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda_i)c_{\text{H}_2\text{O}} = \mu_a(\lambda_i), \quad (11.12)$$

где $\varepsilon_{\text{chrom}}(\lambda_i)$ — коэффициент экстинкции в единицах $\text{см}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$ для данного хромофора (Hb, HbO₂, H₂O) на длине волны λ_i , $i = 1, 2, 3$,

$$\begin{bmatrix} 6\,578\,300 & 740\,100 & 0,0748 \\ 1\,833\,100 & 2\,153\,900 & 0,427 \\ 1\,500\,600 & 3\,048\,600 & 7,24 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} c_{\text{Hb}} \\ c_{\text{HbO}_2} \\ c_{\text{H}_2\text{O}} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mu_a(674) \\ \mu_a(811) \\ \mu_a(956) \end{bmatrix}. \quad (11.13)$$

Каждый столбец матрицы содержит значения коэффициента экстинкции для одного хромофора на трех длинах волн. Значения коэффициента поглощения на каждой длине волны определяются экспериментально.

Обсуждаемая спектроскопическая система может использоваться с равным успехом для целей визуализации. В литературе описано много модуляционных систем визуализации (см. работы [1, 3, 4, 6, 427–429, 466, 510, 538–540, 543, 1914–1919]). Одна из таких систем разработана Университетом штата Пенсильвания и NIM Inc. для отображения областей мозга [1914]. Система может работать на выбираемых радиочастотах от 50 до 400 МГц. В ней используется источник света с двумя длинами

волн (два диодных лазера на 779 и 834 нм), ЛФД для фоторегистрации и ОБП-электроника для модуляции/демодуляции. Данная система успешно применялась в клинических исследованиях, при которых на основе реконструированного изображения (на глубину до 1,2 см) ткани мозга больного гидроцефалией (аномальной увеличением объема цереброспинальной жидкости (ЦСЖ)) определялось положение компонентов шунта в ходе операции по его замене.

Таблица 11.1
Результаты измерений *in vivo* оптических и физиологических параметров здоровых и патологических тканей пациентов (расстояние между источником и приемником равно 2,2 см, в скобках приведены среднеквадратичные ошибки) [432, 434]

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	C_{Hb} , мкМ	C_{HbO_2} , мкМ	$C_{\text{Hb} + \text{HbO}_2}$, мкМ	$C_{\text{H}_2\text{O}}$, М
Молочная железа (56 лет)						
Норма	674	0,04	4,96	10,6	15,56	6,39
	811	0,035				
	849	0,035				
	956	0,085				
Фиброаденома с гиперплазией протоков	674	0,055	5,65	22	27,65	6,02
	811	0,06				
	849	0,055				
	956	0,12				
Молочная железа (27 лет)						
Норма	674	0,035	4,1	8,13	12,23	9,4
	811	0,03				
	849	0,038				
	956	0,09				
Киста, заполненная жидкостью	674	0,07	8,1	23,6	31,7	11,3
	811	0,07				
	849	0,08				
	956	0,16				
Множественная подкожная крупноклеточная карцинома (мужчина, 62 года)						
Брюшная часть						
Норма	674	0,0589 (0,0036)	6,22 (0,64)	23,9 (1,9)	30,1 (2,0)	4,09 (2,23)
	811	0,0645 (0,0032)				
	849	0,0690 (0,0025)				
	956	0,1110 (0,015)				
Опухоль	674	0,169 (0,02)	17,4 (3,6)	73,4 (8,3)	90,8 (9,0)	—
	811	0,190 (0,015)				
	849	0,276 (0,03)				
	956	—				

Таблица 11.1 (окончание)

Биоткань	λ , нм	μ_a , см^{-1}	C_{Hb} , мкМ	C_{HbO_2} , мкМ	$C_{\text{Hb} + \text{HbO}_2}$, мкМ	$C_{\text{H}_2\text{O}}$, М
Спина						
Норма	674	0,0883 (0,006)	9,68 (1,04)	33,2 (2,7)	42,9 (2,9)	—
	811	0,0892 (0,005)				
	849	0,0915 (0,0030)				
	956	0,127 (0,03)				
Опухоль	674	0,174 (0,02)	19,1 (3,7)	66,0 (7,4)	85,1 (8,2)	—
	811	0,177 (0,013)				
	849	0,190 (0,01)				
	956	0,186 (0,16)				

В работе [447] описана очень стабильная и быстрая система визуализации с использованием дифракции волн фотонной плотности. Система собрана на основе ВЧ-модулированного (100 МГц) маломощного (около 3 мВт) диодного лазера (786 нм). Свет от источника направляется на ткань по волоконному световоду, а другой — приемный волоконный световод — передает регистрируемый рассеянный модулированный свет на ЛФД. Используется ОБП IQ демодуляционная электроника. Динамический диапазон системы примерно 2500. Положение волоконного световода — источника фиксировано, единственное приемное волокно сканируется в пределах области $9,3 \times 9,3 \text{ см}^2$; в каждом положении записывается амплитуда и фаза детектируемого сигнала при общем числе точек 1024. Для получения проекционных изображений скрытых макронеоднородностей были разработаны и клинически испытаны алгоритмы, основанные на спектральном анализе в K -пространстве и быстром преобразовании Фурье (БПФ). Подход на основе БПФ давал проекционные изображения в клинических условиях со временем обработки намного меньшим времени сбора данных. Было показано, что важную проблему представляют краевые эффекты на границе исследуемого объекта, связанные, например, с изменением его толщины, резким изменением рассеивающих свойств и показателя преломления окружающей среды. Для уменьшения влияния краевых эффектов можно использовать согласующие вещества с заданными рассеивающими свойствами и значением показателя преломления, которые окружают объект исследования. Учет краевых эффектов может быть также включен и в сам алгоритм реконструкции, но для этого необходима тщательная разработка модели исследуемого объекта с учетом его геометрии и геометрии эксперимента.

Схема модуляционного оптического маммографа (LIMA), разработанного компанией Carl Zeiss, показана на рис. 11.16 [453, 454]. В нем используются два диодных лазера на 690 и 810 нм. Интенсивности лазеров синусоидально модулируются на частотах 110,0010 и 110,008 МГц соответственно. Средняя мощность составляет около 10 мВт. Пучки обоих лазеров (2 см в диаметре) коллимируются и коллимерно направляются на объект. Оптическое волокно диаметром 5 мм, расположенное

с противоположной стороны молочной железы, направляет свет на фотоприемник, в качестве которого используется ФЭУ с модулированным усилением. Частота модуляции усиления равна 110 МГц. Разности частот модуляции света и усиления составляют $\Delta f_1 = 1$ кГц (сигнал на 690 нм) и $\Delta f_2 = 0,8$ кГц (сигнал на 810 нм), они называются частотами кросс-корреляции. Соответствующая электронная фильтрация позволяет разделить сигналы на этих частотах, т. е. фактически разделить сигналы, соответствующие различным длинам волн зондирования объекта.

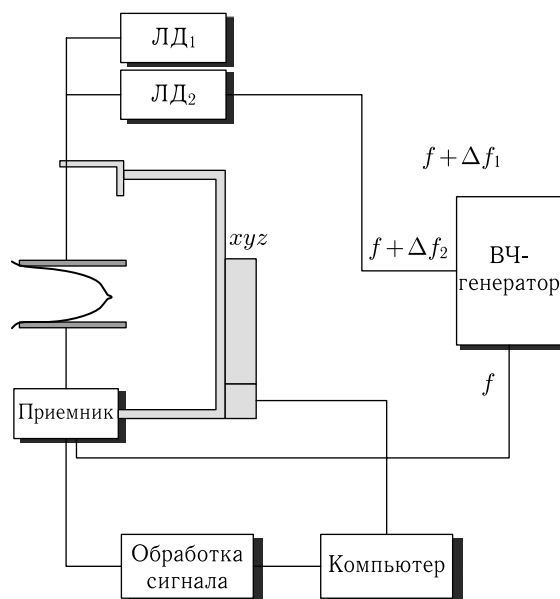


Рис. 11.16. Схема модуляционного маммографа (LIMA) [453, 454]

Молочная железа слегка сжимается между двумя параллельными стеклянными пластинами. Лазерный пучок с двумя длинами волн и приемное волокно совместно сканируются по верхней и нижней поверхности, так что расстояние между источником и приемником фиксировано. Весь оптический измерительный блок с двумя стеклянными пластинами можно поворачивать на 90° для получения краниокаудальной (горизонтальной) и медиолатеральной (вертикальной) проекций. Расширение шага сканирования (увеличение размера пикселя) можно устанавливать программно, однако в общем случае оно определяется необходимым пространственным разрешением, полным временем сбора данных и отношением сигнал-шум. Для данной системы шаг сканирования 1,5 мм в обоих направлениях требует полного времени сбора данных около 3 мин на всю маммограмму при уровне шума около 0,2% для фазы и 0,1% для амплитуды. Влияние краевых эффектов учитывалось с помощью соответствующего алгоритма (функции $N(x, y)$), основанного на использовании информации о фазе в данном пикселе с координатами (x, y) для оценки локальной толщины молочной железы в этой точке. На втором шаге зависимость амплитудного сигнала от толщины молочной железы моделируется с использованием эмпирически определенной зависимости от толщины в оптически однородном случае. Система LIMA прошла клиническую проверку на 15 больных раком молочной железы.

На рис. 11.17 представлены две маммограммы — рентгеновская и оптическая (810 нм) для молочной железы с опухолью. Сравнение этих маммограмм ясно пока-

зывает, что данный оптический метод имеет хороший контраст и способность обнаружить опухоль, но уступает в пространственном разрешении, которое изначально ограничено диффузным характером распространения света в ткани. Перспективность методов оптической визуализации заключается в высоком контрасте, способности к обнаружению малых изменений поглощения и специфичности, что обеспечивает хорошие диагностические возможности. Дальнейшее усиление контраста может быть достигнуто введением дополнительных источников света, других длин волн, частот модуляции и/или многих приемников (см. обсуждение выше). Кроме усиления контраста, модуляционные и временные методы имеют потенциальную возможность обеспечить оптическую биопсию *in situ* путем измерения локальных оптических свойств биологической ткани [432, 433].

Одна из первых систем визуализации для исследований *in vivo* была создана в Университете штата Иллинойс в Урбана–Шампейн [456]. Оптический сигнал на длине волны 760 нм от титан-сапфирового лазера, работающего в режиме синхронизации мод (Mira 900, Coherent), модулировался на частоте 160 МГц. Гетеродинное смещение в цепи динодов ФЭУ создает сигнал кросс-корреляции (1,25 кГц), несущий ту же амплитудную и фазовую информацию, что и исходный сигнал. Система получения изображения обеспечивает время интегрирования данных менее секунды на один пиксель (полное число пикселей 10^4 , сетка $8 \times 8 \text{ см}^2$ с делением на 101 шаг по 0,8 мм в каждом направлении), что в результате дает полное время измерения около 10 мин. Для уменьшения пределов динамического диапазона измерений и снижения влияния краевых эффектов исследуемая рука человека погружалась в сильно рассеивающий водный раствор Липозина III (20%) (жировая эмульсия для внутривенного вливания), рассеивающие и поглощающие свойства которого подбирались близкими к свойствам руки путем разбавления эмульсии водой с добавлением черной туши.

В модуляционном спектрометре, описанном в работе [431], в качестве источника света используется дуговая лампа, интенсивность излучения которой модулируется с помощью ячейки Поккельса на частоте 135 МГц, с последующим гетеродинным смещением в цепи динода ФЭУ и получением сигнала кросс-корреляции на частоте 100 Гц. Для типичных уровней сигнала уровень шума в данной системе определяется фотонным дробовым шумом. Влияние шума можно минимизировать с использованием конфигурации типа фазированной решетки с двумя приемниками. Для получения наилучшего результата сигналы двух приемников нужно уравнивать, чтобы шум более слабого сигнала не играл определяющей роли. Система обеспечивает наименьшую неопределенность в определении μ_a и μ'_s , около 4% при условии равенства сигналов у обоих приемников. Увеличение глубины и частоты модуляции делает возможным дальнейшее уменьшение случайных ошибок примерно до 1%.

Систематические ошибки, обусловленные конечным объемом ткани и кривизной ее поверхностей, могут быть существенно больше случайных ошибок, вызванных дробовым фотонным шумом. Как обсуждалось ранее, эти систематические ошибки можно уменьшить преимущественно за счет применения соответствующего рассеивающего и поглощающего иммерсионного окружения или если имеется информация о геометрии ткани, достаточная для построения скорректированного алгоритма [453, 454, 456]. Измерения *in vivo*, выполненные на двуглавой мышце бедра кролика, показали, что на практике трудно достичь уровня дробового шума. Среднеквадратичная ошибка в определении μ_a и μ'_s в типичном случае составляет 20% для времени измерения 15 с, тогда как вклад дробового шума оценивается в 8% для μ_a и 4% для μ'_s . Это означает, что при оценке точности определения μ_a и μ'_s другие источники флуктуаций (содержание крови в ткани или степень ее оксигенации, неоднородность ткани, конечные размеры источника и приемника, неопределенность их

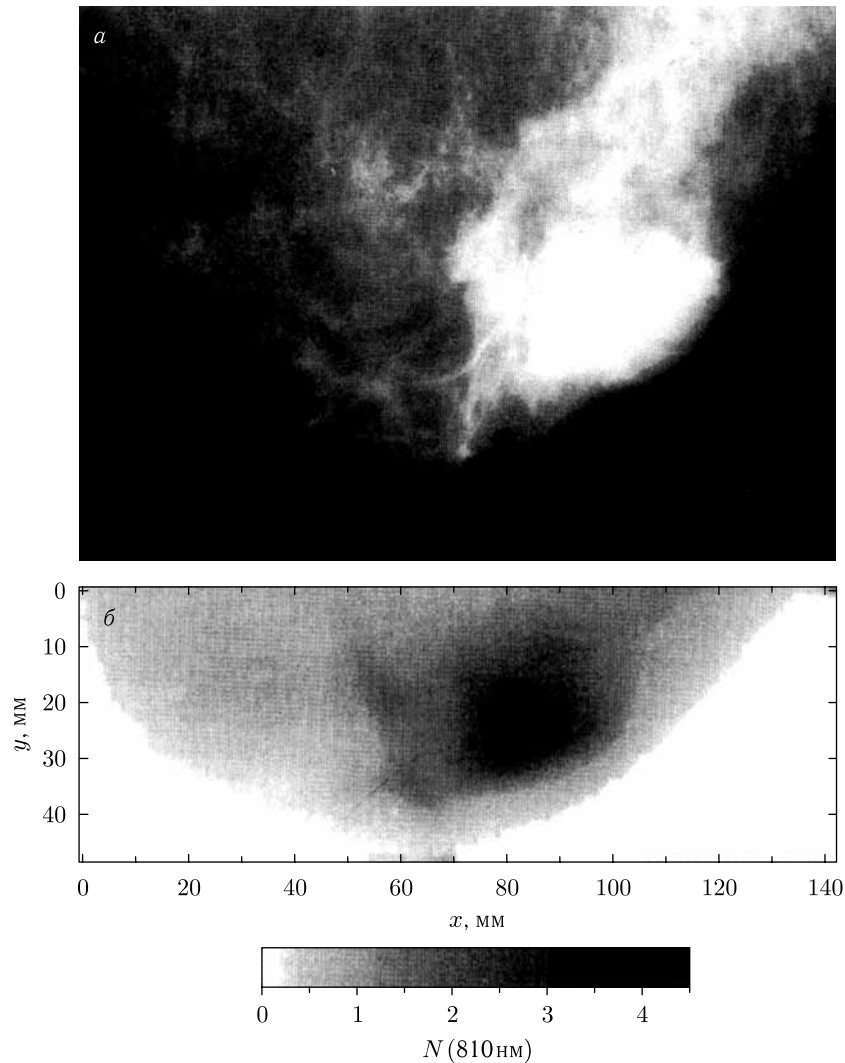


Рис. 11.17. Рентгеновская (а) и оптическая (б) краниокаудальные маммограммы левой молочной железы с опухолью (55-летняя женщина с инвазивным раком протока молочной железы в нижнем латеральном квадранте, основная опухоль 3,0 см в диаметре). Рентгеновское и оптическое изображения не могут быть точно сравнены, поскольку степень и геометрия сжатия были различными при рентгеновском и оптическом исследованиях [453, 454]

относительного расположения и др.) оказываются более важными, чем внутренний аппаратный шум.

В литературе сообщалось о результатах измерений коэффициента поглощения и приведенного коэффициента рассеяния мозга на лобной части головы 30 взрослых добровольцев с использованием многоканального модуляционного БИК-спектрометра (Imagent, ISS®, Champaign, IL) [1916]. В спектрометре использовались диодные лазеры, модулируемые на частоте 110 МГц, и ФЭУ с коэффициентом усиления, модулируемым на слегка смещенной частоте 110,005 МГц, что при гетеродиниро-

вании дает сигнал на частоте 5 кГц. В исследованиях, описанных в работе [1916], использовались 33 лазерных диода (16 на 758 нм и 16 на 830 нм) и четыре ФЭУ. Лазерные диоды мультиплексировались так, что два лазера с одной длиной волны и одинаковым положением включались одновременно. Свет от двух лазеров направлялся оптическим волокном с диаметром сердцевины 400 мкм на поверхность ткани, и фотоны, рассеянные тканью, одновременно собирались волоконно-оптическим жгутом диаметром 5,6 мм, расположенным в нескольких сантиметрах от освещающего волокна. Собираемый свет поступал на ФЭУ, после чего сигналы подвергались цифровой обработке для получения средней интенсивности, амплитуды модуляции и разности фаз. Эти данные использовались для точной оценки абсолютных значений коэффициента поглощения и приведенного коэффициента рассеяния мозга взрослого человека. Было обнаружено, что с точки зрения рассеяния света голова взрослого человека может быть описана двухслойной моделью и что нелинейная регрессия для этой модели может быть использована при точной оценке абсолютных значений коэффициента поглощения и приведенного коэффициента рассеяния обоих слоев при условии, что толщина черепа/скальпа известна. Например, для взрослого человека оптические коэффициенты мозга на длине волны 830 нм были оценены как $\mu_a = 0,145 \pm 0,005 \text{ см}^{-1}$ и $\mu'_s = 4,1 \pm 0,1 \text{ см}^{-1}$. Концентрация гемоглобина и насыщение его кислородом также вычислялись с хорошей точностью, достаточной для обеспечения мониторинга мозгового кровообращения и насыщения крови кислородом, необходимого при оценке патологии мозга, связанной с перфузией ткани кислородом.

Портативный многоволновый модуляционный БИК-спектрометр, аналогичный показанному на рис. 11.9, был использован для изучения оптических свойств мозга 23 новорожденных *in vivo* [1917]. Было обнаружено, что коэффициент поглощения мозга младенца ниже, чем сообщалось для взрослых, и в среднем по 23 новорожденным составляет $\mu_a = 0,078 \pm 0,014 \text{ см}^{-1}$ на 788 нм и $\mu_a = 0,089 \pm 0,019 \text{ см}^{-1}$ на 832 нм. Была продемонстрирована также высокая вариабельность μ'_s от субъекта к субъекту, $\mu'_s = 9,16 \pm 1,22 \text{ см}^{-1}$ на 788 нм и $\mu'_s = 8,42 \pm 1,23 \text{ см}^{-1}$ на 832 нм. Физиологические параметры, определенные по коэффициентам поглощения на двух длинах волн, оказались следующими: средняя полная концентрация гемоглобина $39,7 \pm 9,8 \text{ мкМ}$, среднее церебральное насыщение крови кислородом $58,7 \pm 11,2\%$. Таким образом, было показано, что модуляционная БИК-спектроскопия в прикроватном варианте может обеспечить количественное оптическое измерение параметров мозга ребенка.

Описание клинических и сопутствующих исследований для импульсных систем визуализации на примере оптической маммографии и мониторинга инсультов представлены в работах [527–531, 1920–1922].

11.5. Метод пространственной модуляции

Обоснование пространственно-модуляционного (ПМ) метода измерений оптических параметров биотканей и визуализации дано в разд. 1.4.3. В качестве клинической апробации ПМ-метода были проведены измерения *in vivo* для предплечья руки человека в поле зрения, равного $72 \times 48 \text{ мм}$. Измерения проводились для четырех частот пространственной модуляции, равномерно распределенных по интервалу между 0 и $0,15 \text{ мм}^{-1}$. Установка для ПМ-измерений показана на рис. 11.18. ПМ-освещение в шкале серого генерируется с помощью комбинации источника света и пространственного модулятора света. Как показано в работе [479] можно использовать простой цифровой проектор, основанный на цифровом управлении светом с помощью микродержала (технология DLP) и ртутной лампы сверхвысокой эффективности (ultra-high performance (UHP) mercury lamp). Из проектора устраняется

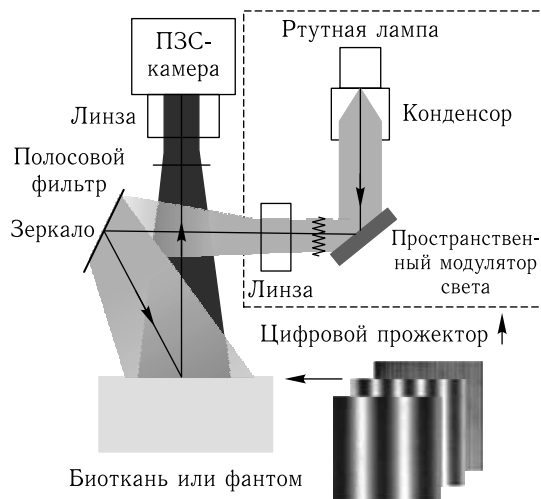


Рис. 11.18. Пространственно-модуляционный метод. Экспериментальная установка для исследования биотканей на основе пространственно-модулированного освещения на разных пространственных частотах: цифровой проектор (NEC HT1000) на основе технологии (DLP) (Texas Instruments), ртутная лампа сверхвысокой эффективности; полосовой интерференционный фильтр ($\lambda = 640 \pm 10, 660 \pm 10, 800 \pm 10$ нм); ПЗС-камера (Roper Cascade 512F, 16-бит, до 30 кадров в секунду с полным разрешением в 512×512 пикселей) [479]

барабан с цветными фильтрами для освещения объекта широкополосным «белым светом» и получения возможности применения узкополосных интерференционных фильтров для проведения исследований на определенной длине волны в пределах узкой полосы. Для формирования пространственно-модулированных пучков с помощью MATLAB (Mathworks, Inc.) генерируются 8-битные растровые изображения в шкале серого. Затем они размещаются в презентационный файл PowerPoint (Microsoft, Inc.) и автоматически последовательно воспроизводятся с помощью элементов управления Microsoft Office ActiveX через внешнюю программу LabVIEW (National Instruments, Inc.). Интенсивность диффузно отраженного света регистрируется 16-битной ПЗС-камерой (Roper Cascade 512F), обеспечивающей до 30 кадров в секунду с полным разрешением в 512×512 пикселей. Зеркальное отражение от объекта обычно устраняется за счет освещения под небольшим углом от нормального падения. Для селекции диффузного отражения дополнительно могут быть использованы скрещенные линейные поляризаторы, что особенно важно при исследовании шероховатых поверхностей (таких как кожа), когда зеркальный компонент имеет много углов отражения.

Модульный характер экспериментальной установки, как ее конструкции, так и используемого программного обеспечения, делает ее очень гибким и удобным инструментом. Во-первых, поле зрения ограничено лишь увеличением освещающей и собирающей оптики (с предельным разрешением, определяемом только фундаментальными законами оптики). Во-вторых, необходимый спектральный диапазон обеспечивается выбором источника света, пространственного модулятора света и визуализирующего сенсора. Для многих приложений ПМ-система может быть потенциально очень дешевой, поскольку основана на использовании широко распространенных на рынке цифровых камер и проекторов. Для многих применений в зависимости от необходимого разрешения по измерению модуляции интенсивности отраженного света (соответственно оптических параметров) требуемый динамический диапазон ПЗС-камеры может не превышать 8 бит.

Для измерений *in vivo* диффузного отражения от предплечья руки человека был использован интерференционный фильтр на длину волны 640 ± 10 нм и скрещенные линейные поляризаторы, которые устраняли зеркальную составляющую отраженного света от шероховатой поверхности кожи и максимально повышали чувствительность установки к диффузной компоненте отраженного света (рис. 11.19).

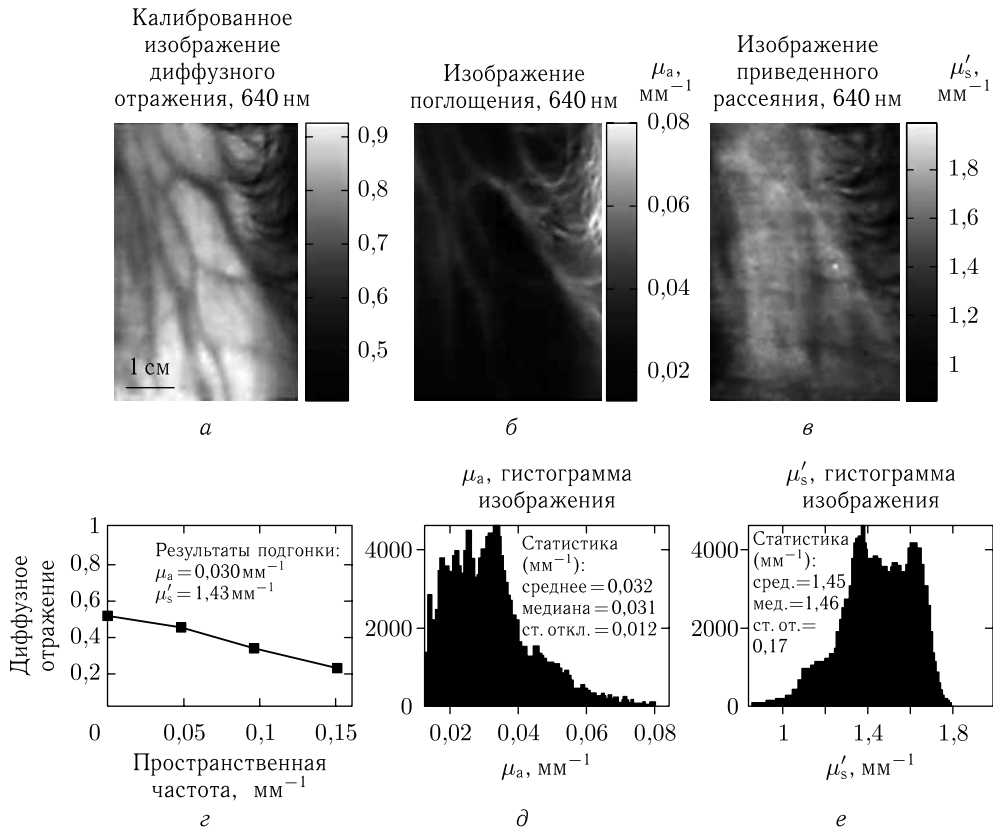


Рис. 11.19. Пространственно-модуляционный метод: *a* — изображение диффузного отражения от предплечья руки человека при планарном освещении; *b* — изображение в виде реконструированного коэффициента поглощения; *c* — изображение в виде реконструированного приведенного коэффициента рассеяния; *z* — усредненные данные для диффузного отражения на четырех пространственных частотах и результаты обработки экспериментальных данных методом наименьших квадратов с использованием уравнения (1.69); статистика: *d* — гистограммы пикселей для значений коэффициента поглощения; *e* — гистограммы пикселей для значений приведенного коэффициента рассеяния [479]

Для демонстрации чувствительности ПМ-системы к физиологическим возмущениям, были проведены стандартные исследования венозной окклюзии в поле зрения 29×40 мм верхней части ладони (рис. 11.20, цветная вклейка). Выбранная длина волны измерений, равная 800 ± 10 нм, близка к изобестической точке спектра гемоглобина, 805 нм, где степень оксигенации гемоглобина мало влияет на величину поглощения, а поглощение в основном определяется объемом крови. Диффузное отражение для пространственных частот модуляции от 0 до $0,135 \text{mm}^{-1}$ измерялось каждые 4 с в течение 13 мин. После 2,5 мин наблюдения за базовой линией нало-

женный манжет наполнялся воздухом до давления 100 мм. рт. ст. на 6,5 мин и затем опорожнялся на 9-й минуте.

На рис. 1.28 (середина) представлены изображения (карты) диффузного отражения (R_d) для разных пространственных частот (f_x), измеренные *in vivo* для предплечья руки человека. Отметим изменение дифференциального контраста по мере увеличения пространственной частоты, что дает возможность отдельно определять поглощение и рассеяние. Кроме того, более высокие частоты соответствуют зондированию более поверхностных областей ткани, что определяет меньший вклад со стороны более глубоко лежащих сосудистых структур. На рис. 11.19 показаны те же многочастотные пространственно-модуляционные измерения для предплечья руки человека, которые включают результаты калибровки и обработки данных, а также статистику: а) карта диффузного отражения при планарном освещении, $f_x = 0 \text{ мм}^{-1}$ (калиброванное распределение); б) изображение в виде реконструированного коэффициента поглощения; в) изображение в виде реконструированного приведенного коэффициента рассеяния; г) усредненные данные для диффузного отражения на четырех пространственных частотах и результаты обработки методом наименьших квадратов с использованием уравнения (1.69) многочастотных экспериментальных данных для каждого пикселя (см. разд. 1.4); д) статистика: гистограммы пикселей для значений коэффициента поглощения, е) гистограммы пикселей для значений приведенного коэффициента рассеяния. Контраст по поглощению позволяет хорошо визуализировать подлежащие вены, в то время как карта рассеяния имеет в середине вертикальную структуру с пониженными рассеивающими свойствами, которую можно отнести на счет лежащего вблизи поверхности сухожилия, которое, возможно, захватывает свет как натуральный световод, поскольку ее показатель преломления в общем случае выше окружающих биотканей [169]. На основе этих данных можно заключить, что глубина зондирования метода по уровню $1/e$ составляет от 2 мм до 3,3 мм соответственно, для низких ($\sim 0 \text{ мм}^{-1}$) и высоких ($0,15 \text{ мм}^{-1}$) пространственных частот.

На карте поглощения отмечена область (пунктирные линии), содержащая хорошо видимую вену. В этой области наблюдается 100%-й контраст по поглощению над веной ($0,46 \text{ мм}^{-1}$) по сравнению с фоном ($0,23 \text{ мм}^{-1}$); в то же время в этой области рассеяние дает небольшой контраст, всего с 10%-ми пространственными вариациями.

Измерения диффузного отражения обратной стороны ладони человека при венозной окклюзии, представленные на рис. 11.20, демонстрируют кинетику изменения объема крови в ткани через измеренные значения коэффициента поглощения на длине волны 800 нм. Для анализа были выбраны две пространственные области, одна для демонстрации глобальных изменений по всему изображению, а вторая — только по небольшой области, где нет видимых сосудов, но где, как и везде, должна быть микрососудистая структура. Усредненные по этим областям временные изменения оптических свойств показаны на рис. 11.20 б, где даны изменения коэффициента поглощения (верхние кривые) и приведенного коэффициента рассеяния (нижние кривые) относительно соответствующих базовых линий. Как и ожидалось, поглощение для обеих областей возрастает при начале окклюзии (2,5 мин), а затем после снятия окклюзии на 9 мин наблюдается спад поглощения, который происходит примерно в течение последующих 2 мин. Максимальное увеличение поглощения примерно равно $0,012 \text{ мм}^{-1}$ для всей области и $0,017 \text{ мм}^{-1}$ для области, содержащей только микрососуды, что соответствует примерно 15%-му и 28%-му повышению относительно базовой линии. Большее возрастание поглощения, наблюдаемое в области микрососудов, может быть объяснено тем фактом, что микроциркуляторная часть сосудистого русла более восприимчива к наполнению венозной кровью, в то время

как большие сосуды менее реактивны. В области окклюзии наблюдались также небольшие флуктуации рассеяния, которые были $< 5\%$ по всей картине и $< 2\%$ для небольшого участка без видимых сосудов.

Таким образом, пространственно-модуляционная измерительная платформа для исследований биологических тканей позволяет получать количественные характеристики для полнопольных изображений оптических параметров с субмиллиметровым разрешением, а также динамических изображений физиологических возмущений, включая гемодинамический отклик при ишемическом инсульте [478, 479]. Для практических приложений в медицинских исследованиях ПМ-метод может быть расширен на основе многочастотной визуализации [494] для возможности количественного функционального картирования эндогенных и экзогенных хромофоров в биоткани [476, 481, 482, 493] и получения изображений с разрешением по глубине, включая многослойные и томографические подходы [494].

На рис. 11.21 и 11.22 (цветная вклейка) дана еще одна иллюстрация эффективности ПМ-метода в приложении к количественной визуализации *in vivo* распределения фотодинамического агента протопорфирина IX (Пп IX), индуцированного при аппли-

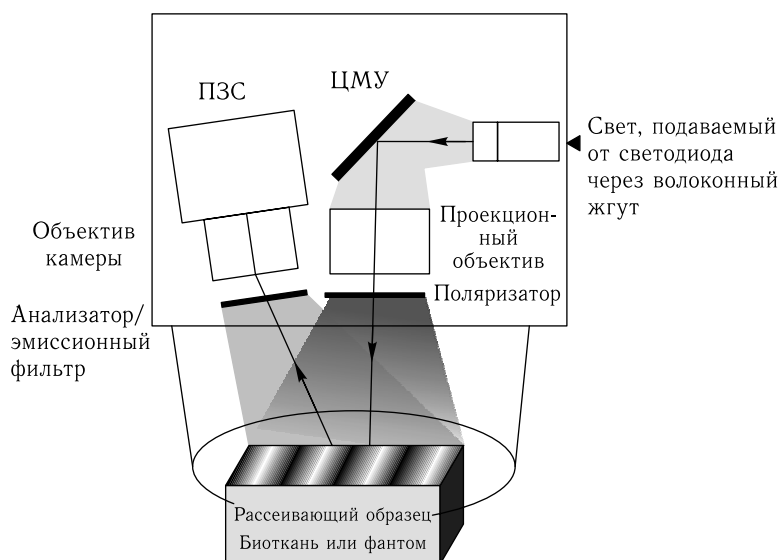


Рис. 11.21. Проекционная система на основе цифрового микрзеркального устройства (ЦМУ) и светодиода (СД) (Texas Instruments) для обеспечения структурированного (пространственно-модулированного) освещения на дискретных длинах волн (630, 730 и 850 нм) для определения оптических свойств биологических тканей и обеспечения планарного освещения для возбуждения флуоресценции в поле зрения 30×40 мм [493]. 12-битная ПЗС-камера (Lumenera) использовалась для регистрации сигналов отражения и флуоресценции от биоткани. При измерениях пространственных спектров диффузного отражения для блокирования зеркального отражения использовались скрещенные поляризатор и анализатор. Для флуоресцентных измерений анализатор заменялся на длинноволновый отрезающий фильтр с длиной волны отсечки на 650 нм. Плоскость изображений ПЗС-камеры согласовывалась с тем же полем зрения проекции. Для ПМ-измерений использовали 6 пространственных частот (от 0 до $0,5 \text{ мм}^{-1}$), которые проектировались на объект в виде трех последовательных фазовых изображений с пространственным сдвигом (0, 120, и 240 град) для каждой длины волны. Полное время измерений в пределах всего динамического диапазона ПЗС-камеры составляло примерно 4 с, однако для регистрации изображений флуоресценции практически было достаточно 2 с

кации ALA на кожу (обратная сторона ладони) [493]. Устройство максимально использует хорошо доступные средства цифровой проекционной техники и модульный принцип сборки. Количественное определение оптических параметров кожи на основе пространственно-модуляционной визуализации для 6 пространственных частот модуляции (от 0 до $0,5 \text{ мм}^{-1}$) и эмпирической модели, использующей метод Монте-Карло, позволило исключить эффекты поглощения и рассеяния из сигнала флуоресценции. Это, в свою очередь, позволило авторам [493] определять концентрацию протопорфирина IX с неточностью в $\sim 0,2$ мкг/мл от известной концентрации. Метод был применен к определению концентрации протопорфирина IX в нормальной коже человека *in vivo*, для которой модельно скорректированное значение концентрации оказалось равным $\sim 1,6$ мкг/мл, что находится в согласии с литературными данными.

Как и любой метод с пространственным разрешением [495], ПМ-метод оказывается чувствительным к пространственной анизотропии оптических свойств биологических тканей, что особенно важно для кожи, мышечной ткани, сухожилий и хрящевой ткани. Авторы работы [495] ввели понятие новой функции контраста, базирующейся на индексе ориентации рассеяния (ИОР), который чувствителен к степени направленности рассеяния света. С использованием специальных фантомов и образцов *ex vivo* мышечной ткани и мозга была доказана чувствительность метода к определению ИОР. Было также показано, что ИОР не зависит от величины общего рассеяния и поглощения в биоткани, а изотропные и анизотропные структуры ткани могут быть вполне различимы. Оказалось возможным определять ориентацию микроскопических анизотропных рассеивающих структур, лежащих на глубине до 600 мкм под слоем сильно рассеивающего материала ($\mu'_s = 1,5 \text{ мм}^{-1}$).

Глава 12

ПОЛЯРИЗАЦИОННО-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

В данной главе рассматриваются поляризационно-чувствительные методы для визуализации и функциональной диагностики биологических тканей. Описаны методы, основанные на поляризационной дискриминации зондирующего поляризованного света, рассеянного биотканью или клеточной структурой или прошедшего через них. Обсуждаются преимущества поляризационных методов для визуализации и функциональной диагностики биотканей. Показано, что поляризационно-спектральная селекция рассеянного излучения и поляризационно-флуоресцентный метод значительно улучшают диагностический потенциал оптических методов исследования биотканей.

12.1. Поляризационная визуализация

12.1.1. Метод просвечивания. Поляризационная дискриминация света, прошедшего через многократно рассеивающую среду, может обеспечить высококачественные изображения неоднородностей, находящихся в этой среде. В литературе описаны принципы так называемой поляризационной диафаногрaфии просвечивания неоднородного рассеивающего объекта [1923]. Этот метод позволяет определить положение и получить изображение поглощающего объекта, скрытого в сильно рассеивающей среде. В нем используется модуляция азимута поляризации линейно поляризованного лазерного пучка и синхронное детектирование поляризационных свойств света, прошедшего через объект. В эксперименте рассеивающий образец зондировался пучком аргонового ионного лазера. Ориентация плоскости поляризации зондирующего пучка модулировалась с помощью ячейки Поккельса: в течение первого полупериода модулирующего сигнала она не менялась, а в течение второго полупериода поворачивалась на 90° . Прошедшая (деполяризованная) и рассеянная вперед (поляризованная) компоненты зондирующего пучка коллимировались двумя диафрагмами и делились на два канала поляризационным делителем пучка. Было обнаружено, что по сравнению с обычной диафаногрaфией поляризационная диафаногрaфия позволяет получать теневые изображения скрытого объекта в рассеивающей среде, которая характеризуется средней кратностью рассеяния вплоть до 30 [1923].

Сравнение поляризационной и обычной визуализации на просвет было проведено в работах [565–567, 1853]. Слой рассеивающей среды с помещенной внутрь неоднородностью в виде поглощающей пластины зондировался линейно поляризованным лазерным пучком (рис. 12.1). Теневые изображения реконструировались из профилей интенсивности и степени поляризации P прошедшего света (рис. 12.2). Заметим, что зависимость степени линейной поляризации демонстрирует возрастание P в окрестности края. Объяснение этой особенности аналогично предложенному Жаком и др. [595] для поляризационно-чувствительной регистрации света, рассеянного назад (см. разд. 12.1.2), и связано с тем, что вблизи края поглотителя степень поляризации может быть примерно вдвое больше (для сильно рассеивающих сред), поскольку фотоны I_{\perp} более эффективно распределяются в объеме за счет более длинных путей

пробега и поэтому их вклад в рассеяние в области тени в пиксели на ее краю мал, в то время как фотоны I_{\parallel} , будучи фотонами с относительно короткими длинами пробега, перераспределены в меньшей степени и поэтому их прямой вклад в эти пиксели большой. При помощи метода поляризационной визуализации получается лучшее качество теневых изображений объекта по сравнению с просвечиванием неполяризованным светом.

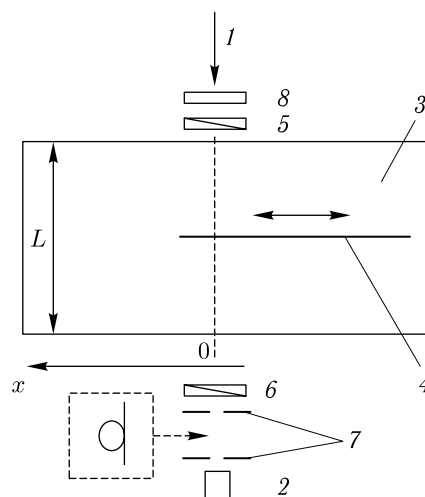


Рис. 12.1. Схема экспериментальной установки для поляризационной визуализации на просвет [196]: 1 — линейно поляризованный пучок He:Ne-лазера (633 нм); 2 — приемник; 3 — стеклянный сосуд, наполненный рассеивающей средой (разбавленным молоком); 4 — поглощающая полуплоскость; 5 — поляризатор; 6 — анализатор; 7 — коллимирующие диафрагмы или собирающее свет оптическое волокно; 8 — прерыватель

12.1.2. Поляризационная визуализация с использованием рассеяния назад.

Принцип поляризационной дискриминации многократно рассеянного света был успешно использован при морфологическом анализе и визуализации подповерхностных слоев в сильно рассеивающих биотканях [129, 135, 136, 138, 196, 588, 590, 591, 594, 595, 671, 672, 669, 676, 731, 1445, 1527, 1544, 1565, 1853, 1924–1928]. Один из наиболее популярных подходов к поляризационной визуализации в неоднородных средах основан на использовании линейно поляризованного света для освещения объекта (выбранной области на поверхности ткани) и блокировании попадания обратно рассеянного света той же поляризации (со-поляризованное излучение) в систему визуализации. В типичном случае такая поляризационная дискриминация достигается простым помещением поляризатора между изображающей линзой и объектом. Оптическая ось поляризатора ориентирована перпендикулярно плоскости поляризации падающего света. Таким образом, только кросс-поляризованная компонента вносит вклад в формирование изображения объекта. Было показано, что несмотря на простоту, этот метод эффективен для функциональной диагностики и визуализации подкожных слоев ткани. Более того, отдельное изображение объекта в со-поляризованном и кросс-поляризованном свете делает возможным выделение структурных особенностей неглубоких слоев ткани (таких как кожные морщины, папиллярная сеть и др.) и глубоких слоев (таких как капилляры в дерме). Элегантная простота этого подхода стимулировала его широкое применение как в лабораторной, так и в клинической медицинской диагностике.

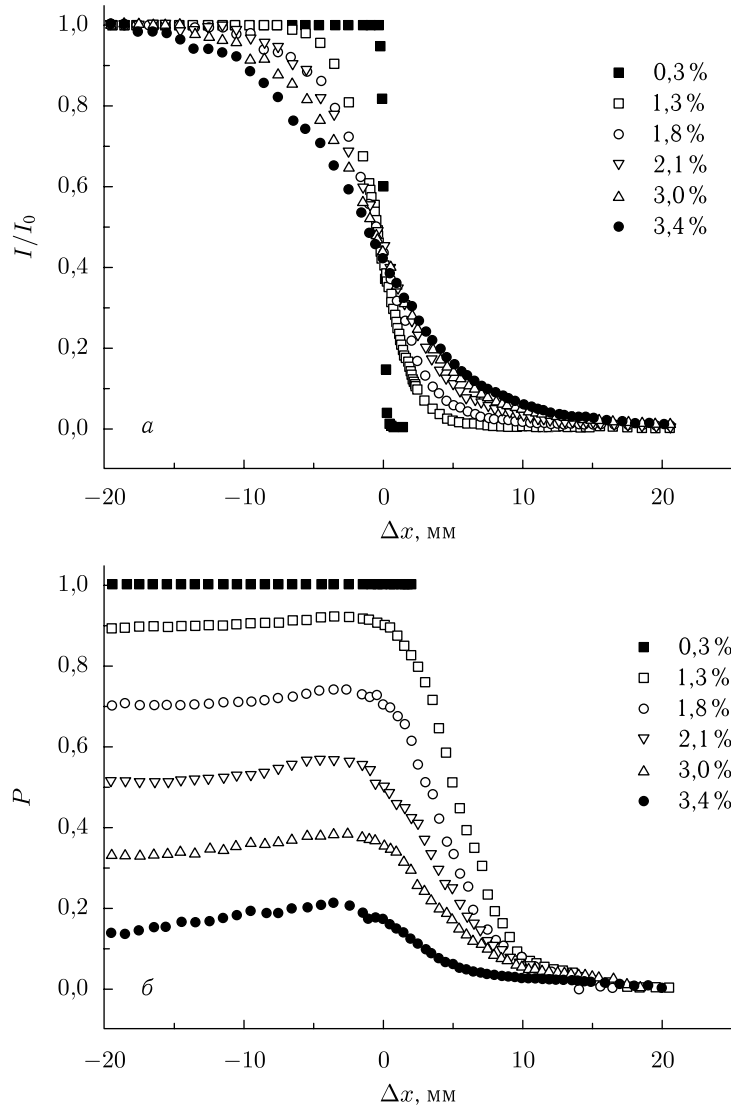


Рис. 12.2. Экспериментальные зависимости нормированной интенсивности (а) и степени линейной поляризации (б) прошедшего света по краю поглощающей полуплоскости при различных концентрациях рассеивающего вещества (разбавленного молока) [196]

Типичная система поляризационной визуализации с использованием обсужденного выше подхода схематически представлена на рис. 12.3. В системе визуализации, разработанной Демосом и др. [1925], в качестве источника освещения используется лазер на красителе с накачкой от Nd:YAG-лазера. Зондирующий пучок имел диаметр 10 см и среднюю плотность мощности примерно 5 мВт/см^2 . Для регистрации рассеянного назад света и захвата изображения использовалась охлаждаемая ПЗС-камера с линзой, фокусное расстояние которой составляло 50 мм. Первый поляризатор, помещенный после расширителя пучка, обеспечивал освещение объекта линейно поляризованным светом. Второй поляризатор, расположенный перед ПЗС-камерой,

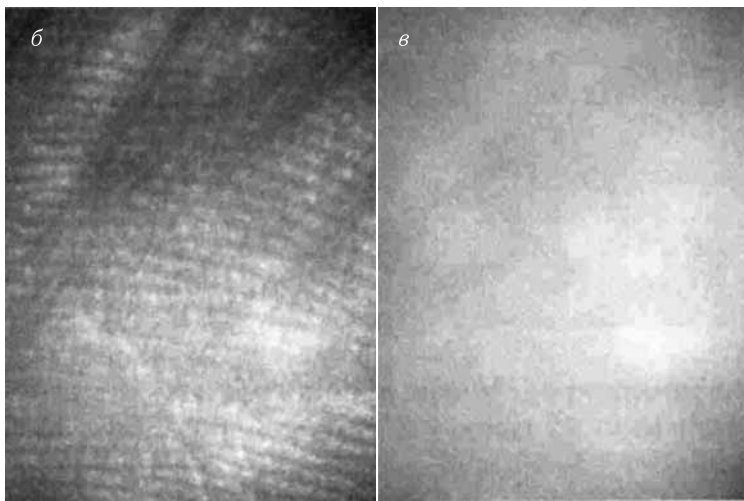
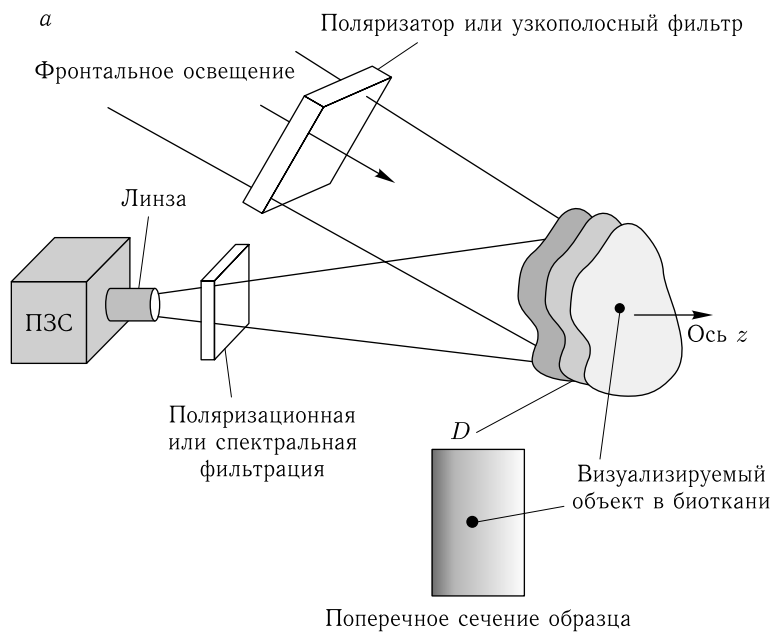


Рис. 12.3. Установка для селективной поляризационной или спектральной визуализации подповерхностных слоев биоткани (а); со-поляризованное (б) и кросс-поляризованное (в) изображения ладони человека при поляризованном лазерном освещении на 580 нм [1925]

ориентировался параллельно или перпендикулярно плоскости поляризации падающего света.

Эффективность селективно-поляризационной визуализации иллюстрируется рис. 12.3, где представлены со- и кросс-поляризационные изображения ладони человека. На рис. 12.3 б показано поверхностное (со-поляризованное) изображение, на котором хорошо видна поверхностная папиллярная структура кожи. Рисунок 12.3 в показывает подповерхностное (кросс-поляризационное) изображение кожи.

Аналогичная система с камерой, но с использованием некогерентного источника белого света, такого как ксеноновая лампа, описана в работах [36, 595, 1928], где представлены результаты предварительного клинического исследования различных патологий кожи с применением поляризованного света. Алгоритм обработки изображения основан на оценке степени поляризации, которая затем рассматривается как отображаемый параметр. Сначала регистрируются два изображения: одно для параллельной поляризации отраженного света I_{\parallel} , другое — для перпендикулярной I_{\perp} . Эти изображения алгебраически комбинируются для каждого пикселя, соответствующего одному и тому же элементу изображения объекта, давая уже изображение в терминах степени поляризации:

$$PI = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}. \quad (12.1)$$

Важно отметить, что в поляризационном изображении числитель исключает случайно поляризованное диффузное отражение, следовательно, PI можно использовать для мониторинга двулучепреломления ткани. Нормировка на знаменатель исключает из PI общее для обеих поляризационных компонент ослабление из-за поглощения в ткани, например влияние меланиновой пигментации кожи.

Поляризационные изображения пигментированных участков кожи (веснушки, татуировки, пигментированные родимые пятна) и непигментированных участков (непигментированные внутрикожные родимые пятна, нейрофибромы, старческий кератоз, злокачественные карциномы базальных клеток, карциномы чешуйчатых клеток, сосудистые аномалии (венозные расширения) и ожоговые шрамы) анализировались с целью выявления различий, обусловленных разными патологиями кожи (см. некоторые примеры на рис. 12.5) [595]. С методическими целями анализировалась также аппаратная функция оптической схемы для отраженного поляризованного света при теневом изображении лезвия бритвы (поглощающий экран), расположенной на коже предплечья. Аппаратная функция описывает поведение степени поляризации как изображаемого параметра вблизи края тени. Было обнаружено, что в окрестности края тени значение степени поляризации приблизительно удваивается, поскольку фотоны I_{\perp} за счет более длинных путей пробега «затекают» в теневую часть ткани, откуда могут дать только очень малый вклад в лежащие по краю тени пиксели, в то время как фотоны I_{\parallel} , будучи фотонами с относительно короткими длинами пробега, непосредственно рассеиваются назад в направлении этих пикселей. Кроме того, различия в эффективности поглощения для фотонов разных поляризаций из-за их существенной разницы в длине пробега также могут играть роль в повышении контраста изображения края экрана. Из полученных результатов следует, что при исследовании кожи аппаратная функция, определяющая перекрестные помехи между пикселями поляризационного изображения, имеет полуширину по попувысоте примерно 390 мкм.

Сравнительный анализ поляризационных изображений кожи человека в норме и при патологиях продемонстрировал способность данного подхода усиливать контраст изображения за счет селекции рассеяния света от поверхностных слоев кожи. Поляризационные изображения позволяют визуализировать патологические нарушения текстуры папиллярного и верхнего ретикулярного слоев. Поляризационная визуализация является эффективным средством для выявления реальных границ поражения кожи для определения области хирургического удаления раковой опухоли кожи (см. рис. 12.5 з). Различные возможности поляризационной визуализации рассмотрены также в работе [1929].

Оценка качества поляризационных изображений основана на представлении многократно рассеянного света в виде суперпозиции парциальных вкладов, характеризу-

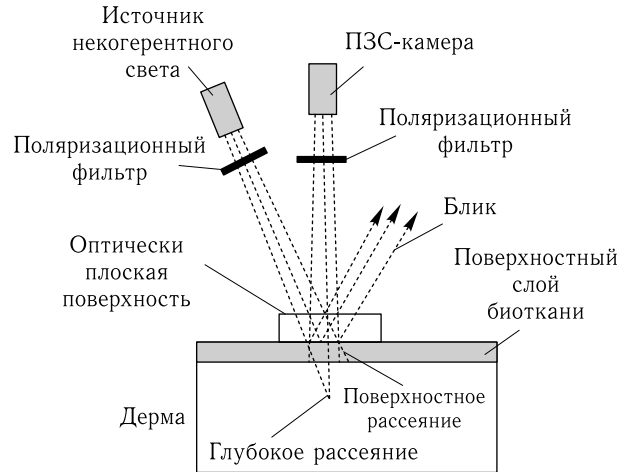


Рис. 12.4. Поляризационная камера для исследования кожи [595]. Падающий свет линейно поляризован параллельно плоскости рассеяния. Оптически плоская поверхность служит границей раздела между кожей и стеклом для отражения блика, чтобы он не попадал в камеру. Поляризованный рассеянный свет и диффузно рассеянный свет попадают на камеру после прохождения через линейный поляризатор, который может ориентироваться параллельно или перпендикулярно плоскости рассеяния

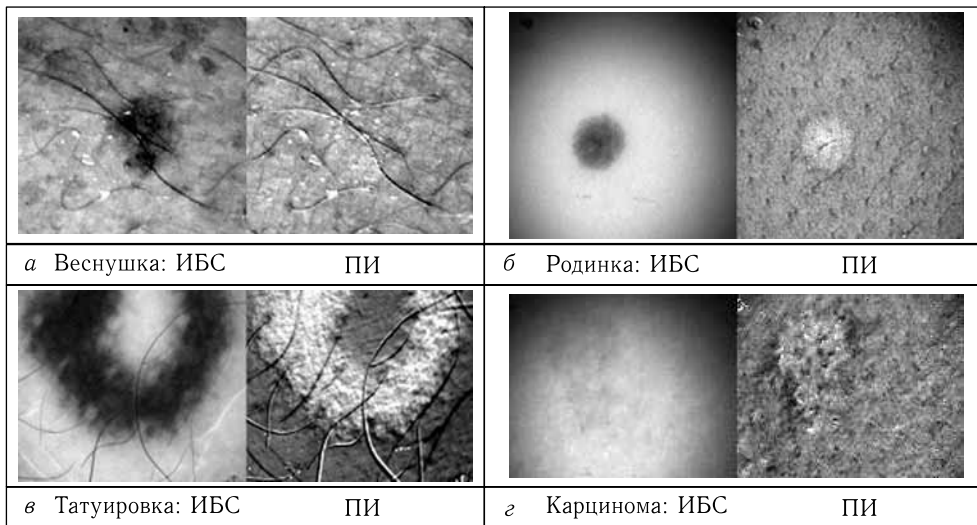


Рис. 12.5. Сравнение изображений в белом свете (ИБС) с поляризационными изображениями (ПИ) [595]: *а* — веснушка, на поляризационном изображении не виден меланин веснушки; *б* — доброкачественная пигментированная родинка, поляризационная визуализация убирает меланин и показывает скрытое рассеяние, виден спад отражения поляризованного света от эпидермиса, выступающего вход в волосяные фолликулы; *в* — татуировка, поляризационная визуализация осветляет «черноту» татуировки, зеркальное отражение поляризованного света от частиц углерода дает яркое изображение; *г* — злокачественная карцинома базальных клеток, изображение в белом свете недооценивает величину области, занятую злокачественными новообразованиями кожи

мых прохождением различной длины оптического пути s в рассеивающей среде [135, 1927]. Статистические особенности ансамбля парциальных вкладов описываются функцией плотности вероятности оптических путей $\rho(s)$, а статистические моменты рассеянного света представляются интегральными свертками $\rho(s)$ с соответствующими ядрами. Степень поляризации многократно рассеянного излучения с первоначально линейной поляризацией можно приближенно представить в виде преобразования Лапласа функции $\rho(s)$:

$$P_L = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \approx \frac{3}{2} \int_0^{\infty} \exp\left(-\frac{s}{\xi_L}\right) \rho(s) ds, \quad (12.2)$$

где I_{\parallel} и I_{\perp} — интенсивности со- и кросс-поляризованной компонент рассеянного света соответственно. Параметр ξ_L — длина деполяризации для линейно поляризованного света.

При рассмотрении поляризационной визуализации поглощающей макроскопической неоднородности со степенью поляризации в качестве отображаемого параметра контраст поляризационного изображения можно определить как [135]

$$V_P = \frac{P_L^{\text{in}} - P_L^{\text{back}}}{P_L^{\text{in}} + P_L^{\text{back}}}, \quad (12.3)$$

где P_L^{in} — степень остаточной линейной поляризации отраженного света в области нахождения неоднородности, а P_L^{back} — аналогичная величина вдали от этой области. Контраст V_P реконструированного поляризационного изображения можно представить как функцию толщины рассеивающего слоя l , глубины расположения неоднородности h , средней транспортной длины свободного пробега фотона l_{tr} в рассеивающей среде, фактора анизотропии рассеяния g и длины деполяризации ξ_L [135]. Функция распределения оптических путей $\rho(s)$ может быть найдена путем моделирования методом Монте-Карло.

Для сравнения эффективности различных вариантов поляризационной визуализации использовалась установка, схема которой приведена на рис. 12.6 [1853]. В качестве отображаемых параметров брались полная нормированная интенсивность (сумма интенсивностей со- и кросс-поляризованной компонент) или степень остаточной линейной поляризации рассеянного назад света. Рассеивающая среда (водно-молочная эмульсия) в прямоугольном стеклянном сосуде ($18 \times 26 \times 26$ см³) использовалась в качестве модели биоткани. Боковые далеко отстоящие друг от друга стенки сосуда были зачернены. Поглощающий объект (прямоугольная пластина с зачерненными матовыми поверхностями) помещалась в центральную часть сосуда на различных расстояниях h (от 1 до 4 см) от прозрачной передней стенки. Зондирующий белый свет был линейно поляризован перпендикулярно плоскости падения. Чтобы избежать зеркального отражения от передней стенки сосуда, освещающий пучок был направлен под углом 30° к ее нормали.

Для захвата изображения по каждой из трех цветовых координат (R, G и B) применялась цветная ПЗС-камера (Panasonic NV-RX70EN) и плата захвата изображения Miro DC20 (MiroVideo, Германия). Цветные 8-битные изображения объекта записывались с разрешением 647×485 в со- и кросс-поляризованном отраженном свете. Распределения яркости для каждой из составляющих R, G, B изображения вдоль произвольно выбранной линии на изображении (рис. 12.6 б) использовались для восстановления изображения поглощающей неоднородности для различных параметров визуализации (рис. 12.6 в). В отсутствие рассеивающей среды и, следовательно, рассеянного назад излучения контраст изображения равен нулю. Увеличение

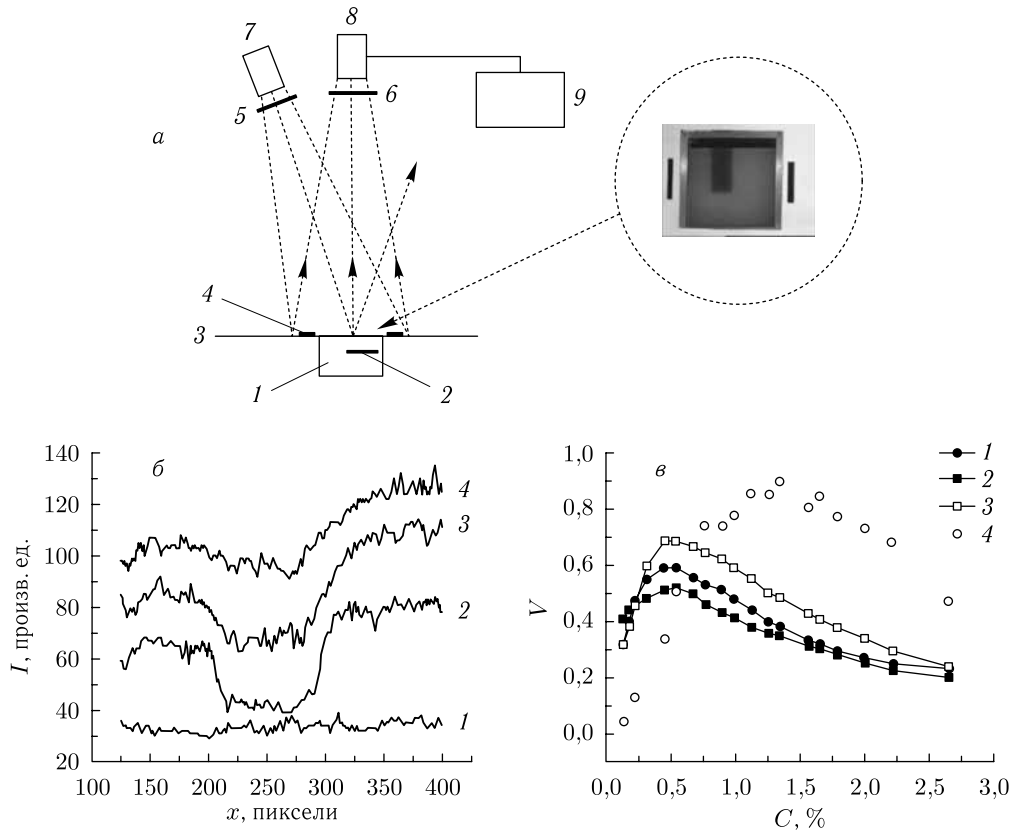


Рис. 12.6. Эксперимент по поляризационной визуализации [196]. Схема эксперимента (а): 1 — ячейка с рассеивающей средой; 2 — поглощающая пластина; 3 — белая эталонная поверхность; 4 — черные эталонные полоски; 5 — поляризатор; 6 — анализатор; 7 — галогеновая лампа; 8 — ПЗС-камера; 9 — ПК. Распределения интенсивности рассеянного назад излучения вдоль произвольно выбранной линии изображения для различных концентраций молочной эмульсии (б): 1, 0%; 2, 0,66%; 3 — 1,96%; и 4 — 5,51% (R-компонента цветного изображения). Зависимости контраста поляризационного изображения от объемной концентрации молочной эмульсии (в): при выборе в качестве параметра визуализации интенсивности неполяризованного света (1), со-поляризованной (2) и кросс-поляризованной (3) компоненты, а также степени поляризации рассеянного назад излучения (4)

концентрации молока приводит к резкому росту контраста изображения до максимального значения с последующим монотонным убыванием, обусловленным ростом кратности рассеяния.

Сравнение экспериментальных данных и результатов моделирования методом Монте-Карло [135, 1853, 1927] приводит к выводу, что максимальный контраст поляризационного изображения получается при глубине расположения неоднородности порядка $(0,25-0,6)\xi_L$ (в зависимости от степени остаточной поляризации рассеянной назад фоновой компоненты, регистрируемой вне области локализации неоднородности). В частности, этот вывод согласуется с данными по поляризационной визуализации кожи, которые продемонстрировали эффективность поляризационной визуализации для эпидермиса и верхних слоев папиллярной дермы (100–150 мкм) [1928].

12.2. Поляризационная отражательная спектроскопия биотканей

12.2.1. Поляризационная спектроскопия с разрешением по глубине. Отображение и мониторинг морфологического и функционального состояния биологических тканей можно обеспечить на основе спектрального анализа поляризационных свойств рассеянного назад света [1930]. Зондирование ткани поляризованным белым светом и измерение спектрального отклика со- и кросс-поляризованных компонент рассеянного назад света позволяет не только количественно определить содержание хромофоров в ткани, но и оценить их распределение по глубине.

Приведенный коэффициент рассеяния кожи в видимом диапазоне лежит в диапазоне $\mu'_s \sim 30\text{--}90 \text{ см}^{-1}$, а коэффициент поглощения $\mu_a \sim 0,2\text{--}5 \text{ см}^{-1}$ (см. табл. 7.1), поэтому ожидаемая средняя транспортная длина рассеяния $l_{tr} = (\mu_a + \mu'_s)^{-1}$ (см. формулу (1.23)) лежит в интервале 100–300 мкм. Из-за преобладания рассеивающих частиц, размеры которых характеризуются параметром дифракции $ka > 1$ (см. формулы (2.54) и (2.55), рис. 2.7 и 2.8) длина деполяризации ξ_L у кожи сравнима с транспортной длиной рассеяния l_{tr} и превосходит толщину эпидермиса. С другой стороны, такие поглотители, как меланин в эпидермисе и гемоглобин в дерме, должны увеличивать степень остаточной поляризации рассеянного назад света в спектральных областях, соответствующих полосам поглощения доминирующих хромофоров. Более того, эти хромофоры расположены на различной глубине, таким образом, их локализацию можно оценить по характеристическим полосам поглощения в дифференциальных поляризационных спектрах [135, 1930].

Экспериментальная установка для поляризационно-спектральных измерений рассеянного назад света представлена на рис. 12.7. Белый свет от источника (галогеновая лампа 200 Вт) направляется на объект волоконно-оптическим жгутом, на торце которого установлен широкополосный фильтр, выделяющий линейную поляризацию. Диаметр освещаемой области на поверхности кожи примерно 8 мм. Рассеянный назад свет от кожи собирается другим волоконно-оптическим жгутом, к которому присоединен аналогичный фильтр линейной поляризации. Ориентацию этого фильтра можно устанавливать параллельно или перпендикулярно оптической оси первого поляризационного фильтра. Оптоволоконные жгуты используются для устранения некоторой поляризационной чувствительности, имеющей место при использовании моноволокна. Для исключения зеркального отражения от поверхности кожи приемный оптоволоконный жгут был расположен под углом $\sim 20^\circ$ к нормали. Дистальный конец жгута был присоединен к спектрометру.

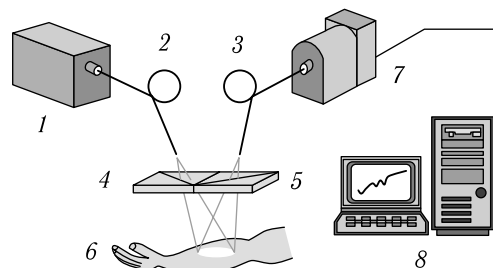


Рис. 12.7. Схема экспериментальной установки для спектальных измерений рассеянного назад света [1930]: 1 — источник белого света (галогеновая лампа, 200 Вт); 2 и 3 — оптоволоконные жгуты; 4 и 5 — поляризационные фильтры; 6 — исследуемый объект; 7 — спектрометр на основе дифракционной решетки с линейкой фотодиодов; 8 — ПК

Установка позволяет измерять спектры отражательной способности ткани при взаимно-параллельно и-перпендикулярно ориентированных поляризационных фильтрах, соответственно $R_{\parallel}(\lambda)$ и $R_{\perp}(\lambda)$. Из получаемых спектров вычисляются дифференциальные спектры остаточной поляризации $\Delta R^r(\lambda)$ или спектры степени остаточной поляризации $P_L^r(\lambda)$:

$$\Delta R^r(\lambda) = R_{\parallel}(\lambda) - R_{\perp}(\lambda), \quad (12.4)$$

$$P_L^r(\lambda) = \frac{R_{\parallel}(\lambda) - R_{\perp}(\lambda)}{R_{\parallel}(\lambda) + R_{\perp}(\lambda)}. \quad (12.5)$$

Два примера исследований *in vivo* кожи человека с помощью поляризационной спектроскопии представлены на рис. 12.8 и 12.9 [1930]. Данные рис. 12.8 демонстрируют спектральные распределения степени остаточной поляризации $P_L^r(\lambda)$ рассеянного назад света для различных значений индекса эритемы, вызванной предварительным УФ-облучением кожи. Для более высокого индекса эритемы (EI) или покраснения кожи (увеличенного объема крови) величина степени остаточной поляризации $P_L^r(\lambda)$ увеличивается в пределах Q -полос поглощения крови. Это происходит из-за уменьшения кратности рассеяния для фотонов с длинами волн, попадающими в полосы поглощения, благодаря более интенсивному поглощению фотонов с длинными траекториями, которые изначально определяют деполаризацию распространяющегося в биоткани света.

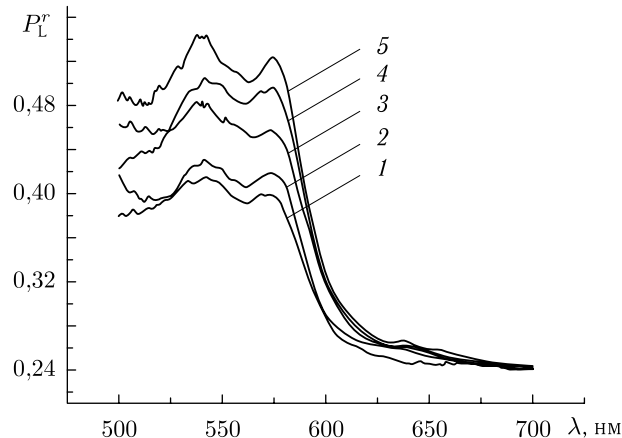


Рис. 12.8. Измеренные *in vivo* спектры степени остаточной поляризации для добровольца с УФ-индуцированной эритемой различных степеней (индекс эритемы, EI): 1 — $EI = 157$; 2 — $EI = 223$; 3 — $EI = 249$; 4 — $EI = 275$; и 5 — $EI = 290$ [1930]. Индекс эритемы был измерен с использованием эритемо-меланинометра, описанного в работе [680]

На рис. 12.9 представлены дифференциальные поляризационные спектры, которые также чувствительны к поглощающим свойствам кожи. Для управления поглощающими свойствами ткани внутри измерительного объема использовалась методика последовательных кожных отрывов посредством медицинской липкой ленты. Меньшая толщина эпидермиса соответствует большему объему крови внутри исследуемого объема (большему поглощению света гемоглобином). Отличие величины ($R_{\parallel}(\lambda) - R_{\perp}(\lambda)$) внутри полос поглощения крови (на длинах волн 545 и 575 нм) от значений, измеренных вдали от полос поглощения крови, т. е. в области 650–700 нм,

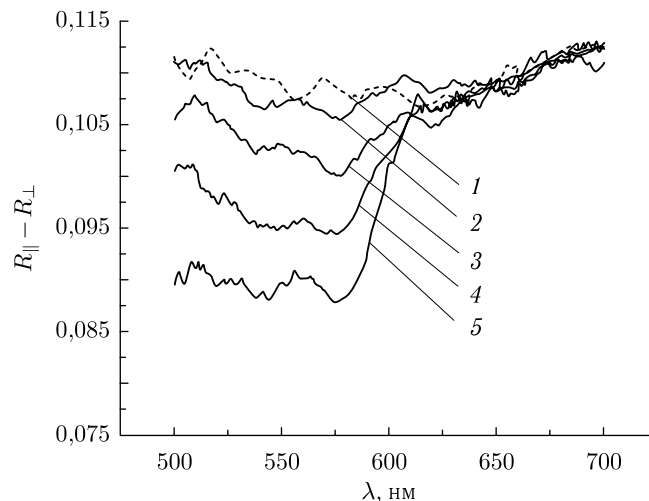


Рис. 12.9. Измеренные *in vivo* дифференциальные спектры остаточной поляризации для добровольца при отрывах эпидермиса различной толщины [1930]: 1 — нормальная кожа; 2 — толщина удаленного слоя кожи 40 мкм; 3 — 50 мкм; 4 — 60 мкм и 5 — 70 мкм

где превалирует рассеяние света, позволяет профилировать эпидермис и находить распределение кровеносных сосудов по глубине кожи.

В качестве критериев толщины эпидермиса (более тонкий эпидермис соответствует увеличению поляризационного контраста V) можно использовать следующие параметры [1930]:

$$V_{545} = \frac{\Delta R_{(650-700)}^r - \Delta R_{545}^r}{\Delta R_{(650-700)}^r + \Delta R_{545}^r} \quad \text{или} \quad V_{575} = \frac{\Delta R_{(650-700)}^r - \Delta R_{575}^r}{\Delta R_{(650-700)}^r + \Delta R_{575}^r}. \quad (12.6)$$

В этих выражениях 545 и 575 обозначают значения $\Delta R^r(\lambda)$ в центрах полос поглощения гемоглобина ($\lambda = 545$ и 575 нм), а (650–700) — в области, где поглощение гемоглобина мало ($\lambda = 650$ – 700 нм).

Метод по-прежнему достаточно прост и благодаря получаемой спектральной информации может дать более ценные сведения о живой ткани, чем неспектральные поляризационные методы, описанные в разд. 12.1.2. Простая экспериментальная система для спектрально-поляризационных исследований *in vivo* кожи человека показана на рис. 12.10. Для получения равномерного освещения поверхности кожи белым светом и устранения зеркального отражения от кожи использовались четыре галогеновые лампы по 50 Вт каждая, свет от которых падал с четырех сторон под углом $\sim 30^\circ$ к нормали. Излучение каждого источника света фильтровалось идентичными широкополосными линейно поляризующими фильтрами, а перед спектрально-чувствительной монохромной ПЗС-камерой помещались широкополосный фильтр-анализатор, плоскость поляризации которого можно было поворачивать, и интерференционный фильтр, выделяющий длину волны измерений. Монохромные изображения кожи на интересующей длине волны захватываются видеосистемой VS-СТТ 60–075 (ООО «Видеоскан», РФ). На рис. 12.11 показан пример поляризационно-спектральной визуализации ожогового поражения кожи на длине волны поглощения гемоглобина (~ 550 нм). Хорошо видно, что максимальный контраст изображения $\sim 0,49$ обеспечивается при использовании именно степени поляризации в качестве отображаемого параметра.

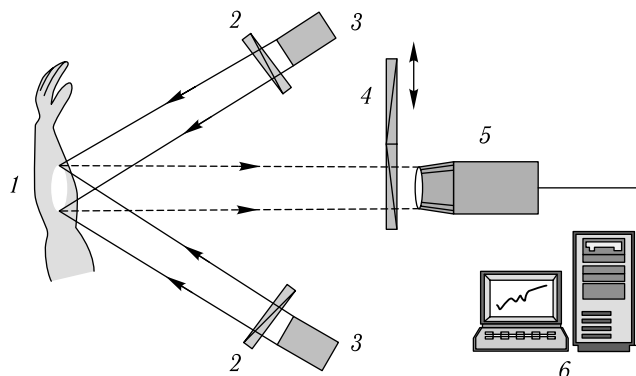


Рис. 12.10. Экспериментальная установка для поляризационно-спектральной визуализации биотканей *in vivo* [1930]: 1 — биоткань; 2 — поляризационные фильтры; 4 — поляризационные и интерференционные фильтры; 3 — источники света; 5 — монохромная ПЗС-камера; 6 — ПК

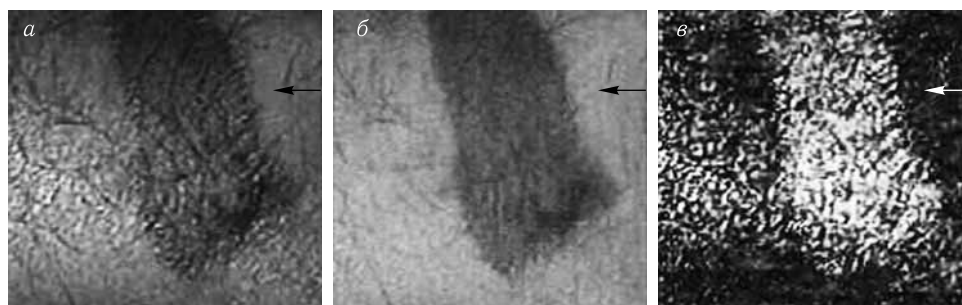


Рис. 12.11. Поляризационно-спектральные ($\lambda = 550$ нм) изображения ожогового поражения кожи добровольца [1930]: а — со-поляризованное изображение; б — кросс-поляризованное изображение; в — изображение распределения степени поляризации, P_L^I

12.2.2. Поляризационная спектроскопия поверхностного слоя эпителия.

Один из многообещающих подходов в ранней диагностике рака кожи, шейки матки и других аналогичных локализаций основан на анализе однократно рассеянной компоненты света, несущей информацию об патологических изменениях структуры ткани (см. разд. 10.4). Зависимость интенсивности света, упруго рассеянного тканью, от длины волны оказывается чувствительной к изменениям морфологии ткани, типичной для предраковых поражений. В частности, было установлено, что специфические особенности злокачественных клеток, такие как увеличенный размер ядер, повышенное отношение размеров ядро/цитоплазма, плеоморфизм и др., заметно проявляются в спектрах упругого рассеяния зондируемой ткани. Специфическая периодическая структура спектра отражения наблюдалась для ткани слизистой оболочки [272]. Эта осциллирующая составляющая в спектре отражения может быть приписана однократному рассеянию на ядрах клеток поверхностного эпителия и может быть интерпретирована в рамках теории Ми. Анализ амплитуды и частоты тонкой структуры спектра интенсивности позволяет оценить распределение этих ядер по плотности и размеру. Однако выделение однократно рассеянной компоненты на фоне маскирующего фона многократного рассеяния представляет собой серьезную проблему. Кроме того, как было показано в разд. 12.2.1, поглощение в дерме кожи и аналогично в строме слизистых оболочек, связанное с гемоглобином, искажает

спектр однократного рассеяния клеток эпителия. Оба эти фактора следует учитывать при интерпретации измеренных спектральных зависимостей рассеянного назад света.

Отрицательное влияние диффузного фона и поглощения гемоглобина можно значительно снизить путем использования поляризационно-дискриминационной методики в виде облучения исследуемой биоткани линейно поляризованным светом с последующей раздельной регистрацией упруго рассеянного света с параллельной и перпендикулярной поляризацией по отношению к падающему свету (т.е. со- и кросс-поляризованных компонент рассеянного света) [216, 229]. Этот подход, называемый поляризационной спектроскопией упругого рассеяния света или поляризационной спектроскопией отражения (ПСО), потенциально способен обеспечить количественную оценку не только распределения ядер по размерам, но и распределения относительного показателя преломления вещества ядер. Эти потенциальные возможности, продемонстрированные в ряде экспериментальных работ на фантомах тканей и эпителиальных тканях *in vivo* [135, 216, 229, 232, 272, 680, 1906], позволяют классифицировать метод ПСО как новый шаг в развитии неинвазивных оптических методов для диагностики морфологии биотканей в реальном времени и, следовательно, для надежного раннего обнаружения предраковых состояний *in vivo*. Важным шагом в дальнейшем развитии метода ПСО должна быть разработка портативного и удобного оборудования для диагностики тканей *in situ*. В частности, оптоволоконные зонды [1931] с небольшой глубиной зондирования и высоким пространственным разрешением перспективны для клинических применений поляризационной спектроскопии отражения в ранней диагностике рака.

12.3. Поляризационная микроскопия

Микроскопия в поляризованном свете применяется в биомедицине уже более ста лет для изучения оптически анизотропных биологических структур, которые трудно или даже невозможно наблюдать с помощью обычного оптического микроскопа. Имеется широкий выбор коммерческих поляризационных микроскопов. Многочисленные исследования биологических объектов выполнены с помощью поляризационной микроскопии. Однако продолжают развиваться новые подходы в поляризационной микроскопии, которые способны дать исследователям много новой и более подробной информации о структурах биологических тканей и клеток. Современная техника позволяет регистрировать разности оптического пути менее чем 0,1 нм [234, 244, 249–270, 600, 1373, 1389, 1529, 1932–1934]. Такая чувствительность вместе с возможностью исследовать рассеивающие образцы появились благодаря недавним достижениям в видео-, интерференционной и мультиспектральной поляризационной микроскопии. Измерения полной матрицы Мюллера и другие комбинированные методики, такие как поляризационно-конфокальная и поляризационная ОКТ-микроскопия, обещают новые значительные возможности в поляризационной микроскопии, включая измерения *in vivo* [135, 216, 229, 232, 362, 367, 602, 624, 625, 628–634, 666–749, 1929–1940].

В дополнение к гл. 2 и разд. 3.6.3 и 9.6.1 мы обсудим только несколько новых технологий, перспективных для изучения анизотропных свойств рассеивающих образцов. Одним из примеров является мультиспектральный изображающий микрополяриметр (МИМ), который используется для измерения двулучепреломления перипапиллярного слоя ретинального нервного волокна (СРНВ) [retinal nerve fiber layer (RNFL)], важного параметра при диагностике глаукомы [234, 600]. Оптическая схема МИМ представлена на рис. 12.12. Свет от вольфрамово-галогенной лампы, после которой расположен интерференционный фильтр (полоса 10 нм), обеспечивает монохроматическое освещение интегрирующей сферы (IS). Линза L_1 ($F = 56$ мм)

коллимирует пучок, падающий на поляризатор (P). Использование интегрирующей сферы гарантирует малые флуктуации выходной интенсивности после поляризатора, не более 0,2% при его вращении на 360°. Линза L_2 ($F = 40,5$ мм, $NA = 0,13$) фокусирует изображение выходной апертуры интегрирующей сферы на образец (SP) в камере (CB) с плоскими входным и выходным окнами. Линза L_3 ($F = 60$ мм, $NA = 0,07$) фокусирует изображение образца на охлаждаемую ПЗС-камеру, обеспечивающую размер пикселя около 4 мкм на образце в водной среде (увеличение $\approx 5,8$). Хотя линзы ахроматические, широкий диапазон исследуемых длин волн (440–830 нм) все-таки требует небольших изменений положения оптических элементов приемной системы (смещение линзы L_3 и ПЗС-камеры в пределах 0,5 мм) для установки фокуса на каждой длине волн. Жидкокристаллическая линейная фазовая пластинка (замедлитель) (C'), за которой следует анализатор линейной поляризации (A), используется для измерения выходного вектора Стокса исследуемого образца. Как поляризатор, так и анализатор представляют собой поляризационные призмы Глана. Азимут и фазовая задержка пластинки устанавливаются в виде набора нескольких дискретных значений, а азимут анализатора имеет фиксированное значение 45°. Каждая установка фазовой пластинки (соответственно азимут и задержка по фазе: 1) 0°, 90°; 2) 0°, 200°; 3) 22,5°, 207°; 4) –22,5°, 207°) характеризуется вектором измерения 1×4 . Четыре установки фазовой пластинки и анализатора вместе характеризуются (4×4) -матрицей \mathbf{D} , каждая строка которой соответствует одному вектору измерений.

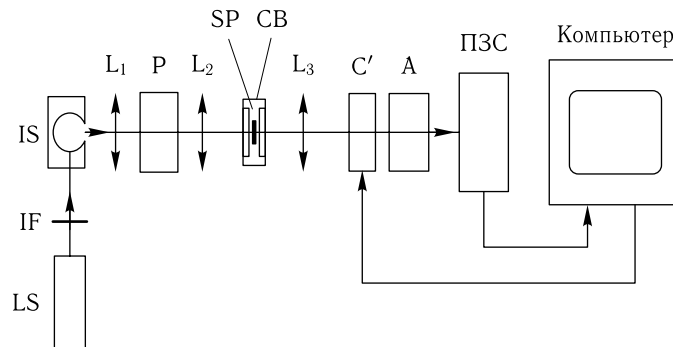


Рис. 12.12. Оптическая схема мультиспектрального визуализирующего микрополяриметра, работающего в режиме пропускания [600]: LS — источник света; IF — интерференционный фильтр; IS — интегрирующая сфера; P — линейный поляризатор; SP — образец; CB — камера; L_1 , L_2 и L_3 — линзы; C' — фазовая пластинка (замедлитель); A — линейный анализатор

Вектор Стокса \mathbf{S} можно вычислить как

$$\mathbf{S} = \mathbf{D}^{-1} \mathbf{R}, \quad (12.7)$$

где \mathbf{D}^{-1} — обратная матрица измерения, а \mathbf{R} — (4×1) -вектор отклика, соответствующий четырем установкам фазовой пластинки/анализатора [821]. Для оценки линейной фазовой задержки на образце нужно найти матрицу Мюллера \mathbf{M} из измерений вектора Стокса падающего \mathbf{S}_{inc} и выходного \mathbf{S} излучения (см. гл. 2):

$$\mathbf{S} = K \mathbf{M}(\rho, \delta) \mathbf{S}_{\text{inc}}, \quad (12.8)$$

где множитель K учитывает потери интенсивности при пропускании, а ρ и δ соответственно азимут и фазовую задержку за счет образца. Это выражение включает четыре уравнения для трех неизвестных K , ρ и δ . В большинстве случаев полезно систему уравнений (12.8) переопределить, используя более одного измерения \mathbf{S}_{inc} .

Фазовая задержка и азимут для образцов нефиксированной и фиксированной ткани СРНВ крысы были измерены в широком спектральном диапазоне [600]. Было обнаружено, что СРНВ ведет себя как линейная фазовая пластинка (замедлитель) и что задержка по фазе примерно постоянна в диапазоне длин волн от 440 до 830 нм. Среднее двулучепреломление для нескольких нефиксированных образцов СРНВ со средней толщиной $13,9 \pm 0,4$ мкм оказалось равным $0,23 \pm 0,01$ (нм/мкм) $\equiv 2,3 \cdot 10^{-4}$. Было обнаружено влияние поляризационных свойств сетчатки на измеренные анизотропные свойства СРНВ. Изображения, представленные на рис. 12.13, иллюстрируют важность поправок, учитывающих поляризационные свойства сетчатки, на распределение задержки и азимута внутри образца СРНВ.

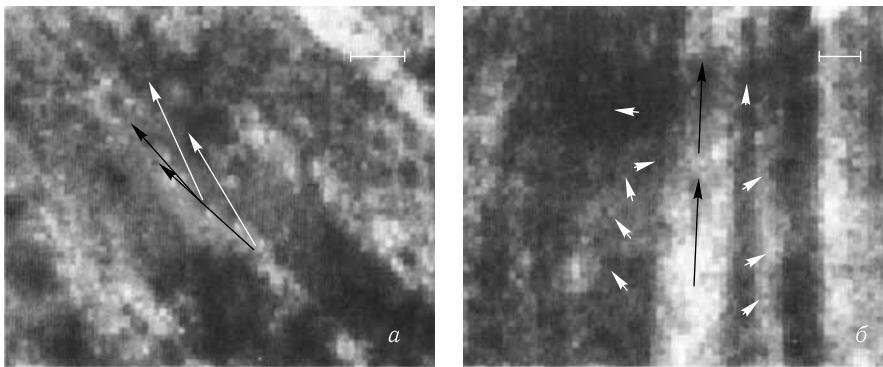


Рис. 12.13. Фазовая задержка (длина стрелок) и азимут — ось наименьшей скорости распространения света (направления стрелок) — для областей пучка и промежутка между слоями волокон зрительного нерва крысы [600]. Изображения получены на длине волны 440 нм. Размеры изображений: *a* — 222×199 мкм; *б* — 187×177 мкм. Пучок нервных волокон виден как светлые полосы. Каждая стрелка начинается из центра области измерения. Калибровочный отрезок показывает запаздывание в виде оптической длины пути в 1 нм. На рис. *a* белые стрелки представляют измерения без поправки на поляризующую способность сетчатки, а черные — скорректированные для учета поправки; на рис. *б* черные стрелки — скорректированное запаздывание для пучка волокон, белые маленькие стрелки показывают изменения остаточного запаздывания, также после коррекции

Другой метод, связанный с количественной микроскопией поляризованного света, основан на технике видеомикроскопии, которая применяется для определения изменений в ориентации коллагеновых волокон, упорядоченных в пластинках (ламеллах) роговицы глаза [1932]. Пластинчатая структура роговицы и склеры хорошо видна на рис. 3.3, 3.4 и 3.5. В пределах пластинки волокна параллельны друг другу, но волокна соседних пластинок, как правило, имеют разные направления. Они могут иметь относительную ориентацию под любым углом от 0 до 180° .

Как обсуждалось в разд. 3.6, в строме роговицы волокна имеют диаметр 25–39 нм, в то время как средний диаметр склеральных волокон равен 100 нм. Следовательно, отдельные волокна не могут быть видны в обычной оптической микроскопии, однако, благодаря двулучепреломлению коллагеновых волокон и его зависимости от угла их ориентации от пластинки к пластинке, по их действию на поляризованный свет можно судить о структуре ткани. Вдоль оси своих волокон коллаген обладает сильным двулучепреломлением, так что те пластинки, которые вырезаны параллельно осям волокон ($\theta = 0^\circ$, см. рис. 12.14 *a*), выглядят ярче в поляризованном свете, когда поляризатор и анализатор скрещены, а продольная ось среза ткани ориентирована под углом 45° к осям поляризатора и анализатора (см. рис. 12.14 *б*).

Коллаген не является двулучепреломляющим в плоскости, перпендикулярной оси своего волокна ($\theta = 90^\circ$, см. рис. 12.14 *a*), так что те пластинки, которые вырезаны перпендикулярно направлению волокон, оказываются совершенно темными в этом сечении (см. рис. 12.14 *б*). Изменение интенсивности вдоль разреза X–Y поперек сечения роговицы (см. рис. 12.14 *б*) обусловлено различными угловыми ориентациями отдельных пластинок (полное число видимых пластинок 15) и представлено на рис. 12.14 *в*.

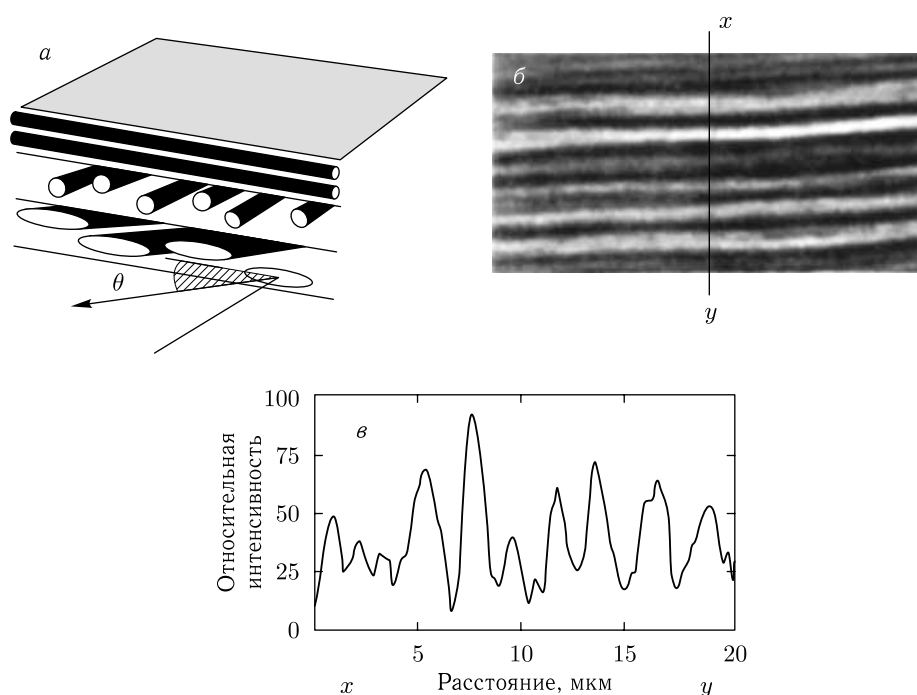


Рис. 12.14. Поляризационная микроскопия структуры коллагеновой ткани [1932]. Схематическое представление сечения ткани, содержащего три ламели (показанное число волокон внутри ламели существенно занижено, а их относительный диаметр сильно завышен; реальная электронная микрофотография показана на рис. 3.2) (*a*); θ — угол наклона волокон по отношению к плоскости сечения. Цифровая микрофотография сечения части роговицы кролика в поляризованном свете ($\times 500$) (*б*). Изменения интенсивности вдоль линии X–Y поперек сечения роговицы, показанного на микрофотографии *б* (*в*)

Из-за регулярной упорядоченности пластинок в срезах роговицы угол θ — это все, что нужно, чтобы определить трехмерную ориентацию волокон. Тем не менее, чтобы найти это угловое распределение для отдельного среза ткани, нужно учитывать двулучепреломление формы, вклад которого составляет около 67% полного двулучепреломления [1932]. Для срезов патологической роговицы и для срезов периферической части роговицы в области соединения со склерой ситуация более сложная, поскольку пластинки имеют менее упорядоченное «волнистое» расположение (см. рис. 3.6 *б* для склеры).

Многие ткани обладают очень сложным характером упорядоченности структурообразующих элементов. Очевидно, что поляризационно-микроскопические методы, благодаря их высокой чувствительности к изменениям сложно организован-

ных структур, перспективны для исследования биотканей. Результатом применения поляризационных методов является построение карт упорядоченности биотканей (см. например, работы [1935–1937]). Метод, представленный в работах [1935, 1936], как и метод, использованный в работе [1932], удобен в случаях, когда структура ткани вдоль направления распространения зондирующего света может рассматриваться как однородная. Метод микроскопической поляриметрии применяется, в частности, для построения карт упорядоченности волокон — структурных элементов биоткани [1935, 1936]. Метод может использоваться для характеристики фиброзных тканей, тканевых фантомов и других волокнистых материалов. Этот метод основан на зондировании образца эллиптически поляризованным светом от вращающейся четвертьволновой пластинки и использовании эффективного циркулярного анализатора. Для оценки оптических параметров оптического тракта и самого образца применяется техника нелинейной регрессии. Обработка последовательности изображений, полученных при различных взаимных ориентациях четвертьволновой пластинки и анализатора, основанная на гармоническом анализе, позволяет восстановить карту направлений упорядоченности и карту фазовой задержки. Эти карты описывают пространственное распределение локального двулучепреломления в образце и, следовательно, могут быть использованы для морфологического анализа биотканей с выраженной структурной анизотропией, преобладающим оптическим свойством которых является линейное двулучепреломление. Потенциал этого метода для точного построения карт упорядоченности для образцов, которые ведут себя как линейные замедлители, с точностью до нескольких градусов задержки по фазе, был продемонстрирован в экспериментах *in vitro* с образцом лепестка клапана сердца свиньи.

Метод, предложенный в работе [1937], также может быть использован в более общей ситуации, когда ориентация структурообразующих элементов (например, коллагеновых волокон) варьирует вдоль направления зондирования. Такие вариации должны учитываться, когда анализируются толстые (> 50 мкм) слои биоткани (например, дермы кожи). В обсуждаемом методе [1937] можно использовать стандартный поляризационный микроскоп с ПЗС-камерой. Измерения обычно производятся с широким спектральным набором цветных светофильтров и без четвертьволновой пластинки. Зависимость регистрируемого сигнала в некоторой точке от углов ориентации поляризатора (ϑ) и анализатора (ϑ') микроскопа:

$$\begin{aligned} i_C &\approx B_0 + B_1 \cos \eta + B_2 \cos \varsigma + B_3 \sin \eta + B_4 \sin \varsigma, \\ \eta &= 2(\vartheta - \vartheta'), \quad \varsigma = 2(\vartheta + \vartheta'), \end{aligned} \quad (12.9)$$

где B_i ($i = 0, 1, 2, 3$ и 4) — коэффициенты, зависящие от локальных оптических свойств образца в зондируемой области и спектральных свойств падающего света. Как показано в работе [1937], измеренные значения B_i могут дать важную информацию о структуре образца. Они могут быть использованы также для характеристики специфических особенностей распространения света в образце. В частности, они позволяют распознать так называемый адиабатический режим распространения света в исследуемой среде. Адиабатический режим означает, что ориентация локальной оптической оси в зондируемой области биоткани меняется плавно. Заметим, что у фиброзных тканей направление локальной оптической оси обычно совпадает с локальным преимущественным направлением ориентации волокон. Если адиабатический режим реализован, то углы ν и ϕ , вычисляемые из полученных величин B_i как $\nu = (1/4) \arctg(B_2/B_4)$ и $\phi = (1/2) \arctg(B_1/B_3)$, дают информацию о структуре образца. Угол ϕ равен углу между азимутальными проекциями локальных оптических осей среды на верхней и нижней границах образца, а угол ν определяет

ориентацию биссектрисы угла между этими проекциями. Анализ экспериментально полученных « B_i -карт», как и пространственные распределения v и ϕ , могут быть предложены в качестве эффективного инструмента для характеристики структуры биоткани [1937]. В частности, в работе [1937] представлены B_0 -карта (этот коэффициент характеризует локальное пропускание образца для неполяризованного света), v -карта и ϕ -карта для образца *in vitro* эпидермиса человека.

Исследование структуры и функции коллагена важно для понимания широкого круга патофизиологических состояний, включая старение. Одной из перспективных лазерных методик, способных обеспечить микроскопический мониторинг *in vivo* коллагеновой структуры, является микроскопия при генерации второй гармоники света (ГВГ) (см. разд. 8.7 и разд. 9.6.5) [1570, 1575]. Рассеянный назад сигнал ГВГ, индуцированный импульсом титан-сапфирового лазера длительностью 100 фс и длиной волны 800 нм, максимальной энергией 10 нДж и частотой повторения импульсов 82 МГц, измерялся поляризационным сканирующим конфокальным ГВГ-микроскопом [1575]. Объектив микроскопа имеет поперечное разрешение около 1,5 мкм и аксиальное разрешение около 10 мкм. Нужно заметить, что внутри рассеивающей среды обе эти величины увеличиваются. Максимальная интенсивность в образце составляла около $4 \cdot 10^{11}$ Вт/см². Чтобы избежать повреждения образца применялась техника непрерывного сканирования. С использованием этого микроскопа было проведено систематическое исследование коллагена типа I в пучке сухожилий хвоста крысы. Коллаген типа I из сухожилия дает один из наиболее сильных сигналов ГВГ среди всех биотканей, изученных авторами работы [1575]. Они выдвинули гипотезу, что такая высокая эффективность ГВГ обусловлена высокой степенью упорядоченности коллагеновых волокон. Поляризационные свойства коллагена также определяются его упорядоченностью. Экспериментально показано, что интенсивность сигнала второй гармоники меняется примерно в два раза по поперечному сечению пучка сухожилий хвоста крысы [1575]. Интенсивность сигнала зависит как от организации коллагена, так и от эффективности рассеяния назад. Для характеристики структуры коллагена нужно исследовать сигнал ГВГ в зависимости как от интенсивности света, так и от его поляризации. Аксиальное и поперечное сканирование для различных углов азимута колебаний линейно поляризованного входного пучка показывает, что ГВГ в сухожилии хвоста крысы сильно зависит от поляризации исходного лазерного пучка. В отличие от интенсивности сигнала ГВГ, функциональный вид поляризационной зависимости существенно не меняется по сечению образца и не подвержен влиянию эффективности рассеяния назад. Данные измерений находятся в хорошем согласии с аналитической моделью, разработанной для сигнала ГВГ при возбуждении от линейно поляризованного света. Они были использованы для определения ориентации волокон и отношения между двумя ненулевыми независимыми элементами тензора нелинейной восприимчивости второго ранга $\gamma \approx -(0,7-0,8)$ [1575]. Небольшой разброс наблюдаемых значений γ в пучке сухожилий говорит о наличии структурной однородности. Этот параметр, следовательно, может быть полезен для неинвазивной характеристики различных коллагеновых структур.

Главной проблемой микроскопии биотканей *in situ* является многократное рассеяние, которое делает случайными направление, когерентность и поляризацию падающего света. Был предложен ряд оптических методов стробирования для фильтрации баллистических и малократно-рассеянных фотонов, несущих информацию о структуре объекта. Один из них — это метод поляризационного стробирования и его модификации, описанные в данной главе, гл. 2, разд. 3.6.3 и 9.6.1. Фундаментальное ограничение всех методов оптического стробирования, включая поляризационные, вытекает из того факта, что только небольшое число баллистических и малократно-рассеянных фотонов участвует в формировании изображения объекта. Тем не менее,

методы поляризационного стробирования в комбинации с методами реконструкции изображения позволяют улучшить качество изображений в случае исследования сильно рассеивающих объектов [1238, 1239]. В работах [1238, 1239] анализировались сканирующие микроскопы с поляризационным стробированием в режимах как пропускания, так и отражения.

Метод оптической иммерсии, основанный на согласовании показателей преломления рассеивающих частиц среды и окружающего базового (интерстициального) вещества, позволяет эффективно управлять рассеивающими свойствами среды (см. гл. 9). Обычно управляемым является показатель преломления базовой среды. Это осуществляется путем введения в биоткань биологически совместимых агентов, таких как глюкоза, глицерин, пропиленгликоль или рентгеноконтрастные вещества, используемые в медицинской практике. Благодаря тому, что показатель преломления применяемого агента выше, чем у базового вещества, где он близок к показателю преломления воды, показатель преломления окружения растёт и приближается к показателю рассеивающих частиц, при этом рассеяние уменьшается. Большинство применяемых агентов гиперосмотичны, следовательно, они могут вызывать временную и локальную дегидратацию ткани, которая также ведет к увеличению показателя преломления интерстициального пространства. На рисунках с 9.35 по 9.38 представлены экспериментальные данные по кинетике пропускания линейно поляризованного света срезами биологических тканей, полученные с помощью видео-цифрового поляризационного микроскопа белого света, или поляризационного спектрометра, при просветлении ткани иммерсионными агентами (тразограф-60 (рентгеноконтрастное вещество) и глицерин) [621, 622, 654, 1578, 1697, 1726].

Просветление ткани, благодаря уменьшению рассеяния света, облегчает обнаружение и количественную оценку поляризационной анизотропии ткани и в конечном итоге позволяет разделить влияние рассеяния света и двулучепреломления на поляризационные свойства ткани. Методом оптической иммерсии можно исследовать как собственное двулучепреломление среды, так и двулучепреломление формы, однако, когда иммерсия сильная, т.е. когда показатель преломления базового вещества становится близким к показателю преломления анизотропных структур ткани, двулучепреломление формы может быть недооценено (см. рис. 9.38, полное согласование показателей преломления на краю образца уменьшает не только рассеяние, но и двулучепреломление). Кинетика оптического просветления ткани и проявление анизотропии при ослаблении рассеяния являются характерными особенностями, которые коррелируют с клиническими данными [555, 621, 622]. Рисунок 9.10 иллюстрирует обратимость влияния оптической иммерсии при управлении поляризационными свойствами биоткани [555]. Практически все здоровые соединительные и сосудистые ткани проявляют сильную или слабую оптическую анизотропию, типичную для одноосного или двуосного кристалла [621, 622]. Патологические ткани, как правило, показывают изотропные оптические свойства.

Поляризационная микроскопия также полезна для исследования отдельных клеток, в частности для оценки количества гликированного гемоглобина в эритроцитах, которое может быть ранним диагностическим маркером гипергликемии у больных диабетом [1389]. Гликирование гемоглобина вызывает изменения показателя преломления эритроцита. С помощью поляризационно-интерференционной микроскопии можно измерить показатель преломления отдельного эритроцита. Показатель преломления гемоглобина или эритроцита, содержащего около 95 % гемоглобина, меняется почти линейно с изменением концентрации глюкозы и насыщается только в условиях очень сильной гипергликемии [1387, 1388]. Поляризационно-интерференционный микроскоп Номарского МР1-5 (Польша) был использован для измерения замедления фазы света [1389]. С помощью призмы Волластона, установленной на

объекте, изображения эритроцитов в свете обыкновенного и необыкновенного пучков были полностью разделены. В области наибольшей толщины эритроцита первые интерференционные максимумы обыкновенного и необыкновенного изображений визуально совмещались по чувствительному для глаза пурпурному цвету при сдвиге второй призмы Волластона, помещенной в заднем фокусе объекта. Из полной ширины интерференционной полосы h и измеренного перемещения призмы Волластона $2d$ вычислялась фазовая задержка Φ и показатель преломления n для каждого эритроцита [1389]:

$$n = n_v + \frac{\Phi}{t} = n_v + \frac{d\lambda}{ht}, \quad (12.10)$$

где $n_v = 1,5133 \pm 0,0001$ — показатель преломления базовой среды, в которых находится эритроцит; t — толщина эритроцита; $\lambda = 550$ нм. Раздельное измерение толщины эритроцита с использованием двух базовых сред с различными показателями преломления дает $t = 0,89$ мкм. Используя это значение, показатель преломления можно было вычислить со стандартным отклонением $\pm 0,0005$.

Надежный конфокальный микроскоп с z -поляризацией, использующий только одну или две бинарные фазовые пластинки с поляризатором, был предложен Хьюзом и др. [1940]. Главным преимуществом микроскопа со значительной продольной компонентой поля является то, что можно отображать z -поляризованные объекты в случайно-ориентированных агломератах молекул, представляющих биологический интерес.

12.4. Цифровые измерения фотоупругости

Фотоупругость как явление является основой хорошо разработанных экспериментальных методов, которые применяются для исследования биомеханики твердых тканей, таких как кости или зубы [1941, 1942]. Фотоупругие измерительные технологии основаны на вызванном механическим напряжением эффекте оптического двулучепреломления, которое для плоского случая описывается следующим законом [1941, 1942]:

$$\sigma_1 - \sigma_2 = \frac{\theta}{2\pi} \frac{f_\sigma}{h} = \frac{Nf_\sigma}{h}, \quad (12.11)$$

где $(\sigma_1 - \sigma_2)$ — разность лежащих в плоскости напряжений; θ — результирующая оптическая фаза, возникающая из-за индуцированного напряжением двулучепреломления в образце; f_σ — оптическая постоянная материала; h — толщина образца. Поскольку величины f_σ и h постоянны при механических напряжениях, регистрация оптической фазы (θ) или порядка интерференционной полосы ($N = \theta/2\pi$) в каждой точке интерференционной картины позволяет анализировать пространственное распределение напряжений [1941, 1942].

Для примера рассмотрим результаты фотомеханических исследований зубов, прелеченных от пульпита [1941, 1942]. В основе таких исследований лежит цифровой метод определения фазового сдвига фотоупругости с использованием полярископа круговой поляризации и системы обработки изображений. Специальное устройство создавало нагрузку вдоль длинной оси зуба (0°) и под углом 60° к длинной оси в направлении языка. С использованием полярископа было получено четыре изображения образца со ступенчатым изменением фазы при каждой нагрузке путем поворота анализатора на 0° , 45° , 90° и 135° по отношению к поляризатору. Получаемые картины интерференционных полос записывались ПЗС-камерой, сохранялись и обрабатывались компьютером. Все четыре изображения оценивались с помощью алгоритма со ступенчатым изменением фазы для получения непрерывной карты распределения фазы [1941]. Развертка фазы производилась вдоль избранных линий,

чтобы сделать модуляцию полос непрерывной и получить информацию о природе распределения напряжений.

На рис. 12.15 показано фазовое изображение модели пролеченного зуба, полученное под нагрузкой в 125 Н, приложенной под углом 60° к направлению длинной оси зуба. Был обнаружен существенный (до трех раз) рост величины напряжения внутри пролеченного зуба по сравнению с моделью intactного зуба. Рост изгибного напряжения приходится на область шейки и серединную часть корня. Это приводит к большому напряжению сжатия в области шейки (с лицевой стороны) и напряжению растяжения в серединной области (со стороны языка). Разработанный метод важен для исследования распределений упругости твердых тканей; здесь, например, он позволил выявить поведение пролеченного зуба при функциональных нагрузках.



Рис. 12.15. Фазовое изображение, полученное из четырех отдельных сдвинутых по фазе изображений в модели пролеченного зуба при нагрузке 125 Н под углом 60° к длинной оси зуба в направлении к языку [1942]

12.5. Измерения поляризации флуоресценции

Флуоресцентные поляризационные измерения используются для оценки различных параметров среды, окружающей флуорофора [1057]; поэтому они имеют потенциальное значение для биомедицинской диагностики, в частности для того, чтобы отличить здоровую ткань от патологической [602, 1527, 1528, 1943–1950]. При возбуждении поляризованным светом испущенный флуорофором свет в нерассеивающей среде деполяризован из-за случайной ориентации молекул флуорофора и углового смещения излучающего диполя молекулы относительно поглощающего [1057]. Внутренние молекулярные процессы, результатом которых является поворот излучающего диполя относительно поглощающего, чувствительны к локальному окружению флуорофора. Как уже было показано в предыдущих главах, деполяризация света в биологических тканях определяется многократным рассеянием, поэтому как возбуждающий свет, так и свет флуоресценции должны испытывать деполяризацию при распространении в тканях [602, 1057, 1943–1950]. Преобразование состояния

поляризации в рассеивающей среде зависит от оптических параметров среды: коэффициента поглощения μ_a , коэффициента рассеяния μ_s и фактора анизотропии рассеяния g . Из-за различия структурных и функциональных свойств нормальной и патологической ткани вклад многократного рассеяния в деполяризацию для них может быть разным. В частности, приведенный (транспортный) коэффициент рассеяния μ'_s или транспортная средняя длина свободного пробега l_{tr} определяют характерную длину деполяризации для различных тканей. Таким образом, флуоресцентно-поляризационные измерения могут быть чувствительны к структурным и функциональным изменениям, которые вызваны, например, злокачественностью ткани на молекулярном уровне (чувствительность возбужденных молекул к молекулам окружения) или на макромолекулярном уровне (чувствительность распространяющегося излучения к рассеивающим свойствам ткани).

Моанти и др. [1945] рассмотрели некоторый флуорофор, расположенный на расстоянии z от поверхности рассеивающей среды. Предполагалось однородное распределение флуорофоров и справедливость диффузионного приближения для переноса света в рассеивающей среде. Среднее число актов рассеяния, претерпеваемых возбуждающим светом прежде, чем он достигнет флуорофора, и испущенным светом прежде, чем он покинет среду, описываются, соответственно, как

$$N_1(z) = z \cdot \mu_s^{\text{ex}}, \quad (12.12)$$

$$N_2(z) = z \cdot \mu_s^{\text{em}}. \quad (12.13)$$

Поляризационная способность флуоресценции характеризуется поляризационной анизотропией (r), которая является безразмерной величиной, не зависящей от полной интенсивности флуоресценции объекта [1057]:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}. \quad (12.14)$$

Она определяется отношением поляризованной компоненты к полной интенсивности и связана со степенью поляризации P :

$$r = \frac{2P}{3 - P}. \quad (12.15)$$

Степень поляризации, определяемая как

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}, \quad (12.16)$$

является удобным параметром для описания источника света, когда луч света направлен вдоль определенной оси. Поляризация такого света определяется как доля света, поляризованная линейно. Напротив, излучение, испускаемое флуорофором, симметрично распределено вокруг этой оси, и полная интенсивность дается не суммой $I_{\parallel} + I_{\perp}$, а выражением $I_{\parallel} + 2I_{\perp}$ (см. разд. 10.4 работы [1057]).

Предполагая, что каждый акт рассеяния уменьшает поляризационную анизотропию флуоресценции r на множитель A ($A = 0-1$), анизотропию света, испущенного флуорофором, расположенным на глубине z , можно записать как

$$r(z) = r_0 \cdot A^{[N_1(z) + N_2(z)]}, \quad (12.17)$$

где r_0 — значение анизотропии флуоресценции в отсутствии рассеяния. Для однородного распределения флуорофоров в ткани толщины d наблюдаемое значение флуоресцентной анизотропии определяется каждым i -м слоем:

$$r_{\text{obs}} = \sum_i (I_i^f r_i) / \sum_i I_i^f, \quad (12.18)$$

где I_i^f — вклад в интенсивность наблюдаемой флуоресценции от i -го слоя толщины dz на глубине z , а r_i — значение анизотропии флуоресценции для этого слоя.

При освещении широким пучком плоской поверхности ткани распространение возбуждающего (индекс «ex») света на расстояние больше нескольких длин свободного пробега фотона ($l_{\text{ph}} = \mu_t^{-1}$, $\mu_t = \mu_a + \mu_s$, см. соотношение (1.8)) хорошо описывается одномерной диффузионной теорией. В этом приближении с учетом $\mu_t^{\text{ex}} \gg \mu_{\text{eff}}^{\text{ex}}$ (см. соотношение (1.18)), что верно для многих биотканей, интенсивность возбуждающего света, достигающего глубины z , выражается как

$$I(z) \approx C_{\text{ex}} \exp(-\mu_{\text{eff}}^{\text{ex}} z), \quad (12.19)$$

где C_{ex} пропорционально интенсивности возбуждения и является функцией оптических параметров ткани на длине волны возбуждающего света.

Интенсивность флуоресценции от флуорофоров, расположенных на глубине z от поверхности биоткани, достигающая этой поверхности, следовательно, будет равна

$$I^f(z) \approx [C_{\text{ex}} \exp(-\mu_{\text{eff}}^{\text{ex}} z)] \cdot \varphi [C_{\text{em}} \exp(-\mu_{\text{eff}}^{\text{em}} z)], \quad (12.20)$$

где C_{em} и $\mu_{\text{eff}}^{\text{em}}$ на длине волны испускания определяются так же, как C_{ex} и $\mu_{\text{eff}}^{\text{ex}}$ на длине волны возбуждения, а φ — квантовый выход флуоресценции.

Путем подстановки значений I_i^f из (12.20) и r_i из (12.17) в формулу (12.18) наблюдаемая анизотропия флуоресценции выражается как

$$r_{\text{obs}} = r_0 \frac{\int_0^d \exp(-\mu_{\text{eff}}^{\text{tot}} z) \cdot A^{[N_1(z)+N_2(z)]} dz}{\int_0^d \exp(-\mu_{\text{eff}}^{\text{tot}} z) dz}, \quad (12.21)$$

где

$$\mu_{\text{eff}}^{\text{tot}} = \mu_{\text{eff}}^{\text{ex}} + \mu_{\text{eff}}^{\text{em}}, \quad (12.22)$$

$$\mu_s^{\text{tot}} = \mu_s^{\text{ex}} + \mu_s^{\text{em}}. \quad (12.23)$$

Интегрирование выражения (12.21) дает

$$r_{\text{obs}} = r_0 \frac{\mu_{\text{eff}}^{\text{tot}}}{\mu_{\text{eff}}^{\text{tot}} - \ln(A) \cdot (\mu_s^{\text{tot}})} \cdot \frac{1 - \exp(-\mu_{\text{eff}}^{\text{tot}} d) \cdot (A)^{\mu_s^{\text{tot}} d}}{1 - \exp(-\mu_{\text{eff}}^{\text{tot}} d)}. \quad (12.24)$$

Измерения анизотропии флуоресценции обычно выполняются на промышленных спектрометрах, чувствительность которых различна для двух ортогональных состояний поляризации. Поэтому все измеренные спектры флуоресценции должны быть скорректированы на отклик системы [1057]:

$$r = \frac{I_{\parallel} - GI_{\perp}}{I_{\parallel} + 2GI_{\perp}}, \quad (12.25)$$

где G — отношение чувствительностей прибора к вертикально и горизонтально поляризованному свету.

Типичные спектры поляризованной флуоресценции с поправкой на G -фактор при возбуждении на длине волны 340 нм от образцов злокачественной и нормальной ткани женской груди толщиной ≈ 2 мм показаны на рис. 12.16 [1945]. В эти спектры вносят вклад коллаген, эластин, коферменты (НАД·Н/НАД·РН) и флавины. Спектры возбуждались также на большей длине волны 460 нм [1945, 1946]. Вклад НАД·Н преобладает при возбуждении на 340 нм, а различные формы флавинов дают преобладающий вклад при возбуждении на 460 нм. На рис. 12.16 сдвиг максимума спектра поляризованной флуоресценции в синюю сторону ясно виден у злокачественной ткани по сравнению с нормальной. Аналогичный сдвиг на 5–10 нм наблюдался также при возбуждении флуоресценции светом с длиной волны 460 нм. Этот сдвиг может быть связан с накоплением положительно заряженных ионов в межклеточном окружении злокачественной клетки [1943]. Некоторые различия, в частности спектральный сдвиг максимума, между спектрами со- и кросс-поляризованной флуоресценции, наблюдаемые для довольно толстых слоев ткани (≈ 2 мм), могут быть

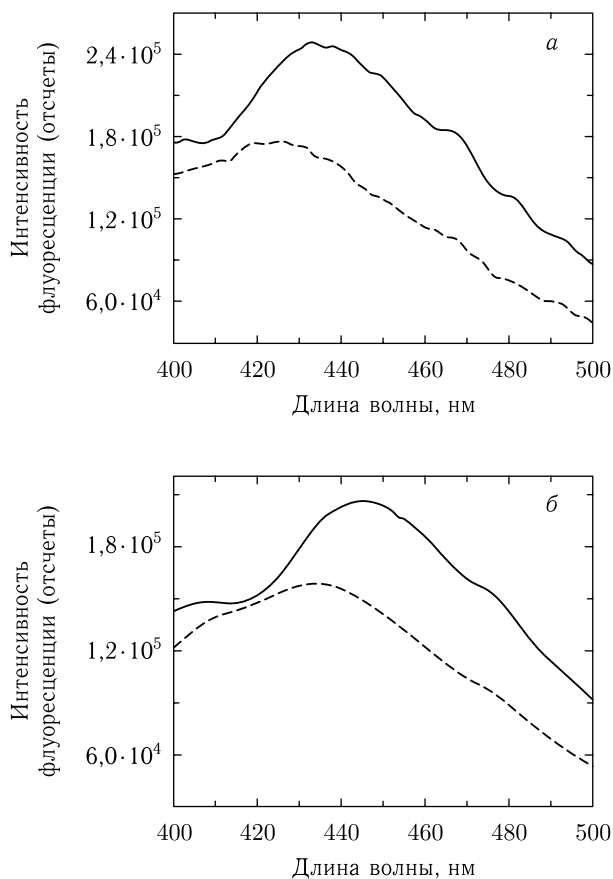


Рис. 12.16. Типичные поляризационные спектры флуоресценции при возбуждении на длине волны 340 нм образцов ткани женской молочной железы толщиной 2 мм [1945]. Сплошные кривые — спектры с возбуждением и испусканием, поляризованными вертикально (I_{\parallel}), штриховые линии — спектры с ортогональными поляризациями возбуждения и испускания (I_{\perp}):
а — злокачественная ткань; б — ткань в норме

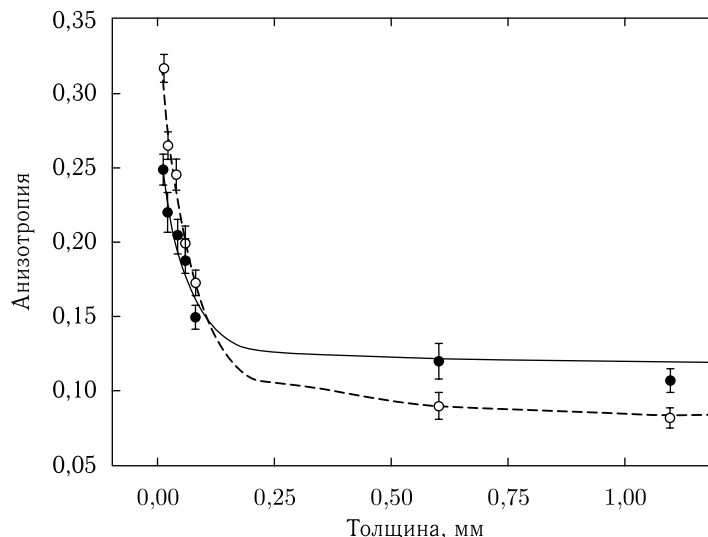


Рис. 12.17. Анизотропия поляризационной флуоресценции, измеренная на длине волны 440 нм при возбуждении на длине волны 340 нм для злокачественной (пустые кружки) и нормальной (заполненные кружки) ткани молочной железы как функция толщины ткани [1945]. Вертикальные отрезки показывают стандартное отклонение. Сплошная и штриховая кривые — теоретическая подгонка с использованием формулы (12.24) соответственно для нормальной и злокачественной биоткани

связаны с зависящими от длины волны рассеивающими и поглощающими свойствами биоткани.

Средние значения анизотропии флуоресценции для образцов нормальной и злокачественной ткани молочной железы толщиной от 10 мкм до 2 мм, определенные при испускании на 440 нм и возбуждении на 340 нм, представлены на рис. 12.17 [1946]. Теоретическая подгонка по экспериментальным данным с использованием формулы (12.24) и параметра приведения анизотропии флуоресценции при однократном рассеянии $A = 0,7$ приводит к следующим результатам для анизотропии и оптических параметров: $r_0 = 0,34$; $\mu_s^{\text{tot}} = 590 \text{ см}^{-1}$; $\mu_{\text{eff}}^{\text{tot}} = 53,5 \text{ см}^{-1}$ для злокачественной и $r_0 \approx 0,25$; $\mu_s^{\text{tot}} = 470 \text{ см}^{-1}$; $\mu_{\text{eff}}^{\text{tot}} = 34,5 \text{ см}^{-1}$ для нормальной биоткани. Для очень тонких слоев, $d \leq 30 \text{ мкм}$, значения анизотропии оказались выше для злокачественной ткани по сравнению с нормальной. Напротив, в более толстых срезах злокачественная ткань демонстрирует меньшую анизотропию флуоресценции, чем нормальная.

Тот факт, что анизотропия флуоресценции меняется с толщиной ткани, связан с проявлением различных механизмов деполяризации флуоресценции, которые обусловлены переносом энергии и вращательной диффузией флуорофоров, а также рассеянием возбуждающего и испущенного света. Перенос энергии и/или вращательная диффузия флуорофоров доминируют в тонких срезах ткани, и эти процессы происходят быстрее в нормальных тканях, чем в злокачественных. В более толстых срезах рассеяние света вносит преобладающий вклад в деполяризацию во время переноса излучения в злокачественной ткани.

Как уже отмечалось в начале данного раздела, фактор анизотропии рассеяния света g и, соответственно, приведенный коэффициент рассеяния μ'_s , или транспортная длина свободного пробега фотона, l_{tr} , определяют характерную длину деполя-

ризации в рассеивающей среде. Параметр A , характеризующий ослабление анизотропии флуоресценции на один акт рассеяния в рассматриваемой модели, зависит от значения g -фактора [1945]. Теоретический анализ, проделанный авторами работы [1945], показал, что параметр анизотропии g принимает значения между 0,7 и 0,9, соответственно значение A меняется между 0,7 и 0,8. Эти результаты означают, что измерения анизотропии флуоресценции можно использовать для маркирования злокачественных областей ткани среди нормальных, что может быть особенно полезным при диагностике эпителиального рака, когда исследованию, как правило, подлежат поверхностные слои ткани [1946].

Разнообразные мультимодальные методы и измерительные системы, включающие флуоресцентно-поляризационные измерения, для демаркации меланомы и других типов рака кожи представлены в работах [602, 1527, 1528, 1947–1950].

12.6. Заключение

Как следует из представленного анализа, поляризационно-чувствительные методы обещают хорошие перспективы для оптической медицинской диагностики и визуализации, особенно для морфологического анализа тканей *in vivo* и *in situ*. Поляризационная дискриминация рассеянного зондирующего излучения, которая может быть легко интегрирована в традиционные оптические диагностические методы, такие как спектроскопия и визуализация диффузного отражения, открывает возможность усиления диагностического потенциала этих методов. Нового вклада в оптическую медицинскую диагностику следует ожидать от систематических морфологических исследований биотканей с выраженной структурной анизотропией. Измерения поляризации флуоресценции, которые могут обеспечить дополнительную информацию на молекулярном уровне, будут полезны при дискриминации злокачественных и нормальных биотканей.

Как правило, почти все поляризационно-чувствительные методы, рассмотренные в данной главе, могут быть реализованы с использованием недорогого промышленного оборудования. Они также не требуют сложных алгоритмов обработки данных. Другими словами, эти методы полностью подходят для широкого внедрения в практику клинической диагностики.

Глава 13

КОГЕРЕНТНЫЕ МЕТОДЫ И УСТРОЙСТВА ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКИ И ВИЗУАЛИЗАЦИИ

В данной главе мы обсудим когерентные оптические методы, открывающие новые возможности приложений в биомедицине, такие как спектроскопия корреляции фотонов и диффузионных волн, спекл-интерферометрия, спекл-визуализация полного поля, когерентная топография и томография, фазовая, конфокальная и доплеровская микроскопия, а также интерференционные измерения ретиальной остроты зрения и седиментации крови.

13.1. Фотонно-корреляционная спектроскопия прозрачных биотканей и потоков клеток

13.1.1. Введение. Физические основы фотонно-корреляционной спектроскопии обсуждались в гл. 8. Описание принципов и характеристик основных типов гомодинных и гетеродинных фотонно-корреляционных спектрометров, лазерных доплеровских анемометров (ЛДА), дифференциальных схем ЛДА и лазерных доплеровских микроскопов (ЛДМ) можно найти в работах [5, 6, 22, 76–79, 82, 555, 1433–1435, 1437, 1438, 1442, 1443, 1460, 1464, 1468, 1469]. Обзоры медицинских приложений, охватывающие, в основном, исследования тканей глаза (хрусталик — диагностика катаракты), изучение гемодинамики изолированных сосудов (сосуды глазного дна и другие сосуды) с использованием волоконно-оптических катетеров и анализ микроциркуляции крови в биологических тканях, содержатся в работах [5, 6, 22, 67, 76–79, 82, 83, 557, 1433–1435, 1437, 1438, 1442, 1443, 1445, 1447, 1460–1464, 1468–1470, 1473, 1479, 1951–1986]. В данном разделе мы обсудим фотонно-корреляционный метод в применении к ранней диагностике катаракты и измерению скорости кровотока и лимфотока в микрососудах.

13.1.2. Диагностика катаракты. Фотонно-корреляционная спектроскопия квазиупругого рассеяния света (КРС) была первоначально разработана для изучения поведения малых коллоидных частиц в жидкостях [1957]. Более тридцати лет назад Танака и Бенедек [1958, 1959] предложили использовать этот метод для исследования катаракты хрусталика глаза, однако он тогда не нашел широкого практического применения в офтальмологии из-за сложностей в технической реализации. Благодаря новым достижениям в оптоэлектронике, позволившим решить ряд проблем с надежной регистрацией сигналов в реальном масштабе времени, метод КРС снова привлекает интерес своими потенциальными возможностями в офтальмологии, где с его помощью можно изучать практически все глазные ткани и жидкости [1469]. Возможность раннего обнаружения изменений молекулярной морфологии методом КРС может помочь не только в разработке новых лекарств для борьбы с такими глазными заболеваниями, как катаракта, но и в диагностике и исследовании таких

тяжелых заболеваний, как диабет и, возможно, болезнь Альцгеймера, как было предложено Анзари [1469, 1956].

Когерентные волоконно-оптические фотонно-корреляционные спектрометры для изучения генезиса катаракты с потенциальными возможностями ее ранней диагностики были разработаны более пятнадцати лет назад [1470, 1960]. Спектрометр, описанный в работе [1470], имеет два оптических волокна. Первое, одномодовое, волокно направляет гауссов пучок гелий-неонового или диодного лазера на объект. Второе, одно- или многомодовое волокно, используется для сбора рассеянного под некоторым углом назад излучения и передачи этого излучения на фотоприемник (см. рис. 13.1*а*). Мощность излучения гелий-неонового лазера (на длине волны 633 нм) ~ 1 мВт. Размер пятна лазерного пучка на хрусталике коло 150 мкм. Рассеянное излучение регистрируется под углами 155° (приемник 1) и 143° (приемник 2). В качестве иллюстрации метода измерений на рис. 13.1*б* показаны типичные автокорреляционные функции (АФ) флуктуаций интенсивности, измеренные для хрусталика быка в условиях температурно-индуцированной катаракты (обратимая катаракта, индуцированная холодом). Хорошо видна связь вида АФ с температурой хрусталика: чем меньше температура, тем больше протяженность АФ, т.е. наблюдаются все более медленные флуктуации, что связано с увеличением размеров белковых агрегатов с уменьшением температуры. В качестве примера на рис. 13.1*в* представлены также результаты решения обратной задачи по определению размеров рассеивающих частиц хрусталика глаза человека. Обратная задача решалась на основе измерений автокорреляционных функций флуктуаций интенсивности с использованием уравнений (8.28), (8.30) и (8.31). Эти данные показывают, что метод КРС достаточно чувствителен для мониторинга возрастных изменений в структуре хрусталика, вызванных ростом размеров агрегированных белковых компонентов.

В работе [1470] представлена клиническая модификация измерительной системы для ранней диагностики катаракты. Согласно оценкам, при измерениях автокорреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного света от хрусталика в интервале времени около 2 мин (интервал времени, необходимый для накопления сигнала при заданной мощности измерительного лазерного пучка) паразитная освещенность на сетчатке имеет плотность мощности не превышающую $0,05$ мВт/мм², что почти на три порядка ниже, чем порог повреждения сетчатки.

Волоконно-оптический КРС-зонд, показанный на рис. 13.2, сочетает уникальные качества: малый размер, низкую лазерную мощность и высокую чувствительность [1469, 1956]. Система проста в использовании, поскольку она не требует тонкой оптической юстировки и виброизоляции. Низкоинтенсивный свет (50–100 мкВт) полупроводникового лазера, прошедший через одномодовое оптическое волокно, остро фокусируется в фокальное пятно диаметром 20 мкм на исследуемую ткань с помощью GRIN-линзы (линзы с градиентом показателя преломления). С приемной стороны рассеянный свет собирается другой GRIN-линзой и направляется на лавинный фотодиод (ЛФД), встроенный в модуль счета фотонов. Сигнал с ЛФД затем передается на цифровой коррелятор для анализа. Зонд обеспечивает количественные измерения патологий роговицы, водянистой влаги, хрусталика, стекловидного тела и сетчатки. Путем выбора оптических фильтров прибор может быть модифицирован для спектральных измерений (автофлуоресценции и спектроскопии комбинационного рассеяния) и лазерной доплеровской флоуметрии/велосиметрии, что открывает возможность измерения, например, окислительного стресса и скорости кровотока в тканях глаза. Прибор легко сочетается с такой стандартной офтальмологической аппаратурой, как щелевые лампы, камеры Шеймпфлюга, видеокератоскопы и флоуметры.

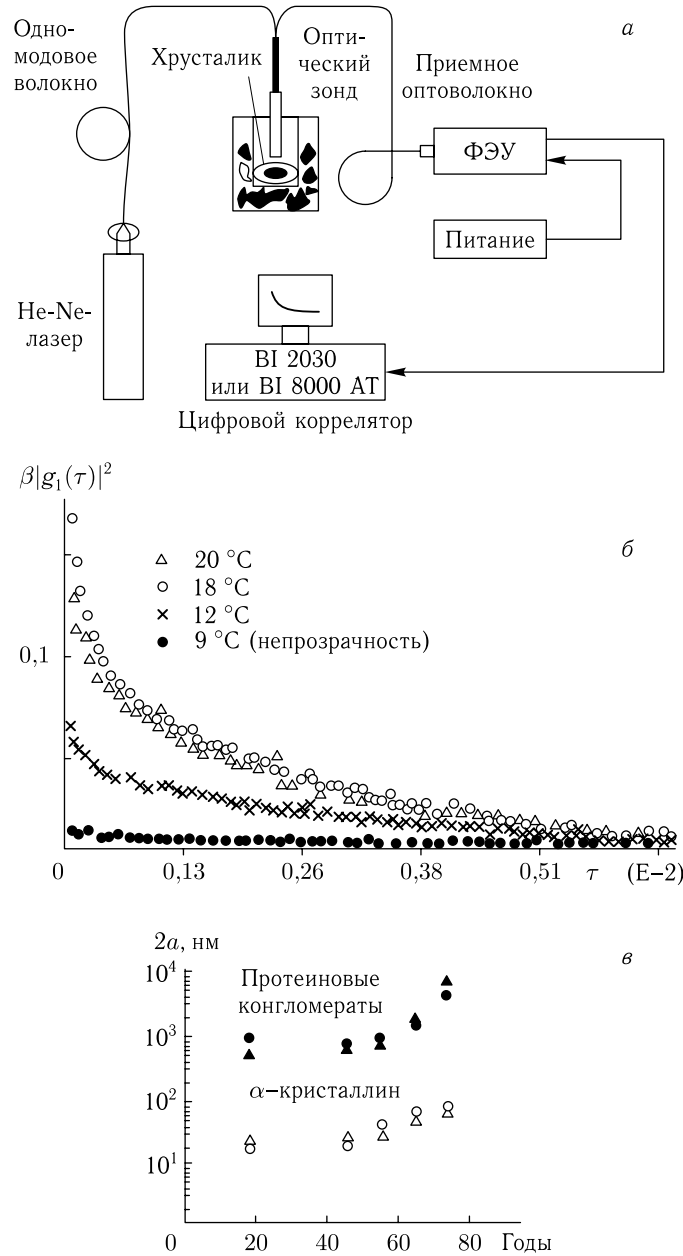


Рис. 13.1. Фотонно-корреляционный спектрометр для ранней диагностики катаракты [1470]: *а* — схема спектрометра; *б* — автокорреляционные функции для температурно-зависимой катаракты глаза быка; *в* — возрастные изменения диаметра рассеивателей хрусталика человека (две фракции: тонкодисперсная (α -кристаллины) и грубодисперсная (белковые конгломераты) реконструированные на основе эмпирической автокорреляционной функции; см. соотношение (8.31)). Треугольники и квадраты представляют измерения, выполненные с различными типами когерентных волоконных зондов

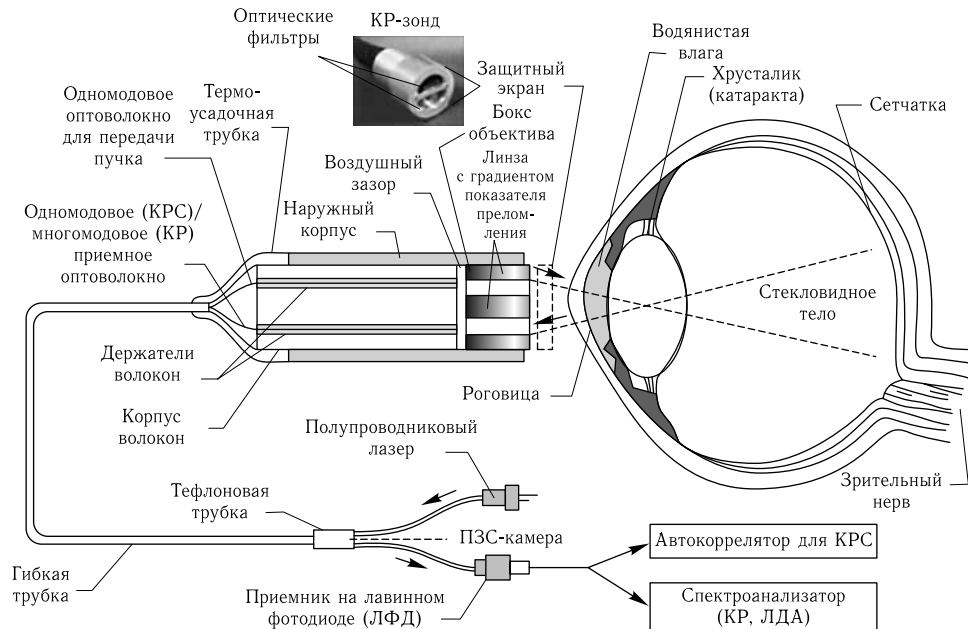


Рис. 13.2. Схема чувствительного, виброзащищенного, универсального и простого в использовании волоконно-оптического зонда квазиупругого рассеяния света (КРС) [1956]. Зонд был первоначально разработан в НАСА (NASA) для проведения экспериментов по гидродинамике в отсутствии гравитации на борту космического челнока или орбитальной станции

Этот компактный зонд (рис. 13.2) использовался для мониторинга генезиса катаракты у мышей *in vivo* посредством исследования профилей АФ (см. формулы (8.28) и (8.30)), измеренных в различные моменты времени [1469, 1956]. В качестве примера изучались мыши Philly. У этих животных катаракта развивается спонтанно между 26 и 33 днями от рождения. Данные включают исследования для 45-дневной мыши контрольного штамма FVB/N, у которой катаракта не развивается, и двух мышей Philly в возрасте примерно 26–29 дней. Каждое измерение занимало 5 с при мощности лазера 100 мкВт. Изменение наклона АФ является признаком развития катаракты, поскольку кристаллины (основные белки хрусталика) агрегируют с образованием скоплений и комплексов с большим молекулярным весом. Автокорреляционные данные КРС преобразуются в распределение частиц по размерам с использованием программы экспоненциальной выборки для решения обратной задачи рассеяния (см. рис. 13.3). Хотя преобразование данных КРС в распределение частиц по размерам требует некоторых предположений, касающихся вязкости материала хрусталика, полученные размеры частиц отражают тенденцию развития катаракты. Данные измерения показывают, что можно количественно с необходимой достоверностью, воспроизводимостью (5–10%) и точностью осуществлять мониторинг развивающейся катаракты.

Кроме исследования катаракты, КРС-зондирование было предложено и экспериментально проверено в качестве метода раннего, неинвазивного и количественного обнаружения и мониторинга таких заболеваний и патологий, как витреопатия, пигментированная глаукома, диабетическая ретинопатия, а также для оценки состояния роговицы при лечении ран после лазерной рефрактивной хирургии [1469, 1956].

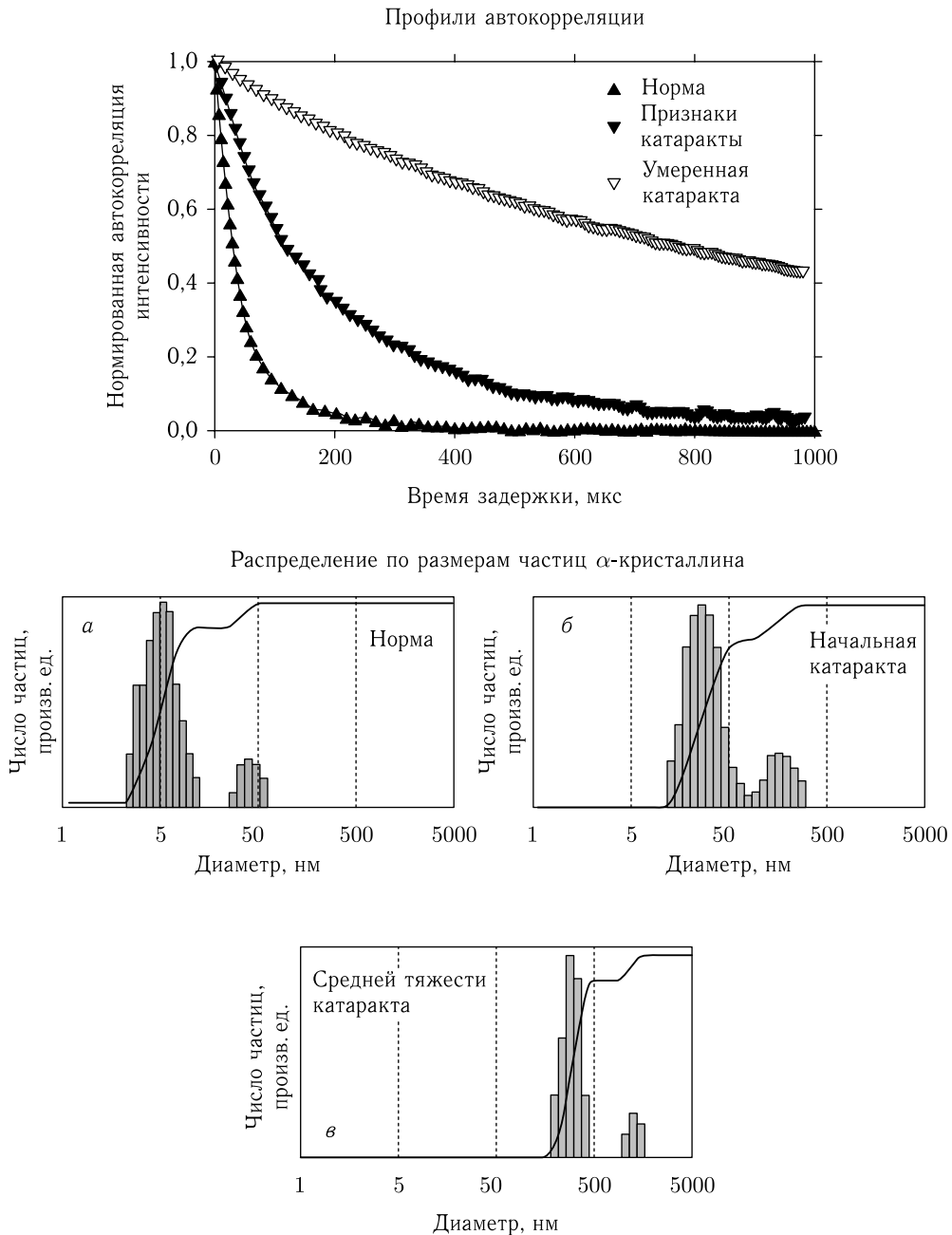


Рис. 13.3. Измерения *in vivo* при катаракте у мышей Philly [1956]: а — автокорреляционные профили флуктуаций интенсивности; распределение по размерам рассеивающих частиц хрусталика глаза: норма, контрольная мышь (б); начальная катаракта (в); катаракта средней тяжести (г)

Портативный волоконно-оптический фотонно-корреляционный спектрометр на основе гелий-неонового лазера (633 нм), одномодовых волокон, фотоумножителя, работающего в режиме счета фотонов, и 288-канального коррелятора реального времени с временем выборки 200 нс описан в работе [1471]. Этот спектрометр позволяет проводить исследования *in vivo* хрусталика пациентов. Эти исследования также подтвердили бимодальный характер распределения размеров рассеивающих частиц в ткани хрусталика человека. В частности, для здоровых глаз пациентов в возрасте от 39 до 43 лет (шесть глаз, три пациентки-женщины) тонкодисперсная фракция имела средний радиус частиц $4,25 (\pm 1,7)$ нм, тогда как грубодисперсная фракция — $497 (\pm 142)$ нм. Для хрусталиков, пораженных катарактой, средний радиус частиц тонкодисперсной фракции приближался к 160 нм, а грубодисперсной — к 1000 нм. Спектрометр позволяет определять распределение частиц по размерам в зависимости от локализации в пределах исследуемого объема. Бимодальные распределения размеров рассеивающих частиц в разных точках вдоль оси пораженного катарактой хрусталика представлены на рис. 13.4.

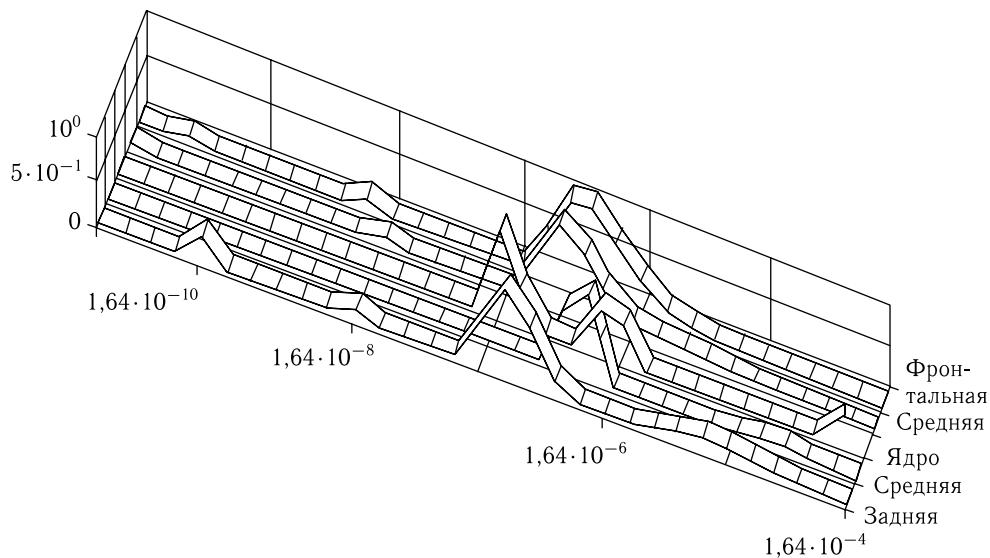


Рис. 13.4. Бимодальное распределение радиусов рассеивающих частиц для хрусталика с катарактой (женщина 76 лет, измерения *in vivo*) с различными локализациями измерительного объема вдоль оси хрусталика: фронтальная часть кортикального слоя, средняя часть кортикального слоя, ядро, средняя часть заднего кортикального слоя и задняя часть кортикального слоя [1471]

13.1.3. Мониторинг потоков крови и лимфы в микрососудах. Параметры потоков крови или лимфы в отдельных сосудах можно измерить с помощью метода, основанного на дифракции сфокусированного лазерного пучка от движущихся рассеивателей (см. разд. 8.4.2) [77, 555, 1434, 1442, 1473, 1474]. Схема соответствующего спекл-микроскопа представлена на рис. 13.5. Лазерное излучение, сфокусированное в пятно малого диаметра порядка $4,6\lambda$, проецируется на изучаемый сегмент микрососуда. Фотоприемник, входная апертура которого много меньше среднего размера спекла, регистрирует флуктуации интенсивности рассеянного света. Зарегистрированные флуктуации интенсивности анализируются низкочастотным цифровым спектроанализатором или преобразуются в цифровой сигнал для последующего

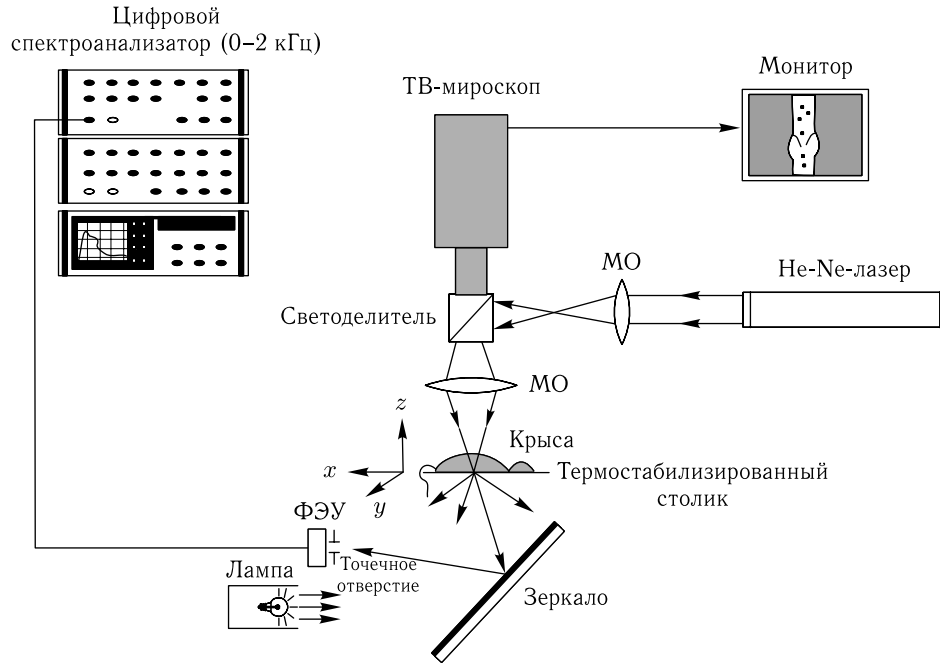


Рис. 13.5. Схема спекл-микроскопа для исследования крови и лимфы в микрососудах [1473, 1474]

компьютерного анализа. Типичные спектры потоков крови и лимфы, наблюдаемые при исследовании поверхностных сосудов брыжейки крысы, усредненные по 128 реализациям случайного сигнала, изображены на рис. 13.6.

Для кровеносного микрососуда спектр флуктуаций интенсивности рассеянного поля имеет почти гауссову форму в низкочастотном диапазоне. Спектры флуктуаций интенсивности для лимфатических сосудов весьма сложны, что отражает намного более сложное движение лимфы в микрососуде по сравнению с движением крови. Например, лимфа может совершать характерное челночное движение, быть неподвижной у стенки сосуда или двигаться в направлении, противоположном направлению движения в его центральной части, и т. д. Такое поведение лимфы связано со сложной динамикой сокращения клеток гладкой мускулатуры в стенках сосудов, управляемой локальным водителем ритма (пейсмейкером) и поведением клапанов лимфатических сосудов.

Для оценки параметров потоков крови и лимфы в микрососудах введем следующие величины [1473, 1474]:

$$V_V = \frac{\Delta F}{D_V}, \quad \Sigma_V = \frac{\int_0^{\Delta F} |S(f) - G(f)|^4 df}{\left[\int_0^{\Delta F} |S(f) - G(f)|^2 df \right]^2 / \Delta F}. \quad (13.1)$$

Здесь ΔF — ширина усредняемого спектра, D_V — диаметр микрососуда, $S(f)$ — спектр мощности флуктуаций интенсивности исследуемого спекл-поля, а $G(f)$ — спектр с гауссовой огибающей. Спектры $S(f)$ и $G(f)$ имеют одинаковую ширину

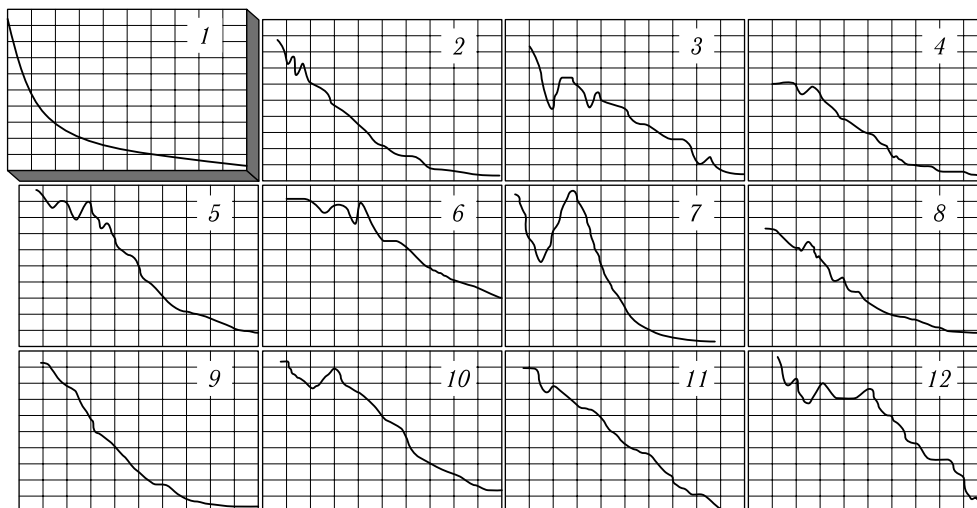


Рис. 13.6. Спектры флуктуаций интенсивности рассеянного света (усреднены по 128 реализациям) для дифракции сфокусированного лазерного пучка на брыжейке крысы: 1 — кровеносный сосуд (12 мкм в диаметре); 2–12 — лимфатические сосуды различного диаметра для различных крыс; измерения производились в диапазоне частот 30–1500 Гц [1473, 1474]

полосы и мощность. Параметр V_V прямо пропорционален скорости потока, а Σ_V несет информацию, относящуюся к пространственным и временным вариациям скорости потока в исследуемой области сосуда.

Характеристики, приведенные выше, были использованы для анализа влияния лимфотропного агента (*Staphylococcus* токсин, ST) на динамику лимфотока в микрососудах брыжейки экспериментальных животных (крыс) [1473, 1474]. Даже на пятой минуте действия ST все исследованные сосуды демонстрировали изменения в спектре флуктуаций интенсивности рассеянного света, отражающие изменения скоростных характеристик лимфотока: в 59% из 17 исследованных сосудов наблюдалось снижение средней скорости лимфотока на $(41 \pm 8)\%$ и рост параметра Σ_V на $(35 \pm 9)\%$. На более поздних стадиях (между пятой и двадцатой минутами) прогрессирует сужение сосудов, причем число сосудов, сокращающихся синфазно, уменьшается, что приводит к изменениям лимфодинамики. После двадцатой минуты лимфоток во всех исследованных сосудах прекращался.

Оптическая схема установки, обеспечивающей регистрацию направления потока клеток и их скоростей в диапазоне от 10 мкм/с до 10 мм/с с временным разрешением до 50 мс, показана на рис. 13.7 [1442, 1443, 1478]. Излучение от унифазного¹⁾ He:Ne-лазера (633 нм) подается через осветительный канал и фокусируется объективом микроскопа в пятно диаметром около 2 мкм в плоскости, отстоящей от оси микрососуда на расстояние $z = 100$ мкм. Радиус кривизны волнового фронта пучка, освещающего микрососуд, достаточно мал, чтобы гарантировать коррелированный сдвиг биоспеклов. Исследуемый объем формируется пересечением расходящегося лазерного пучка с микрососудом и имеет форму усеченного конуса (угол наклона образующей 10° , средний диаметр порядка 30 мкм). Лазерное излучение, рассеянное потоком клеток, с помощью делителя пучка направляется на фотоприемник,

¹⁾ Унифазный или одномодовый лазер, работающий на поперечной моде наименьшего порядка TEM_{00} , для которой отсутствуют вариации фазы поля поперек лазерного пучка.

расположенный на расстоянии 300 мм от предметной плоскости микроскопа. Диаметр каждого фотоприемника 3 мм, что соответствует среднему диаметру спеклов в плоскости наблюдения. Расстояние между центрами фотоприемников около 7 мм. Сигналы с фотоприемников усиливаются преобразователями фототока и оцифровываются с помощью двухканального 16-битного аналого-цифрового преобразователя (АЦП) с частотой выборки 44,1 кГц. Для определения функции кросс-корреляции сигналов фотоприемника, а также положения ее пика использовался персональный компьютер.

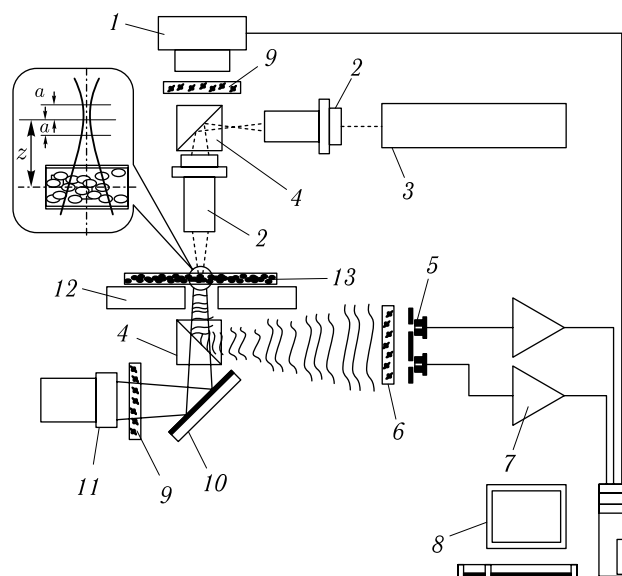


Рис. 13.7. Схема экспериментальной установки лазерного спекл-велоциметра, интегрированно с динамическим цифровым микроскопом, обеспечивающим измерения абсолютных величин и направлений потоков клеток [1478]: 1 — цифровая видеокамера; 2 — микрообъектив; 3 — He:Ne-лазер (633 нм); 4 — делитель пучка; 5 — фотодиоды; 6 — фильтр красного света; 7 — преобразователи фототока; 8 — ПК; 9 — фильтры зеленого света; 10 — зеркало; 11 — осветитель; 12 — термически стабилизированный столик; 13 — лимфатический сосуд брыжейки. Врезка показывает освещение лимфатического сосуда сфокусированным гауссовым пучком (a — длина перетяжки лазерного пучка, z — расстояние между осью потока и плоскостью перетяжки лазерного пучка)

В зависимости от необходимого временного разрешения обработка сигналов фотодетектора длительностью 60 с занимала от 90 до 300 с. Цифровая видеокамера в сочетании с микроскопом, работающим на просвет, использовалась для анализа функции микрососуда *in vivo* в реальном времени. При этом определялись направление и средняя скорость потока, измерялся диаметр микрососуда, регистрировалось появление фазного сокращения в исследуемых лимфатических сосудах. Динамические цифровые изображения обрабатывались при помощи специально разработанного программного обеспечения. Скорость клеток определялась как отношение разности координат клетки на двух последовательных кадрах к интервалу времени между ними. Средняя скорость клеток вычислялась путем усреднения скоростей от четырех до шести клеток. Динамическая цифровая микроскопия позволяла регистрировать

скорость потока клеток в диапазоне от 25 мкм/с до 2–2,5 мм/с с временным разрешением 40 мс.

Описанная установка была испытана при измерениях *in vivo* скорости лимфотока в сосудах брыжейки белой крысы, находящейся под наркозом. Исследуемое животное помещалось на термостабилизированный столик (37,7 °С) микроскопа (см. рис. 13.7), при этом брыжейка и кишечник увлажнялись раствором Рингера при 37 °С (рН ~ 7,4). Изображения микрососудов с движущейся лимфой, полученные с помощью микроскопии просвечивания в процессе измерения скорости с помощью лазерного спекл-велоциметра, обрабатывались для получения абсолютных скоростей движения клеток. Результаты таких измерений представлены на рис. 13.8, где показаны временные зависимости скорости потока в исследованных лимфатических микрососудах со средним диаметром 170 ± 5 мкм при средней скорости потока лимфы $169 \pm 4,6$ мкм/с [1442, 1443, 1478]. Лазерный спекл-велоциметр позволяет измерять скорость лимфоцитов только в относительных единицах. Коэффициент пропорциональности между данными спекл-велоциметрии и средней скоростью, измеренной с помощью динамической цифровой микроскопии, определялся из наклона графика линейной регрессии между скоростями, измеренными этими двумя методами. Коэффициент корреляции линейной регрессии был равен 0,723 для измерений в лимфатическом сосуде и 0,966 для калибровочных измерений в стеклянном капилляре.

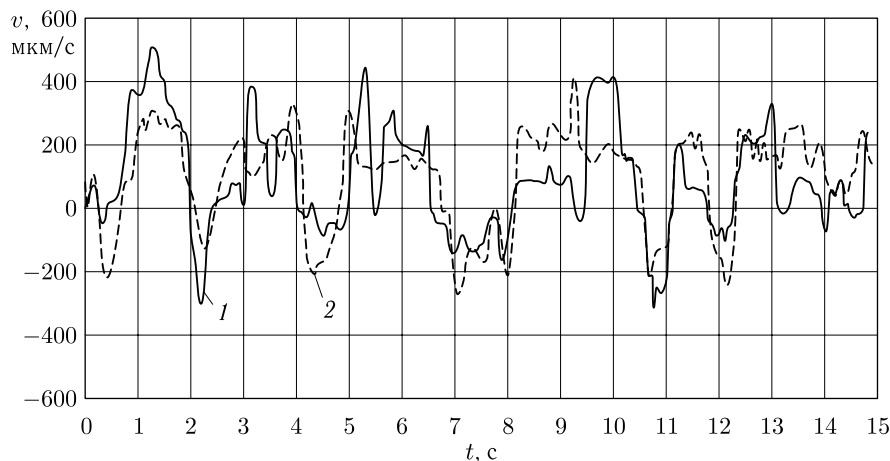


Рис. 13.8. Временные зависимости скорости потока лимфы в лимфатическом сосуде со средним диаметром 170 ± 5 мкм, полученные с помощью спекл-велоциметра (1) и динамической цифровой микроскопии (2) (см. рис. 13.7) [1478]

13.2. Диффузионно-волновая спектроскопия и интерферометрия: измерения микроциркуляции крови

Экспериментальная реализация диффузионно-волновой спектроскопии (ДВС) весьма проста: нужно освещать рассеивающий объект светом лазера непрерывного действия и измерять флуктуации интенсивности рассеянного излучения в пределах одного спекла с помощью фотоумножителя и электронного коррелятора. Типичная установка, используемая в модельных экспериментах, показана на рис. 13.9 [80, 81, 1499, 1961, 1962]. Излучение с длиной волны 514 нм и мощностью порядка 2 Вт от аргонового лазера с внутрирезонаторным эталоном проходит через многомодовый

волоконно-оптический кабель и освещает поверхность твердого объемного образца (суспензия тонкодисперсного порошка TiO_2 в эпоксидной смоле). Образец имел размеры $15 \times 15 \times 8 \text{ см}^3$. Сферическая полость диаметром 2,5 см, заполненная 0,2% водной суспензией полистироловых сфер диаметром 0,296 мкм при температуре 25 °C располагалась в центре образца на глубине 1,8 см от его верхней поверхности. Средняя транспортная длина свободного пробега фотонов для суспензии и образца составляла $l_{tr} = 0,15$ и 0,22 см соответственно. Коэффициенты поглощения этих сред были равны друг другу, $\mu_a = 0,002 \text{ см}^{-1}$. Коэффициент диффузии броуновского движения в суспензии равен $D_B = 1,5 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$. Свет, выходящий из некоторой области объекта, собирался одномодовым волокном и передавался на фотоумножитель. Выходной сигнал фотоумножителя с помощью цифрового автокоррелятора реконструировался во временную автокорреляционную функцию (АФ) флуктуаций интенсивности. Эта АФ связана с временной автокорреляционной функцией поля формулой Зигерта (см. соотношение (8.28)). Оптические волокна были спроектированы таким образом, чтобы можно было собирать излучение с любого участка поверхности образца.

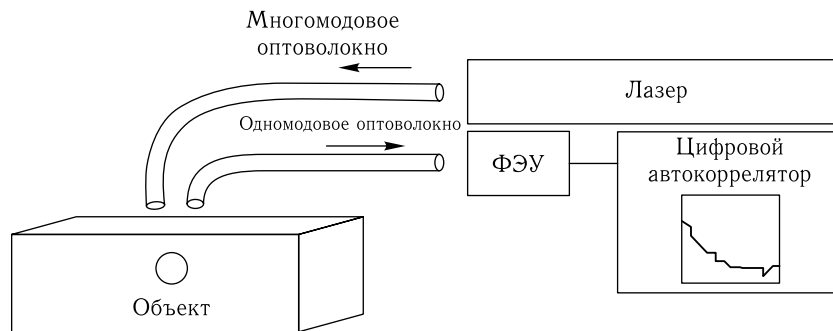


Рис. 13.9. Типичная экспериментальная установка для диффузионно-волновой (корреляционной) спектроскопии рассеивающих сред [1962]

На рис. 13.10 показаны экспериментальные результаты для нормированной временной АФ поля при трех различных расположениях оптических волокон, связанных с источником излучения и приемником, а также сравнение этих экспериментальных данных с предсказаниями теории. Поскольку начало координатной системы $x-y$ лежит на поверхности образца над центром динамической полости, источник излучения и приемник располагались вдоль оси y так, что координата источника была равна $y = 1,0 \text{ см}$, а координата приемника $y = -0,75 \text{ см}$. Измерения производились при $x = 0,0, 1,0$ и $2,0 \text{ см}$. Расстояние между источником и приемником оставалось постоянным. Ошибка этих измерений составляла 3%. Основной источник ошибок был связан с неопределенностью установления положения оптических волокон. Теоретические кривые получены моделированием на основе диффузионной теории с учетом экспериментальных данных [1499, 1961, 1962]. Нетрудно видеть, что АФ спадает быстрее, когда источник излучения и приемник расположены близко к динамической сфере, которая порождает временные флуктуации. Именно в этой области большинство детектируемых фотонов проходят через динамический объем. Такое поведение автокорреляционных функций позволяет использовать их наклон (скорость затухания) как параметр для построения изображений динамических неоднородностей в среде. Эта модель соответствует ситуации, когда скорость микроциркуляции крови локально увеличена, например, вблизи растущей опухоли. Используя аналогичный

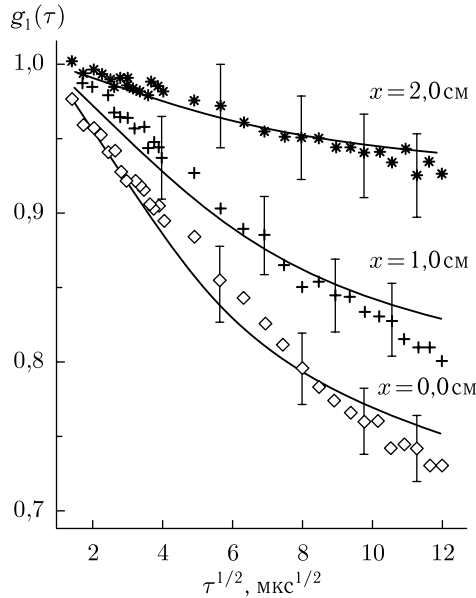


Рис. 13.10. Экспериментальные и теоретические нормированные автокорреляционные функции корреляции поля рассеянного света от твердого фантома биоткани, изготовленного из эпоксидной смолы с TiO_2 -частицами, со сферической полостью, заполненной суспензией полистироловых сфер (см. подробности в тексте) [1962]

подход, можно моделировать направленные потоки крови. Для этой цели в твердом образце нужно просверлить сквозное отверстие на некоторой глубине и пропускать через него рассеивающую жидкость (например, Интралипид) с определенной скоростью [1961, 1962].

Для определения АФ поля в наносекундном или субнаносекундном масштабе времени нужно заменить электронный коррелятор интерферометром Майкельсона с большой разностью длин плеч, которая должна быть порядка 3 м [80, 1963]. В этом случае усредненная по времени интенсивность $\langle I(\tau) \rangle$ зависит только от времени задержки τ между интерферирующими полями в интерферометре, несущей частоты ω оптического сигнала, средней интенсивности спеклов I_{ave} и временной АФ поля $g_1(\tau)$:

$$\langle I(\tau) \rangle = \frac{1}{2} I_{ave} [1 + g_1(\tau) \cos(\omega\tau)]. \quad (13.2)$$

Схема экспериментальной установки и результаты модельных экспериментов представлены на рис. 13.11. Излучение непрерывного лазера, рассеянное вперед объектом в пределах одного спекла, вводится в длинный интерферометр Майкельсона. Разность длин плеч этого интерферометра можно плавно регулировать, например, путем изменения давления воздуха в коротком плече. Эффекты, возникающие из-за конечной длины корреляции лазерного излучения и геометрических факторов, исключались путем калибровки измерительной системы с использованием разбавленных образцов, АФ которых не спадает на исследуемых временных масштабах.

Возможности метода ДВС для медицинских приложений были продемонстрированы в работе [1964]. Используемая в этих исследованиях экспериментальная установка показана на рис. 13.12 а. В основе экспериментальной системы лежит титан-сапфировый лазер с мощностью около 100 мВт и длиной волны 800 нм. Лазерное

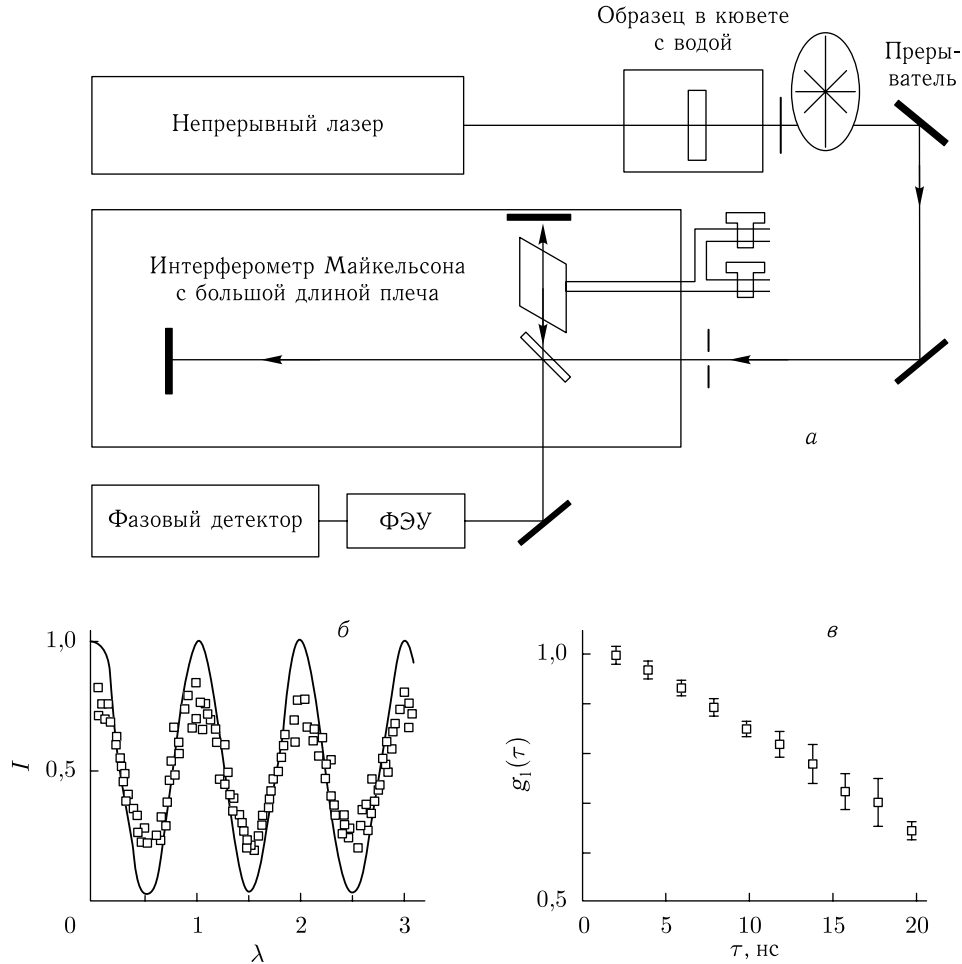


Рис. 13.11. Диффузионно-волновая интерферометрия [1963]: *a* — экспериментальная установка; *б* — нормированный выходной сигнал (интерференционные полосы) для времени задержки между интерферирующими полями в интерферометре $\tau = 0$ (сплошная линия) и 20 нс (квадраты) для двухфазной водной суспензии полистироловых сфер диаметром 0,0385 и 0,299 мкм; *в* — соответствующая автокорреляционная функция поля $g_1(\tau)$

излучение подавалось на объект через многомодовое оптическое волокно с диаметром сердцевины 200 мкм. Рассеянное излучение регистрировалось в пределах одного спекла с использованием одномодового волокна с диаметром сердцевины 5 мкм. Расстояние между оптическими волокнами на поверхности объекта оставалось постоянным и равнялось 6 мм. Скорость потока крови в объеме ткани предплечья человека устанавливалась при помощи наполняемой воздухом манжеты медицинского тонометра. Цифровой автокоррелятор на выходе фотоумножителя, работающего в режиме счета фотонов, использовался для измерения временной АФ флуктуаций интенсивности и зависимости формы АФ от давления P , производимого тонометром. Такие зависимости АФ поля, которая связана с АФ флуктуаций интенсивности формулой Зигерта, представлены в логарифмической шкале на рис. 13.12 *б*. Эти зависимости указывают на высокую чувствительность наклона АФ к изменению давления, т. е.

к изменению скорости объемного потока крови. В соответствии с формулами (8.30) и (8.43), нормированная АФ флуктуаций поля может быть представлена в виде двух компонентов, связанных с броуновским и упорядоченным движением рассеивающих частиц [1964]:

$$g_1(\tau) = \int_0^{\infty} p(s) \exp \left\{ -2 \left[\frac{\tau}{\tau_B} + \left(\frac{\tau}{\tau_S} \right)^2 \right] \frac{s}{l_{tr}} \right\} ds, \quad (13.3)$$

где $\tau_B^{-1} \equiv \Gamma_T$ определяется формулой (8.30), $\tau_S^{-1} \approx 0,18G_V |\bar{q}| l_{tr}$ характеризует направленный поток, а G_V — градиент скорости потока. Другие величины, входящие в соотношение (13.3), определены формулами (8.26) и (8.43). Это соотношение позволяет выразить наклон АФ через коэффициент диффузии и градиент направленной скорости рассеивающих частиц. Когда упорядоченное течение существенно преобладает над броуновским движением, полулогарифмический график зависимости $g_1(\tau)$ от $\tau^{1/2}$ имеет вид прямой линии, наклон которой пропорционален скорости потока рассеивающих частиц.

Рисунок 13.12*в* показывает измеренную скорость потока крови как функцию приложенного давления. Если пренебречь броуновской компонентой, эта зависимость характеризуется изменением наклона АФ (см. соотношение (13.3)). Поскольку измерения производились на длине волны, близкой к изобестической точке (805 нм), изменение степени оксигенации крови из-за вариаций приложенного давления лишь слегка влияет на наклон АФ (скорость потока крови). Это обстоятельство позволяет найти корреляцию между скоростью кровотока и вариациями диаметра сосудов посредством одновременных и независимых измерений степени оксигенации и объема крови в биоткани с использованием двухчастотного спектрометра Ruptan (NIM Inc., Филадельфия, США). Эти измерения дают наглядную иллюстрацию высокой эффективности ДВС для исследований *in vivo* кровотока в объеме биотканей.

Заметим также, что если параметры кровотока остаются постоянными, измеренные АФ дают информацию, относящуюся к статическим оптическим параметрам многократно рассеивающей среды, т.е. l_{tr} или μ'_s , μ_a и g (см. формулу (8.43)). Действительно, как показано в работе [1965], полуширина спектра временных флуктуаций интенсивности в условиях многократного рассеяния зависит не только от динамических и геометрических параметров рассеивающих частиц, но и от поглощающей способности эритроцитов в крови, что позволяет оценивать степень оксигенации крови из результатов измерений, производимых вдали от изобестической длины волны.

Описанная в работе [1966] гибридная система и протокол измерений, основанный на диффузно-корреляционной спектроскопии (информация о кровотоке) и диффузно-отражательной спектроскопии (или ближне-инфракрасной спектроскопии (БИКС)) (информация об оксигенации крови), обеспечивают оценку микроциркуляции и мышечного метаболизма у пациентов с сосудистыми заболеваниями. Непрерывный лазер (800 нм) с большой длиной когерентности и лавинный фотодиод использовались для корреляционных измерений, расстояние между источником и приемником менялось от 0,5 до 3 см, время выборки составляло 1,5 с. Полный набор данных при циклическом переборе всех комбинаций «источник–приемник» накапливался за 2,5 с. Были обследованы 10 здоровых добровольцев и один больной с периферическим заболеванием артерий при 3-минутной окклюзии артерий на руке и ноге манжетами и при 1-минутном сгибании подошвы. Сигналы от различных слоев кожных тканей и мышц во время окклюзии манжетой дифференцировались, обнаруживая сильный гемодинамический отклик от мышечных слоев. Во время физической нагрузки в здоровых ногах наблюдаемый рост скорости кровотока ($\sim 4,7$ раза) был

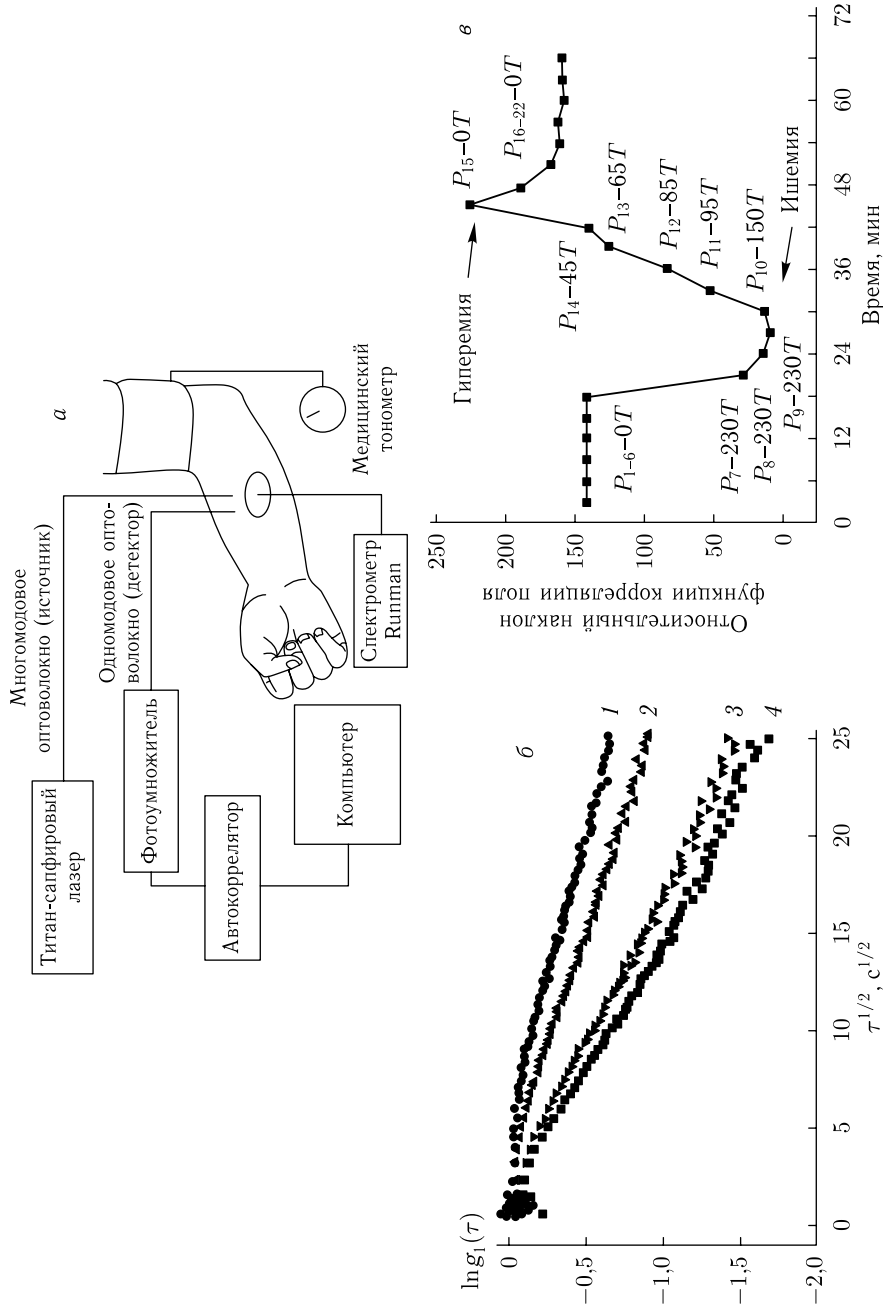


Рис. 13.12. Измерения *in vivo* скорости кровотока при помощи метода ДВС [1964]: *а* — экспериментальная установка; *б* — экспериментальные АФ-флуктуаций поля при рассеянии назад для различных давлений, приложенных к руке (давление увеличивается от 1 к 4); *в* — кинетика относительного наклона АФ для различных давлений, приложенных к руке, *P* — давление тонометра. Стрелки показывают моменты времени, соответствующие сужению (ишемии) и расширению (гиперемии) сосудов

существенно ниже, чем соответствующий примерно семикратный рост потребления кислорода в мышцах. У больного при нагрузке величина обоих физиологических параметров была примерно вдвое ниже, чем в здоровой контрольной группе, а время восстановления насыщения кислородом — в два раза больше.

В работе [1495] эта же гибридная система БИКС/ДВС использовалась в клинических исследованиях новорожденных с врожденным пороком сердца ($n = 33$) в условиях гиперкапнии (избыточного накопления углекислого газа в дыхательной и сердечно-сосудистой системах). В этих исследованиях одновременно измерялись концентрации оксигемоглобина, дезоксигемоглобина и полного гемоглобина (БИКС); скорость церебрального кровотока (ДВС) и на основании простой модели рассчитывалась скорость метаболизма кислорода. Одновременные измерения с помощью спин-меченной магнитно-резонансной артериальной визуализации показали хорошую корреляцию ($R = 0,7$, $p = 0,01$) с ДВС измерениями скорости микроциркуляции. Исследования показали, что оптические технологии имеют значительные перспективы для клинического мониторинга новорожденных с таким заболеванием.

13.3. Визуализация кровотока

Нетрудно показать, что методы доплеровской флоуметрии, интенсивно развивающиеся в течение последних нескольких десятилетий, вообще говоря, идентичны сравнительно новым спекл-методам (которые были предложены в 1980-е годы) в приложении к анализу параметров микроциркуляции крови, поскольку оба эти подхода обеспечивают возможность определять скорость кровотока в некоторой точке [82]. Описание и анализ доплеровских методов мониторинга микроциркуляции крови в тканях содержится в обзорных работах [5, 22, 101, 112, 205, 672, 1434, 1435, 1439, 1442–1445, 1460, 1463, 1464, 1483, 1967–1969] и ряде оригинальных работ [67, 1461, 1462, 1490, 1491, 1970–1978]. Заметим, что распространение доплеровского метода на исследования микроциркуляции крови в объемных тканях стимулировало развитие теории доплеровских сигналов и методов их моделирования и обнаружения в многократно рассеивающих средах (см. например [344, 1561, 1974–1977]). Спекл-методы исследования микроциркуляции крови описаны в многочисленных работах [3, 5, 76, 82, 83, 112, 1424, 1435, 1437–1445, 1451–1459, 1473–1480, 1484–1488, 1777, 1860–1862, 1951, 1952, 1973, 1979–2019].

Диагностика многих заболеваний, связанных с расстройством микроциркуляции крови, требует мониторинга микроциркуляции в больших объемах ткани, т. е. визуализации поля скоростей кровотока. Поскольку изучаемые методы характеризуются высокой пространственной локальностью, требуется механическое сканирование или последовательный анализ флуктуаций интенсивности в пределах одного пикселя ПЗС-камеры, либо и то, и другое одновременно. Такие сканирующие системы для визуализации кровотока были реализованы, и их разработка доведена до стадии промышленного производства [1481, 1482]. Одна из таких систем показана на рис. 13.13 [1482]. Система для визуализации микроциркуляции может быть полезной для диагностики и сопровождения терапии в случаях, связанных с заболеваниями периферической сосудистой системы, а также при лечении ран и ожогов. Однако на первоначальном этапе развития технологии необходимость либо механического сканирования, либо сбора и обработки больших массивов данных в системах с ПЗС-камерами помешала разработчикам создать простые и высокоэффективные системы получения изображений. Вероятно, единственным исключением является спекл-система, созданная на основе 100×100 -пиксельного матричного фотоприемника, который был специально спроектирован для анализа ретинального кровотока.

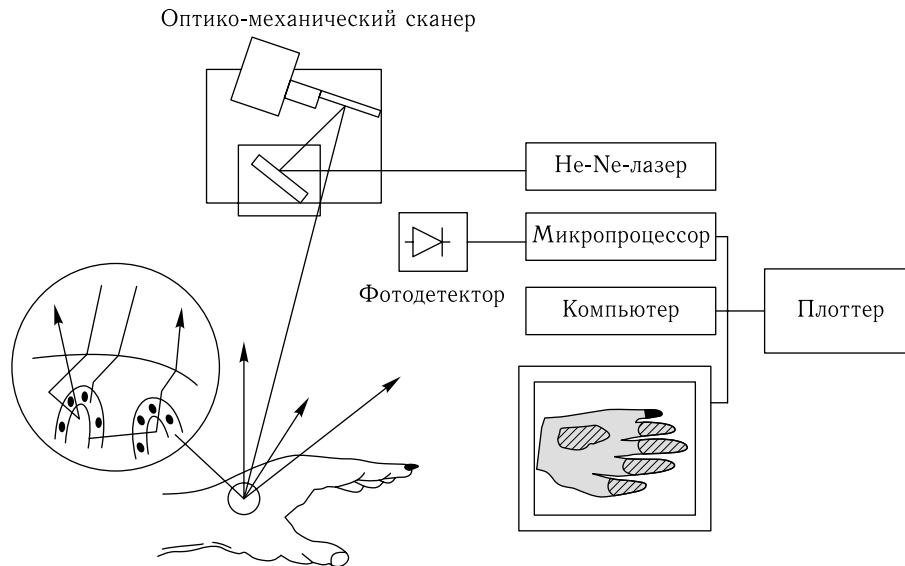


Рис. 13.13. Схема сканирующей доплеровской системы для визуализации микроциркуляции крови в биотканях [1482]

Полное время анализа данных у этой системы при поле зрения $0,42 \times 0,42$ -мм было равно 15 с [1480].

Потенциальную возможность построить надежный прибор для визуализации кровотока в биоткани с многократным рассеянием открывает метод, основанный на зондировании ткани сфокусированным лазерным пучком и регистрации пространственной кросс-корреляции рассеянного поля с применением ПЗС-камеры [1981]. Концепция метода основана на том, что область однократного рассеяния внутри ткани (в объеме засветки сфокусированным лазерным пучком) будет давать коррелированные области (спеклы) с большими поперечными размерами, в то время как сравнительно большое гало многократно рассеянных фотонов от этого пучка будет порождать мелкомасштабные спеклы. Таким образом, кросс-корреляционная функция флуктуаций интенсивности в двух пространственных точках (пикселях ПЗС-камеры), разделенных расстоянием Δx , большим, чем размеры спеклов от многократного рассеяния, будет отражать форму АФ для однократного рассеяния. Профиль АФ для однократного рассеяния даст информацию о потоке крови или лимфы в объеме засветки сфокусированным лазерным пучком. Привлекательность этого подхода определяется его применимостью к промежуточным режимам рассеяния, в то время как КРС обеспечивает точную информацию только для режима однократного рассеяния, а ДВС можно применять только в случае диффузного распространения фотонов.

Типичный подход к оптимизации работы устройств для визуализации кровотока, в частности к увеличению скорости получения изображений, состоит в параллельном измерении с использованием одномерных линеек или двумерных матриц фотоприемников. Новое поколение высокоскоростных приборов для полнополевой лазерной доплеровской визуализации (ЛДВ) кровотока было недавно разработано на основе датчиков изображения на комплементарных металлооксидных полупроводниках (CMOS) [1490, 1491, 1978]. Система ЛДВ, в которой используется датчик изображения на CMOS-камере, выдает изображение кровотока с высоким разрешением каждые

0,7–11 с, в зависимости от числа временных точек в каждом пикселе (32–512 точек) и разрешения изображения (256×256 или 512×512 пикселей). Для интегрирующей системы получения изображения была использована цифровая CMOS-камера на основе VCA1281 монохромного CMOS-сенсора изображения (Symagegy, Канада). Этот сенсор работает в режиме подвижной шторки; он имеет разрешение 280×1024 пикселей (по вертикали и горизонтали, соответственно), размер пикселя 7×7 мкм², скорость выборки 40 МГц и 8-битный АЦП. Сенсор имеет спектрально-равномерный отклик в диапазоне от 500 до 750 нм. Камера соединена с управляющим персональным компьютером через быстродействующий интерфейс LVDS¹⁾, обеспечивающий высокоскоростную передачу получаемых кадров.

Для освещения объекта использовался твердотельный лазер с диодной накачкой с выходной оптической мощностью 250 мВт, излучающий на длине волны 671 нм. Лазерный пучок направлялся в пластиковое оптоволокно диаметром 1,5 мм. GRIN-линза (линза с градиентом показателя преломления) диаметром 1,8 мм размещалась на дистальном конце пластикового оптоволокна. Такая конфигурация обеспечивала равномерное освещение объекта. Освещаемая область имела диаметр 170 мм. Рассеянный назад свет собирался объективом ($f = 6$ мм) с малой эффективной фокальной длиной ($f/D \equiv 1/(2NA) = 1,2$, где D — диаметр входящего зрачка), обеспечивая высокую эффективность сбора фотонов, что критично для малых времен интегрирования (в пределах нескольких десятков миллисекунд). Обычно головка формирователя изображений располагалась на расстоянии 150–250 мм от поверхности исследуемой биоткани (см. рис. 13.14).

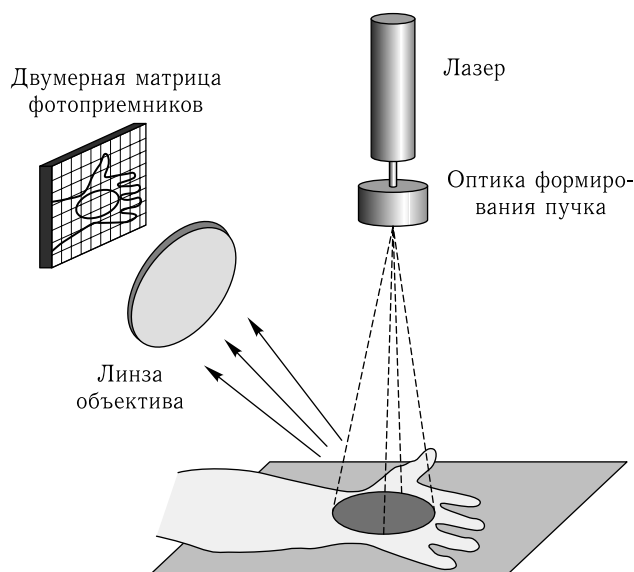


Рис. 13.14. Схема высокоскоростной полнополевой лазерной доплеровской системы визуализации на основе датчика изображений на комплементарных металлооксидных полупроводниках (CMOS) [1978]

¹⁾ LVDS — low-voltage differential signaling — низковольтный дифференциальный преобразователь.

Специально разработанное программное обеспечение предусматривает изменение параметров датчика, управление режимом сбора данных, накопление данных и демонстрацию карт кровотока (перфузии, концентрации, скорости). Фотографическое изображение образца и карты кровотока на мониторе компьютера получаются одним и тем же датчиком изображений, поэтому карты кровотока легко привязываются к исследуемому участку образца. Частота дискретизации сигнала обратно пропорциональна времени получения одного субкадра. Частота субкадров датчика изображений зависит от его размеров и тактовой частоты опроса пикселей. Тактовая частота была фиксирована на частоте 40 МГц для оптимального соотношения скорости и качества. Число пикселей на один субкадр окончательно определяет частоту дискретизации сигнала формирователем изображений. Для субкадра размером 256×4 пикселей частота дискретизации кадра составляла 30 кГц, 256×6 пикселей — 20 кГц, 256×8 пикселей — 14 кГц и т. д.

Для получения одной карты кровотока исследуемого участка, в котором было 256×256 или 512×512 пикселей, этот участок нужно поделить на меньшие области (например, на 32 субкадра по 256×8 пикселей) и сканировать электронным образом. От 32 до 512 измерительных точек получалось при наборе временного сигнала в каждом пикселе субкадра, таким образом временные зависимости флуктуаций интенсивности записывались для каждого пикселя исследуемого участка.

Обработка сигнала подразумевает вычисление нулевого (M_0) и первого (M_1) моментов спектра плотности мощности $S(\nu)$ флуктуаций интенсивности $I(t)$ для каждого пикселя. Нулевой момент связан со средней концентрацией $\langle C \rangle$ движущихся частиц в объеме выборки. Первый момент (плотность потока или перфузия) пропорционален среднеквадратичной скорости движущихся частиц V_{rms} , умноженной на среднюю концентрацию [1990]. Соответствующие выражения имеют вид:

$$\text{Концентрация} = \langle C \rangle \propto M_0 = \int_0^{\infty} S(\nu) d\nu, \quad (13.4)$$

$$\text{Перфузия} = \langle C \rangle V_{\text{rms}} \propto M_1 = \int_0^{\infty} \nu S(\nu) d\nu, \quad (13.5)$$

$$S(\nu) = \left| \int_0^{\infty} I(t) \exp(-i2\pi\nu t) dt \right|^2. \quad (13.6)$$

Здесь переменная ν — частота флуктуаций интенсивности, индуцированных фотонами с доплеровским смещением. Спектр флуктуаций плотности мощности для каждого пикселя в пределах исследуемого участка вычислялся на основе зарегистрированных временных вариаций сигнала с применением оптимизированного для ускоренной работы алгоритма БПФ. Вычитание шума из рассчитанного спектра производилось путем установки порогового значения амплитуды спектральных компонент. Такая фильтрация применялась для снижения вклада в сигнал от белого шума (например, теплового шума и шума считывания данных). После этого вычисляются и выводятся на монитор карты распределения перфузии, концентрации и скорости. Полное время формирования изображения, включая сбор данных, обработку и демонстрацию, зависит от числа отсчетов на каждом пикселе и размера исследуемого участка. Для участка размером 256×256 пикселей время формирования изображения составляло 0,9 с для 64 отсчетов, 1,2 с для 128 отсчетов, 1,7 с для 256 отсчетов и 2,9 с для 512 отсчетов.

На рис. 13.15 показаны карты кровотока, полученные на коже пальца здорового человека. Изображения получены при установках формирователя изображений на ширину полосы от постоянного сигнала до 4000 Гц с разрешением 66 Гц, время интегрирования составляло 130 мкс. Полное время формирования изображения было равно примерно 5 с. К строковым изображениям применялась сглаживающая фильтрация: значение каждого показанного пикселя было получено путем усреднения строковых значений 8 соседних пикселей. Карты кровотока (перфузия, концентрация, скорость) имели 9-цветное цветовое кодирование (не представлено). Изображения ясно показывают разницу в распределениях скоростей и концентраций, измеренных на пальцах. Меньшее значение сигнала концентрации, измеренное на ногте, обусловлено большим количеством фотонов без доплеровского сдвига, переизлученных сравнительно толстой и статически рассеивающей тканью ногтя по сравнению с тонким статически рассеивающим эпидермисом кожи. Сигнал, измеренный на ногте, указывает на более высокую скорость движущихся клеток крови в подноготной ткани. Однако невозможно определенно предсказать, происходит ли это от действительно большей скорости крови под ногтем или от влияния многократного рассеяния (см. АФ, представленную на рис. 13.27). Эта неоднозначность является общей проблемой всех лазерных доплеровских или использующих спеклы измерительных систем и требует для ее преодоления либо предварительной калибровки на фантомах, либо сложных алгоритмов обработки данных на основе адекватных моделей биологических тканей с учетом микроциркуляции крови. Черно-белое фотографическое изображение исследуемой области получается при помощи той же CMOS-камеры. Это изображение помогает определить анатомические границы, соответствующие областям перфузии на картах кровотока.

Время формирования изображения у рассмотренной высокоскоростной системы лазерной доплеровской визуализации (ЛДВ) приближается к аналогичному показателю систем лазерной спекл-визуализации (ЛСВ) [82, 83, 112, 145, 1439, 1484–1488, 1982–2019], которые в настоящее время считаются самыми быстродействующими [1985]. В системах ЛСВ информация о кровотоке получается путем измерения контраста спеклов изображения (см. разд. 8.4.3). Практически значения контраста, измеряемые в ЛСВ, прямо пропорциональны нормированному значению M_0 , которое измеряется в лазерных доплеровских системах с интегрирующими фотоприемниками. Изображения, показанные на рис. 13.15, демонстрируют различие между картами перфузии (M_1) и концентрации (M_0). Кажется, что метод ЛДВ дает более объективную информацию, чем ЛСВ, поскольку в методе ЛДВ сигналы концентрации и скорости можно измерить независимо. В ЛСВ эти два сигнала, как правило, смешаны, и поэтому, может быть, трудно приписать точную причину изменениям контраста [1989]. Однако была обнаружена хорошая корреляция ($R^2 = 0,98$) между ЛДВ- и ЛСВ-измерениями одной и той же области местного церебрального кровотока (ЦК) у различных животных (самцы крыс Wistar) [1982]. Детальное сравнение лазерного доплеровского и спекл-контрастного методов визуализации кровотока можно найти в работе [1984]. Из этого анализа следует, что спекл-контрастный метод, как и ЛДВ, может давать изображение сосудистой структуры биоткани с относительным распределением скорости кровотока (соответственно нелинейному отклику, описываемому формулой (8.34)), но он не позволяет произвести измерение перфузии в линейном режиме, как это характерно для ЛДВ.

Тем не менее, спекл-контрастный метод (LASCA), основы которого обсуждались в разд. 8.4.3, является концептуально простым высокоэффективным методом визуализации кровотока [82, 83, 112, 1424, 1435, 1437–1439, 1484–1488, 1979–2019]. В измерительной системе используется ПЗС-камера, плата захвата изображения и специальное программное обеспечение для вычисления локального контраста



Рис. 13.15. Карты параметров кровотока, полученные с помощью CMOS интегрированного визуализатора на коже пальцев (участок размером 512×512 пикселей): изображение объекта (изображение интенсивности); карта перфузии (наименьшая перфузия равна 200 о.е., наибольшая — 700 о.е.); карта распределения концентрации крови (наименьшая концентрация равна 140 о.е., наибольшая — 310 о.е.); карта скорости потока (наименьшая скорость потока равна 400 о.е., наибольшая — 1500 о.е.). Отображаемая область $11 \times 11 \text{ см}^2$. Полное время получения изображения 5 с; о.е. — относительные единицы [1978]

спекл-структуры и преобразования контраста в цветную карту (которая отображает распределение скоростей потока). Это результирующее изображение представляет контраст спекл-поля, усредненный по времени. Однако такое усреднение производится достаточно быстро (время усреднения обычно равно 5–30 мс), что позволяет производить измерения в реальном времени.

Формула (8.34) выражает контраст спеклов в усредненной по времени спекл-структуре как функцию времени экспозиции T и времени корреляции

$$\tau_c = \frac{1}{ak_0v}, \quad (13.7)$$

где v — средняя скорость рассеивающих частиц, k_0 — волновое число света, а a — фактор, зависящий от лоренцевой полуширины и рассеивающих свойств биоткани [1990]. Как и в ЛДВ, здесь теоретически возможно связать времена корреляции τ_c с абсолютными скоростями эритроцитов, однако на практике это сложно, поскольку число движущихся частиц, с которыми взаимодействует свет, и их ориентации неизвестны [1990]. Однако можно получить пространственные и временные распределения для относительной скорости из измерения отношения $2T/\tau_c$, которое пропорционально скорости и определяется как измеряемая относительная скорость [1439, 1486, 1487].

Схема экспериментальной установки показана на рис. 8.14. Пучок света от He-Не-лазера ($\lambda = 633 \text{ нм}$, 3 мВт) через оптоволоконный жгут толщиной 8 мм равномерно освещал исследуемую область [1439, 1486, 1487]. Изображение этой области

проецировалось с помощью стереомикроскопа с переменным фокусным расстоянием объектива (SZ6045TR, Olympus, Япония) на ПЗС-камеру (PIXELFLY, PCO Computer Optics, Германия) с 480×640 пикселями, которая давала изображение от 0,8 мм до 7 мм в зависимости от увеличения. Время экспозиции ПЗС-камеры T было равно 20 мс. Изображения получались с помощью легко управляемого программного обеспечения (PCO Computer Optics, Германия) на 40 Гц.

Исходные изображения спеклов использовались для вычисления спекл-контрастного изображения. Число пикселей, используемых для вычисления локального контраста спеклов, может выбираться пользователем: меньшие числа снижают достоверность статистики, большие — ограничивают пространственное разрешение метода. Чтобы гарантировать должное качество оцифровки спекл-картины, размер отдельного спекла должен быть примерно равен размеру отдельного пикселя и определяется дифракционной шириной пятна, равной $2,44\lambda f/D$, где λ — длина волны, а f/D — относительная апертура системы. В данной системе размер пикселя был равен 9,9 мкм. При единичном увеличении требуемое отношение $f/D = 6,4$ на длине волны 633 нм. Согласно теоретическим исследованиям, использовались квадраты 5×5 пикселей [83]. Компьютерная программа вычисляла контраст спеклов для каждого данного квадрата 5×5 пикселей и приписывала это значение контраста центральному пикселю квадрата. Этот процесс повторялся для получения полной карты спекл-контраста. Для каждого пикселя карты спекл-контраста по формуле (8.34), связывающей время корреляции и скорость, вычислялось значение скорости ($2T/\tau_c$) и таким образом формировалась карта распределения скоростей.

Для вычисления относительных скоростей потока крови в исследуемых сосудах вначале для исследуемого участка устанавливался порог по измеренному изображению скоростей, а затем представляющие интерес сосуды идентифицировались по пикселям, значения которых были выше порога. Средние значения измеряемой скорости в этих пикселях вычислялись в каждой временной точке. Относительная скорость в представляющих интерес сосудах выражалась как отношение измеренной скорости в условиях стимуляции к ее значению в контрольных условиях.

Лазерная спекл-визуализация (ЛСВ) представляет собой неинвазивный полнополевой метод оптической визуализации с высоким пространственным и временным разрешением, который удобен для измерения динамики церебрального кровотока (ЦК). В частности, в работе [1439] метод ЛСВ был использован для мониторинга динамики ЦК у нескольких модельных животных в процессе стимуляции седалищного нерва, которая производилась аналогично тому, как это обычно делается при физиологических исследованиях. Мониторинг кровотока производился в соматосенсорной коре у 16 крыс при электрической стимуляции седалищного нерва. Были найдены распределения активированного кровотока для сосудов (артерий/вен) разного калибра и обнаружено изменение активированных областей. Пример полученных результатов показан на рис. 13.16, на котором более яркие места соответствуют областям повышенного кровотока. Для сравнения с ЛДВ оценка средней скорости потока (рис. 13.17) производилась в выбранной области исследований в 1 мм^2 , показанного на рис. 13.16 *a*: возбуждаемый ЦК начинал расти ($0,7 \pm 0,1$) с, достигал максимума при ($3,1 \pm 0,2$) с и затем возвращался к исходному уровню. Это согласуется с выводами, полученными методом ЛДВ [1993, 1994]. Для того, чтобы дифференцировать картину отклика артерий и вен при одинаковой стимуляции, на рис. 13.16 *a* отмечено 6 сосудов разного калибра, в которых показано изменение скорости кровотока. Результаты ясно показали, что картина отклика артерий и вен в соматосенсорной коре совершенно различна: вена 1 (V-1, ~ 140 мкм в диаметре) почти не изменилась, артериола 1 (A-1, ~ 35 мкм в диаметре) реагировала медленно; в артериоле 2 (A-2, ~ 35 мкм в диаметре) наблюдался пик на $3,5 \pm 0,5$ с после начала

стимуляции, а затем достигалось стационарное плато, а у вены 2 (V-2, ~ 70 мкм в диаметре) после задержки наблюдался умеренный отклик; усиление кровотока в капиллярах (A-3 и V-3, ~ 10 мкм в диаметре) происходило быстро и имело значительную величину. Были измерены также изменения в артериях и венах различного диаметра [1439]. Картина активации церебрального кровотока была дискретной по своему пространственному распределению и сильно локализованной в возбуждаемой коре при эволюции во времени. Это согласуется с гипотезой Роя и Шеррингтона [1992–1994].

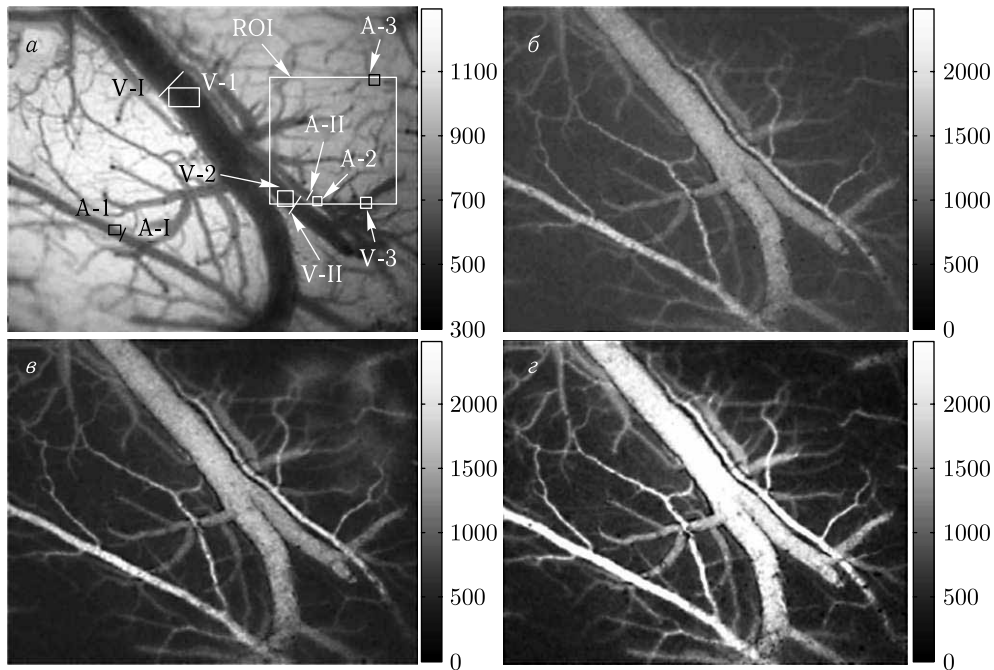


Рис. 13.16. Изменение скорости кровотока в контралатеральной соматосенсорной коре головного мозга крыс при односторонней стимуляции седалищного нерва [1992]: *а* — топография сосудов при освещении зеленым светом (540 ± 20 нм); *б* — карта скорости кровотока перед стимуляцией; *в* — через 1 с и *г* — через 3 с после начала стимуляции. Изображения относительной скорости кровотока, на которых более яркие места соответствуют областям повышенного кровотока, преобразованы из спекл-контрастных изображений; выделенные области A-1, A-2, A-3 и V-1, V-2, V-3 представляют собой участки наибольшего интереса (ROI) для мониторинга изменений скорости кровотока. Выделенные области A-I, A-II и V-I, V-II представляют местоположения сосудов, диаметры которых измеряются в эксперименте

Влияние эпидурально применяемого глицерина, обладающего гиперосмотичностью, на ЦК *in vivo* кролика в покое также исследовалось с использованием метода ЛСВ (см. разд. 9.7.1) [1439]. При трепанации черепа обнажалась интактная твердая мозговая оболочка *dura mater*. Для изучения влияния глицерина на ЦК *in vivo* удаляли небольшой участок *dura mater*. Теплый обезвоженный глицерин наносился вблизи открытого участка. Изображения скоростей ЦК под действием глицерина показаны на рис. 9.45. По мере диффузии глицерина в ткань мозга его воздействие на ЦК меняется. На рис. 9.46 показан временной ход изменений в четырех различных сосудах.

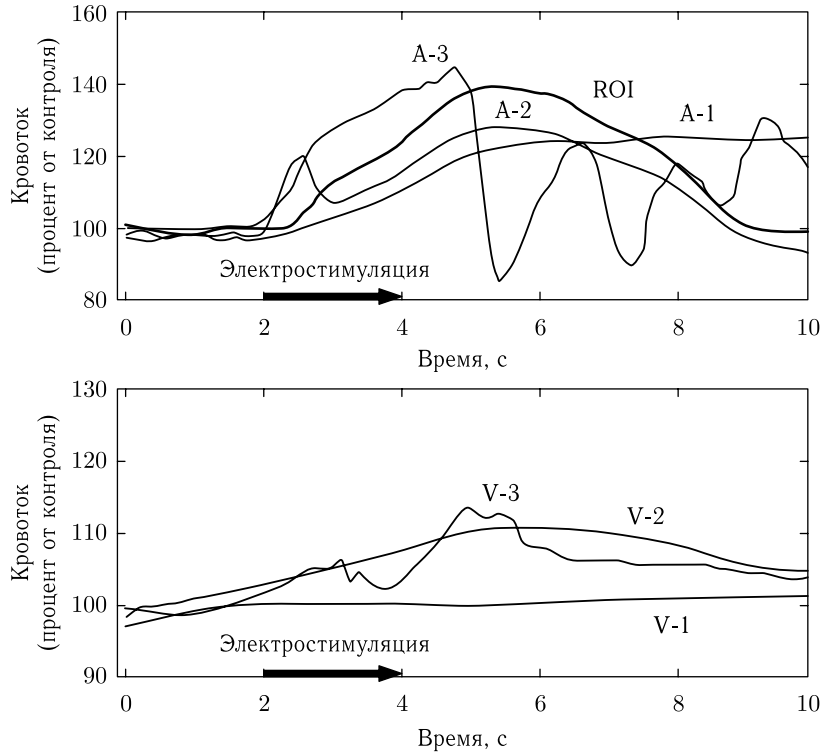


Рис. 13.17. Относительные (нормированные на соответствующие значения перед стимуляцией) изменения скорости мозгового кровотока в 6 областях, отмеченных на рис. 13.16а, при стимуляции седалищного нерва крысы [1992]

Как было описано выше, ЛСВ основана на пространственной статистике первого порядка спеклов, проинтегрированных по времени. Основной недостаток метода LASCA — потеря разрешения, обусловленная необходимостью усреднения по блоку пикселей, чтобы получить пространственную статистику, используемую в анализе, хотя на самом деле он имеет более высокое разрешение, чем другие методы, такие как сканирующий лазерный доплеровский метод. В связи с этим был предложен модифицированный метод ЛСВ, использующий временную статистику спеклов, проинтегрированных по времени [1997]. В этом методе каждый пиксель в спекл-изображении может рассматриваться как одна точка. Тогда обработка сигнала состоит в вычислении временной статистики интенсивности каждого пикселя изображения:

$$N_{i,j} = \frac{\langle I_{i,j,t}^2 \rangle_t - \langle I_{i,j,t} \rangle_t^2}{\langle I_{i,j,t} \rangle_t^2}, \quad (13.8)$$

$$i = 1-480, \quad j = 1-640, \quad t = 1-m,$$

где $I_{i,j,t}$ — мгновенная интенсивность i -го и j -го пикселей в кадре с номером t исходной спекл-картины, а $\langle I_{i,j,t} \rangle_t$ — средняя интенсивность i -го и j -го пикселей по последовательности m кадров. Величина $N_{i,j}$ обратно пропорциональна скорости рассеивающих частиц. Значение $N_{i,j}$ каждого пикселя в m следующих друг за другом кадрах ($I_{i,j,t}$) необработанной спекл-картины вычисляется по формуле (13.8). Затем процесс повторяется для следующей группы m кадров. Результаты представ-

ляются в виде двумерной карты в серой шкале (65536 уровней яркости) или условно-цветовой шкале (65536 цветов), которая описывает пространственные вариации распределения скоростей в исследуемой области.

Предложен также другой подход к усовершенствованию метода LASCA, в частности к снижению шумов, основанный на активной схеме усреднения спеклов, которая гарантирует хорошее усреднение по ансамблю [1984, 1987]. Указанные подходы могут включать различные методы генерирования спекл-изображений при сокращенном времени обработки, такие как использование вторичных низкокогерентных источников света (освещение рассеянным пучком лазера, пропущенным через вращающийся рассеиватель) или вибрационные методы.

Приведем несколько примеров применения метода ЛСВ в эксперименте и клинических исследованиях. Он был успешно использован для получения динамических изображений регионального кровотока в брыжейке крыс под влиянием норадреналина [1998], количественной оценки пространственно-временного отклика церебрального кровотока [1981, 1992–1994, 1999, 2000, 2003–2005, 2009, 2014], в том числе при функциональной активации соматосенсорной коры головного мозга крыс [1981, 1999, 2003] и острой гипергликемии [2000], а также для исследования метаболизма кислорода при церебральной ишемии [1981, 2004, 2005]. Ряд работ посвящен визуализации кровотока на сетчатке [2008, 2009].

Метод используется для визуализации кровотока в режиме реального времени при обеспечении обратной связи во время лазерной терапии родимых (портвейновых) пятен [2002], мониторинга лазерной коагуляции кровеносных сосудов [2015, 2016], а также для характеристики статуса сосудистой сети опухоли [2017] или визуализации лимфатических сосудов [2019]. Часто спекл-метод, как один из каналов получения информации об объекте, входит в мультимодальные диагностические или терапевтические системы [2002, 2006, 2015–2018].

Разрабатываются новые более совершенные подходы для мониторинга скорости микроциркуляции [2009]. Быстрая визуализация кровотока с высоким пространственным разрешением получаемых изображений возможна при анализе данных с использованием графических процессоров [2010, 2013]. Описана портативная лазерная система, основанная на цифровом процессоре для обработки сигнала при получении спекл-изображений перфузии крови [2011]. Разработана система для регистрации лазерных спекл-изображений в режиме реального времени на основе специального процессора и сконструированная в виде чипа [2012].

13.4. Интерферометрические и спекл-интерферометрические методы измерения биовибраций

К настоящему времени предложено большое число оптических методов для мониторинга биовибраций. Например, для мониторинга сердцебиения у пациентов во время исследования на магнитно-резонансном томографе успешно применялся волоконно-оптический сенсор на основе одномодового x -делителя [2020]. Бесконтактные биовиброметры со сверхвысокой чувствительностью на основе гетеродинных лазерных интерферометров с высокой степенью автоматизации и хорошо развитым математическим обеспечением детально описаны Ханна и др. [2021, 2022]. Их исследования были посвящены измерению колебаний различных компонентов внутреннего уха животных. Конфокальная схема гетеродинного интерференционного микроскопа, использованного в этих исследованиях, позволяла изучать колебания различных слоев биоткани. Этот подход обеспечивал рекордную чувствительность по отношению к малым смещениям объектов с низкой отражательной способностью

(порядка 10^{-4} – 10^{-5}). Чувствительность, достигнутая в этих экспериментах, в диапазоне частот колебаний от 50 до 2000 Гц составляла 10^{-11} м. Концептуально аналогичная, но намного более простая лазерная система для исследования биокосильаний была описана в работе [1214]. Эта система, где также используется гетеродинный интерферометр, известна как лазерный доплеровский виброметр. Данный прибор, работающий в диапазоне частот до 10 кГц, использовался для мониторинга спектров колебаний барабанной перепонки при различных расстройствах внутреннего уха. Голографический анализ колебаний барабанной перепонки также описан в литературе (см., например, работу [2024]). Оптическая система для дистанционного мониторинга сердечных биений представлена в работе [1489]. Оптический интерферометр с 633-нм He:Ne-лазером использовался для регистрации микронных смещений (чувствительность 366,2 мкм/с) поверхности кожи [2025]. Измеренная скорость движения кожи связана с временной производной давления крови. Профили скорости движения кожи вблизи каждой поверхностной артерии и точки аускультации на грудной клетке позволяли различить звук, производимый двумя разными клапанами сердца. Разработанный оптический кардиоваскулярный виброметр имеет потенциальную возможность стать простым неинвазивным средством сердечно-сосудистого скрининга.

Лазерный доплеровский метод, основанный на эффекте самосмещения в диодном лазере [1462, 1463], был использован для сердечно-сосудистых пульсовых измерений в области радиальной артерии запястья [2026, 2027]. Разработанный интерферометр самосмещения использовался для измерения смещений кожи, индуцированных пульсовой волной. Реконструированные доплеровские спектрограммы отслеживали первую производную пульсирующего давления крови, как при нормальных, так и при аномальных состояниях пульса. Коэффициент корреляции между формами доплеровских спектрограмм и первой производной кровяного давления для десяти исследованных добровольцев (738 сердечно-сосудистых пульсограмм) был найден равным 0,95 со стандартным отклонением 0,05. Лазерный интерферометр самосмещения использовался также для регистрации барорефлекторного эффекта и измерения модуля упругости артериальной стенки.

Взаимодействие лазерного излучения с биотканями приводит к формированию спекл-структур. Интерференция между спекл-модулированным (отраженным от биоткани) и опорным полями имеет свои особенности, которые нужно обязательно учитывать или даже использовать при проектировании биовиброметров [76, 1448, 2028–2031] (см. гл. 8). Разработка когерентных оптических бесконтактных биовиброметров для целей медицинской диагностики тесно связана с решением проблемы дифракции лазерных пучков, распространяющихся через нестационарные случайно-неоднородные среды [76]. Для медицинских приложений было разработано несколько спекл-методов [76, 1448, 2028–2031]. Например, в работе [2030] описан диагностический зонд, представляющий собой миниатюрную спекл-электронную интерференционную систему, включающую оптоволоконный спекл-интерферометр и матричный фотоприемник. Последовательный покадровый анализ распределения электронных спеклов позволяет получать изображения колебаний в трех измерениях с высоким качеством. Зонд был спроектирован для количественного анализа колебаний барабанной перепонки и голосовых связок.

Возможность применения спекл-интерферометра Майкельсона для исследований кардиоколебаний и обнаружения пульсовых волн была обоснована в работах [1448, 2028, 2029]. Здесь мы кратко рассмотрим основные результаты этих исследований и представим некоторые результаты по обнаружению пульсовых волн с использованием спекл-методики, основанной на дифракции сфокусированных лазерных пучков. Медицинская диагностика требует построения простых и устойчивых к шумам

оптических систем. Гомодинный спекл-интерферометр, показанный на рис. 13.18, вполне удовлетворяет этим требованиям. Выходной сигнал этого интерферометра достигает своего максимума, когда спекл-поля согласованы (см. разд. 8.2). Для сфокусированных лазерных пучков такое согласование может быть легко достигнуто выравниванием плеч интерферометра. Спекл-виброметр может работать в двух режимах: со сравнительно большой амплитудой колебаний ($l_0 > \lambda/4$, режим счета полос) и с малыми амплитудами колебаний ($l_0 < \lambda/4$, когда случайная амплитуда выходного сигнала демонстрирует дополнительную зависимость от начальной фазы). Если число спеклов внутри приемной апертуры удовлетворяет условию $N_{sp} > 4$, то выходной сигнал интерферометра описывается гауссовой статистикой первого порядка, т. е. комплексная амплитуда этого сигнала характеризуется распределением Рэля [1448]. Соответствующие экспериментальные и теоретические зависимости для средней амплитуды $\langle U \rangle$ и дисперсии σ_U^2 выходного сигнала от числа спеклов в пределах апертуры фотоприемника позволяют оптимизировать отношение сигнал-шум в гомодинных интерферометрах (см. рис. 13.19). Можно показать, что в случае колебаний большой амплитуды

$$\langle U \rangle \approx d_{av}^2 (N_{sp})^{0.5}, \quad \sigma_U^2 \approx N_{sp}, \quad (13.9)$$

где d_{av} — средний поперечный размер спекла, а $N_{sp} = (2R_a/d_{av})^2$ для круговой апертуры диаметра $2R_a$. При записи формулы (13.9) было предположено, что изменения размеров спеклов не меняют интенсивности интерферирующих пучков.

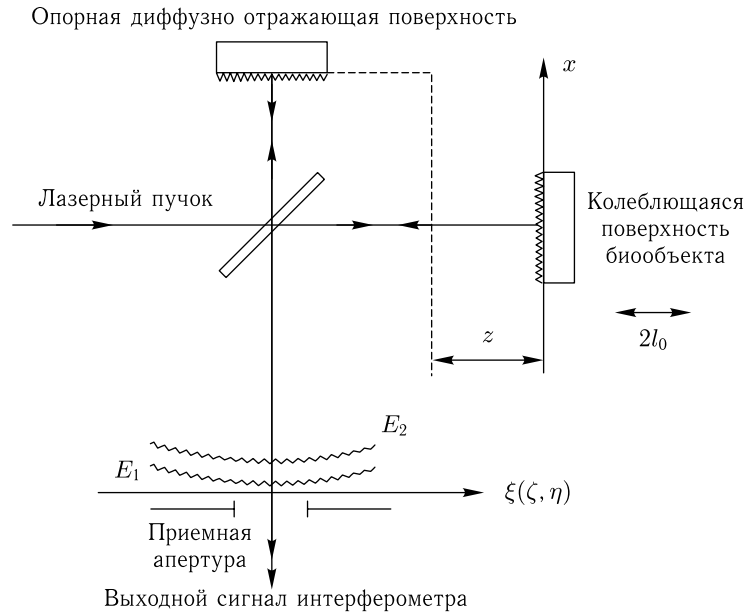


Рис. 13.18. Схема гомодинного спекл-интерферометра для исследования биовибраций [1448]

Таким образом, для увеличения амплитуды выходного сигнала спекл-интерферометра нужно выбирать схемы, гарантирующие обнаружение большого числа спеклов с максимальным средним размером, т. е. использовать сфокусированные пучки и фотоприемник с большой апертурой. Заметные продольные смещения биологических мембран (барабанная перепонка, кожа и пр.) обычно сопровождаются поперечными

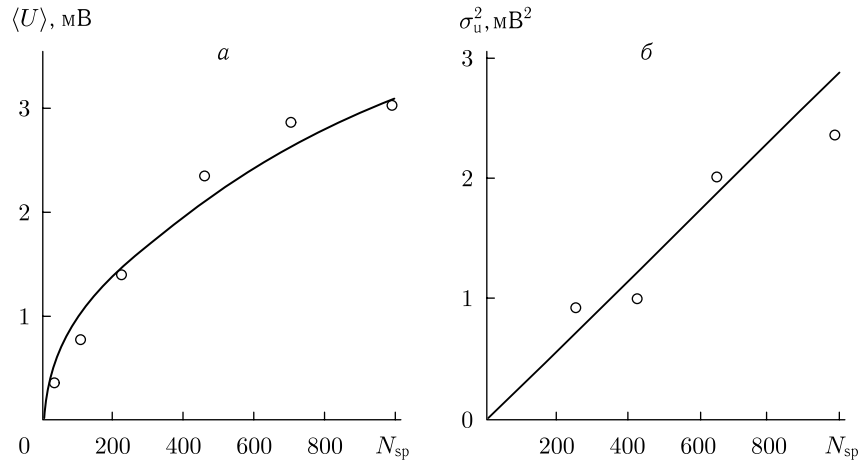


Рис. 13.19. Экспериментальные и теоретические зависимости усредненной амплитуды $\langle U \rangle$ выходного сигнала спекл-интерферометра (а) и его дисперсии σ_u^2 от числа спеклов N_{sp} внутри приемной апертуры (б) (шероховатая поверхность характеризуется значительной амплитудой колебаний, $l_0 \sim \lambda$; размеры спеклов остаются неизменными, а усреднение производится по 300 реализациям опорного спекл-поля) [1448]

и угловыми сдвигами поверхности объекта. Как показано в работе [1448], эти сдвиги порождают низкочастотную модуляцию в выходном сигнале интерферометра. Глубина этой модуляции меняется в широких пределах от 0 до 100% в зависимости от конкретной реализации сигнального и опорного спекл-полей. Поскольку было показано, что такая модуляция обусловлена флуктуациями интенсивности в группе близко расположенных спеклов, можно заметно ослабить паразитную модуляцию путем блокирования соответствующей группы спеклов небольшим непрозрачным экраном.

Для колебаний малой амплитуды выходной сигнал интерферометра имеет существенно иную статистику. Модуль выходного сигнала в этом случае имеет экспоненциальную функцию распределения с наиболее вероятным значением, равным нулю. Однако среднее значение модуля этого сигнала и его дисперсия характеризуются такой же зависимостью от N_{sp} , как и в случае колебаний большой амплитуды [1448] (см. формулу (13.9)).

Учитывая сказанное выше и используя формулы (8.22) и (8.23), можно представить выходной сигнал гомодинного интерферометра в следующем виде:

$$U_i(t) = A_i \sin[\phi_i + A_L H(t)], \quad (13.10)$$

где $H(t)$ — нормированный сигнал с дисперсией, равной единице, который описывает форму колебаний на поверхности биообъекта, A_i и ϕ_i — случайные величины, определяемые условиями регистрации спекл-интерферограмм и выбранной реализацией поверхности объекта с номером i , а A_L — амплитуда колебаний поверхности. Формула (13.10) остается справедливой для дифференциального интерферометра, если величину A_L определить как разность амплитуд колебаний в двух точках. Лазерный дифференциальный спекл-интерферометр с двумя пучками, сфокусированными на поверхность объекта, был успешно использован для обнаружения пульса человека в различных точках поверхности кожи в области запястья [1448]. Как показано в работе [2031], исследование пульсовых волн по анализу фазового портрета вы-

ходного сигнала дифференциального спекл-интерферометра является полезным для кардиодиагностики. Однако для эффективного исключения влияния латеральных сдвигов поверхности кожи, связанных с пульсовой волной, необходимо производить подходящую фильтрацию сигнала.

На основе разработанной спекл-технологии можно спроектировать надежный виброметр для медицинских приложений [2029] (см. рис. 13.20). Однако простота прибора достигается за счет нетривиального описания функции отклика виброметра. Флуктуации интенсивности в рассеянном свете в случае дифракции сфокусированных гауссовых пучков связаны с колебаниями объекта посредством некоторой нелинейной случайной функции. Тем не менее, благодаря регулярным изменениям в спекл-поле (смещению и декорреляции спеклов), вызванным колебаниями рассеивающей поверхности, сигнал на выходе фотоприемника содержит спектральные компоненты, соответствующие колебаниям поверхности. Сложное движение поверхности порождает дополнительные нелинейности в функции отклика. Например, периодическое движение поверхности кожи, обусловленное пульсовой волной, является суперпозицией по крайней мере трех смещений: по нормали к поверхности, по углу и вдоль поверхности. Для измерительной системы, показанной на рис. 13.20, нормальные колебания не вносят вклада в выходной сигнал. Сравнительно малые угловые колебания отвечают за поперечные колебания спеклов в плоскости наблюдения (без декорреляции спеклов), тогда как малые поперечные сдвиги поверхности приводят к частичной декорреляции спекл-поля. Таким образом, временные флуктуации интенсивности рассеянного поля в случае периодических колебаний поверхности тоже содержат периодическую составляющую. В такой ситуации нелинейный случайный оператор, связывающий флуктуации интенсивности со смещением рассеивающей поверхности зависит от размеров освещаемой части поверхности, условий наблюдения спеклов и конкретной реализации исследуемой поверхности. Однако численный анализ дифракции сфокусированного гауссова пучка от движущейся шероховатой поверхности с гауссовой статистикой в рамках приближения Кирхгоффа показывает, что когда амплитуда поперечных смещений меньше, чем длина корреляции поверхности (например, для кожи человека $L_c \sim 60\text{--}80$ мкм), а амплитуда угловых колебаний меньше, чем один градус, статистические и нелинейные свойства сигнала не оказывают заметного влияния на выявление закона движения шероховатой поверхности [2029].

Оптоволоконный сенсор, основанный на этих принципах, показан на рис. 13.20 а. Этот сенсор преобразует колебания кожи, обусловленные пульсовой волной, в соответствующее движение спеклов, которое регистрируется в плоскости наблюдения. Для стандартизации отражательных свойств поверхности и исключения объемного рассеяния в биоткани в приборе используется тонкая резиновая мембрана, которая присоединяется к поверхности кожи таким образом, чтобы не возмущать движений кожной поверхности. Различные тонкие рассеивающие назад пленки, получаемые распылением вещества на поверхность кожи, также можно использовать как стандартные отражатели. Нужно заметить, что этот метод также обеспечивает высокую эффективность в случаях открытой поверхности кожи, поскольку вклад объемного рассеяния в значительной степени подавляется благодаря острой фокусировке излучения на поверхность ткани, а сама поверхность может быть удовлетворительно описана в рамках гауссовой статистики. Рисунок 13.20 б представляет типичные пульсограммы, измеренные с помощью оптоволоконного спекл-виброметра на запястье здорового молодого человека при различных внешних давлениях на поверхность предплечья (как и раньше, для этой цели использовалась наполняемая воздухом манжета медицинского тонометра). Это устройство можно рассматривать как прототип

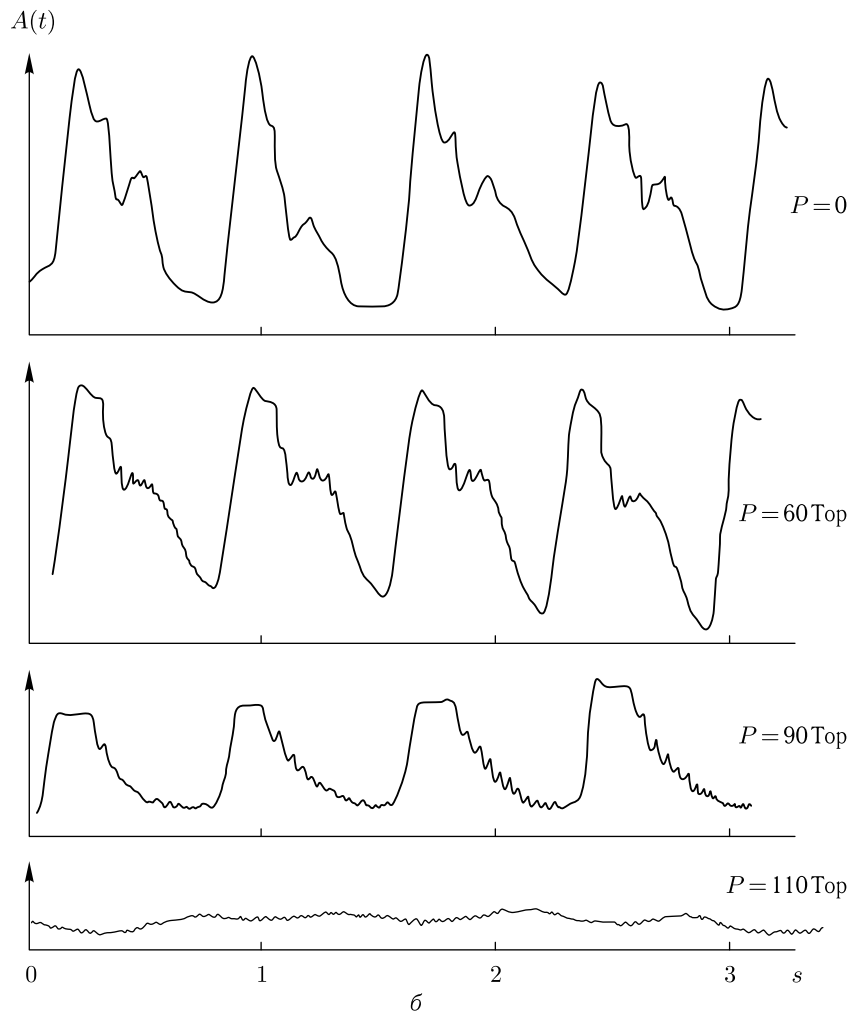
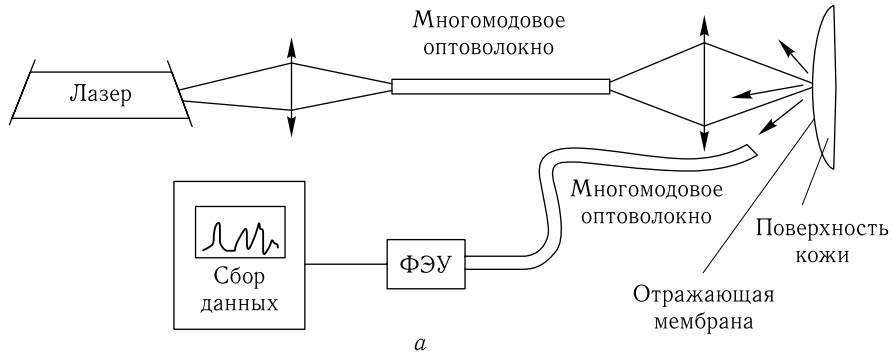


Рис. 13.20. Волоконно-оптический лазерный спекл-виброметр [2029]: *a* — схема прибора; *б* — пульсограммы, зарегистрированные на запястье молодого мужчины (24 года) для различных давлений P в манжете тонометра

компактного, простого и надежного датчика биоколебаний с высоким пространственным разрешением, который может быть собран с помощью диодного лазера и фотодиода, соединенных отрезками многомодовых оптических волокон. Такой датчик будет полезен в кардиологии, для диагностики сосудистых заболеваний и в спортивной медицине (мониторинг самопроизвольных мышечных сокращений и др.).

13.5. Оптическая спекл-топография и томография биотканей

Довольно много внимания было уделено развитию методов оптической спекл-топографии и томографии [76, 135, 136, 138, 139, 221, 472, 555, 607, 608, 761, 792, 1433, 1435–1441, 1444–1447, 1449, 1465–1467, 1973, 1981, 1987, 2032–2048]. Локальный статистический и корреляционный анализ представляется перспективным методом топографического картирования и структурного мониторинга рассеивающих объектов. Локальные оценки корреляционных характеристик (корреляционных или структурных функций, или их параметров, см. формулы (8.20) и (8.21) и рис. 8.5 и 8.6) и нормированные статистические моменты (обычно используются контраст V_I и коэффициент асимметрии Q_a , см. формулы (8.5)–(8.7)) очень чувствительны к структурным параметрам объекта, таким как корреляционная длина L_ϕ и стандартное отклонение σ_ϕ фазовых флуктуаций граничного поля (см. разд. 8.1) в случае дифракции сфокусированных лазерных пучков [76, 155, 555, 1433, 1435, 1437, 1438, 1446, 1447, 2033–2042]. Исследуемый объект можно рассматривать как нерегулярную систему элементарных линз с определенными статистическими характеристиками, которые соответствуют флуктуациям интенсивности, наблюдаемым при сканировании сфокусированного лазерного пучка по поверхности объекта [1447].

Флуктуации интенсивности включают две компоненты (см. рис. 13.21). Первая компонента представляет собой фон со сравнительно малой и плавно меняющейся амплитудой. Вторая компонента представлена нечастыми импульсами высокой интенсивности, связанными с согласованными с неоднородностями (расстояния между плоскостью перетяжки падающего лазерного пучка и объектом и между объектом и фотоприемником согласуются с эффективным фокусным расстоянием неоднородности, что гарантирует эффективное отображение перетяжки лазерного пучка на плоскость наблюдения).

Можно классифицировать неоднородности путем анализа контраста V_I и коэффициента асимметрии Q_a как функций расстояния между плоскостью перетяжки лазерного пучка и поверхностью объекта. Используя этот подход, можно реконструировать статистические распределения флуктуаций показателя преломления среды [77]. Тот факт, что V_I и Q_a резко возрастают, когда отношение радиуса лазерного пучка к длине корреляции удовлетворяет условию $w/L_\phi \sim 1$, является прямым проявлением эффекта микрофокусировки в дальней зоне дифракции [1447, 2038] (см. рис. 13.22 для V_I , $\Delta z = \pm 0,4$ мм). Рост отношения w/L_ϕ ($|z| > 0,4$ мм) сопровождается уменьшением величин V_I и Q_a , которые достигают значений, соответствующих полностью развитым спеклам. Эти эффекты могут происходить в случае слаборассеивающих объектов, таких как тонкие слои биотканей или клеточные монослои, когда $L_c \sim L_\phi \sim d$ (где d — толщина образца), $L_c \gg \lambda$, а стандартное отклонение σ_ϕ , связанное с фазовыми флуктуациями поля, полностью определяется флуктуациями показателя преломления δn .

Многократное рассеяние характерно для оптически толстых слоев тканей. В этом случае пространственное распределение рассеянного света имеет широкий угловой спектр, а эффекты деполяризации играют важную роль. Пространственное распределение корреляционных свойств рассеянного поля, связанное со структурой объекта, можно рассматривать так же, как в диффузионно-волновой спектроскопии

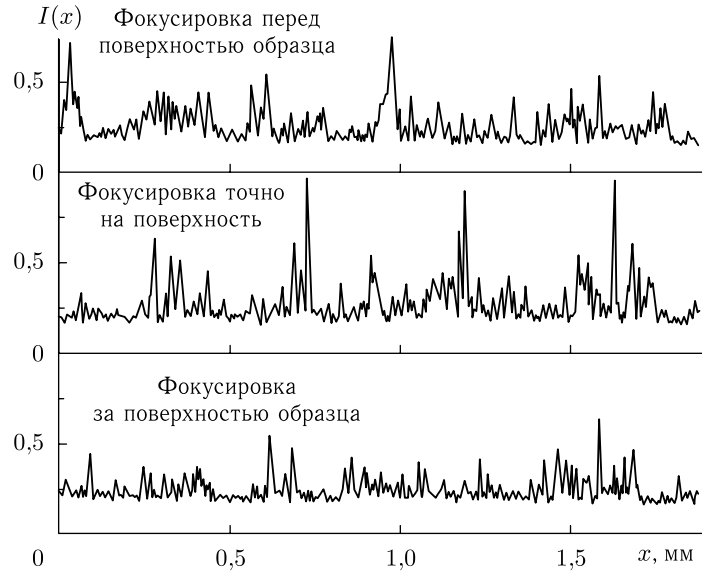


Рис. 13.21. Реализации флуктуаций интенсивности спеклов, полученных с помощью сфокусированного лазерного пучка, сканируемого по образцу эпидермиса (отрыв эпидермиса) кожи человека с псориазом [555]. Верхняя и нижняя реализации были получены с лазерным пучком, сфокусированным перед и за поверхностью образца соответственно. Средняя реализация соответствует точной фокусировке лазерного пучка на поверхность

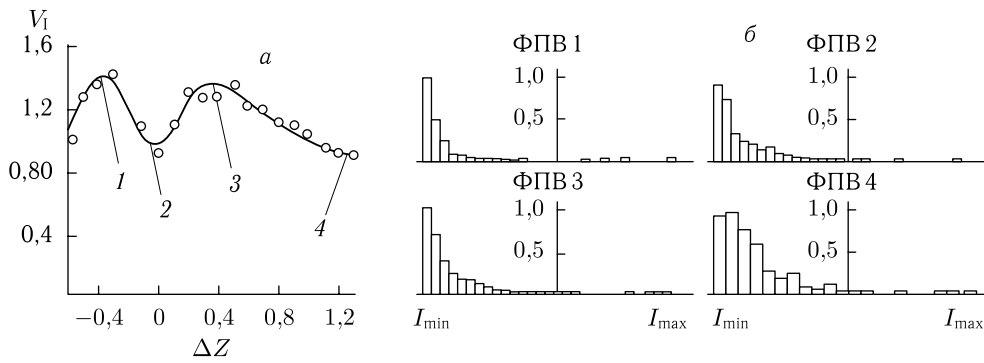


Рис. 13.22. Соответствие между значениями контраста (а) и формой распределения (б) флуктуаций интенсивности спеклов, описываемой функцией плотности вероятности (ФПВ) при изменении положения перетяжки сфокусированного лазерного пучка по отношению к поверхности образца (отрыва эпидермиса кожи человека с псориазом) Δz (мм); $\Delta z = 0$ соответствует случаю, когда перетяжка пучка лежит на поверхности образца [1447]

(см. формулу (8.43)), с учетом того факта, что объект имеет статическую структуру, а лазерный пучок сканируется по поверхности объекта с определенной скоростью (или, наоборот, движется сам объект, а пучок неподвижен). Наряду с выбранным радиусом лазерного пучка и характером оптических неоднородностей среды, скорость сканирования определяет флуктуации рассеянного поля во времени. В такой ситуации нормированная автокорреляционная функция флуктуаций интенсивности в общем случае определяется формулой (8.20) с $\xi \equiv t$ и $\Delta\xi \equiv \tau$. Поведение струк-

турной функции (см. соотношение (8.21)) вблизи нуля аргумента, соответствующего наивысшей чувствительности к высокочастотным пространственным флуктуациям интенсивности, удобно характеризовать экспоненциальным фактором ν_I [1447, 2033]:

$$\nu_I = \frac{\ln[D_I(\Delta\tau_2)/D_I(\Delta\tau_1)]}{\ln(|\Delta\tau_2|/|\Delta\tau_1|)}. \quad (13.11)$$

Для анализа поляризационных свойств спекл-полей можно использовать следующие временные статистические характеристики первого и второго порядка флуктуаций интенсивности рассеянного света в параксиальной области, которые нужно измерять для двух ортогональных линейных поляризаций (относительно поляризации зондирующего пучка) [555]:

1) среднюю интенсивность спеклов,

$$\langle I_{sp} \rangle = \langle I_{\parallel} \rangle + \langle I_{\perp} \rangle; \quad (13.12)$$

2) кросс-корреляционную функцию (коэффициент корреляции) для двух состояний поляризации,

$$r_{\perp\parallel}(\tau) = \langle [I_{\parallel}(t) - \langle I_{\parallel} \rangle] [I_{\perp}(t + \tau) - \langle I_{\perp} \rangle] \rangle, \quad (13.13)$$

где индексы (\perp , \parallel) обозначают комбинации поляризационных состояний, а усреднение проводится вдоль траектории сканирования.

На рис. 13.23 представлена оптическая схема пространственного спекл-коррелометра, предназначенного для топографии или томографии сравнительно тонких образцов биологических тканей. В этом устройстве используется сфокусированный пучок около 5 мкм в диаметре от одномодового унифазного He:Ne-лазера. Структурные картины объекта обычно реконструировались основе данных двумерного сканирования объекта и соответствующего анализа статистических и корреляционных свойств рассеянного света. Шаг сканирования по обеим координатам был 5 мкм. Фотодетектор помещался вдоль направления оси падающего лазерного пучка (рассеиваемого точно в прямом направлении). Диаметр входного отверстия фотоприемника был около 25 мкм, что намного меньше, чем средний диаметр спекла. Максимальная скорость сканирования была около 5 мм/с. Используемая электроника позволяла получать по крайней мере 20 равноотстоящих отсчетов на один шаг сканирования. Объект обычно располагался в перетяжке падающего лазерного пучка. Положение объекта относительно перетяжки пучка и ориентация поляризационного анализатора, смонтированного перед фотоприемником, устанавливались вручную.

Как показано выше, оценка структурных параметров ткани, таких как характерный размер локальных неоднородностей и пространственные флуктуации показателя преломления, обычно требует некоторых предположений, касающихся модели рассеяния. Одна из простейших моделей рассеяния — модель случайного фазового экрана с гауссовой статистикой неоднородностей (см. разд. 8.1) [223, 1425, 1427, 1447, 2039]. Во многих случаях статистические модели живых структур более сложны. В частности, многие модели учитывают многократное рассеяние и лишь некоторые рассматривают возможные нелинейности. Несмотря на нехватку хорошо разработанных моделей структуры многих типов биологических тканей, любая эмпирическая информация, касающаяся статистических свойств рассеянного света тканями, полезна для анализа структурных изображений тканей. Такая информация может быть также полезна для разработки самих структурных моделей.

Кожа человека — один из наиболее естественных объектов для приложения оптической спекл-коррелометрии [76, 1446, 1447, 2033, 2034]. Все структурные специфические особенности поверхности кожи проявляются в статистических и корреляционных свойствах спекл-поля в дальней зоне дифракции, когда образцы кожи

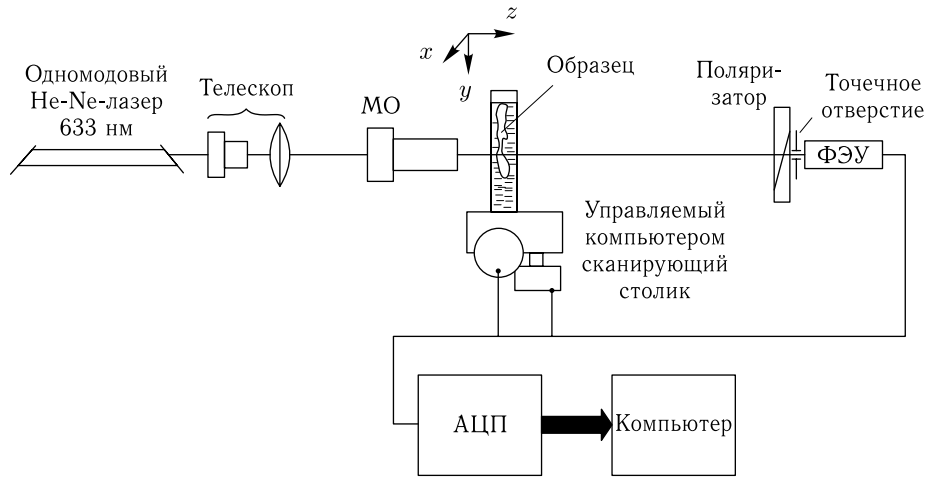


Рис. 13.23. Оптическая схема сканирующего поляризационно-чувствительного спекл-коррелометра с пространственным разрешением [221]: ФЭУ — фотоумножитель; АЦП — амплитудно-цифровой преобразователь; МО — микрообъектив

или реплики кожи зондируются сфокусированным лазерным пучком. Технология, которая позволяет получать тонкие образцы (отрывы) эпидермиса с помощью медицинских клеев и кварцевых (стеклянных, металлических) подложек очень удобна для исследований *in vitro* структуры эпидермиса посредством спекл-корреляционной оптики [1446, 1447]. Толщина образцов в этом случае обычно составляет 30–50 мкм. Эта технология позволяет получать от 5 до 7 последовательных отрывов с одного и того же места. В качестве примера на рис. 13.21 представлены три пространственные реализации флуктуаций интенсивности, полученные путем сканирования образца эпидермиса кожи, взятой из области псориазической бляшки больного, для трех различных положений перетяжки лазерного пучка. Исследованные тонкие слои нормального и псориазического эпидермиса показали, что такие образцы могут быть описаны в рамках модели однократного рассеяния или рассеяния низкой кратности, поскольку в дальнем поле наблюдались лишь незначительные эффекты деполаризации.

Контраст V_I и коэффициент асимметрии Q_a флуктуаций интенсивности в дальней зоне поля как функции изменений параметра дефокусировки Δz для нормального и псориазического эпидермиса имеют два максимума вблизи области точной фокусировки ($\Delta z = 0$) [1447]. Рисунок 13.24 показывает такую зависимость для образца псориазического эпидермиса, а также соответствующие функции плотности вероятности для флуктуаций интенсивности. Поведение статистических характеристик первого порядка подтверждает правильность модели элементарных линз для описания процессов рассеяния в эпидермисе. Нормальный эпидермис (где рассеиватели имеют меньший размер и более однородное распределение) характеризуется частичным перекрытием упомянутых выше максимумов. Симметрия в расположении пиков V_I и Q_a по отношению к плоскости перетяжки пучка позволяет предположить, что статистические веса отрицательных и положительных элементарных линз в ансамбле рассеивателей равны друг другу.

Различия между кривыми $V_I(\Delta z)$ и $Q_a(\Delta z)$ для образцов нормального и псориазического эпидермиса возникают из-за изменений в структуре ткани, вызванных заболеванием. Эти изменения связаны с появлением паракератонических фокусов

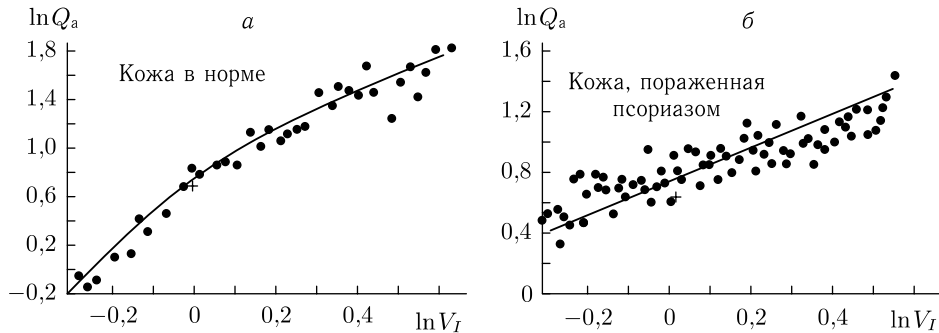


Рис. 13.24. Статистические зависимости $\ln Q_a$ и $\ln V_I$ для образцов нормальной и псориатической кожи (отрывов эпидермиса человека); + — отмечает значения Q_a и V_I для развитых спеклов [2040]

(структура клеток вблизи каждого фокуса существенно разупорядочена) и насыщением окружающих тканей интерстициальной жидкостью с большим количеством белковых компонентов (которая уменьшает эффективность рассеяния, аналогично иммерсионным жидкостям). Поздние стадии заболевания характеризуются появлением микропространств, заполненных воздухом, и отслоением при формировании неоднородностей, что увеличивает рассеяние и меняет его характер [1447, 2040]. Для малых Δz величина V_I больше 1, достигая значений 1,6–1,7 для некоторых образцов. Как правило, образцы нормальной кожи демонстрируют более высокий контраст, чем образцы псориатической кожи. Параметрические зависимости для $\ln Q_a$ и $\ln V_I$, построенные для различных Δz , иллюстрируют разницу в статистических свойствах образцов нормальной и псориатической кожи (см. рис. 13.24). Для нормальной кожи первая производная от функции $\ln Q_a = f(\ln V_I)$ больше, чем для псориатической кожи. Эта производная имеет отрицательный наклон в случае нормальной кожи и положительный наклон для патологической кожи. Для развитых спекл-полей с $V_I = 1$ и отрицательной экспоненциальной функцией плотности вероятности флуктуаций интенсивности (см. формулу (8.9)) имеем $Q_a = 2$ (эти точки отмечены знаком плюс на рис. 13.24).

Таким образом, статистика первого порядка может использоваться как простой и эффективный критерий распознавания структурно-специфических особенностей образцов биоткани. Исследования специальных реплик кожи показали, что эта методика эффективна также для полуколичественного определения сухости и жирности кожи [2036, 2041].

Статистические характеристики второго порядка для флуктуаций интенсивности также весьма чувствительны к структурным изменениям в биоткани [1446]. Для нормальной кожи нормированные одномерные автокорреляционные функции флуктуаций интенсивности характеризуются сравнительно малой величиной корреляционной длины, $L_I \sim 60\text{--}80$ мкм, и отсутствием заметных крупномасштабных флуктуаций коэффициента корреляции (см. рис. 8.5). При появлении псориатической бляшки АФ демонстрируют примерно двукратный рост корреляционной длины, $L_I \sim 95\text{--}180$ мкм и появление крупномасштабных аperiодических колебаний со сравнительно большой амплитудой. Эффективные размеры структурных неоднородностей, порождающих такие колебания, коррелируют с размерами, характерными для ансамбля паракератонических фокусов. Подробный анализ колебательных составляющих АФ должен позволить оценить поверхностную плотность паракератонических фокусов и их средний размер.

В области высоких пространственных частот примерно 1 мкм^{-1} и выше структурная функция или ее экспоненциальный фактор ν_I (см. формулы (8.21) и (13.11)) предпочтительны для описания флуктуаций интенсивности. Локальные оценки экспоненциального фактора позволяют определить вклад высокочастотных структурных компонент биоткани и найти их пространственное распределение в виде топограмм. Рисунок 13.25 представляет топограммы, полученные с использованием этого метода для образцов нормального и псориатического эпидермиса [221, 2035, 2042]. Топограммы и соответствующие распределения экспоненциального фактора (см. рис. 13.26) демонстрируют структурные изменения, связанные с различными стадиями развития патологии. Значения ν_I были усреднены вдоль направления оси x , причем окно усреднения содержало не менее 10^3 отсчетов. Эпидермис нормальной кожи со сравнительно мелкомасштабными неоднородностями характеризуется несколько меньшим значением и большей дисперсией параметра ν_I , чем ранние и средние стадии формирования псориатической бляшки (см. рис. 13.25 и 13.26). Крупномасштабные структурные особенности, такие как фрагменты кожного рисунка, хорошо видны на топограмме нормальной кожи. Средняя стадия патологии характеризуется малой дисперсией и сравнительно большим средним значением рассматриваемого параметра. На поздних стадиях процесса дисперсия растет, среднее значение параметра ν_I слегка убывает, а симметрия функции распределения понижается. Стадии формирования псориатической бляшки, ясно различаемые с помощью корреляционной спектроскопии, согласуются с результатами клинических наблюдений.

Управление оптическими свойствами биотканей, в частности возможность заметного уменьшения коэффициента рассеяния, может сыграть ключевую роль в оп-

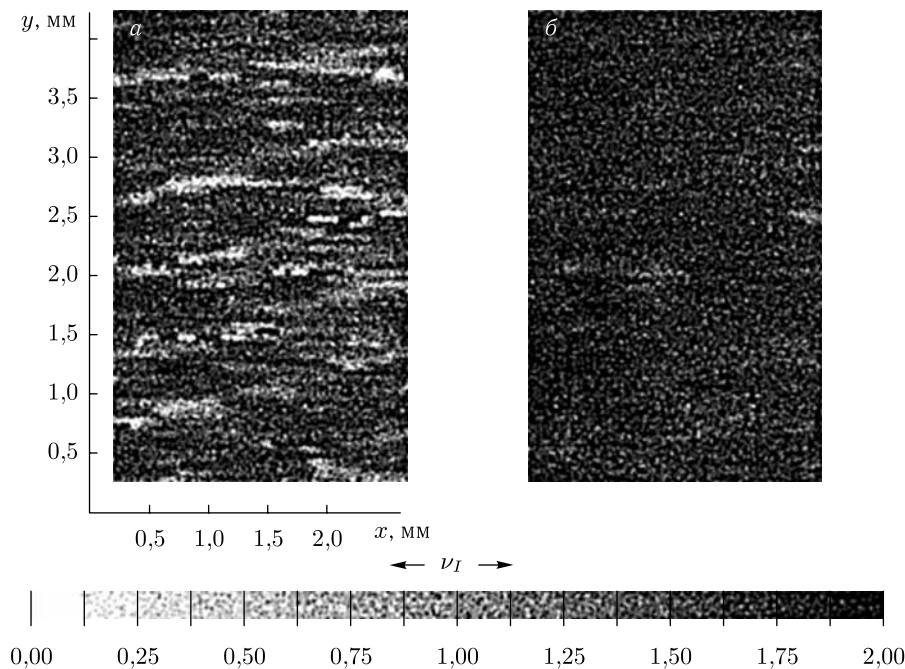


Рис. 13.25. Топограммы экспоненциального фактора ν_I , полученные для образцов отрывков эпидермиса кожи человека: (а) нормальная кожа и (б) кожа с псориазом (средняя стадия заболевания) [221]

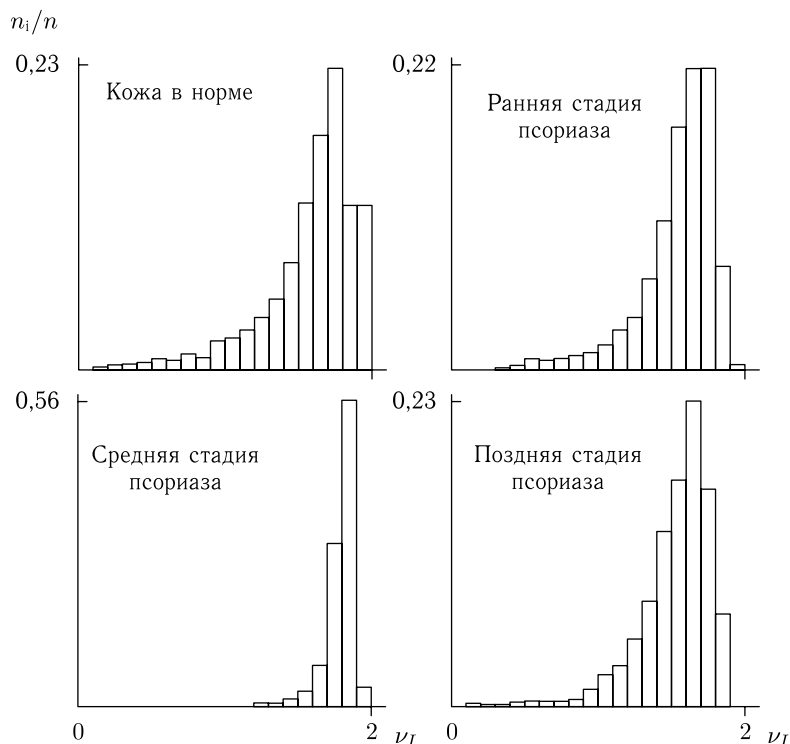


Рис. 13.26. Эволюция распределений экспоненциального фактора ν_I при развитии псориаза [221]: нормальная кожа (соответствующая рис. 13.25 а), ранняя стадия псориаза, средняя стадия псориаза (соответствующая рис. 13.25 б) и поздняя стадия заболевания

тической томографии тканей при поиске небольших опухолей на ранних стадиях их формирования (см. гл. 9). Рисунок 9.8 представляет два записанных фрагмента, соответствующих ранней и более поздней стадии оптического просветления ткани. Характерные изменения в структуре спеклов в дальней зоне поля визуально наблюдались на экране, расположенном в плоскости фотоприемника и были записаны в отраженном свете с помощью ПЗС-камеры [221, 238]. Эволюция типичной нормированной АФ флуктуаций интенсивности для склеры в процессе ее просветления, измеренная с использованием спекл-коррелометра (см. рис. 13.23), показана на рис. 13.27. В пределах малых промежутков времени (1–2 мин) временная эволюция пика автокорреляции, связанная с переходом биоткани из одного режима рассеяния в другой, может быть аппроксимирована экспоненциальной кривой, в то время как для больших интервалов времени этот процесс приближенно описывается гауссовой кривой. Начальная стадия процесса характеризуется существованием многих масштабов флуктуаций интенсивности (у АФ можно различить по крайней мере три значения наклона). На более поздних стадиях просветления полуширина пика АФ стремится к значению $(0,3-0,4) \cdot 10^{-3}$ с, близкому к отношению w/v радиуса перетяжки падающего пучка к скорости сканирования. Этот эффект можно использовать как критерий завершения перехода от режима многократного к режиму однократного рассеяния. Временная эволюция экспоненциального фактора ν_I (см. Соотношение (13.11) и рис. 13.28) характеризует поведение высокочастотных компонент флуктуаций интенсивности.

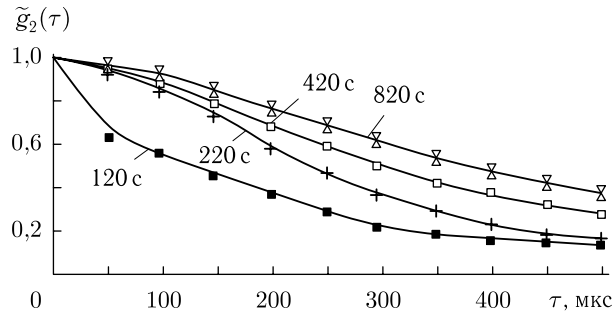


Рис. 13.27. Эволюция нормированной автокорреляционной функции флуктуаций интенсивности спекл-поля при рассеянии когерентного света от образца склеры глаза человека в процессе его просветления раствором тразографа-60; толщина образца 0,6 мм; измерения производились после пребывания образца в растворе в течение 120, 220, 420 и 820 с [221]

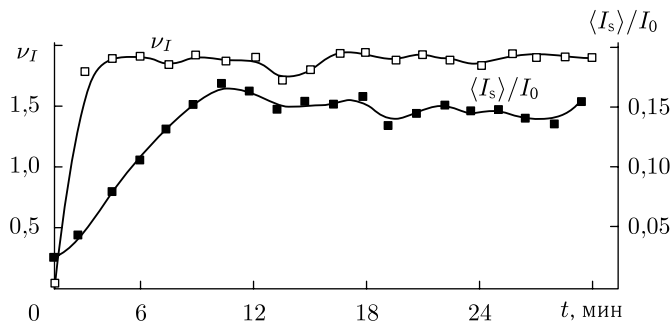


Рис. 13.28. Типичные зависимости от времени экспоненциального фактора ν_I и нормированной средней интенсивности $\langle I_s \rangle / I_0$, измеренных в точке наблюдения образца склеры, помещенного в тразограф-60; $\lambda = 633$ нм [221]

Заметим, что экспоненциальный фактор и относительные флуктуации средней интенсивности прошедшего света имеют существенно различные скорости отклика на действие гиперосмотических оптически просветляющих агентов (ОПА): ν_I особенно чувствителен к ОПА на ранних стадиях просветления (в пределах $\sim 1,5$ мин для тразографа-60), в то время как пропускание достигает своего максимума только на десятой минуте. Это различие в скорости отклика можно отнести на счет того факта, что корреляционные свойства поля, характеризующиеся переходом от однородного к неоднородному распределению спеклов, существенно меняются на начальных стадиях согласования показателей преломления. Напротив, наибольшее коллимированное пропускание достигается только, когда показатели преломления полностью согласованы.

Прямое моделирование распространения первоначально коллимированных фотонов с длиной волны 600 нм через фиброзную ткань, состоящую из коллагеновых волокон со средним диаметром 100 нм и показателем преломления $n_c = 1,474$, окружающих базовым веществом, показывает, что даже при частичном согласовании показателей преломления, $n_0 = 1,345$ – $1,474$, нерассеянные ($\sim 67\%$) и слегка рассеянные ($\sim 24\%$) фотоны преобладают в проходящем свете (см. рис. 8.6) [791]. Этот расчет хорошо

согласуется с измеренными спектрами пропускания и отражения склеры и данными по корреляционным измерениям (см. разд. 9.3) [791, 792].

Другая специфическая особенность просветления склеры — появление квазипериодических колебаний средней интенсивности пропускания, которые также проявляют себя в корреляционных характеристиках. Эти колебания имеют малую амплитуду и могут быть хорошо видны на более поздних стадиях просветления, когда основные кинетические процессы, связанные с направленной диффузией вещества из раствора в ткань или диффузией воды из ткани в раствор, близки к своему завершению. Характерное время колебаний $\sim 1,5\text{--}2,0$ мин. Очевидно, что процесс с таким характеристическим временем можно приписать неоднородности диффузии внутри ткани в пространстве и времени. Этот эффект можно учесть с помощью многостадийного характера процесса диффузии. На первой стадии диффузия ОПА в ткань и поток воды из ткани частично выравнивают показатели преломления гидратированного коллагена и межколлагенового вещества. При этих условиях оптическое пропускание ткани растет, пока исследуемая зависимость не насытится. Однако на второй стадии проявляется сравнительно слабый процесс взаимодействия нового базового вещества с коллагеном. Базовое вещество немного снижает свой показатель преломления из-за дегидратации коллагена, в то время как показатель преломления коллагена растет. Появляющееся рассогласование вызывает небольшое снижение оптического пропускания. На следующей стадии некоторое нарушение равновесия между давлением воды и ОПА в растворе и ткани вызывает диффузию воды из ткани и ОПА в ткань, что приводит к более точному равенству показателей преломления, и пропускание снова растет. Затем вышеописанный процесс повторяется, и пропускание колеблется во времени. Такие колебания наблюдаются в течение всего периода действия гиперосмотического агента на биоткань, в конкретном эксперименте вплоть до сороковой — пятидесятой минуты [221, 238, 555]. Вероятно, что колебания такой же природы с временным периодом $\sim 2,5\text{--}3,5$ мин были зарегистрированы для кожи хомьяка *in vivo* при местном применении глицерина в качестве ОПА и с использованием ОКТ-системы в качестве приемника [1721].

Как было показано ранее (см. разд. 9.6.1), переход рассеивающего объекта из режима многократного рассеяния в режим однократного должен менять поляризационные свойства рассеянного излучения, которые можно описать на языке статистических характеристик первого и второго порядка (см. соотношения (13.12) и (13.13)). На ранних стадиях оптического просветления склеры обе поляризационные компоненты прошедшего света имеют примерно равные интенсивности. Однако в процессе просветления компонента, поляризованная вдоль поляризации падающего пучка, начинает преобладать над другой компонентой (см. рис. 9.10) [555]. Эти экспериментальные данные демонстрируют обратимость процесса оптического просветления, что важно для живых систем, и выявляют высокую чувствительность поляризационных характеристик к структурным изменениям в ткани.

Заметим, что просветленная склера обладает крупномасштабными пространственными неоднородностями рассеивающих и поглощающих свойств в виде доменной структуры с площадью доменов порядка $0,1\text{--}1$ мм². Такая структура связана с пространственно-неоднородным распределением скорости диффузии вещества и ясно проявляется как во временных реализациях флуктуаций интенсивности для отдельных поляризационных компонент, так и в поведении кросс-корреляционной функции этих компонент (см. рис. 13.29), измеренной при сканировании лазерного пучка по поверхности образца [221]. Очевидно, что подобно корреляционным характеристикам спекл-полей, эти поляризационные и кросс-корреляционные характеристики могут быть использованы для визуализации структуры тканей, а также для топографии и томографии тканей.

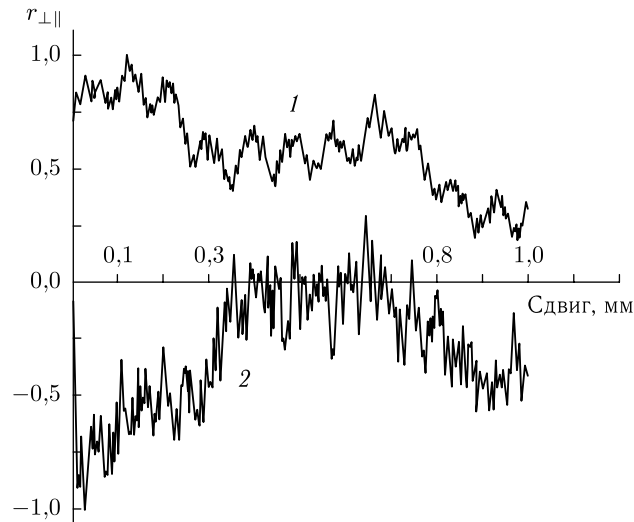


Рис. 13.29. Эволюция коэффициента кросс-корреляции флуктуаций интенсивности для двух ортогональных поляризаций в спекл-поле, сформированном в плоскости наблюдения лазерным пучком, сканируемым по образцу склеры, находящемуся в растворе тразографа-60 в течение 200 с (1) и 400 с (2). Скорость сканирования 5 мм/с [221]

13.6. Методы когерентной микроскопии

Современные методы микроскопии развиваются в направлении структурных исследований *in vivo* отдельных клеток без фиксации этих клеток и с одновременным мониторингом внутриклеточных динамических процессов, связанных с жизнедеятельностью клетки. Лазерная доплеровская микроскопия [5, 24, 1463, 1970] и высокоэффективная фазовая и дифракционная микроскопия со сверхвысоким пространственным разрешением [245, 252–259, 265–270, 1368–1373, 1873, 2049–2051] являются хорошими примерами таких методов. Другая тенденция — это развитие микроскопического послойного анализа тканей *in vivo* с высоким пространственным разрешением. Конфокальная микроскопия [1, 3, 28, 76, 120, 122, 351, 1128, 1502–1527, 1567, 1667, 1671, 1679, 1854, 1940, 1949, 2052] — это яркий пример развития метода послойной визуализации в микроскопии (см. разд. 8.5 и разд. 9.6.2). Голографическая микроскопия [249–251, 260–264, 2053–2056] также имеет много перспективных приложений.

Фазовый микроскоп, описанный в работах [245, 267–270, 1873, 2051], представляет собой интерферометр Линника–Толанского с компьютерно управляемым пьезоприводом зеркала в опорном канале и диссектором (координатно-чувствительным приемником), который регистрирует интерференционную картину (см. рис. 13.30). Фактически такой микроскоп является микропрофилометром с пространственным разрешением до 10 нм на длине волны 633 нм. Временное разрешение, обеспечиваемое этим микроскопом при исследовании динамических процессов, имеет порядок 1 мс. Разрешение по высоте у этого прибора 0,5 нм, изображаемая область включает от 64×64 до 256×256 пикселей, полное усиление 10^5 – 10^6 ; минимальный размер пикселя 5 нм, а время обработки данных 4–20 с. Информация о структуре объекта представляется в виде топограмм высоты (оптической длины пути), сечений, трехмерных изображений и т. д. Когда динамические процессы исследуются в произвольно выбранной точке объекта, результаты исследования представляются в виде

временных реализаций, фурье-спектра или гистограмм. Фазовый микроскоп использовался для структурных исследований живых и высушенных клеток фибробластов (L 929) и митохондрий, экстрагированных из клеток печени крысы в нормальном и конденсированных состояниях [245, 1873]. Фазовые изображения клеток L 929, полученные в ходе этих исследований, характеризуются средней оптической длиной пути света порядка 600 нм для живой клетки и 50 нм для высушенной клетки. Эти данные показывают возможность эффективного мониторинга клеточного метаболизма. Аналогичные изображения митохондрий показывают, что оптический путь в нормальной митохондрии по сравнению с окружением около 15 нм. Для конденсированного состояния оптическая длина пути составляет 3 нм. Микроскоп такого типа успешно использовался также для структурного исследования стенки клеток грибов и эритроцитов с высоким пространственным разрешением, для исследований внутриклеточной подвижности с высоким временным разрешением [2049], а также для изучения клеток карциномы человека в различных физиологических состояниях, индуцированных гиперосмотическими агентами [2051].

Более поздние исследования В. П. Тычинского с соавторами можно найти в работах [267–270], в которых анализируются как общие положения и перспективы развития фазовой микроскопии, так и конкретные результаты исследований, например исследование связи рефракции с метаболической активностью клеток [268], исследование опухолей на модели рака молочной железы [269], изучение реакции ядрышек клеточного ядра на токсические воздействия [270].

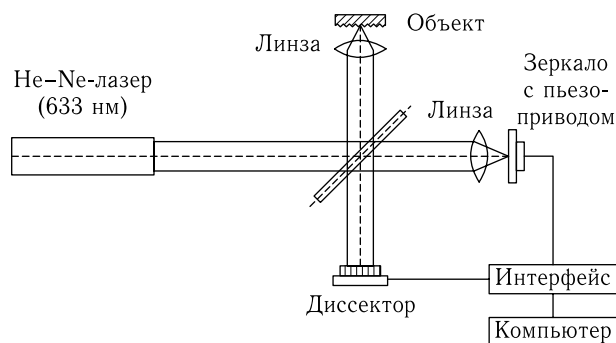


Рис. 13.30. Схема фазового микроскопа [2049]

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, принципы которой обсуждались в разд. 8.5, является хорошо разработанным методом визуализации для биомедицинских исследований [1, 3, 28, 76, 120, 122, 351, 1128, 1502–1527, 1567, 1667, 1671, 1679, 1854, 1940, 1949, 2052]. Например, при морфометрии *in vivo* эпидермиса человека с использованием конфокальной микроскопии в реальном времени было продемонстрировано пространственное разрешение лучше 1 мкм и профилирование по глубине до 150–250 мкм в зависимости от анатомического места и оптических характеристик кожи (цвет, прозрачность) [2052]. Некоторые из этих результатов по оценке размеров ядер и числа кератиноцитов для различных слоев живого эпидермиса человека представлены в табл. 13.1. Разрешение, достигнутое в структурных исследованиях дентина зуба, оказалось сравнимым с характеристиками разрешения сканирующей электронной микроскопии, при этом обеспечивалась также дополнительная подповерхностная визуализация ткани с разрешением 1 мкм для глубин до 30–50 мкм [1507].

Таблица 13.1

Оценка размера ядер и числа кератиноцитов в горизонтальном оптическом срезе живого эпидермиса [2052]

Слой эпидермиса	Диаметр, мкм	Плотность, число/мм ²
Зернистый	12–15	1500
Шиповатый	9–12	4000
Базальный	6–8	7000

Трехмерное изображение клеток в различных слоях эпителия роговицы позволило выявить характер митоза в таких клетках [1515, 1516]. На рис. 13.31 показана типичная схема конфокального микроскопа, в котором сканирование производится вдоль оси z (вдоль пучка света) (см. работу [1, с. 555–575]). Такой микроскоп предназначен для послынного анализа структуры глаза. Излучение вводится в микроскоп с помощью оптоволоконна. Микроскоп имеет две оптически сопряженные щели. Одна из этих щелей отображается на объект, а вторая расположена перед фотоприемником. Объектив сканируется вдоль оси z пьезоприводом с управлением от компьютера. Иммерсионная жидкость обеспечивает оптическое согласование объектива и исследуемого глаза.

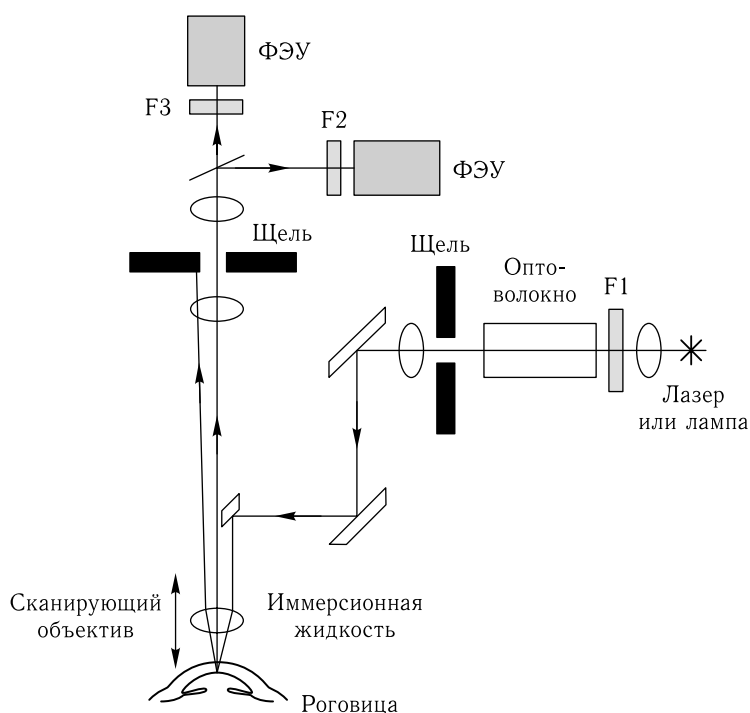


Рис. 13.31. Схема конфокального микроскопа с оптически сопряженными щелями и сканированием вдоль оси z [1, 1503]: F1, F2 и F3 — фильтры

На рис. 13.32 показан конфокальный микроскоп со сканированием щели другого типа. Такой микроскоп позволяет получать изображения объекта на различной глубине [1508, 1509, 1513–1516]. Этот микроскоп работает в реальном времени

и может быть использован для исследования *in vivo* тканей глаза. Основным элементом микроскопа является двухстороннее зеркало, которое реализует поперечное сканирование без сдвига оси отраженного пучка (такая схема была предложена впервые Свищевым в 1969 году для исследования прозрачных рассеивающих объектов, включая живую ткань нерва). Снижение качества изображения из-за движения глаза пациента исключалось использованием электронной схемы, которая гарантировала требуемую частоту сканирования и синхронизацию фазы между всеми элементами системы. В качестве примера на рис. 13.33 представлено изображение клеток эндотелия роговицы человека, полученное с помощью конфокального микроскопа, показанного на рис. 13.32 [1513]. Высококачественные послойные изображения клеточных структур ткани глаза и кожи в нормальных и патологических состояниях, а также структуры дентина зуба человека представлены в работах [1, 3, 28, 76, 120, 122, 351, 1128, 1502–1527, 1567, 1667, 1671, 1679, 1854, 1940, 1949, 2052].

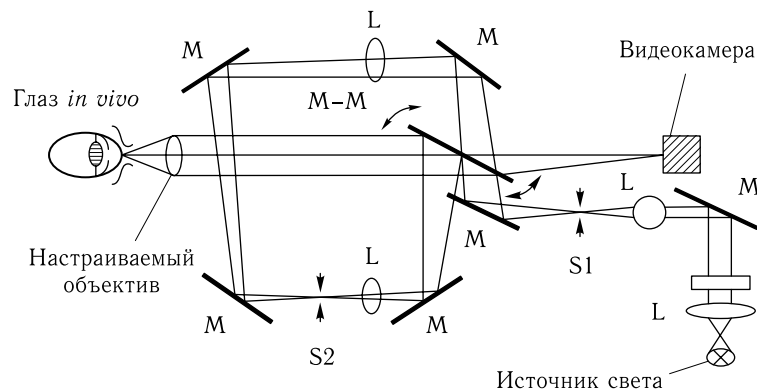


Рис. 13.32. Схема конфокального микроскопа со сканируемой щелью, работающего в реальном масштабе времени [1508]: М — зеркала; L — линзы; S1 и S2 — сопряженные щели; М-М — сканирующее двухстороннее зеркало

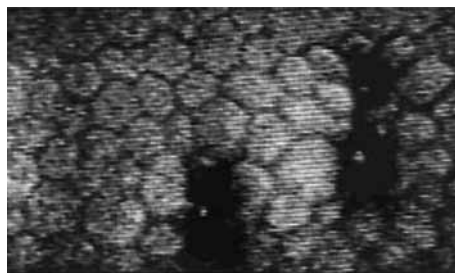


Рис. 13.33. Конфокальное изображение роговицы глаза человека *in vivo*, видны клетки эндотелия задней поверхности роговицы; оптическое картирование проведено на глубине 500 мкм по отношению к поверхности роговицы; темные места на изображении соответствуют патологическому эпителию [1513]

В зависимости от используемого источника света, приемной системы и типа исследуемой биоткани, для достижения удовлетворительного отношения сигнал-шум может быть необходимо усреднение по нескольким экспозициям (кадрам). Например, для слабо отражающих тканей глаза (обычно меньше 1%) может потребоваться от четырех до восьми кадров. Однако, если в качестве приемника используется

высококонтрастная видеокамера в сочетании с широкополосным записывающим устройством, усреднение по кадрам не требуется, и можно производить измерения *in vivo* в реальном времени [1508, 1509]. Хотя конфокальные микроскопы могут работать с ртутными или ксеноновыми дуговыми или галогенными лампами, монохроматическое лазерное излучение обеспечивает получение изображений с лучшим качеством, благодаря отсутствию хроматических аберраций, вносимых оптической системой. Однако лазер нужно выбирать с учетом глубины проникновения лазерного излучения внутрь ткани и пропускания оптической системы микроскопа.

Сравнительный анализ конфокальных и гетеродинных сканирующих микроскопов и их приложений к исследованию рассеивающих объектов показал, что во многих случаях ограничения конфокального метода главным образом связаны с низким уровнем сигнала, а не с деградацией изображения из-за рассеянного света [1519, 1520]. Действительно, удовлетворительное разрешение по глубине (селекция фотонов, отраженных от определенного слоя и исключение влияния рассеянного света от других слоев) может быть достигнуто, когда конфокальная система имеет сопряженные точечные диафрагмы радиуса (в оптических единицах):

$$\nu_p \leq 2, \quad \nu_p = \frac{2\pi r_p a_1}{\lambda f_1}, \quad (13.14)$$

где r_p — радиус отверстия диафрагмы, a_1 и f_1 — радиус и фокусное расстояние линзы, фокусирующей свет на отверстие. Такие отверстия не пропускают много света. Например, при $\nu_p = 2$, отверстие пропускает только 40% падающего на него излучения в пределах своей апертуры. В то же время, гетеродинная (интерференционная) схема, включающая узкополосный источник света, до известной степени исключает это ограничение из-за выигрыша в оптической мощности. В конце концов, интерференционная схема позволяет получать изображения объекта с таким же отношением сигнал-шум, что и в конфокальной микроскопии за более короткое время, чем это имеет место в конфокальной микроскопии. Дополнительные преимущества интерференционной схемы, вытекающие из когерентности света и использования амплитудного отклика исследуемого объекта, связаны с появлением нового механизма подавления рассеянного света и возможностью регистрации меньших различий в отражательной способности различных слоев ткани. Интеграция подходов, рассмотренных выше, в одном микроскопе и использование широкополосных (низкокогерентных) источников света (см. гл. 14) может существенно улучшить селективность системы, что важно для исследования слабо неоднородных биотканей [1519, 1520].

Спекл-интерферометрия, использующая остросфокусированные лазерные пучки и пространственное усреднение оптических сигналов, также имеет преимущества в профилировании рассеивающих объектов по глубине. С использованием спекл-интерферометра (см. рис. 8.7), были исследованы отрывы кожи человека на металлической подложке. Было осуществлено профилирование по глубине тонких слоев ткани с субклеточным разрешением (см. рис. 9.34). Этот метод позволяет оценить толщину слоев ткани и распределение показателя преломления по глубине. Соответствующее поперечное сканирование объекта дает томограммы с пространственным разрешением около $3 \times 3 \times 3$ мкм³. Выигрыш в интенсивности оптического сигнала у данной схемы и возможность использования мощных лазеров позволяет получать высокие значения отношения сигнал-шум.

Технический прогресс в различных областях оптической микроскопии все больше фокусируется на задачах визуализации *in vivo* и *in situ* метаболических функций и дисфункций. Наблюдение динамики биологических процессов в микро- и нанометровом масштабе требуется для более детального понимания клеточной физиологии и патологии.

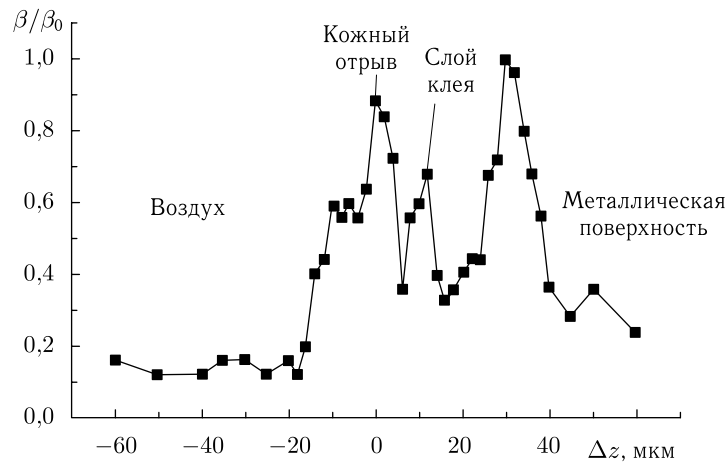


Рис. 13.34. Оптическое профилирование по глубине клеевого отрыва кожи человека, произведенного на металлическую подложку (зависимость нормированного фактора модуляции фотоэлектрического сигнала β/β_0 от продольного смещения образца) [1449]

13.7. Интерференционная ретинометрия и исследование седиментации крови

Лазерные интерференционные ретинометры, используемые для мониторинга ретиальной остроты зрения человека, основаны на оптическом двухлучевом интерферометре, создающем два когерентных пучка света, которые фокусируются на узловую плоскость N глаза и формируют пространственно-модулированный лазерный пучок (ПМЛП) с параллельными интерференционными полосами на сетчатке (см. рис. 8.9 и 13.35) [5, 473, 1441, 2057]. Период полос L и их ориентация зависят от соответствующих параметров падающего МПЛП [5]:

$$L = \frac{D\lambda}{2l}, \quad (13.15)$$

где D — среднее расстояние между узловой плоскостью глаза и сетчаткой, λ длина волны, $2l$ расстояние между двумя точечными источниками, формируемыми в узловой плоскости.

Нормальная ретиальная острота зрения определяется как угловая разрешающая сила глаза и характеризуется плотностью интерференционных полос на один градус угла зрения [5]:

$$N_{\text{int}} = \left(\arcsin \frac{\lambda}{2l} \right)^{-1}. \quad (13.16)$$

При идеальном состоянии среды передней части глаза контраст картины интерференционных полос очень высок, практически он равен единице, из-за высокой степени взаимной когерентности лазерных пучков.

Процедура оценки ретиальной остроты зрения проста [2057]. Сначала на сетчатке пациента формируется картина интерференционных полос с большим периодом. Пациент сообщает врачу, что он видит картину полос. Затем период полос уменьшают, а пациент должен отметить свою способность их различать. Это повторяется до тех пор, пока пациент не перестанет видеть полосы. Для устранения возможности ложного ответа пациента полосы поворачивают на произвольный угол (см. рис. 13.35 б).

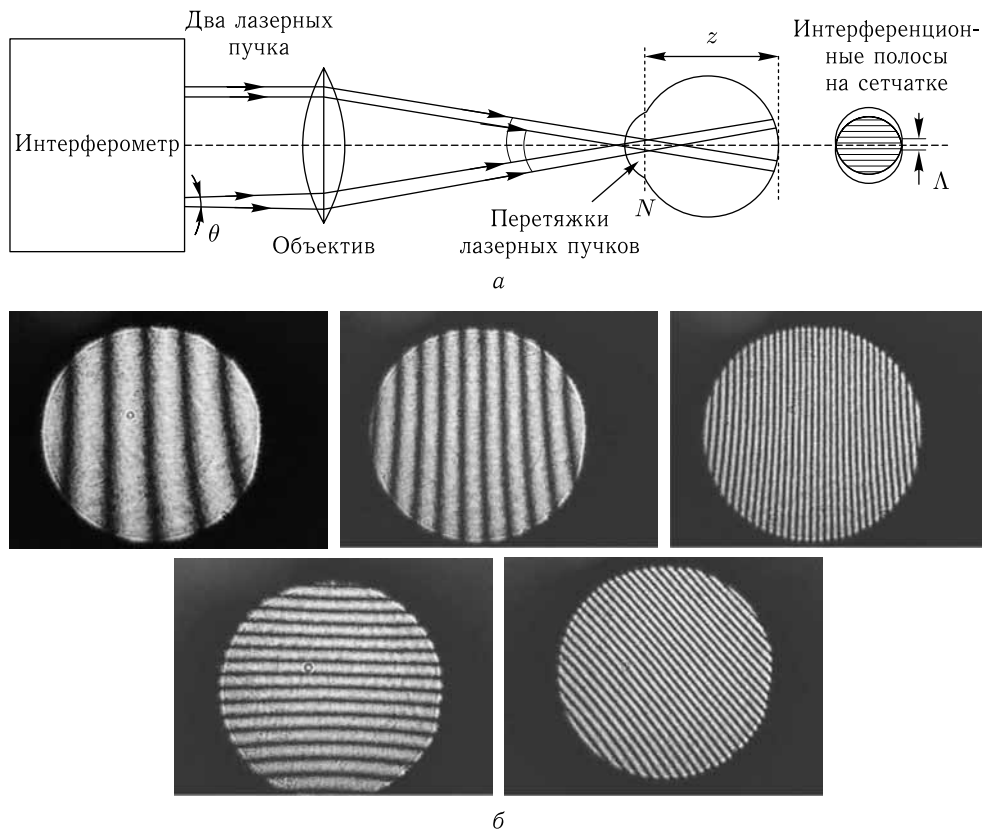


Рис. 13.35. Схема лазерного интерференционного ретинометра (а) и интерференционные полосы различной ширины и ориентации на сетчатке (б) [1441]

Для пациентов с катарактой (помутнением) хрусталика рассеяние ПМЛП в мутной среде не дает возможности сформировать картину полос (см. рис. 13.36 б) [2057]. Однако усреднение интерференционной картины может улучшить видность исходных полос (см. разд. 8.3), и, следовательно, данный метод с некоторыми ограничениями может применяться для оценки ретиальной остроты зрения при катаракте. Оптическая схема, представленная на рис. 13.36 а, где ПМЛП периодически смещается дефлектором, но полосы на сетчатке остаются неподвижными, обеспечивает такое усреднение. Возможны и некоторые другие схемы усреднения [1441].

Другим примером применения ПМЛП в медицине является мониторинг скорости оседания эритроцитов (СОЭ). Обычно в тесте используется измерение расстояния, на которое эритроцит опускается под действием силы тяжести за один час в вертикальном столбе крови с антикоагулянт. Тест помогает поставить специфический диагноз во многих случаях, включая диабет и инфаркт миокарда. Метод ПМЛП позволяет регистрировать временные изменения рассеивающих свойств суспензии крови при ее оседании [2058]. Этот метод использовался при исследовании сильно разбавленной крови, т. е. для мониторинга седиментации отдельных или слабо взаимодействующих эритроцитов, и прошел проверку в клинических условиях.

Экспериментальная установка представлена на рис. 13.37 [2058]. Пучок излучения He:Ne-лазера с длиной волны 633 нм расширился до 10 мм, и интерферометр

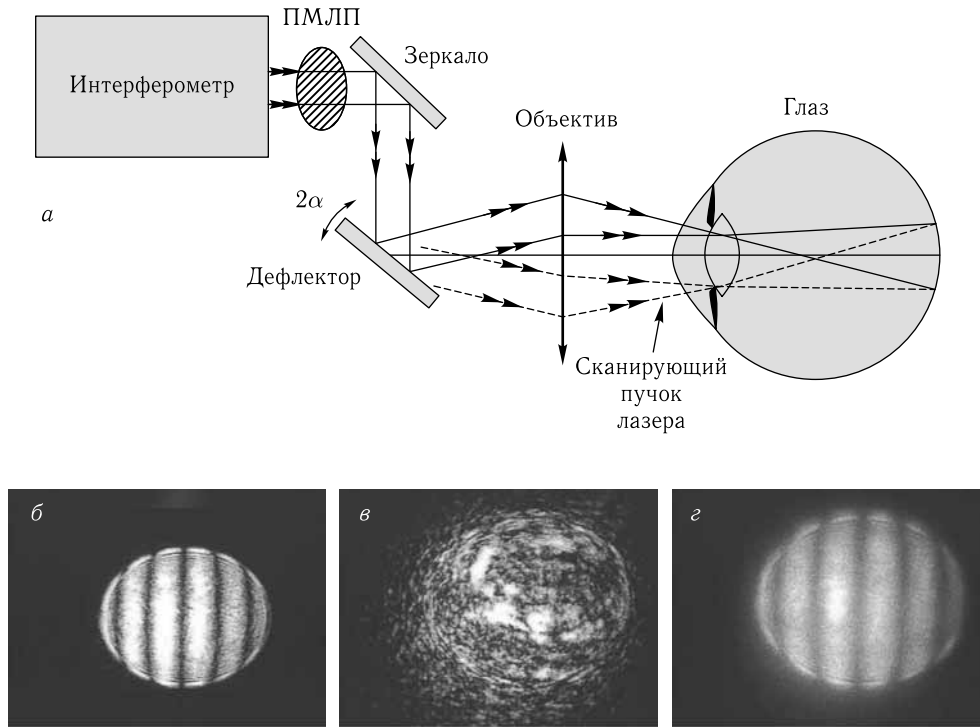


Рис. 13.36. Наблюдение полос средней интенсивности на сетчатке: *a* — схема формирования полос средней интенсивности на сетчатке; *b* — полосы при прозрачном хрусталике; *в* — картина полос при мутном хрусталике; *г* — полосы средней интенсивности [2057]

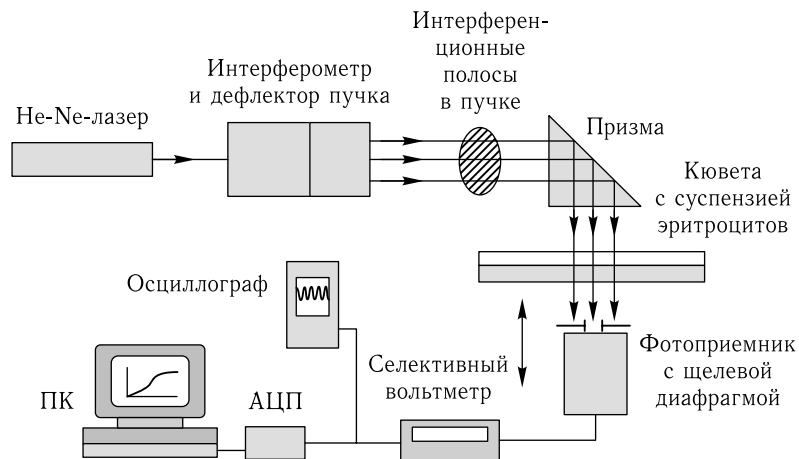


Рис. 13.37. Лазерная система с пространственно-модулированным лазерным пучком для изучения свойств динамического рассеяния света суспензией эритроцитов во время их спонтанной агрегации и седиментации [2058]

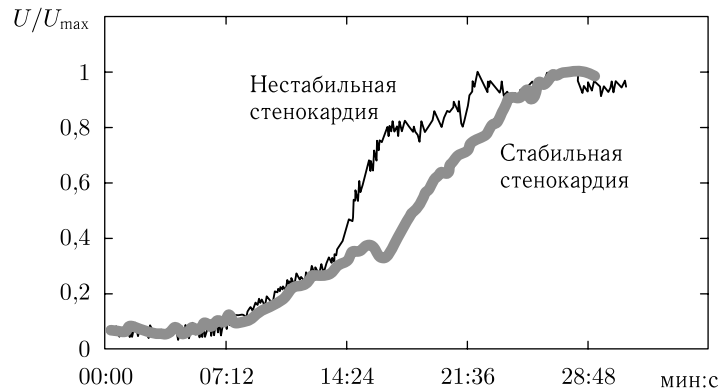


Рис. 13.38. Временные характеристики рассеяния суспензии эритроцитов (цельная кровь, разбавленная физиологическим раствором в отношении 1:200) в процессе седиментации. Кровь была взята у пациентов со стабильной и нестабильной стенокардией [2058]

создавал параллельные полосы в освещающем пучке. Для получения динамических полос использовался пьезодефлектор. ПМЛП вертикально падал на горизонтально расположенный стеклянный сосуд с образцами крови. В процессе седиментации измерялся контраст интерференционных полос. При седиментации крови рассеивающая среда переходит из сильно рассеивающего в слабо рассеивающее состояние из-за высокой степени упаковки осевших вниз эритроцитов, в силу чего контраст повышается (см. рис. 13.38). Благодаря различным свойствам образцов крови, взятых у больных с разными стадиями заболевания, динамические характеристики контраста различаются, следовательно контраст может служить диагностическим параметром.

Глава 14

ОПТИЧЕСКАЯ КОГЕРЕНТНАЯ ТОМОГРАФИЯ И ГЕТЕРОДИННАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ

В данной главе представлено описание методов оптической когерентной томографии (ОКТ), основанных на использовании интерферометрии низкокогерентных источников света, а также метода оптического гетеродинирования, использующего, напротив, высококогерентные источники света. Обсуждаются достоинства, недостатки и предельные возможности обоих методов в приложении к исследованию биологических тканей.

14.1. ОКТ

14.1.1. Введение. В оригинальной литературе, обзорах, монографиях, руководствах и учебных пособиях описано большое число схем когерентных оптических томографов для исследования биологических тканей и органов, представлены также результаты лабораторных, доклинических и клинических исследований [1, 3, 6, 8, 13, 17, 18, 28, 45, 76, 77, 84, 102, 108–111, 116, 126, 127, 129, 135, 136, 138, 139, 141, 142, 146, 147, 201, 555, 624–636, 1306, 1404–1417, 1485, 1530–1568, 1582, 1614, 1615, 1759–1776, 1780, 1782, 1801, 1803–1807, 1826, 2055, 2056, 2059–2091].

Описание основ и принципов оптической когерентной томографии (ОКТ) можно найти в разд. 8.6 настоящей монографии. В разд. 7.7 ОКТ обсуждается как метод измерения оптических свойств биотканей. Представлены методы и результаты измерения коэффициентов поглощения и рассеяния (см. табл. 7.1). Увеличение глубины зондирования и повышение контраста изображения ОКТ при действии оптически просветляющих агентов описано в разд. 9.4.5 для кожи, разд. 9.5.2 для тканей пищеварительного тракта, разд. 9.7.2 для образцов крови, а в разд. 9.8.1 обсуждается применение ОКТ для определения глюкозы. В данной главе мы дадим краткий обзор некоторых типичных схем ОКТ и кратко проиллюстрируем их биомедицинские приложения.

14.1.2. Амплитудная (временная) ОКТ. Рисунок 14.1 представляет одну из типичных временных томографических схем на основе суперлюминесцентного диода (СЛД) ($\lambda = 830$ нм, $\Delta\lambda = 30$ нм) и одномодового волоконно-оптического интерферометра Майкельсона [1306, 1535]. Мощность ИК-излучения на поверхности ткани примерно 30 мВт. Сигнал интерференции на доплеровской частоте, которая определяется скоростью сканирования зеркала в опорном плече (см. формулу (8.53)), пропорционален коэффициенту отражения нерассеянной компоненты от оптической неоднородности внутри ткани. Можно определить положение неоднородности в продольном направлении, уравнивая длины сигнального и опорного плеч интерферометра в пределах длины когерентности источника света (~ 10 мкм) (см. соотношение (8.54)). Поперечное разрешение пучка, сканируемого по поверхности образца, определяется радиусом w_0 фокального пятна зондирующего излучения (обычно $w_0 \leq 20$ мкм, что должно согласовываться с требуемой длиной зондируемой области

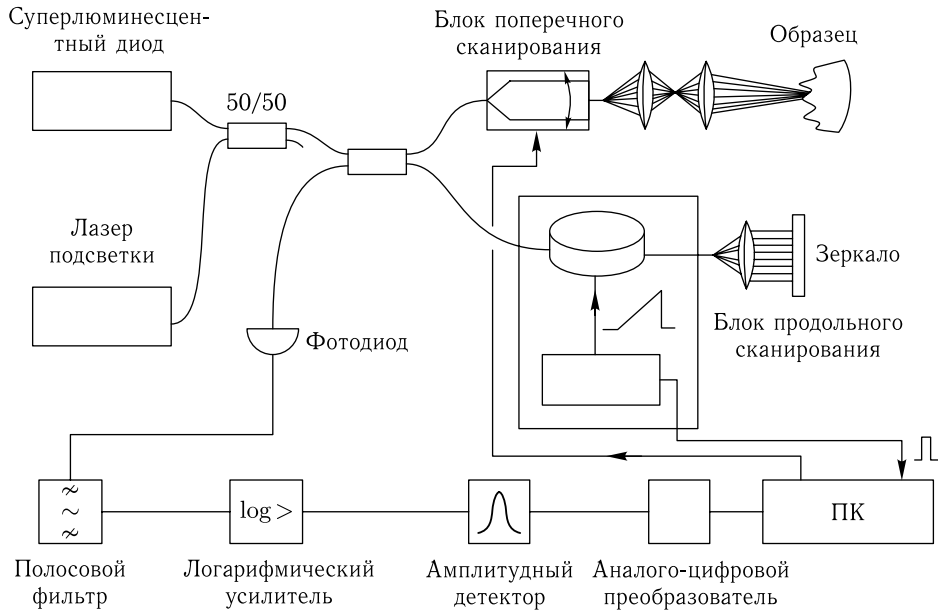


Рис. 14.1. Схема волоконного когерентного оптического томографа (ОКТ) [1535]

в продольном направлении, которая определяется длиной области перетяжки пучка, $2\pi w_0^2/\lambda_0$).

В качестве примера на рис. 9.30 показаны ОКТ-изображения кожи человека с псориатической эритродермией до и после применения глицерина как просветляющего агента [1306]. Для получения изображений размером $2,5 \times 4 \text{ мм}^2$ (аксиальный размер \times латеральный размер) с разрешением $20 \times 20 \text{ мкм}^2$, скоростью захвата изображения — одно изображение в секунду, скорость сканирования должна составлять 50 см/с . Скорость сканирования должна поддерживаться постоянной с точностью по крайней мере 1%, чтобы ограничить сигнал на доплеровской частоте в пределах полосы детектирования. Резонансные свойства доступных ныне механических сканирующих систем не могут гарантировать постоянство скорости с требуемой точностью по всему периоду модуляции. В системах ОКТ, разработанных в Институте прикладной физики РАН (Н. Новгород), система продольного сканирования основана на оптоволоконном пьезоэлектрическом преобразователе (см. рис. 14.1) [1306, 1535]. Этот преобразователь способен сканировать разность хода между плечами интерферометра со скоростью 50 см/с до 4 мм в глубину. Его практически безынерционный отклик в диапазоне используемых амплитуд и частот модуляции существенно упрощает регистрацию информативного сигнала на доплеровской частоте.

14.1.3. Двухволновая волоконная ОКТ. Для надежного детектирования патологии в толще исследуемой ткани полезны многоволновые изображения, полученные на двух или нескольких длинах волн. Чувствительность и диапазон распознавания таких систем могут быть очень высокими, поскольку поглощающие и рассеивающие свойства нормальной ткани и патологических включений могут зависеть от зондирующей длины волны по-разному. Очень важно обеспечить захват ОКТ-изображений на различных длинах волн одновременно, используя тот же интерферометр и фокусирующую систему [2059].

Схема двухволновой оптоволоконной ОКТ-системы показана на рис. 14.2 [1306, 2059]. Два СЛД с центральной длиной волны 0,83 мкм и 1,3 мкм, соответствующими спектральной ширине полосы 25 нм и 50 нм (длина когерентности соответственно 13 мкм и 19 мкм) и мощностью 1,5 мВт и 0,5 мВт использовались в качестве источников света. Свет от обоих СЛД вводился в интерферометр Майкельсона. Падающее излучение делилось на две равные части между пробным и опорным плечами волоконным делителем с точностью разделения света 3 дБ на обеих длинах волны. Разность хода между плечами интерферометра модулировалась пьезоэлектрическим преобразователем (см. рис. 14.1), обеспечивая сканирование по глубине до 3 мм. Наиболее сложная проблема одновременной компенсации волновой дисперсии на двух различных длинах волны в плечах интерферометра была решена посредством помещения в одно из плеч интерферометра дополнительного отрезка оптоволоконна, дисперсионные свойства которого совершенно иные, чем у основного волокна. Достигнутое пространственное разрешение по глубине на длинах волны 0,83 мкм и 1,3 мкм было 15 мкм и 34 мкм соответственно.

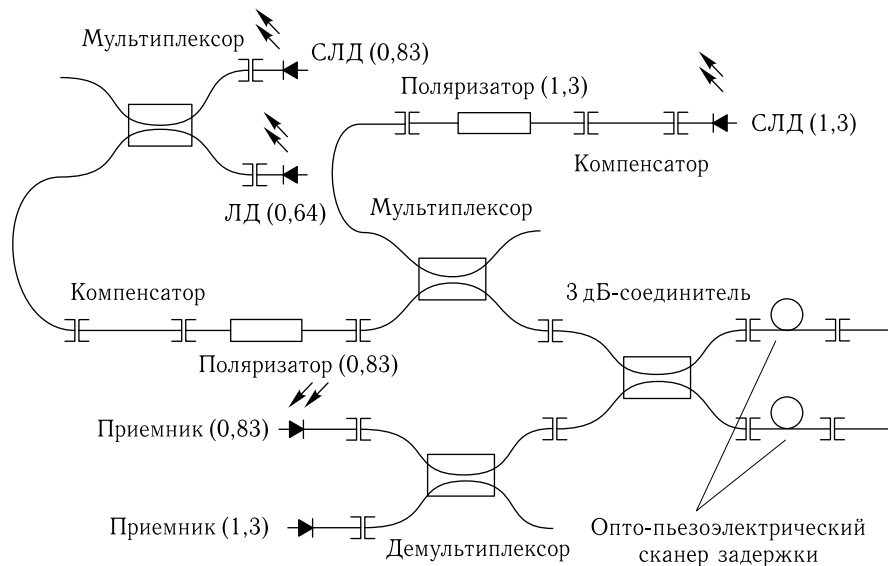


Рис. 14.2. Схема двухволнового ОКТ [2059]

14.1.4. Волоконная ОКТ сверхвысокого разрешения. Типичное аксиальное разрешение систем ОКТ-визуализации с такими общепринятыми широкополосными источниками, как СЛД или лазеры с синхронизацией мод, меняется от 10–15 мкм (СЛД) до 4–5 мкм (лазеры на красителях и титан-сапфировые лазеры со сверхкороткими импульсами) [109, 116, 127, 139, 142, 156]. Для обеспечения значительно более высокого аксиального разрешения (например, на субклеточном уровне) требуются широкополосные источники света, покрывающие несколько сотен нанометров в видимом и БИК-диапазонах. Такие ОКТ-системы сверхвысокого разрешения для визуализации *in vivo* описаны в работе [2060]. Одна из оптических схем представлена на рис. 14.3. Для нее было продемонстрировано продольное разрешение порядка 1 мкм, что является наивысшим разрешением, достигнутым для ОКТ к настоящему времени. В качестве источника света использовался фемтосекундный титан-сапфировый лазер с синхронизацией мод с помощью керровской линзы, он излучал импульсы с менее

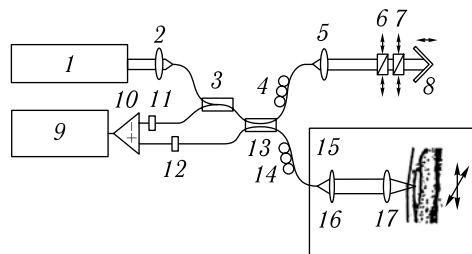


Рис. 14.3. Волоконная ОКТ-система сверхвысокого разрешения на основе титан-сапфирового лазера с синхронизацией мод при помощи керровской линзы [2060]: 1 — KLM титан-сапфировый лазер; 2, 5, 16, 17 — специально изготовленные линзы; 3, 13 — специальные широкополосные волоконные разветвители; 4, 14 — поляризационные контроллеры; 6, 7 — элементы согласования дисперсии; 8 — опорное зеркало; 9 — блок обработки данных на основе компьютера; 10, 11, 12 — двойной балансный детектор; 15 — система сканирования

чем двумя оптическими колебаниями, соответствующие ширине полосы вплоть до 350 нм с центральной длиной волны на 800 нм. Такие характеристики света достигались благодаря специально спроектированным зеркалам двойного чирпа с широкой спектральной полосой отражения и управляемым дисперсионным откликом, используемым в сочетании с призмами со слабой дисперсией из фтористого кальция для внутррезонаторной компенсации дисперсии. Пара призм из плавленого кварца и бритвенные лезвия использовались для спектрального разложения пучка и формирования выходного спектра. Оптическая схема низкокогерентного интерферометра была оптимизирована под источник света со сверхшироким спектром. Использовались специально изготовленные линзы с фокусным расстоянием 10 мм и числовой апертурой 0,30 в сочетании с одномодовыми оптическими волокнами и специальными широкополосными разветвителями. Для исключения уширения интерференционного пакета из-за рассогласования поляризаций использовались регуляторы поляризации. Согласование дисперсии достигалось с помощью призмы переменной толщины из плавленого кварца и ВК7 для достижения однородности дисперсии групповой задержки. ОКТ-система сверхвысокого разрешения оптимизировалась для обеспечения оптического спектра до 260 нм (полная ширина по полувысоте), и было достигнуто продольное разрешение 1,5 мкм в свободном пространстве, что соответствует 1 мкм в биоткани.

Для демонстрации потенциала описанной ОКТ-системы сверхвысокого разрешения были получены *in vivo* томограммы головастика африканской лягушки (*Xenopus laevis*) с субклеточным уровнем разрешения (1 мкм × 3 мкм; продольное × поперечное). На изображениях ясно различаются многочисленные мезанхимальные (стволовые) клетки с различными размерами и отношениями ядро/цитоплазма, обонятельный тракт и внутриклеточная морфология, а также митоз нескольких клеток. Следует заметить, что во всем диапазоне глубин было достигнуто также высокое латеральное разрешение.

14.1.5. Спектральная ОКТ. Метод частотно-модуляционной ОКТ (фурье-ОКТ) основан на спектральной интерферометрии рассеянного назад излучения и поэтому чаще называется методом спектральной ОКТ [109, 116, 127, 139, 142, 156, 1550, 1563]. Одно из главных достоинств этого метода — это то, что он не требует сканирования по глубине образца. Тем не менее, в течение длительного времени после первой демонстрации он не играл заметной роли среди методов ОКТ. Как отмечалось в работе [1563], это происходит, возможно, потому, что достаточно быстродействующие и чувствительные ПЗС-камеры не были доступны в этот ранний

период. В настоящее время ясно, что этот метод обладает огромным потенциалом в том, что касается скорости и чувствительности [109, 116, 127, 139, 142, 156, 1563, 2061, 2062]. Демонстрируемые им значения чувствительности на два–три порядка выше, чем у его временных аналогов [2062, 2063].

Одна из первых демонстраций частотно-модуляционной ОКТ описана в работе [1550]. На рис. 14.4 показана схема соответствующей экспериментальной установки на основе интерферометра Майкельсона и спектрометра с высоким разрешением (спектрального радара), а также оптограмма кожи руки человека, измеренная *in vitro*. Поскольку спектральный радар измеряет амплитуду рассеяния $E(z)$ вдоль оси, идущей от поверхности в глубь объекта, за одну экспозицию приемника без продольного сканирования, время записи томограммы может быть очень мало. С учетом суперпозиции предметного и опорного полей, интенсивность света можно записать в следующем виде [1550]:

$$I(k) = |S(k)|^2 \int_0^{\infty} E(z) \cos(2kz) dz + \dots, \quad (14.1)$$

где k — волновой вектор, $S(k)$ — спектральное распределение амплитуды источника света. Производя обратное преобразование Фурье, можно найти зависимость $a(z)$ амплитуды рассеяния от глубины. Более высокие частоты в принимаемом сигнале соответствуют большим глубинам. Можно оценить максимальную глубину зондирования на основе спектрального разрешения спектрометра. В частности, для спектрометра с разрешением $\Delta\lambda = 0,05$ нм имеем $z_{\max} = (1/4n) (\lambda_0^2/\Delta\lambda) \approx 2,4$ мм ($n = 1,5$, $\lambda_0 = 853$ нм). Для обеспечения отношения сигнал–шум на уровне 10^4 нужно использовать высокочувствительную ПЗС или CMOS-камеру на выходе спектрометра.

Фурье-ОКТ может быть реализована также с использованием лазерной развертки — лазера, быстро перестраиваемого в широкой полосе оптических частот [2063, 2064, 2085]. В ОКТ с лазерной разверткой вместо ПЗС или фотодиодных матриц в приемном канале интерферометра используется единственный фотодиод, что позволяет кодировать спектральный интерферометрический сигнал с характерной частотой гетеродинных биений. Показано, что гетеродинное детектирование в ОКТ с лазерной разверткой позволяет разрешить неоднозначность, связанную с комплексным сопряжением, и устранить спектральные и автокорреляционные артефакты, характерные для спектральной ОКТ [2064].

14.1.6. Доплеровская ОКТ. Доплеровская ОКТ сочетает доплеровский принцип с ОКТ для получения с высоким разрешением томографических изображений статичных и движущихся компонентов в сильно рассеивающих биологических тканях [1566]. Когда свет, рассеянный назад от движущихся частиц, интерферирует с опорным пучком, возникает доплеровский сдвиг (f_{Ds}) интерференционной полосы:

$$f_{Ds} = \frac{2V_s n \cos \theta}{\lambda_0}, \quad (14.2)$$

где V_s — скорость движения частиц; n — показатель преломления среды, окружающей частицы; θ — угол между потоком частиц и пробным пучком света; λ_0 — центральная длина волны источника света в вакууме. Важно, что продольная скорость потока (скорость, параллельная зондирующему пучку) может быть определена путем измерения доплеровского сдвига в локализованных областях объекта в пределах получаемого ОКТ-изображения, а именно в глубине рассеивающей ткани, где обычные доплеровские методы не работают (см. гл. 13). Поперечную же скорость потока можно определить из уширения спектральной полосы, возникающего за счет конечной числовой апертуры зондирующего пучка [1566].

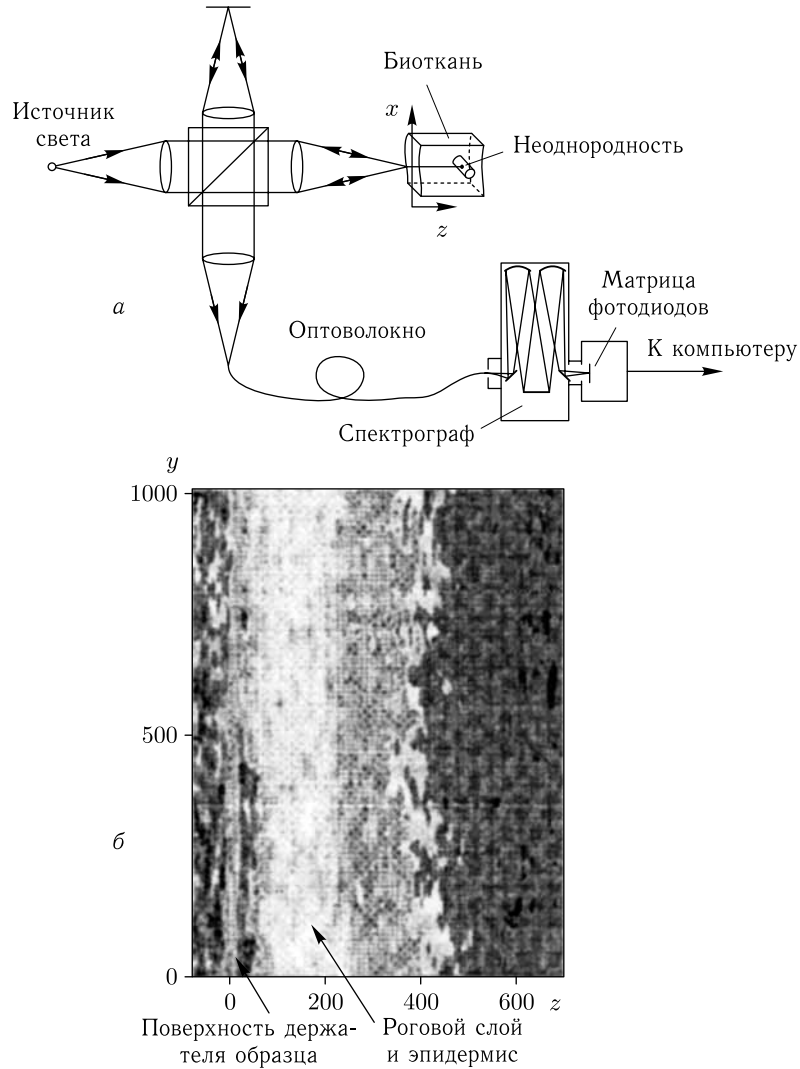


Рис. 14.4. Основная схема спектрального радара (спектральный ОКТ) с источником света, имеющим малую длину когерентности (а) [1550]; оптограмма кожи руки человека *in vitro* (б), по оси ординат отложено латеральное смещение по поверхности кожи в микрометрах, по оси абсцисс — глубина в микрометрах

Сканирование опорного зеркала ОКТ-системы со скоростью v производит доплеровский сигнал на частоте f_D , описываемый формулой (8.53). Поток лимфы или крови со скоростью V_s производит другой доплеровский сигнал, описываемый формулой (14.2). В результате сигнал доплеровской ОКТ пропорционален

$$A(t) \cos [2\pi (f_D - f_{Ds}) t + \phi(t)], \quad (14.3)$$

где $A(t)$ — отражательная способность, а $\phi(t)$ — фазовый сдвиг, определяемый положением рассеивающей частицы.

Волоконно-оптическая доплеровская ОКТ ($\lambda_0 = 850$ нм, $\Delta\lambda = 25$ нм, $P = 1$ мВт) использовалась для измерений скорости потока крови в сосуде, расположенном за тонким рассеивающим слоем в живом объекте (сосуды брыжейки крысы) [1539]. Таким образом был продемонстрирован новый подход к исследованию направленных потоков крови в подповерхностных сосудах под слоем сильно рассеивающей биоткани [1539, 1557–1561, 1566]. Электронная обработка данных позволяет отделить сигнал, характеризующий амплитуду обратного рассеяния и используемый для построения стационарной томограммы объекта, от доплеровского сигнала, по которому определяется скорость рассеивателей в заданной точке объекта. Рисунок 14.5 представляет изображение структуры фрагмента брыжейки крысы с артерией и двумя

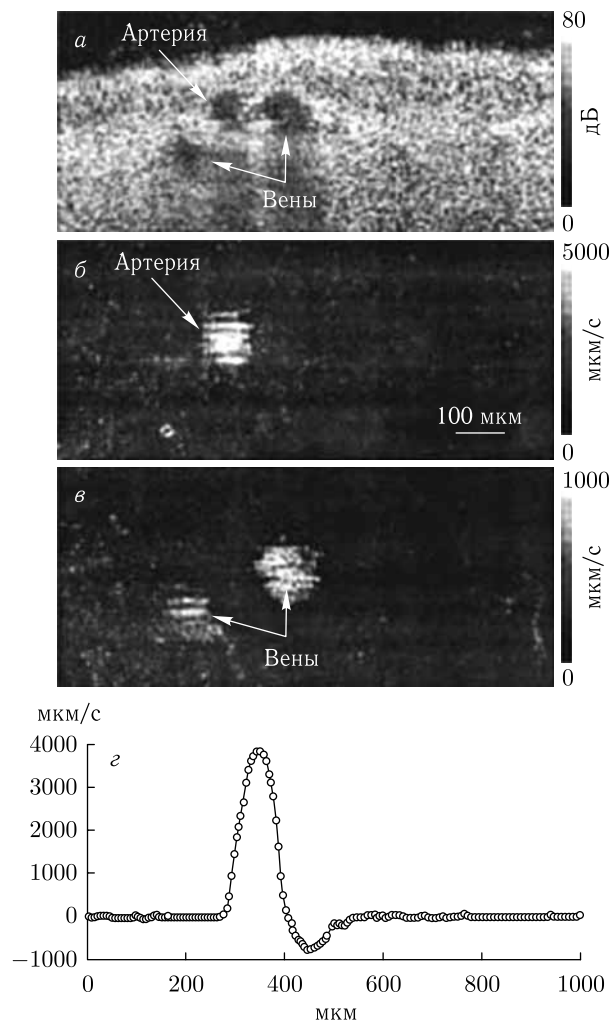


Рис. 14.5. Изображения *in vivo* фрагмента брыжейки крысы: *a* — структурное изображение (показана артерия и две вены); *б* — изображение скорости потока крови в артерии; *в* — изображение скорости потока крови в венах; *г* — профиль скорости кровотока, измеренный на глубине артерии (показанной стрелкой на рис. 14.5 *a*); отрицательный пик в правой части связан с влиянием скорости кровотока в вене [1539]

венами, соответствующие изображения скорости потока крови в артерии и венах и профиль скорости полного кровотока.

14.1.7. Поляризационно-чувствительная ОКТ. Специфичность временной ОКТ можно повысить путем проведения измерений поляризационных свойств зондирующего излучения при его распространении через биоткань. Этот подход был реализован в поляризационно-чувствительном методе ОКТ (ПЧ ОКТ), который детально описан в многочисленных оригинальных работах [624–636, 1544, 2065–2067], нескольких обзорных статьях и книгах [127, 135, 139, 142, 156, 146, 147, 1306, 1565]. Развитые ПЧ ОКТ-системы обеспечивают визуализацию тканей с использованием элементов матриц Джонса [630] или Мюллера [628].

В большинстве исследований по ПЧ ОКТ критерием патологических изменений является измеряемое уменьшение макроскопического двулучепреломления биоткани. Однако достаточно трудно обеспечить корректные измерения двулучепреломления на глубинах более 300–500 мкм. Для более глубоких слоев (до 1,5 мм) можно использовать намного более простой вариант ПЧ ОКТ — кросс-поляризационную ОКТ (КП ОКТ) [1306, 1544]. Деполяризация света, вызванная рассеянием и двулучепреломлением в биоткани, ведет к появлению кросс-поляризованной компоненты света, рассеянного назад. Ряд патологических процессов, например, характеризуется изменениями в количестве коллагеновых волокон и их пространственной организации. Поэтому сравнительный анализ кросс-поляризационных свойств обратного рассеяния нормальной и патологической ткани можно использовать для ранней диагностики неопластических процессов.

Схема экспериментальной системы для получения изображений с помощью обычной ОКТ и КП ОКТ показана на рис. 14.6 [1306, 2065]. С помощью мультиплексора (М) низкокогерентное ИК-излучение от СЛД ($\lambda = 1,3$ мкм и $l_c = 21$ мкм) комбинируется с излучением красного диодного лазера (КДЛ), используемого для юстировки оптической системы. Одна из собственных поляризационных мод сохраняющего поляризацию (РМ) волоконного разветвителя (FC) на уровне 3 дБ выделяется посредством контроллера поляризации (СР). Сохраняющее поляризацию волокно используется для передачи излучения с определенным поляризационным состоянием

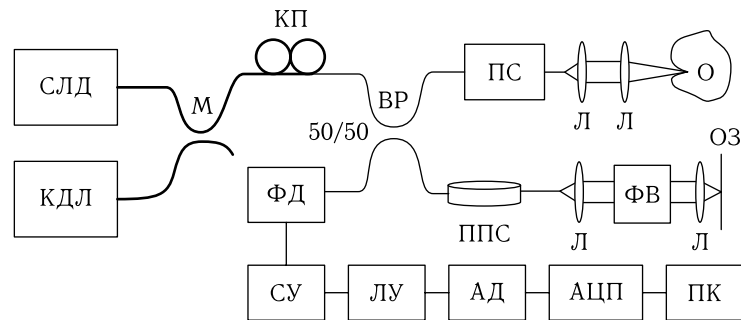


Рис. 14.6. Кросс-поляризационный ОКТ [1306, 2065]: СЛД — суперлюминесцентный диод; КДЛ — красный диодный лазер; М — мультиплексор; КП — контроллер поляризации; ВР — волоконный разветвитель; ПС — поперечный сканер; О — исследуемый объект; ППС — продольный пьезо-сканер; Л — линзы; ФВ — фарадеевский вращатель; ОЗ — опорное зеркало; ФД — фотодиод; СУ — селективный усилитель; ЛУ — логарифмический усилитель; АД — амплитудный детектор; АЦП — аналого-цифровой преобразователь; ПК — персональный компьютер. Жирная линия соответствует одномодовому волокну, тонкая линия — волокну, сохраняющему поляризацию

как в сигнальном, так и в опорном плечах интерферометра. В отсутствие фарадеевского вращателя (F) в опорном плече регистрируется со-поляризованная компонента рассеянного назад излучения (реализуется обычная ОКТ). Фарадеевский вращатель поворачивает произвольное состояние поляризации на заданный угол, а направление поворота определяется только направлением магнитного поля во вращателе и не зависит от направления распространения излучения. Следовательно, в случае поворота фарадеевского вращателя на 45° излучение проходит через него, отражаясь от зеркала, проходит назад через вращатель и становится ортогонально поляризованным. В результате только кросс-поляризованная компонента света, рассеянного назад биологическим объектом, будет интерферировать со светом из опорного плеча. Время захвата одного ОКТ-изображения составляет 1 с. Для всех ОКТ-изображений использовалась логарифмическая шкала интенсивности. Латеральное (поперечное) разрешение системы, определяемое диаметром зондирующего пучка в фокусе, было выбрано близким к аксиальному (по глубине) разрешению, которое определяется длиной когерентности и составляло 21 мкм. Оба типа изображений — обычное и кросс-поляризованное — получались от одного и того же участка биоткани.

Рисунок 14.7 (цветная вклейка) демонстрирует возможности метода кросс-поляризационной визуализации по сравнению с обычным методом на примере изображения *ex vivo* ткани рубца пищевода человека. Хорошо видно, что в отличие от обычной ОКТ, кросс-поляризационное изображение содержит дополнительную структурную информацию.

14.1.8. Дифференциальная фазочувствительная ОКТ. Дифференциальная фазочувствительная ОКТ (ДФЧ ОКТ) дает количественные данные о дисперсии, важные для описания распространения света через биоткани, в фоторефрактивной хирургии и измерениях показателей преломления биотканей и крови [142]. Изменения показателя преломления объекта вызывают изменения фазы предметного пучка. Одна из схем ДФЧ ОКТ представлена на рис. 14.8 [1874]. Зондирующий пучок делится двулучепреломляющими клиньями и коллимируется осветительной линзой. Два ортогонально ориентированных пучка, разделенных расстоянием x , освещают образец. Рассеянные назад пучки комбинируются двулучепреломляющими клиньями, а в приемном плече, будучи предварительно смешанными с опорным пучком в волоконном смесителе (50×50), они разделяются поляризационным делителем пучка (призмой Волластона). Из сигналов фотоприемника получаются три интерферограммы: два изображения интенсивности и одно — разности фаз. Эксперименты показывают, что в прозрачных и рассеивающих средах можно обеспечить измерение разности хода ($(\lambda/4\pi)\Delta\varphi$) между пучками в ангстремно-нанометровом диапазоне [142, 1874]. Было показано, что метод ДФЧ ОКТ подходит для неинвазивного высокочувствительного и точного мониторинга малых концентраций веществ, включая глюкозу (см. разд. 9.8.1) [1874]. Поскольку ДФЧ ОКТ регистрирует фазовый контраст в направлении разделения пучка, то регистрируются градиенты фазы, обусловленные поперечными изменениями показателя преломления и/или изменением фазы при отражении от поверхностей [142].

14.1.9. ОКТ полного поля. Обычная временная ОКТ обеспечивает регистрацию коэффициента отражения последовательно, точка за точкой, при этом для получения 3-мерных изображений необходимо обеспечить сканирование как по продольной, так и по двум поперечным координатам. Хотя временные ОКТ-системы позволяют регистрировать двумерные изображения с высокой скоростью, вплоть до видео-скоростей, однако они имеют ограниченную чувствительность или ограниченное произведение «пространственная координата · ширина полосы» (число разрешенных пикселей по координате) [142]. Полнополевая или параллельная ОКТ использует

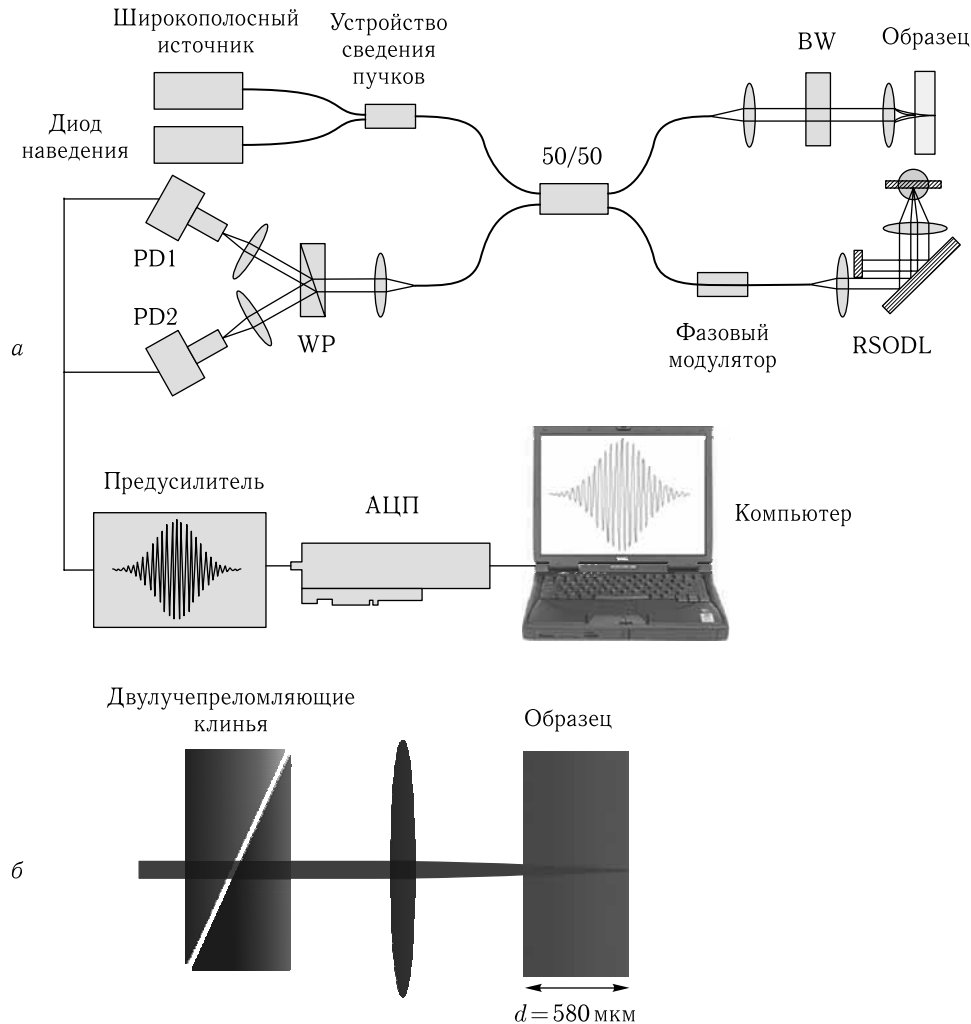


Рис. 14.8. Фазочувствительная ОКТ-система [1874]: *a* — общая схема; WP — призма Волластона; RSODL — быстрая сканирующая оптическая линия задержки; PD — фотоприемники; BW — двулучепреломляющие клинья; АЦП — аналого-цифровой преобразователь; *б* — предметное плечо

линейки или двумерные матрицы из N и N^2 отдельных приемников соответственно. Преимущество параллельной ОКТ в том, что отношение сигнал-шум при использовании линейки или матрицы приемников может быть примерно в \sqrt{N} или N раз выше, чем при сигнале от одного приемника. Недостатки, возникающие при использовании стандартных ПЗС-датчиков, связаны с их интегрирующим по времени режимом работы, что исключает работу на переменных сигналах, детектирование методом смещения или синхронизации мод. Для преодоления этих проблем вместо обычной синхронной регистрации можно использовать синхронное освещение для обеспечения синхронизации всех пикселей ПЗС-приемника или использовать линейку CMOS-приемников [142]. В CMOS-камере каждый «интеллектуальный пиксель», включающий фотоприемник и аналоговую обработку сигнала, осуществляет гетеро-

динное детектирование параллельно, таким образом резко увеличивая динамический диапазон по сравнению с ПЗС-камерой. Такая двумерная «матрица интеллектуальных пикселей-детекторов», дающая возможность записи набора данных из 58×58 пикселей для 33 срезов с частотой захвата 6 Гц представлена на рис. 14.9.

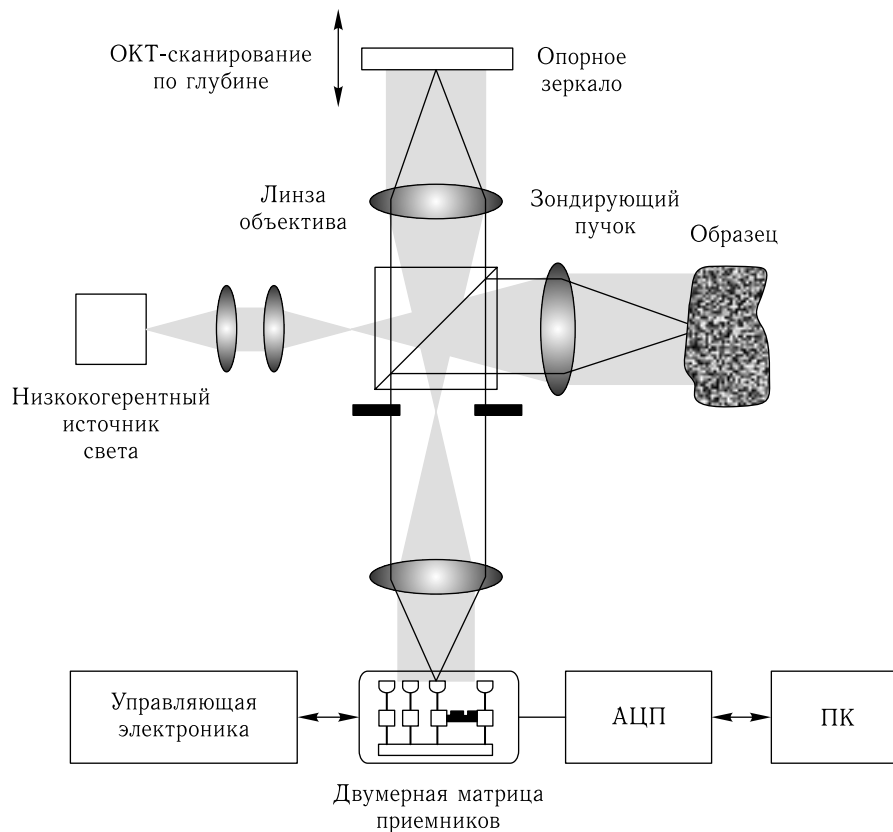


Рис. 14.9. Установка для параллельной (полного поля) ОКТ с двумерной матрицей CMOS-детекторов 58×58 пикселей, где каждый детектор параллельно осуществляет гетеродинный прием (Буркен и др., 2001) [142]

В полнополевой ОКТ для улучшения разрешения по глубине также можно использовать тепловой источник света [142, 2068, 2069]. В модифицированном микроскопе Линника применение галогенной лампы с вольфрамовой нитью накаливания мощностью 100 Вт позволило получить разрешение 1,2 мкм [2068]. Для компенсации дисперсии использовалась водная иммерсия; соответствующие линзы иммерсионного объектива с $NA = 0,3$ обеспечивали поперечное разрешение около 1,3 мкм. Трехмерное ОКТ-изображение глаза головастика *Xenopus laevis* было синтезировано из 300 томографических изображений.

Бесконтактная трехмерная топография поверхности кожи человека необходима для мониторинга лечения ран и ожогов, наблюдения побочного действия сильнодействующих медицинских препаратов и т. д. На рис. 14.10 показана одна из первых полнополевых ОКТ систем, так называемый когерентный радар на основе интерферометра Майкельсона и низкокогерентного источника света (светодиод, СД) [1550].

Сканируя опорное зеркало, можно получить трехмерные изображения поверхности кожи с разрешением в пределах длины когерентности источника света. Однако, поскольку «когерентный радар» должен сканировать глубину всего объекта, а для описываемого устройства скорость сканирования была ограничена (4 мкм/с), время измерения было велико (около 150 с), а поле освещения, в свою очередь, было ограничено мощностью СД и составляло $7 \times 10 \text{ мм}^2$. Влияние объемного рассеяния можно исключить, если кожу покрыть светозащитным составом, например графитовой пудрой [1550]. В связи с тем, что за последние годы яркость светодиодов и чувствительность матричных фотоприемников, выпускаемых промышленностью, существенно возросли, быстродействие «когерентного радара», описанного типа, может быть существенно улучшено.

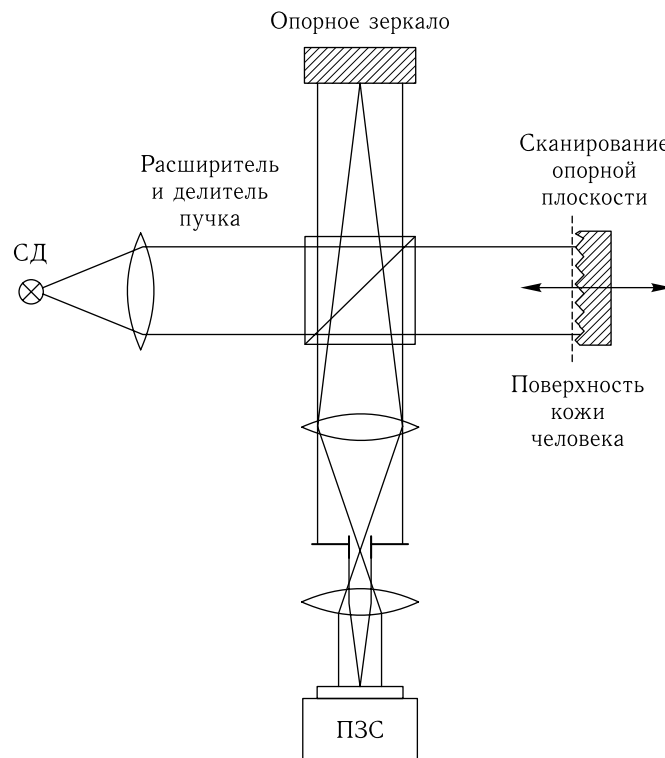


Рис. 14.10. «Когерентный радар» для исследования трехмерной топологии поверхности кожи [1550]: СД — светодиод; сканирование опорной плоскости показано штриховой линией

14.1.10. Оптическая когерентная микроскопия. Оптическая когерентная микроскопия (ОКМ) представляет новые возможности для биомедицинских исследований, сочетая предельные возможности послойного анализа биоткани, присущие ОКТ и конфокальной микроскопии [1416, 1567]. В ОКМ послойная селекция изображения ткани за счет острой фокусировки зондирующего пучка и его ограничения точечной диафрагмой в приемной части, присущих конфокальной микроскопии, дополнительно усиливается за счет когерентного стробирования, применяемого в ОКТ.

Рисунок 14.11 иллюстрирует результаты сравнительного анализа потенциальных возможностей конфокальной микроскопии и ОКМ полного поля для визуализации

ции [2070]. В последнем случае получено значительно лучшее качество реконструированных изображений. Предметное плечо низкокogerентного интерферометра состоит из высокоскоростного сканирующего конфокального микроскопа (КМ) с быстродействующим сканером (резонансный сканер или вращающееся многогранное зеркало) и медленным сканером (гальванометрическое сканирующее зеркало). Медленный сканер располагался в плоскости изображений быстрого сканера. Для исключения механического сканирования фазовой задержки в опорном плече использовался акустооптический модулятор (АОМ) на 40 МГц в сочетании с неподвижным зеркалом, который сдвигал частоту света в опорном плече из-за двойного прохождения через АОМ. Таким образом обеспечивалось соответствие оптических длин путей опорного и предметного плеча. Установка превращалась в КМ путем блокирования опорного плеча и регистрации постоянного сигнала, поступающего из предметного плеча. Оба набора изображений записывались со скоростью 8 кадров в секунду с многогранным зеркалом в качестве быстрого сканера. Каждое изображение представляет собой один кадр видеозаписи. Поскольку вращающееся многогранное зеркало вызывает изменение оптической длины пути в предметном плече интерферометра во время реконструкции ОКМ-изображения, вводился дополнительный сдвиг рабочей частоты АОМ в процессе сканирования образца. Этот сдвиг при переходе от одной стороны изображения к другой равнялся 3 МГц. Так путем сдвига центральной частоты с 80 на 83 МГц захватывалось полнополюсовое ОКТ-изображение.

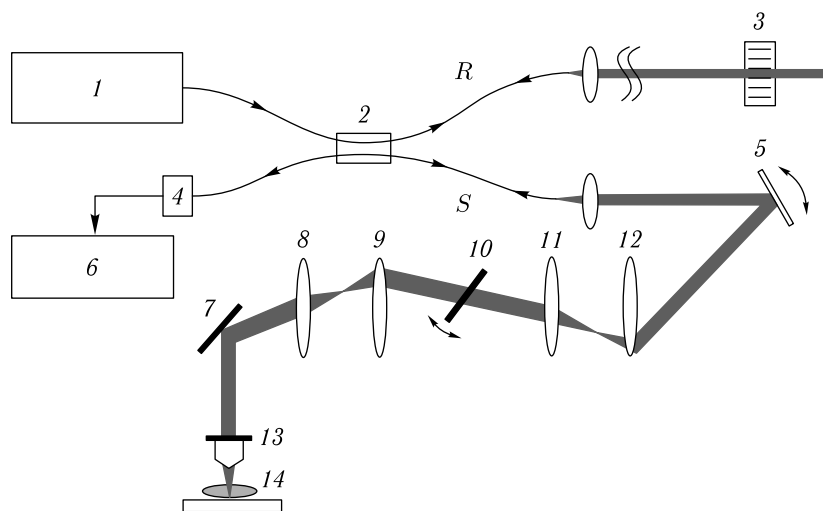


Рис. 14.11. Оптическая схема высокоскоростного полнополюсового оптического когерентного микроскопа [2070]: 1 — низкокogerентный источник света; 2 — волоконно-оптический интерферометр; 3 — акустооптический модулятор; 4 — приемник; 5 — резонансный сканер; 6 — блок обработки данных на основе компьютера; 7 — зеркало; 8, 9, 11, 12 — линзы; 10 — гальванометр; 13 — объектив микроскопа; 14 — образец; R, опорное плечо; S, предметное плечо. Путем блокирования опорного плеча система может превращаться в конфокальный сканирующий микроскоп

Разработан компактный ОКМ с гибким предметным плечом и дистанционным оптическим зондом для оборудования лабораторий и клиник [1416]. Для достижения аксиального разрешения на клеточном уровне использовался источник света с эффективной шириной полосы 100 нм. Источник света включал два СЛД на

однослойных квантоворазмерных гетероструктурах (GaAl)As со смещенными спектрами. Излучение от обоих СЛД направлялось в сохраняющую поляризацию (СП) оптоволокно через мультиплексор. Мультиплексор был спектрально отрегулирован так, чтобы ширина автокорреляционной функции была минимальной. Динамическая фокусировка обеспечивалась сканированием выходной линзы объектива, расположенной на самом конце предметного плеча. Движением линзы управляла электронная система, обеспечивалась юстировка фокального пятна с когерентным стробированием во время сканирования до глубины 0,5–0,8 мм внутрь биоткани. Спектральные боковые лепестки, возникающие из-за неравномерности спектра источника света, подавлялись.

14.1.11. Эндоскопическая ОКТ. Применение волоконно-оптических кабелей для доставки и сбора излучения позволяет создать гибкие низкокогерентные системы визуализации, обеспечивающие возможность эндоскопического анализа биотканей и органов человека. В частности, система ОКТ для эндоскопических приложений (высокоскоростной внутриартериальной визуализации *in vivo*) описана в работе [1538]. Твердотельный форстеритовый лазер (Cr^{+4} :Forsterite) с синхронизацией мод методом керровской линзы со средней длиной волны 1280 нм и шириной полосы 75 нм использовался как источник освещения. Таким образом, теоретическое аксиальное разрешение системы можно оценить как 10 мкм (см. формулу (8.54)); измерение фактического разрешения по глубине стандартным методом с помощью зеркала дало размер аксиального пикселя в 9,2 мкм. Латеральное разрешение этой системы, зависящее от размера пятна используемой линзовой системы на выходном конце освещающего волокна, было равно 30 мкм с конфокальным параметром, равным 1,74 мм. Электроника позволяла захватывать 4 кадра в секунду для 512 пикселей поперечного изображения. Мощность оптического излучения, падающего на отображаемую ткань, составляла примерно 10 мВт. Соответствующее отношение сигнал–шум было равно 106 дБ. Устройство сканирования задержки фазы в опорном плече состояло из колеблющегося зеркала гальванометра, линзы и дифракционной решетки.

В литературе описаны разнообразные оптоволоконные приборы для эндоскопической ОКТ-визуализации (см. например [156, 1306, 1582, 2070, 2077, 2081, 2082]). Одним из примеров является волоконно-оптический сканирующий катетер для внутриартериальной визуализации [2070]. Такой катетер состоит из элемента оптической связи на проксимальном конце, одномодового волокна в качестве канала подачи света и элементов, фокусирующих и направляющих свет, на дистальном конце. В начале проксимального конца устройства падающий свет от фиксированного одномодового оптического волокна ответвляется через узкий воздушный зазор во второе одномодовое волокно, которое может вращаться. В блоке привода катетера, расположенном на проксимальном конце, используется оптоволоконный соединитель. Зубчатая передача прикреплена к соединителю и осевому блоку, состоящему из соединителя, волокна в катетере и дистальных фокусирующих элементов. Электродвигатель постоянного тока приводит в движение осевой блок через зубчатую передачу. Пучок фокусируется линзой с распределенным показателем преломления и направляется микропризмой. Пучок сканируется по кругу посредством вращения кабеля, волокна и оптического блока внутри неподвижного корпуса. Потери мощности за счет неоптимальной связи и внутренних отражений в катетере составляли 3–4 дБ. Например, изображение *in vivo* трахеи кролика, полученное при помощи описанной системы, позволяло дифференцировать различные тканевые структуры, такие как псевдостратифицированный эпителий, слизистая и окружающий гиалиновый хрящ [2070].

Создано целое семейство диагностических эндоскопических ОКТ-приборов, пригодных для изучения различных внутренних органов [2071]. Для зондирования поверхности внутреннего органа было разработано миниатюрное электромеханическое устройство (оптический зонд), контролирующее и осуществляющее латеральное сканирование. Этот зонд расположен на дистальном конце предметного плеча, и его размеры подобраны под диаметр и радиус кривизны стандартных каналов эндоскопов для биопсии. На рис. 14.12 *а* показана головка эндоскопа для желудочно-кишечных исследований со встроенным ОКТ-сканером [1306]. Схема оптического сканирующего зонда и его расположение относительно исследуемого объекта показаны на рис. 14.12 *б*. Зондирующий пучок сканируется по поверхности ткани с амплитудой 2 мм. Система отклонения пучка построена по гальванометрическому принципу, необходимое напряжение в пределах 5 В подается на дистальный конец эндоскопа. Расстояние между выходной линзой и образцом меняется от 5 до 7 мм, диаметр фокального пятна 20 мкм. Оптический сканирующий зонд и часть гибкого предметного плеча, вставленная в эндоскоп, герметизированы, так что перед клиническим использованием устройства можно произвести обычную процедуру очистки и стерилизации. Реализация протяженного гибкого плеча ОКТ-интерферометра стала возможной благодаря использованию оптических волокон, сохраняющих поляризацию, для передачи низкокогерентного зондирующего света. Это позволяет исключить потери поляризации из-за ее возмущения в местах изгиба плеча эндоскопа. Устройство оснащено высококачественными волоконными поляризаторами и разветвителями. «Однокадровый» динамический диапазон ОКТ-схемы, определенный как максимальное изменение мощности отраженного сигнала в пределах одного кадра изображения, достигает 25–40 дБ. При скорости сканирования 45 см/с и глубине изображения 3 мм (в единицах свободного пространства) ОКТ-изображение с 200×200 пикселями снимается примерно за 1 с. Такая частота захвата достаточна для исключения влияния движений внутренних органов (артефактов движения) на качество изображения.

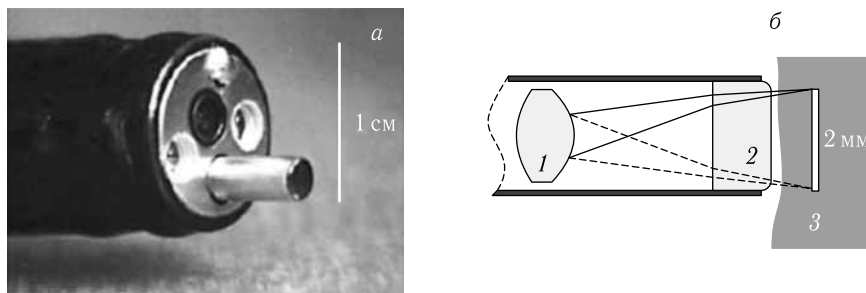


Рис. 14.12. Дистальный конец гастроскопа с ОКТ-зондом, вводимым через канал для биопсии (*а*) [1306]; схема сканирующего блока (*б*): 1 — выходная линза, 2 — стеклянное окно выхода, 3 — образец, область сканирования 2 мм

14.1.12. Спекл-ОКТ. Оригинальный метод когерентной томографии, который не требует поперечного сканирования и использует спеклы при рассеянии света на объекте, описан в работе [1537]. На рис. 14.13 показана схема экспериментальной установки, состоящей из СЛД, открытого зеркального интерферометра Маха–Цендера и ПЗС-камеры. Излучение источника света фокусируется на поверхность объекта. Падающий пучок света облучает поверхность под углом 45° . Свет проникает в ткань и претерпевает рассеяние. Рассеянный обратно свет достигает поверхности объекта. Часть этого света, распространяющаяся перпендикулярно поверхности, отображается

ПЗС-камерой, где этот пучок света смешивается с излучением опорной волны, отраженным от зеркала, сканируемого с постоянной скоростью. Наблюдение рассеянного света с апертурой конечных размеров дает субъективные спеклы в плоскости изображения (на светочувствительной поверхности ПЗС-камеры).

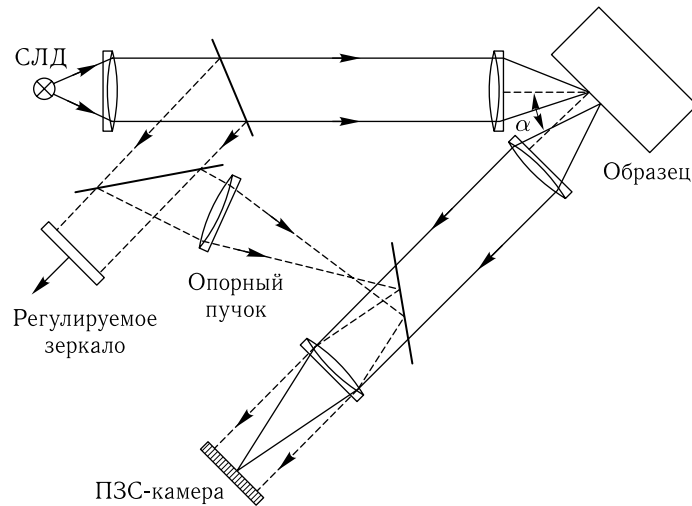


Рис. 14.13. Когерентно-оптическая томографическая схема на основе субъективных спеклов [1537]: СЛД — суперлюминесцентный диод ($P = 4$ мВт, $\lambda = 850$ нм и $l_c = 30$ мкм); α — угол падения излучения на поверхность образца

В случае, когда используется частично-когерентный свет, нужно рассматривать различные группы фотонов, проходящих через плоскость изображения P_i . Каждая из этих групп состоит из фотонов, прошедших определенный путь $l_i \pm l_c$. Соответственно, эти фотоны создают свою собственную спекл-структуру с распределением интенсивности $S_i(x, y)$. Результирующая спекл-структура создается за счет некогерентной суперпозиции $\sum S_i$ различных спекл-структур. Для определения положения областей внутри объекта, от которых приходят фотоны с определенной длиной пути $L = l_i$, нужно наложить опорную волну с соответствующей длиной пути L . Тогда только фотоны из выбранной группы P_i будут обеспечивать требуемый контраст V_I , подлежащий измерению. Для измерения V_I нужны две последовательные экспозиции. После первой экспозиции фаза поля в опорном пучке сдвигается на π , и экспозиция повторяется. Некогерентная компонента остается неизменной в этих двух экспозициях и легко исключается вычитанием. Заметим, что размеры субъективных спеклов должны быть адаптированы к размерам пикселей ПЗС-камеры. Максимальный контраст достигается, когда длина когерентности l_c настолько велика, насколько это возможно для данного разрешения.

В обработанном таким образом изображении темные пятна спекл-модуляции изображения поверхности будут обусловлены парциальными компонентами рассеянного поля, которые прошли одинаковое расстояние, но вдоль различных индивидуальных путей. Особенностью регистрируемого изображения является резко искривленный край импульсного отклика — «фотонный горизонт». Эта кривая определяет максимальную глубину проникновения в анализируемой рассеивающей системе для каждой опорной длины пути. Таким образом, различные глубины проникновения могут быть визуализированы путем подходящей установки опорной длины пути.

Рисунок 14.14 показывает характер этих изображений, полученных с разными источниками света.

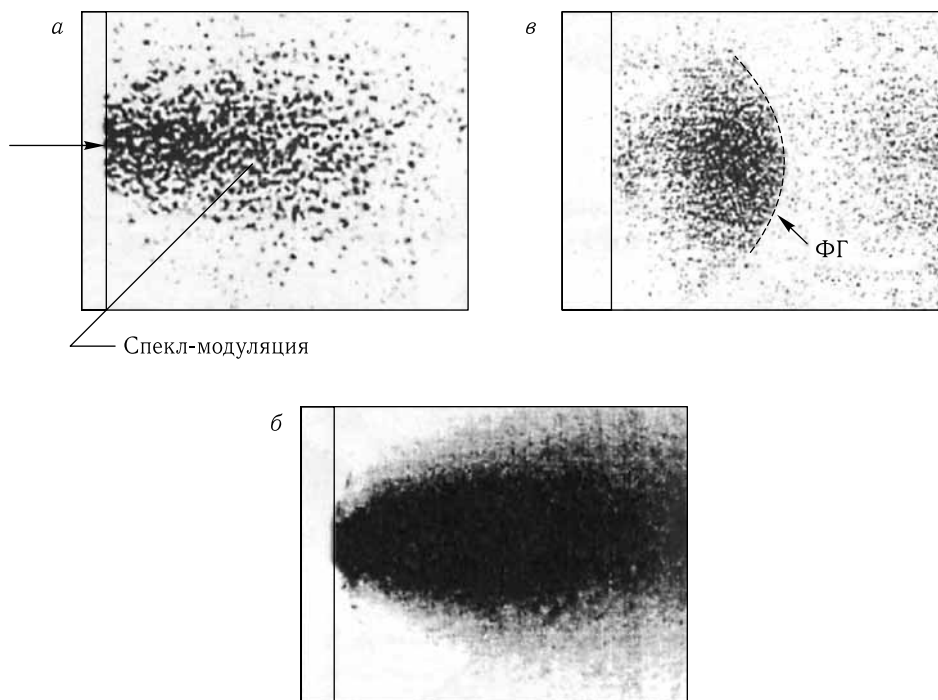


Рис. 14.14. Изображения процесса рассеяния с различными длинами когерентности и различными типами наблюдения [1537]: *a* — полностью когерентное освещение, прямое наблюдение; *б* — широкополосное освещение, прямое наблюдение; *в* — широкополосное освещение, выделение когерентной части; штриховая линия показывает положение «фотонного горизонта» (ФГ)

Разрешение по длине пути для этой системы определяется длиной когерентности l_c , и для используемого источника света с $l_c = 30$ мкм результирующее разрешение по времени равно примерно 100 фс [1537]. Главным достоинством этой схемы является то, что генерация двумерной ($x-z$)-томограммы не требует поперечного сканирования пучка. В применении к визуализации макроскопически неоднородных рассеивающих фантомов и кожи человека *in vivo* метод «фотонного горизонта» продемонстрировал интересные результаты [2072]. В случае исследования кожи человека из-за интегрирования спекл-модулированных изображений по времени в течение экспозиции, требуются меньшие времена экспозиции, чем при исследовании неподвижных рассеивающих объектов. Тем не менее, времени экспозиции 40 мс достаточно для обеспечения адекватного качества изображений биотканей человека в методе «фотонного горизонта».

На основании полученных результатов можно заключить, что метод «фотонного горизонта» позволяет получать двумерные поверхностные изображения сильно рассеивающих сред с разрешением лучше 10 фс и глубиной зондирования до 350 мкм. Это вполне дает возможность применять такой метод визуализации для обнаружения патологических изменений кожи человека (например, злокачественной меланомы).

Недавно было показано, что метод спекл-ОКТ альтернативен доплеровской ОКТ при двумерном отображении кровотока [1973]. Информацию о потоке можно

извлечь из флуктуаций спеклов в обычной амплитудной ОКТ. Временные изменения спеклов проявляются в пространственных частотах спеклов, модулирующих ОКТ-изображения. Было показано, что в некотором диапазоне скоростей отношение высоких и низких пространственных частот ОКТ-изображения линейно связано со скоростью потока и что этот метод чувствителен к кровотоку во всех направлениях без необходимости привлечения фазовой информации. С использованием спекл-ОКТ были получены двумерные изображения распределения кровотока в коже хомяка *in vivo* [1973].

14.2. Оптическая гетеродинная визуализация

Для когерентной гетеродинной оптической регистрации характерен ряд преимуществ по сравнению с методами прямого детектирования [1, 3, 28, 1519, 1520, 1568, 2021–2023, 2092–2098]:

- наивысшая чувствительность среди всех методов регистрации; отношение сигнал–шум на несколько порядков выше, чем можно достичь некогерентными методами;
- исключительно широкий динамический диапазон, примерно 15 порядков или более по мощности сигнала при ширине полосы порядка герца;
- отличная селективность или способность к фильтрации по частоте и поляризации;
- высокое пространственное разрешение, до 60–80 линий на мм (с конфокальной оптикой);
- значительная пространственная селективность или способность к фильтрации из-за направленных антенноподобных свойств;
- возможность количественного определения новых параметров биоткани путем регистрации деградации волнового фронта внутри данной ткани.

Если использовать обычный фотоэлектронный приемник, то квантовый предел оптической регистрации соответствует ограниченному сигналом дробовому шуму. Минимальная мощность сигнала, доступного регистрации, дается выражением [2094]

$$P_{\min} = \frac{h\nu B_d}{\eta_q}, \quad (14.4)$$

где $h\nu$ — энергия фотона, B_d — ширина полосы приема, а η_q — квантовая эффективность приемника. В случае прямого детектирования этот предел недостижим. Только оптическая гетеродинная регистрация и методы счета фотонов позволяют реализовать этот стандартный квантовый предел детектирования.

Поле зрения оптической гетеродинной системы, имеющей эффективную апертуру A , для сигналов на длине волны λ , приходящих в пределах одного главного лепестка диаграммы направленности, определяется телесным углом [2094]

$$\Omega \approx \frac{\lambda^2}{A}. \quad (14.5)$$

Антенные свойства дают высокое пространственное разрешение для обнаружения, локализации и построения изображений различных биологических объектов, а также отличную направленность, чтобы отличить одно характерное направление от другого.

Благодаря этим важным особенностям, позволившим регистрировать и визуализировать очень слабые сигналы на фоне сильных шумовых помех, метод оптического гетеродинирования имеет перспективы в приложениях в спектроскопии и визуализации биотканей [1, 2092–2096]. Метод визуализации с когерентным детектированием (ВКД), основанный на технике оптического гетеродинирования, предложил Инаба

в 1989 г. (см. работы [1, 3]). ВКД — метод когерентного стробирования, который выделяет многократно рассеянный вперед пучок, сохраняя прямую геометрическую корреляцию с падающим пучком света, из диффузной компоненты прошедшего света, которая из-за многократного рассеяния обычно утрачивает свойства падающего пучка, такие как когерентность, направленность и поляризация.

Метод оптического гетеродинного детектирования работает на принципе смешения двух оптических волн с различными частотами $((\omega_0 + \omega_1)$ и $(\omega_0 + \omega_2)$, где ω_0 — оптическая частота, ω_1 и ω_2 — радиочастоты модуляции) на квадратичном детекторе (фотодиоде) (см. рис. 14.15). Сигнал, генерируемый фотодетектором, есть прямое произведение двух оптических полей — сигнального

$$\sqrt{I_1(t, x, y)} \cdot \sin [(\omega_0 + \omega_1) t + \phi(t, x, y)], \quad (14.6)$$

и гетеродинного

$$\sqrt{I_2} \cdot \sin [(\omega_0 + \omega_2) t], \quad (14.7)$$

и может быть выражен как

$$\propto \sqrt{I_1(t, x, y)} \cdot \sqrt{I_2} \cdot \sin [(\omega_1 - \omega_2) t + \phi(t, x, y)], \quad (14.8)$$

где $\sqrt{I_1(t, x, y)}$ и $\sqrt{I_2}$ — амплитуды сигнальной и гетеродинной волн; t , x и y — время и пространственные координаты; $\phi(t, x, y)$ — зависящий от координат и времени фазовый сдвиг, обусловленный пространственными и временными флуктуациями рефракции исследуемой биоткани.

Амплитуда сигнала подвержена временным и пространственным флуктуациям из-за зависящего от координат и времени ослабления света тканью. Интенсивность сигнальной волны, ослабленной биотканью толщины $d(t, x, y)$, можно вычислить как (см. уравнение (1.1))

$$I_1(t, x, y) \approx I_{10} \exp [-\mu_t(t, x, y)d(t, x, y)], \quad (14.9)$$

где I_{10} — интенсивность сигнальной волны, падающей на объект; $\mu_t(t, x, y)$ — распределение коэффициента ослабления.

Типичная схема ВКД показана на рис. 14.15. Хорошо коллимированный оптический пучок непрерывного одномодового лазера (аргонового: Ar (514,5 нм), гелий-неонового: He:Ne (633 нм), криптонового: Kr (647,1 нм), титан-сапфирового: Ti:Al₂O₃ (перестраиваемого в диапазоне 700–1000 нм) или гранатового: Nd:YAG с диодной накачкой (1064 и 1319 нм)) с мощностью в несколько десятков милливольт разделяется на сигнальный и гетеродинный пучки. Гетеродинный и сигнальный пучки сдвигаются по частоте (модулируются) парой акустооптических модуляторов на 80 и 80,05 МГц соответственно. Сигнальный пучок (примерно 0,8 мм в диаметре) после прохождения через объект (палец человека) смешивается с гетеродинным пучком на кремниевом фотодиоде, генерирующим сигнал на промежуточной частоте (ПЧ) (частоте биений) (см. соотношение (14.8)). Сигнал ПЧ подается на анализатор, реализующий быстрое преобразование Фурье и соединенный с персональным компьютером. Динамический диапазон системы, определяемый как $P_{\text{sat}}/P_{\text{min}}$, где P_{sat} — оптическая мощность, при которой приемник насыщается, а P_{min} — минимальная детектируемая оптическая мощность, составляет около 140 дБ. Нужно заметить, что мощность сигнала пропорциональна амплитуде сигнала ПЧ по всему динамическому диапазону гетеродинной системы. Можно зарегистрировать очень низкую оптическую мощность порядка 10^{-17} Вт на длине волны 800 нм при ширине полосы приема в несколько герц.

С использованием описанной системы ВКД была успешно осуществлена двумерная (проекционная) визуализация различных биологических объектов *in vitro* и *in vivo*, таких как куриные ноги и яйца, образцы опухолей человека, зубы

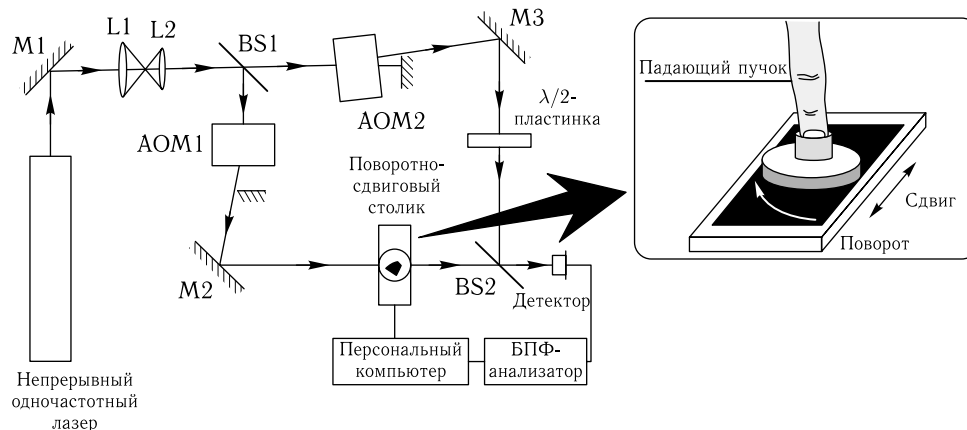


Рис. 14.15. Схема системы визуализации с когерентным детектированием (ВКД) [2095]: L1 и L2 — коллимирующие линзы; M1, M2 и M3 — зеркала с антиотражающим покрытием; BS1 и BS2 — делители пучка; АОМ1 и АОМ2 — акустооптические модуляторы. На врезке схема закрепления пальца на сканирующем устройстве

человека, кости животных, голова мышонка и палец человека [1, 2094–2096]. Пространственное разрешение системы составляло от 0,3 до 0,5 мм в зависимости от используемых оптических и сканирующих устройств. В качестве примера данные рис. 14.15 и 14.16 иллюстрируют применение системы ВКД для томографического исследования пальца здорового добровольца. Указательный палец закреплялся на столике, который мог двигаться и поворачиваться шаговым двигателем (как показано на вставке рис. 14.15). Основание пальца слегка охватывалось силиконовой трубкой для уменьшения потока крови к его поверхности. Эта процедура была существенной, особенно при визуализации на длине волны 715 нм, для уменьшения влияния на сигнал ПЧ эффекта Доплера, обусловленного кровотоком. Показанное на рис. 14.16 а изображение было реконструировано с использованием 30 проекций. Данные для каждой проекции состоят из усредненной (по 32 точкам) амплитуды сигнала ПЧ для каждого шага сканирования со сдвигом на 0,5 мм поперек сустава пальца. Усреднение сигнала ПЧ было необходимо для минимизации спекл-эффекта. После каждого поступательного сканирования палец поворачивался на 6° и сканирование повторялось. Для каждого набора данных палец поворачивался на 180°. Обработка данных производилась методом обратной проекции с фильтрацией, который используется в рентгеновской компьютерной томографии (КТ) при реконструкции изображений.

На рис. 14.16 показано лазерное ВКД томографическое изображение пальца (в области сустава, соответствующего головке проксимальной фаланги), полученное на длине волны 1064 нм, а также, для сравнения, изображения, полученные другими методами, такими как рентгеновская КТ и магнитно-резонансная томография (МРТ). Диаметр пальца в плоскости измерения был ~ 14 мм, мощность падающего света ~ 25 мВт. Данные для каждого изображения накапливались в течение ~ 25 мин. Толщина слоя секционирования на рентгеновском и МРТ изображениях оценивалась как 5 и 3 мм соответственно, тогда как для изображения ВКД эта оценка составила 0,5 мм. Использование двумерного массива гетеродинных детекторов может помочь в увеличении поперечного разрешения и сокращении времени измерений [2095].

Из-за ограниченности известных данных об оптических свойствах компонентов биотканей пальца человека сложно идентифицировать все структуры на ВКД-картине. Однако, по сравнению с рентгеновским и МРТ изображениями видны некото-

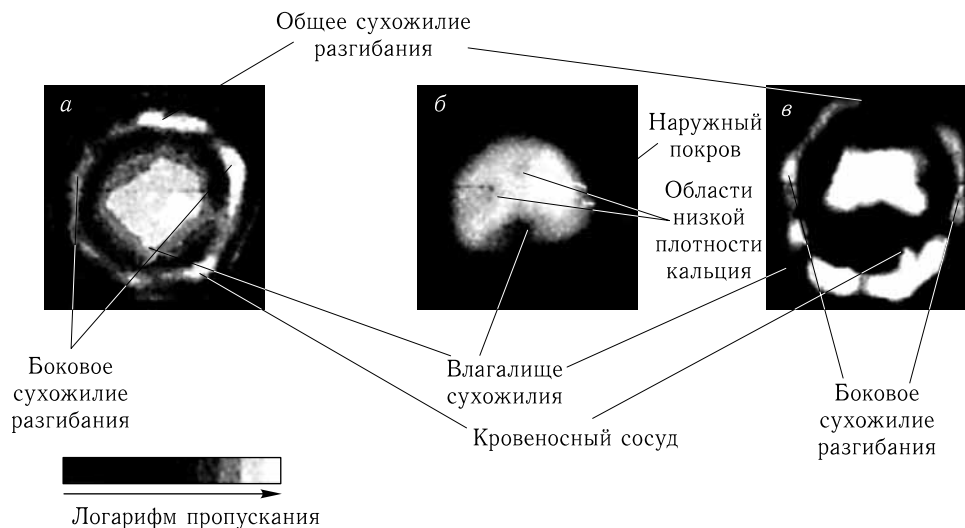


Рис. 14.16. Томографические изображения в области сустава, соответствующего головке проксимальной фаланги указательного пальца здорового человека [2095]: *a* — лазерное ВКД-изображение, полученное с Nd:YAG-лазером, работающим на длине волны 1064 нм; *б* — рентгеновское изображение; *в* — магнитно-резонансное изображение (МРТ)

рые дополнительные структуры, которые могут соответствовать связкам, влагалищам сухожилий и т.п. Использование отношения изображений, полученных на двух разных длинах волн, широко применяемое в диффузной оптической томографии, может помочь в идентификации этих субструктур и ВКД-методом. Зондирование на разных длинах волн должно обеспечить как дополнительную структурную, так и функциональную информацию и может использоваться для ранней диагностики ревматического артрита, как это было показано с использованием другого оптического метода [2097]. Заметим, что более ранние оптические томографические исследования руки человека с использованием стационарной [2097] и временной (волны фотонной плотности) [875] методов визуализации не дали такого высокого пространственного разрешения, как метод ВКД.

В работах [1568, 2098] был продемонстрирован метод прямого измерения среднего квадрата амплитуды гетеродинных биений (ПЧ) и его пропорциональность перекрытию распределений фазового пространства Вигнера для гетеродинного и сигнального полей. Такие распределения дают максимум информации о рассеянном поле при визуализации. Был реализован динамический диапазон экспериментальной установки (см. рис. 14.17) более чем 13 порядков величины для лазерной мощности всего лишь 2 мВт. При увеличении мощности гетеродинного и входного пучков до 10 мВт ожидается увеличение динамического диапазона до 15 порядков. В установке для гетеродинных экспериментов используется пучок гелий-неонового лазера, который делится на гетеродинный пучок (ГП) и пучок, подаваемый на образец, оба мощностью по 1 мВт. Пучок, прошедший через образец, смешивается с ГП с помощью делителя 50×50 (BS2). Технические шумы подавляются с использованием стандартной системы балансного детектирования [1568]. Сигнал ПЧ на частоте 6 МГц измеряется аналоговым спектроанализатором, выходной сигнал которого возводится в квадрат с помощью низкошумящего умножителя. Синхронный усилитель позволяет разделить среднеквадратичный сигнал и напряжение шума при включении и выключении входного пучка. Таким путем обеспечивалось измерение среднего

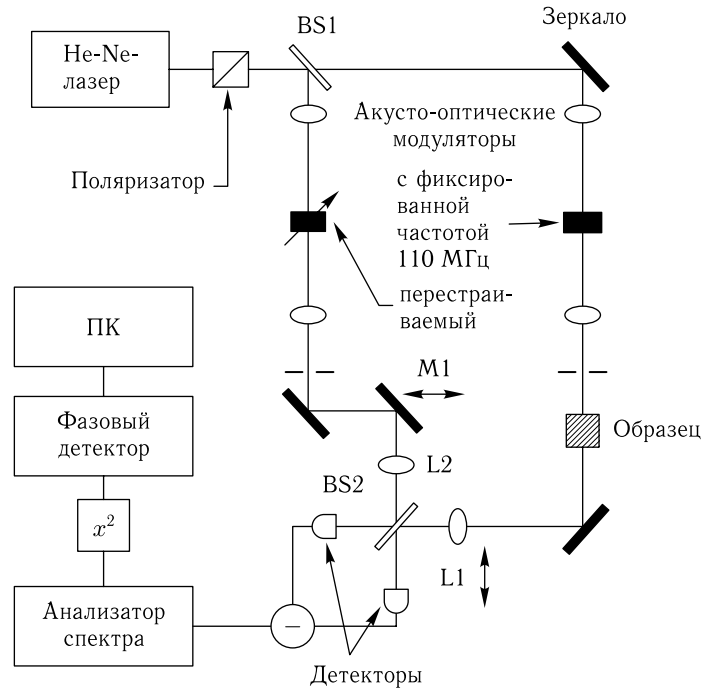


Рис. 14.17. Схема гетеродинного детектирования [2098]

квадрата амплитуды биений $|V_B|^2$ в реальном времени. Информация о распределении фазового пространства Вигнера для прошедшего света получалась путем измерения интенсивности биений как функции сдвига центра ГП (за счет смещения зеркала M1) и поперечного импульса (угла) (за счет смещения линзы L1). Приемник находился в фурье-плоскости линз L1 и L2, так что положение ГП было фиксировано в плоскости детектирования. Пространственное разрешение системы определялось пространственной шириной и дифракционным углом ГП.

Модельные эксперименты, выполненные авторами работы [1568], обеспечили лучшее понимание томографических исследований, проведенных Инаба с сотрудниками для живых тканей [2094–2096], в частности, была установлена связь амплитуды сигнала ПЧ с плотностью биоткани и ее коэффициентом поглощения. Интенсивность биений при распространении гауссова пучка через раствор Интралипида при фиксированных положениях зеркала M1 и линзы L1, соответствующих максимальному сигналу, показана на рис. 14.18 как функция концентрации раствора. С ростом концентрации сначала ясно виден быстрый экспоненциальный спад, за которым следует более медленное неэкспоненциальное убывание. Пространственные измерения показали, что быстрый спад соответствует прохождению гауссова пучка, а более медленное убывание возникает из-за вклада многократного рассеяния. С использованием распределения фазового пространства Вигнера для входного гауссова пучка с углом дифракции около 1 мрад было показано, что при низких концентрациях Интралипида амплитуда сигнала биений затухает экспоненциально из-за поглощения и рассеяния

$$\propto \exp[-(\sigma_{\text{sca}} + \sigma_{\text{abs}}) \rho_s d], \quad (14.10)$$

где σ_{sca} и σ_{abs} — сечение рассеяния и поглощения соответственно; ρ_s — концентрация частиц, а d толщина образца. При промежуточных концентрациях Интралипида,

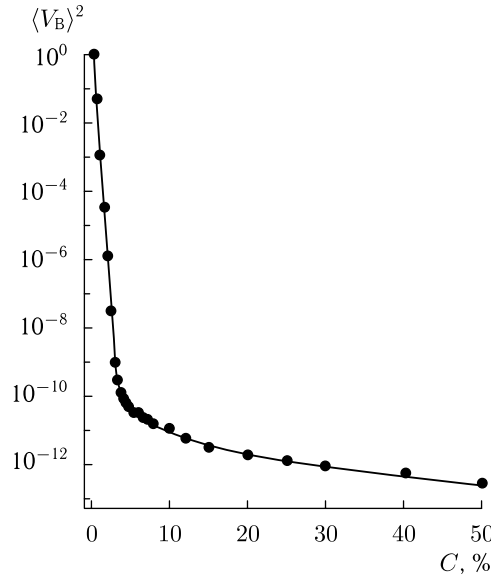


Рис. 14.18. Зависимость интенсивности биений от концентрации Интралипида ($C \sim \rho_s$) в процентах десятипроцентного раствора Интралипида в чистой воде для среднего размера частицы 0,5 мкм и длины образца 1 см [2098]

когда проходящий пучок расширяется из-за многократного рассеяния, интенсивность биений должна падать как

$$\propto \rho_s^{-2} \exp(-\sigma_{\text{abs}} \rho_s d). \quad (14.11)$$

При высоких концентрациях распределение рассеянного света становится изотропным и затухание интенсивности определяется, в основном, поглощением

$$\propto \exp(-\sigma_{\text{abs}} \rho_s d). \quad (14.12)$$

Можно ожидать, что эта простая картина будет нарушаться при достаточно высоких концентрациях, когда длина пути, проходимого фотоном при диффузии, существенно больше толщины образца.

14.3. Резюме

Таким образом, краткий обзор оптических схем когерентных томографов и топографов демонстрирует возможности этих устройств для исследования биологических тканей и органов. Продолжают совершенствоваться как ОКТ устройства, так и методы исследования (см., например, [136, 156, 2073–2083], включая повышение чувствительности ОКМ за счет сканирования линейным пучком [2076], использование ОКТ-пробников в виде иглы, прокалывающей биоткань [2077, 2081], новые виды спектральных ОКТ, построенные с использованием непрерывных источников суперконтинуума [2078] или в виде чипа [2079]. Появляются новые разработки волоконно-оптических ОКТ [2082] и высокоскоростных ОКТ с ультравысоким разрешением для офтальмологии [2083]. Несмотря на постоянное развитие ОКТ и поиск более совершенных томографических схем, сфера медицинских приложений уже разработанных методов и устройств ОКТ непрерывно расширяется. В настоящее

время она охватывает анализ зон поражения кожи у больных псориазом, эритематозной волчанкой, склеродермией и злокачественной меланомой, исследование послеожоговых келоидных рубцов и васкуляризации субэпидермальных слоев кожи, мониторинг лазерной абляции тканей, визуализацию тканей мозга и глазного дна, твердых и мягких тканей ротовой полости, исследование слизистой оболочки внутренних органов и многое другое. Из последних наиболее интересных достижений это эластометрия кровеносных сгустков [2080], исследование раковой опухоли молочной железы ОКТ с пробником в виде иглы [2081], мониторинг раннего развития эмбрионов млекопитающих и их отдельных органов непосредственно в матке [2084, 2085], ОКТ-микроангиография без использования каких-либо меток для исследования *in vivo* микроциркуляции крови и сосудистой системы сетчатки, кожи и слизистых [2088–2089], количественный мониторинг микропузырьков в крови [2087], изучение скорости молекулярной диффузии в патологических тканях с целью более надежной идентификации характера поражения и мониторинга доставки лекарственных препаратов [1766, 1769–1776, 2086, 2091].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной монографии рассмотрены лишь некоторые аспекты взаимодействия света с биологическими тканями и основное внимание сосредоточено на описании рассеяния когерентного и некогерентного излучения неупорядоченными и квазиупорядоченными структурами. Рассмотренные методы и представленные результаты позволяют сделать некоторые выводы и предложения, касающиеся направлений дальнейших исследований и развития лазерных диагностических и терапевтических медицинских систем.

Результаты многочисленных исследований рассеяния света показывают необходимость более углубленного изучения оптических свойств биотканей с различной структурной организацией. В настоящее время распространение света в биотканях достаточно хорошо описано на качественном (а иногда и количественном) уровне, что обеспечивает прочную основу для реализации различных диагностических, терапевтических и хирургических методов. В то же время оценка оптимальных доз облучения или выбор правильных диагностических критериев иногда вызывает большие трудности по причине отсутствия надежных данных для оптических параметров биотканей.

Традиционная спектрофотометрия или угловые и поляризационные измерения несомненно полезны для характеристики биотканей уже в том виде, в котором они представлены в литературе, однако они нуждаются в усовершенствовании при исследовании сложноорганизованных тканей, в том числе при построении соответствующих физических моделей биотканей. Такие модели должны принимать в рассмотрение пространственное распределение рассеивающих и поглощающих частиц, их полидисперсную природу, оптическую активность и двулучепреломляющие свойства материалов, из которых состоят рассеивающие частицы и базовое вещество.

Необходимо развить и совершенствовать методы решения обратных задач рассеяния с учетом реальной геометрии объекта и лазерного пучка, которые были бы одинаково применимы при произвольном соотношении коэффициентов поглощения и рассеяния. Обратный метод Монте-Карло несомненно является полезным методом решения обратных задач оптики биотканей, однако требуемые для практической медицинской диагностики и дозиметрии быстрые расчеты оптических параметров и дозы излучения в реальном масштабе времени могут быть реализованы на основе адекватных приближенных решений уравнений переноса излучения.

Широкомасштабные исследования ведутся в направлении лучшего понимания волн фотонной плотности и их использования в модуляционных методах измерения оптических параметров тканей. Ожидается, что они дадут новые алгоритмы реконструкции трехмерных изображений ткани и практические приложения диффузионной оптической томографии.

Поляризационные свойства тканей, довольно подробно описанные в данной книге, имеют первостепенное значение для физиологической поляризационной оптики и ранней диагностики рака кожи и других органов, покрытых эпителиальной тканью. Метод матрицы рассеяния долгое время использовался в оптике и в настоящее время применяется многими исследователями для изучения свойств биологических тканей и клеточных суспензий. Для этой цели, как правило, применяется матрица интенсивностей (матрица Мюллера), однако использование двухчастотных лазеров (например, зеемановского лазера) или четырехканальной ОКТ позволяет измерить амплитудные

матричные элементы (матрица Джонса), что дает возможность упростить решение обратной задачи для многих биологических структур.

Проектирование лазерных оптоакустических, акустооптических и оптотермических систем визуализации можно рассматривать как очень перспективное направление в биомедицинской оптике, позволяющее обеспечить высокий контраст и разрешение изображения глубоколежащих и подповерхностных малых опухолей. Эти методы представляются оптимальными для диагностики тканей на глубинах до нескольких сантиметров, где временные диффузионные и ОКТ-методы неэффективны.

Оптические спекл-методы, в частности метод, основанный на частично-развитых спеклах, возникающих при дифракции сфокусированных пучков, перспективны для исследования структуры тканей и анализа колебаний и подвижности клеток (крово- и лимфоток). Развитие этих методов требует детального исследования оптики спеклов, их статистики и интерференции световых пучков в плотных рассеивающих средах.

Когерентные оптические методы открывают перспективу развития новых высокоэффективных и высокоразрешающих томографических методик, позволяющих визуализировать структурные и функциональные состояния ткани на субклеточном уровне. В настоящее время исследования поверхностных слоев ткани с использованием оптической когерентной томографии (ОКТ) могут дать важные результаты и обещают новые возможности для медицинских приложений, особенно для офтальмологии, ранней диагностики рака кожи и шейки матки, анализа микроциркуляции крови и эндоскопического исследования стенок кровеносных сосудов (визуализация атеросклеротических бляшек) и слизистой оболочки внутренних органов.

Методы, основанные на динамическом рассеянии света, полезны для анализа как слабо рассеивающих, так и плотных биологических сред. Многие из этих методов уже нашли свою специфическую область медицинского приложения. Заметного прогресса в расширении медицинских приложений следует ожидать при использовании метода диффузионно-волновой спектроскопии.

Гетеродинная и гомодинная интерферометрия, включая спекл-интерферометрию, имеет широкий диапазон биомедицинских приложений. Лазерные доплеровские измерения потоков и колебаний в биотканях и органах — наиболее развитые области приложения этих методов. Хорошо известные достоинства конфокальной микроскопии очень полезны для исследования биотканей и клеток. Многие когерентные методы и приборы медицинской диагностики успешно используют конфокальный принцип оптического послойного секционирования исследуемого объекта. Двухфотонная микроскопия и микроскопия, основанная на генерации второй гармоники, обеспечивают новые дополнительные возможности в изучении биотканей и клеток.

Техника оптической иммерсии позволяет эффективно управлять оптическими свойствами биотканей и крови. Такое управление приводит к существенному подавлению рассеяния и, следовательно, значительно повышает пропускание (оптическое просветление), вызывает появление большого числа слабо рассеянных фотонов (снейк-фотонов) и баллистических фотонов, что позволяет успешно применять когерентные и поляризационные методы визуализации. Это особенно важно для неинвазивной медицинской диагностики методом ОКТ, поскольку с помощью последнего обычно исследуют довольно тонкие слои ткани, которые можно быстро и эффективно пропитать биологически совместимой иммерсионной жидкостью. Известно, например, что ОКТ позволяет визуализировать такие ткани, как стенки кровеносных сосудов, пищевод, желудок, шейка матки и толстая кишка, на глубину не более 1–2 мм. Оптическое просветление позволяет существенно (в несколько раз) увеличить глубину зондирования и тем самым обеспечить более эффективную диагностику с помощью ОКТ. Очевидно, что технология обратимого оптического просветления биологических тканей полезна не только для медицинской диагностики, но и для лазерной и фототермической терапии и хирургии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Medical Optical Tomography: Functional Imaging and Monitoring / Ed. by G. Müller, B. Chance, R. Alfano et al. Bellingham, WA: SPIE Press, 1993. V. IS11.
2. Laser-Induced Interstitial Thermotherapy / Ed. by G. Müller, A. Roggan. Bellingham, WA: SPIE Press, 1995.
3. Selected Papers on Tissue Optics: Applications in Medical Diagnostics and Therapy / Ed. by V. V. Tuchin. Bellingham, WA: SPIE Press, 1994. V. MS102.
4. *Chance B., Cope M., Gratton E., Ramanujam N., Tromberg B.* Phase measurement of light absorption and scatter in human tissue // *Rev. Sci. Instrum.* 1998. V. 69, № 10. P. 3457–3481.
5. *Приезжев А. В., Тучин В. В., Шубочкин Л. П.* Лазерная диагностика в биологии и медицине. М.: Наука, 1989.
6. *Тучин В. В.* Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. 2-е изд. М.: Физматлит, 2010.
7. *Katzir A.* Lasers and Optical Fibers in Medicine. San Diego, et al.: Academic Press, Inc., 1993.
8. Coherence Domain Optical Methods in Biomedical Science and Clinical Applications II, III / Ed. by V. V. Tuchin, J. A. Izatt // *Proc SPIE.* 1998. V. 3251; 1999. V. 3598.
9. *Tuchin V. V.* Lasers and fiber optics in biomedicine // *Laser Physics.* 1993. V. 3, № 3. P. 767–820; № 4. P. 925–950.
10. *Tuchin V. V.* Lasers light scattering in biomedical diagnostics and therapy // *J. Laser Appl.* 1993. V. 5, № 2–3. P. 43–60.
11. *Sliney D. H., Trokel S. L.* Medical Lasers and their Safe Use. N. Y. et al.: Academic Press, Inc., 1993.
12. Optical Properties of Mammalian Tissue / Ed. by L. E. Preuss, A. E. Profio // *Appl. Opt.* 1989. V. 28, № 12. P. 2207–2357.
13. *Schmitt J. M., Knüttel A., Bonnar R. F.* Measurement of optical properties of biological tissues by low-coherence reflectometry // *Appl. Opt.* 1993. V. 32. P. 6032–6042.
14. Lasers in Biology and Medicine // *IEEE J. Quantum Electr.* 1984. V. 20, № 12. P. 1342–1532; 1987. V. 23, № 10. P. 1701–1855; 1990. V. 26, № 12. P. 2146–2308.
15. Selected Papers on Optical Tomography, Fundamentals and Applications in Medicine / Ed. by O. Minet, G. Müller, J. Beuthan // Bellingham, WA: SPIE Press, 1998. V. MS147.
16. Special Section on Biomedical Optics / Ed. by A. Katzir // *Opt. Eng.* 1992. V. 31, № 7. P. 1399–1486; 1993. V. 32, № 2. P. 216–367.
17. Special section on interferometry in biomedicine / Ed. by H. Podbielska, C. K. Hitzengerger, V. V. Tuchin // *J. Biomed. Opt.* 1998. V. 3, № 1. P. 5–79; № 3. P. 225–266.
18. Special section on coherence domain optical methods in biomedical science and clinics / Ed. by V. V. Tuchin, H. Podbielska, C. K. Hitzengerger // *J. Biomed. Opt.* 1999. V. 4, № 1. P. 94–190.
19. Photodynamic Therapy / Ed. by T. J. Dougherty // *J. Clin. Laser Med. Surg.* 1996. V. 14. P. 219–348.
20. *Letokhov V. S.* Laser biology and medicine // *Nature.* 1985. V. 316, № 6026. P. 325–328.
21. *Brunetaud J. M., Maunoury V., Cochelard D.* Lasers in digestive endoscopy // *J. Biomed. Opt.* 1997. V. 2, № 1. P. 42–52.
22. Optical Diagnostics of Biological Fluids III / Ed. by A. V. Priezzhev, T. Asakura, J. D. Briers // *Proc. SPIE.* 1998. V. 3252.

23. Advances in Optical Imaging and Photon Migration / Ed. by J. G. Fujimoto, M. S. Patterson // OSA Trends in Optics and Photonics. Washington, DC: Optical Society of America. 1998. V. 21.
24. Тучин В. В. Исследование биотканей методами светорассеяния // УФН. 1997. Т. 167, № 5. С. 517–539.
25. Жаров В. П., Летохов В. С. Лазерная оптико-акустическая спектроскопия. М.: Наука, 1984.
26. Узденский А. Б. Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии. СПб.: Наука, 2010.
27. Geschwind H. J. Recent developments in laser cardiac surgery // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1, № 1. P. 28–30.
28. Rudolph W., Kempe M. Topical review: Trends in optical biomedical imaging // J. Modern Opt. 1997. V. 44, № 9. P. 1617–1642.
29. Dosimetry of Laser Radiation in Medicine and Biology / Ed. by G. J. Müller, D. H. Sliney. Bellingham, WA: SPIE Inst. Advanced Opt. Techn., 1989. V. IS5.
30. Mahadevan-Jansen A., Richards-Kortum R. Raman spectroscopy for detection of cancers and precancers // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1, № 1. P. 31–70.
31. Das B. B., Liu F., Alfano R. R. Time-resolved fluorescence and photon migration studies in biomedical and random media // Rep. Prog. Phys. 1997. V. 60. P. 227–292.
32. Photon Migration in Tissue and Biomedical Applications of Lasers / Ed. by M. Motamedi // Appl. Opt. 1993. V. 32. P. 367–434.
33. Diffusing Photons in Turbid Media / Ed. by A. Yodh, B. Tromberg, E. Sevick-Muraca, D. Pine // Appl. Opt. 1997. V. 36. P. 9–231.
34. Durduran T., Yodh A. G., Chance B., Boas D. A. Does the photon-diffusion coefficient depend on absorption? // J. Opt. Soc. Am. A. 1997. V. 14, № 12. P. 3358–3365.
35. Selected Papers on Photodynamic Therapy / Ed. by D. Kessel // Bellingham, WA: SPIE Press, 1993. V. MS82.
36. Jacques S. L. Strengths and weaknesses of various optical imaging techniques // Saratov Fall Meeting'01. 2001. Saratov, Russia. Internet Plenary Lecture: <http://optics.sgu.ru/~SFM>
37. van Gemert M. J. C., Jacques S. L., Sterenborg H. J. C. M., Star W. M. Skin optics // IEEE Trans. Biomed. Eng. 1989. V. 36, № 12. P. 1146–1154.
38. van Gemert M. J. C., Nelson J. S., Milner T. E. et al. Non-invasive determination of port wine stain anatomy and physiology for optimal laser treatment strategies // Phys. Med. Biol. 1997. V. 42. P. 937–949.
39. Sterenborg H. J. C. M., van Gemert M. J. C., Kamphorst W. et al. The spectral dependence of the optical properties of human brain // Lasers Med. Sci. 1989. V. 4. P. 221–227.
40. Cheong W.-F., Prahl S. A., Welch A. J. A review of the optical properties of biological tissues // IEEE J. Quantum Electr. V. 26, № 12. P. 2166–2185. Updated by W.-F. Cheong, further additions by L. Wang, S. L. Jacques, August 6, 1993.
41. Jacques S. L. Monte Carlo modeling of light transport in tissues // Tissue Optics / Ed. by A. J. Welch, M. C. J. van Gemert. N. Y.: Academic, 1992.
42. Niemz M. H. Laser-Tissue Interactions. Fundamentals and Applications. Berlin et al.: Springer-Verlag, 1996. 3rd ed. 2007.
43. Johnston R. G., Singham S. B., Salzman G. C. Polarized light scattering // Comments on Molecular and Cellular Biophysics. Gordon and Breach Sci. Publ. Inc. 1988. V. 5, № 3. P. 171–192.
44. Time-Resolved Laser Spectroscopy in Biochemistry / Ed. by J. R. Lakowicz // Proc. SPIE. 1990. V. 1204. Pt. 1–2.
45. Coherence-Domain Methods in Biomedical Science and Clinical Applications / Ed. by V. V. Tuchin, H. Podbielska, B. Ovrin // Proc. SPIE. 1997. V. 2981.

46. Kienle A., Lilge L., Patterson M. S. *et al.* Spatially resolved absolute diffuse reflectance measurements for non-invasive determination of the optical scattering and absorption coefficients of biological tissue // *Appl. Opt.* 1996. V. 35. P. 2304–2314.
47. Mourant J. R., Bigio I. J., Boyer J. *et al.* Elastic scattering spectroscopy as a diagnostic tool for differentiating pathologies in the gastrointestinal tract: preliminary testing // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 2. P. 192–199.
48. Roggan A., Friebel M., Dorschel K., Hahn A., Müller G. Optical properties of circulating human blood in the wavelength range 400–2500 nm // *J. Biomed. Opt.* 1999. V. 4, № 1. P. 36–46.
49. Nilsson A. M. K., Lucassen G. W., Verkruyse W., Andersson-Engels S., van Gemert M. J. C. Changes in optical properties of human whole blood *in vitro* due to slow heating // *Photochem. Photobiology.* 1997. V. 65, № 2. P. 366–373.
50. Marks F. A. Optical determination of the hemoglobin oxygenation state of breast biopsies and human breast cancer xenografts in nude mice // *Proc. SPIE.* 1992. V. 1641. P. 227–237.
51. Bassani M., Martelli F., Zaccanti G., Contini D. Independence of the diffusion coefficient from absorption: experimental and numerical evidence // *Opt. Lett.* 1997. V. 22. P. 853–855.
52. Patterson M. S. Noninvasive measurement of tissue optical properties: current status and future prospects // *Comments Mol. Cell. Biophys.* 1995. V. 8. P. 387–417.
53. Chance B., Kang K., He L., Liu H., Zhou S. Precision localization of hidden absorbers in body tissues with phased-array optical systems // *Rev. Sci. Instrum.* 1996. V. 67. P. 4324–4332.
54. Sterenborg H. J. C. M., Van der Leun J. C. Change in epidermal transmission due to UV-induced hyperplasia in hairless mice: a first approximation of the action spectrum // *Photodermatology.* 1988. V. 5. P. 71–82.
55. Clinical Near Infrared Spectroscopy / Imaging / Ed. by M. Ferrari, D. Delpy, D. A. Benaron // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 4. P. 361–434; 1997. V. 2, № 1. P. 7–41.
56. Yoon G., Welch A. J., Motamedi M. *et al.* Development and application of three-dimensional light distribution model for laser irradiated tissue // *IEEE J. Quantum Electr.* 1987. V. 23, № 10. P. 1721–1733.
57. Anderson R. R., Parrish J. A. Optical properties of human skin // *The Science of Photomedicine* / Ed. by J. D. Regan, J. A. Parrish. N. Y.: Plenum Press, 1982. P. 147–194.
58. Dunn A., Smithpeter C., Welch A. J., Richards-Kortum R. Finite-difference time-domain simulation of light scattering from single cells // *J. Biomed. Opt.* 1997. V. 2, № 3. P. 262–266.
59. Schmitt J. M., Gandjbakhche A. H., Bonnar R. F. Use of polarized light to discriminate short-photons in a multiply scattering medium // *Appl. Opt.* 1992. V. 31. P. 6535–6546.
60. Bronk B. V., van de Merwe W. P., Stanley M. *In vivo* measure of average bacterial cell size from a polarized light scattering function // *Cytometry.* 1992. V. 13. P. 155–162.
61. Бакуткин В. В., Максимова И. Л., Сапрыкин П. И. *и др.* Рассеяние света склеральной оболочкой глаза человека // *ЖПС.* 1987. Т. 46, № 1. С. 104–107.
62. Максимова И. Л., Тучин В. В., Шубочкин Л. П. Распространение света в анизотропных биологических объектах // *Лазерные пучки.* Хабаровск: Изд-во Хабаровского политехн. ин-та, 1985. С. 91–96.
63. Максимова И. Л., Тучин В. В., Шубочкин Л. П. Поляризационные характеристики роговой оболочки глаза // *Опт. спектр.* 1986. Т. 60, № 4. С. 801–806.
64. Максимова И. Л., Тучин В. В., Шубочкин Л. П. Матрицы рассеяния света хрусталика глаза // *Опт. спектр.* 1988. Т. 65, № 3. С. 615–620.
65. Альтшулер Г. Б., Грисимов В. Н. Эффект волноводного распространения света в зубе человека // *Докл. АН СССР.* 1990. Т. 310, № 5. С. 1245–1248.
66. Zijp J. R., ten Bosch J. J. Angular dependence of He-Ne-laser light scattering by bovine human dentine // *Archs Oral Biol.* 1991. V. 36, № 4. P. 283–289.

67. Приезжев А. В., Тучин В. В., Шубочкин Л. П. Лазерная микродиагностика оптических тканей глаза и форменных элементов крови // Изв. АН СССР. Сер. физическая. 1989. Т. 53, № 8. С. 1490–1495.
68. Максимова И. Л., Миронычев А. П., Романов С. В. и др. Методы и аппаратура для лазерной диагностики в офтальмологии // Изв. АН СССР. Сер. физическая. 1990. Т. 54, № 10. С. 1918–1923.
69. Королевич А. Н., Хайруллина А. Я., Шубочкин Л. П. Матрица рассеяния монослоя оптических мягких частиц при их плотной упаковке // Опт. спектр. 1990. Т. 68. С. 403–409.
70. Городничев Е. Е., Рогозкин Д. Б. Малоугловое многократное рассеяние света в случайно-неоднородных средах // ЖЭТФ. 1995. Т. 107. С. 209–235.
71. Rinneberg H. Scattering of laser light in turbid media, optical tomography for medical diagnostics // The Inverse Problem / Ed. by H. Lübbig. Berlin: Akademie Verlag, 1995. P. 107–141.
72. Tissue optics / Ed. by A. J. Welch, M. C. J. van Gemert. N. Y.: Academic, 1992.
73. Кузьмин В. Л., Романов В. П. Когерентные эффекты при рассеянии света в неупорядоченных системах // УФН. 1996. Т. 166, № 3. С. 247–278.
74. Yoo K. M., Liu F., Alfano R. R. Biological materials probed by the temporal and angular profiles of the backscattered ultrafast laser pulses // J. Opt. Soc. Am. B. 1990. V. 7. P. 1685–1693.
75. Рытов С. М., Кравцов Ю. А., Татарский В. И. Введение в статистическую радиофизику Ч. 2. Случайные поля. М.: Наука, 1978.
76. Coherence — domain methods in biomedical optics / Ed. by V. V. Tuchin. Bellingham, WA: SPIE. 1996. V. 2732.
77. Tuchin V. V. Coherence-domain methods in tissue and cell optics // Laser Physics. 1998. V. 8, № 4. P. 807–849.
78. Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов / Под ред. Г. Камминса, Е. Пайка // Пер. с англ. под ред. Ф. В. Бункина. М.: Мир, 1978; Photon Correlation and Light Beating Spectroscopy / Ed. by H. Z. Cummins, E. R. Pike. N. Y.: Plenum, 1974.
79. Photon Correlation Spectroscopy and Velocimetry / Ed. by H. Z. Cummins, E. R. Pike. N. Y.: Plenum, 1977.
80. Kao M. H., Yodh A. G., Pine D. J. Observation of Brownian motion on the time scale of hydrodynamic interactions // Phys. Rev. Lett. 1993. V. 70. P. 242–245.
81. Kaplan P. D., Dinsmore A. D., Yodh A. G., Pine D. Diffuse-transmission spectroscopy: a structural probe of opaque colloidal mixtures // Phys. Rev. E. 1994. V. 50. P. 4827–4835.
82. Briers J. D. Laser Doppler and time-varying speckle: a reconciliation // J. Opt. Soc. Amer. A. 1996. V. 13. P. 345–350.
83. Briers J. D., Webster S. Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1. P. 174–179.
84. Fercher A. F. Optical coherence tomography // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1. P. 157–173.
85. Beauvoit B., Kitai T., Chance B. Contribution of the mitochondrial compartment to the optical properties of the rat liver: a theoretical and practical approach // Biophys. J. 1994. V. 67. P. 2501–2510.
86. Young A. R. Chromophores in human skin // Phys. Med. Biol. 1997. V. 42. P. 789–802.
87. Duck F. A. Physical properties of tissue: a comprehensive reference book. L.: Academic, 1990.
88. Photon Migration in Tissue / Ed. by B. Chance. N. Y.: Plenum, 1989.
89. Quantitative Spectroscopy in Tissue / Ed. by K. Frank, M. Kessler. Frankfurt am Main: pmi Verlag, 1992.
90. Photodynamic Therapy: Basic Principles and Clinical Applications / Ed. by B. W. Henderson, T. J. Dougherty. N. Y.: Marcel Dekker, Inc., 1992.

91. Прикладная лазерная медицина. Учеб. справ. пособие / Под ред. Х.-П. Берлиена, Г.И. Мюллера. М.: Интерэксперт, 1997; *Applied Laser Medicine* / Ed. by H.-P. Berlien, G. J. Müller. Berlin: Springer-Verlag, 2003.
92. *Zhadin N.N., Aljano R.R.* Correction of the internal absorption effect in fluorescence emission and excitation spectra from absorbing and highly scattering media: Theory and experiment // *J. Biomed. Opt.* 1998. V. 3, № 2. P. 171–186.
93. *Kienle A., Patterson M.S., Dognitz N., Bays R., Wagnieres G., van de Bergh H.* Noninvasive determination of the optical properties of two-layered turbid medium // *Appl. Opt.* 1998. V. 37. P. 779–791.
94. *Mourant J.R., Boyer J., Hielscher A.H., Bigio I.J.* Influence of the scattering phase function on light transport measurements in turbid media performed with small source-detector separations // *Opt. Lett.* 1996. V. 21, № 7. P. 546–548.
95. *Mourant J.R., Freyer J.P., Hielscher A.H., Eick A.A., Shen D., Johnson T.M.* Mechanisms of light scattering from biological cells relevant to noninvasive optical-tissue diagnostics // *Appl. Opt.* 1998. V. 37. P. 3586–3593.
96. *Drezek R., Dunn A., Richards-Kortum R.* Light scattering from cells: finite-difference time-domain simulations and goniometric measurements // *Appl. Opt.* 1999. V. 38, № 16. P. 3651–3661.
97. *Zijp J.R., ten Bosch J.J.* Anisotropy of volume-backscattered light // *Appl. Opt.* 1997. V. 36. P. 1671–1680.
98. Special issue on optical radiation technique in medicine and biology / Ed. by H. Moseley // *Phys. Med. Biol.* 1997. V. 24. P. 759–996.
99. Special section on biomedical applications of vibrational spectroscopic imaging / Ed. by M. D. Morris // *J. Biomed. Opt.* 1999. V. 4. 1999. P. 6–34.
100. Special section on medical near-infrared spectroscopy / Ed. by K. Okada, T. J. Hamaoka // *Biomed. Opt.* 1999. V. 4. 1999. P. 391–428.
101. Special section on optical diagnostics of biological fluids / Ed. by A. V. Priezzhev, T. Asakura // *J. Biomed. Opt.* 1999. V. 4. P. 35–93.
102. *Schmitt J.M.* Optical coherence tomography (OCT): a review // *IEEE J. Select. Tops Quant. Electr.* 1999. V. 5. P. 1205–1215.
103. Special issue honoring Professor Britton Chance / Ed. by D. Benaron, I. Bigio, E. Sevick-Muraca, A. G. Yodh // *J. Biomed. Opt.* 2000. V. 5. P. 115–248; P. 269–282.
104. *Carden A., Morris M.D.* Application of vibration spectroscopy to the study of mineralized tissues (review) // *J. Biomed. Opt.* 2000. V. 5. P. 259–268.
105. *McNichols R.J., Coté G.L.* Optical glucose sensing in biological fluids: an overview // *J. Biomed. Opt.* 2000. V. 5. P. 5–16.
106. *Biophotonics and Coherent Systems* / Ed. by L. Belousov et al. M.: Moscow Univ. Press, 2000.
107. *Wang R.K.* Modelling optical properties of soft tissue by fractal distribution of scatterers // *J. Modern Opt.* 2000. V. 47, № 1. P. 103–120.
108. *Fujimoto J.G., Drexler W., Morgner U., Kartner F., Ippen E.* Optical coherence tomography: High resolution imaging using echoes of light // *Optics & Photonics News.* 2000. January. P. 24–31.
109. *Fujimoto J.G., Brezinski M.E.* Optical coherence tomography imaging // *Biomedical Photonics Handbook* / Ed. by T. Vo-Dinh. Boca Rotan: Florida: CRC Press, 2003. P. 13-1–29.
110. *Brezinski M.E.* *Optical Coherence Tomography: Principles and Applications.* Amsterdam. Boston: Academic Press, 2006.
111. *Sergeev A.M., Dolin L.S., Reitze D.H.* Optical tomography of biotissues: past, present, and future // *Optics & Photonics News.* 2001. July. P. 28–35.
112. *Briers J.D.* Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging // *Physiol. Meas.* 2001. V. 22. P. R35–R66.
113. Special issue on photon correlation and scattering / Ed. by W. V. Meyer, A. E. Smart, R. G. W. Brown // *Appl. Opt.* 2001. V. 40, № 24. P. 3965–4242.

114. So P. T. C., Dong C. Y., Masters B. R., Berland K. M. Two-photon excitation fluorescence microscopy // Annual Review of Biomedical Engineering. Palo Alto, CA: Annual Reviews, 2000.
115. Special Issue on Recent Developments in Biomedical Optics / Ed. by R. K. Wang, J. C. Hebden, V. V. Tuchin. Phys. Med. Biol. 2004. V. 49, № 7. P. 1083–1368.
116. Coherence Domain Optical Methods in Biomedical Science and Clinical Applications IV-VIII / Ed. by V. V. Tuchin, J. A. Izatt, J. G. Fujimoto // Proc. SPIE. 2000. V. 3915; 2001. V. 4251; 2002. V. 4619; 2003. V. 4956; 2004. V. 5316; Coherence Domain Optical Methods and Optical Coherence Tomography in Biomedicine IX-XV / Ed. by V. V. Tuchin, J. A. Izatt, J. G. Fujimoto // Proc. SPIE. 2005. V. 5690; 2006. V. 6079; 2007. V. 6429; 2008. V. 6847; 2009. V. 7168; 2010. V. 7554; 2011. V. 7999.
117. Saratov Fall Meeting, Optical Technologies in Biophysics and Medicine / Ed. by V. V. Tuchin, D. A. Zimnyakov, A. B. Pravdin // Proc. SPIE. 2000. V. 4001.
118. Saratov Fall Meeting, Optical Technologies in Biophysics and Medicine II-IX / Ed. by V. V. Tuchin // Proc. SPIE. 2001. V. 4241; 2002. V. 4707; 2003. V. 5068; 2004. V. 5474; 2005. V. 5771; 2006. V. 6163; 2007. V. 6535; 2008. V. 6791.
119. Methods in Cellular Imaging / Ed. by A. Periasamy // N. Y.: Oxford University Press, 2001.
120. Murphy D. B. Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging. N. Y.: Wiley-Liss, 2001.
121. Waves and Imaging through Complex Media / Ed. by P. Sebbah // N. Y.: Kluwer Academic Publishers, 2001.
122. Confocal and Two-Photon Microscopy: Foundations, Applications, and Advances / Ed. by A. Diaspro // N. Y.: Wiley-Liss, 2002.
123. Handbook of Vibrational Spectroscopy / Ed. by J. M. Chalmers, P. R. Griffiths // Chichester: John Wiley & Sons, 2002.
124. Photonics and Imaging in Biology and Medicine / Ed. by Q. Luo, B. Chance, V. V. Tuchin // Proc. SPIE. 2002. V. 4536.
125. Photonics and Imaging in Biology and Medicine / Ed. by Q. Luo, V. V. Tuchin, M. Gu, L. V. Wang // Proc. SPIE. 2003. V. 5254.
126. Selected Papers on Optical Low-Coherence Reflectometry and Tomography / Ed. by B. Masters // Bellingham, WA: SPIE Press, 2002. V. MS165.
127. Handbook of Optical Coherence Tomography / Ed. by B. E. Bouma, G. J. Tearney // N. Y.: Marcel-Dekker, 2002.
128. Lasers in Medicine / Ed. by D. R. Vij, K. Mahesh // Boston, Dordrecht. London: Kluwer Academic Publishers, 2002.
129. Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 1. 2 / Под ред. В. В. Тучина. Пер. с англ. М.: Физматлит, 2007 // Handbook of Optical Biomedical Diagnostics / Ed. by V. V. Tuchin. Bellingham, WA: SPIE Press, 2002.
130. Biomedical Photonics Handbook / Ed. by T. Vo-Dinh. Boca Raton: CRC Press, 2003.
131. Selected Papers on Multiphoton Excitation Microscopy / Ed. by B. R. Masters. Bellingham, WA: SPIE Press, 2003. V. MS175.
132. Encyclopedia of Optical Engineering / Ed. by R. G. Driggers. N. Y.: Marcel-Dekker, 2003.
133. Utzinger U., Richards-Kortum R. Fiber-optic probes for biomedical optical spectroscopy // J. Biomed. Opt. 2003. V. 8. P. 121–147.
134. Biomedical Optical Biopsy and Optical Imaging: Classic Reprints on CD-ROM Series / Ed. by R. R. Alfano, B. R. Masters. Washington, DC: Optical Society of America, 2004.
135. Tuchin V. V., Wang L., Zimnyakov D. A. Optical Polarization in Biomedical Applications. Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 2006.
136. Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science / Ed. by V. V. Tuchin. Boston: Kluwer Academic Publishers. 2004. V. 1. 2; Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science. V. 1. 2 / Ed. by V. V. Tuchin, Second edition. Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 2012.

137. Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy / Ed. by B. R. Masters, P. T. C. So. N. Y.: Oxford University Press, 2008.
138. Special section on tissue polarimetry / Ed. by L. V. Wang, G. L. Coté, S. L. J. Jacques // Biomed. Opt. 2002. V. 7, № 3. P. 278–397.
139. Зимняков Д. А., Тучин В. В. Оптическая томография тканей (обзор) // Квантовая электроника. 2002. Т. 32, № 4. С. 849–867.
140. Special issue on biophotonics / Ed. by W. R. Chen et al. X-Ray Sci. and Technol. 2002. V. 10, № 3–4. P. 139–243.
141. Special issue on biophotonics / Ed. by P. French, A. I. J. Ferguson. Phys. D: Appl. Phys. 2003. V. 36, № 14. P. R207–R258; 1655–1757.
142. Fercher A. F., Drexler W., Hitzenberger C. K., Lasser T. Optical coherence tomography-principles and applications // Rep. Progr. Phys. 2003. V. 66. P. 239–303.
143. Hanlon E. D., Manoharan R., Koo T.-W., Shafer K. E., Motz J. T., Fitzmaurice M., Kramer J. R., Itzkan I., Dasari R. R., Feld M. S. Prospects for *in vivo* Raman spectroscopy // Phys. Med. Biol. 2000. V. 45. P. R1–R59.
144. Ophthalmic Diagnostics / Ed. by R. R. Ansari, J. Sebag. // J. Biomed. Opt. 2004. V. 9, № 1. P. 8–179.
145. Prasad P. Introduction to Biophotonics. Hoboken, N. J.: Wiley-Interscience, 2003.
146. Гладкова Н. Д. Оптическая когерентная томография в ряду методов медицинской визуализации, Н. Новгород: Институт прикладной физики РАН, 2005.
147. Руководство по оптической когерентной томографии / Под ред. Н. Д. Гладковой, Н. М. Шаховой, А. М. Сергеева. М.: Физматлит, Медицинская книга, 2007.
148. Advances in Biophotonics, NATO Science Series I. Life and Behavioural Sciences. V. 369 / Ed. by B. Wilson, V. Tuchin, S. Tanev. Amsterdam: IOS Press, 2005.
149. Special issue in honor of Professor Valery V Tuchin's contribution to the field of biomedical optics / Ed. by R. K. Wang, A. V. Priezzhev, S. J. Fantini. Phys. D: Appl. Phys. 2005. V. 38. P. 2497–2747.
150. Лопатин В. Н., Приезжев А. В., Апонасенко А. Д., Шепелевич Н. В., Пожиленкова П. В., Простакова И. В. Методы светорассеяния в анализе дисперсных биологических сред. М.: Физматлит, 2006.
151. Жорина Л. В., Змиевской Г. Н. Основы взаимодействия физических полей с биологическими объектами. М.: Изд-во МГТУ им. Н. Э. Баумана, 2006.
152. Photonics in Dentistry. Series of Biomaterials and Bioengineering / Ed. by A. Kishen, A. Asundi. London, Imperial College Press, 2006.
153. Tuchin V. V., Altshuler G. B. Dental and oral tissue optics // Photonics in Dentistry. Series of Biomaterials and Bioengineering / Ed. by A. Kishen, A. Asundi. London, Imperial College Press, 2006. P. 245–300.
154. Проблемы оптической физики / Под ред. В. В. Тучина. Саратов: Изд-во «Новый ветер», 2006–2008; http://optics.sgu.ru/chair/edu/library/pop_sfm/
155. Проблемы оптической физики и биофотоники / Под ред. В. В. Тучина, Г. В. Симоненко. Саратов: Изд-во «Новый ветер», 2009–2011; http://optics.sgu.ru/chair/edu/library/pop_sfm/
156. Optical Coherence Tomography: Technology and Applications / Ed. by W. Drexler, J. G. Fujimoto. Berlin: Springer, 2008.
157. Optical Waveguide Sensing and Imaging, NATO SPS Series B: Physics and Biophysics / Ed. by W. Bock, I. Gannot, S. Tanev. Dordrecht: Springer, 2008.
158. Tanev S., Pond J., Paddon P., Tuchin V. A finite-difference time-domain model of optical phase contrast microscope imaging // Optical Waveguide Sensing and Imaging. NATO SPS Series B: Physics and Biophysics / Ed. by W. Bock, I. Gannot, S. Tanev. Dordrecht: Springer, 2008. P. 243–258.
159. Спецвыпуск, посвященный использованию лазерных технологий в биофотонике и биомедицинских исследованиях / Под ред. А. Н. Башкатова, А. В. Приезжева, В. В. Тучина // Квант. электрон. 2008. Т. 38, № 6. С. 503–611; № 7. С. 634–654.

160. Special Issue on Biophotonics / Ed. by S. Tanev, B. C. Wilson, V. V. Tuchin, D. Matthews Adv. Opt. Technol. 2008, doi: 10.1155/2008/134215.
161. Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care / Ed. by J. Popp et al. // Proc. SPIE. 2008. V. 6991; 2010. V. 7715.
162. Special Section on Optical Clearing of Tissues and Cells / Ed. by V. V. Tuchin, R. K. Wang, A. T. J. Yeh. Biomed. Opt. 2008. V. 13, № 2. 021101–024001.
163. Special Issue on Optical Clearing for Biomedical Imaging / Ed. by V. V. Tuchin, M. Leahy, Zhu D // J. Innov. Opt. Health Sci. 2010. V. 3, № 3. P. 147–211.
164. Cosmetic Applications of Laser & Light-Based Systems / Ed. by G. A. Ahluwalia. Norwich, N. Y.: William Andrew Inc., 2009.
165. *Altshuler G. B., Tuchin V. V.* Physics behind the light-based technology: Skin and hair follicle interactions with light // Cosmetic Applications of Laser & Light-Based Systems / Ed. by G. A. Ahluwalia. Norwich, N. Y.: William Andrew Inc., 2009. P. 49–109.
166. Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues / Ed. by V. V. Tuchin. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2009.
167. Light-Based Therapies for Skin of Color / Ed. by E. Baron. N. Y.: Springer, 2009.
168. *Yang M. F., Tuchin V. V., Yaroslavsky A. N.* Principles of light skin interactions // Light-Based Therapies for Skin of Color / Ed. by E. Baron. N. Y.: Springer, 2009.
169. *Tuchin V. V.* Optical spectroscopy of biological materials // Encyclopedia of Applied Spectroscopy / Ed. by D. L. Andrews. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009.
170. Special Section on Nanophotonics for Diagnostics, Protection, and Treatment of Cancer and Inflammatory Diseases / Ed. by V. V. Tuchin et al. // Biomed. Opt. 2009. V. 14, № 2. 020901; 021001–021017.
171. Спецвыпуск по оптике и спектроскопии в биомедицинских исследованиях / Под ред. А. Н. Башкатова, А. В. Любимова, В. В. Тучина // Опт. спектр. 2009. Т. 107, № 6. С. 895–995.
172. Special Issue on Optical Technologies in the Study of Tissues and Biological Fluids / Ed. by E. A. Genina, K. V. Larin, V. V. J. Tuchin. Innov. Opt. Health Sci. 2009. V. 2, № 3. P. 215–287.
173. Special Issue on Towards *In Vivo* Flow Cytometry / Ed. by V. V. Tuchin, A. Tárnok, V. P. Zharov // J. Biophoton. 2009. V. 2, № 8–9. P. 457–547.
174. Special Issue on Biophotonics for Dermatology: Science and Applications / Ed. by V. V. Tuchin, A. N. Yaroslavsky, S. L. Jacques, R. Anderson // J. Biophoton. 2010. V. 3, № 1–2. P. 15–88.
175. Saratov Fall Meeting 2009: International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics XIII / Ed. by E. A. Genina, V. V. Tuchin / J. Biophoton. 2010. V. 3, № 3. P. 120–121.
176. Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. by V. V. Tuchin. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010.
177. Laser Imaging and Manipulation in Cell Biology / Ed. by F. S. Pavone. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010.
178. *Genina E. A., Bashkatov A. N., Larin K. V., Tuchin V. V.* Light-tissue interaction at optical clearing // Laser Imaging and Manipulation in Cell Biology / Ed. by F. S. Pavone. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010. P. 115–164.
179. Advanced Optical Cytometry: Methods and Disease Diagnoses / Ed. by V. V. Tuchin. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011.
180. Handbook of Biophotonics. V. 1: Basics and Techniques / Ed. by J. Popp et al. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011.
181. Handbook of Biophotonics. V. 2: Photonics for Health Care / Ed. by J. Popp et al. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012.
182. Special Issue: *In Vivo* Flow Cytometry / Ed. by V. V. Tuchin et al. 2011. V. 79A, № 10. P. 735–883.

183. Handbook of Biomedical Optics / Ed. by D. A. Boas, C. Pitris, N. Ramanujam. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2011.
184. Complex Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics IV / Ed. by V. V. Tuchin // Proc. SPIE. 2007. V. 6436.
185. Complex Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics V / Ed. by V. V. Tuchin, L. V. Wang // Proc. SPIE. 2008. V. 6855.
186. Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics VI / Ed. by V. V. Tuchin, L. V. Wang, D. D. Duncan // Proc. SPIE. 2009. V. 7176.
187. Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics VII / Ed. by V. V. Tuchin, D. D. Duncan, K. V. Larin // Proc. SPIE. 2010. V. 7563.
188. Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics VIII / Ed. by V. V. Tuchin et al. // Proc. SPIE. 2011. V. 7898.
189. 5th International Conference on Photonics and Imaging in Biology and Medicine / Ed. by Q. Luo et al. // Proc. SPIE. 2007. V. 6534.
190. Advances in Biomedical Photonics and Imaging / Ed. by Q. Luo, L. V. Wang, V. V. Tuchin. New Jersey, London, Singapore et al.: World Scientific, 2008.
191. Seventh International Conference on Photonics and Imaging in Biology and Medicine / Ed. by Q. Luo, L. V. Wang, V. V. Tuchin // Proc. SPIE. 2009. V. 7280.
192. Eighth International Conference on Photonics and Imaging in Biology and Medicine / Ed. by Q. Luo et al. // Proc. SPIE. 2009. V. 7519.
193. The 9th International Conference on Photonics and Imaging in Biology and Medicine (PIBM 2010) / Ed. by Q. Luo, L. V. Wang, V. V. Tuchin // J. Phys.: Conference Series. 2011. V. 277. 9 March.
194. Saratov Fall Meeting 2009: International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics, and Biophotonics / Ed. by V. V. Tuchin, E. A. Genina // Proc. SPIE. 2010. V. 7547.
195. Saratov Fall Meeting 2010: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XII / Ed. by V. V. Tuchin, E. A. Genina // Proc. SPIE. 2011. V. 7999 (CD-ROM).
196. Wang L. V., Wu H.-I. Biomedical Optics: Principles and Imaging. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2007; ftp://ftp.wiley.com/public/sci_tech_med/biomedical_optics
197. Splinter R., Hooper B. A. An Introduction to Biomedical Optics. N. Y.. London: Taylor & Francis Publishers, 2007.
198. Sobol E. N. Phase Transformations and Ablation in Laser-Treated Solids. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 1995.
199. Лазерная инженерия хрящей / Под ред. В. Н. Баграташвили, Э. Н. Соболя, А. Б. Шехтера. М.: Физматлит, 2006.
200. Tuchin V. V. Optical Clearing of Tissues and Blood. V. PM 154. Bellingham, WA: SPIE Press, 2006.
201. Tuchin V. V. A clear vision for laser diagnostics // IEEE J. Select. Tops. Quant. Electr. 2007. V. 13, № 6. P. 1621–1628.
202. Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational and Clinical / Ed. by M. Hamblin, P. Mroz. Boston–London: Artec House, 2008.
203. Wilson B. C. Photodynamic therapy/diagnostics: Principles, practice and advances / Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. by V. V. Tuchin. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 649–686.
204. Photoacoustic Imaging and Spectroscopy / Ed. by L. Wang. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2009.
205. Peiponen K.-E., Myllylä R., Priezzhev A. V. Optical Measurement Techniques, Innovations for Industry and the Life Science. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2009.
206. Special section on Pioneers in Biomedical Optics. Honoring Professor Frans F. Jöbsis / Ed. by D. T. Delpy, M. Ferrari, C. A. Piantadosi, M. Tamura // J. Biomed. Opt. 2007. V. 12, № 6. P. 062101–62113.

207. Biomedical Vibrational Spectroscopy / Ed. by P. Lasch, J. Kneipp. Hoboken: Wiley, 2008.
208. Special Issue on Vibrational Spectroscopy in Medicine: Applications to Diagnosis of Disease / Ed. by M. Diem // *J. Biophoton.* 2009. V. 2, № 1–2. P. 13–113.
209. Special Issue on Modern Biophotonic Trends in Microbiological and Medical Diagnostics / Ed. by D. Naumann, M. Diem // *J. Biophoton.* 2010. V. 3, № 8–9. P. 494–631.
210. *Tuchin V. V.* Dictionary of Biomedical Optics and Biophotonics. Bellingham, WA: SPIE Press, 2012.
211. Light Scattering by Nonspherical Particles / Ed. by M. I. Mishchenko, J. W. Hovenier, L. D. Travis. San Diego: Academic Press, 2000.
212. *Mishchenko M. I., Travis L. D., Lacis A. A.* Scattering, Absorption, and Emission of Light by Small Particles. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2002.
213. Saratov Fall Meeting: Coherent Optics of Ordered and Random Media / Ed. by D. A. Zimnyakov // *Proc. SPIE.* 2001. V. 4242; 2002. V. 4705; 2003. V. 5067; 2004. V. 5475.
214. *Борен К., Хафмен Д.* Поглощение и рассеяние света малыми частицами. М.: Мир, 1986 / Пер. с англ., *Bohren C. F., Huffman D. R.* Absorption and Scattering of Light by Small Particles. N. Y.: Wiley, 1983.
215. *Salzmann G. C., Singham S. B., Johnston R. G., Bohren C. F.* Light scattering and cytometry // *Flow Cytometry and Sorting* / 2nd ed / Ed. by M. R. Melamed, T. Lindmo, M. L. Mendelsohn. N. Y.: Wiley-Liss Inc., 1990. P. 81–107.
216. *Backman V., Gurjar R., Badizadegan K., Dasari R., Itzkan I., Perelman L. T., Feld M. S.* Polarized light scattering spectroscopy for quantitative measurement of epithelial cellular structures *in situ* // *IEEE J. Sel. Top. Quant. Elect.* 1999. V. 5. P. 1019–1027.
217. *Mourant J. R., Canpolat M., Brocker C., Esponda-Ramos O., Johnson T. M., Matanock A., Stetter K., Freyer J. P.* Light scattering from cell: the contribution of the nucleus and the effects of proliferative status // *J. Biomed. Opt.* 2000. V. 5, № 2. P. 131–137.
218. *Mourant J. R., Gibson R. R., Johnson T. M., Carpenter S., Short K. W., Yamada Y. R., Freyer J. P.* Methods for measuring the infrared spectra of biological cells // *Phys. Med. Biol.* 2003. V. 48. P. 243–257.
219. *Drezek R., Guillaud M., Collier T., Boiko I., Malpica A., Macaulay C., Follen M., Richards-Kortum R.* Light scattering from cervical cells throughout neoplastic progression: Influence of nuclear morphology, DNA content, and chromatin texture // *J. Biomed. Opt.* 2000. V. 8. P. 7–16.
220. *Schmitt J. M., Kumar G.* Turbulent nature of refractive-index variations in biological tissue // *Opt. Lett.* 1996. V. 21. P. 1310–1312.
221. *Zimnyakov D. A., Tuchin V. V., Mishin A. A.* Spatial speckle correlometry in applications to tissue structure monitoring // *App. Opt.* 1997. V. 36. P. 5594–5607.
222. *Schmitt J. M., Kumar G.* Optical scattering properties of soft tissue: a discrete particle model // *Appl. Opt.* 1998. V. 37, № 13. P. 2788–2797.
223. *Гудмен Дж.* Статистическая оптика / Пер. с англ. под ред. Г. В. Скродского. М.: Мир, 1988; *Goodman J. W.* Statistical Optics. N. Y., et al.: Wiley-Interscience, 1985.
224. *Сидько Ф. Я., Лопатин В. Н., Парамонов Л. Е.* Поляризационные характеристики взвесей биологических частиц. Новосибирск: Наука СО, 1990.
225. *Borovoi A. G., Naats E. I., Oppel U. G.* Scattering of light by a red blood cell // *J. Biomed. Opt.* 1998. V. 3, № 3. P. 364–372.
226. *Борн М., Вольф Э.* Основы оптики. М.: Наука, 1970 / Пер. с англ. под ред. Г. П. Мотулевич; *Born M., Wolf E.* Principles of Optics, 7th ed., Cambridge Cambridge Univ. Press, 1999.
227. *Dyson R. D.* Cell Biology: a Molecular Approach. Boston: Allyn and Bacon, 1974.
228. *Latimer P.* Light scattering and absorption as methods of studying cell population parameters // *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 1982. V. 11, № 1. P. 129–150.

229. Sokolov K., Drezek R., Gossagee K., Richards-Kortum R. Reflectance spectroscopy with polarized light: is it sensitive to cellular and nuclear morphology // *Opt. Express*. 1999. V. 5. P. 302–317.
230. Yaroslavsky A. N., Yaroslavsky I. V., Goldbach T., Schwarzmaier H.-J. Influence of the scattering phase function approximation on the optical properties of blood determined from the integrating sphere measurements // *J. Biomed. Opt.* 1999. V. 4. P. 47–53.
231. Kumar G., Schmitt J. M. Micro-optical properties of tissue // *Proc. SPIE*. 1996. V. 2679. P. 106–116.
232. Mourant J. R., Johnson T. M., Carpenter S., Guerra A., Aida T., Freyer J. P. Polarized angular dependent spectroscopy of epithelial cells and epithelial cell nuclei to determine the size scale of scattering structures // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, № 3. P. 378–387.
233. Hogan M. J., Alvarado J. A., Weddel J. *Histology of the Human Eye*, Philadelphia: Sanders W. B. Co., 1971.
234. Zhou Q., Knighton R. W. Light scattering and form birefringence of parallel cylindrical arrays that represent cellular organelles of the retinal nerve fiber layer // *Appl. Opt.* 1997. V. 36, № 10. P. 2273–2285.
235. Videen G., Ngo D. Light scattering multipole solution for a cell // *J. Biomed. Opt.* 1998. V. 3. P. 212–220.
236. Mourant J. R., Johnson T. M., Doddi V., Freyer J. P. Angular dependent light scattering from multicellular spheroids // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, № 1. P. 93–99.
237. Шифрин К. С. Введение в оптику океана. Л.: Гидрометеиздат, 1983; Shifrin K. S. *Physical Optics of Ocean Water*. N. Y.: American Institute of Physics, 1988.
238. Tuchin V. V., Maksimova I. L., Zimnyakov D. A., Kon I. L., Mavlutov A. H., Mishin A. A. Light propagation in tissues with controlled optical properties // *J. Biomed. Opt.* 1997. V. 2, № 4. P. 401–417.
239. Tuchin V. V., Zhestkov D. M. Tissue structure and eye lens transmission and scattering spectra // *Proc. SPIE*. 1997. V. 3053. P. 123–128.
240. Moss-Salentijn L., Hendricks-Klyvert M. *Dental and Oral Tissues, an Introduction* / 3rd edition. Philadelphia. London: Lea & Febiger, 1990.
241. *Measuring the Skin* / Ed. by P. Agache, P. Humbert. Berlin, Heidelberg: Springer, 2004.
242. Уэй Т. Физические основы молекулярной биологии / Пер. с англ. М.: Изд. дом «Интеллект», 2010; Waigh T. A. *Applied Biophysics. A Molecular Approach for Physical Scientists*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2007.
243. Плескова С. Н. Атомно-силовая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях. М.: Изд. дом «Интеллект», 2011.
244. Чандлер Д., Робертсон Р. Оптическая и электронная микроскопия в медицине и биологии / Пер. с англ. М.: Изд. дом «Интеллект», 2010.
245. Beuthan J., Minet O., Helfmann J., Herring M., Müller G. The spatial variation of the refractive index in biological cells // *Phys. Med. Biol.* 1996. V. 41, № 3. P. 369–382.
246. Silver F. H. *Biological Materials: Structure, Mechanical Properties, and Modeling of Soft Tissues*. N. Y.: N. Y. Univ. Press, 1987.
247. Kessel R. G. *Basic Medical Histology: The Biology of Cells, Tissues, and Organs*. N. Y.: Oxford Univ. Press, 1998.
248. Bolin F. P., Preuss L. E., Taylor R. C., Ference R. J. Refractive index of some mammalian tissues using a fiber optic cladding method // *Appl. Opt.* 1989. V. 28. P. 2297–2303.
249. Rappaz B., Marquet P., Cuche E., Emery Y., Depeursinge C., Magistretti P. Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy // *Optics Express*. 2005. V. 13. P. 9361–9373.
250. Charrière F., Pavillon N., Colomb T., Depeursinge C., Heger T. J. Living specimen tomography by digital holographic microscopy: morphometry of testate amoeba // *Opt. Express*. 2006. V. 14. P. 7005–7013.
251. Rappaz B., Charrière F., Depeursinge C., Magistretti P. J., Marquet P. Simultaneous cell morphometry and refractive index measurement with dual-wavelength digital holographic

- microscopy and dye-enhanced dispersion of perfusion medium // *Opt. Lett.* 2008. V. 33. P. 744–746.
252. *Popescu G., Ikeda T., Best C., Badizadegan K., Dasari R.R., Feld M.S.* Erythrocyte structure and dynamics quantified by Hilbert phase microscopy // *J. Biomed. Opt.* 2005. V. 10. P. 060503-1–3.
253. *Park Y., Popescu G., Badizadegan K., Dasari R., Feld M.* Diffraction phase and fluorescence microscopy // *Opt. Express.* 2006. V. 14, № 18. P. 8263–8268.
254. *Lue N., Popescu G., Ikeda T., Dasari R.R., Badizadegan K., Feld M.S.* Live cell refractometry using microfluidic devices // *Opt. Lett.* 2006. V. 31. P. 2759–2761.
255. *Choi W., Fang-Yen C., Badizadegan K., Oh S., Lue N., Dasari R.R., Feld M.S.* Tomographic phase microscopy // *Nature Methods.* 2007. V. 4. P. 717–719.
256. *Popescu G., Park Y., Choi W.* Imaging red blood cell dynamics by quantitative phase microscopy // *Blood Cells Mol. Diseases.* 2008. V. 4, № 1. P. 10–16.
257. *Popescu G.* Quantitative phase imaging of nanoscale cell structure and dynamics. Chapter 5 // *Methods in Cell Biology* / Ed. by B. Jena. V. 90. Elsevier Inc., 2008. P. 87–115.
258. *Lue N., Choi W., Popescu G., Yaqoob Z., Badizadegan K., Dasari R., Feld M.* Live cell refractometry using Hilbert phase microscopy and confocal reflectance // *J. Phys. Chem. A.* 2009. V. 113. P. 13327–13330.
259. *Park Y.-K., Best C.A., Badizadegan K., Dasari R.R., Feld M.S., Kuriabova T., Henle M.L., Levine A.J., Popescu G.* Measurement of red blood cell mechanics during morphological changes // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2010. V. 107, № 15. P. 6731–6736.
260. *Kemper B., Carl D., Schnekenburger J., Bredebusch I., Schäfer M., Domschke W., von Bally G.* Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy // *J. Biomed. Opt.* 2006. V. 11, № 3. P. 034005-1–8.
261. *Kemper B., Kosmeier S., Langehanenberg P., von Bally G., Bredebusch I., Domschke W., Schnekenburger J.* Integral refractive index determination of living suspension cells by multi focus digital holographic phase contrast microscopy // *J. Biomed. Opt.* 2007. V. 12. P. 054009-1–9.
262. *Kemper B., von Bally G.* Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection // *Appl. Opt.* 2008. V. 47. P. A52–A61.
263. *Kemper B., Schnekenburger J.* Digital holographic microscopy for quantitative live cell imaging and cytometry. Chapter 8 // *Advanced Optical Cytometry: Methods and Disease Diagnoses* / Ed. by V. V. Tuchin. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011.
264. *Rommel C.E., Dierker C., Schmidt L., Przibilla S., von Bally G., Kemper B., Schnekenburger J.* Contrast-enhanced digital holographic imaging of cellular structures by manipulating the intracellular refractive index // *J. Biomed. Opt.* 2010. 15, № 4. P. 041509-1–10.
265. *Debailleul M., Georges V., Simon B., Morin R., Haeberlé O.* High resolution three-dimensional tomographic diffractive microscopy of transparent inorganic and biological samples // *Opt. Lett.* 2009. V. 34. P. 79–81.
266. *Vishnyakov G., Levin G., Minaev V., Pickalov V., Likharev A.* Tomographic interference microscopy of living cells // *Eur. J. Microscopy and Analysis.* 2004. V. 87. P. 19–21.
267. *Тычинский В.П.* Динамическая фазовая микроскопия: возможен ли «диалог» с клеткой? // *УФН.* 2007. Т. 177, № 5. С. 535–552.
268. *Tychinsky V.* The metabolic component of cellular refractivity and its importance for optical cytometry // *J. Biophoton.* 2009. V. 2, № 8–9. P. 494–504.
269. *Чиссов В.И., Тычинский В.П., Волченко Н.Н., Решетов И.В., Кретушев А.В., Вышенская Т.В., Славнова Е.Н., Барыгина В.В., Клемяшов И.В.* Когерентная фазовая микроскопия опухолей на модели рака молочной железы // *Российский онкологический журнал.* 2006. Т. 2. С. 11–15.
270. *Тычинский В.П., Кретушев А.В., Клемяшов И.В., Вышенская Т.В., Иванов А.Б., Игнатъев П.С., Филиппова Н.А., Райхлин Н.Т., Штиль А.А.* Снижение фазовой толщины — характерная реакция ядрышек на токсические воздействия при исследова-

- нии методом когерентной фазовой микроскопии // Бюлл. эксп. биол. мед. 2007. Т. 4. С. 473–477.
271. Graaff R., Aarnoudse J.G., Zijp J.R., Sloot P.M.A., de Mul F.F.M., Greve J., Koelink M.H. Reduced light scattering properties for mixtures of spherical particles: a simple approximation derived from Mie calculations // *Appl. Opt.* 1992. V. 31. P. 1370–1376.
272. Perelman L. T., Backman V., Wallace M., Zonios G., Manoharan R., Nusrat A., Shields S., Seiler M., Lima C., Hamano T., Itzkan I., Van Dam J., Crawford J.M., Feld M.S. Observation of periodic fine structure in reflectance from biological tissue: a new technique for measuring nuclear size distribution // *Phys. Rev. Lett.* 1998. V. 80. P. 627–630.
273. Ван-де-Хюльст Г. Рассеяние света малыми частицами. М.: ИЛ, 1961; *van de Hulst H. C. Light Scattering by Small Particles.* N. Y.: Wiley, 1957 [reprint, N. Y.: Dover, 1981].
274. *van de Hulst H. C. Multiple Light Scattering. Tables, Formulas and Applications.* N. Y.: Academic Press, 1980.
275. Исимару А. Распространение и рассеяние волн в случайно-неоднородных средах. М.: Мир, 1981; *Ishimaru A. Wave Propagation and Scattering in Random Media.* N. Y.: IEEE Press, 1997.
276. Чандрасекар С. Перенос лучистой энергии. М.: ИЛ, 1953; *Chandrasekhar C. Radiative Transfer.* Toronto, Ontario: Dover, 1960.
277. *Sobolev V. V. Light Scattering in Planetary Atmospheres.* Oxford: Pergamon Press, 1974.
278. Zege E. P., Ivanov A. P., Katsev I. L. Image Transfer through a Scattering Medium. N. Y.: Springer-Verlag, 1991.
279. Долгинов А. З., Гнедин Ю. М., Силантьев Н. А. Распространение и поляризация излучения в космической среде. М.: Наука, 1979; *Dolginov A. Z., Gnedin Yu. N., Silant'ev N. A. Propagation and Polarization of Radiation in Cosmic Media.* Basel: Gordon and Breach, 1995.
280. *Mishchenko M. I., Travis L. D., Lacis A. A. Multiple Scattering of Light by Particles: Radiative Transfer and Coherent Backscattering.* N. Y.: Cambridge University Press, 2006.
281. *Yanovitskij E. J. Light Scattering in Inhomogeneous Atmospheres.* Berlin: Springer-Verlag, 1997.
282. *Thomas G. E., Stamnes K. Radiative Transfer in the Atmosphere and Ocean.* N. Y.: Cambridge University Press, 1999.
283. Durian D.J. The diffusion coefficient depends on absorption // *Opt. Lett.* 1998. V. 23. P. 1502–1504.
284. *Ishimaru A. Diffusion of light in turbid material // Appl. Opt.* 1989. V. 28. P. 2210–2215.
285. *Farrell T. J., Patterson M. S., Wilson B. C. A diffusion theory model of spatially resolved, steady-state diffuse reflectance for the noninvasive determination of tissue optical properties in vivo // Med. Phys.* 1992. V. 19. P. 881–888.
286. *Keijzer M., Star W. M., Storchi P. R. M. Optical diffusion in layered media // Appl. Opt.* 1988. V. 27. P. 1820–1824.
287. *Yoon G., Prahl S. A., Welch A. J. Accuracies of the diffusion approximation and its similarity relations for laser irradiated biological media // Appl. Opt.* 1989. V. 28. P. 2250–2255.
288. *Yoo K. M., Liu F., Alfano R. R. When does the diffusion approximation fail to describe photon transport in random media? // Phys. Rev. Lett.* 1990. V. 64, № 22. P. 2647–2650.
289. *Dayan I., Halvin S., Weiss G. H. Photon migration in a 2-layer turbid medium — a diffusion analysis // J. Modern Opt.* 1992. V. 39, № 7. P. 1567–1582.
290. *Wang L. V., Jacques S. L. Source of error in calculation of optical diffuse reflectance from turbid media using diffusion theory // Comput. Meth. Progr. Biomed.* 2000. V. 61. P. 163–170.
291. *Martelli F., Bassani M., Alianelli L., Zangheri L., Zaccanti G. Accuracy of the diffusion equation to describe photon migration through an infinite medium: numerical and experimental investigation // Phys. Med. Biol.* 2000. V. 45. P. 1359–1373.

292. *Del Bianco S., Martelli F., Zaccanti G.* Penetration depth of light re-emitted by a diffusive medium: theoretical and experimental investigation // *Phys. Med. Biol.* 2002. V. 47. P. 4131–4144.
293. *Graaff R., Rinzema K.* Practical improvements on photon diffusion theory: application to isotropic scattering // *Phys. Med. Biol.* 2001. V. 46. P. 3043–3050.
294. *Sahni D. C., Dahl E. B., Sjostrand N. G.* Diffusion coefficient for photon transport in turbid media // *Phys. Med. Biol.* 2003. V. 48. P. 3969–3976.
295. *Khan T., Jiang H.* A new diffusion approximation to the radiative transfer equation for scattering media with spatially varying refractive indices // *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* 2003. V. 5. P. 137–141.
296. *Haskell R. C., Svaasand L. O., Tsay T.-T., Feng T. C., McAdams M. N., Tromberg B. J.* Boundary conditions for the diffusion equation in radiative transfer // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1994. V. 11, № 10. P. 2727–2741.
297. *Kienle A., Patterson M. S.* Improved solutions of the steady-state and time-resolved diffusion equations for reflectance from a semi-infinite turbid media // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1997. V. 14. P. 246–254.
298. *Farrell T. J., Patterson M. S.* Experimental verification of the effect of refractive index mismatch on the light fluence in a turbid medium // *J. Biomed. Opt.* 2001. V. 6, № 4. P. 468–473.
299. *Rice B. W., Cable M. D., Nelson M. B.* *In vivo* imaging of light-emitting probes // *J. Biomed. Opt.* 2001. V. 6, № 4. P. 432–440.
300. *Motamedi M., Rastegar S., LeCarpentier G., Welch A. J.* Light and temperature distribution in laser irradiated tissue: the influence of anisotropic scattering and refractive index // *Appl. Opt.* 1989. V. 28. P. 2230–2237.
301. *Arridge S. R., Schweiger M., Hiraoka M., Delpy D. T.* A finite element approach for modelling photon transport in tissue // *Med. Phys.* 1993. V. 20. P. 299–309.
302. *Star W. M.* Comparing the P₃-approximation with diffusion theory and with Monte Carlo calculations of light propagation in a slab geometry / *Dosimetry of Laser Radiation in Medicine and Biology* / Ed. by G. J. Mueller, D. H. V. Sliney. IS5. Bellingham, WA: SPIE Press, 1989. P. 146–154.
303. *Star W. M.* Light dosimetry *in vivo* // *Phys. Med. Biol.* 1997. V. 42. P. 763–787.
304. *Dickey D. J., Moore R. B., Rayner D. C., Tulip J.* Light dosimetry using the P₃ approximation // *Phys. Med. Biol.* 2001. V. 46. P. 2359–2370.
305. *Phylips-Invernizzi B., Dupont D., Caze C.* Bibliographical review for reflectance of diffusing media // *Opt. Eng.* 2001. V. 40, № 6. P. 1082–1092.
306. *Tuchin V. V., Utz S. R., Yaroslavsky I. V.* Tissue optics, light distribution, and spectroscopy // *Opt. Eng.* 1994. V. 33. P. 3178–3188.
307. *Соболь И. М.* Численные методы Монте-Карло. М.: Наука, 1973.
308. *Ермаков С. М., Михайлов Г. А.* Курс статистического моделирования. М.: Наука, 1976.
309. *Wilson B. C., Adam G. A.* Monte Carlo model for the absorption and flux distributions of light in tissue // *Med. Phys.* 1983. V. 10. P. 824–830.
310. *Prahl S. A., Keijzer M., Jacques S. L., Welch A. J.* Monte Carlo model of light propagation in tissues // *Dosimetry of Laser Radiation in Medicine and Biology* / Ed. by G. J. Müller, D. H. Sliney. Bellingham, WA: SPIE Press, 1989. V. IS5. P. 102–111.
311. *Keijzer M., Jacques S. L., Prahl S. A., Welch A. J.* Monte Carlo simulation for finite-diameter laser beams // *Lasers Surg. Med.* 1989. V. 9. P. 148–154.
312. *Keijzer M., Richards-Kortum R. R., Jacques S. L., Feld M. S.* Fluorescence spectroscopy of turbid media: autofluorescence of the human aorta // *Appl. Opt.* 1989. V. 28, № 20. P. 4286–4292.
313. *Flock S. T., Wilson B. C., Wyman D. R., Patterson M. S.* Monte Carlo modeling of light-propagation in highly scattering tissues I: model predictions and comparison with diffusion theory // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1989. V. 36, № 10. P. 1162–1168.

314. Flock S. T., Wilson B. C., Patterson M. S. Monte Carlo modeling of light-propagation in highly scattering tissues II: comparison with measurements in phantoms // IEEE Trans. Biomed. Eng. 1989. V. 36, № 10. P. 1169–1173.
315. Schmitt J. M., Zhou G. X., Walker E. C., Wall R. T. Multilayer model of photon diffusion in skin // J. Opt. Soc. Am. 1990. V. A7. P. 2141–2153.
316. Jacques S. L. The role of skin optics in diagnostic and therapeutic uses of lasers // Lasers in Dermatology. Berlin: Springer-Verlag, 1991. P. 1–21.
317. Key H., Davies E. R., Jackson P. C., Wells P. N. T. Optical attenuation characteristics of breast tissues at visible and near-infrared wavelengths // Phys. Med. Biol. 1991. V. 36, № 5. P. 579–590.
318. Ярославский И. В., Тучин В. В. Распространение света в многослойных рассеивающих средах. Моделирование методом Монте-Карло // Опт. спектр. 1992. Т. 72. С. 934–939.
319. Wang L. H., Jacques S. L. Hybrid model of the Monte Carlo simulation and diffusion theory for light reflectance by turbid media // J. Opt. Soc. Am. A. 1993. V. 10. P. 1746–1752.
320. Graaff R., Koelink M. H., de Mul F. F. M. et al. Condensed Monte Carlo simulations for the description of light transport // Appl. Opt. 1993. V. 32, № 4. P. 426–434.
321. Tuchin V. V., Utz S. R., Yaroslavsky I. V. Skin optics: modeling of light transport and measuring of optical parameters // Medical optical tomography: functional imaging and monitoring / Ed. by G. Müller, B. Chance, R. Alfano et al. Bellingham, WA: SPIE, 1993. V. IS11. P. 234–258.
322. Graaff R., Dassel A. C. M., Koelink M. H., de Mul F. F. M., Aarnoudse J. G., Zijlstra W. G. Optical properties of human dermis *in vitro* and *in vivo* // Appl. Opt. 1993. V. 32. P. 435–447.
323. Щербаков Ю. Н., Якунин А. Н., Ярославский И. В., Тучин В. В. Моделирование тепловых процессов при взаимодействии некоагулирующего лазерного излучения с многослойной биотканью. 1. Теория и модели расчета // Опт. спектр. 1994. Т. 76, № 5. С. 845–849.
324. Щербаков Ю. Н., Якунин А. Н., Ярославский И. В., Тучин В. В. Моделирование тепловых процессов при взаимодействии некоагулирующего лазерного излучения с многослойной биотканью. 2. Численные модели // Опт. спектр. 1994. Т. 76, № 5. С. 850–857.
325. Tuchin V. V., Scherbakov Yu. N., Yakunin A. N., Yaroslavsky I. V. Numerical technique for modeling of laser-induced hyperthermia // Laser-induced interstitial thermotherapy / Ed. by G. Müller, A. Roggan. Bellingham, WA: SPIE Press, 1995. P. 100–113.
326. Jacques S. L., Wang L. Monte Carlo modeling of light transport in tissues // Optical-thermal response of laser-irradiated tissue / Ed. by A. J. Welch, M. J. C. van Gemert. N. Y.: Plenum Press, 1995. P. 73–100.
327. Wang L., Jacques S. L., Zheng L. MCML — Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues // Comput. Meth. Progr. Biomed. 1995. V. 47. P. 131–146.
328. Arridge S. R., Hiraoka M., Schweiger M. Statistical basis for the determination of optical pathlength in tissue // Phys. Med. Biol. 1995. V. 40. P. 1539–1558.
329. Troy T. L., Page D. L., Sevick-Muraca E. M. Optical properties of normal and diseased breast tissues: prognosis for optical mammography // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1, № 3. P. 342–355.
330. Okada E., Firbank M., Schweiger M. et al. Theoretical and experimental investigation of near-infrared light propagation in a model of the adult head // Appl. Opt. 1997. V. 36, № 1. P. 21–31.
331. Kolinko V. G., de Mul F. F. M., Greve J., Priezzhev A. V. On refraction in Monte-Carlo simulations of light transport through biological tissues // Med. Biol. Eng. Comp. 1997. V. 35. P. 287–288.
332. Wang L.-H. Rapid modeling of diffuse reflectance of light in turbid slabs // J. Opt. Soc. Am. A. 1998. V. 15, № 4. P. 936–944.
333. Simpson C. R., Kohl M., Essenpreis M., Cope M. Near-infrared optical properties of *ex vivo* human skin and subcutaneous tissues measured using the Monte Carlo inversion technique // Phys. Med. Biol. 1998. V. 43. P. 2465–2478.

334. *Laufer J., Simpson C.R., Kohl M., Essenpreis M., Cope M.* Effect of temperature on the optical properties of *ex vivo* human dermis and subdermis // *Phys. Med. Biol.* 1998. V. 43. P. 2479–2489.
335. *Ripley P.M., Laufer J.G., Gordon A.D., Connell R.J., Bown S.G.* Near-infrared optical properties of *ex vivo* human uterus determined by the Monte Carlo inversion technique // *Phys. Med. Biol.* 1999. V. 44. P. 2451–2462.
336. *de Jode M.L.* Monte Carlo simulations of light distributions in an embedded tumour model: studies of selectivity in photodynamic therapy // *Lasers Med. Sci.* 2000. V. 15. P. 49–56.
337. *Jeraj R., Keall P.* The effect of statistical uncertainty on inverse treatment planning based on Monte Carlo dose calculation // *Phys. Med. Biol.* 2000. V. 45. P. 3601–3613.
338. *Меглинский И.В.* Моделирование спектров отражения оптического излучения от случайно-неоднородных многослойных сильно рассеивающих и поглощающих свет сред методом Монте-Карло // *Квант. электрон.* 2001. Т. 31, № 12. С. 1101–1107.
339. *Hayakawa C.K., Spanier J., Bevilacqua F., Dunn A.K., You J.S., Tromberg B.J., Venugopalan V.* Perturbation Monte Carlo methods to solve inverse photon migration problems in heterogeneous tissues // *Opt. Lett.* 2001. V. 26, № 17. P. 1335–1337.
340. *Meglinski I.V., Matcher S.J.* Quantitative assessment of skin layers absorption and skin reflectance spectra simulation in visible and near-infrared spectral region // *Physiol. Meas.* 2002. V. 23. P. 741–753.
341. *Preece S.J., Claridge E.* Monte Carlo modelling of the spectral reflectance of the human eye // *Phys. Med. Biol.* 2002. V. 47. P. 2863–2877.
342. *Boas D.A., Culver J.P., Stott J.J., Dunn A.K.* Three-dimensional Monte Carlo code for photon migration through complex heterogeneous media including the adult human head // *Optics Express.* 2002. V. 10, № 3. P. 159–170.
343. *Meglinski I.V., Matcher S.J.* Computer simulation of the skin reflectance spectra // *Comput. Meth. Progr. Biomed.* 2003. V. 70. P. 179–186.
344. *de Mul F.F.M.* Monte-Carlo simulations of light scattering in turbid media. Chapter 15 // *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science. V.2* / Ed. by V.V. Tuchin. Second edition. Berlin, Heidelberg, N.Y.: Springer-Verlag, 2012. P. 593–662.
345. *Yaroslavsky A.N., Yaroslavsky I.V., Goldbach T., Schwarzmaier H.-J.* The optical properties of blood in the near infrared spectral range // *Proc. SPIE.* 1996. V. 2678. P. 314–324.
346. *Yaroslavsky A.N., Yaroslavsky I.V., Goldbach T., Schwarzmaier H.-J.* Different phase function approximations to determine optical properties of blood: a comparison // *Proc. SPIE.* 1997. V. 2982. P. 324–330.
347. *McShane M., Rastegar S., Pishko M., Côte G.* Monte Carlo modeling of implantable fluorescent analyte sensors // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2000. V. 47, № 5. P. 624–632.
348. *Churmakov D.Y., Meglinski I.V., Greenhalgh D.A.* Influence of refractive index matching on the photon diffuse reflectance // *Phys. Med. Biol.* 2002. V. 47, № 23. P. 4271–4285.
349. *Vishwanath K., Pogue B., Mycek M.* Quantitative fluorescence spectroscopy in turbid media: comparison of theoretical, experimental and computational methods // *Phys. Med. Biol.* 2002. V. 47, № 18. P. 3387–3405.
350. *Churmakov D.Y., Meglinski I.V., Piletsky S.A., Greenhalgh D.A.* // Analysis of skin tissues spatial fluorescence distribution by the Monte Carlo simulation // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2003. V. 36, № 14. P. 1722–1728.
351. *Meglinski I.V., Churmakov D.Y., Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V.* The enhancement of confocal images of tissues at bulk optical immersion // *Laser Phys.* 2003. V. 13, № 1. P. 65–69.
352. *Кузьмин В.Л., Меглинский И.В.* Когерентные эффекты многократного рассеяния и метод Монте-Карло // *Письма ЖЭТФ.* 2004. Т. 79, № 3. С. 139–142.
353. *Meglinski I.V., Kuzmin V.L., Churmakov D.Y., Greenhalgh D.A.* Monte Carlo simulation of coherent effects in multiple scattering // *Proc. Royal Soc. A.* 2005. V. 461, № 2053. P. 43–53.

354. *Ramella-Roman J., Prahl S., Jacques S.* Three Monte Carlo programs of polarized light transport into scattering media: part I // *Opt. Express*. 2005. V. 13, № 12. P. 4420–4438; part II // *Opt. Express*. 2005. V. 13, № 25. P. 10392–10405.
355. *Kirillin M. Yu., Priezzhev A. V., Tuchin V. V., Wang R. K., Myllylä R.* Effect of red blood cell aggregation and sedimentation on optical coherence tomography signals from blood samples // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2005. V. 38. P. 2582–2589.
356. *Berrocal E., Meglinski I.* New model for light propagation in highly inhomogeneous poly-disperse turbid media with applications in spray diagnostics // *Opt. Express*. 2005. V. 13, № 23. P. 9181–9195.
357. *Chicea D., Turcu I.* Testing a new multiple light scattering phase function using RWMCS // *J. Optoelectr. Adv. Materials*. 2006. V. 8, № 4. P. 1516–1519.
358. *Chicea D., Turcu I.* RWMCS — An alternative random walk Monte Carlo code to simulate light scattering in biological suspensions // *Optik*. 2007. V. 118. P. 232–236.
359. *Berrocal E., Meglinski I. V., Greenhalgh D. A., Linne M. A.* Image transfer through the complex scattering turbid media // *Laser Phys. Letts*. 2006. V. 3, № 9. P. 464–468.
360. *Berrocal E., Sedarsky D., Paciaroni M., Meglinski I. V., Linne M. A.* Laser light scattering in turbid media Part I: Experimental and simulated results for the spatial intensity distribution // *Opt. Express*. 2007. V. 15. P. 10649–10665.
361. *Berrocal E., Sedarsky D. L., Paciaroni M. E., Meglinski I. V., Linne M. A.* Laser light scattering in turbid media Part II: Spatial and temporal analysis of individual scattering orders via Monte Carlo simulation // *Opt. Express*. 2009. V. 17. P. 13792–13809.
362. *Meglinski I. V., Kirillin M., Kuzmin V. L., Myllylä R.* Simulation of polarization-sensitive optical coherence tomography images by a Monte Carlo method // *Opt. Letts*. 2008. V. 33, № 14. P. 1581–1583.
363. *Кандидов В. П., Милицин В. О., Быков А. В., Приезжев А. В.* Использование корпускулярного и волнового методов Монте-Карло в оптике дисперсных сред // *Квант. электр.* 2006. Т. 36, № 11. С. 1003–1008.
364. *Alerstam E., Svensson T., Andersson-Engels S.* Parallel computing with graphics processing units for high-speed Monte Carlo simulation of photon migration // *J. Biomed. Opt.* 2008. V. 13. P. 060504-1–10.
365. *Binzoni T., Leung T. S., Van De Ville D.* The photo-electric current in laser-Doppler flowmetry by Monte Carlo simulations // *Phys. Med. Biol.* 2009. V. 54, № 14. P. № 303–№ 318.
366. *Fredriksson I., Larsson M., Strömberg T.* Forced detection Monte Carlo algorithms for accelerated blood vessel image simulations // *J. Biophoton*. 2009. V. 2, № 3. P. 178–184.
367. *Kirillin M., Meglinski I., Sergeeva E., Kuzmin V. L., Myllylä R.* Simulation of optical coherence tomography images by Monte Carlo modeling based on polarization vector approach // *Opt. Express*. 2010. V. 18, № 21. P. 21714–21724.
368. *Sakota D., Takatani S.* Photon-cell interactive Monte Carlo model based on the geometrical optics theory for photon migration in blood by incorporating both extra and intra-cellular pathways // *J. Biomed. Opt.* 2010. V. 15, № 6. P. 065001-1–14.
369. *Valisuo P., Kaartinen I., Tuchin V., Alander J.* New closed-form approximation for skin chromophore mapping // *J. Biomed. Opt.* 2011. V. 16, № 4. P. 046012-1–10.
370. *Doronin A., Meglinski I.* Online object oriented Monte Carlo computational tool for the needs of biomedical optics // *Biomed. Opt. Express*. 2011. V. 2, № 9. P. 2461–2469.
371. *Meglinski I.* SPIE News, website <http://biophotonics.otago.ac.nz>
372. *Bashkatov A. N., Genina E. A., Tuchin V. V.* Optical properties of skin, subcutaneous, and muscle tissues: a review // *J. Innov. Opt. Health Sci.* 2011. V. 4, № 1. P. 9–38.
373. *Pratx G., Xing L.* Monte Carlo simulation of photon migration in a cloud computing environment with MapReduce // *J. Biomed. Opt.* 2011. V. 16, № 12. P. 125003-1–9.
374. *Воронов А. В., Третьяков Е. В., Шувалов В. В.* Быстрое интегрирование по путям при моделировании распространения света через сильно рассеивающие объекты // *Квант. электр.* 2004. Т. 34, № 6. С. 547–553.

375. Петникова В. М., Третьяков Е. В., Шувалов В. В. Устойчивость фазовой функции Хенни–Гринштейна и быстрое интегрирование по путям в условиях многократного рассеяния света // Квант. электр. 2006. Т. 36, № 11. С. 1039–1042.
376. Wilson M. J., Wang R. K. A path-integral model of light scattered by turbid media // J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys. 2001. V. 34. P. 1453–1472.
377. Perelman L. T., Wu J., Itzkan I., Feld M. S. Photon migration in turbid media using path integrals // Phys. Rev. Lett. 1994. V. 72. P. 1341–1344.
378. Polishchuk A. Y., Aljano R. R. Fermat photons in turbid media: an exact analytic solution for most favorable paths — a step toward optical tomography // Opt. Lett. 1995. V. 20. P. 1937–1939.
379. Jacques S. L. Path integral description of light transport in tissue // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1998. V. 838. P. 1–13.
380. Кравченко О. В., Любимов В. В. Применение метода плавных возмущений к решению задач оптической томографии сильнорассеивающих объектов, содержащих поглощающие макронеоднородности // Опт. спектр. 2000. Т. 89. С. 119–124.
381. Lyubimov V. V., Kalintsev A. G., Kononov A. B. et al. Application of the photon average trajectories method to real-time reconstruction of tissue inhomogeneities in diffuse optical tomography of strongly scattering media // Phys. Med. Biol. 2002. V. 47. P. 2109–2128.
382. Gandjbakhche A. H., Chernomordik V., Hebden J. C., Nossal R. Time-dependent contrast functions for quantitative imaging in time-resolved transillumination experiments // Appl. Opt. 1998. V. 37. P. 1973–1981.
383. Yaroslavsky A. N., Utz S. R., Tatarintsev S. N., Tuchin V. V. Angular scattering properties of human epidermal layers // Proc. SPIE. 1994. V. 2100. P. 38–41.
384. Everett M. A., Yeagers E., Sayre R. M., Olson R. L. Penetration of epidermis by ultraviolet rays // Photochem. Photobiol. 1966. V. 5. P. 533–542.
385. Keijzer M., Pickering J. M., van Gemert M. J. C. Laser beam diameter for port wine stain treatment // Lasers Surg. Med. 1991. V. 11. P. 601–605.
386. van Gemert M. J. C., Smithies D. J., Verkrusse W. et al. Wavelengths for port wine stain laser treatment: influence of vessel radius and skin anatomy // Phys. Med. Biol. 1997. V. 42. P. 41–50.
387. Kienle A., Hibst R. A new optimal wavelength for treatment of port wine stains? // Phys. Med. Biol. 1995. V. 40. P. 1559–1576.
388. Kienle A., Lilge L., Patterson M. S. Investigation of multi-layered tissue with *in vivo* reflectance measurements // Proc. SPIE. 1994. V. 2326. P. 212–214.
389. Willmann S., Terenji A., Yaroslavsky I. V., Kahn T., Hering P., Schwarzmaier H.-J. Determination of the optical properties of a human brain tumor using a new microspectrophotometric technique // Proc. SPIE. 1999. V. 3598. P. 233–239.
390. Yaroslavsky A. N., Schulze P. C., Yaroslavsky I. V., Schober R., Ulrich F., Schwarzmaier H.-J. Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues *in vitro* in the visible and near infrared spectral range // Phys. Med. Biol. 2002. V. 47. P. 2059–2073.
391. Star W. M., Wilson B. C., Patterson M. C. Light delivery and dosimetry in photodynamic therapy of solid tumors // Photodynamic Therapy, Basic Principles and Clinical Applications / Ed. by B. W. Henderson, T. J. Dougherty. N. Y.: Marcel-Dekker, 1992. P. 335–368.
392. Nematı B., Rylander III H. G., Welch A. J. Optical properties of conjunctiva, sclera, and the ciliary body and their consequences for transscleral cyclophotocoagulation // Appl. Opt. 1996. V. 35, № 19. P. 3321–3327.
393. Nematı B., Dunn A., Welch A. J., Rylander III H. G. Optical model for light distribution during transscleral cyclophotocoagulation // Appl. Opt. 1998. V. 37, № 4. P. 764–771.
394. van Gemert M. J. C., Welch A. J., Pickering J. W. et al. Wavelengths for laser treatment of port wine stains and telangiectasia // Lasers Surg. Med. 1995. V. 16. P. 147–155.
395. Минин И. Н. Теория переноса излучения в атмосфере планет. М.: Наука, 1988.

396. Cai W., Das B.B., Liu F. *et al.* Time-resolved optical diffusion tomographic image reconstruction in highly scattering media // Proc. Math. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 13561–13564.
397. Arridge S.R., Hebden J.C. Optical imaging in medicine II: modelling and reconstruction // Phys. Med. Biol. 1997. V. 42. P. 841–854.
398. Patterson M.S., Chance B., Wilson B.C. Time resolved reflectance and transmittance for the non-invasive measurement of tissue optical properties // Appl. Opt. 1989. V. 28. P. 2331–2336.
399. Jacques S.L. Time-resolved reflectance spectroscopy in turbid tissues // IEEE Trans. Biomed. Eng. 1989. V. 36. P. 1155–1161.
400. Matcher S.J., Cope M., Delpy D.T. *In vivo* measurements of the wavelength dependence of tissue-scattering coefficients between 760 and 900 nm measured with time-resolved spectroscopy // Appl. Opt. 1997. V. 36, № 1. P. 386–396.
401. Cui W., Wang N., Chance B. Study of photon migration depths with time-resolved spectroscopy // Opt. Lett. 1991. V. 16. P. 1632–1634.
402. Ferrari M., Wei Q., Carraresi L. *et al.* Time-resolved spectroscopy of the human forearm // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1992. V. 16. P. 141–153.
403. Hielscher A.H., Liu H., Chance B. *et al.* Time-resolved photon emission from layered turbid media // Appl. Opt. 1996. V. 35. P. 719–728.
404. de Haller E.B., Deppeursinge C. Simulation of the time-resolved breast transillumination // Med. Biol. Eng. Comp. 1993. V. 31. P. 165–170.
405. Andersson-Engels S., Berg R., Svanberg S., Jarlman O. Time-resolved transillumination for medical diagnostics // Opt. Lett. 1990. V. 15. P. 1179–1181.
406. Wang L., Ho P.P., Liu C. *et al.* Ballistic 2-D imaging through scattering walls using an ultrafast optical Kerr gate // Science. 1991. V. 253. P. 769–771.
407. Das B.B., Yoo K.M., Alfano R.R. Ultrafast time-gated imaging in thick tissues: a step toward optical mammography // Opt. Lett. 1993. V. 18. P. 1092–1094.
408. Любимов В.В. Перенос изображения в плоском слое рассеивающей среды и оценка разрешающей способности при оптической томографии на первопршедших фотонах ультракоротких импульсов // Опт. спектр. 1994. Т. 76. С. 814–815.
409. Yao Y.Q., Wang Y., Pei Y.L. *et al.* Frequency-domain optical imaging of absorption and scattering distributions by Born iterative method // J. Opt. Soc. Am. A. 1997. V. 14, № 1. P. 325–342.
410. Cubeddu R., Pifferi A., Taroni P. *et al.* Time-resolved imaging on a realistic tissue phantom: μ_s' and μ_a images versus time-integrated images // Appl. Opt. 1996. V. 35. P. 4533–4540.
411. Yodh A., Chance B. Spectroscopy and imaging with diffusing light // Physics Today. 1995. March. P. 34–40.
412. Arridge S.R., Cope M., Delpy D.T. Theoretical basis for the determination of optical pathlengths in tissue: temporal and frequency analysis // Phys. Med. Biol. 1992. V. 37. P. 1531–1560.
413. de Haller E.B. Time-resolved transillumination and optical tomography // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1, № 1. P. 7–17.
414. Heusmann H., Kolzer J., Mitic G. Characterization of female breast *in vivo* by time resolved and spectroscopic measurements in near infrared spectroscopy // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1, № 4. P. 425–434.
415. Suzuki K., Yamashita Y., Ohta K. *et al.* Quantitative measurement of optical parameters in normal breast using time-resolved spectroscopy: *In vivo* results of 30 Japanese women // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1, № 3. P. 330–334.
416. Taddeucci A., Martelli F., Barilli M. *et al.* Optical properties of brain tissue // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1, № 1. P. 117–130.
417. Wang R.K., Wilson M.J. Vertex/propagator model for least-scattered photons traversing a turbid medium // J. Opt. Soc. Am. A. 2001. V. 18, № 1. P. 224–231.

418. Tualle J.-M., Tinet E., Prat J., Avriillier S. Light propagation near-turbid — turbid planar interfaces // *Opt. Commun.* 2000. V. 183. P. 337–346.
419. Tsuchiya Y. Photon path distribution and optical responses of turbid media: theoretical analysis based on the microscopic Beer-Lambert Law // *Phys. Med. Biol.* 2001. V. 46. P. 2067–2084.
420. Zacharakis G., Zolindaki A., Sakkalis V., Filippidis G., Papazoglou T. G., Tsiptsis D. D., Koumantakis E. *In vitro* optical characterization and discrimination of female breast tissue during near infrared femtosecond laser pulses propagation // *J. Biomed. Opt.* 2001. V. 6, № 4. P. 446–449.
421. Elaloufi R., Carminati R., Greffet J.-J. Time-dependent transport through scattering media: from radiative transfer to diffusion // *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* 2002. V. 4. P. S103–108.
422. Arijler D., Guillaud M., Carraro A., Malpica A., Follen M., Richards-Kortum R. Light scattering from normal and dysplastic cervical cells at different epithelial depths: finite-difference time-domain modeling with a perfectly matched layer boundary condition // *J. Biomed. Opt.* 2003. V. 8, № 3. P. 484–494.
423. Chernomordik V., Gandjbakhche A. H., Hebden J. C., Zaccanti G. Effect of lateral boundaries on contrast functions in time-resolved transillumination measurements // *Med. Phys.* 1999. V. 26, № 9. P. 1822–1831.
424. Chernomordik V., Gandjbakhche A., Lepore M., Esposito R., Delfino I. Depth dependence of the analytical expression for the width of the point spread function (spatial resolution) in time-resolved transillumination // *J. Biomed. Opt.* 2001. V. 6, № 4. P. 441–445.
425. Chernomordik V., Hattery D. W., Gannot I., Zaccanti G., Gandjbakhche A. Analytical calculation of the mean time spent by photons inside an absorptive inclusion embedded in a highly scattering medium // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, № 3. P. 486–492.
426. Chernomordik V., Hattery D. W., Grosenick D. et al. Quantification of optical properties of a breast tumor using random walk theory // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, № 1. P. 80–87.
427. Ярославский И. В., Ярославская А. Н., Родригес Х., Баттарби Г. Распространение импульсов и волн фотонной плотности в мутных средах // *Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 1 / Под ред. В. В. Тучина. М.: Физматлит, 2007. С. 197–233.*
428. Родригес Х., Ярославский И. В., Ярославская А. Н., Баттарби Г., Тучин В. В. Визуализация с временным разрешением в рассеивающих средах // *Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 1 / Под ред. В. В. Тучина. М.: Физматлит, 2007. С. 312–356.*
429. Фантини С., Францечини М. А. Фазово-модуляционные методы спектроскопии тканей и формирования изображений // *Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 1 / Под ред. В. В. Тучина. М.: Физматлит, 2007. С. 357–397.*
430. Papaioannou D. G., Hooft G. W., Colak S. B., Oostveen J. T. Detection limit in localizing objects hidden in a turbid medium using an optically scanned phased array // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 3. P. 305–310.
431. Pogue B. W., Patterson M. S. Error assessment of a wavelength tunable frequency domain system for noninvasive tissue spectroscopy // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 3. P. 311–323.
432. Fishkin J. B., Coquoz O., Anderson E. R. et al. Frequency-domain photon migration measurements of normal and malignant tissue optical properties in a human subject // *Appl. Opt.* 1997. V. 36, № 1. P. 10–20.
433. Tromberg B. J., Svaasand L. O., Tsay T.-T., Haskell R. C. Properties of photon density waves in multiple-scattering media // *Appl. Opt.* 1993. V. 32. P. 607–616.
434. Tromberg B., Coquoz O., Fishkin J. B. et al. Non-invasive measurements of breast tissue optical properties using frequency-domain photon migration // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 1997. V. 352. P. 661–668.
435. Boas D. A., O’Leary M. A., Chance B., Yodh A. G. Scattering and wavelength transduction of diffuse photon density waves // *Phys. Rev. E.* 1993. V. 47. P. R2999–R3002.
436. Boas D. A., O’Leary M. A., Chance B., Yodh A. G. Scattering of diffuse photon density waves by spherical inhomogeneities within turbid media: analytic solution and applications // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 4887–4891.

437. *Lakowicz J. R., Berndt K.* Frequency-domain measurements of photon migration in tissues // *Chem. Phys. Lett.* 1990. V. 166. P. 246–252.
438. *Patterson M. S., Moulton J. D., Wilson B. C. et al.* Frequency-domain reflectance for the determination of the scattering and absorption properties of tissue // *Appl. Opt.* 1991. V. 30. P. 4474–4476.
439. *Schmitt J. M., Knüttel A., Knutson J. R.* Interference of diffusive light waves // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1992. V. 9. P. 1832–1843.
440. *Fishkin J. B., Gratton E.* Propagation of photon-density waves in strongly scattering media containing an absorbing semi-infinite plane bounded by a straight edge // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1993. V. 10. P. 127–140.
441. *Svaasand L. O., Tromberg B. J., Haskell R. C. et al.* Tissue characterization and imaging using photon density waves // *Opt. Eng.* 1993. V. 32. P. 258–266.
442. *Барун В. В., Иванов А. П.* Тепловое воздействие короткого импульса света на биологические ткани II. Световые и тепловые поля // *Биофизика.* 2005. Т. 50, № 1. С. 132–139.
443. *Сергеева Е. А., Кириллин М. Ю., Приезжев А. В.* Распространение фемтосекундного импульса в рассеивающей среде: теоретический анализ и численное моделирование // *Квантовая электроника.* 2006. Т. 36, № 11. С. 1023–1031.
444. *Мазуренко Ю. Т.* Спектрально-корреляционный метод получения изображений сильно-рассеивающих объектов // *Опт. спектр.* 1994. Т. 76. С. 816–821.
445. *Jiang H. B., Paulsen K. D., Osterberg U. L., Patterson M. S.* Frequency-domain optical-image reconstruction in turbid media — an experimental study of single-target detectability // *Appl. Opt.* 1997. V. 36. P. 52–63.
446. *Madsen S. J., Wyst P., Svaasand L. O. et al.* Determination of the optical properties of the human uterus using frequency-domain photon migration and steady-state techniques // *Phys. Med. Biol.* 1994. V. 39, № 8. P. 1191–1202.
447. *Li X. D., Durduran T., Yodh A. G. et al.* Diffraction tomography for biochemical imaging with diffuse photon-density waves // *Opt. Lett.* 1997. V. 22. P. 573–575.
448. *Matson C. L., Clark N., McMackin L., Fender J. S.* Three-dimensional tumor localization in thick tissue with the use of diffuse photon-density waves // *Appl. Opt.* 1997. V. 36. P. 214–220.
449. *Chance B.* Optical method // *Annual Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1991. V. 20. P. 1–28.
450. *Pogue B. W., Patterson M. S.* Frequency-domain optical absorption spectroscopy of finite tissue volumes using diffusion theory // *Phys. Med. Biol.* 1994. V. 39. P. 1157–1180.
451. *Pogue B. W., Patterson M. S., Jiang H., Paulsen K. D.* Initial assessment of a simple system for frequency domain diffuse optical tomography // *Phys. Med. Biol.* 1995. V. 40. P. 1709–1729.
452. *Wu X., Stinger L., Faris G. W.* Determination of tissue properties by immersion in a matched scattering fluid // *Proc. SPIE, Bellingham, SPIE.* 1997. V. 2979. P. 300–306.
453. *Fantini S., Franceschini M. A., Fishkin J. B. et al.* Quantitative determination of the absorption and spectra of chromophores in strongly scattering media: a light-emitting-diode based technique // *Appl. Opt.* 1994. V. 32. P. 5204–5212.
454. *Franceschini M. A., Moesta K. T., Fantini S.* Frequency-domain techniques enhance optical mammography: initial clinical results // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. P. 6468–6473.
455. *Yaroslavsky I. V., Yaroslavskaya A. N., Tuchin V. V., Schwarzmaier H.-J.* Effect of the scattering delay on time-dependent photon migration in turbid media // *Appl. Opt.* 1997. V. 36, № 22. P. 6529–6538.
456. *Mantulin W. W., Fantini S., Franceschini M. A., Walker S. A., Maier J. S., Gratton E.* Tissue optical parameter map generated with frequency-domain spectroscopy // *Proc. SPIE.* 1995. V. 2396. P. 323–330.
457. *Wabnitz H., Rinneberg H.* Imaging in turbid media by photon density waves: spatial resolution and scaling relations // *Appl. Opt.* 1997. V. 36, № 1. P. 67–73.

458. Boas D. A., O'Leary M. A., Chance B., Yodh A. Detection and characterization of optical inhomogeneities with diffuse photon density waves: a signal-to-noise analysis // *Appl. Opt.* 1997. V. 36. P. 75–92.
459. Knüttel A., Schmitt J. M., Knutson J. R. Spatial localization of absorbing bodies by interfering diffusive photon-density waves // *Appl. Opt.* 1993. V. 32. P. 381–389.
460. Fantini S., Franceschini M. A., Gratton E. Semi-infinite-geometry boundary problem for light migration in highly scattering media: a frequency-domain study in the diffusion approximation // *J. Opt. Soc. Am. B.* 1994. V. 11. P. 2128–2138.
461. Moon J. A., Reintjes J. Image resolution by use of multiply scattered light // *Opt. Lett.* 1994. V. 19. P. 521–523.
462. Weersink A., Hayward J. E., Diamond K. R., Patterson M. S. Accuracy of noninvasive *in vivo* measurements of photosensitizer uptake based on a diffusion model of reflectance spectroscopy // *Photochem. Photobiol.* 1997. V. 66, № 3. P. 326–335.
463. Тучин В. В. Основы взаимодействия низкоинтенсивного лазерного излучения с биотканями: дозиметрический и диагностический аспекты // *Изв. РАН. Сер. физическая.* 1995. Т. 59, № 6. С. 120–143.
464. Chen Y., Mu C., Intes X., Chance B. Signal-to-noise analysis for detection sensitivity of small absorbing heterogeneity in turbid media with single-source and dual-interfering-source // *Opt. Express.* 2001. V. 9, № 4. P. 212–224.
465. Durduran T., Culver J. P., Holboke M. J., Li X. D., Zubkov L., Chance B., Pattanayak D. N., Yodh A. G. Algorithms for 3D localization and imaging using near-field diffraction tomography with diffuse light // *Opt. Express.* 1999. V. 4, № 8. P. 247–262.
466. Матчер С. Дж. Количественное определение и локализация сигнала в спектроскопии ближнего инфракрасного диапазона // *Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 1 / Под ред. В. В. Тучина. М.: Физматлит, 2007. С. 427–505.*
467. Maier J. S., Walker S. A., Fantini S., Franceschini M. A., Gratton E. Possible correlation between blood glucose concentration and the reduced scattering coefficient of tissues in the near infrared // *Opt. Lett.* 1994. V. 19. P. 2062–2064.
468. Kohl M., Cope M., Essenpreis M., Böcker D. Influence of glucose concentration on light scattering in tissue-simulating phantoms // *Opt. Lett.* 1994. V. 19. P. 2170–2172.
469. Bruulsema J. T., Hayward J. E., Farrell T. J., Patterson M. S., Heinemann L., Berger M., Koschinsky J., Sandahal-Christiansen T., Orskov H., Essenpreis M., Schmelzeisen-Redeker G., Böcker D. Correlation between blood glucose concentration in diabetics and noninvasively measured tissue optical scattering coefficient // *Opt. Lett.* 1997. V. 22, № 3. P. 190–192.
470. Erickson M. G., Reynolds J. S., Webb K. J. Comparison of sensitivity for single-source and dual-interfering-source configurations in optical diffusion imaging // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1997. V. 14, № 11. P. 3083–3092.
471. Neil M. A. A., Juskaitis R., Wilson T. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope // *Opt. Lett.* 1997. V. 22, № 24. P. 1905–1907.
472. Ryabukho V. P., Chaussky A. A., Khomutov V. L., Tuchin V. V. Interferometric testing of the random phase objects (biological tissue models) by a spatially-modulated laser beam // *Proc. SPIE.* 1996. V. 2732. P. 100–117.
473. Radchenko E. Yu., Akchurin G. G., Bakutkin V. V., Tuchin V. V., Akchurin A. G. Measurement of retinal visual acuity in human eyes // *Proc. SPIE.* 1999. V. 4001. P. 228–237.
474. Dognitz N., Wagnieres G. Determination of tissue optical properties by steady-state spatial frequency-domain reflectometry // *Lasers Med. Sci.* 1998. V. 13. P. 55–65.
475. Cuccia D. J., Bevilacqua F., Durkin A. J., Tromberg B. J. Modulated imaging: quantitative analysis and tomography of turbid media in the spatial-frequency domain // *Opt. Lett.* 2005. V. 30, № 11. P. 1354–1356.
476. Joshi A., Bangerth W., Sevick-Muraca E. Noncontact fluorescence optical tomography with scanning patterned illumination // *Opt. Express.* 2006. V. 14. P. 6516–6534.

477. Bassi A., Cuccia D., Durkin A., Tromberg B. Spatial shift of spatially modulated light projected on turbid media // *J. Opt. Soc. Am.* 2008. V. 25, № 11. P. 2833–2839.
478. Abookasis D., Lay C., Mathews M., Linskey M., Frostig R., Tromberg B. Imaging cortical absorption, scattering, and hemodynamic response during ischemic stroke using spatially modulated near-infrared illumination // *J. Biomed. Opt.* 2009. V. 14, № 2. P. 024033.
479. Cuccia D., Bevilacqua F., Durkin A.J., Ayers F., Tromberg B. Quantitation and mapping of tissue optical properties using modulated imaging // *J. Biomed. Opt.* 2009. V. 14, № 2. P. 024012-1–13.
480. Gioux S., Mazhar A., Cuccia D.J., Durkin A.J., Tromberg B.J., Frangioni J.V. Three-dimensional surface profile intensity correction for spatially modulated imaging // *J. Biomed. Opt.* 2009. V. 14, № 3. P. 034045.
481. Mazhar A., Cuccia D., Gioux S., Durkin A., Frangioni J., Tromberg B. Structured illumination enhances resolution and contrast in thick tissue fluorescence imaging // *J. Biomed. Opt.* 2010. V. 15, № 1. P. 010506.
482. Mazhar A., Dell S., Cuccia D.J., Gioux S., Durkin A.J., Frangioni J.V., Tromberg B.J. Wavelength optimization for rapid chromophore mapping using spatial frequency domain imaging // *J. Biomed. Opt.* 2010. V. 15. P. 061716.
483. Konecky S.D., Rice T., Durkin A.J., Tromberg B.J. Imaging scattering orientation with spatial frequency domain imaging // *J. Biomed. Opt.* 2011. V. 16, № 12. P. 126001-1–8.
484. Svaasand L.O., Spott T., Fishkin J.B., Pham T., Tromberg B.J., Berns M.W. Reflectance measurements of layered media with diffuse photon-density waves: a potential tool for evaluating deep burns and subcutaneous lesions // *Phys. Med. Biol.* 1999. V. 44, № 3. P. 801–813.
485. Fishkin J.B., Fantini S., van de Ven M.J., Gratton E. Gigahertz photon density waves in a turbid medium: theory and experiments // *Phys. Rev. E* 1996. V. 53, № 3. P. 2307–2319.
486. Kim A.D. Transport theory for light propagation in biological tissue // *J. Opt. Soc. Am. A.* 2004. V. 21, № 5. P. 820–827.
487. Kienle A., Patterson M.A. Determination of the optical properties of turbid media from a single Monte Carlo simulation // *Phys. Med. Biol.* 1996. V. 41. P. 2221–2227.
488. Swartling J., Pifferi A., Enejder A.M., Andersson-Engels S. Accelerated Monte Carlo models to simulate fluorescence spectra from layered tissues // *J. Opt. Soc. Am. A.* 2003. V. 20, № 4. P. 714–727.
489. Spott T., Svaasand L.O. Collimated light sources in the diffusion approximation // *Appl. Opt.* 2000. V. 39, № 34. P. 6453–6465.
490. Carp S.A., Prahl S.A., Venugopalan V. Radiative transport in the delta-P1 approximation: accuracy of fluence rate and optical penetration depth predictions in turbid semi-infinite media // *J. Biomed. Opt.* 2004. V. 9, № 3. P. 632–647.
491. Pham T., Coquoz O., Fishkin J.B., Anderson E., Tromberg B.J. A broad bandwidth frequency domain instrument for quantitative tissue optical spectroscopy // *Rev. Sci. Instrum.* 2000. V. 7. P. 2500–2513.
492. Markel V.A., Schotland J.C. Symmetries, inversion formulas, and image reconstruction for optical tomography // *Phys. Rev. E* 2004. V. 70, № 5. Pt 2. P. 056616.
493. Saager R.B., Cuccia D.J., Saggese S., Kelly K.M., Durkin A.J. Quantitative fluorescence imaging of protoporphyrin IX through determination of tissue optical properties in the spatial frequency domain // *J. Biomed. Opt.* 2011. V. 16, № 12. P. 126013-1–5.
494. Weber J.R., Cuccia D.J., William R., Johnson W.R., Bearman G., Durkin A.J., Hsu M., Lin A., Binder D.K., Wilson D., Tromberg B.J. Multispectral imaging of tissue absorption and scattering using spatial frequency domain imaging and a computed-tomography imaging spectrometer // *J. Biomed. Opt.* 2011. V. 16. P. 011015.
495. Nickell S., Hermann M., Essenpreis M., Farrell T.J., Krämer U., Patterson M.S. Anisotropy of light propagation in human skin // *Phys. Med. Biol.* 2000. V. 45. P. 2873–2886.

496. Nelson L. A., McCann J. C., Loepke A. W. *et al.* Development and validation of a multi-wavelength spatial domain near-infrared oximeter to detect cerebral hypoxia-ischemia // *J. Biomed. Opt.* 2006. V. 11, № 6. P. 064022.
497. Стратонников А. А., Меерович Г. А., Рябова А. В., Савельева Т. А., Лощенов В. Б. Использование спектроскопии обратного диффузного отражения света для мониторинга состояния тканей при фотодинамической терапии // *Квантовая электроника*. 2006. Т. 36, № 12. С. 1103–1110.
498. Дьяченко А. И. Применение методов биомеханики для обнаружения опухолей мягких тканей // *Проблемы биомеханики*. 2006. Вып. 11. С. 152–166. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2006.
499. Ло Ш., Ценг Ш., Чанс Б., Ниока Ш. Исследование активности головного мозга методом инфракрасной спектроскопии // *Оптическая биомедицинская диагностика*. Т. 1 / Под ред. В. В. Тучина. М.: Физматлит, 2007. С. 398–425.
500. Yuan Z., Zhang Q., Sobel E., Jiang H. Comparison of diffusion approximation and higher order diffusion equations for optical tomography of osteoarthritis // *J. Biomed. Opt.* 2009. V. 14, № 5. P. 054013-1–8.
501. Curcio G., Ferrara M., Limongi T. *et al.* Acute mobile phones exposure affects frontal cortex hemodynamics as evidenced by functional near-infrared spectroscopy // *J. Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2009. V. 29. P. 903–910.
502. Котова С. П., Майоров И. В., Майорова А. М. Применение нейронных сетей для определения оптических параметров сильно рассеивающих сред по профилю интенсивности рассеянного назад излучения // *Квантовая электроника*. 2007. Т. 37, № 1. С. 22–26.
503. Векслер Б. А., Меглинский И. В. Использование искусственной нейронной сети для восстановления изображения внутренней структуры случайно-неоднородной среды по пространственным характеристикам рассеянного назад оптического излучения // *Квантовая электроника*. 2008. Т. 38, № 6. С. 576–579.
504. Kashyap D. R., Chu N., Apte A., Wang B. P., Liu H. Development of broadband multichannel NIRS (near-infrared spectroscopy) imaging system for quantification of spatial distribution of hemoglobin derivatives // *Proc. SPIE*. 2007. V. 6434. P. 64341X.
505. Boden S., Obrig H., Köhncke C. *et al.* The oxygenation response to functional stimulation: Is there a physiological meaning to the lag between parameters? // *Neuroimage*. 2007. V. 36, № 1. P. 100–107.
506. Everdell N. L., Gibson A. P., Tullis I. D. C. *et al.* A frequency multiplexed near-infrared topography system for imaging functional activation in the brain // *Rev. Sci. Instrum.* 2005. V. 76. P. 093705.
507. Akin A., Bilensoy D. Cerebrovascular reactivity to hypercapnia in migraine patients measured with near-infrared spectroscopy // *Brain. Res.* 2006. V. 1107, № 1. P. 206–214.
508. Li C. J., Gong H., Gan Z., Zeng S. Q., Luo Q. M. Verbal working memory load affects prefrontal cortices activation: evidence from a functional NIRS study in humans // *Proc. SPIE*. 2005. V. 5696. P. 33–40.
509. Schmitz C. H., Locker M., Lasker J. M., Hielscher A. H., Barbour R. L. Instrumentation for fast functional optical tomography // *Rev. Sci. Instrum.* 2002. V. 73, № 2. P. 429–439.
510. Leon-Carrion J., Damas J., Izzetoglu K. *et al.* Differential time course and intensity of PFC activation for men and women in response to emotional stimuli: a functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) study // *Neurosci. Lett.* 2006. V. 403, № 1/2. P. 90–95.
511. Wolf M., Ferrari M., Quaresima V. Progress of near-infrared spectroscopy and tomography for brain and muscle clinical applications // *J. Biomed. Opt.* 2007. V. 12, № 6. P. 062104-1–14.
512. Sevick E. M., Chance B., Leigh J. *et al.* Quantitation of time- and frequency-resolved optical spectra for the determination of tissue oxygenation // *Anal. Biochem.* 1991. V. 195. P. 330–351.

513. *Duncan M.D., Mahon R., Tankersley L.L., Reintjes J.* Time-gated imaging through scattering media using stimulated Raman amplification // *Opt. Letts.* 1991. 16, № 23. P. 1868–1870.
514. *Benaron D.A., Stevenson D.K.* Optical time-of-flight and absorbance imaging of biologic media // *Science.* 1993. V. 259. C. 1463–1466.
515. *Mahon R., Duncan M.D., Tankersley L.L., Reintjes J.* Time-gated imaging through dense scatterers with a Raman amplifier // *Appl. Opt.* 1993. V. 32, № 36. P. 7425–7433.
516. *Hauger C., Baigar E., Wilhelm T., Zinth W.* Time-resolved backscattering of femtosecond pulses from scattering media — an experimental and numerical investigation // *Opt. Commun.* 1996. V. 131. P. 351–358.
517. *Le Tolguenec G., Devaux F., Lantz E.* Two-dimensional time-resolved direct imaging through thick biological tissues: a new step toward noninvasive medical imaging // *Opt. Letts.* 1999. V. 24, № 15. P. 1047–1049.
518. *Eda H., Oda I., Ito Y. et al.* Multichannel time-resolved optical tomographic imaging system // *Rev. Sci. Instrum.* 1999. V. 70. P. 3595–3602.
519. *Воробьев Н. С., Подгаецкий В. М., Смирнов А. В., Терещенко С. А.* Ослабление и рассеяние вперед лазерного излучения малой длительности в сильнорассеивающей среде // *Квант. электроника.* 1997. Т. 24, № 7. С. 667–670.
520. *Терещенко С. А., Подгаецкий В. М., Воробьев Н. С., Смирнов А. В.* Раздельное наблюдение баллистических и рассеянных фотонов при распространении коротких лазерных импульсов в сильно рассеивающей среде // *Квант. электроника.* 1998. Т. 25, № 7. С. 853–856.
521. *Воробьев Н. С., Подгаецкий В. М., Смирнов А. В., Терещенко С. А.* Наблюдение временного разделения фотонов в лазерном УКИ, прошедшем через рассеивающую среду // *Квант. электроника.* 1999. Т. 28, № 8. С. 181–182.
522. *Arridge S.R.* Optical tomography in medical imaging // *Inverse Problems.* 1999. V. 15. P. R41–R93.
523. *Волконский В. Б., Кравченко О. В., Любимов В. В. и др.* Использование статистических характеристик траекторий фотонов для томографического исследования оптических макронеоднородностей в сильно рассеивающих объектах // *Опт. спектр.* 1999. Т. 86. С. 299–306.
524. *Schmidt F.E.W., Fry M.E., Hillman E.M.C., Hebden J.C., Delpy D.T.* A 32-channel time-resolved instrument for medical optical tomography // *Rev. Sci. Instrum.* 2000. V. 71. P. 256–265.
525. *Shuvalov V.V., Chursin D.A., Shutov I.V.* Spatial resolution, measuring time, and fast visualization of hidden deep phantoms in diffusion optical tomography of extended scattering objects // *Laser Phys.* 2001. V. 11. P. 636–649.
526. *Третьяков Е. В., Шувалов В. В., Шутов И. В.* Визуализация деталей сложной внутренней структуры модельных объектов методом диффузионной оптической томографии // *Квантовая электроника.* 2002. Т. 32, № 11. С. 941–944.
527. *Grosenick D., Wabnitz H., Rinneberg H.H. et al.* Optical mammograph and first *in vivo* applications // *Appl. Opt.* 1999. V. 38. P. 2927–2943.
528. *Liebert A., Wabnitz H., Steinbrink J. et al.* Time-resolved multidistance near-infrared spectroscopy of the adult head: intracerebral and extracerebral absorption changes from moments of distribution of times of flight of photons // *Appl. Opt.* 2004. V. 43, № 15. P. 3037–3047.
529. *Grosenick D., Wabnitz H., Moesta K. T. et al.* Time-domain scanning optical mammography: II. Optical properties and tissue parameters of 87 carcinomas // *Phys. Med. Biol.* 2005. V. 50. P. 2451–2468.
530. *Yates T., Hebden J.C., Gibson A.P. et al.* Optical tomography of the breast using a multi-channel time-resolved imager // *Phys. Med. Biol.* 2005. V. 50. P. 2503–2517.

531. *Grosenick D., Moesta K. T., Moller M. et al.* Time-domain scanning optical mammography: I. Recording and assessment of mammograms of 154 patients // *Phys. Med. Biol.* 2005. V. 50. P. 2429–2449.
532. *Montcel B., Chabrier R., Poulet P.* Detection of cortical activation with time-resolved diffuse optical methods // *Appl. Opt.* 2005. V. 44, № 10. P. 1942–1947.
533. *Ueda Y., Yamanaka T., Yamashita D. et al.* Reflectance diffuse optical tomography: its application to human brain mapping // *Jap. J. Appl. Phys.* 2005. V. 44, № 38. P. L1203–L1206.
534. *Contini D., Torricelli A., Pifferi A. et al.* Multichannel time-resolved tissue oximeter for functional imaging of the brain // *IEEE Trans. Instrum. Meas.* 2006. V. 55. P. 85–90.
535. *Selb J., Joseph D. K., Boas D. A.* Time-gated optical system for depth-resolved functional brain imaging // *J. Biomed. Opt.* 2006. V. 11, № 4. P. 044008.
536. Коновалов А. Б., Власов В. В., Калинин А. Г., Кравченко О. В., Любимов В. В. Импульсная диффузионная оптическая томография на основе использования аналитических характеристик траекторий фотонов // *Квантовая электроника.* 2006. Т. 36, № 11. С. 1048–1055.
537. Коновалов А. Б., Власов В. В., Могилениких Д. В., Кравченко О. В., Любимов В. В. Алгебраическая реконструкция и постобработка в одношаговой диффузионной оптической томографии // *Квантовая электроника.* 2008. Т. 38, № 6. С. 588–596.
538. *Fantini S., Taroni P.* Optical mammography // *Cancer Imaging: Lung and Breast Carcinomas* / Ed. by M. A. Hayat. N. Y.: Elsevier, 2007. P. 449–458.
539. *Xu R. X., Povoski S. P.* Diffuse optical imaging and spectroscopy for cancer // *Expert Rev. Med. Devices.* 2007. V. 4, № 1. P. 83–95.
540. *Leff D. R., Warren O. J., Enfield L. C. et al.* Diffuse optical imaging of the healthy and diseased breast: A systematic review // *Breast Cancer Res. Treat.* 2008. V. 108, № 1. P. 9–22.
541. *Ferrante S., Contini D., Spinelli L. et al.* Monitoring muscle metabolic indexes by time-domain near-infrared spectroscopy during knee flex-extension induced by functional electrical stimulation // *J. Biomed. Opt.* 2009. V. 14, № 4. P. 044011-1–11.
542. *Pavia J. M., Charbon E., Wolf M.* 3D near-infrared imaging based on a single-photon avalanche diode array sensor // *Proc. SPIE.* 2011. V. 8088. P. 808811-1–6.
543. *Schweiger M., Arridge S.* University College London // 17 March 2008. <http://web4.cs.ucl.ac.uk/research/vis/toast/>
544. Волконский В. Б., Кравченко О. В., Любимов В. В., Скотников В. А. Траектории фотонов в сильнорассеивающей среде, облучаемой синусоидально-модулированным лазерным излучением // *Опт. спектр.* 1999. Т. 87. С. 457–460.
545. Чурсин Д. А., Шувалов В. В., Шутков И. В. Оптический томограф со счетом фотонов и проекционное восстановление параметров поглощающих «фантомов» в протяженных рассеивающих средах // *Квантовая электроника.* 1999. Т. 29. С. 83–88.
546. Маликов Е. В., Петникова В. М., Чурсин Д. А. и др. Пространственное разрешение и время сканирования в оптической томографии поглощающих «фантомов» в условиях многократного рассеяния // *Квантовая электроника.* 2000. Т. 30. С. 78–80.
547. Акчурина Г. Г., Зимняков Д. А., Тучин В. В. Оптоэлектронный модуль для лазерной СВЧ модуляционной спектроскопии и томографии // *Биомед. радиоэлектроника.* 2000. № 1. С. 46–53.
548. *Alford K., Wickramasinghe Y.* Intensity modulated near infrared spectroscopy: instrument design issues // *Proc. SPIE.* 2000. V. 3911. P. 330–337.
549. *Nissila I., Kotilahti K., Fallström K., Katila T.* Instrumentation for the accurate measurement of phase and amplitude in optical tomography // *Rev. Sci. Instrum.* 2002. V. 73. P. 3306–3331.
550. *Nissila I., Noponen T., Kotilahti K. et al.* Instrumentation and calibration methods for the multichannel measurement of phase and amplitude in optical tomography // *Rev. Sci. Instrum.* 2005. V. 76. P. 044302.

551. Lee J., Saltzman D.J., Cerussi A.E. et al. Broadband diffuse optical spectroscopy measurement of hemoglobin concentration during hypovolemia in rabbits // *Physiol. Meas.* 2006. V. 27, № 8. P. 757–767.
552. Teng Y., Ding H., Gong Q., Jia Z., Huang L. Monitoring cerebral oxygen saturation during cardiopulmonary bypass using near-infrared spectroscopy: the relationships with body temperature and perfusion rate // *J. Biomed. Opt.* 2006. V. 11, № 2. P. 024016.
553. Ho D., Eom G., Lee S., Kim B. Study on the property measurement for tissue phantom and human tissue used of F-D DOT system // *Proc. SPIE.* 2007. V. 6434. P. 643428.
554. Orlova A.G., Turchin I.V., Plehanov V.I., Shakhova N.M., Fiks I.I., Kleshnin M.I., Konuchenko Yu N., Kamensky V.A. Frequency-domain diffuse optical tomography with single source-detector pair for breast cancer detection // *Laser Phys. Lett.* 2008. V. 5, № 4. P. 321–327.
555. Tuchin V.V. Coherent optical techniques for the analysis of tissue structure and dynamics // *J. Biomed. Opt.* 1999. V. 4, № 1. P. 106–124.
556. Brusaglioni P., Zaccanti G., Wei Q. Transmission of a pulsed polarized light beam through thick turbid media: numerical results // *Appl. Opt.* 1993. V. 32. P. 6142–6150.
557. Bicout D., Brosseau C., Martinez A.S., Schmitt J.M. Depolarization of multiply scattering waves by spherical diffusers: influence of the size parameter // *Phys. Rev. E.* 1994. V. 49. P. 1767–1770.
558. Dogariu M., Asakura T. Photon pathlength distribution from polarized backscattering in random media // *Opt. Eng.* 1996. V. 35. P. 2234–2239.
559. Dogariu A., Kutsche C., Likamwa P., Boreman G., Moudgil B. Time-domain depolarization of waves retroreflected from dense colloidal media // *Opt. Lett.* 1997. V. 22. P. 585–587.
560. Hielscher A.H., Mourant J.R., Bigio I.J. Influence of particle size and concentration on the diffuse backscattering of polarized light from tissue phantoms and biological cell suspensions // *Appl. Opt.* 1997. V. 36. P. 125–135.
561. Ambirajan A., Look D.C. A backward Monte Carlo study of the multiple scattering of a polarized laser beam // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer.* 1997. V. 58. P. 171–192.
562. Rakovic M.J., Kattawar G.W. Theoretical analysis of polarization patterns from incoherent backscattering of light // *Appl. Opt.* 1998. V. 37, № 15. P. 3333–3338.
563. Rakovic M.J., Kattawar G.W., Mehrubeoglu M., Cameron B.D., Wang L.V., Rasteger S., Coté G.L. Light backscattering polarization patterns from turbid media: theory and experiment // *Appl. Opt.* 1999. V. 38. P. 3399–3408.
564. Yao G., Wang L.V. Propagation of polarized light in turbid media: simulated animation sequences // *Opt. Express.* 2000. V. 7, № 5. P. 198–203.
565. Zimnyakov D.A., Sinichkin Yu.P., Zakharov P.V., Agafonov D.N. Residual polarization of non-coherently backscattered linearly polarized light: the influence of the anisotropy parameter of the scattering medium // *Waves in Random Media.* 2001. V. 11. P. 395–412.
566. Зимняков Д. А., Синичкин Ю. П. О предельном значении степени остаточной поляризации некогерентно обратного рассеянного излучения при многократном рассеянии линейно поляризованного света // *Опт. спектр.* 2001. Т. 91. С. 113–119.
567. Зимняков Д. А., Синичкин Ю. П., Киселева И. В., Агафонов Д. Н. О влиянии поглощения многократно рассеивающих сред на степень остаточной поляризации обратного рассеянного излучения // *Опт. спектр.* 2002. Т. 92. С. 831–838.
568. Vitkin I.A., Studinski R.C.N. Polarization preservation in diffusive scattering from *in vivo* turbid biological media: effects of tissue optical absorption in the exact backscattering direction // *Opt. Commun.* 2001. V. 190. P. 37–43.
569. Bal G., Moscoso M. Theoretical and numerical analysis of polarization for time-dependent radiative transfer equations // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer.* 2001. V. 70. P. 75–98.
570. Kokhanovsky A.A. Photon transport in asymmetric random media // *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* 2002. V. 4. P. 521–526.
571. Kokhanovsky A.A. Reflection and polarization of light by semi-infinite turbid media: simple approximations // *J. Colloid Interface Sci.* 2002. V. 251. P. 429–433.

572. *Dagdug L., Weiss G. H., Gandjbakhche A. H.* Effects of anisotropic optical properties on photon migration in structured tissues // *Phys. Med. Biol.* 2003. V. 48. P. 1361–1370.
573. *Tynes H. H., Kattawar G. W., Zege E. P., Katsev I. L., Prikhach A. S., Chaikovskaya L. I.* Monte Carlo and multicomponent approximation methods for vector radiative transfer by use of effective Mueller matrix calculations // *Appl. Opt.* 2001. V. 40, № 3. P. 400–412.
574. *Stockford I. M., Morgan S. P., Chang P. C. Y., Walker J. G.* Analysis of the spatial distribution of polarized light backscattering // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, № 3. P. 313–320.
575. *Bartel S., Hielscher A. H.* Monte Carlo simulations of the diffuse backscattering Mueller matrix for highly scattering media // *Appl. Opt.* 2000. V. 39. P. 1580–1588.
576. *Wang X., Wang L. V.* Propagation of polarized light in birefringent turbid media: time-resolved simulations // *Opt. Express.* 2001. V. 9, № 5. P. 254–259.
577. *Yong K. Y., Morgan S. P., Stockford I. M., Pitter M. C.* Characterization of layered scattering media using polarized light measurements and neural networks // *J. Biomed. Opt.* 2003. V. 8, № 3. P. 504–511.
578. *Максимова И. Л., Романов С. В., Изотова В. Ф.* Влияние многократного рассеяния в дисперсных системах на поляризационные характеристики рассеянного света // *Опт. спектр.* 2002. Т. 92, № 6. С. 990–998.
579. *Wang X., Wang L. V.* Propagation of polarized light in birefringent turbid media: a Monte Carlo study // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, № 3. P. 279–290.
580. *Gangnus S. V., Matcher S. J., Meglinski I. V.* Monte Carlo modeling of polarized light propagation in biological tissues // *Laser Phys.* 2004. V. 14. P. 886–891.
581. *Hourdakis C. J., Perris A.* A Monte Carlo estimation of tissue optical properties for the use in laser dosimetry // *Phys. Med. Biol.* 1995. V. 40. P. 351–364.
582. Special Section on Diffusing Photons in Turbid Media / Ed. by A. Yodh, B. Tromberg, E. Sevick-Muraca, D. Pine // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1997. V. 14. P. 136–342.
583. *Svaasand L. O., Gomer Ch. J.* Optics of tissue // *Dosimetry of Laser Radiation in Medicine and Biology* / Ed. by G. J. Müller, D. H. Sliney. Bellingham, WA: SPIE Press, 1989. V. IS5. P. 114–132.
584. *Horinaka H., Hashimoto K., Wada K., Cho Y.* Extraction of quasi-straightforward-propagating photons from diffused light transmitting through a scattering medium by polarization modulation // *Opt. Lett.* 1995. V. 20. P. 1501–1503.
585. *Morgan S. P., Khong M. P., Somekh M. G.* Effects of polarization state and scatterer concentration optical imaging through scattering media // *Appl. Opt.* 1997. V. 36. P. 1560–1565.
586. *Pravdin A. B., Chernova S. P., Tuchin V. V.* Polarized collimated tomography for biomedical diagnostics // *Coherence-Domain Methods In Biomedical Science and Clinical Applications* / Ed. by V. V. Tuchin, H. Podbielska, B. Ovryn. Bellingham, WA: SPIE. 1997. V. 2981. P. 230–234.
587. *Ostermeyer M. R., Stephens D. V., Wang L., Jacques S. L.* Nearfield polarization effects on light propagation in random media // *OSA TOPS on Biomedical Optics Spectroscopy and Diagnostics.* Washington DC: OSA. 1996. V. 3. P. 20–25.
588. *Anderson R. R.* Polarized light examination and photography of the skin // *Arch. Dermatol.* 1991. V. 127. P. 1000–1005.
589. *Dreher A. W., Reiter K.* Polarization technique measures retinal nerve fibers // *Clin. Vis. Sci.* 1992. V. 7. P. 481–485.
590. *Kollias N.* Polarized light photography of human skin // *Bioengineering of the Skin: Skin Surface Imaging and Analysis* / Ed. by K.-P. Wilhelm et al. Boca Raton et al.: CRC Press, 1997. P. 95–106.
591. *Demos S. G., Alfano R. R.* Optical polarization imaging // *Appl. Opt.* 1997. V. 36. P. 150–155.
592. *Yao G., Wang L. V.* Two-dimensional depth-resolved Mueller matrix characterization of biological tissue by optical coherence tomography // *Opt. Lett.* 1999. V. 24. P. 537–539.
593. *Cameron B. D., Rakovic M. J., Mehrubeoglu M., Kattawar G., Rasteger S., Wang L. V., Coté G.* Measurement and calculation of the two-dimensional backscattering Mueller matrix

- of a turbid medium // Opt. Lett. 1998. V. 23. P. 485–487; Errata, Opt. Lett. 1998. V. 23. P. 1630.
594. Jacques S. L., Roman R. J., Lee K. Imaging superficial tissues with polarized light // Lasers Surg. Med. 2000. V. 26. P. 119–129.
595. Jacques S. L., Ramella-Roman J. C., Lee K. Imaging skin pathology with polarized light // J. Biomed. Opt. 2002. V. 7, № 3. P. 329–340.
596. Moscoso M., Keller J. B., Papanicolaou G. Depolarization and blurring of optical images by biological tissue // J. Opt. Soc. Am. 2001. V. 18, № 4. P. 948–960.
597. Smith M. H. Optimization of a dual-rotating-retarder Mueller matrix polarimeter // Appl. Opt. 2002. V. 41. P. 2488–2493.
598. Smith M. H. Interpreting Mueller matrix images of tissues // Proc. SPIE. 2001. V. 4257. P. 82–89.
599. Deibler L. L., Smith M. H. Measurement of the complex refractive index of isotropic materials with Mueller matrix polarimetry // Appl. Opt. 2001. V. 40, № 22. P. 3659–3667.
600. Huang X.-R., Knighton R. W. Linear birefringence of the retinal nerve fiber layer measured *in vitro* with a multispectral imaging micropolarimeter // J. Biomed. Opt. 2002. V. 7, № 2. P. 199–204.
601. Свиридов А. П., Зимняков Д. А., Синичкин Ю. П., Бутвина Л. Н., Омельченко А. И., Махмутова Г. Ш., Баграташвили В. Н. ИК фурье-спектроскопия *in vivo* кожи человека при ее абляции излучением ИАГ:Ег-лазера и поляризация света, рассеиваемого кожным покровом // Ж. прикл. спектр. 2002. Т. 69, № 4. С. 484–488.
602. Yaroslavsky A. N., Neel V., Anderson R. R. Demarcation of nonmelanoma skin cancer margins in thick excisions using multispectral polarized light imaging // J. Invest. Dermatol. 2003. V. 121. P. 259–266.
603. Gorodnichev E. E., Kuzovlev A. I., Rogozkin D. B. Depolarization of light in small-angle multiple scattering in random media // Laser Phys. 1999. V. 9. P. 1210–1227.
604. Freund I., Kaveh M., Berkovits R., Rosenbluh M. Universal polarization correlations and microstatistics of optical waves in random media // Phys. Rev. B. 1990. V. 42, № 4. P. 2613–2616.
605. Eliyahu D., Rosenbluh M., Freund I. Angular intensity and polarization dependence of diffuse transmission through random media // J. Opt. Soc. Am. A. 1993. V. 10, № 3. P. 477–491.
606. Jarry G., Steiner E., Damaschini V., Epiřanie M., Jurczak M., Kaizer R. Coherence and polarization of light propagating through scattering media and biological tissues // Appl. Opt. 1998. V. 37. P. 7357–7367.
607. Зимняков Д. А., Тучин В. В. О взаимосвязи характерных масштабов деполяризации и декорреляции оптических полей при многократном рассеянии // Письма ЖЭТФ. 1998. Т. 76, № 7. С. 455–460.
608. Zimnyakov D. A., Tuchin V. V., Yodh A. G. Characteristic scales of optical field depolarization and decorrelation for multiple scattering media and tissues // J. Biomed. Opt. 1999. V. 4. P. 157–163.
609. Bettelheim F. On the optical anisotropy of lens fibre cells // Exp. Eye Res. 1975. V. 21. P. 231–234.
610. Wang J. Y. T., Bettelheim F. A. Comparative birefringence of cornea // Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol. 1975. V. 51. P. 89–94.
611. Hemenger R. P. Birefringence of a medium of tenuous parallel cylinders // Appl. Opt. 1989. V. 28, № 18. P. 4030–4034.
612. Maitland D. J., Walsh J. T. Quantitative measurements of linear birefringence during heating of native collagen // Laser Surg. Med. 1997. V. 20. P. 310–318.
613. Klein Brink H. B. Birefringence of the human crystalline lens *in vivo* // J. Opt. Soc. Am. A. 1991. V. 8. P. 1788–1793.
614. Hemenger R. P. Refractive index changes in the ocular lens result from increased light scatter // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1. P. 268–272.

615. *Izotova V. F., Maksimova I. L., Nefedov I. S., Romanov S. V.* Investigation of Mueller matrices of anisotropic nonhomogeneous layers in application to optical model of cornea // *Appl. Opt.* 1997. V. 36, № 1. P. 164–169.
616. *Baba J. S., Cameron B. D., Theru S., Coté G. L.* Effect of temperature, pH, and corneal birefringence on polarimetric glucose monitoring in the eye // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, № 3. P. 321–328.
617. *van Blokland G. J.* Ellipsometry of the human retina *in vivo*: preservation of polarization // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1985. V. 2. P. 72–75.
618. *Klein Brink H. B., van Blokland G. J.* Birefringence of the human foveal area assessed *in vivo* with mueller-matrix ellipsometry // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1988. V. 5. P. 49–57.
619. *Haskell R. C., Carlson F. D., Blank P. S.* Form birefringence of muscle // *Biophys. J.* 1989. V. 56. P. 401–413.
620. *Bosman S.* Heat-induced structural alterations in myocardium in relation to changing optical properties // *Appl. Opt.* 1993. V. 32, № 4. P. 461–463.
621. *Simonenko G. V., Denisova T. P., Lakodina N. A., Tuchin V. V.* Measurement of an optical anisotropy of biotissues // *Proc. SPIE* 2000. V. 3915. P. 152–157.
622. *Симоненко Г. В., Тучин В. В., Лагодина Н. А.* Измерение оптической анизотропии тканей с использованием нематической жидко-кристаллической ячейки // *Опт. журн.* 2000. № 6. С. 70–73.
623. *Ангельский О. В., Ушенко А. Г., Архелюк А. Д., Ермоленко С. Б., Бурковец Д. Н.* Рассеяние лазерного излучения мультифрактальными биоструктурами // *Опт. спектр.* 2000. Т. 88, № 3. С. 495–498.
624. *Hee M. R., Huang D., Swanson E. A., Fujimoto J. G.* Polarization-sensitive low-coherence reflectometer for birefringence characterization and ranging // *J. Opt. Soc. Am. B.* 1992. V. 9. P. 903–908.
625. *de Boer J. R., Milner T. E., van Gemert M. J. C., Nelson J. S.* Two-dimensional birefringence imaging in biological tissue by polarization-sensitive optical coherence tomography // *Opt. Lett.* 1997. V. 22. P. 934–936.
626. *Everett M. J., Schoenerberger K., Colston Jr. B. W., Da Silva L. B.* Birefringence characterization of biological tissue by use of optical coherence tomography // *Opt. Lett.* 1998. V. 23, № 3. P. 228–230.
627. *de Boer J. F., Milner T. E., Nelson J. S.* Determination of the depth resolved stokes parameters of light backscattered from turbid media using polarization sensitive optical coherence tomography // *Opt. Lett.* 1999. V. 24. P. 300–302.
628. *de Boer J. F., Milner T. E.* Review of polarization sensitive optical coherence tomography and Stokes vector determination // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, № 3. P. 359–371.
629. *Hitzenberger C. K., Gotzinger E., Sticker M., Pircher M., Fercher A. F.* Measurement and imaging of birefringence and optic axis orientation by phase resolved polarization sensitive optical coherence tomography // *Opt. Express.* 2001. V. 9. P. 780–790.
630. *Jiao S., Wang L. V.* Jones-matrix imaging of biological tissues with quadruple-channel optical coherence tomography // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, № 3. P. 350–358.
631. *Ducros M. G., de Boer J. F., Huang H., Chao L., Chen Z., Nelson J. S., Milner T. E., Rylander H. G.* Polarization sensitive optical coherence tomography of the rabbit eye // *IEEE J. Sel. Top. Quant. Electron.* 1999. V. 5. P. 1159–1167.
632. *Ducros M. G., Marsack J. D., Rylander III H. G., Thomsen S. L., Milner T. E.* Primate retina imaging with polarization-sensitive optical coherence tomography // *J. Opt. Soc. Am. A.* 2001. V. 18. P. 2945–2956.
633. *Saxer C. E., de Boer J. F., Park B. H., Zhao Y., Chen C., Nelson J. S.* High speed fiber based polarization sensitive optical coherence tomography of *in vivo* human skin // *Opt. Lett.* 2001. V. 26. P. 1069–1071.
634. *Park B. H., Saxer C. E., Srinivas S. M., Nelson J. S., de Boer J. F.* *In vivo* burn depth determination by high-speed fiber-based polarization sensitive optical coherence tomography // *J. Biomed. Opt.* 2001. V. 6. P. 474–479.

635. Wang X.J., Milner T.E., de Boer J.F., Zhang Y., Pashley D.H., Nelson J.S. Characterization of dentin and enamel by use of optical coherence tomography // *Appl. Opt.* 1999. V. 38. P. 2092–2096.
636. Baumgartner A., Dichtl S., Hitzenberger C.K., Sattmann H., Robl B., Moritz A., Fercher A.F., Sperr W. Polarization-sensitive optical coherence tomography of dental structures // *Caries Res.* 2000. V. 34, № 1. P. 59–69.
637. Kienle A., Forster F.K., Diebold R., Hibst R. Light propagation in dentin: influence of microstructure on anisotropy // *Phys. Med. Biol.* 2003. V. 48, № 2. P. N7–14.
638. Fried D., Featherstone J.D.B., Glens R.E., Seka W. The nature of light scattering in dental enamel and dentin at visible and near-infrared wavelengths // *Appl. Opt.* 1995. V. 34, № 7. P. 1278–1285.
639. Альтшулер Г.В. Оптическая модель тканей зуба человека // *Оптический журнал.* 1995. Т. 62. С. 516–520.
640. Studinski R.C.N., Vitkin I.A. Methodology for examining polarized light interactions with tissues and tissue-like media in the exact backscattering direction // *J. Biomed. Opt.* 2000. V. 5, № 3. P. 330–337.
641. Hadley K.C., Vitkin I.A. Optical rotation and linear and circular depolarization rates in diffusely scattered light from chiral, racemic, and achiral turbid media // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, № 3. P. 291–299.
642. Applequist J. Optical activity: biot's bequest // *Am. Sci.* 1987. V. 75. P. 59–67.
643. Theory and Practice of Histological Techniques / Ed. by J.D. Bancroft, A. Stevens. Edinburgh, N.Y.: Churchill Livingstone, 1990.
644. Maurice D.M. The cornea and sclera // *The Eye* / Ed. by H. Davson. Orlando: Academic Press, 1984. P. 1–158.
645. Hart R.W., Farrell R.A. Light scattering in the cornea // *J. Opt. Soc. Am.* 1969. V. 59, № 6. P. 766–774.
646. Barron L.D. Molecular Light Scattering and Optical Activity / London: Cambridge Univ., 1982.
647. McCally R.L., Farrell R.A. Light scattering from cornea and corneal transparency // *Noninvasive Diagnostic Techniques in Ophthalmology* / Ed. by B.R. Master. N.Y.: Springer-Verlag, 1990. P. 189–210.
648. Максимова И.Л., Шубочкин Л.П. Матрица рассеяния света на плотно упакованной бинарной системе твердых сфер // *Опт. спектр.* 1991. Т. 70, № 6. С. 1276–1281.
649. Shankaran V., Everett M.J., Maitland D.J., Walsh Jr. J.T. Polarized light propagation through tissue phantoms containing densely packed scatterers // *Opt. Lett.* 2000. V. 25, № 4. P. 239–241.
650. Shankaran V., Walsh Jr. J.T., Maitland D.J. Comparative study of polarized light propagation in biological tissues // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, № 3. P. 300–306.
651. Tuchin V.V. Optics of the human sclera: photon migration, imaging and spectroscopy // *OSA TOPS 21* / Washington, DC: Optical Society of America, 1998. P. 99–104.
652. Максимова И.Л. Рассеяние излучения регулярными и случайными системами, образованными параллельными длинными цилиндрическими стержнями // *Опт. спектр.* 2002. Т. 93, № 4. С. 663–673.
653. Ushenko A.G., Pishak V.P. Laser polarimetry of biological tissues: principles and applications // *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science* / Ed. by V.V. Tuchin. Boston: Kluwer Academic Publishers. 2004. V. 1. P. 94–138.
654. Хлебцов Н.Г., Максимова И.Л., Тучин В.В., Ванг Л.В. Введение в рассеяние света биологическими объектами // *Оптическая биомедицинская диагностика* / Под ред. В.В. Тучина. М.: Физматлит, 2007. Т. 1. С. 36–156 / Пер. с англ. под ред. В.В. Тучина / *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics* / Ed. by V.V. Tuchin. Bellingham, WA: SPIE Press, 2002.

655. Шерклифф У. Поляризованный свет. Получение и использование / Пер. с англ. под ред. Н. Д. Жевандрова. М.: Мир, 1965 / *Shurkliff W. A. Polarized Light. Production and Use.* Cambridge, MA: Harvard Univ., 1962.
656. *Shurkliff W. A., Ballard S. S. Polarized Light.* Princeton: Van Nostrand, 1964.
657. *O'Neill E. L. Introduction to Statistical Optics.* Reading, MA: Addison-Wesley, 1963.
658. *Kliger D. S., Lewis J. W., Randall C. E. Polarized Light in Optics and Spectroscopy.* Boston: Academic, 1990.
659. *Collet E. Polarized Light. Fundamentals and Applications.* N. Y.: Dekker, 1993.
660. *Azzam R. M. A., Bashara N. M. Ellipsometry and Polarized Light.* Amsterdam: Elsevier Science, 1994.
661. *Brosseau C. Fundamentals of Polarized Light: A Statistical Optics Approach.* N. Y.: Wiley, 1998.
662. Максимова И. Л., Татаринцев С. Н., Шубочкин Л. П. Эффекты многократного рассеяния в биообъектах при лазерной диагностике // *Опт. спектр.* 1992. Т. 72. С. 1171–1177.
663. Изотова В. Ф., Максимова И. Л., Романов С. В. Использование соотношений между элементами матрицы Мюллера для оценки свойств реальных объектов и достоверности эксперимента // *Опт. спектр.* 1996. Т. 80, № 5. С. 838–844.
664. Зега Э. П., Чайковская Л. И. Особенности распространения поляризованного света в средах с сильно анизотропным рассеянием // *ЖПС.* 1986. Т. 44, № 6. С. 996–1005.
665. *Kokhanovsky A. A. Polarization Optics of Random Media.* Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 2003.
666. Polarization-Based Optical Techniques Applied to Biology and Medicine // *Proc. European Workshop / Ed. by A. De Martino.* Massy: Ecole Polytechnique, 2009. www.nanocharm.org
667. *Cotè G. L., Cameron B. D. A noninvasive glucose sensor based on polarimetric measurements through the aqueous humor of the eye // Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues / Ed. by V. V. Tuchin.* London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2009. P. 183–211.
668. *Wood M. F. G., Ghosh N., Guo X., Vitkin I. A. Towards noninvasive glucose sensing using polarization analysis of multiply scattered light // Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues / Ed. by V. V. Tuchin.* London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2009. P. 469–50.
669. *Ghosh N., Wood M. F. G., Vitkin I. A. Polarized light assessment of complex turbid media such as biological tissues via Mueller matrix decomposition // Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. by V. V. Tuchin.* London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 253–282.
670. *Angelsky O. V., Ushenko A. G., Ushenko Yu. A., Pishak V. P., Peresunko A. P. Statistical, correlation, and topological approaches in diagnostics of the structure and physiological state of birefringent biological tissues // Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. by V. V. Tuchin.* London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 283–322.
671. *Morgan S. P., Stockford I. M. Instrumentation for in vivo flow cytometry — a sickle cell anemia case study // Advanced Optical Cytometry: Methods and Disease Diagnoses / Ed. by V. V. Tuchin.* Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011. P. 433–462.
672. *Leahy M. J., O'Doherty J. Optical instrumentation for the measurement of blood perfusion, concentration, and oxygenation in living microcirculation // Advanced Optical Cytometry: Methods and Disease Diagnoses / Ed. by V. V. Tuchin.* Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011. P. 573–604.
673. *Schilders S. P., Gan X. S., Gu M. Resolution improvement in microscopic imaging through turbid media based on differential polarization gating // Appl. Opt.* 1998. V. 37. P. 4300–4302.
674. *Zonios G., Perelman L. T., Backman V., Manoharan R., Fitzmaurice M., Van Dam J., Feld M. S. Diffuse reflectance spectroscopy of human adenomatous colon polyps in vivo // Appl. Opt.* 1999. V. 38, № 31. P. 6628–6637.

675. Groner W., Winkelman J. W., Harris A. G., Ince C., Bouma G. J., Messmer K., Nadeau R. G. Orthogonal polarization spectral imaging: A new method for study of the microcirculation // *Nature Med.* 1999. V. 5. P. 1209–1212.
676. Demos S. G., Radousky H. B., Alfano R. R. Deep subsurface imaging in tissues using spectral and polarization filtering // *Opt. Express.* 2000. V. 7. P. 23–28.
677. Gurjar R. S., Backman V., Perelman L. T., Georgakoudi I., Badizadegan K., Itzkan I., Dasari R. R., Feld M. S. Imaging human epithelial properties with polarized light scattering spectroscopy // *Nature Med.* 2001. V. 7. P. 245–249.
678. Morgan S. P., Stockford I. M. Surface-reflection elimination in polarization imaging of superficial tissue // *Opt. Lett.* 2003. V. 28. P. 114–116.
679. Jaillon F., Saint-Jalmes H. Description and time reduction of a Monte Carlo code to simulate propagation of polarized light through scattering media // *Appl. Opt.* 2003. V. 42, № 16. P. 3290–3296.
680. Sviridov A. P., Chernomordik V., Hassan M., Boccara A. C., Russo A., Smith P., Gandjbakhche A. Enhancement of hidden structures of early skin fibrosis using polarization degree pattern and Pearson correlation analysis // *J. Biomed. Opt.* 2005. V. 10, № 5. P. 051706-1–6.
681. Boulvert F., Boulbry B., Le Brun G., Le Jeune B., Rivet S., Cariou J. Analysis of the depolarizing of irradiated pig skin // *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* 2005. V. 7. P. 21–28.
682. Hunter M., Backman V., Popescu G., Kalashnikov M., Boone C. W., Wax A., Gopal V., Badizadegan K., Stoner G. D., Feld M. S. Tissue self-affinity and polarized light scattering in the Born approximation: a new model for precancer detection // *Phys. Rev. Lett.* 2006. V. 97, № 13. P. 138102.
683. Turzhitsky V. M., Gomes A. J., Kim Y. L., Liu Y., Kromine A., Rogers J. D., Jameel M., Roy H. K., Backman V. Measuring mucosal blood supply *in vivo* with a polarization-gating probe // *Appl. Opt.* 2008. V. 47, № 32. P. 6046–6057.
684. Wu P. J., Walsh Jr. J. T. Stokes polarimetry imaging of rat tail tissue in a turbid medium: degree of linear polarization image maps using incident linearly polarized light // *J. Biomed. Opt.* 2006. V. 11. P. 014031.
685. Синичкин Ю. П., Зимняков Д. А., Яковлев Д. А., Овчинникова И. А., Спивак А. В., Ушакова О. В. Влияние оптической анизотропии рассеивающих сред на состояние поляризации рассеянного света // *Опт. спектр.* 2006. Т. 101, № 5. С. 851–860.
686. Зимняков Д. А., Синичкин Ю. П., Ушакова О. В. Оптическая анизотропия фиброзных биотканей: анализ влияния структурных характеристик // *Квант. электр.* 2007. Т. 37, № 8. С. 777–783.
687. Ramachandran J., Powers T. M., Carpenter S., Garcia-Lopez A., Freyer J. P., Mourant J. R. Light scattering and micro architectural differences between tumorigenic and non-tumorigenic cell models of tissue // *Opt. Exp.* 2007. V. 15, № 7. P. 4039–4053.
688. Shukla P., Sumathi R., Gupta S., Pradhan A. Influence of size parameter and refractive index of the scatterer on polarization-gated optical imaging through turbid media // *J. Opt. Soc. Am. A.* 2007. V. 24. P. 1704–1713.
689. Shukla P., Pradhan A. Mueller decomposition images for cervical tissue: Potential for discriminating normal and dysplastic states // *Opt. Express.* 2009. V. 17. P. 1600–1609.
690. Chung J., Jung W., Hammer-Wilson M. J., Wilder-Smith P., Chen Z. Use of polar decomposition for the diagnosis of oral precancer // *Appl. Opt.* 2007. V. 46. P. 3038–3044.
691. Anastasiadou M., De Martino A., Clément D., Liège F., Laude-Boulesteix B., Quang N., Dreyfuss J., Huynh B., Nazac A., Schwartz L., Cohen H. Polarimetric imaging for the diagnosis of cervical cancer // *Phys. Stat. Sol.* 2008. V. 5. P. 1423–1426.
692. Jacques S. L., Samatham R., Isenhath S., Lee K. Polarized light camera to guide surgical excision of skin cancers // *Proc. SPIE.* 2008. V. 6842. 684201-1–7.
693. Li X., Yao G. Mueller matrix decomposition of diffuse reflectance imaging in skeletal muscle // *Appl. Opt.* 2009. V. 48. P. 2625–2631.

694. He H., Nan Z., Ran L., Tianliang Y., Wei L., Yonghong H., Hui M. Application of sphere-cylinder scattering model to skeletal muscle // *Opt. Express*. 2010. V. 18. P. 15104–15112.
695. Pierangelo A., Benali A., Antonelli M.-R., Novikova T., Validire P., Gayet B., De Martino A. *Ex-vivo* characterization of human colon cancer by Mueller polarimetric imaging // *Opt. Express*. 2011. V. 19. P. 1582–1593.
696. Dreher A. W., Reiter K., Weinreb R. N. Spatially resolved birefringence of the retinal nerve fiber layer assessed with a retinal laser ellipsometer // *Appl. Opt.* 1992. V. 31. P. 3730–3735.
697. Greenfield D. S., Knighton R. W., Huang X.-R. Effect of corneal polarization axis on assessment of retinal nerve fiber layer thickness by scanning laser polarimetry // *Am. J. Ophthalmol.* 2000. V. 129. P. 715–722.
698. Knighton R. W., Huang X.-R. Linear birefringence of the central human cornea // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002. V. 43. P. 82–86.
699. Zhou Q., Weinreb R. N. Individualized compensation of anterior segment birefringence during scanning laser polarimetry // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002. V. 43. P. 2221–2228.
700. Burns S. A., Elsner A. E., Mellem-Kairala M. B., Simmons R. B. Improved contrast of subretinal structures using polarization analysis // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003. V. 44. P. 4061–4068.
701. Bueno J. M. Measurement of parameters of polarization in the living human eye using imaging polarimetry // *Vision Res.* 2000. V. 40. P. 3791–3799.
702. Bueno J. M. Depolarization effects in the human eye // *Vision Res.* 2001. V. 41. P. 2687–2696.
703. Bueno J. M., Jaronski J. W. Spatially resolved polarization properties for *in vitro* corneas // *Ophthalm. Physiol. Opt.* 2001. V. 21. P. 384–392.
704. Bueno J. M., Campbell M. C. W. Polarization properties for *in vitro* old human crystalline lens // *Ophthalm. Physiol. Opt.* 2003. V. 23. P. 109–118.
705. Bueno J. M. The influence of depolarization and corneal birefringence on ocular polarization // *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* 2004. V. 6. P. S91–99.
706. Bueno J. M., Berrio E., Artal P. Corneal polarimetry after LASIK refractive surgery // *J. Biomed. Opt.* 2006. V. 11. P. 014001-1–6.
707. Bueno J. M., Artal P. Average double-pass ocular diattenuation using foveal fixation // *J. Mod. Opt.* 2008. V. 55. P. 849–859.
708. Mellem-Kairala M. B., Elsner A. E., Weber A., Simmons R. B., Burns S. A. Improved contrast of peripapillary hyperpigmentation using polarization analysis // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005. V. 46. P. 1099–1106.
709. Miura M., Elsner A. E., Weber A., Cheney M. C., Oshako M., Usui M., Iwasaki T. Imaging polarimetry in central serous chorioretinopathy // *Am. J. Ophthalmol.* 2005. V. 140. P. 1014–1019.
710. Götzinger E., Pircher M., Dejaco-Ruhschworm I., Kaminski S., Skorpik C., Hitzenberger C. K. Imaging of birefringent properties of keratoconus corneas by polarization-sensitive optical coherence tomography // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007. V. 48. P. 3551–3558.
711. Pircher M., Baumann B., Götzinger E., Hitzenberger C. K. Corneal birefringence compensation for polarization sensitive optical coherence tomography of the human retina // *J. Biomed. Opt.* 2007. V. 12. P. 041210-1–10.
712. Twietmeyer K. M., Chipman R. A., Elsner A. E., Zhao Y., Van Nasdale D. Mueller matrix retinal imager with optimized polarization conditions // *Opt. Express*. 2008. V. 16. P. 21339–21354.
713. Côté D., Vitkin I. A. Balanced detection for low-noise precision polarimetric measurements of optically-active, multiply-scattering tissue phantoms // *J. Biomed. Opt.* 2004. V. 9. P. 213–220.
714. Côté D., Vitkin I. A. Robust concentration determination of optically active molecules in turbid media with validated 3-D polarization sensitive Monte Carlo simulation // *Opt. Express*. 2005. V. 13. P. 148–163.

715. Guo X., Wood M. F. G., Vitkin I. A. Angular measurements of light scattered by turbid chiral media using linear Stokes polarimeter // *J. Biomed. Opt.* 2006. V. 11. P. 041105-1–10.
716. Wood M. F. G., Guo X., Vitkin I. A. Polarized light propagation in multiply scattering media exhibiting both linear birefringence and optical activity: Monte Carlo model and experimental methodology // *J. Biomed. Opt.* 2007. V. 12. P. 14029-1–10.
717. Guo X., Wood M. F. G., Vitkin I. A. Stokes polarimetry in multiply scattering chiral media: effects of experimental geometry // *Appl. Opt.* 2007. V. 46. P. 4491–4500.
718. Guo X., Wood M. F. G., Vitkin I. A. Monte Carlo study of pathlength distribution of polarized light in turbid media // *Opt. Express.* 2007. V. 15. P. 1348–1360.
719. Guo X., Wood M. F. G., Vitkin I. A. A Monte Carlo study of penetration depth and sampling volume of polarized light in turbid media // *Opt. Commun.* 2008. V. 281. P. 380–387.
720. Ghosh N., Wood M. F. G., Vitkin I. A. Mueller matrix decomposition for extraction of individual polarization parameters from complex turbid media exhibiting multiple scattering, optical activity, and linear birefringence // *J. Biomed. Opt.* 2008. V. 13. P. 044036-1–10.
721. Ghosh N., Wood M. F. G., Li S., Weisel R. D., Wilson B. C., Li R.-K., Vitkin I. A. Mueller matrix decomposition for polarized light assessment of complex turbid media such as biological tissues // *J. Biophoton.* 2009. V. 2. P. 145–156.
722. Wood M. F. G., Ghosh N., Moriyama E. H., Wilson B. C., Vitkin I. A. Proof-of-principle demonstration of a Mueller matrix decomposition method for polarized light-based tissue characterization *in vivo* // *J. Biomed. Opt.* 2009. V. 14. P. 014029-1–4.
723. Ghosh N., Wood M. F. G., Vitkin I. A. Polarimetry in turbid, birefringent, optically active media: A Monte Carlo study of Mueller matrix decomposition in the backscattering geometry // *J. Appl. Phys.* 2009. V. 105. P. 102023-1–8.
724. Ghosh N., Wood M. F. G., Wallenburg M. A., Vitkin I. A. Influence of the order of the constituent basis matrices on the Mueller matrix decomposition-derived polarization parameters in complex turbid media such as biological tissues // *Opt. Commun.* 2010. V. 283. P. 1200–1208.
725. Guo X., Ghosh N., Wood M. F. G., Vitkin I. A. Depolarization of light in turbid media: A scattering event resolved Monte Carlo study // *Appl. Opt.* 2010. V. 49. P. 153–162.
726. Wallenburg M. A., Pop M., Wood M. F. G., Ghosh N., Wright G. A., Vitkin I. A. Comparison of optical polarimetry and diffusion tensor MR imaging for assessing myocardial anisotropy // *J. Innov. Opt. Health Sci.* 2010. V. 3. P. 109–121.
727. Wallenburg M. A., Wood M. F. G., Vitkin I. A. Effect of optical axis orientation on polarimetry-based linear retardance measurements // *Opt. Lett.* 2010. V. 35. P. 2570–2572.
728. Wood M. F. G., Ghosh N., Wallenburg M. A., Li S., Weisel R. D., Wilson B. C., Li R.-K., Vitkin I. A. Polarization birefringence measurements for characterizing the myocardium, including healthy, infarcted, and stem cell regenerated tissues // *J. Biomed. Opt.* 2010. V. 15. P. 047009-1–9.
729. Wood M. F. G., Vurgun N., Wallenburg M. A., Vitkin I. A. Effect of formalin fixation on tissue optical polarization properties // *Phys. Med. Biol.* 2011. V. 56. P. 115–122.
730. Ahmad M., Alali S., Kim A. J., Wood M. F. G., Vitkin I. A. Do different turbid media with matched bulk optical properties also exhibit similar polarization properties? // *Biomed. Opt. Express.* 2011. V. 2. P. 3248–3258.
731. Ghosh N., Vitkin I. A. Concepts, challenges and applications of polarized light in biomedicine: a tutorial review // *J. Biomed. Opt.* 2011. V. 16, № 11. P. 110801-1–29.
732. Alali S., Ahmad M., Kim A. J., Vurgun N., Wood M. F. G., Vitkin I. A. Quantitative correlation between light depolarization and transport albedo of various porcine tissues // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17, № 4. P. 045004.
733. Кузьмин В. Л., Меглинский И. В., Чурмаков Д. Ю. Когерентные эффекты при многократном рассеянии линейно-поляризованного света // *Опт. спектр.* 2005. Т. 98, № 4. С. 673–679.

734. Кузьмин В. Л., Меглинский И. В. Обратное рассеяние света с линейной и круговой поляризациями в случайно-неоднородных средах // *Опт. спектр.* 2009. Т. 106, № 2. С. 294–305.
735. Кузьмин В. Л., Меглинский И. В. Аномальные поляризационные эффекты при рассеянии света в случайных средах // *ЖЭТФ.* 2010. Т. 137, № 5. 848–860.
736. Kuzmin V. L., Meglinski I. V. Helicity flip of backscattered circularly polarized light // *Proc. SPIE.* 2010. V. 7573. P. 5730Z-1–7.
737. Bagnaninchi P. O., Yang Y., Bonesi M., Maffulli G., Plelan C., Meglinski I. et al. In-depth imaging and quantification of degenerative changes associated with Achilles ruptured tendons by polarization-sensitive optical coherence tomography // *Phys. Med. Biol.* 2010. V. 55. P. 3777–3787.
738. Macdonald C., Meglinski I. Backscattering of circular polarized light from a disperse random medium influenced by optical clearing // *Laser Phys. Lett.* 2011. V. 8, № 4. P. 324–328.
739. Meglinski I., Kuzmin V. L. Coherent backscattering of circularly polarized light from a disperse random medium // *Prog. Electromagnet. Res.* 2011. V. M16. P. 47–61.
740. Compain E., Poirier S., Drévilion B. General and self-consistent method for the calibration of polarization modulators, polarimeters, and Mueller-matrix ellipsometers // *Appl. Opt.* 1999. V. 38. P. 3490–3502.
741. Sabatke D. S., Descour M. R., Dereniak E. L., Sweatt W. C., Kemme S. A., Phipps G. S. Optimization of retardance for a complete Stokes polarimeter // *Opt. Lett.* 2000. V. 25. P. 802–804.
742. De Martino A., Garcia-Caurel E., Laude B., Drévilion B. General methods for optimized design and calibration of Mueller polarimeters // *Thin Solid Films.* 2004. V. 455/456. P. 112–119.
743. Laude-Boulesteix B., De Martino A., Drévilion B., Schwartz L. Mueller polarimetric imaging system with liquid crystals // *Appl. Opt.* 2004. V. 43. P. 2824–2832.
744. Anastasiadou M., Ben Hatit S., Ossikovski R., Guyot S., De Martino A. Experimental validation of the reverse polar decomposition of depolarizing Mueller matrices // *J. Europ. Opt. Soc.* 2007. V. 2. P. 07018-1–7.
745. Ossikovski R., De Martino A., Guyot S. Forward and reverse product decompositions of depolarizing Mueller matrices // *Opt. Lett.* 2007. V. 32. P. 689–691.
746. Dubreuil M., Rivet S., Le Jeune B., Cariou J. Snapshot Mueller matrix polarimeter by wavelength polarization coding // *Opt. Express.* 2007. V. 15. 13660–13668.
747. Ossikovski R., Anastasiadou M., Ben Hatit S., Garcia-Caurel E., De Martino A. Depolarizing Mueller matrices: how to decompose them? // *Phys. Status Solidi A.* 2008. V. 205. P. 720–727.
748. Ossikovski R. Analysis of depolarizing Mueller matrices through a symmetric decomposition // *J. Opt. Soc. Am. A.* 2009. V. 26. P. 1109–1118.
749. Cerny V., Turek Z., Parizkova R. Orthogonal polarization spectral imaging // *Physiol. Res.* 2007. V. 56. P. 141–147.
750. Trunina N., Derbov V., Tuchin V., Altshuler G. Dentinal permeation modeling // *Proc. SPIE.* 2008. V. 6791. 67910T-1–7.
751. Трунина Н. А., Лычагов В. В., Тучин В. В. Исследование диффузии воды через дентин зуба человека методом оптической когерентной томографии // *Опт. спектр.* 2010. № 2. С. 1246–1252.
752. Кузьмин В. Л., Меглинский И. В. Численное моделирование когерентного обратного рассеяния и временных корреляций интенсивности в случайно-неоднородных средах (обзор) *Квантовая электроника.* 2006. Т. 36, № 11. С. 990–1002.
753. Heller W. Remarks on refractive index mixture rules // *J. Phys. Chem.* 1966. V. 69, № 4. P. 1123–1129.
754. Верецагин В. Г., Понявина А. Н. Статистические характеристики и пропускание тонкого дисперсного плотно упакованного слоя // *Ж. прикл. спектр.* 1975. Т. 22, № 3. С. 518–524.

755. *Twersky V.* Interface effects in multiple scattering by large, low refracting, absorbing particles // *J. Opt. Soc. Am.* 1970. V. 60, № 7. P. 908–914.
756. *Lax M.* Multiple scattering of waves II. The effective field in dense system // *Phys. Rev.* 1952. V. 85, № 4. P. 621–629.
757. *Tsang L., Kong J. A., Shin R. T.* Theory of Microwave Remote Sensing / N. Y.: Wiley, 1985.
758. *Hong K. M.* Multiple scattering of electromagnetic waves by a crowded monolayer of spheres: application to migration imaging films // *J. Opt. Soc. Am.* 1980. V. 70, № 7. P. 821–826.
759. *Ishimaru A., Kuga Y.* Attenuation constant of a coherent field in a dense distribution of particles // *J. Opt. Soc. Am.* 1982. V. 72, № 10. P. 1317–1320.
760. *Понявина А. Н.* Селекция оптического излучения при рассеянии в частично упорядоченных дисперсных средах // *Ж. прикл. спектр.* 1998. Т. 65, № 5. С. 721–733.
761. *Smith T. R.* Multiple scattering in the cornea // *J. Mod. Opt.* 1988. V. 35, № 1. P. 93–101.
762. *Twersky V.* Absorption and multiple scattering by biological suspensions // *J. Opt. Soc. Am.* 1970. V. 60. P. 1084–1093.
763. *Steinke J. M., Shepherd A. P.* Diffusion model of the optical absorbance of whole blood // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1988. V. 5. P. 813–822.
764. *Cilesiz I. F., Welch A. J.* Light dosimetry: effects of dehydration and thermal damage on the optical properties of the human aorta // *Appl. Opt.* 1993. V. 32. P. 477–487.
765. *Lin W.-C., Motamedi M., Welch A. J.* Dynamics of tissue optics during laser heating of turbid media // *Appl. Opt.* 1996. V. 35, № 19. P. 3413–3420.
766. *Vargas G., Chan E. K., Barton J. K., Rylander III H. G., Welch A. J.* Use of an agent to reduce scattering in skin // *Laser. Surg. Med.* 1999. V. 24. P. 133–141.
767. *Doornbos R. M. P., Lang R., Aalders M. C., Cross F. W., Sterenborg H. J. C. M.* The determination of *in vivo* human tissue optical properties and absolute chromophore concentrations using spatially resolved steady-state diffuse reflectance spectroscopy // *Phys. Med. Biol.* 1999. V. 44. P. 967–981.
768. *Rol P., Niederer P., Dürr U., Henchoz P.-D., Fankhauser F.* Experimental investigation on the light scattering properties of the human sclera // *Laser Light Ophthalmol.* 1990. V. 3. P. 201–212.
769. *Rol P. O.* Optics for Transscleral Laser Applications: Dis. ... for the degree of Doctor of Natural Sciences. № 9655. Zurich, Swiss Federal Institute of Technology, 1992. 152 p.
770. *Kamai Y., Ushiki T.* The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera // *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 1991. V. 32. P. 2244–2258.
771. *Leonard D. W., Meek K. M.* Refractive indices of the collagen fibrils and extrafibrillar material of the corneal stroma // *Biophys. J.* 1997. V. 72. P. 1382–1387.
772. *Meek K. M., Dennis S., Khan S.* Changes in the refractive index of the stroma and its extrafibrillar matrix when the cornea swells // *Biophys. J.* 2003. V. 85. P. 2205–2212.
773. *Farrell R. A., McCally R. L.* Corneal transparency // *Principles and Practice of Ophthalmology* / Ed. by D. A. Albert, F. A. Jakobiec. Philadelphia, PA: W. B. Saunders, 2000. P. 629–643.
774. *Freund D. E., McCally R. L., Farrell R. A.* Effects of fibril orientations on light scattering in the cornea // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1986. V. 3. P. 1970–1982.
775. *Farrell R. A., Freund D. E., McCally R. L.* Hierarchical structure and light scattering in the cornea // *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* 1992. V. 255. P. 233–246.
776. *Farrell R. A., Freund D. E., McCally R. L.* Research on corneal structure // *Johns Hopkins APL Techn. Digest.* 1990. V. 11. P. 191–199.
777. *Borcherding M. S., Blasik L. J., Sittig R. A., Bizzel J. W., Breen M., Weinstein H. G.* Proteoglycans and collagen fiber organization in human corneoscleral tissue // *Exp. Eye Res.* 1975. V. 21. P. 59–70.
778. *Spitznas M.* The fine structure of human scleral collagen // *Am. J. Ophthalmol.* 1971. V. 71, № 1. P. 68–75.

779. Huang Y., Meek K. M. Swelling studies on the cornea and sclera: the effect of pH and ionic strength // *Biophys. J.* 1999. V. 77. P. 1655–1665.
780. Vaezy S., Clark J. I. Quantitative analysis of the microstructure of the human cornea and sclera using 2-D Fourier methods // *J. Microsc.* 1994. V. 175, № 2. P. 93–99.
781. Sacks Z. S., Kurtz R. M., Juhasz T., Mourau G. A. High precision subsurface photodisruption in human sclera // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, № 3. P. 442–450.
782. Bettelheim F. A. *The Ocular Lens. Structure, Function and Pathology.* N. Y.: Marcel Dekker, 1985.
783. Zigman S., Sutliff G., Rounds M. Relationships between human cataracts and environmental radiant energy. Cataract formation, light scattering and fluorescence // *Lens Eye Toxicity Res.* 1991. V. 8. P. 259–280.
784. Xu J., Pokorny J., Smith V. C. Optical density of the human lens // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1997. V. 14, № 5. P. 953–960.
785. Pierscionek B. K., Weale R. A. Polarising light biomicroscopy and the relation between visual acuity and cataract // *Eye.* 1995. V. 9. P. 304–308.
786. Pierscionek B. K. Aging changes in the optical elements of the eye // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 3. P. 147–156.
787. van Best J. A., Kuppens E. V. M. J. Summary of studies on the blue – green autofluorescence and light transmission of the ocular lens // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 3. P. 243–250.
788. Bettelheim F. A., Churchill A. C., Robinson Jr. W. G., Zigler Jr. J. S. Dimethyl sulfoxide cataract: a model for optical anisotropy fluctuations // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 3. P. 273–279.
789. Yu N.-T., Krantz B. S., Eppstein J. A. et al. Development of noninvasive diabetes screening device using the ratio of fluorescence to Rayleigh scattered light // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 3. P. 280–288.
790. Costello M. J., Oliver T. N., Cobo L. M. Cellular architecture in aged-related human nuclear cataracts // *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 1992. V. 3, № 11. P. 2244–2258.
791. Максимова И. Л., Зимняков Д. А., Тучин В. В. Управление оптическими свойствами биотканей. 1. Спектральные характеристики склеры глаза // *Опт. спектр.* 2000. Т. 89, № 1. С. 86–95.
792. Зимняков Д. А., Максимова И. Л., Тучин В. В. Управление оптическими свойствами биотканей. 2. Когерентно-оптические методы исследования структуры тканей // *Опт. спектр.* 2000. Т. 88, № 6. С. 1026–1034.
793. Ozaki Y. Medical application of Raman spectroscopy // *Appl. Spectrosc. Rev.* 1988. V. 24, № 3. P. 259–312.
794. Dillon J. The photochemistry and photobiology of the eye // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1991. V. 10. P. 23–40.
795. Benedek G. B. Theory of transparency of the eye // *Appl. Opt.* 1971. V. 10, № 3. P. 459–473.
796. Tardieu A., Delaye M. Eye lens proteins and transparency from light transmission theory to solution x-ray structural analysis // *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 1988. V. 17. P. 47–70.
797. Кривандин А. В. О надмолекулярной структуре кристаллинов в хрусталике глаза. Исследование методом рентгеновского малоуглового рассеяния // *Биофизика.* 1997. Т. 42, № 6. С. 1274–1278.
798. Vaezy S., Clark J. I. Characterization of the cellular microstructures of ocular lens using 2-D power law analysis // *Ann. Biomed. Eng.* 1995. V. 23. P. 482–490.
799. Bityurin N. M., Muraviov S. V., Kamensky V. A., Malyshev A. Yu., Chelnokov E. V., Sostov L. V., Gelikonov G. V. Kinetics of low scattering biotissue photodenaturation induced by the UV harmonics of a Nd:YAP laser and by Nd:YAG laser at a wavelength of 1440 nm // *Proc. SPIE.* 2001. V. 4161. P. 1–11.
800. Соустов Л. В., Челноков Е. В., Саногова Н. В., Битюрин Н. М., Немов В. В., Сергеев Ю. В., Островский М. А. Исследование механизмов агрегации кристаллинов, индуцированной импульсным лазерным УФ-излучением 308 нм // *Биофизика.* 2008. Т. 53, № 4. С. 582–597.

801. *Chelnokov E., Soustov L., Sapogova N., Ostrovsky M., Bityurin N.* Nonreciprocal XeCl laser-induced aggregation of β -crystallins in water solution // *Opt. Express*. 2008. V. 16, № 23. P. 18798–18803.
802. *Wang X., Milner T. E., Chang M. C., Nelson J. S.* Group refractive index measurement of dry and hydrated type I collagen films using optical low-coherence reflectometry // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 2. P. 212–216.
803. *Ziman J. M.* Models of Disorder: The Theoretical Physics of Homogeneously Disordered Systems. London, N. Y., Melbourne: Cambridge Univ. Press, 1979.
804. *Wertheim M. S.* Exact solution of the Percus-Yevick integral equation for hard spheres // *Phys. Rev. Lett.* 1963. V. 10, № 8. P. 321–323.
805. *Lebovitz J. L.* Exact solution of generalized Percus-Yevick equation for a mixture of hard spheres // *Phys. Rev.* 1964. V. 133, № 4A. P. 895–899.
806. *Baxter R. J.* Ornstein-Zernike relation and Percus-Yevick approximation for fluid mixtures // *J. Chem. Phys.* 1970. V. 52, № 9. P. 4559–4562.
807. *Иванов А. П., Лойко В. А., Дик В. П.* Распространение света в плотноупакованных дисперсных средах. Минск: Наука и техника, 1988.
808. *Marguez G., Wang L. V., Lin S.-P., Swartz J. A., Thomsen S.* Anisotropy in the absorption and scattering spectra of the chicken breast tissue // *Appl. Opt.* 1998. V. 37, № 4. P. 798–804.
809. *Ларионова Н. Л., Максимова И. Л., Тучин В. В.* Спектры рассеяния и цвет дисперсных систем слабо поглощающих частиц // *Опт. спектр.* 2002. Т. 93, № 2. С. 292–302.
810. *Sacks Z. S., Craig D. L., Kurtz R. M., Juhasz T., Mourou G.* Spatially resolved transmission of highly focused beams through cornea and sclera between 1400 and 1800 nm // *Proc. SPIE*. 1999. V. 3726. P. 522–527.
811. *van den Berg T. J. T. P., Tan K. E. W. P.* Light transmittance of the human cornea from 320 to 700 nm for different ages // *Vision Res.* 1994. V. 33. P. 1453–1456.
812. *Kostyuk O., Nalovina O., Mubard T. M., Regini J. W., Meek K. M., Quantock A. J., Elliott G. F., Hodson S. A.* Transparency of the bovine corneal stroma at physiological hydration and its dependence on concentration of the ambient anion // *J. Physiol.* 2002. V. 543. P. 633–642.
813. *Герман И.* Физика организма человека / Пер. с англ. М.: Изд. дом «Интеллект», 2010; *Herman I. P.* Physics of the Human Body. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2007.
814. *van de Kraats J., van Norren D.* Optical density of the aging human ocular media in the visible and the UV // *JOSA A*. 2007. V. 24, № 7. P. 1842–1857.
815. *Королевич А. Н., Хайруллина А. Я., Шубочкин Л. П.* Влияние агрегированности крупных биологических частиц на элементы матрицы рассеяния света // *Опт. спектр.* 1994. Т. 77. С. 278–282.
816. *Изотова В. Ф., Максимова И. Л., Романов С. В.* Анализ ошибок лазерного поляризационного нефелометра // *Опт. спектр.* 1996. Т. 80, № 6. С. 1001–1007.
817. *Carrieri A. H., Owens D. J., Schultz J. C.* Infrared Mueller matrix acquisition and preprocessing system // *Appl. Opt.* 2008. V. 47. P. 5019–5027.
818. *Twietmeyer K., Chipman R. A.* Optimization of Mueller polarimeters in the presence of error sources // *Opt. Express*. 2008. V. 16. P. 11589–11603.
819. *Tyo J. S.* Noise equalization in Stokes parameter images obtained by use of variable-retardance polarimeters // *Opt. Lett.* 2000. V. 25. P. 1198–1200.
820. *Tyo J. S., Wang Zh., Johnson S. J., Hoover B. G.* Design and optimization of partial Mueller matrix polarimeters // *Appl. Opt.* 2010. V. 49. P. 2326–2333.
821. *Hauge P. S.* Recent developments in instruments in ellipsometry // *Surface Science*. 1980. V. 96. P. 108–140.
822. *Benoit A.-M., Naoun O. K., Louis-Dorr V. et al.* Linear dichroism of the retinal nerve fiber layer expressed with Mueller matrices // *Appl. Opt.* 2001. V. 40. P. 565–569.
823. *Naoun O. K., Louis-Dorr V., Allé P. et al.* Exploration of the retinal nerve fiber layer thickness by measurement of the linear dichroism // *Appl. Opt.* 2005. V. 44. P. 7074–7082.

824. *Louis-Dorr V., Naoun K., Allé P. et al.* Linear dichroism of the cornea // *Appl. Opt.* 2004. V. 43. P. 1515–1521.
825. *Rosencwaig A.* Photoacoustics and Photoacoustic spectroscopy. N. Y.: Wiley, 1983.
826. *Progress in Photothermal and Photoacoustic Science and Technology. Life and Earth Sciences / Ed. by A. Mandelis, P. Hess.* Bellingham, WA: SPIE Press, 1997.
827. *Fried D.* Optical methods for caries detection, diagnosis, and therapeutic intervention // *Biomedical Photonics Handbook / Ed. by T. Vo-Dinh.* Boca Raton: CRC Press, 2003. P. 50-1–27.
828. *Braslavsky S. E., Heihoff K.* Photothermal methods / *Handbook of Organic Photochemistry / Ed. by J. C. Scaiano.* Boca Raton: CRC Press, 1989.
829. *Гусев В. Э., Карабутов А. А.* Лазерная оптоакустика. М.: Наука, 1991; *Gusev V. E., Karabutov A. A.* Laser Optoacoustics. N. Y.: AIP Press, 1993.
830. *Photoacoustic and photothermal science and engineering / Ed. by A. Mandelis, K. H. Michaelian // Opt. Eng.* 1997. V. 36, № 2. P. 301–534.
831. *Карабутов А. А., Ораевский А. А.* Регистрация оптико-акустических импульсов с высоким временным разрешением для измерения распределения оптической энергии в биотканях, в кн. *Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 1 / Под ред. В. В. Тучина.* М.: Физматлит, 2007. С. 507–554 / Пер. с англ. под ред. В. В. Тучина. *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics / Ed. by V. V. Tuchin.* Bellingham, WA: SPIE Press, 2002.
832. *Oraevsky A. A., Karabutov A. A.* Optoacoustic tomography // *Biomedical Photonics Handbook / Ed. by T. Vo-Dinh.* Boca Raton: CRC Press, 2003. P. 34-1–34.
833. *Nagai S., Izuchi M.* Quantitative photoacoustic imaging of biological tissues // *Jap. J. Appl. Phys.* 1988. V. 27, № 3. P. L423–L425.
834. *Ашуров А. М., Мадвалиев У., Проклов В. В. и др.* Фотоакустический микроскоп с оптическим сканированием // *ПТЭ.* 1988. № 2. С. 154–157.
835. *Sowa M. G., Mantsch H. H.* FT-IR step-scan photoacoustic phase analysis and depth profiling of calcified tissue // *Appl. Spectr.* 1994. V. 48, № 3. P. 316–319.
836. *Kruger R. A., Lin P.* Photoacoustic ultrasound: pulse production and detection in 0.5 % Liposyn // *Med. Phys.* 1994. V. 21, № 7. P. 1179–1184.
837. *Kruger R. A., Pingyu L., Fang Y., Appledorn C. R.* Photoacoustic ultrasound-reconstruction tomography // *Med. Phys.* 1995. V. 22, № 10. P. 1605–1609.
838. *Oraevsky A. A.* Laser optoacoustic imaging for diagnosis of cancer // *IEEE/LEOS Newsletter.* 1996. № 12. P. 17–20.
839. *Karabutov A. A., Podymova N. B., Letokhov V. S.* Time-resolved laser optoacoustic tomography of inhomogeneous media // *Appl. Phys. B.* 1996. V. 63. P. 545–563.
840. *Oraevsky A. A., Jacques S. L., Tittel F. K.* Measurement of tissue optical properties by time-resolved detection of laser-induced transient stress // *Appl. Opt.* 1997. V. 36, № 1. P. 402–415.
841. *Esenaliev R. O., Larin K. V., Larina I. V., Motamedi M., Oraevsky A. A.* Optical properties of normal and coagulated tissues: measurements using combination of optoacoustic and diffuse reflectance techniques // *Proc. SPIE.* 1999. V. 3726. P. 560–566.
842. *Karabutov A. A., Savateeva E. V., Podymova N. B., Oraevsky A. A.* Backward mode detection of laser-induced wide-band ultrasonic transients with optoacoustic transducer // *J. Appl. Phys.* 2000. V. 87, № 4. P. 2003–2014.
843. *Andreev V. G., Karabutov A. A., Oraevsky A. A.* Detection of ultrawide-band ultrasound pulses in optoacoustic tomography // *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control.* 2003. V. 50, № 10. P. 1383–1390.
844. *Paltauf G., Schmidt-Kloiber H.* Pulsed optoacoustic characterization of layered media // *J. Appl. Phys.* 2000. V. 88, № 3. P. 1624–1631.
845. *Köstli K. P., Frenz M., Weber H. P., Paltauf G., Schmidt-Kloiber H.* Optoacoustic infrared spectroscopy of soft tissue // *J. Appl. Phys.* 2000. V. 88, № 3. P. 1632–1637.

846. Köstli K. P., Frenz M., Weber H. P., Paltauf G., Schmidt-Kloiber H. Optoacoustic tomography: time-gated measurement of pressure distributions and image reconstruction // *Appl. Opt.* 2001. V. 40, № 22. P. 3800–3809.
847. Viator J. A., Au G., Paltauf G., Jacques S. L., Prah S. A., Ren H., Chen Z., Nelson J. S. Clinical testing of a photoacoustic probe for port wine stain depth determination // *Lasers Surg. Med.* 2002. V. 30. P. 141–148.
848. Kruger R. A., Kiser W. L., Reinecke D. R., Kruger G. A. Thermoacoustic computed tomography using a conventional linear transducer array // *Med. Phys.* 2003. V. 30. P. 856–860.
849. Kruger R. A., Kiser W. L., Reinecke D. R., Kruger G. A., Miller K. D. Thermoacoustic optical molecular imaging of small animals // *Molecular Imag.* 2003. V. 2. P. 113–123.
850. Hoelen C. G. A., de Mul F. F. M., Pongers R., Dekker A. Three-dimensional photoacoustic imaging of blood vessels in tissue // *Opt. Lett.* 1998. V. 23. P. 648–650.
851. Hoelen C. G. A., de Mul F. F. M. Image reconstruction for photoacoustic scanning of tissue structures // *Appl. Opt.* 2000. V. 39, № 31. P. 5872–5883.
852. Hoelen C. G. A., Dekker A., de Mul F. F. M. Detection of photoacoustic transients originating from microstructures in optically diffuse media such as biological tissue // *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control.* 2001. V. 48, № 1. P. 37–47.
853. Pilatou M. C., Voogd N. J., de Mul F. F. M., van Adrichem L. N. A., Steenbergen W. Analysis of three-dimensional photoacoustic imaging of a vascular tree *in vitro* // *Rev. Sci. Instrum.* 2003. V. 74, № 10. P. 4495–4499.
854. Kolkman R. G. M., Hondebrink E., Steenbergen W., van Leeuwen T. G., de Mul F. F. M. Photoacoustic imaging of blood vessels with a double-ring sensor featuring a narrow angular aperture // *J. Biomed. Opt.* 2004. V. 9, № 6. P. 1327–1335.
855. Ku G., Wang L.-H. V. Scanning electromagnetic-induced thermoacoustic tomography: signal, resolution, and contrast // *Med. Phys.* 2001. V. 28. P. 4–10.
856. Wang X. D., Pang Y. J., Ku G., Xie X. Y., Stoica G., Wang L. V. Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional *in vivo* imaging of the brain // *Nature Biotechnol.* 2003. V. 21. P. 803–806.
857. Wang X. D., Pang Y. J., Ku G., Xie X. Y., Stoica G., Wang L. V. Three-dimensional laser-induced photoacoustic tomography of mouse brain with the skin and skull intact // *Opt. Lett.* 2003. V. 28, № 19. P. 1739–1741.
858. Niederhauser J. J., Frauchiger D., Weber H. P., Frenz M. Real-time optoacoustic imaging using a schlieren transducer // *Appl. Phys. Lett.* 2002. V. 81. P. 571–573.
859. Payne B. P., Venugopalan V., Mikic B. B., Nishioka N. S. Optoacoustic determination of optical attenuation depth using interferometric detection // *J. Biomed. Opt.* 2003. V. 8, № 2. P. 264–272.
860. Payne B. P., Venugopalan V., Mikic B. B., Nishioka N. S. Optoacoustic tomography using time-resolved interferometric detection of surface displacement // *J. Biomed. Opt.* 2003. V. 8, № 2. P. 273–280.
861. Oberheide U., Bruder I., Welling H., Ertmer W., Lubatschowski H. Optoacoustic imaging for optimization of laser cyclophotocoagulation // *J. Biomed. Opt.* 2003. V. 8, № 2. P. 281–287.
862. Schüle G., Hüttman G., Framme C., Roeder J., Brinkmann R. Noninvasive optoacoustic temperature determination at the fundus of the eye during laser irradiation // *J. Biomed. Opt.* 2004. V. 9, № 1. P. 173–179.
863. Imhof R. E., Whitters C. J., Birch D. J. S. Opto-thermal *in vivo* monitoring of sunscreens on skin // *Phys. Med. Biol.* 1990. V. 35, № 1. P. 95–102.
864. Prah S. A., Vitkin I. A., Bruggemann U., Wilson B. C., Anderson R. R. Determination of optical properties of turbid media using pulsed photothermal radiometry // *Phys. Med. Biol.* 1992. V. 37. P. 1203–1217.
865. Jacques S. L., Nelson J. S., Wright W. H., Milner T. E. Pulsed photothermal radiometry of port wine stain lesions // *Appl. Opt.* 1993. V. 32. P. 2439–2446.

866. Vitkin I. A., Wilson B. C., Anderson R. R. Analysis of layered scattering materials by pulsed photothermal radiometry: application to photon propagation in tissue // *Appl. Opt.* 1995. V. 34. P. 2973–2982.
867. Milner T. E., Goodman D. M., Tanenbaum B. S., Nelson J. S. Depth profiling of laser-heated chromophores in biological tissues by pulsed photothermal radiometry // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1995. V. 12. P. 1479–1488.
868. Milner T. E., Goodman D. M., Tanenbaum B. S., Anvari B., Nelson J. S. Noncontact determination of thermal diffusivity in biomaterials using infrared imaging radiometry // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1. P. 92–97.
869. Fried D., Visuri S. R., Featherstone J. D. et al. Infrared radiometry of dental enamel during Er: YAG and Er: YSGG laser irradiation // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 4. P. 455–465.
870. Sathyam U. S., Prahl S. A. Limitations in measurement of subsurface temperatures using pulsed photothermal radiometry // *J. Biomed. Opt.* 1997. V. 2, № 3. P. 251–261.
871. Li B., Majaron B., Viator J. A., Milner T. E., Chen Z., Zhao Y., Ren H., Nelson J. S. Accurate measurement of blood vessel depth in port wine stained human skin *in vivo* using pulsed photothermal radiometry // *J. Biomed. Opt.* 2004. V. 9, № 2. P. 299–307.
872. Choi B., Majaron B., Nelson J. S. Computational model to evaluate port wine stain depth profiling using pulsed photothermal radiometry // *J. Biomed. Opt.* 2004. V. 9, № 5. P. 961–966.
873. Nicolaidis L., Mandelis A., Abrams S. H. Novel dental dynamic depth profilometric imaging using simultaneous frequency-domain infrared photothermal radiometry and laser luminescence // *J. Biomed. Opt.* 2000. V. 5. P. 31–39.
874. Jeon R. J., Mandelis A., Sanchez V., Abrams S. H. Nonintrusive, noncontacting frequency-domain photothermal radiometry and luminescence depth profilometry of carious and artificial subsurface lesions in human teeth // *J. Biomed. Opt.* 2004. V. 9, № 4. P. 804–819.
875. Douglas-Hamilton D. H., Conia J. Thermal effects in laser-assisted pre-embryo zona drilling // *J. Biomed. Opt.* 2001. V. 6, № 2. P. 205–213.
876. Lapotko D., Romanovskaya T., Zharov V. Photothermal images of live cells in presence of drug // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, № 3. P. 425–434.
877. Zharov V. Far-field photothermal microscopy beyond the diffraction limit // *Opt. Lett.* 2003. V. 28. P. 1314–1316.
878. Zharov V., Galitovsky V., Viegas M. Photothermal detection of local thermal effects during selective nanophotothermolysis // *Appl. Phys. Lett.* 2003. V. 83, № 24. P. 4897–4899.
879. Galitovskiy V., Chowdhury P., Zharov V. P. Photothermal detection of nicotine-induced apoptotic effects in a pancreatic cancer cells // *Life Sciences.* 2004. V. 75. P. 2677–2687.
880. Zharov V. P., Galanzha E. I., Tuchin V. V. Integrated photothermal flow cytometry *in vivo* // *J. Biomed. Opt.* 2005. V. 10. P. 051502-1–13.
881. Zharov V. P., Galanzha E. I., Tuchin V. V. Photothermal image flow cytometry *in vivo* // *Opt. Lett.* 2005. V. 30, № 6. P. 628–630.
882. Yablon A. D., Nishioka N. S., Mikic B. B., Venugopalan V. Measurement of tissue absorption coefficients by use of interferometric photothermal spectroscopy // *Appl. Opt.* 1999. V. 38. P. 1259–1272.
883. Dark M. L., Perelman L. T., Itzkan I., Schaffer J. L., Feld M. S. Physical properties of hydrated tissue determined by surface interferometry of laser-induced thermoelastic deformation // *Phys. Med. Biol.* 2000. V. 45. P. 529–539.
884. Oraevsky A. A., Jacques S. L., Esenaliev R. O., Tittel F. K. Pulsed laser ablation of soft tissues, gels and aqueous solutions at temperatures below 100 °C // *Lasers Surg. Med.* 1995. V. 18, № 3. P. 231–240.
885. Larin K. V., Larina I. V., Esenaliev R. O. Monitoring of tissue coagulation during thermotherapy using optoacoustic technique // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2005. V. 38. P. 2645–2653.

886. Schmitz C. H., Oberheide U., Lohmann S., Lubatschowski H., Ertmer W. Pulsed photothermal radiometry as a method for investigating blood vessel-like structures // J. Biomed. Opt. 2001. V. 6, № 2. P. 214–223.
887. Kinnunen M., Myllylä R. Application of optical coherence tomography, pulsed photoacoustic technique, and time-of-flight technique to detect changes in the scattering properties of a tissue-simulating phantom // J. Biomed. Opt. 2008. V. 13, № 2. P. 024005-1–9.
888. Larina I. V., Larin K. V., Esenaliev R. O. Real-time optoacoustic monitoring of temperature in tissues // J. Phys. D: Appl. Phys. 2005. V. 38. P. 2633–2639.
889. Esenaliev R. O., Larina I. V., Larin K. V., Deyo D. J., Motamedi M., Prough D. S. Optoacoustic technique for noninvasive monitoring of blood oxygenation: A feasibility study // Appl. Opt. 2002. V. 41, № 22. P. 4722–4731.
890. Wang L. V. Ultrasound-mediated biophotonics imaging: A review of acousto-optical tomography and photo-acoustic tomography // Disease Markers. 2003/2004. V. 19. P. 123–138.
891. Maslov K., Stoica G., Wang L. V. *In vivo* dark-field reflection-mode photoacoustic microscopy // Opt. Lett. 2005. V. 30, № 6. P. 625–627.
892. Мерфи П., Уемсел Г. Фототермальные методы оптической проверки материалов // Экспресс — информация: Испыт. приб. и стенды. 1987. № 24. С. 18–24.
893. Ntziachristos V., Ripoll J., Wang L. V., Weissleder R. Looking and listening to light: the revolution of photonic imaging // Nature Biotechnol. 2005. V. 23, № 3. P. 313–320.
894. Xu M., Wang L. V. Photoacoustic imaging in biomedicine // Rev. Sci. Instrum. 2006. V. 77. P. 041101.
895. Wang L. V., Hu S. Photoacoustic tomography: *in vivo* imaging from organelles to organs // Science 2012. V. 335, № 6075. P. 1458–1462.
896. Li C., Wang L. V. Photoacoustic tomography and sensing in biomedicine // Phys. Med. Biol. 2009. V. 54. P. R59–R97.
897. Hu S., Maslov K., Wang L. V. Optical-resolution photoacoustic microscopy for *in vivo* volumetric microvascular imaging in intact tissues // Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. by V. V. Tuchin. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 361–375.
898. Khokhlova T., Pelivanov I., Karabutov A. Advances in optoacoustic imaging // Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. by V. V. Tuchin. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 343–360.
899. Tuchin V. V., Galanzha E. I., Zharov V. P. *In vivo* photothermal and photoacoustic flow cytometry // Advanced Optical Cytometry: Methods and Disease Diagnoses / Ed. by V. V. Tuchin. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011. P. 501–571.
900. Tuchin V. V., Tárnok A., Zharov V. P. *In vivo* flow cytometry: a horizon of opportunities // Cytometry A. 2011. V. 79A, № 10. P. 737–745.
901. Esenaliev R. O. Biomedical Optoacoustics // J. Innov. Opt. Health Sci. 2011. V. 4, № 1. P. 39–44.
902. Fang H., Maslov K., Wang L. V. Photoacoustic Doppler effect from flowing small light-absorbing particles // Phys. Rev. Lett. 2007. V. 99. P. 184501.
903. Xu X., Liu H., Wang L. V. Time-reversed ultrasonically encoded optical focusing into scattering media // Nature Photon. 2011. V. 5. P. 154–157.
904. Zhang H. F., Maslov K., Stoica G., Wang L. V. Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive *in vivo* imaging // Nature Biotechnol. 2006. V. 24. P. 848–851.
905. Zhang H. F., Maslov K., Wang L. V. *In vivo* imaging of subcutaneous structures using functional photoacoustic microscopy // Nature Protocols. 2007. V. 2. P. 797–804.
906. Wang L. V. Multiscale photoacoustic microscopy and computed tomography // Nature Photon. 2009. V. 3, № 9. P. 503–509.
907. Guo Z., Hu S., Wang L. V. Calibration-free absolute quantification of optical absorption coefficients using acoustic spectra in 3D photoacoustic microscopy of biological tissue // Opt. Lett. 2010. V. 35. P. 2067–2069.

908. Zhang C., Maslov K., Wang L. V. Subwavelength-resolution label-free photoacoustic microscopy of optical absorption *in vivo* // Opt. Lett. 2010. V. 35. P. 3195–3197.
909. Buehler A., Rosenthal A., Jetzfellner T., Dima A., Razansky D., Ntziachristos V. Model-based optoacoustic inversions with incomplete projection data // Med. Phys. 2011. V. 38. P. 1694–1704.
910. Rosenthal A., Ntziachristos V., Razansky D. Model-based optoacoustic inversion with arbitrary-shape detectors // Med. Phys. 2011. V. 38. P. 4285–4295.
911. Glatz J., Deliolanis N. C., Buehler A., Razansky D., Ntziachristos V. Blind source unmixing in multi-spectral optoacoustic tomography // Opt. Express. 2011. V. 19. P. 3175–3184.
912. Razansky D., Buehler A., Ntziachristos V. Volumetric real-time multispectral optoacoustic tomography of biomarkers // Nature Protoc. 2011. V. 6. P. 1121–1129.
913. Xu Z., Li C., Wang L. V. Photoacoustic tomography of water in phantoms and tissue // J. Biomed. Opt. 2010. V. 15. P. 036019.
914. Yin B., Xing D., Wang Y., Zeng Y., Tan Y., Chen Q. Fast photoacoustic imaging system based on 320-element linear transducer array // Phys. Med. Biol. 2004. V. 49. P. 1339–1346.
915. Su Y., Zhang F., Xu K., Yao J., Wang R. K. A photoacoustic tomography system for imaging of biological tissues // J. Phys. D: Appl. Phys. 2005. V. 38. P. 2640–2644.
916. Fomitchov P. A., Kromine A. K., Krishnaswamy S. Photoacoustic probes for nondestructive testing and biomedical applications // Appl. Opt. 2002. V. 41, № 22. P. 4451–4459.
917. Jaeger M., Niederhauser J. J., Hejazi M., Frenz M. Diffraction-free acoustic detection for optoacoustic depth profiling of tissue using an optically transparent polyvinylidene fluoride pressure transducer operated in backward and forward mode // J. Biomed. Opt. 2005. V. 10, № 2. P. 024035-1–7.
918. Ku G., Wang X., Stoica G., Wang L. V. Multiple-bandwidth photoacoustic tomography // Phys. Med. Biol. 2004. V. 49. P. 1329–1338.
919. Pilatou M. C., Marani E., de Mul F. F., Steenbergen W. Photoacoustic imaging of brain perfusion on albino rats by using Evans Blue as contrast agent // Arch. Physiol. Biochem. 2003. V. 111. P. 389–397.
920. Zhang E. Z., Laufer J. G., Pedley R. B., Beard P. C. *In vivo* high-resolution 3D photoacoustic imaging of superficial vascular anatomy // Phys. Med. Biol. 2009. V. 54. P. 1035–1046.
921. Laufer J., Zhang E., Raivich G., Beard P. Three-dimensional noninvasive imaging of the vasculature in the mouse brain using a high resolution photoacoustic scanner // Appl. Opt. 2009. V. 48. P. D299–D306.
922. Razansky D., Vinegoni C., Ntziachristos V. Multispectral photoacoustic imaging of fluorochromes in small animals // Opt. Lett. 2007. V. 32. P. 2891–2893.
923. Ma R., Taruttis A., Ntziachristos V., Razansky D. Multispectral optoacoustic tomography (MSOT) scanner for whole-body small animal imaging // Opt. Express. 2009. V. 17. P. 21414–21426.
924. Buehler A., Herzog E., Razansky D., Ntziachristos V. Video rate optoacoustic tomography of mouse kidney perfusion // Opt. Lett. 2010. V. 35. P. 2475–2477.
925. Gamelin J., Maurudis A., Aguirre A., Huang F., Guo P., Wang L. V., Zhu Q. A real-time photoacoustic tomography system for small animals // Opt. Express. 2009. V. 17. P. 10489–10498.
926. Brecht H. P., Su R., Fronheiser M., Ermilov S. A., Conjusteau A., Oraevsky A. A. Whole-body three-dimensional optoacoustic tomography system for small animals // J. Biomed. Opt. 2009. V. 14. P. 064007.
927. Rosenthal A., Razansky D., Ntziachristos V. Fast semi-analytical model-based acoustic inversion for quantitative optoacoustic tomography // IEEE Trans. Med. Imaging. 2010. V. 29. P. 1275–1285.
928. Khokhlova T. D., Pelivanov I. M., Kozhushko V. V., Zharinov A. N., Solomatin V. S., Karabutov A. A. Optoacoustic imaging of absorbing objects in a turbid medium: ultimate sensitivity and application to breast cancer diagnostics // Appl. Opt. 2007. V. 46, № 2. P. 262–272.

929. *Khokhlova T. D., Pelivanov I. M., Karabutov A. A.* Optoacoustic tomography utilizing focused transducers: the resolution study // *Appl. Phys. Lett.* 2008. V. 92. P. 024105-1-3.
930. *Khokhlova T. D., Pelivanov I. M., Karabutov A. A.* Numerical simulations improve biomedical visualization // *SPIE Newsroom.* 2008. 10.1117/2.1200810.1302.
931. *Симонова В. А., Пеливанов И. М., Панченко В. Я., Карабутов А. А.* Поперечное пространственное разрешение многоэлементной антенны для оптико-акустической томографии // *Акуст. журн.* 2010. Т. 56, № 5. P. 693-698.
932. *Manohar S., Kharine A., van Hespren J. C. G., Steenbergen W., van Leeuwen T. G.* The Twente photoacoustic mammoscope: system overview and performance // *Phys. Med. Biol.* 2005. V. 50. P. 2543-2557.
933. *Manohar S., Vaartjes S. E., van Hespren J. C. G., Klaase J. M., van den Engh F. M., Steenbergen W., van Leeuwen T. G.* Initial results of *in vivo* non-invasive cancer imaging in the human breast using near-infrared photoacoustics // *Opt. Express.* 2007. V. 15. P. 12277-12285.
934. *Ermilov S. A., Khamapirad T., Conjsteau A., Leonard M. H., Lacewell R., Mehta K., Miller T., Oraevsky A. A.* Laser optoacoustic imaging system for detection of breast cancer // *J. Biomed. Opt.* 2009. V. 14. P. 024007.
935. *Kruger R. A., Lam R. B., Reinecke D. R., Del Rio S. P., Doyle R. P.* Photoacoustic angiography of the breast // *Med. Phys.* 2010. V. 37. P. 6096-6100.
936. *Song K. H., Stein E. W., Margenthaler J. A., Wang L. V.* Noninvasive photoacoustic identification of sentinel lymph nodes containing methylene blue *in vivo* in a rat model // *J. Biomed. Opt.* 2008. V. 13. P. 054033.
937. *Li M. L., Oh J. T., Xie X., Ku G., Wang W., Li C., Lungu G., Stoica G., Wang L. V.* Simultaneous molecular and hypoxia imaging of brain tumors *in vivo* using spectroscopic photoacoustic tomography // *Proc. IEEE* 2008. V. 96. P. 481-489.
938. *Oh J. T., Li M. L., Zhang H. F., Maslov K., Stoica G., Wang L. V.* Three-dimensional imaging of skin melanoma *in vivo* by dual-wavelength photoacoustic microscopy // *J. Biomed. Opt.* 2006. V. 11. P. 034032.
939. *Zhang H. F., Maslov K., Sivaramakrishnan M., Stoica G., Wang L. V.* Imaging of hemoglobin oxygen saturation variations in single vessels *in vivo* using photoacoustic microscopy // *Appl. Phys. Lett.* 2007. V. 90, № 5. P. 053901.
940. *Ntziachristos V., Razansky D.* Molecular imaging by means of multispectral optoacoustic tomography (MSOT) // *Chem. Rev.* 2010. V. 110. P. 2783-2794.
941. *Razansky D., Harlaar N. J., Hillebrands J. L., Taruttis A., Herzog E., Zeebregts C. J., van Dam G. M., Ntziachristos V.* Multispectral optoacoustic tomography of matrix metalloproteinase activity in vulnerable human carotid plaques // *Mol. Imaging Biol.* 2011.
942. *Razansky D., Distel M., Vinegoni C., Ma R., Perrimon N., Koster R. W., Ntziachristos V.* Multispectral opto-acoustic tomography of deep-seated fluorescent proteins *in vivo* // *Nature Photon.* 2009. V. 3. P. 412-417.
943. *Homan K., Kim S., Chen Y. S., Wang B., Mallidi S., Emelianov S.* Prospects of molecular photoacoustic imaging at 1064 nm wavelength // *Opt. Lett.* 2010. V. 35. P. 2663-2665.
944. *Krumholz A., VanVickle-Chavez S. J., Yao J., Fleming T. P., Gillanders W. E., Wang L. V.* Photoacoustic microscopy of tyrosinase reporter gene *in vivo* // *J. Biomed. Opt.* 2011. V. 16. P. 080503.
945. *Hochreiner A., Berer T., Grün H., Leitner M., Burgholzer P.* Photoacoustic imaging using an adaptive interferometer with a photorefractive crystal // *J. Biophoton.* 2012. V. 5, № 7. P. 508-517.
946. *Berer T., Veres I. A., Grün H., Bauer-Marschallinger J., Felbermayer K., Burgholzer P.* Characterization of broadband fiber optic line detectors for photoacoustic tomography // *J. Biophoton.* 2012. V. 5, № 7. P. 518-528.
947. *Sethuraman S., Aglyamov S. R., Amirian J. H., Smalling R. W., Emelianov S. Y.* Intravascular photoacoustic imaging using an IVUS imaging catheter // *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control/* 2007. V. 54. P. 978-986.

948. Sethuraman S., Amirian J.H., Litovsky S.H., Smalling R.W., Emelianov S.Y. Spectroscopic intravascular photoacoustic imaging to differentiate atherosclerotic plaques // *Opt. Express*. 2008. V. 16. P. 3362–3367.
949. Yang J.M., Maslov K., Yang H.C., Zhou Q., Shung K.K., Wang L.V. Photoacoustic endoscopy // *Opt. Lett.* 2009. V. 34. P. 1591–1593.
950. Yang J.-M., Favazza C., Chen R., Yao J., Cai X., Maslov K., Zhou Q., Shung K.K., Wang L.V. Simultaneous functional photoacoustic and ultrasonic endoscopy of internal organs *in vivo* // *Nature Med.* 2012. V. 18, № 8. P. 1297–1302.
951. Yuan Y., Yang S., Xing D. Preclinical photoacoustic imaging endoscope based on acousto-optic coaxial system using ring transducer array // *Opt. Lett.* 2010. V. 35. P. 2266–2268.
952. Jansen K., Van der Steen A.F.W., van Beusekom H.M.M., Oosterhuis J.W., van Soest G. Intravascular photoacoustic imaging of human coronary atherosclerosis // *Opt. Lett.* 2011. V. 36. P. 597–599.
953. Zijlstra G., Buursma A., van Assendelft O.W. Visible and Near Infrared Absorption Spectra of Human and Animal Hemoglobin, Determination and Application. Amsterdam, Netherlands: VSP, 2000.
954. Alander J.T., Kaartinen I., Laakso A., Pätilä T., Spillmann T., Tuchin V.V., Venermo M., Välisuo P. A Review of indocyanine green fluorescent imaging in surgery // *Int. J. Biomed. Imaging*, 2012, paper 940585.
955. Taruttis A., Ntziachristos V. Optoacoustic molecular imaging: methods and applications // *Advanced Biophotonics: Tissue Optical Sectioning* / Ed. by V.V. Tuchin, R.K. Wang. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2012.
956. Hellen A., Mandelis A., Finer Y., Amaechi B.T. Quantitative evaluation of simulated human enamel caries kinetics using Photothermal Radiometry and Modulated Luminescence // *J. Biomed. Opt.* 2011. V. 16, № 7. P. 071406.
957. Hellen A., Mandelis A., Finer Y., Amaechi B.T. Quantitative remineralization evolution of artificially demineralized human enamel using photothermal radiometry and modulated luminescence // *J. Biophoton.* 2011. V. 4, № 11–12. P. 788–804.
958. Abrams S., Sivagurunathan K., Jeon R.J., Mandelis A., Silvertown J.D., Hellen A., Hellen W.M.P., Elman G.I., Ehrlich B.R., Chouljian R., Finer Y., Amaechi B.T. Multi-center clinical study to evaluate the safety and effectiveness of «The canary system» (PTR-LUM Technology) // *Caries Res.* 2011. V. 45. P. 174–242.
959. Garcia J.A., Mandelis A., Abrams S.H., Matvienko A. Photothermal radiometry and modulated luminescence: Applications for dental caries detection // *Handbook of Biophotonics. V. 2: Photonics for Health Care* / Ed. by J. Popp et al. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012. P. 1047–1052.
960. Jacobs A., Worwood M. *Iron in Biochemistry and Medicine* / London, N.Y.: Academic Press, 1974.
961. Zharov V.P., Galanzha E.I., Tuchin V.V. *In vivo* photothermal flow cytometry: Imaging and detection of individual cells in blood and lymph flow // *J. Cell Biochem.* 2006. V. 97, № 5. P. 916–930.
962. Tamaki E., Sato K., Tokeshi M., Aihara M., Kitamori T. Single-cell analysis via scanning thermal lens microscope with a microchip: Direct monitoring of cytochrome c distribution during apoptosis process // *Anal. Chem.* 2002. V. 74. P. 1560–1564.
963. Lapotko D., Kuchinsky G., Potapnev M., Pechkovsky D. Photothermal image cytometry of human neutrophils // *Cytometry.* 1996. V. 24. P. 198–203.
964. Zharov V.P., Galitovskiy V., Lyle C.S., Chambers T.C. Super high-sensitive photothermal monitoring of individual cell response to antitumor drug // *J. Biomed. Opt.* 2006. V. 11. P. 064034.
965. Zharov V.P., Lapotko D.O. Photothermal imaging of nanoparticles and cells // *IEEE JSTQE* 2005. V. 11, № 4. P. 733–751.

966. *Lapotko D. O., Romanovskaya T. R., Shnip A., Zharov V. P.* Photothermal time-resolved imaging of living cells // *Lasers Surg. Med.* 2002. V. 31. P. 53–63.
967. *Zharov V. P., Galanzha E. I., Ferguson S., Tuchin V. V.* Confocal photothermal flow cytometry *in vivo* // *Proc. SPIE.* 2005. V. 5697. P. 167–176.
968. *Galanzha E. I., Shashkov E. V., Tuchin V. V., Zharov V. P.* *In vivo* multispectral, multiparameter, photoacoustic lymph flow cytometry with natural cell focusing, label-free detection and multicolor nanoparticle // *Cytometry.* 2008. V. A73. P. 884–894.
969. *Zharov V. P., Galanzha E. I., Tuchin V. V.* Photothermal flow cytometry *in vivo* for detection and imaging of individual moving cells // *Cytometry A.* 2007. V. 71A. P. 191–206.
970. *Galanzha E. I., Tuchin V. V., Zharov V. P.* *In vivo* integrated flow image cytometry and lymph/blood vessels dynamic microscopy // *J. Biomed. Opt.* 2005. V. 10. P. 54018-1–8.
971. *Zharov V. P., Kim J.-W., Everts M., Curiel D. T.* Self-assembling nanoclusters in living systems: Application for integrated photothermal nanodiagnostics and nanotherapy (review) // *Nanomedicine.* 2005. V. 1. P. 326–345.
972. *Tuchin V. V., Galanzha E. I., Zharov V. P.* *In vivo* image flow cytometry // *Advanced Optical Cytometry: Methods and Disease Diagnoses* / Ed. by V. V. Tuchin. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011. P. 387–433.
973. *Galanzha E. I., Tuchin V. V., Zharov V. P.* Advances in small animal mesentery models for *in vivo* flow cytometry, dynamic microscopy, and drug screening (invited review) // *World J. Gastroenterology.* 2007. V. 13, № 2. P. 198–224.
974. *Wang L., Zhao X.* Ultrasound-modulated optical tomography of absorbing objects buried in dense tissue-simulating turbid media // *Appl. Opt.* 1997. V. 36, № 28. P. 7277–7282.
975. *Wang L.* Ultrasonic modulation of scattered light in turbid media and a potential novel tomography in biomedicine // *Photochem. Photobiol.* 1998. V. 67, № 1. P. 41–49.
976. *Wang L. V., Ku G.* Frequency-swept ultrasound-modulated optical tomography of scattering media // *Opt. Lett.* 1998. V. 23, № 12. P. 975–977.
977. *Selb J., Lévesque-Fort S., Dubois A., Forget B. C., Pottier L., Ramaz F., Boccara C.* Ultrasonically modulated optical imaging // *Biomedical Photonics Handbook* / Ed. by T. Vo-Dinh. Boca Raton: CRC Press, 2003. P. 35-1–12.
978. *Kempe M., Larionov M., Zaslavsky D., Genack A. Z.* Acousto-optic tomography with multiply scattered light // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1997. V. 14, № 5. P. 1151–1158.
979. *Wang L.-H. V.* Mechanisms of ultrasonic modulation of multiply scattered coherent light: an analytical mode // *Phys. Rev. Lett.* 2001. V. 8704. P. 3903-1–4.
980. *Соловьев А. П., Перченко М. И., Синичкин Ю. П., Зюрюкина О. В.* Особенности регистрации сигнала при акустооптической визуализации рассеивающих сред // *Ж. технич. физ.* 2002. Т. 72, № 6. С. 64–70.
981. *Соловьев А. П., Перченко М. И., Зюрюкина О. В.* Особенности акустооптической визуализации в рассеивающих средах в случае регистрации небаллистического света // *Опт. спектр.* 2006. Т. 101, № 2. С. 333–340.
982. *Gore J. P., Xu L. X.* Thermal imaging for biological and medical diagnostics // *Biomedical Photonics Handbook* / Ed. by T. Vo-Dinh. Boca Rotan, Florida: CRC Press, 2003. P. 17-1–12.
983. *McKenzie A. L.* Physics of thermal processes in laser-tissue interaction // *Phys. Med. Biol.* 1990. V. 35. P. 1175–1209.
984. *Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue* / Ed. by A. J. Welch, M. J. C. van Gemert. N. Y.: Plenum Press, 1995.
985. *Wright C. H. G., Barrett S. F., Welch A. J.* Laser-tissue interaction // *Lasers in Medicine* / Ed. by D. R. Vij, K. Mahesh. Boston, Dordrecht. London: Kluwer Academic Publishers, 2002.
986. *Weinbaum S., Jiji L. M.* A new simplified bioheat equation for the effect of blood flow on local average tissue temperature // *J. Biomech. Eng.* 1985. V. 107. P. 131–139.
987. *Cui Z. F., Barbenel J. C.* The influence of model parameter values on the prediction of skin surface temperature: I. resting and surface insulation // *Phys. Med. Biol.* 1990. V. 35. P. 1683–1697.

988. *Nitzan M., Khanokh B.* Infrared radiometry of thermally insulated skin for the assessment of skin blood flow // *Opt. Eng.* 1994. V. 33. P. 2953–2957.
989. *Wang L. V., Shen Q.* Sonoluminescent tomography of strongly scattering media // *Opt. Lett.* 1998. V. 23, № 7. P. 561–563.
990. *Shen Q., Wang L. V.* Two-dimensional imaging of dense tissue-simulating turbid media by use of sonoluminescence // *Appl. Opt.* 1999. V. 38, № 1. P. 246–252.
991. *Khalil O.* Non-invasive glucose measurement technologies: an update from 1999 to the dawn of the new millennium // *Diabetes Technol. Ther.* 2004. V. 6, № 5. P. 660–697.
992. *Quan K. M., Christison G. B., MacKenzie H. A., Hodgson P.* Glucose determination by a pulsed photoacoustic technique: an experimental study using a gelatin-based tissue phantom // *Phys. Med. Biol.* 1993. V. 38. P. 1911–1922.
993. *MacKenzie H. A., Ashton H. S., Spiers S., Shen Y., Freeborn S. S., Hannigan J., Lindberg J., Rae P.* Advances in photoacoustic noninvasive glucose testing // *Clin. Chem.* 1999. V. 45. P. 1587–1595.
994. *Bednov A. A., Karabutov A. A., Savateeva E. V., March W. F., Oraevsky A. A.* Monitoring glucose *in vivo* by measuring laser-induced acoustic profiles // *Proc. SPIE.* 2000. V. 3916. P. 9–18.
995. *Bednov A. A., Savateeva E. V., Oraevsky A. A.* Glucose monitoring in whole blood by measuring laser-induced acoustic profiles // *Proc. SPIE.* 2003. V. 4960. P. 21–29.
996. *Zhao Z., Myllylä R.* Photoacoustic blood glucose and skin measurement based on optical scattering effect // *Proc. SPIE.* 2002. V. 4707. P. 153–157.
997. *Kinnunen M., Myllylä R.* Effect of glucose on photoacoustic signals at the wavelength of 1064 and 532 nm in pig blood and Intralipid // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2005. V. 38. P. 2654–2661.
998. *Zhao Z.* Pulsed Photoacoustic Techniques and Glucose Determination in Human Blood and Tissue, Ph.D. Dissertation, Oulu, Finland, University of Oulu, 2002. <http://herkules.oulu.fi/isbn9514266900/index.html>
999. *Myllylä R., Zhao Z., Kinnunen M.* Pulsed photoacoustic techniques and glucose determination in human blood and tissue // *Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues* / Ed. by V. V. Tuchin. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2009. P. 419–455.
1000. *Shen Y., Lu Z., Spiers S., MacKenzie H. A., Ashton H. S., Hannigan J., Freeborn S. S., Lindberg J.* Measurement of the optical absorption coefficient of a liquid by use of a time-resolved photoacoustic technique // *Appl. Opt.* 2000. V. 39. P. 4007–4012.
1001. *Klonoff D. C., Braig J. R., Sterling B. B., Kramer C., Goldberger D. S., Trebino Y.* Mid-infrared spectroscopy for non-invasive blood glucose monitoring // *IEEE Laser Electro-Opt. Soc. Newslett.* 1998. V. 12. P. 13–14.
1002. *Zheng P., Kramer C. E., Barnes C. W., Braig J. R., Sterling B. B.* Noninvasive glucose determination by oscillating thermal gradient spectrometry // *Diabetes Technol. Ther.* 2000. V. 2. P. 17–25.
1003. *Malchoff C. D., Shoukri K., Landau J. I., Buchert J. M.* A novel noninvasive blood glucose monitor // *Diabetes Care.* 2002. V. 25. P. 2268–2275.
1004. *Esenaliev R. O., Petrov Y. Y., Hartrumpf O., Deyo D. J., Prough D. S.* Continuous, noninvasive monitoring of total hemoglobin concentration by an optoacoustic technique // *Appl. Opt.* 2004. V. 43. P. 3401–3407.
1005. *Petrova I., Esenaliev R. O., Petrov Y. Y., Brecht H.-P. F., Svendsen C. H., Olsson J., Deyo D. J., Prough D. S.* Optoacoustic monitoring of blood hemoglobin concentration: A pilot clinical study // *Opt. Lett.* 2005. V. 30. P. 1677–1679.
1006. *Esenaliev R. O., Larin K. V., Larina I. V., Motamedi M.* Noninvasive monitoring of glucose concentration with optical coherent tomography // *Opt. Lett.* 2001. V. 26, № 13. P. 992–994.
1007. *Larin K. V., Eledrisi M. S., Motamedi M., Esenaliev R. O.* Noninvasive blood glucose monitoring with optical coherence tomography: a pilot study in human subjects // *Diabetes Care.* 2002. V. 25, № 12. P. 2263–2267.

1008. *Larin K. V., Motamedi M., Ashitkov T. V., Esenaliev R. O.* Specificity of noninvasive blood glucose sensing using optical coherence tomography technique: a pilot study // *Phys. Med. Biol.* 2003. V. 48. P. 1371–1390.
1009. *Zhestkov D. M., Bashkatov A. N., Genina E. A., Tuchin V. V.* Influence of clearing solutions osmolarity on the optical properties of RBC // *Proc. SPIE.* 2004. V. 5474. P. 321–330.
1010. *Башкатов А. Н., Жестков Д. М., Генина Э. А., Тучин В. В.* Иммерсионное просветление крови человека в видимом и ближнем ИК спектральных диапазонах // *Опт. спектр.* 2005. Т. 98, № 4. С. 695–703.
1011. *Petrov Y. Y., Petrova I. Y., Patrikeev I. A., Esenaliev R. O., Prough D. S.* Multiwavelength optoacoustic system for noninvasive monitoring of cerebral venous oxygenation: a pilot clinical test in the internal jugular vein // *Opt. Lett.* 2006. V. 31. P. 1827–1829.
1012. *Brecht H. P., Prough D. S., Petrov Y. Y., Patrikeev I., Petrova I. Y., Deyo D. J., Cicenaitė I., Esenaliev R. O.* *In vivo* monitoring of blood oxygenation in large veins with a triple-wavelength optoacoustic system // *Opt. Express.* 2007. V. 15, № 24. P. 16261–16269.
1013. *Patrikeev I., Petrov Y. Y., Petrova I. Y., Prough D. S., Esenaliev R. O.* Monte Carlo modeling of optoacoustic signals from human internal jugular veins // *Appl. Opt.* 2007. V. 46, № 21. P. 4820–4827.
1014. *Petrova I. Y., Petrov Y. Y., Esenaliev R. O., Deyo D. J., Cicenaitė I., Prough D. S.* Noninvasive monitoring of cerebral blood oxygenation in ovine superior sagittal sinus with novel multi-wavelength optoacoustic system // *Opt. Express.* 2009. V. 17, № 9. P. 7285–7294.
1015. *Petrov I. Y., Petrov Y. Y., Prough D. S., Deyo D. J., Cicenaitė I., Esenaliev R. O.* Optoacoustic monitoring of cerebral venous blood oxygenation through extracerebral blood // *Biomed. Opt. Express.* 2012. V. 3, № 1. P. 125–136.
1016. *Petrov I. Y., Petrov Y., Prough D. S., Cicenaitė I., Deyo D. J., Esenaliev R. O.* Optoacoustic monitoring of cerebral venous blood oxygenation through intact scalp in large animals // *Opt. Express.* 2012. V. 20, № 4. P. 4159–4167.
1017. *Saha R. K., Karmakar S., Hysi E., Roy M., Kolios M. C.* Validity of a theoretical model to examine blood oxygenation dependent optoacoustics // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17, № 5. P. 055002-1–10.
1018. *Ray A., Rajian J. R., Lee Y.-E. K., Wang X., Kopelman R.* Lifetime-based photoacoustic oxygen sensing *in vivo* // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17, № 5. P. 057004-1–4.
1019. *Shah J., Park S., Aglyamov S., Larson T., Ma L., Sokolov K., Johnston K., Milner T., Emelianov S. Y.* Photoacoustic imaging and temperature measurement for photothermal cancer therapy // *J. Biomed. Opt.* 2008. V. 13, № 3. P. 034024.
1020. *Pramanik M., Wang L. V.* Thermoacoustic and photoacoustic sensing of temperature // *J. Biomed. Opt.* 2009. V. 14. P. 054024.
1021. *Никитин С. М., Хохлова Т. Д., Пеливанов И. М.* Измерение температурной зависимости эффективности оптико-акустического преобразования в биотканях *in vitro* // *Квант. электроника.* 2012. Т. 42, № 3. С. 269–278.
1022. *Nikitin S. M., Khokhlova T. D., Pelivanov I. M.* Temperature dependence of the optoacoustic transformation efficiency in *ex vivo* tissues for application in monitoring thermal therapies // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17. P. 061214-1–9.
1023. *Yanina I. Yu., Bochko V. A., Alander J. T., Tuchin V. V.* Optical image analysis of fat cells for indocyanine green mediated near-infrared laser treatment // *Laser Phys. Lett.* 2011. V. 8, № 9. P. 684–690.
1024. *Ларин К. В., Ларина И. В., Мотамеди М., Есеналиев Р. О.* Мониторинг охлаждения и замораживания ткани с помощью лазерного оптико-акустического метода // *Квантовая электроника.* 2002. Т. 32, № 11. С. 953–958.
1025. *Srinivasan R., Dyer P. E., Braren B.* Far-ultraviolet laser ablation of the cornea: photoacoustic studies // *Lasers Surg. Med.* 1987. V. 6, № 4. P. 514–519.
1026. *Galanzha E. I., Shashkov E. V., Spring P., Suen J. Y., Zharov V. P.* *In vivo*, noninvasive, label-free detection and eradication of circulating metastatic melanoma cells using two-color photoacoustic flow cytometry with a diode laser // *Cancer Res.* 2009. V. 69. P. 7926–7934.

1027. Zharov V., Galanzha E., Shashkov E., Khlebtsov N., Tuchin V. *In vivo* photoacoustic flow cytometry for monitoring circulating cells and contrast agents // *Opt. Lett.* 2006. V. 31. P. 3623–3625.
1028. Eghtedari M., Oraevsky A., Copland J. A., Kotov N. A., Conjusteau A., Motamedi M. High sensitivity of *in vivo* detection of gold nanorods using a laser optoacoustic imaging system // *Nano Lett.* 2007. V. 7. P. 1914–1918.
1029. Zharov V. P., Galanzha E. I., Shashkov E. V., Kim J.-W., Khlebtsov N. G., Tuchin V. V. Photoacoustic flow cytometry: principle and application for real-time detection of circulating single nanoparticles, pathogens, and contrast dyes *in vivo* // *J. Biomed. Opt.* 2007. V. 12, № 5. P. 051503-1–14.
1030. Shashkov E. V., Everts M., Galanzha E. I., Zharov V. P. Quantum dots as multimodal photoacoustic and photothermal contrast agents // *Nano Lett.* 2008. V. 8. P. 3953–3958.
1031. Kim J.-W., Galanzha E. I., Shashkov E. V., Moon H.-M., Zharov V. P. Golden carbon nanotubes as multimodal photoacoustic and photothermal high-contrast molecular agents // *Nature Nanotechnol.* 2009. V. 4, № 10. 688–694.
1032. Galanzha E. I., Shashkov E. V., Kelly T., Kim J. W., Yang L., Zharov V. P. *In vivo* magnetic enrichment and multiplex photoacoustic detection of circulating tumour cells // *Nature Nanotechnol.* 2009. V. 4. P. 855–860.
1033. Galanzha E. I., Kokoska M. S., Shashkov E. V., Kim J.-W., Tuchin V. V., Zharov V. P. *In vivo* fiber photoacoustic detection and photothermal purging of metastasis targeted by nanoparticles in sentinel lymph nodes at single cell level // *J. Biophoton.* 2009. V. 2. P. 528–539.
1034. Song K. H., Kim C., Cogley C. M., Xia Y., Wang L. V. Near-infrared gold nanocages as a new class of tracers for photoacoustic sentinel lymph node mapping on a rat model // *Nano Lett.* 2009. V. 9. P. 183–188.
1035. Song K. H., Kim C., Maslov K., Wang L. V. Noninvasive *in vivo* spectroscopic nanorod-contrast photoacoustic mapping of sentinel lymph nodes // *Eur. J. Radiol.* 2009. V. 70. P. 227–231.
1036. Yavuz M. S., Cheng Y., Chen J., Cogley C. M., Zang Q., Rycenga M., Xie J., Kim C., Song K. H., Schwartz A. G., Wang L. V., Xia Y. Gold nanocages covered by smart polymers for controlled release with near-infrared light // *Nature Materials.* 2009. V. 8. P. 935–939.
1037. Mallidi S., Larson T., Tam J., Joshi P. P., Karpiouk A., Sokolov K., Emelianov S. Multi-wavelength photoacoustic imaging and plasmon resonance coupling of gold nanoparticles for selective detection of cancer // *Nano Lett.* 2009. V. 9. P. 2825–2831.
1038. Didychuk C. L., Ephrat P., Chamson-Reig A., Jacques S. L., Carson J. J. L. Depth of photothermal conversion of gold nanorods embedded in a tissue-like phantom // *Nanotechnology.* 2009. V. 20. P. 195102.
1039. De La Zerda A., Zavaleta C., Keren S., Vaithilingam S., Bodapati S., Liu Z., Levi J., Smith T. J., Ma B. R., Oralkan O., Cheng Z., Chen X., Dai H., Khuri-Yakub B. T., Gambhir S. S. Carbon nanotubes as photoacoustic molecular imaging agents in living mice // *Nature Nanotechnol.* 2008. V. 3. P. 557–562.
1040. De La Zerda A., Liu Z., Bodapati S., Teed R., Vaithilingam S., Khuri-Yakub B. T., Chen X., Dai H., Gambhir S. S. Ultrahigh sensitivity carbon nanotube agents for photoacoustic molecular imaging in living mice // *Nano Lett.* 2010. V. 10. P. 2168–2172.
1041. Li Z., Huang P., Zhang X., Lin J., Yang S., Liu B., Gao F., Xi P., Ren Q., Cui D. RGD-conjugated dendrimer-modified gold nanorods for *in vivo* tumor targeting and photothermal therapy // *Mol. Pharmacol.* 2010. V. 7. P. 94–104.
1042. Lu W., Huang Q., Ku G., Wen X., Zhou M., Guzatov D., Brecht P., Su R., Oraevsky A., Wang L. V. Photoacoustic imaging of living mouse brain vasculature using hollow gold nanospheres // *Biomaterials.* 2010. V. 31. P. 2617–2626.
1043. Kim C., Cho E. C., Chen J., Song K. H., Au L., Favazza C., Zhang Q., Cogley C. M., Gao F., Xia Y., Wang L. V. *In vivo* molecular photoacoustic tomography of melanomas targeted by bioconjugated gold nanocages // *ACS Nano.* 2010. V. 4. P. 4559–4564.

1044. Wang C., Chen J., Talavage T., Irudayaraj J. Gold nanorod / Fe₃O₄ nanoparticle «nano-pearl-necklaces» for simultaneous targeting, dual-mode imaging, and photothermal ablation of cancer cells // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009. V. 48. P. 2759–2763.
1045. Jung Y., Guan G., Wei C.-w., Reif R., Gao X., O'Donnell M., Wang R. K. Multifunctional nanoprobe to enhance the utility of optical based imaging techniques // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17, № 1. P. 016015-1–6.
1046. Taruttis A., Herzog E., Razansky D., Ntziachristos V. Real-time imaging of cardiovascular dynamics and circulating gold nanorods with multispectral optoacoustic tomography // *Opt. Express.* 2010. V. 18. P. 19592–19602.
1047. Taruttis A., Claussen J., Razansky D., Ntziachristos V. Motion clustering for deblurring multispectral optoacoustic tomography images of the mouse heart // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17, № 1. P. 016009-1–4.
1048. Xia J., Chatni M. R., Maslov K., Guo Z., Wang K., Anastasio M., Wang L. V. Whole-body ring-shaped confocal photoacoustic computed tomography of small animals *in vivo* // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17, № 5. P. 050506-1–3.
1049. Zhang C., Maslov K., Hu S., Chen R., Zhou Q., Shung K. K., Wang L. V. Reflection-mode submicron-resolution *in vivo* photoacoustic microscopy // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17, № 2. P. 020501-1–3.
1050. Yao D.-K., Chen R., Maslov K., Zhou Q., Wang L. V. Optimal ultraviolet wavelength for *in vivo* photoacoustic imaging of cell nuclei // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17, № 5. P. 056004-1–7.
1051. Ke H., Erpelding T. N., Jankovic L., Liu C., Wang L. V. Performance characterization of an integrated ultrasound, photoacoustic, and thermoacoustic imaging system // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17, № 5. P. 056010-1–6.
1052. Laufer J., Johnson P., Zhang E., Treeby B., Cox B., Pedley B., Beard P. *In vivo* preclinical photoacoustic imaging of tumor vasculature development and therapy // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17, № 5. P. 056016-1–8.
1053. Hu S., Rao B., Maslov K., Wang L. V. Label-free photoacoustic ophthalmic angiography // *Opt. Lett.* 2010. V. 35. P. 1–3.
1054. Jiao S., Jiang M., Hu J., Fawzi A., Zhou Q., Shung K. K., Puliafito C. A., Zhang H. F. Photoacoustic ophthalmoscopy for *in vivo* retinal imaging // *Opt. Express.* 2010. V. 18. P. 3967–3972.
1055. Su J. L., Bouchard R. R., Karpouk A. B., Hazle J. D., Emelianov S. Y. Photoacoustic imaging of prostate brachytherapy seeds // *Biomed. Opt. Express.* 2011. V. 2, № 8. P. 2243–2254.
1056. Yeh C., Hu S., Maslov K., Wang L. V. Photoacoustic microscopy of blood pulse wave // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17. 070504.
1057. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, 1986; *Lakowicz J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy.* 2nd ed., N. Y.: Kluwer Academic/Plenum Publ., 1999; 3rd ed., N. Y.: Springer, 2006.
1058. Шнекенбургер Г., Штайнер Р., Штраус В., Шайлер Р. Флуоресцентные технологии в биомедицинской диагностике // *Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 2* / Под ред. В. В. Тучина. М.: Физматлит, 2007. С. 155–194.
1059. Синичкин Ю. П., Коллиас Н., Зониос Г., Утц С. Р., Тучин В. В. Отражательная и флуоресцентная спектроскопия кожи человека *in vivo* // *Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 2* / Под ред. В. В. Тучина. М.: Физматлит, 2007. С. 77–124.
1060. Slavik J. *Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes*, Plenum, N. Y.. London, 1996.
1061. Синичкин Ю. П., Утц С. Р. *In vivo* отражательная и флуоресцентная спектроскопия. Саратов: Изд-во Саратовск. ун-та, 2001.
1062. Синичкин Ю. П., Долотов Л. Е., Зимняков Д. А., Тучин В. В., Утц С. Р. Специальный практикум по оптической биофизике. *In vivo* отражательная и флуоресцентная спектроскопия кожи человек / Учебное пособие для студентов вузов. Саратов: Изд-во Саратовск. ун-та, 2003.

1063. *Wessels J. T., Busse A. C., Mahrt J., Dullin C., Grabbe E., Müller G. A.* *In vivo* imaging in experimental preclinical tumor research — a review // *Cytometry A*. 2007. V. 71. P. 542–549.
1064. *Svanberg S.* New developments in laser medicine // *Phys. Scripta*. 1997. V. 72. P. 69–75.
1065. *Richards-Kortum R. R., Rava R. P., Petras R. E., Fitzmaurice M., Sivak M., Feld M. S.* Spectroscopic diagnosis of colonic dysplasia // *Photochem. Photobiol.* 1991. V. 53. P. 777–786.
1066. *Sterenborg H. J. C. M., Motamedi M., Wagner R. F., Dovic J. R. M., Thomsen S., Jacques S. L.* *In vivo* fluorescence spectroscopy and imaging of human skin tumours // *Lasers Med. Sci.* 1994. V. 9. P. 191–201.
1067. *Zeng H., MacAulay C. E., McLean D. I., Palcic B.* Spectroscopic and microscopic characteristics of human skin autofluorescence emission // *Photochem. Photobiol.* 1995. V. 61, № 6. P. 639–645.
1068. *Sinichkin Yu. P., Utz S. R., Mavlutov A. H., Pilipenko H. A.* *In vivo* fluorescence spectroscopy of the human skin: experiments and models // *J. Biomed. Opt.* 1998. V. 3. P. 201–211.
1069. *Drezek R., Sokolov K., Utzinger U., Boiko I., Malpica A., Follen M., Richards-Kortum R.* Understanding the contributions of NADH and collagen to cervical tissue fluorescence spectra: modeling, measurements, and implications // *J. Biomed. Opt.* 2001. V. 6, № 4. P. 385–396.
1070. *Lucchina L. C., Kollias N., Gillies R., Phillips S. B., Muccini J. A., Stiller M. J., Trancik R. J., Drake L. A.* Fluorescence photography in the evaluation of acne // *J. Am. Acad. Dermatol.* 1996. V. 35. P. 58–63.
1071. *Soukos N. S., Som S., Abernethy A. D., Ruggiero K., Dunham J., Lee C., Doukas A. G., Goodson J. M.* Phototargeting oral black-pigmented bacteria // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. V. 49. P. 1391–1396.
1072. *Czaika V., Alborova A., Sterry W., Lademann J., Koch S.* Application of laser scan microscopy *in vivo* for wound healing characterization // *Laser Phys. Lett.* 2010. V. 7, № 9. P. 685–692.
1073. *Patzelt A., Sterry W., Lademann J.* *In vivo* measurements of skin barrier: comparison of different methods and advantages of laser scanning microscopy // *Laser Phys. Lett.* 2010. V. 7, № 12. P. 843–852.
1074. *Gonchukov S., Biryukova T., Sukhinina A., Vdovin Yu.* Fluorescence detection of dental calculus // *Laser Phys. Lett.* 2010. V. 7, № 11. P. 812–816.
1075. *Бахмутов Д. Н., Гончуков С. А., Харченко О. Н., Никифорова О. А.* Флюоресцентная диагностика стоматологических заболеваний // *Медицинская физика*. 2006. № 1. С. 62–67.
1076. *Kask P., Palo K., Fay N., Brand L., Mets U., Ullmann D., Jungmann J., Pschorr J., Gall K.* Two-dimensional fluorescence intensity distribution analysis: Theory and applications // *Biophys. J.* 2000. V. 78. P. 1703–1713.
1077. *Hyde D. E., Farrell T. J., Patterson M. S., Wilson B. C.* A diffusion theory model of spatially resolved fluorescence from depth-dependent fluorophore concentrations // *Phys. Med. Biol.* 2001. V. 46. P. 369–383.
1078. *Sokolov K., Galvan J., Myakov A., Lacy A., Lotan R., Richards-Kortum R.* Realistic three-dimensional epithelial tissue phantoms for biomedical optics // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, № 1. P. 148–156.
1079. *Eppstein M. J., Hawrysz D. J., Godavarty A., Sevick-Muraca E. M.* Three-dimensional, bayesian image reconstruction from sparse and noisy data sets: Near-infrared fluorescence tomography // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99, № 15. P. 9619–9624.
1080. *Eidsath A., Chernomordik V., Gandjbakhche A., Smith P., Russo A.* Three-dimensional localization of fluorescent masses deeply embedded in tissue // *Phys. Med. Biol.* 2002. V. 47. P. 4079–4092.
1081. *Biswal N. C., Gupta S., Ghosh N., Pradhan A.* Recovery of turbidity free fluorescence from measured fluorescence: an experimental approach // *Opt. Express*. 2003. V. 11, № 24. P. 3320–3331.

1082. Liu Q., Zhu C., Ramanujam N. Experimental validation of Monte Carlo modeling of fluorescence in tissues in the UV-visible spectrum // *J. Biomed. Opt.* 2003. V. 8, № 2. P. 223–236.
1083. Zhu C., Liu Q., Ramanujam N. Effect of fiber optic probe geometry on depth-resolved fluorescence measurements from epithelial tissues: a Monte Carlo simulation // *J. Biomed. Opt.* 2003. V. 8, № 2. P. 237–247.
1084. Katika K. M., Pilon L. Steady-state directional diffuse reflectance and fluorescence of human skin // *Appl. Opt.* 2006. V. 45, № 17. P. 4174–4183.
1085. Schneckenburger H., Gschwend M. H., Sailer R., Mock H.-P., Strauss W. S. L. Time-gated fluorescence microscopy in molecular and cellular biology // *Cell. Mol. Biol.* 1998. V. 44. P. 795–805.
1086. Abugo O. O., Herman P., Lakowicz J. R. Fluorescence properties of albumin blue 633 and 670 in plasma and whole blood // *J. Biomed. Opt.* 2001. V. 6, № 3. P. 359–365.
1087. Budaj J. E., Achilefu S., Dorshow R. B., Rajagopalan R. Novel fluorescent contrast agents for optical imaging of *in vivo* tumors based on a receptor-targeted dye-peptide conjugate platform // *J. Biomed. Opt.* 2001. V. 6, № 2. P. 122–133.
1088. Suhling K., Siegel J., Phillips D., French P. M. W., Leveque-Fort S., Webb S. E. D., Davis D. M. Imaging the environment of green fluorescent protein // *Biophys. J.* 2002. V. 83. P. 3589–3595.
1089. Gannot I., Garashi A., Gannot G., Chernomordik V., Gandjbakhche A. *In vivo* quantitative three-dimensional localization of tumor labeled with exogenous specific fluorescence markers // *Appl. Opt.* 2003. V. 42, № 16. P. 3073–3080.
1090. Зубова Н. Н., Булавина А. Ю., Савицкий А. П. Спектральные и физико-химические свойства зеленого (GFP) и красного (drFP583) флуоресцирующих белков // *Успехи биологической химии.* 2003. Т. 43. С. 163–224.
1091. Rusanov A. L., Savitsky A. P. Fluorescence resonance energy transfer between fluorescent proteins as powerful toolkits for *in vivo* studies // *Laser Phys. Lett.* 2011. V. 8, № 2. P. 91–102.
1092. Chudakov D. M., Matz M. V., Lukyanov S., Lukyanov K. A. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues // *Physiol. Rev.* 2010. V. 90. P. 1103–1163.
1093. Shcherbo D. S., Shemiakina I. I., Ryabova A. V., Luker K. E., Schmidt B. T., Souslova E. A., Gorodnichenova T. V., Strukova L., Shidlovskiy K. M., Britanova O. V., Zaraisky A. G., Lukyanov K. A., Loschenov V. B., Luker G. D., Chudakov D. M. Near-infrared fluorescent proteins // *Nature Methods.* 2010. V. 7. P. 827–829.
1094. Vasilchenko S. Yu., Volkova A. I., Ryabova A. V., Loschenov V. B., Konov V. I., Mamedov A. A., Kuzmin S. G., Lukyanets E. A. Application of aluminum phthalocyanine nanoparticles for fluorescent diagnostics in dentistry and skin autotransplantation // *J. Biophoton.* 2010. V. 3, № 5–6. P. 336–346.
1095. Khlebtsov B., Panfilova E., Khanadeev V., Bibikova O., Terentyuk G., Ivanov A., Rumyantseva V., Shilov I., Ryabova A., Loshchenov V., Khlebtsov N. Nanocomposites containing silica-coated gold-silver nanocages and Yb-2,4-Dimethoxyhematoporphyrin: Multifunctional capability of IR-luminescence detection, photosensitization, and photothermolysis // *ACS Nano.* 2011. V. 5, № 9. P. 7077–7089.
1096. Khlebtsov B. N., Tuchina E. S., Khanadeev V. A., Panfilova E. V., Petrov P. O., Tuchin V. V., Khlebtsov N. G. Enhanced photoinactivation of *Staphylococcus aureus* with nanocomposites containing plasmonic particles and hematoporphyrin // *J. Biophoton.* 2012. V. 5; doi: 10.1002/jbio.201200079.
1097. Beharry A. A., Woolley G. A. Photoswitches in Laser Imaging and Manipulation in Cell Biology / Ed. by F. S. Pavone. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010. P. 83–97.
1098. Zhu M.-Q., Zhang G.-F., Li C., Li Y.-J., Aldred M. P., Li A. D. Q. Photoswitchable nanofluorophores for innovative bioimaging // *J. Innov. Opt. Health Sci.* 2011. V. 4, № 4. P. 395–408.

1099. Hattery D., Chernomordik V., Loew M., Gannot I., Gandjbakhche A. Analytical solutions for time-resolved fluorescence lifetime imaging in a turbid medium such as tissue // *J. Opt. Soc. Am. A*. 2001. V. 18, № 7. P. 1523–1530.
1100. Sadoqi M., Riseborough P., Kumar S. Analytical models for time resolved fluorescence spectroscopy in tissues // *Phys. Med. Biol.* 2001. V. 46. P. 2725–2743.
1101. Kuwana E., Sevick-Muraca E. M. Fluorescence lifetime spectroscopy in multiply scattering media with dyes exhibiting multiexponential decay kinetics // *Biophys. J.* 2002. V. 83. P. 1165–1176.
1102. Thompson A. J., Coda S., Sørensen M. B., Kennedy G., Patalay R., Waitong-Brämning U., De Beule P. A. A., Neil M. A. A., Andersson-Engels S., Bendsøe N., French P. M. W., Svanberg K., Dunsby C. *In vivo* measurements of diffuse reflectance and time-resolved autofluorescence emission spectra of basal cell carcinomas // *J. Biophoton.* 2012. V. 5. P. 1–15; doi: 10.1002/jbio.201100126.
1103. Betz C. S., Mehlmann M., Rick K., Stepp H., Grevers G., Baumgartner R., Leunig A. Autofluorescence imaging and spectroscopy of normal and malignant mucosa in patients with head and neck cancer // *Lasers Surg. Med.* 1999. V. 25. P. 323–334.
1104. Anastassopoulou N., Arapoglou B., Demakakos P., Makropoulou M. I., Paphiti A., Serafeitinides A. A. Spectroscopic characterisation of carotid atherosclerotic plaque by laser induced fluorescence // *Lasers Surg. Med.* 2001. V. 28. P. 67–73.
1105. Chang S. K., Dawood M. Y., Staerke G., Utzinger U., Atkinson E. N., Richards-Kortum R. R., Follen M. Fluorescence spectroscopy for cervical precancer detection: is there variance across the menstrual cycle? // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, № 4. P. 595–602.
1106. Hage R., Galhanone P. R., Zangaro R. A., Rodrigues K. C., Pacheco M. T. T., Martin A. A., Netto M. M., Soares F. A., da Cunha I. W. Using the laser-induced fluorescence spectroscopy in the differentiation between normal and neoplastic human breast tissue // *Lasers Med. Sci.* 2003. V. 18. P. 171–176.
1107. Andersson-Engels S., Canti G., Cubeddu R., Eker C., Klinteberg C., Pifferi A., Svanberg K., Svanberg S., Taroni P., Valentini G., Wang I. Preliminary evaluation of two fluorescence imaging methods for the detection and the delineation of basal cell carcinomas of the skin // *Lasers Surg. Med.* 2000. V. 26. P. 76–82.
1108. Wu T., Qu J. Y., Cheung T.-H., Lo K. W.-K., Yu M.-Y. Preliminary study of detecting neoplastic growths *in vivo* with real time calibrated autofluorescence imaging // *Opt. Express.* 2003. V. 11, № 4. P. 291–298.
1109. Rovati L., Docchio F. Autofluorescence methods in ophthalmology // *J. Biomed. Opt.* 2004. V. 9, № 1. P. 9–21.
1110. Peng T., Xie H., Ding Y., Wang W., Li Z., Jin D., Tang Y., Ren Q., Xi P. CRAFT: Multimodality confocal skin imaging for early cancer diagnosis // *J. Biophoton.* 2012. V. 5. P. 469–476.
1111. Thong P. S. P., Tandjung S. S., Movania M. M., Chiew W. M., Olivo M., Bhuvanewari R., Seah H. S., Lin F., Qian K., Soo K. C. Toward real-time virtual biopsy of oral lesions using confocal laser endomicroscopy interfaced with embedded computing // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17. P. 056009.
1112. Wirth D., Snuderl M., Sheth S., Kwon C.-S., Frosch M. P., Curry W., Yaroslavsky A. N. Identifying brain neoplasms using dye-enhanced multimodal confocal imaging // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17, № 2. P. 026012.
1113. Recknagel P., Claus R. A., Neugebauer U., Bauer M., Gonnert F. A. *In vivo* imaging of hepatic excretory function in the rat by fluorescence microscopy // *J. Biophoton.* 2012. V. 5. P. 571–581.
1114. Jelzow A., Wabnitz H., Obrig H., Macdonald R., Steinbrink J. Separation of indocyanine green boluses in the human brain and scalp based on time-resolved *in vivo* fluorescence measurements // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17, № 5. P. 057003-1–4.
1115. Konecky S. D., Owen C. M., Rice T., Valdés P. A., Kolste K., Wilson B. C., Leblond F., Roberts D. W., Paulsen K. D., Tromberg B. J. Spatial frequency domain tomography of

- protoporphyrin IX fluorescence in preclinical glioma models // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17. P. 056008.
1116. *Goergen C. J., Chen H. H., Bogdanov, Jr A., Sosnovik D. E., Kumar A. T. N.* *In vivo* fluorescence lifetime detection of an activatable probe in infarcted myocardium // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17. P. 056001.
1117. *Lin Y., Kwong T. C., Bolisay L., Gulsen G.* Temperature-modulated fluorescence tomography based on both concentration and lifetime contrast // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17. P. 056007-1-4.
1118. *Соколов В. В., Филоненко Е. В., Телегина Л. В., Булгакова Н. Н., Смирнов В. В.* Комбинация флуоресцентного изображения и локальной спектрофотометрии при флуоресцентной диагностике раннего рака гортани и бронхов // *Квантовая электроника.* 2002. Т. 32, № 11. С. 963–969.
1119. *Чиссов В. И., Филоненко Е. В., Решетов И. В., Зайцев А. М., Лошаков В. А., Куржупов М. И., Шелеско А. А., Яникова А. Г., Лощенов В. Б., Франк Г. А., Бобров А. Н.* Интраоперационная флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия у больных с метастатическим поражением головного мозга // *Российский онкологический журнал.* 2011. № 2. P. 4–7.
1120. *Борисова Е., Троянова П., Павлова П., Аврамов Л.* Диагностика пигментированных кожных новообразований методами лазерно-индуцированной автофлуоресцентной и диффузной отражательной спектроскопии // *Квантовая электроника.* 2008. Т. 38, № 6. С. 597–605.
1121. *Isikman S. O., Bishara W., Mudanyali O., Sencan I., Su T.-W., Tseng D. K., Yaglidere O., Sikora U., Ozcan A.* Lensfree on-chip microscopy and tomography for biomedical applications // *IEEE J. Select. Tops. Quant. Electr.* 2012. V. 18, № 3. P. 1059–1072.
1122. *Leppänen O., Ekstrand M., Bräsen J. H., Levin M.* Bioluminescence imaging of energy depletion in vascular pathology: patent ductus arteriosus and atherosclerosis // *J. Biophoton. J. Biophoton.* 2011. V. 4. P. 1–9; doi: 10.1002/jbio.201100096.
1123. *Denk W.* Two-photon excitation in functional biological imaging // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 3. P. 296–304.
1124. *Piston D. W., Masters B. R., Webb W. W.* Three dimensionally resolved NAD(P)H cellular metabolic redox imaging of the *in situ* cornea with two-photon excitation laser scanning microscopy // *J. Microsc.* 1995. V. 178. P. 20–27.
1125. *Berland K. M., So P. T. C., Gratton E.* Two-photon fluorescence correlation spectroscopy: method and application to the intracellular environment // *Biophys. J.* 1995. V. 68. P. 694–701.
1126. *Hell S. W., Bahlmann K., Schrader M. et al.* Three-photon excitation in fluorescence microscopy // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 4. P. 71–74.
1127. *Masters B. R., So P. T. C., Gratton E.* Multi-photon excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of *in vivo* human skin // *Biophys. J.* 1997. V. 72. P. 2405–2412.
1128. *Masters B. R.* Confocal laser scanning microscopy // *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science* / Ed. by V. V. Tuchin. Boston, Kluwer Academic Publishers, 2004. P. 364–415.
1129. *So P. T. C., Dong C. Y., Masters B. R.* Two-photon excitation fluorescence microscopy // *Biomedical Photonics Handbook* / Ed. by T. Vo-Dinh. Boca Rotan, Florida: CRC Press, 2003. P. 11-1–17.
1130. *Zhang Z. X., Sonek G. J., Wei X. B., Sun C., Berns M. W., Tromberg B. J.* Cell viability and DNA denaturation measurements by two-photon fluorescence excitation in CW Al:GaAs diode laser optical traps // *J. Biomed. Opt.* 1999. V. 4, № 2. P. 256–259.
1131. *Bardeen Ch. J., Yakovlev V. V., Squier J. A., Wilson K. R., Carpenter S. D., Weber P. M.* Effect of pulse shape on the efficiency of multiphoton processes: implications for biological microscopy // *J. Biomed. Opt.* 1999. V. 4, № 3. P. 362–367.

1132. *Dunn A.K., Wallace V.P., Coleno M., Berns M.W., Tromberg B.J.* Influence of optical properties on two-photon fluorescence imaging in turbid samples // *Appl. Opt.* 2000. V. 39, № 7. P. 1194–1201.
1133. *Gu M., Bird D., Day D., Fu L., Morrish D.* Femtosecond Biophotonics: Core Technology and Applications. N. Y.: Cambridge University Press, 2010.
1134. *König K., Uchugonova A.* Multiphoton imaging and nanoprocessing of human stem cells // *Laser Imaging and Manipulation in Cell Biology* / Ed. by F.S. Pavone. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010. P. 9–34.
1135. *Nanoscopy and Multidimensional Optical Fluorescence Microscopy* / Ed. by A. Diaspro. Boca Raton: CRC Press, A Chapman & Hall Book, Taylor & Francis Group, 2010.
1136. *Optical Fluorescence Microscopy: from the Spectral to the Nano Dimension* / Ed. by A. Diaspro // Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2011.
1137. *So P. T. C., Dong C. Y., Masters B. R., Berland K. M.* Two-photon excitation fluorescence microscopy // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2000. V. 2, № 1. P. 399–429.
1138. *Gu M., Gan X., Kisteman A., Xu M. G.* Comparison of penetration depth between two-photon excitation and single-photon excitation in imaging through turbid tissue media // *Appl. Phys. Lett.* 2000. V. 77. P. 1551–1553.
1139. *Beaurepaire E., Oheim M., Mertz J.* Ultra-deep two-photon fluorescence excitation in turbid media // *Opt. Commun.* 2001. V. 188. P. 25–29.
1140. *Masters B. R., So P. T. C.* Confocal microscopy and multi-photon excitation microscopy of human skin *in vivo* // *Opt. Express.* 2001. V. 8. P. 2–10.
1141. *König K., Riemann I.* High-resolution multiphoton tomography of human skin with sub-cellular spatial resolution and picosecond time resolution // *J. Biomed. Opt.* 2003. V. 8. P. 432–439.
1142. *Rubart M.* Two-photon microscopy of cells and tissue // *Circulation Res.* 2004. V. 95. P. 1154–1166.
1143. *Diaspro A., Chirico G., Collini M.* Two-photon fluorescence excitation and related techniques in biological microscopy // *Q. Rev. Biophys.* 2005. V. 38, № 2. P. 97–166.
1144. *Makale M., McElroy M., O'Brien P., Hoffman R. M., Guo S., Bouwet M., Barnes L., Inguelli E., Cheres D.* Extended-working-distance multiphoton micromanipulation microscope for deep-penetration imaging in live mice and tissue // *J. Biomed. Opt.* 2009. V. 14. P. 024032.
1145. *Zheng W., Wu Y., Li D., Qu J. Y.* Autofluorescence of epithelial tissue: single-photon versus two-photon excitation // *J. Biomed. Opt.* 2008. V. 13, № 5. P. 054010-1–8.
1146. *Zheng W., Li D., Li S., Zeng Y., Yang Y., Qu J. Y.* Diagnostic value of nonlinear optical signals from collagen matrix in the detection of epithelial precancer // *Opt. Lett.* 2011. V. 36, № 18. P. 3620–3622.
1147. *Zheng W., Li D., Zeng Y., Luo Y., Qu J. Y.* Two-photon excited hemoglobin fluorescence // *Biomed. Opt. Express.* 2011. V. 2, № 1. P. 71–79.
1148. *Li D., Zheng W., Zeng Y., Luo Y., Qu J. Y.* Two-photon excited hemoglobin fluorescence provides contrast mechanism for label-free imaging of microvasculature *in vivo* // *Opt. Lett.* 2011. V. 36, № 6. P. 834–836.
1149. *Li D., Zheng W., Zhang W., Teh S. K., Zeng Y., Luo Y., Qu J. Y.* Time-resolved detection enables standard two-photon fluorescence microscopy for *in vivo* label-free imaging of microvasculature in tissue // *Opt. Lett.* 2011. V. 36, № 14. P. 2638–2640.
1150. *Georgakoudi I., Solban N., Novak J., Rice W. L., Wei X., Hasan T., Lin C. P.* *In vivo* flow cytometry: A new method for enumerating circulating cancer cells // *Cancer Res.* 2004. V. 64. P. 5044–5047.
1151. *Wei X., Sipkins D. A., Pitsillides C. M., Novak J., Georgakoudi I., Lin C. P.* Real-time detection of circulating apoptotic cells by *in vivo* flow cytometry // *Mol. Imaging.* 2005. V. 4. P. 415–416.

1152. Greiner C., Georgakoudi I. Advances in fluorescence-based *in vivo* flow cytometry for cancer applications / Advanced Optical Cytometry: Methods and Disease Diagnoses / Ed. by V. V. Tuchin. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011. P. 463–500.
1153. Olarte O. E., Licea-Rodriguez J., Palero J. A., Gualda E. J., Artigas D., Mayer J., Swoger J., Sharpe J., Rocha-Mendoza I., Rangel-Rojo R., Loza-Alvarez P. Image formation by linear and nonlinear digital scanned light-sheet fluorescence microscopy with Gaussian and Bessel beam profiles // Biomed. Opt. Express. 2012. V. 3, № 7. P. 1492–1505.
1154. Padera T. P., Stoll B. R., So P. T., Jain R. K. Conventional and high-speed intravital multiphoton laser scanning microscopy of microvasculature, lymphatics, and leukocyte-endothelial interactions // Mol. Imaging. 2002. V. 1. P. 9–15.
1155. He W., Wang H., Hartmann L. C., Cheng J. X., Low P. S. *In vivo* quantitation of rare circulating tumor cells by multiphoton intravital flow cytometry // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 11760–11765.
1156. Tkaczyk E. R., Tkaczyk A. H. Review: Multiphoton flow cytometry strategies and applications // Cytometry A. 2011. V. 79, № 10. P. 775–788.
1157. Zvyagin A. V., Zhao X., Gierden A., Sanchez W., Ross J. A., Roberts M. S. Imaging of zinc oxide nanoparticle penetration in human skin *in vitro* and *in vivo* // J. Biomed. Opt. 2008. V. 13, № 6. P. 064031-1–9.
1158. Roberts M. S., Roberts M. J., Robertson T. A., Sanchez W., Thörling C., Zou Y., Zhao X., Becker W., Zvyagin A. V. *In vitro* and *in vivo* imaging of xenobiotic transport in human skin and in the rat liver // J. Biophoton. 2008. V. 1, № 6. P. 478–493.
1159. Song Z., Kelf T. A., Sanchez W. H., Roberts M. S., Ricka J., Frenz M., Zvyagin A. V. Characterization of optical properties of ZnO nanoparticles for quantitative imaging of transdermal transport // Biomed. Opt. Express. 2011. V. 2, № 12. P. 3321–3333.
1160. Darvin M. E., König K., Kellner-Hoefer M., Werncke W., Meinke M., Breunig H. G., Patzelt A., Sterry W., Lademann J. Safety assessment by multiphoton fluorescence/SHG/HRS tomography of ZnO nanoparticles used in cosmetic products // Skin Pharmacol. Physiol. 2012. V. 25. P. 219–226.
1161. Trunina N. A., Popov A. P., Lademann J., Tuchin V. V., Myllylä R., Darvin M. E. Two-photon-excited autofluorescence and second-harmonic generation microscopy for the visualization of penetration of TiO₂ and ZnO nanoparticles into human tooth tissue *ex vivo* // Proc. SPIE. 2012. V. 8427. P. 8427OY-1–6.
1162. Zhang Y., Yu J., Birch D. J. S., Chen Y. Gold nanorods for fluorescence lifetime imaging in biology // J. Biomed. Opt. 2010. V. 15, № 2. P. 020504-1–3.
1163. Perelman L. T., Modell M. D., Vitkin E., Hanlon E. B. Light scattering spectroscopy: From elastic to inelastic. Chapter 12 // Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science. V. 1 / Ed. by V. V. Tuchin. Second edition. Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 2012. P. 437–486.
1164. Tu A. T. Raman Spectroscopy in Biology. N. Y.: John Wiley & Sons Ltd, 1982.
1165. Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials / Ed. by H. U. Gremlich, B. Yan. N. Y.: Marcel Dekker Inc., 2001.
1166. Lucassen G. W., van Veen G. N. A., Jansen J. A. J. Band analysis of hydrated human skin stratum corneum attenuated total reflectance fourier transform infrared spectra *in vivo* // J. Biomed. Opt. 1998. V. 3. P. 267–280.
1167. Puppels G. J. Confocal Raman Microspectroscopy in Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity / Ed. by W. Mason. London: Academic Press, 1999. P. 377–406.
1168. Лукассен Дж. В., Касперс П. Дж., ПANNELС Х. Дж. Спектроскопия инфракрасного поглощения и комбинационного рассеяния кожи человека *in vivo*, в кн. Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 2 / Под ред. В. ВМ. Тучина. М.: Физматлит, 2007. С. 125–154.
1169. Utzinger U., Heintzelman D. L., Mahadevan-Jansen A., Malpica A., Follen M., Richards-Kortum R. Near-infrared Raman spectroscopy for *in vivo* detection of cervical precancers // Appl. Spectrosc. 2001. V. 55. P. 955–959.

1170. *Petry R., Schmitt M., Popp J.* Raman spectroscopy- A prospective tool in the life sciences // *Chemphyschem.* 2003. V. 4. P. 14–30.
1171. *Krafft C., Dietzek B., Schmitt M., Popp J.* Raman and coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy for biomedical applications // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17, № 4. P. 040801-1–15.
1172. *Suhalim J. L., Boik J. C., Tromberg B. J., Potma E. O.* The need for speed // *J. Biophoton.* 2012. V. 5, № 5–6. P. 387–395.
1173. *Schatz C. S., Van Duyne R. P.* Electromagnetic mechanism of surface-enhanced spectroscopy, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy* / Ed. by J. M. Chalmers, P. R. Griffiths. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. 2002. P. 1–16.
1174. *Kneipp K., Haka A. S., Kneipp H., Badizadegan K., Yoshizawa N., Boone C., Shafer-Peltier K. E., Motz J. T., Dasari R. R., Feld M. S.* Surface-enhanced Raman spectroscopy in single living cells using gold nanoparticles // *Appl. Spectrosc.* 2002. V. 56. P. 150–154.
1175. *Kneipp J., Kneipp H., Rice W. L., Kneipp K.* Optical probes for biological applications based on surface-enhanced Raman scattering from indocyanine green on gold nanoparticles // *Anal. Chem.* 2005. V. 77. P. 2381–2385.
1176. *Yaroslavsky I. V., Yaroslavsky A. N., Otto C. et al.* Combined elastic and Raman light scattering of human eye lenses // *Exp. Eye. Res.* 1994. 59. P. 393–400.
1177. *Ярославская А. Н., Ярославский И. В., Отто К., Пуппелс Х. Ж., Дуиндам Х., Френсен Х. Ф. Я. М., Хреве Я., Тучин В. В.* Исследование водного обмена хрусталика глаза человека с помощью конфокальной микроскопии комбинационного рассеяния // *Биофизика.* 1998. Т. 43, № 3. С. 109–114.
1178. *Darvin M. E., Gersonde I., Meinke M., Sterry W., Lademann J.* Non-invasive *in vivo* determination of the carotenoids beta-carotene and lycopene concentrations in the human skin using the Raman spectroscopic method // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2005. V. 38. P. 2696–2700.
1179. *Darvin M. E., Gersonde I., Albrecht H., Sterry W., Lademann J.* *In vivo* Raman spectroscopic analysis of the influence of UV radiation on carotenoid antioxidant substance degradation of the human skin // *Laser Phys.* 2006. V. 16, № 5. P. 833–837.
1180. *Darvin M. E., Gersonde I., Meinke M., Albrecht H., Sterry W., Lademann J.* Non-invasive *in vivo* detection of the carotenoid antioxidant substance lycopene in the human skin using the resonance Raman spectroscopy // *Laser Phys. Lett.* 2006. V. 3, № 9. P. 460–463.
1181. *Darvin M. E., Gersonde I., Albrecht H., Sterry W., Lademann J.* *In vivo* Raman spectroscopic analysis of the influence of IR radiation on the carotenoid antioxidant substances beta-carotene and lycopene in the human skin. Formation of free radicals // *Laser Phys. Lett.* 2007. V. 4, № 4. P. 318–321.
1182. *Darvin M. E., Patzelt A., Knorr F., Blume-Peytavi U., Sterry W., Lademann J.* One-year study on the variation of carotenoid antioxidant substances in the living human skin: influence of dietary supplementation and stress factors // *J. Biomed. Opt.* 2008. V. 13, № 4. P. 044028-1–9.
1183. *Lademann J., Caspers P. J., van der Pol A., Richter H., Patzelt A., Zastrow L., Darvin M., Sterry W., Fluhr J. W.* *In vivo* Raman spectroscopy detects increased epidermal antioxidative potential with topically applied carotenoids // *Laser Phys. Lett.* 2009. V. 6, № 1. P. 76–79.
1184. *Darvin M. E., Sterry W., Lademann J.* Resonance Raman spectroscopy as an effective tool for determination of antioxidative stability of cosmetic formulations // *J. Biophoton.* 2010. V. 3, № 1–2. P. 82–88.
1185. *Skrebova-Eikje N., Ozaki Y., Aizawa K., Arase S.* Fiber optic near-infrared Raman spectroscopy for clinical noninvasive determination of water content in diseased skin and assessment of cutaneous edema // *J. Biomed. Opt.* 2005. V. 10. P. 014013-1–13.
1186. *Bonnier F., Ali S. M., Knief P., Lambkin H., Flynn K., McDonagh V., Healy C., Lee T. C., Lyng F. M., Byrne H. J.* Analysis of human skin tissue by Raman microspectroscopy: Dealing with the background // *Vib. Spectrosc.* 2012. V. 61. P. 124–132.

1187. *Shih W.-C., Bechtel K. L., Feld M. S.* Quantitative biological Raman spectroscopy // Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues / Ed. by V. V. Tuchin. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2009. P. 366–396.
1188. *Rowlands C. J., Varma S., Perkins W., Leach I., Williams H., Notingher I.* Rapid acquisition of Raman spectral maps through minimal sampling: applications in tissue imaging, *J. Biophoton.* 2012. V. 5, № 3. P. 220–229.
1189. *Demers J.-L. H., Davis S. C., Pogue B. W., Morris M. D.* Multi-channel diffuse optical Raman tomography for bone characterization *in vivo*: A phantom study // *Biomed. Opt. Express.* 2012.
1190. *Lednev I. K., Xu M., Shashilov V.* Ultraviolet Raman spectroscopy is uniquely suitable for studying amyloid diseases // *Current Science.* 2009. V. 97, № 2. P. 180–185.
1191. *Kohl M., Essenpreis M., Cope M.* The influence of glucose concentration upon the transport of light in tissue-simulating phantoms // *Phys. Med. Biol.* 1995. V. 40. P. 1267–1287.
1192. *Qu J., Wilson B. C.* Monte Carlo modeling studies of the effect of physiological factors and other analytes on the determination of glucose concentration *in vivo* by near infrared optical absorption and scattering measurements // *J. Biomed. Opt.* 1997. V. 2, № 3. P. 319–325.
1193. *Beck G. C., Akgun N., Rück A., Steiner R.* Developing optimized tissue phantom systems for optical biopsies // *Proc. SPIE.* 1997. V. 3197. P. 76–85.
1194. *Beck G. C., Akgun N., Rück A., Steiner R.* Design and characterization of a tissue phantom system for optical diagnostics // *Lasers Med. Sci.* 1998. V. 13. P. 160–171.
1195. *Royston D. D., Poston R. S., Prahl S. A.* Optical properties of scattering and absorbing materials used in the development of optical phantoms at 1064 nm // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 1. P. 110–123.
1196. *Burmeister J. J., Chung H., Arnold M. A.* Phantoms for noninvasive blood glucose sensing with near infrared transmission spectroscopy // *Photochem. Photobiol.* 1998. V. 67, № 1. P. 50–55.
1197. *Правдин А. Б., Чернова С. П., Паназоглоу Е. Г., Тучин В. В.* Фантомы биотканей // *Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 1* / Под ред. В. В. Тучина. М.: Физматлит, 2007. С. 273–308.
1198. *Groenhuis R. A. J., Ferwerda H. A., ten Bosch J. J.* Scattering and absorption of turbid materials determined from reflection measurements. 1. Theory // *Appl. Opt.* 1983. V. 22. P. 2456–2462.
1199. *Groenhuis R. A. J., ten Bosch J. J., Ferwerda H. A.* Scattering and absorption of turbid materials determined from reflection measurements. 2. Measuring method and calibration // *Appl. Opt.* 1983. V. 22. P. 2463–2467.
1200. *Wagnieres G., Cheng S., Zellweger M., Utke N., Braichotte D., Ballini J., Bergh H.* An optical phantom with tissue-like properties in the visible for use in PDT and fluorescence spectroscopy // *Phys. Med. Biol.* 1997. V. 42. P. 1415–1426.
1201. *Chernova S., Pravdin A., Sinichkin Yu., Kochubey V., Tuchin V., Vari S.* Correlation of fluorescence and reflectance spectra of tissue phantoms with their structure and composition // *Proc. SPIE.* 1999. V. 3598. P. 294–300.
1202. *Chernova S., Kasimov O., Kuznetsova L., Moskalenko T., Pravdin A. B.* *Ex vivo* and phantom fluorescence spectra of human cervical tissue // *Proc. SPIE.* 2000. V. 4001. P. 290–298.
1203. *Chernova S., Pravdin A., Sinichkin Yu., Tuchin V., Vari S.* Layered gel-based phantoms mimicking fluorescence of cervical tissue // *Proc. OWLS V. 2000.* Berlin: Springer. P. 301–306.
1204. *Mendelson Y., Kent J.* An *in vitro* tissue model for evaluating the effect of carboxyhemoglobin concentration on pulse oximetry // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1989. V. 36, № 6. P. 625–627.
1205. *Sankaran V., Walsh J., Maitland D.* Polarized light propagation in biological tissue and tissue phantoms // *Proc. SPIE.* 2000. V. 4001. P. 54–62.

1206. *Pogue B., Lilge L., Patterson M., Wilson B., Hasan T.* Absorbed photodynamic dose from pulsed versus continuous wave light examined with tissue-simulating dosimeters // *Appl. Opt.* 1997. V. 36, № 28. P. 7257–7269.
1207. *Wolf M., Keel M., Dietz V., Siebenthal K., Bucher H., Baenziger O.* The influence of a clear layer on near-infrared spectrophotometry measurements using a liquid neonatal head phantom // *Phys. Med. Biol.* 1999. V. 44. P. 1743–1753.
1208. *Pogue B. W., Patterson M. S.* Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry // *J. Biomed. Opt.* 2006. V. 11, № 4. P. 041102-1–16.
1209. *Hwang J., Ramella-Roman J. C., Nordstrom R.* Introduction: Feature issue on phantoms for the performance evaluation and validation of optical medical imaging devices // *Biomed. Opt. Express.* 2012. V. 3, № 6. P. 1399–1403.
1210. *Zhao J., Ding H. S., Zhao Z. Y., Du J.* Phantoms with tissue-like optical properties for use in near-infrared spectroscopy and imaging // *J. Optoelectron. Laser.* 2005. V. 16, № 4. P. 496–500.
1211. *Fu J., Quan G., Gong H.* A simple method for prediction of the reduced scattering coefficient in tissue-simulating phantoms // *J. Innov. Opt. Health Sci.* 2010. V. 3, № 1. P. 53–59.
1212. *Kanick S. C., Krishnaswamy V., Gamm U. A., Sterenborg H. J. C. M., Robinson D. J., Amelink A., Pogue B. W.* Scattering phase function spectrum makes reflectance spectrum measured from Intralipid phantoms and tissue sensitive to the device detection geometry // *Biomed. Opt. Express.* 2012. V. 3, № 6. P. 1086–1100.
1213. *Di Ninni P., Martelli F., Zaccanti G.* The use of India ink in tissue-simulating phantoms // *Opt. Express.* 2010. V. 18, № 26. P. 26854–26865.
1214. *Di Ninni P., Martelli F., Zaccanti G.* Intralipid: towards a diffusive reference standard for optical tissue phantoms // *Phys. Med. Biol.* 2011. V. 56. P. N21–28.
1215. *Martelli F., Zaccanti G.* Calibration of scattering and absorption properties of a liquid diffusive medium at NIR wavelengths. CW method // *Opt. Express.* 2007. V. 15. P. 486–500.
1216. *Spinelli L., Martelli F., Farina A., Pifferi A., Torricelli A., Cubeddu R., Zaccanti G.* Calibration of scattering and absorption properties of a liquid diffusive medium at NIR wavelengths. Time-resolved method // *Opt. Express.* 2007. V. 15. P. 6589–6604.
1217. *Michels R., Foschum F., Kienle A.* Optical properties of fat emulsions // *Opt. Express.* 2008. V. 16. P. 5907–5925.
1218. *Xu H., Patterson M.* Determination of the optical properties of tissue-simulating phantoms from interstitial frequency domain measurements of relative fluence and phase difference // *Opt. Express.* 2006. V. 14. P. 6485–6501.
1219. *Pifferi A., Torricelli A., Bassi A., Taroni P., Cubeddu R., Wabnitz H., Grosenick D., Möller M., Macdonald R., Swartling J., Svensson T., Andersson-Engels S., van Veen R. L. P., Sterenborg H. J. C. M., Tualle J.-M., Nghiem H. L., Avriillier S., Whelan M., Stamm M.* Performance assessment of photon migration instruments: the MEDPHOT protocol // *Appl. Opt.* 2005. V. 44, № 11. P. 2104–2114.
1220. *Cerussi A. E., Warren R., Hill B., Roblyer D., Leproux A., Durkin A. F., O'Sullivan T. D., Keene S., Haghany H., Quang T., Mantulin W. M., Tromberg B. J.* Tissue phantoms in multicenter clinical trials for diffuse optical technologies // *Biomed. Opt. Express.* 2012. V. 3, № 5. P. 966–971.
1221. *Wang Q., Le D., Ramella-Roman J., Pfejfer J.* Broadband ultraviolet-visible optical property measurement in layered turbid media // *Biomed. Opt. Express.* 2012. V. 3, № 6. P. 1226–1240.
1222. *Clarke M. L., Lee J. Y., Samarov D. V., Allen D. W., Litorja M., Nossal R., Hwang J.* Designing microarray phantoms for hyperspectral imaging validation // *Biomed. Opt. Express.* 2012. V. 3, № 6. P. 1291–1299.
1223. *Xu R. X., Allen D. W., Huang J., Gnyawali S., Melvin J., Elgharably H., Gordillo G., Huang K., Bergdall V., Litorja M., Rice J. P., Hwang J., Sen C. K.* Developing digital tissue phantoms for hyperspectral imaging of ischemic wounds // *Biomed. Opt. Express.* 2012. V. 3, № 6. P. 1433–1445.

1224. *Samarov D. V., Clarke M. L., Lee J. Y., Allen D. W., Litorja M., Hwang J.* Algorithm validation using multicolor phantoms // *Biomed. Opt. Express.* 2012. V. 3, № 6. P. 1300–1311.
1225. *Jacques S. L., Wang B., Samatham R.* Reflectance confocal microscopy of optical phantoms // *Biomed. Opt. Express.* 2012. V. 3, № 6. P. 1162–1172.
1226. *Lamouche G., Kennedy B. F., Kennedy K. M., Bisailon C.-E., Curatolo A., Campbell G., Pazos V., Sampson D. D.* Review of tissue simulating phantoms with controllable optical, mechanical and structural properties for use in optical coherence tomography // *Biomed. Opt. Express.* 2012. V. 3, № 6. P. 1381–1398.
1227. *de Bruin D. M., Bremmer R. H., Kodach V. M., de Kinkelder R., van Marle J., van Leeuwen T. G., Faber D. J.* Optical phantoms of varying geometry based on thin building blocks with controlled optical properties // *J. Biomed. Opt.* 2010. V. 15, № 2. P. 025001-1–10.
1228. *Chang R. C., Johnson P., Stafford C. M., Hwang J.* Fabrication and characterization of a multilayered optical tissue model with embedded scattering microspheres in polymeric materials // *Biomed. Opt. Express.* 2012. V. 3, № 6. P. 1326–1339.
1229. *Agrawal A., Connors M., Beylin A., Liang C.-P., Barton D., Chen Y., Drezek R. A., Pfeffer T. J.* Characterizing the point spread function of retinal OCT devices with a model eye-based phantom // *Biomed. Opt. Express.* 2012. V. 3, № 6. P. 1116–1126.
1230. *Nguyen T. T. A., Le H. N. D., Vo M., Wang Z., Luu L., Ramella-Roman J. C.* Three-dimensional phantoms for curvature correction in spatial frequency domain imaging // *Biomed. Opt. Express.* 2012. V. 3, № 6. P. 1200–1214.
1231. *Viator J. A., Choi B., Peavy G. M., Kimel S., Nelson J. S.* Spectra from 2.5–15 μm of tissue phantom materials, optical clearing agents and *ex vivo* human skin: implications for depth profiling of human skin // *Phys. Med. Biol.* 2003. V. 48. P. N15–24.
1232. *Wen X., Tuchin V. V., Luo Q., Zhu D.* Controlling the scattering of Intralipid by using optical clearing agents // *Phys. Med. Biol.* 2009. V. 54, № 22. P. 6917–6930.
1233. *Parthasarathy A. B., Shin W. G., Zhang X. J., Dunn A. K.* Laser speckle contrast imaging of flow in a microfluidic device // *Proc. SPIE.* 2007. V. 6446. P. 644604.
1234. *Bykov A. V., Popov A. P., Priezzhev A. V., Myllylä R.* Multilayer tissue phantoms with embedded capillary system for OCT and DOCT imaging // *Proc. SPIE.* 2011. V. 8091. P. 80911R-1–6.
1235. *Tuchin V. V., Bashkatov A. N., Genina E. A., Kochubey V. I., Lychagov V. V., Portnov S. A., Trunina N. A., Miller D. R., Cho S., Oh H., Shim B., Kim M., Oh J., Eum H., Ku Y., Kim D., Yang Y.* Finger tissue model and blood perfused skin tissue phantom // *Proc. SPIE.* 2011. V. 7898. P. 78980Z-1–11.
1236. *Luu L., Roman P. A., Mathews S. A., Ramella-Roman J. C.* Microfluidics based phantoms of superficial vascular network // *Biomed. Opt. Express.* 2012. V. 3, № 6. P. 1350–1364.
1237. *Funane T., Atsumori H., Kiguchi M., Tanikawa Y., Okadac E.* Dynamic phantom with two stage-driven absorbers for mimicking hemoglobin changes in superficial and deep tissues // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17, № 4. P. 047001-1–11.
1238. *Kang H. G., Clarke M. L., De Paoli Lacerda S. H., Karim A., Pease III L. F., Hwang J.* Multimodal optical studies of single and clustered colloidal quantum dots for the long-term optical property evaluation of quantum dot-based molecular imaging phantoms // *Biomed. Opt. Express.* 2012. V. 3, № 6. P. 1314–1325.
1239. *Anderson R. R., Parrish J. A.* The optics of human skin // *J. Invest. Dermatol.* 1981. V. 77. P. 13–19.
1240. *Hammer M., Roggan A., Schweitzer D., Müller G.* Optical properties of ocular fundus tissues — an *in vitro* study using the double-integrating-sphere technique and inverse Monte Carlo simulation // *Phys. Med. Biol.* 1995. V. 40. P. 963–978.
1241. *Star W. M.* The relationship between integrating sphere and diffusion theory calculations of fluence rate at the wall of a spherical cavity // *Phys. Med. Biol.* 1995. V. 40. P. 1–8.
1242. *Prahl S. A., van Gemert M. J. C., Welch A. J.* Determining the optical properties of turbid media by using the adding-doubling method // *Appl. Opt.* 1993. V. 32. P. 559–568.

1243. Marquet P., Bevilacqua F., Depeursinge C., de Haller E.B. Determination of reduced scattering and absorption coefficients by a single charge-coupled-device array measurement. 1. Comparison between experiments and simulations // *Opt. Eng.* 1995. V. 34. P. 2055–2063.
1244. Bevilacqua F., Marquet P., Depeursinge C., de Haller E.B. Determination of reduced scattering and absorption coefficients by a single charge-coupled-device array measurement. 2. Measurements on biological tissue // *Opt. Eng.* 1995. V. 34. P. 2064–2069.
1245. Bevilacqua F., Piquet D., Marquet P. et al. *In vivo* local determination of tissue optical properties // *Proc. SPIE.* 1997. V. 3194–39.
1246. Yaroslavsky I. V., Tuchin V. V. An inverse Monte Carlo method for spectrophotometric data processing // *Proc. SPIE.* 1994. V. 2100. P. 57–68.
1247. Marchesini R., Bertoni A., Andreola S. et al. Extinction and absorption coefficients and scattering phase functions of human tissues *in vitro* // *Appl. Opt.* 1989. V. 28. P. 2318–2324.
1248. Jacques S.L., Alter C.A., Prahl S.A. Angular dependence of the He-Ne laser light scattering by human dermis // *Lasers Life Sci.* 1987. V. 1. P. 309–333.
1249. Driver I., Lowdell C. P., Ash D. V. *In vivo* measurement of the optical interaction coefficients of human tumours at 630 nm // *Phys. Med. Biol.* 1991. V. 36. P. 805–813.
1250. Peters V.G., Wyman D.R., Patterson M.S., Frank G.L. Optical properties of normal and diseased human tissues in the visible and near infrared // *Phys. Med. Biol.* 1990. V. 35. P. 1317–1334.
1251. Seyfried M. Optical radiation interaction with living tissue / *Radiation Measurement in Photobiology.* N. Y.: Academic, 1989. P. 191–223.
1252. Roggan A., Minet O., Schröder C., Müller G. The determination of optical tissue properties with double integrating sphere technique and Monte Carlo simulations // *Proc. SPIE.* 1994. V. 2100. P. 42–56.
1253. Pickering J. W., Moes C.J.M., Sterenborg H.J.C.M. et al. Two integrating spheres with an intervening scattering sample // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1992. V. 9. P. 621–631.
1254. Pickering J. W., Prahl S.A., van Wieringen N. et al. Double-integrating sphere system for measuring the optical properties of tissue // *Appl. Opt.* 1993. V. 32. P. 399–410.
1255. Yaroslavsky A.N., Yaroslavsky I. V., Goldbach T., Schwarzmaier H.-J. Inverse hybrid technique for determining the optical properties of turbid media from integrating-sphere measurements // *Appl. Opt.* 1997. V. 35, № 34. P. 6797–6809.
1256. Schwarzmaier H.-J., Yaroslavsky A.N., Yaroslavsky I. V. et al. Optical properties of native and coagulated human brain structures // *Proc. SPIE.* 1997. V. 2970. P. 492–499.
1257. Chan E.K., Sorg B., Protsenko D., O'Neil M., Motamedi M., Welch A.J. Effects of compression on soft tissue optical properties // *IEEE J. Select. Tops Quant. Electr.* 1996. V. 2, № 4. P. 943–950.
1258. Chan E., Menovsky T., Welch A.J. Effect of cryogenic grinding of soft-tissue optical properties // *Appl. Opt.* 1996. V. 35, № 22. P. 4526–4532.
1259. Fine I., Loewinger E., Weinreb A., Weinberger D. Optical properties of the sclera // *Phys. Med. Biol.* 1985. V. 30. P. 565–571.
1260. Wang L.-H., Jacques S.L. Use of laser beam with an oblique angle of incidence to measure the reduced scattering coefficient of a turbid medium // *Appl. Opt.* 1995. V. 34. P. 2362–2366.
1261. Lin S.-P., Wang L.-H., Jacques S.L., Tittel F.K. Measurement of tissue optical properties by the use of oblique-incidence optical fiber reflectometry // *Appl. Opt.* 1997. V. 36. P. 136–143.
1262. Yaroslavsky A.N., Vervoorts A., Priezzhev A. V., Yaroslavsky I. V., Moser J.G., Schwarzmaier H.-J. Can tumor cell suspension serve as an optical model of tumor tissue *in situ*? // *Proc. SPIE.* 1999. V. 3565. P. 165–173.
1263. Yaroslavsky A.N., Yaroslavsky I. V., Schwarzmaier H.-J. Small-angle approximation to determine radiance distribution of a finite beam propagating through turbid medium // *Proc. SPIE.* 1998. V. 3195. P. 110–120.

1264. Ebert D. W., Roberts C., Farrar S. K., Johnston W. M., Litsky A. S., Bertone A. L. Articular cartilage optical properties in the spectral range 300–850 nm // J. Biomed. Opt. 1998. V. 3. P. 326–333.
1265. Sardar D. K., Mayo M. L., Glickman R. D. Optical characterization of melanin // J. Biomed. Opt. 2001. V. 6. P. 404–411.
1266. Hammer M., Schweitzer D. Quantitative reflection spectroscopy at the human ocular fundus // Phys. Med. Biol. 2002. V. 47. P. 179–191.
1267. Troy T. L., Thennadil S. N. Optical properties of human skin in the near infrared wavelength range of 1000 to 2200 nm // J. Biomed. Opt. 2001. V. 6. P. 167–176.
1268. Du Y., Hu X. H., Cariveau M., Ma X., Kalmus G. W., Lu J. Q. Optical properties of porcine skin dermis between 900 nm and 1500 nm // Phys. Med. Biol. 2001. V. 46. P. 167–181.
1269. Prahl S. A. Light Transport in Tissues. PhD Thesis. Austin, Univ. of Texas, 1988.
1270. Prahl S. A. The inverse adding-doubling program. <http://omlc.ogi.edu/software/iad/index.html>
1271. Khalil O., Yeh S.-j., Lowery M. G., Wu X., Hanna C. F., Kantor S., Jeng T.-W., Kanger J. S., Bolt R. A., de Mul F. F. Temperature modulation of the visible and near infrared absorption and scattering coefficients of human skin // J. Biomed. Opt. 2003. V. 8, № 2. P. 191–205.
1272. Pfefer T. J., Matchette L. S., Bennett C. L., Gall J. A., Wilke J. N., Durkin A. J., Ediger M. N. Reflectance-based determination of optical properties in highly attenuating tissue,» J. Biomed. Opt. 2003. V. 8, № 2. P. 206–215.
1273. Thueller F., Charvet I., Bevilacqua F., Ghislain M. St., Ory G., Marquet P., Meda P., Vermeulen B., Depeursinge C. *In vivo* endoscopic tissue diagnostics based on spectroscopic absorption, scattering, and phase function properties // J. Biomed. Opt. 2003. V. 8, № 3. P. 495–503.
1274. Jacques S. L. Simple Monte Carlo code. <http://omlc.ogi.edu/software/index.html>
1275. Kumar G., Schmitt J. M. Optimal probe geometry for near-infrared spectroscopy of biological tissue // Appl. Opt. 1997. V. 36, № 10. P. 2286–2293.
1276. Kienle A., Forster F. K., Hibst R. Influence of the phase function on determination of the optical properties of biological tissue by spatially resolved reflectance // Opt. Lett. 2001. V. 26. P. 1571–1573.
1277. Hayakawa C. K., Spanier J., Bevilacqua F., Dunn A. K., You J. S., Tromberg B. J., Venugopalan V. Perturbation Monte Carlo methods to solve inverse photon migration problems in heterogeneous tissues // Opt. Lett. 2001. V. 26. P. 1335–1337.
1278. Bevilacqua F., Depeursinge C. Monte Carlo study of diffuse reflectance at source-detector separations close to one transport mean free path // J. Opt. Soc. Am. A. 1999. V. 16, № 2. P. 2935–2945.
1279. Steenbergen W., Kolkman R., de Mul F. Light-scattering properties of undiluted human blood subjected to simple shear // J. Opt. Soc. Am. A. 1999. V. 16, № 12. P. 2959–2967.
1280. Flock S. T., Wilson B. C., Patterson M. S. Total attenuation coefficient and scattering phase function of tissues and phantom materials at 633 nm // Med. Phys. 1987. V. 14. P. 835–841.
1281. Roggan A., Dörschel K., Minet O., Wolff D., Müller G. The optical properties of biological tissue in the near infrared wavelength range — review and measurements // Laser-Induced Interstitial Thermotherapy. V. P. M25 / Ed. by G. Müller, A. Roggan. Bellingham, WA, SPIE Press, 1995. P. 10–44.
1282. Stolik S., Delgado J. A., Pérez A., Anasagasti L. Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human «*ex vivo*» tissues // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 2000. V. 57. P. 90–93.
1283. Tauber S., Baumgartner R., Schorn K., Beyer W. Lightdosimetric quantitative analysis of the human petrous bone: experimental study for laser irradiation of the cochlea // Laser Sur. Med. 2001. V. 28. P. 18–26.
1284. Bevilacqua F., Piguat D., Marquet P., Gross J. D., Tromberg B. J., Depeursinge C. *In vivo* local determination of tissue optical properties: applications to human brain // Appl. Opt. 1999. V. 38. P. 4939–4950.

1285. *Mobley J., Vo-Dinh T.* Optical properties of tissues // Biomedical Photonics Handbook / Ed. by T. Vo-Dinh. Boca Raton: CRC Press, 2003. P. 2-1-2-75.
1286. *Roggan A., Schäder D., Netz U., Ritz J.-P., Germer C.-T., Müller G.* The effect of preparation technique on the optical parameters of biological tissue // Appl. Phys. B. 1999. V. 69. P. 445–453.
1287. *Gottschalk W.* Ein Messverfahren zur Bestimmung der Optischen Parameter Biologischer Gevebe *In Vitro* // Dissertation 93 HA8984. Karlsruhe, Universitaet Fridriciana, 1992.
1288. *Ghosh N., Mohanty S.K., Majumder S.K., Gupta P.K.* Measurement of optical transport properties of normal and malignant human breast tissue // Appl. Opt. 2001. V. 40. P. 176–184.
1289. *Hornung R., Pham T.H., Keeffe K.A., Berns M.W., Tadir Y., Tromberg B.J.* Quantitative near-infrared spectroscopy of cervical dysplasia *in vivo* // Hum. Reprod. 1999. V. 14. P. 2908–2916.
1290. *Gratton E., Fantini S., Franceschini M.A., Gratton G., Fabiani M.* Measurements of scattering and absorption changes in muscle and brain // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 1997. V. 352. P. 727–735.
1291. *Farrell T.J., Patterson M.S., Essenpreis M.* Influence of layered tissue architecture on estimates of tissue optical properties obtained from spatially-resolved diffuse reflectometry // Appl. Opt. 1998. V. 37. P. 1958–1972.
1292. *Башкатов А. Н.* Управление оптическими свойствами тканей под действием осмотически активных иммерсионных жидкостей. Дисс. на соиск. уч. ст. канд. физ.-мат. наук, Саратовский государственный университет, 2002.
1293. *Генина Э. А., Башкатов А. Н., Кочубей В. И., Тучин В. В.* Оптическое просветление твердой мозговой оболочки человека // Опт. спектр. 2005. Т. 98, № 3. С. 515–521.
1294. *Башкатов А. Н., Генина Э. А., Кочубей В. И., Тучин В. В.* Оптические свойства подкожной жировой ткани в спектральном диапазоне 400–2500 нм // Опт. спектр. 2005. Т. 99, № 5. С. 868–874.
1295. *Башкатов А. Н., Генина Э. А., Кочубей В. И., Тучин В. В., Чикина Е. Э., Князев А. Б., Мареев О. В.* Оптические свойства слизистой оболочки в спектральном диапазоне 350–2000 нм // Опт. спектр. 2004. Т. 97, № 6. С. 1043–1048.
1296. *Fantini S., Walker S.A., Franceschini M.A., Kaschke M., Schlag P.M., Moesta K.T.* Assessment of the size, position, and optical properties of breast tumors *in vivo* by noninvasive optical methods // Appl. Opt. 1998. V. 37. P. 1982–1989.
1297. *Fantini S., Hueber D., Franceschini M.A., Gratton E., Rosenfeld W., Stubblefield P.G., Maulik D., Stankovic M.R.* Non-invasive optical monitoring of the newborn piglet brain using continuous-wave and frequency-domain spectroscopy // Phys. Med. Biol. 1999. V. 44. P. 1543–1563.
1298. *Black J.F., Barton J.K., Frangineas G., Pummer H.* Cooperative phenomena in two-pulse two-color laser photocoagulation of cutaneous blood vessels // Proc. SPIE. 2001. V. 4244. P. 13–24.
1299. *Jacques S.L.* Origins of tissue optical properties in the UVA, visible and NIR regions // Advances in Optical Imaging and Photon Migration. OSA TOPS 2 / Ed. by R.R. Alfano, J.G. Fujimoto. Washington, DC: Optical Society of America, 1996. P. 364–371.
1300. *Levitz D., Thrane L., Frosz M.H., Andersen P.E., Andersen C.B., Andersson-Engels S., Valanciunaite J., Swartling J., Hansen P.R.* Determination of optical scattering properties of highly-scattering media in optical coherence tomography images // Opt. Express. 2004. V. 12. P. 249–259.
1301. *Knüttel A., Boehlau-Godau M.* Spatially confined and temporally resolved refractive index and scattering evaluation in human skin performed with optical coherence tomography // J. Biomed. Opt. 2000. V. 5. P. 83–92.
1302. *Knüttel A., Bonev S., Knaak W.* New method for evaluation of *in vivo* scattering and refractive index properties obtained with optical coherence tomography // J. Biomed. Opt. 2004. V. 9. P. 265–273.

1303. *Holboke M. J., Tromberg B. J., Li X., Shah N., Fishkin J., Kidney D., Butler J., Chance B., Yodh A. G.* Three-dimensional diffuse optical mammography with ultrasound localization in a human subject // *J. Biomed. Opt.* 2000. V. 5. P. 237–247.
1304. *Tromberg B. J., Shah N., Lanning R., Cerussi A., Espinoza J., Pham T., Svaasand L., Butler J.* Non-invasive *in vivo* characterization of breast tumors using photon migration spectroscopy // *Neoplasia*. 2000. V. 2. P. 26–40.
1305. *Turchin I. V., Sergeeva E. A., Dolin L. S., Kamensky V. A.* Estimation of biotissue scattering properties from oct images using a small-angle approximation of transport theory // *Laser Phys.* 2003. V. 13. P. 1524–1529.
1306. *Dolin L. S., Gelikonov G. V., Gelikonov V. M., Gladkova N. D., Iksanov R. R., Kamensky V. A., Kuranov R. V.* Sergeev, *Shakhova N. M., Turchin I. V.* // *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science. V. 2* / Ed. by V. V. Tuchin. Second edition. Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 2012. P. 999–1064.
1307. *Turchin I. V., Kamensky V. A., Sergeeva E. A., Shakhova N. M.* OCT image processing algorithm for differentiation biological tissue pathologies // 13 Inter. Laser Phys. Workshop, Book of Abstracts, Trieste, Italy, 2004. P. 189.
1308. *Firbank M., Hiraoka M., Essenpreis M., Delpy D. T.* Measurement of the optical properties of the skull in the wavelength range 650–950 nm // *Phys. Med. Biol.* 1993. V. 38. P. 503–510.
1309. *Ugryumova N., Matcher S. J., Attenburrow D. P.* Measurement of bone mineral density via light scattering // *Phys. Med. Biol.* 2004. V. 49. P. 469–283.
1310. *Kholodnykh A. I., Petrova I. Y., Larin K. V., Motamedi M., Esenaliev R. O.* Precision of measurement of tissue optical properties with optical coherence tomography // *Appl. Opt.* 2003. V. 42. P. 3027–3037.
1311. *Ярославская А. Н., Приезжев А. В., Родригес Х., Ярославский И. В., Баттарби Г.* Оптика крови // *Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 1* / Под ред. В. В. Тучина. М.: Физматлит, 2007. С. 157–196.
1312. *Bashkatov A. N., Genina E. A., Kochubey V. I., Tuchin V. V.* Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2005. V. 38. P. 2543–2555.
1313. *Tuchin V. V.* Biomedical spectroscopy // *Encyclopedia of Optical Engineering* / Ed. by R. G. Driggers. N. Y.: Marcel-Dekker, 2003. P. 166–182.
1314. *Tuchin V. V.* Light-tissue interactions // *Biomedical Photonics Handbook* / Ed. by T. Vo-Dinh. Boca Raton: CRC Press, 2003. P. 3-1–26.
1315. *Martelli F., Del Bianco S., Ismaelli A., Zaccanti G.* Light Propagation through Biological Tissue and Other Diffusive Media: Theory, Solutions, and Software. V. P. M193. Bellingham, WA, SPIE Press, 2009.
1316. *Bashkatov A. N., Genina E. A., Kochubey V. I., Gavrilova A. A., Kapralov S. V., Grishaev V. A., Tuchin V. V.* Optical properties of human stomach mucosa in the spectral range from 400 to 2000 nm: prognosis for gastroenterology // *Med. Laser Appl.* 2007. V. 22. P. 95–104.
1317. *Башкатов А. Н., Генина Э. А., Кочубей В. И., Тучин В. В.* Оптические свойства склеры глаза человека в спектральном диапазоне 370–2500 нм // *Опт. спектр.* 2010. Т. 109, № 2. С. 226–234.
1318. *Bashkatov A. N., Genina E. A., Tuchin V. V.* Tissue optical properties. Chapter 5 // *Handbook of Biomedical Optics* / Ed. by D. A. Boas, C. Pitris, N. Ramanujam. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2011.
1319. *Ermakov I. V., Gellermann W.* Dermal carotenoid measurements via pressure mediated reflection spectroscopy // *J. Biophoton.* 2012. V. 5, № 7. P. 559–570.
1320. *Lister T. S., Wright P. A., Chappell P. H.* Spectrophotometers for the clinical assessment of port wine stain skin lesions: A review // *Lasers Med. Sci.* 2010. V. 25. P. 449–457.

1321. *Lister T. S., Wright P. A., Chappell P. H.* The optical properties of human skin // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17, № 9. P. 090901.
1322. *Sandell J. L., Zhu T. C.* A Review of *in vivo* optical properties of human tissues and its impact on PDT // *J. Biophoton.* 2011. V. 4. P. 773–787.
1323. *Reynolds L. O., McCormick N. J.* Approximate two-parameter phase function for light scattering // *J. Opt. Soc. Am.* 1980. V. 70. P. 1206–1212.
1324. *Barber P. W., Hill S. C.* Light Scattering by Particles: Computational Methods. Singapore: World Scientific, 1990.
1325. *Hammer M., Schweitzer D., Michel B., Thamm E., Kolb A.* Single scattering by red blood cells // *Appl. Opt.* 1998. V. 37, № 31. P. 7410–7418.
1326. *Bigio I. J., Mourant J. R.* Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy // *Phys. Med. Biol.* 1997. V. 42. P. 803–814.
1327. *Перельман Л. Т., Бекман В.* Спектроскопия рассеяния света эпителиальными тканями: принципы и приложения // *Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 2 / Под ред. В. В. Тучина. М.: Физматлит, 2007. С. 34–124.*
1328. *Backman V., Wallace M., Perelman L. T., Gurjar R., Zonios G., Müller M. G., Zhang Q., Valdez T., Arendt J. T., Levin H. S., McGillican T., Badizadegan K., Seiler M., Kabani S., Itzkan I., Fitzmaurice M., Dasari R. R., Crawford J. M., Van Dam J., Feld M. S.* Detection of preinvasive cancer cells. early-warning changes in precancerous epithelial cells can be spotted *in situ* // *Nature.* 2000. V. 406, № 6791. P. 35–36.
1329. *Yang C., Perelman L. T., Wax A., Dasari R. R., Feld M. S.* Feasibility of field-based light scattering spectroscopy // *J. Biomed. Opt.* 2000. V. 5. P. 138–143.
1330. *Zonios G., Perelman L. T., Backman V., Manoharan R., Fitzmaurice M., Feld M. S.* Diffuse reflectance spectroscopy of human adenomatous colon polyps *in vivo* // *Appl. Opt.* 1999. V. 38. P. 6628–6637.
1331. *Tuchin V. V., Xu X., Wang R. K.* Dynamic optical coherence tomography in optical clearing, sedimentation and aggregation study of immersed blood // *Appl. Opt. OT.* 2002. V. 41, № 1. P. 258–271.
1332. *Andersen P. E., Thrane L., Yura H. T., Tycho A., Jørgensen T. M.* Optical coherence tomography: Advanced modeling. Chapter 17 // *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science. V. 2 / Ed. by V. V. Tuchin. Second edition. Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 2012. P. 743–798.*
1333. *Thrane L., Yura H. T., Andersen P. E.* Analysis of optical coherence tomography systems based on the extended Huygens-Fresnel principle // *J. Opt. Soc. Am.* 2000. V. A17. P. 484–490.
1334. *Yang Y., Wang T., Biswal N. C., Wang X., Sanders M., Brewer M., Zhu Q.* Optical scattering coefficient estimated by optical coherence tomography correlates with collagen content in ovarian tissue // *J. Biomed. Opt.* 2011. V. 16, № 9. P. 090504-1–3.
1335. *Kodach V. M., Faber D. J., van Marle J., van Leeuwen T. G., Kalkman J.* Determination of the scattering anisotropy with optical coherence tomography // *Opt. Express.* 2011. V. 19, № 7. P. 6131–6140.
1336. *Wang R. K., Tuchin V. V.* Optical coherence tomography. Light scattering and imaging enhancement. Chapter 16 // *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science. V. 2 / Ed. by V. V. Tuchin. Second edition. Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 2012. P. 665–742.*
1337. *Ghosn M., Tuchin V. V., Larin K. V.* Depth-resolved monitoring of glucose diffusion in tissues by using optical coherence tomography // *Opt. Lett.* 2006. V. 31. P. 2314–2316.
1338. *Ghosn M. G., Tuchin V. V., Larin K. V.* Nondestructive quantification of analyte diffusion in cornea and sclera using optical coherence tomography // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007. V. 48. P. 2726–2733.

1339. Ghosn M. G., Carbajal E. F., Befruj N., Tuchin V. V., Larin K. V. Differential permeability rate and percent clearing of glucose in different regions in rabbit sclera // *J. Biomed. Opt.* 2008. V. 13. P. 021110-1-6.
1340. Larin K. V., Tuchin V. V. Functional imaging and assessment of the glucose diffusion rate in epithelial tissues with optical coherence tomography // *Quant. Electr.* 2008. V. 38. P. 551-556.
1341. Larin K. V., Ghosn M. G., Bashkatov A. N., Genina E. A., Trunina N. A., Tuchin V. V. Optical clearing for OCT image enhancement and in-depth monitoring of molecular diffusion // *IEEE J. Select. Tops. Quant. Electr.* 2012. V. 18, № 3. P. 1244-1259.
1342. Genina E. A., Bashkatov A. N., Tuchin V. V. Optical clearing of cranial bone // *Adv. Optical Technol.* 2008. Article ID 267867. 8 p.
1343. Bashkatov A. N., Genina E. A., Kochubey V. I., Lakodina N. A., Tuchin V. V. Optical properties of human cranial bones in the spectral range from 800 to 2000 nm // *Proc. SPIE.* 2006. V. 6163. P. 616310-1-11.
1344. Reynolds L., Johnson C., Ishimaru A. Diffuse reflectance from a finite blood medium: applications to the modeling of fiber optic catheters // *Appl. Opt.* 1976. V. 15. P. 2059-2067.
1345. Steinke J. M., Shepherd A. P. Comparison of Mie theory and the light scattering of red blood cells // *Appl. Opt.* 1988. V. 27. P. 4027-4033.
1346. Douplik A., Strattonnikov A., Zhernovaya O., Loshchenov V. modifications of optical properties of blood during photodynamic reactions *in vitro* and *in vivo* // *Advanced Optical Flow Cytometry: Methods and Disease Diagnoses* / Ed. by V. V. Tuchin. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011. P. 627-698.
1347. Friebe M., Roggan A., Müller G., Meinke M. Determination of optical properties of human blood in the spectral range 250 to 1100 nm using Monte Carlo simulation with hematocrit-dependent effective scattering phase functions // *J. Biomed. Opt.* 2006. V. 11, № 3. P. 034021-1-10.
1348. Meinke M., Müller G., Helfmann J., Friebe M. Empirical model functions to calculate hematocrit-dependent optical properties of human blood // *Appl. Opt.* 2007. V. 46, № 10. P. 1742-1763.
1349. Meinke M., Müller G., Helfmann J., Friebe M. Optical properties of platelets and blood plasma and their influence on the optical behaviour of whole blood in the VIS-NIR wavelength range // *J. Biomed. Opt.* 2007. V. 12. P. 014024.
1350. Friebe M., Müller G., Helfmann J., Meinke M. Influence of shear rate on the optical properties of human blood in the spectral range 250-1100 nm // *J. Biomed. Opt.* 2007. V. 12. P. 054005.
1351. Meinke M., Müller G., Helfmann J., Friebe M. Empirical model functions to calculate hematocrit dependent optical properties of human blood // *Appl. Opt.* 2007. V. 46. P. 1742-1753.
1352. Friebe M., Helfmann J., Netz U., Meinke M. C. Influence of oxygen saturation on the optical scattering properties of human red blood cells in the spectral range 250 to 2000 nm // *J. Biomed. Opt.* 2009. V. 14, № 3. P. 034001-1-6.
1353. Meinke M. C., Friebe M., Helfmann J. Optical properties of flowing blood cells, chapter 5 // *Advanced Optical Flow Cytometry: Methods and Disease Diagnoses* / Ed. by V. V. Tuchin. Weinheim: Wiley-VCH, 2011. P. 95-129.
1354. Sardar D. K., Levy L. B. Optical properties of whole blood // *Lasers Med. Sci.* 1998. V. 13. P. 106-111.
1355. Pittman R. N. *In vivo* photometric analysis of hemoglobin // *Annals Biomed. Eng.* 1986. V. 14. P. 119-137.
1356. Bartlett M. A., Jiang H. Effect of refractive index on the measurement of optical properties in turbid media // *Appl. Opt.* 2001. V. 40. P. 1735-1741.
1357. Cheng S., Shen H. Y., Zhang G., Huang C. H., Huang X. J. Measurement of the refractive index of biotissue at four laser wavelengths // *Proc. SPIE.* 2002. V. 4916. P. 172-176.
1358. Liu H., Xie S. Measurement method of the refractive index of biotissue by total internal reflection // *Appl. Opt.* 1996. V. 35. P. 1793-1795.

1359. *Tuchin V. V., Zhestkov D. M., Bashkatov A. N., Genina E. A.* Theoretical study of immersion optical clearing of blood in vessels at local hemolysis // *Opt. Express*. 2004. V. 12. P. 2966–2971.
1360. *Barer R., Ross K. F. A., Tkaczyk S.* Refractometry of living cells // *Nature*. 1953. V. 171, № 4356. P. 720–724.
1361. *Haruna M., Yoden K., Ohmi M., Seiyama A.* Detection of phase transition of a biological membrane by precise refractive-index measurement based on the low coherence interferometry // *Proc. SPIE*. 2000. V. 3915. P. 188–193.
1362. *Faber D. J., Aalders M. C. G., Mik E. G., Hooper B. A., van Gemert M. J. C., van Leeuwen T. G.* Oxygen saturation-dependent absorption and scattering of blood // *Phys. Rev. Lett.* 2004. V. 93. P. 028102-1–4.
1363. *Dirckx J. J. J., Kuypers L. C., Decraemer W. F.* Refractive index of tissue measured with confocal microscopy // *J. Biomed. Opt.* 2005. V. 10, № 4. P. 044014-1–8.
1364. *Zysk A. M., Chaney E. J., Boppart S. A.* Refractive index of carcinogen-induced rat mammary tumors // *Phys. Med. Biol.* 2006. V. 51. P. 2165–2177.
1365. *Ma X., Lu J. Q., Ding H., Hu X. H.* Bulk optical parameters of porcine skin dermis tissues at eight wavelengths from 325 to 1557 nm // *Opt. Lett.* 2005. V. 30. P. 412–414.
1366. *Ding H., Lu J. Q., Jacobs K. M., Hu X. H.* Determination of refractive indices of porcine skin tissues and Intralipid at eight wavelengths between 325 and 1557 nm // *J. Opt. Soc. Am. A*. 2005. V. 22. P. 1151–1157.
1367. *Ding H., Lu J. Q., Wooden W. A., Kragel P. J., Hu X. H.* Refractive indices of human skin tissues at eight wavelengths and estimated dispersion relations between 300 and 1600 nm // *Phys. Med. Biol.* 2006. V. 51. P. 1479–1489.
1368. *Ding H., Wang Z., Nguyen F., Boppart S. A., Popescu G.* Fourier transform light scattering of inhomogeneous and dynamic structures // *Phys. Rev. Lett.* 2008. V. 101. P. 238102.
1369. *Ding H., Nguyen F., Boppart S. A., Popescu G.* Optical properties of tissues quantified by Fourier transform light scattering // *Opt. Lett.* 2009. V. 34. P. 1372–1374.
1370. *Lue N., Bewersdorff J., Lessard M. D., Badizadegan K., Dasari K., Feld M. S., Popescu G.* Tissue refractometry using Hilbert phase microscopy // *Opt. Lett.* 2007. V. 32. P. 3522–3524.
1371. *Ding H., Wang Z., Liang X., Boppart S. A., Tangella K., Popescu G.* Measuring the scattering parameters of tissues from quantitative phase imaging of thin slices // *Opt. Lett.* 2011. V. 36. P. 2281–2283.
1372. *Wang Z., Tangella K., Balla A., Popescu G.* Tissue refractive index as marker of disease // *J. Biomed. Opt.* 2011. V. 16. P. 116017.
1373. *Popescu G.* Quantitative Phase Imaging of Cells and Tissues / N. Y.: McGraw-Hill, 2011.
1374. *Sun P., Wang Y.* Measurements of optical parameters of phantom solution and bulk animal tissues *in vitro* at 650 nm // *Opt. Laser. Tech.* 2010. V. 42. P. 1–7.
1375. *Jin Y. L., Chen J. Y., Xu L., Wang P. N.* Refractive index measurement for biomaterial samples by total internal reflection // *Phys. Med. Biol.* 2006. V. 51. P. 371–379.
1376. *Lai J., Li Z., Wang C., He A.* Experimental measurement of the refractive index of biological tissues by total internal reflection // *Appl. Opt.* 2005. V. 44. P. 1845–1849.
1377. *Lai J. C., Zhang Y. Y., Li Z. H., Jiang H. J., He A. Z.* Complex refractive index measurement of biological tissues by attenuated total reflection ellipsometry // *Appl. Opt.* 2010. V. 49, № 16. P. 3235–3238.
1378. *Ye Q., Wang J., Deng Z. C., Zhou W. Y., Zhang C. P., Tian J. G.* Measurement of the complex refractive index of tissue-mimicking phantoms and biotissue by extended differential total reflection method // *J. Biomed. Opt.* 2011. V. 16. 097001.
1379. *Friebel M., Meinke M.* Determination of the complex refractive index of highly concentrated hemoglobin solutions using transmittance and reflectance measurements // *Biomed. Opt.* 2005. V. 10. P. 064019.

1380. *Friebel M., Meinke M.* Model function to calculate the refractive index of native hemoglobin in the wavelength range of 250–1100 nm dependent on concentration // *Appl. Opt.* 2006. V. 45, № 12. P. 2838–2842.
1381. *Rappaz B., Barbul A., Emery Y., Korenstein R., Depeursinge C., Magistretti P.J., Marquet P.* Comparative study of human erythrocytes by digital holographic microscopy, confocal microscopy, and impedance volume analyzer // *Cytometry A.* 2008. V. 73. P. 895–903.
1382. *Schiebener P., Straub J., Sengers J.M.H.L., Gallagher J.S.* Refractive index of water and steam as function of wavelength, temperature and density // *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 1990. V. 19. P. 677–717.
1383. *Фихман Б. А.* Микробиологическая рефрактометрия. М.: Изд-во «Медицина», 1967.
1384. *Zhernovaya O., Sydoruk O., Tuchin V., Douplik A.* Refractive index of human hemoglobin in the visible range // *Phys. Med. Biol.* 2011. V. 56. P. 4013–4021.
1385. *Gonchukov S.A., Lazarev Yu. B.* Laser refractometry in medicine and biology // *Laser Phys.* 2003. V. 13, № 5. P. 749–755.
1386. *Oliveira L., Lage A., Clemente M.P., Tuchin V.* Optical characterization and composition of abdominal wall muscle from rat // *Opt. Laser Eng.* 2009. V. 47, № 6. P. 667–672.
1387. *Tuchin V.V., Wang R.K., Galanzha E.I., Lakodina N.A., Solovieva A.V.* Monitoring of glycated hemoglobin in a whole blood by refractive index measurement with OCT/CLEO/QELS. Washington, DC: Optical Society of America, 2003. P. 120.
1388. *Tuchin V.V., Wang R.K., Galanzha E.I., Elder J.B., Zhestkov D.M.* Monitoring of glycated hemoglobin by OCT measurement of refractive index // *Proc. SPIE.* 2004. V. 5316. P. 66–77.
1389. *Mazarevica G., Freivalds T., Jurka A.* Properties of erythrocyte light refraction in diabetic patients // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7. P. 244–247.
1390. *Zhernovaya O.S., Tuchin V.V., Meglinski I.V.* Monitoring of blood proteins glycation by refractive index and spectral measurements // *Laser Phys. Lett.* 2008. V. 5, № 6. P. 460–464.
1391. *Шумилина С. Ф.* Дисперсия действительной и мнимой части комплексного показателя преломления гемоглобина в диапазоне 450–820 нм // *Изв. АН БССР. Сер. физ.-мат. наук.* 1984. № 1. С. 79–84.
1392. *Reinoso R.F., Telfer B.A., Rowland M.* Tissue water content in rats measured by desiccation // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 1997. V. 38. P. 87–92.
1393. *Nonoyama A., Garcia-Lopez A., Garcia-Rubio L.H., Leparc G., Potter R.L.* Hypochromicity in red blood cells: an experimental and theoretical investigation // *Biomed. Opt. Express.* 2011. V. 2. P. 2126–2143.
1394. *Syodoruk O., Zhernovaya O., Tuchin V., Douplik A.* Refractive index of solutions of human hemoglobin from the near infrared to the ultraviolet range: Kramers-Kronig analysis // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17, № 11. P. 115002.
1395. *Lucarini V., Peiponen K.-E., Saarinen J.J., Vartiainen E.M.* Kramers-Kronig Relations in Optical Materials Research. Berlin: Springer, 2005.
1396. *Hempe J., Gomez R., McCarter R., Chalew S.* High and low hemoglobin glycation phenotypes in type 1 diabetes. A challenge for interpretation of glycemic control // *J. Diabetes Complications.* 2002. V. 16. P. 313–320.
1397. *Волькенштейн М. В.* Молекулярная оптика. М.: Гостехиздат, 1951.
1398. *Максимов Г. В., Лулева О. Г., Максимова Н. В., Матеттучи Е., Медведев Е. А., Пащенко В. З., Рубин А. Б.* Исследование роли вязкости и проницаемости плазматической мембраны эритроцита в изменениях связывания кислорода гемоглобина при сахарном диабете // *Бюл. эксп. биол. мед.* 2005. Т. 140, № 5. С. 510–513.
1399. *Bashkatov A.N., Genina E.A., Kochubey V.I., Sinichkin Yu.P., Korobov A.A., Lakodina N.A., Tuchin V.V.* *In vitro* study of control of human *dura mater* optical properties by acting of osmotical liquids // *Proc. SPIE.* 2000. V. 4162. P. 182–188.
1400. *Bashkatov A.N., Genina E.A., Kochubey V.I., Tuchin V.V.* Estimation of wavelength dependence of refractive index of collagen fibers of scleral tissue // *Proc. SPIE.* 2000. V. 4162. P. 265–268.

1401. *Bashkatov A. N., Genina E. A., Kochubey V. I., Stolnitz M. M., Bashkatova T. A., Novikova O. V., Peshkova A. Yu., Tuchin V. V.* Optical properties of melanin in the skin and skin-like phantoms // Proc. SPIE. 2000. V. 4162. P. 219–226.
1402. *Kamai Y., Ushiki T.* The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera // Invest. Ophthalmol. Visual Sci. 1991. V. 32. P. 2244–2258.
1403. *Грисимов В. Н.* Показатель преломления основного вещества дентина // Опт. спектр. 1994. Т. 77. С. 272–273.
1404. *Wang X., Milner T. E., Chang M. C., Nelson J. S.* Group refractive index measurement of dry and hydrated type I collagen films using optical low-coherence reflectometry // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1, № 2. P. 212–216.
1405. *Sorin W. V., Gray D. F.* Simultaneous thickness and group index measurements using optical low-coherence refractometry // IEEE Photon. Technol. Lett. 1992. V. 4. P. 105–107.
1406. *Wang X. J., Milner T. E., Dhond R. P., Sorin W. V., Newton S. A., Nelson J. S.* Characterization of human scalp hairs by optical low-coherence reflectometry // Opt. Lett. 1995. V. 20. P. 524–526.
1407. *Tearney G. J., Brezinski M. E., Southern J. F., Bouma B. E., Hee M. R., Fujimoto J. G.* Determination of the refractive index of highly scattering human tissue by optical coherence tomography // Opt. Lett. 1995. V. 20. P. 2258–2260.
1408. *Ohmi M., Ohnishi Y., Yoden K., Haruna M.* *In vitro* simultaneous measurement of refractive index and thickness of biological tissue by the low coherence interferometry // IEEE Trans. Biomed. Eng. 2000. V. 47. P. 1266–1270.
1409. *Wang X., Zhang C., Zhang L., Xue L., Tian J.* Simultaneous refractive index and thickness measurement of biotissue by optical coherence tomography // J. Biomed. Opt. 2002. V. 7. P. 628–632.
1410. *Alexandrov S. A., Zvyagin A. V., Silva K. K. M. B. D., Sampson D. D.* Bifocal optical coherence refractometry of turbid media // Opt. Lett. 2003. V. 28. P. 117–119.
1411. *Zvyagin A. V., Silva K. K. M. B. D., Alexandrov S. A., Hillman T. R., Armstrong J. J., Tsuzuki T., Sampson D. D.* Refractive index tomography of turbid media by bifocal optical coherence refractometry // Opt. Express. 2003. V. 11. P. 3503–3517.
1412. *Zysk A. M., Adie S. G., Armstrong J. J., Leigh M. S., Paduch A., Sampson D. D., Nguyen F. T., Boppart S. A.* Needle-based refractive index measurement using low-coherence interferometry // Opt. Lett. 2007. V. 32. P. 385–387.
1413. *Kim Y. L., Walsh Jr. J. T., Goldstick T. K., Glucksberg M. R.* Variation of corneal refractive index with hydration // Phys. Med. Biol. 2004. V. 49. P. 859–868.
1414. *Drexler W., Hitzenberger C. K., Baumgartner A., Findl O., Sattmann H., Fercher A. F.* Investigation of dispersion effects in ocular media by multiple wavelength partial coherence interferometry // Exp. Eye Res. 1998. V. 66. P. 25–33.
1415. *Lin R. C., Shure M. A., Rollins A. M., Izatt J. A., Huang D.* Group index of the human cornea at 1.3- μm wavelength obtained *in vitro* by optical coherence domain reflectometry // Opt. Lett. 2004. V. 29. P. 83–85.
1416. *Gelikonov G. V., Gelikonov V. M., Ksenofontov S. U., Morosov A. N., Myakov A. V., Potapov Yu. P., Saposhnikova V. V., Sergeeva E. A., Shabanov D. V., Shakhova N. M., Zagainova E. V.* Optical Coherence Microscopy. Chapter 27 // Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science. V. 2 / Ed. by V. V. Tuchin. Second edition. Berlin, Heidelberg, N.Y.: Springer-Verlag, 2012. P. 1127–1156.
1417. *Schmitt J. M., Yadlowsky M., Bonner R. F.* Subsurface imaging of living skin with optical coherence microscopy // Dermatology. 1995. V. 191. P. 93–98.
1418. *Vargas G., Chan K. F., Thomsen S. L., Welch A. J.* Use of osmotically active agents to alter optical properties of tissue: Effects on the detected fluorescence signal measured through skin // Lasers Surg. Med. 2001. V. 29. P. 213–220.

1419. Gebhart S. C., Lin W. C., Mahadevan-Jansen A. *In vitro* determination of normal and neoplastic human brain tissue optical properties using inverse adding-doubling // *Phys. Med. Biol.* 2006. V. 51. P. 2011–2027.
1420. Salomatina E., Jiang B., Novak J., Yaroslavsky A. N. Optical properties of normal and cancerous human skin in the visible and near infrared spectral range // *J. Biomed. Opt.* 2006. V. 11, № 6. P. 064026.
1421. Clark A. L., Gillenwater A., Alizadeh-Naderi R., El-Naggar A. K., Richards-Kortum R. Detection and diagnosis of oral neoplasia with an optical coherence microscope // *J. Biomed. Opt.* 2004. V. 9, № 6. P. 1271–1280.
1422. Chan D., Sculz B., Rübhausen M., Wessel S., Wepf R. Structural investigations of human hairs by spectrally resolved ellipsometry // *J. Biomed. Opt.* 2006. V. 11, № 1. P. 014029-1–6.
1423. Fercher A. F., Briers J. D. Flow visualization by means of single-exposure speckle photography // *Opt. Commun.* 1981. V. 37. P. 326–329.
1424. Løkberg O. J. Speckles and speckle techniques for biomedical applications // *Proc. SPIE.* 1991. V. 1524. P. 35–47.
1425. *Laser Speckle and Related Phenomena* / Ed. by J. C. Dainty. 2nd ed. N. Y.: Springer-Verlag, 1984.
1426. Goodman J. W. *Speckle Phenomena in Optical: Theory and Applications* // Englewood, Colorado: Roberts and Company, 2007.
1427. Dainty J. C. The statistics of speckle patterns // *Progress in Optics XIV* / Ed. by E. Wolf. Amsterdam: North Holland, 1976. P. 3–48.
1428. Francon M. *Laser Speckle and Applications in Optics*. N. Y.: Academic Press, 1979.
1429. Jones R., Wykes C. *Holographic and Speckle Interferometry*. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1983.
1430. Wolf E. *Introduction to the Theory of Coherence and Polarization of Light*. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2007.
1431. Berne B. J., Pecora R. *Dynamic Light Scattering. With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. N. Y.: Dover Publications, Inc., 2000.
1432. Yoshimura T. Statistical properties of dynamic speckles // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1986. V. 3, № 7. P. 1032–1054.
1433. Зимняков Д. А. Статистические свойства многократно рассеянного когерентного света // *Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 1* / Под ред. В. В. Тучина. М.: Физматлит, 2007. С. 234–272.
1434. Галанжа Е. И., Бриль Г. Е., Айзу Й., Ульянов С. С., Тучин В. В. Использование динамики спеклов и эффекта Доплера при исследовании микропотоков лимфы и крови // *Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 2* / Под ред. В. В. Тучина. М.: Физматлит, 2007. С. 199–240.
1435. Зимняков Д. А., Брайерс Дж. Д., Тучин В. В. Спекл-корреляционные методы анализа структуры биологических тканей и модельных сред // *Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 2* / Под ред. В. В. Тучина. М.: Физматлит, 2007. С. 284–323.
1436. Киркпатрик Ш. Дж., Дункан Д. Д. Оптическое тестирование механических свойств тканей // *Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 2* / Под ред. В. В. Тучина. М.: Физматлит, 2007. С. 324–357.
1437. Zimnyakov D. A., Tuchin V. V. Speckle Correlometry // *Biomedical Photonics Handbook* / Ed. by T. Vo-Dinh. Boca Raton: CRC Press, 2003. P. 14-1–23.
1438. Zimnyakov D. A. Light correlation and polarization in multiply scattering media: Industrial and biomedical applications. Chapter 1 // *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science. V. 1* / Ed. by V. V. Tuchin. Second edition. Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 2012. P. 3–66.
1439. Luo Q., Jiang C., Li P., Cheng H., Wang Z., Wang Z., Tuchin V. V. Laser speckle imaging of cerebral blood flow. Chapter 5 // *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science. V. 1* / Ed. by V. V. Tuchin. Second edition. Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 2012. P. 167–212.

1440. *Boas D. A., Dunn A. K.* Laser speckle contrast imaging in biomedical optics // *J. Biomed. Opt.* 2010. V. 15, № 1. P. 011109.
1441. *Ryabukho V. P.* Diffraction of interference fields on random phase objects. Chapter 7 // *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science. V. 1* / Ed. by V. V. Tuchin. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004. P. 235–318.
1442. *Fedosov I. V., Ulyanov S. S., Galanzha E. I., Galanzha V. A., Tuchin V. V.* Laser Doppler and speckle techniques for bioflow measurements. Chapter 10 // *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science V. 1* / Ed. by V. V. Tuchin. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004. P. 397–435.
1443. *Fedosov I. V., Tuchin V. V.* Bioflow measuring: Laser Doppler and speckle techniques. Chapter 13 // *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science. V. 1* / Ed. by V. V. Tuchin. Second edition. Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 2012. P. 487–564.
1444. *Zakharov P., Scheffold F.* Advances in dynamic light scattering techniques // *Light Scattering Reviews 4* / Ed. by A. A. Kokhanovsky. Heidelberg: Springer, 2009. P. 433–468.
1445. *Daly S. M., Leahy M. J.* Go with the flow: A review of methods and advancements in blood flow imaging // *J. Biophoton.* 2012. Jun 18; doi: 10.1002/jbio.201200071.
1446. *Зимняков Д. А., Тучин В. В., Утц С. Р.* Исследование статистических свойств частично развитых спекл-полей применительно к диагностике структурных изменений кожи человека // *Опт. спектр.* 1994. Т. 76, № 5. С. 838–844.
1447. *Ul'yanov S. S., Zimnyakov D. A., Tuchin V. V.* Fundamentals and applications of dynamic speckles induced by focused laser beam scattering // *Opt. Eng.* 1994. V. 33, № 10. P. 3189–3201.
1448. *Ul'yanov S. S., Ryabukho V. P., Tuchin V. V.* Speckle interferometry for biotissue vibration measurement // *Opt. Eng.* 1994. V. 33, № 3. P. 908–914.
1449. *Ryabukho V. P., Khomutov V. L., Tuchin V. V., Lyakin D. V., Konstantinov K. V.* Laser interferometer with an object sharply focused beam as a tool for optical tomography // *Proc. SPIE.* 1998. V. 3251. P. 247–252.
1450. *Ахманов С. А., Дьяков Ю. Е., Чиркин А. С.* Введение в статистическую радиофизику и оптику / 2-е изд., перераб. и доп. М.: Физматлит, 2010.
1451. *Bandyopadhyay R., Gittings A. S., Suh S. S., Dixon P. K., Durian D. J.* Speckle-visibility spectroscopy: a tool to study time-varying dynamics // *Rev. Sci. Instrum.* 2005. V. 76. P. 093110.
1452. *Parthasarathy A. B., Tom W. J., Gopal A., Zhang X., Dunn A. K.* Robust flow measurement with multi-exposure speckle imaging // *Opt. Express.* 2008. V. 16. P. 1975–1989.
1453. *Zakharov P., Volker A., Buck A., Weber B., Scheffold F.* Quantitative modeling of laser speckle imaging // *Opt. Lett.* 2006. V. 31. P. 3465–3467.
1454. *Kirkpatrick S. J., Duncan D. D., Wells-Gray E. M.* Detrimental effects of speckle-pixel size matching in laser speckle contrast imaging // *Opt. Lett.* 2008. V. 33. P. 2886–2888.
1455. *Duncan D. D., Kirkpatrick S. J., Wang R. K.* Statistics of local speckle contrast // *J. Opt. Soc. Am. A Opt. Image Sci. Vis.* 2008. V. 25. P. 9–15.
1456. *Duncan D. D., Kirkpatrick S. J.* Can laser speckle flowmetry be made a quantitative tool? // *J. Opt. Soc. Am. A Opt. Image Sci. Vis.* 2008. V. 25. P. 2088–2094.
1457. *Duncan D. D., Kirkpatrick S. J.* The copula: a tool for simulating speckle dynamics // *J. Opt. Soc. Am. A.* 2008. V. 25, № 1. P. 231–237.
1458. *Tom W. J., Ponticorvo A., Dunn A. K.* Efficient processing of laser speckle contrast images // *IEEE Trans. Med. Imaging.* 2008. V. 27. P. 1728–1738.
1459. *Ramirez-San-Juan J. C., Ramos-Garcia R., Guizar-Iturbide I., Martinez-Niconoff G., Choi B.* Impact of velocity distribution assumption on simplified laser speckle imaging equation // *Opt. Express.* 2008. V. 16. P. 3197–3203.
1460. *Shepherd A. P., Öberg P. Å.* Laser Doppler Blood Flowmetry. Boston, Kluwer, 1990.

1461. *Fein M. E., Gluskin A. H., Goon W. W. Y., Chew B. D., Crone W. A., Jones H. W.* Evolution of optical methods of detecting dental pulp vitality // *J. Biomed. Opt.* 1997. V. 2, № 1. P. 58–73.
1462. *de Mul F. F. M., Koelink M. H., Weijers A. L. et al.* Self-mixing laser-Doppler velocimetry of liquid flow and blood perfusion of tissue // *Appl. Opt.* 1992. V. 31. P. 5844–5851.
1463. *Leahy M., Enfield J. G., Clancy N. T., O'Doherty J., McNamara P., Nilsson G. E.* Biophotonic methods in microcirculation imaging // *Med. Laser Appl.* 2007. V. 22. P. 105–126.
1464. *Handbook of Non-Invasive Methods and the Skin* / Ed. by J. Serup, B. E. Jemee. Boca Raton et al.: CRC Press, 1995.
1465. *Рябухо В. П., Аветисян Ю. А., Гриневич А. Е., Зимняков Д. А., Голубенцева Л. И.* Эффекты корреляции спекл-полей при дифракции пространственно-модулированного лазерного пучка на случайном фазовом экране // *Письма в ЖТФ.* 1994. Т. 20, № 11. С. 74–78.
1466. *Ryabukho V. P., Chaussky A. A., Tuchin V. V.* Interferometric testing of the random phase objects by focused spatially-modulated laser beam // *Photon. Optoelectron.* 1995. V. 3. P. 77–85.
1467. *Рябухо В. П., Чаусский А. А., Перепелицына О. А.* Формирование изображения интерференционной картины в оптической системе со случайным фазовым экраном в пространственно-частотной плоскости // *Опт. спектр.* 2002. Т. 92, № 2. С. 220–227.
1468. *Optical Engineering in Ophthalmology* / Ed. by S. Jutamulia, T. Asakura // *Opt. Eng.* 1995. V. 34, № 3. P. 640–707.
1469. *Ansari R. R.* Quasi-elastic light scattering in ophthalmology, Chapter 14 // *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science. V. 1* / Ed. by V. V. Tuchin. Second edition. Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 2012. P. 565–592.
1470. *Dhadwal H. S., Ansari R. R., DellaVecchia M. A.* Coherent fiber optic sensor for early detection of cataractogenesis in the human eye lens // *Opt. Eng.* 1993. V. 32. P. 233–238.
1471. *Dieckman M., Dierks K.* Diagnostics methods and tissue parameter investigations together with measurement results (*in vivo*) // *Proc. SPIE.* Bellingham, SPIE. 1995. V. 2126. P. 331–345.
1472. *Ulyanov S. S.* New type of manifestation of the doppler effect: an application to blood and lymph flow measurements // *Opt. Eng.* 1995. V. 34. P. 2850–2855.
1473. *Ulyanov S. S., Tuchin V. V., Bednov A. A., Brill G. E., Zakharova E. I.* The application of speckle-interferometry method for the monitoring of blood and lymph flow in microvessels // *Lasers Med. Sci.* 1996. V. 11. P. 97–107.
1474. *Беднов А., Ульянов С. С., Тучин В. В., Брилли Г. Е., Захарова Е. И.* Исследование динамики лимфотока методами спекл-интерферометрии // *Изв. вузов. Прикл. нелинейн. динам.* 1996. Т. 4, № 6. С. 45–54.
1475. *Ulyanov S. S.* Speckled speckle statistics with a small number of scatterers: implication for blood flow measurement // *J. Biomed. Opt.* 1998. V. 3. P. 237–245.
1476. *Starukhin P., Ulyanov S., Galanzha E., Tuchin V.* Blood-flow measurements with a small number of scattering events // *Appl. Opt.* 2000. V. 39, № 10. P. 2823–2829.
1477. *Ulyanov S. S., Tuchin V. V.* Use of low-coherence speckled speckles for bioflow measurements // *Appl. Opt.* 2000. V. 39, № 34. P. 6385–6389.
1478. *Федосов И. В., Тучин В. В., Галанжа Е. И., Соловьева А. В., Степанова Т. В.* Регистрация динамики лимфотока в микрососудах с использованием корреляционных свойств рассеянного когерентного излучения // *Квант. электрон.* 2002. Т. 32. С. 970–974.
1479. *Konishi N., Fujii H.* Real-time visualization of retinal microcirculation by laser flowgraphy // *Opt. Eng.* 1995. V. 34. P. 753–757.
1480. *Tamaki Y., Araie M., Kawamoto E., Eguchi S., Fujii H.* Noncontact, two-dimensional measurement of retinal microcirculation using laser speckle phenomenon // *Inv. Ophthalmol. Visual Sci.* 1994. V. 35. P. 3825–3834.
1481. *Essex T. J. H., Byrne P. O.* A laser Doppler scanner for imaging blood flow in skin // *J. Biomed. Eng.* 1991. V. 13. P. 189–194.

1482. *Wårdell K., Braverman I. M., Silverman D. G., Nilsson G. E.* Spatial heterogeneity in normal skin perfusion recorded with laser Doppler imaging and flowmetry // *Microvascular Res.* 1994. V. 48. P. 26–38.
1483. *Leahy M. J., de Mul F. F. M., Nilsson G. E., Maniewski R.* Principles and practice of the laser-Doppler perfusion technique // *Technol. Health Care.* 1999. V. 7. P. 143–162.
1484. *Briers J. D., Richards G., He X. W.* Capillary blood flow monitoring using speckle contrast analysis (LASCA) // *J. Biomed. Opt.* 1999. V. 4, № 1. P. 164–175.
1485. *Zimnyakov D. A., Tuchin V. V.* Optical medical tomography // *Lasers in Medicine / Ed. by D. R. Vij, K. Mahesh.* Boston, Dordrecht. London: Kluwer Academic Publishers, 2002. P. 147–194.
1486. *Cheng H., Luo Q., Liu Q., Lu Q., Gong H., Zeng S.* Laser speckle imaging of blood flow in microcirculation // *Phys. Med. Biol.* 2004. V. 49. P. 1347–1357.
1487. *Cheng H., Luo Q., Wang Z., Gong H., Chen S., Liang W., Zeng S.* Efficient characterization of regional mesentric blood flow by use of laser speckle imaging // *Appl. Opt.* 2004. V. 42, № 28. P. 5759–5764.
1488. *Choi B., Kang N. M., Nelson J. S.* Laser speckle imaging for monitoring blood flow dynamics in the *in vivo* rodent dorsal skin fold model // *Microvasc. Res.* 2004. V. 68. P. 143–146.
1489. *Dacosta G.* Optical remote sensing of heartbeats // *Opt. Commun.* 1995. V. 117. P. 395–398.
1490. *Serov A., Steinacher B., Lasser T.* Full-field laser Doppler perfusion imaging and monitoring with an intelligent CMOS camera // *Opt. Express.* 2005. V. 13. P. 3681–3689.
1491. *Serov A., Lasser T.* High-speed laser Doppler perfusion imaging using an integrating CMOS image sensor // *Opt. Express.* 2005. V. 13, № 17. P. 6416–6428.
1492. *Weitz D. A., Pine D. J.* Diffusing-wave spectroscopy. Chapter 16 // *Dynamic Light Scattering. The Method and Some Applications / Ed. by W. Brown.* N. Y.: Oxford University Press, 1993. P. 652–720.
1493. *Меглинский И. В., Королевич А. Н., Тучин В. В.* Исследование микроциркуляции кровотока методом диффузионно-волновой спектроскопии // *Биомед. радиоэлектр.* 2000. № 10. С. 37–45.
1494. *Meglinski I. V., Tuchin V. V.* Diffusing wave spectroscopy: Application for blood diagnostics, Chapter 4 // *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science. V. 2 / Ed. by V. V. Tuchin.* Second edition. Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 2012. P. 149–167.
1495. *Durduran T., Zhou C., Buckley E. M., Kim M. N., Yu G., Choe R., Gaynor J. W., Spray T. L., Durning S. M., Mason S. E., Montenegro L. M., Nicolson S. C., Zimmerman R. A., Putt M. E., Wang J., Greenberg J. H., Detre J. A., Yodh A. G., Licht D. J.* Optical measurement of cerebral hemodynamics and oxygen metabolism in neonates with congenital heart defects // *J. Biomed. Opt.* 2010. V. 15, № 3. P. 037004-1–10.
1496. *Фомин Н. А.* Спекл-интерферометрия газовых потоков. Минск: Наука и техника, 1989; *Fomin N. A.* Speckle Photography for Fluid Mechanic Measurements: Experimental Fluid Mechanics. Berlin: Springer-Verlag, 1998.
1497. *Maret G., Wolf E.* Multiple light scattering from disordered media. The effect of brownian motion of scatterers // *Z. Physik B — Condens. Matter.* 1987. V. 65. P. 409–413.
1498. *Yodh A. G., Kaplan P. D., Pine D. J.* Pulsed diffusing-wave spectroscopy: High resolution through nonlinear optical gating // *Phys. Rev. B.* 1990. V. 42. P. 4744–4747.
1499. *Boas D. A., Campbell L. E., Yodh A. G.* Scattering and imaging with diffusing temporal field correlations // *Phys. Rev. Lett.* 1995. V. 75. P. 1855–1858.
1500. *Pine D. J., Weitz D. A., Zhu J. X., Hebolzheimer E.* Diffusing-wave spectroscopy: Dynamic light scattering in the multiple scattering limit // *J. Phys. France.* 1990. V. 51. P. 2101–2127.
1501. *Wu X.-L., Pine D. J., Chaikin P. M., Huang J. S., Weitz D. A.* Diffusing-wave spectroscopy in shear flow // *J. Opt. Soc. Am. B.* 1990. V. 7, № 1. P. 15–20.
1502. *Handbook of Biological Confocal Microscopy / Ed. by J. B. Pawley.* N. Y.: Plenum Press, 1990.

1503. Selected papers on confocal microscopy. V. MS131 / Ed. by B. Masters. Bellingham: SPIE Press, 1996.
1504. Confocal microscopy / Ed. by T. Wilson. London: Academic Press, 1990.
1505. Wilson T. Confocal microscopy // Biomedical Photonics Handbook / Ed. by T. Vo-Dinh. Boca Rotan, Florida: CRC Press, 2003. P. 10-1-18.
1506. Jacques S. L. Confocal scanning laser microscopy using scattering as the contrast mechanism, chapter 28 // Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science. V. 2 / Ed. by V. V. Tuchin. Second edition. Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 2012. P. 1157-1172.
1507. Watson T. F. Application of high-speed confocal imaging techniques in operative dentistry // Scanning. 1994. V. 16. P. 168-173.
1508. Masters B. R., Thaer A. A. Real time scanning slit confocal microscopy of the *in vivo* human cornea // Appl. Opt. 1994. V. 33. P. 695-701.
1509. Masters B. R., Thaer A. A. *In vivo* real-time confocal microscopy of wing cells in the human cornea: a new benchmark for *in vivo* corneal microscopy // Bioimages. 1995. V. 3, № 1. P. 7-11.
1510. Rajadhyaksha M., Grossman M., Esterowitz D., Webb R. H., Anderson R. R. *In vivo* confocal scanning laser microscopy of human skin: Melanin provides strong contrast // J. Invest. Dermatol. 1995. V. 104. P. 946-952.
1511. Rajadhyaksha M., Zavislan J. M. Confocal reflectance microscopy of unstained tissue *in vivo* // Retinoids. 1998. V. 14, № 1. P. 26-30.
1512. Rajadhyaksha M., Anderson R. R., Webb R. H. Video-rate confocal scanning laser microscope for imaging human tissues *in vivo* // Appl. Opt. 1999. V. 38. P. 2105-2115.
1513. Masters B. Confocal microscopy of biological tissues // Proc. SPIE. 1996. V. 2732. P. 155-167.
1514. Bohnke M., Masters B. R. Confocal microscopy of the cornea // Prog. Retinal Eye Res. 1999. V. 18, № 5. P. 553-628.
1515. Beebe D. C., Masters B. Cell lineage and the differentiation of corneal epithelial cells // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1996. V. 37, № 9. P. 1815-1825.
1516. Masters B. R. Three-dimensional confocal microscopy of the living *in situ* rabbit cornea // Opt. Express. 1998. V. 3, № 9. P. 351-355.
1517. Masters B. R., Gonnord G., Corcuff P. Three-dimensional microscopic biopsy of *in vivo* human skin: a new technique based on a flexible confocal microscope // J. Microsc. 1997. V. 185. P. 329-338.
1518. Kimura Y., Wilder-Smith P., Krasieva T., Arrastia-Iitosho A. M. A., Liaw L.-H. L., Matsumoto K. Visualization and quantification of dentin structure using confocal laser scanning microscopy // J. Biomed. Opt. 1997. V. 2, № 3. P. 267-274.
1519. Kempe M., Genak A. Z., Rudolph W., Dorn P. Ballistic and diffuse light detection in confocal and heterodyne imaging systems // J. Opt. Soc. Am. A. 1997. V. 14, № 1. P. 216-223.
1520. Kempe M., Rudolph W., Welsch E. Comparative study of confocal and heterodyne microscopy for imaging through scattering media // J. Opt. Soc. Am. A. 1996. V. 13, № 1. P. 46-52.
1521. Меглинский И. В., Башкатов А. Н., Генина Э. А., Чурмаков Д. Ю., Тучин В. В. Исследование возможности увеличения глубины зондирования методом отражательной конфокальной микроскопии при иммерсионном просветлении приповерхностных слоев кожи человека // Квант. электрон. 2002. Т. 32, № 10. С. 875-882.
1522. Collier T., Follen M., Malpica A., Richards-Kortum R. Sources of scattering in cervical tissue: determination of the scattering coefficient by confocal microscopy // Appl. Opt. 2005. V. 44. P. 2072-2081.
1523. Gareau D. S., Merlino G., Corless C., Kulesz-Martin M., Jacques S. L. Noninvasive imaging of melanoma with reflectance mode confocal scanning laser microscopy in a murine model // J. Invest. Dermatol. 2007. V. 27, № 9. P. 2184-2190.

1524. *Samatham R., Jacques S.L., Campagnola P.* Optical properties of mutant versus wild-type mouse skin measured by reflectance-mode confocal scanning laser microscopy (rCSLM) // *J. Biomed. Opt.* 2008. V. 13. P. 041309.
1525. *Samatham R., Phillips K.G., Jacques S.L.* Assessment of optical clearing agents using reflectance-mode confocal scanning laser microscopy // *J. Innov. Opt. Health Sci.* 2010. V. 3, № 3. P. 183–188.
1526. *Jacques S.L., Levitz D., Samatham R., Choudhury N., Truffer F., Gareau D.S.* Light scattering in confocal reflectance microscopy, chapter 7 // *Biomedical Applications of Light Scattering* / Ed. by A. Wax, V. Backman. N.Y.: McGraw Hill Publishing, 2010.
1527. *Yaroslavsky A.N., Barbosa J., Neel V., DiMarzio C., Anderson R.R.* Combining multi-spectral polarized-light imaging and confocal microscopy for localization of nonmelanoma skin cancer // *J. Biomed. Opt.* 2005. V. 10, № 1. P. 014011-1–6.
1528. *Yaroslavsky A.N., Patel R., Salomatina E., Li C., Lin C., Al-Arashi M., Neel V.* High-contrast mapping of basal cell carcinomas // *Opt. Lett.* 2012. V. 37, № 4. P. 644–646.
1529. *Мухомов А. П., Архипова С. С., Никольский Е. Е.* Современная световая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях. М: Наука, 2011.
1530. *Huang D., Swanson E.A., Lin C.P., Schuman J.S., Stinson W.G., Chang W., Hee T., Floette M.R., Gregory K., Puliafito C.A., Fujimoto J.G.* Optical coherence tomography // *Science.* 1991. V. 254. P. 1178–1181.
1531. *Izatt J.A., Kulkarni M.D., Kobayashi K. et al.* Optical coherence tomography for biodiagnostics // *Opt. Photon. News.* 1997. V. 8, № 5. P. 41–47, 65.
1532. *Fercher A.F., Drexler W., Hitzenberger C.K.* Ocular partial-coherence interferometry // *Coherence-domain methods in biomedical optics* / Ed. by V.V. Tuchin. Bellingham: SPIE. 1996. V. 2732. P. 210–228.
1533. *Fercher A.F., Drexler W., Hitzenberger C.K.* Ocular partial-coherence tomography / Ed. by V.V. Tuchin. Bellingham: SPIE. 1996. V. 2732. P. 229–241.
1534. *Schmitt J.M.* Array detection for speckle reduction in optical coherence microscopy // *Phys. Med. Biol.* 1997. V. 42. P. 1427–1439.
1535. *Геликонов В. М., Геликонов Г. В., Гладкова Н. Д. и др.* Когерентная оптическая томография микронеоднородностей биотканей // *Письма ЖЭТФ.* 1995. Т. 61. С. 149–153.
1536. *Schmitt J.M., Knüttel A.* Model of optical coherence tomography of heterogeneous tissue // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1997. V. 14. P. 1231–1242.
1537. *Häusler G., Herrmann J.M., Kummer R., Linder M.W.* Observation of light propagation in volume scatterers with 10^{11} -fold slow motion // *Opt. Lett.* 1996. V. 21. P. 1087–1089.
1538. *Tearny G.J., Brezinsky M.E., Bouma B.E. et al.* Optical coherence tomography // *Science.* 1997. V. 276. P. 2037–2039.
1539. *Chen Z., Milner T., Srinivas S. et al.* Noninvasive imaging of *in vivo* blood flow velocity using optical Doppler tomography // *Opt. Lett.* 1997. V. 22. P. 1119–1121.
1540. *Fujimoto J.G., Pitris C., Boppart S.A., Brezinski M.E.* Optical coherence tomography: an emerging technology for biomedical imaging and optical biopsy // *Neoplasia.* 2000. V. 2. P. 9–25.
1541. *Schmitt J.M.* Restoration of optical coherence images of living tissue using the CLEAN algorithm // *J. Biomed. Opt.* 1998. V. 3, № 1. P. 66–75.
1542. *Colston B.W. (Jr.), Everett M.J., Da Silva L.B., Otis L.L., Stroeve P., Nathel H.* Imaging of hard- and soft-tissue structure in the oral cavity by optical coherence tomography // *Appl. Opt.* 1998. V. 37, № 16. P. 3582–3585.
1543. *Schmitt J.M., Lee S.L., Yung K.M.* An optical coherence microscope with enhanced resolving power in thick tissue // *Opt. Commun.* 1997. V. 142. P. 203–207.
1544. *Schmitt J.M., Xiang S.H.* Cross-polarized backscatter in optical coherence tomography of biological tissue // *Opt. Lett.* 1998. V. 23, № 13. P. 1060–1062.
1545. *Barton J.K., Milner T.E., Pfeifer T.J. et al.* Optical low-coherence reflectometry to enhance Monte Carlo modeling of skin // *J. Biomed. Opt.* 1997. V. 2, № 2. P. 226–234.

1546. Brunner H., Lazar R., Steiner R. Optical coherence tomography (OCT) of human skin with a slow-scan CCD-camera // OSA TOPS 6. Washington, DC: Optical Society of America, 1996. P. 50–55.
1547. Lankenau E., Welzel J., Birngruber R., Engelhardt R. *In vivo* tissue measurements with optical low coherence tomography // Proc. SPIE. 1995. V. 2981. P. 78–84.
1548. Hitzenberger C. K., Drexler W., Baumgartner A., Fercher A. F. Dispersion effects in partial coherence interferometry // Proc. SPIE. 1997. V. 2981. P. 29–36.
1549. Podoleanu A. G., Seeger M., Dobre G. M. et al. Transversal and longitudinal images from the retina of the living eye using low coherence reflectometry // J. Biomed. Opt. 1998. V. 3, № 1. P. 12–20.
1550. Häusler G., Lindner M. W. «Coherence Radar» and «Spectral Radar» — new tools for dermatological diagnosis // J. Biomed. Opt. 1998. V. 3, № 1. P. 21–31.
1551. Baumgartner A., Hitzenberger C. K., Sattmann H. et al. Signal and resolution enhancements in dual beam optical coherence tomography of the human eye // J. Biomed. Opt. 1998. № 3, № 1. P. 45–54.
1552. Drexler W., Findl O., Menapace R. et al. «Dual beam optical coherence tomography: signal identification for ophthalmologic diagnosis // J. Biomed. Opt. 1998. V. 3, № 1. P. 55–65.
1553. Bouma B., Nelson L. E., Tearney G. J. et al. Optical coherence tomographic imaging of human tissue at 1.55 μm and 1.81 μm using Er- and Tm-doped fiber sources // J. Biomed. Opt. 1998. V. 3, № 1. P. 76–79.
1554. Walti R., Bohnke M., Gianotti R. et al. Rapid and precise *in vivo* measurement of human corneal thickness with optical low-coherence reflectometry in normal human eyes // J. Biomed. Opt. 1998. V. 3, № 3. P. 253–258.
1555. Feldchtein F. I., Gelikonov G. V., Gelikonov V. M. et al. *In vivo* OCT imaging of hard and soft tissue of the oral cavity // Optics Express. 1998. V. 3, № 6. P. 239–250.
1556. Schmitt J. M. OCT elastography: imaging microscopic deformation and strain in tissue // Optics Express. 1998. V. 3. P. 199–211.
1557. Wang X., Milner T., Chen Z., Nelson J. S. Measurement of fluid-flow-velocity profile in turbid media by the use of optical Doppler tomography // Appl. Opt. 1997. V. 36, № 1. P. 144–149.
1558. Chen Z., Milner T., Wang X. et al. Optical Doppler tomography: imaging *in vivo* blood flow dynamics following pharmacological intervention and photodynamic therapy // Photochem. Photobiol. 1998. V. 67, № 1. P. 56–60.
1559. Izatt J. A., Kulkarni M. D., Yazdanfar S. *In vivo* bidirectional color Doppler flow imaging of picoliter blood volumes using optical coherence tomography // Opt. Lett. 1997. V. 22, № 18. P. 1439–1441.
1560. Boas D. A., Bizheva K. K., Siegel A. M. Using dynamic low-coherence interferometry to image Brownian motion within highly scattering media // Opt. Lett. 1998. V. 23, № 5. P. 319–321.
1561. Kolinko V. G., de Mul F. F. M., Greve J., Priezzhev A. V. Feasibility of picosecond laser-Doppler flowmetry provides basis for time-resolved Doppler tomography of biological tissue // J. Biomed. Opt. 1998. V. 3, № 2. P. 187–190.
1562. Masters B. Early development of optical low-coherence reflectometry and some recent biomedical applications // J. Biomed. Opt. 1999. V. 4, № 2. P. 236–247.
1563. Hitzenberger C. K. Absorption and dispersion in OCT. Chapter 15 in Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science / Ed. by V. V. Tuchin. Boston, Kluwer Academic Publishers. 2004. V. 2. P. 119–161.
1564. Podoleanu A. Flying spot *en-face* OCT imaging. Chapter 18 // Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science. V. 2 / Ed. by V. V. Tuchin. Second edition. Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 2012. P. 799–856.
1565. de Boer J. F. Polarization sensitive optical coherence tomography: Phase sensitive interferometry for multi-functional imaging. Chapter 19 // Coherent-Domain Optical Methods:

- Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science. V.2 / Ed. by V. V. Tuchin. Second edition. Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 2012. P. 857–888.
1566. *Chen Z., Liu G.* Doppler optical coherence tomography. Chapter 20 // *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science. V. 2* / Ed. by V. V. Tuchin. Second edition. Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 2012. P. 898–922.
1567. *Neerken S., Lucassen G. W., Nuijs T.(A.M.), Lenderink E., Hendriks R. F. M.* Comparison of confocal laser scanning microscopy and optical coherence tomography, Chapter 19 // *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science* / Ed. by V. V. Tuchin. Boston: Kluwer Academic Publishers. 2004. V. 2. P. 417–439.
1568. *Reil F., Thomas J. E.* Heterodyne techniques for characterizing light fields. Chapter 8 // *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science* / Ed. by V. V. Tuchin. Boston: Kluwer Academic Publishers. 2004. V. 2. P. 319–351.
1569. *Roth S., Freund I.* Second harmonic generation in collagen // *J. Chem. Phys.* 1979. V. 70. P. 1637–1643.
1570. *Freund I., Deutsch M., Sprecher A.* Connective tissue polarity // *Biophys. J.* 1986. V. 50. P. 693–712.
1571. *Campagnola P. J., Clark H. A., Mohler W. A., Lewis A., Loew L. M.* Second-harmonic imaging microscopy of living cells // *J. Biomed. Opt.* 2001. V. 6, № 3. P. 277–286.
1572. *Campagnola P. J., Millard A. C., Terasaki M., Hoppe P. E., Malone S. J., Mohler W. A.* Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues // *Biophys. J.* 2002. V. 82, № 2. P. 493–508.
1573. *Campagnola P. J., Loew L. M.* Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. P. 1356–1360.
1574. *Brown E., McKee T. diTomaso E., Pluen A., Seed B., Boucher Y., Jain R. K.* Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors *in vivo* using second-harmonic generation // *Nat. Med.* 2003. V. 9, № 6. P. 796–801.
1575. *Stoller P., Kim B.-M., Rubenchik A. M.* Polarization-dependent optical second-harmonic imaging of a rat-tail tendon // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, № 2. P. 205–214.
1576. *Stoller P., Reiser K. M., Celliers P. M., Rubenchik A. M.* Polarization-modulated second-harmonic generation in collagen // *Biophys. J.* 2002. V. 82, № 2. P. 3330–3342.
1577. *Zoumi A., Yeh A. T., Tromberg B. J.* Imaging cells and extracellular matrix *in vivo* by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 11014–11019.
1578. *Yeh A. T., Choi B., Nelson J. S., Tromberg B. J.* Reversible dissociation of collagen in tissues // *J. Invest. Dermatol.* 2003. V. 121. P. 1332–1335.
1579. *Yasui T., Tohno Y., Araki T.* Characterization of collagen orientation in human dermis by two-dimensional second-harmonic-generation polarimetry // *J. Biomed. Opt.* 2004. V. 9, № 2. P. 259–264.
1580. *Han M., Zickler L., Giese G., Walter M., Loesel F. H., Bille J. F.* Second-harmonic imaging of cornea after intrastromal femtosecond laser ablation // *J. Biomed. Opt.* 2004. V. 9, № 4. P. 760–766.
1581. *Cicchi R., Sacconi L., Pavone F.* Nonlinear imaging of tissues. Chapter 20 // *Handbook of Photonics for Biomedical Science* / Ed. by V. V. Tuchin. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 509–545.
1582. *Wu Y., Li X.* Endomicroscopy technologies for high-resolution nonlinear optical imaging and optical coherence tomography. Chapter 21 // *Handbook of Photonics for Biomedical Science* / Ed. by V. V. Tuchin. London, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 547–573.
1583. *Sacconi L., Pavone F. S.* *In vivo* nanosurgery. Chapter 2 // *Laser Imaging and Manipulation in Cell Biology* / Ed. by F. S. Pavone. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010. P. 35–48.

1584. Williams R. M., Zipfel W. R., Webb W. W. Interpreting second-harmonic generation images of collagen I fibrils // *Biophys. J.* 2005. V. 88, № 2. P. 1377–1386.
1585. Plotnikov S. V., Millard A. C., Campagnola P. J., Mohler W. A. Characterization of the myosin-based source for second-harmonic generation from muscle sarcomeres // *Biophys. J.* 2006. V. 90, № 2. P. 693–703.
1586. Nadiarnykh O., Lacomb R. B., Campagnola P. J., Mohler W. A. Coherent and incoherent SHG in fibrillar cellulose matrices // *Opt. Express.* 2007. V. 15, № 6. P. 3348–3360.
1587. Lacomb R., Nadiarnykh O., Campagnola P. Quantitative second harmonic generation imaging of the diseased state osteogenesis imperfecta: experiment and simulation // *Biophys. J.* 2008. V. 94, № 11. P. 4504–4514.
1588. Lacomb R., Nadiarnykh O., Townsend S. S., Campagnola P. J. Phase matching considerations in second harmonic generation from tissues: Effects on emission directionality, conversion efficiency and observed morphology // *Opt. Commun.* 2008. V. 281, № 7. P. 1823–1832.
1589. Nadiarnykh O., LaComb R. B., Brewer M. A., Campagnola P. J. Alterations of the extracellular matrix in ovarian cancer studied by second harmonic generation imaging microscopy // *BMC Cancer.* 2010. V. 10, № 1. P. 94.
1590. Ajeti V., Nadiarnykh O., Ponik S. M., Keely P. J., Eliceiri K. W., Campagnola P. J. Structural changes in mixed Col I/Col V collagen gels probed by SHG microscopy: implications for probing stromal alterations in human breast cancer // *Biomed. Opt. Express.* 2011. V. 2, № 8. P. 2307–2316.
1591. Sacconi L., Mapelli J., Gandolfi D., Lotti J., O'Connor R. P., D'Angelo E., Pavone F. S. Optical recording of electrical activity in intact neuronal networks with random access second-harmonic generation microscopy // *Opt Express.* 2008. V. 16, № 19. P. 14911–14911.
1592. Cicchi R., Sestini S., De Giorgi V., Massi D., Lotti T., Pavone F. S. Nonlinear laser imaging of skin lesions // *J. Biophoton.* 2008. V. 1, № 1. P. 62–73.
1593. Cicchi R., Kapsokalyvas D., De Giorgi V., Maio V., Van Wiechen A., Massi D., Lotti T., Pavone F. S. Scoring of collagen organization in healthy and diseased human dermis by multiphoton microscopy // *J. Biophoton.* 2010. V. 3, № 1–2. P. 34–43.
1594. Raub C. B., Suresh V., Krasieva T., Lyubovitsky J., Mih J. D., Putnam A. J., Tromberg B. J., George S. C. Noninvasive assessment of collagen gel microstructure and mechanics using multiphoton microscopy // *Biophys. J.* 2007. V. 92, № 6. P. 2212–2222.
1595. Légaré F., Pfeiffer C., Olsen B. R. The role of backscattering in SHG tissue imaging // *Biophys. J.* 2007. V. 93, № 4. P. 1312–1320.
1596. Tiaho F., Recher G., Rouède D. Estimation of helical angles of myosin and collagen by second harmonic generation imaging microscopy // *Opt. Express.* 2007. V. 15, № 19. P. 12286–12295.
1597. König K. Clinical multiphoton tomography // *J. Biophoton.* 2008. V. 1. P. 13–23.
1598. Han X. X., Brown E. Measurement of the ratio of forward-propagating to back-propagating second harmonic signal using a single objective // *Opt. Express.* 2010. V. 18, № 10. P. 10538–10550.
1599. Su P. J., Chen W. L., Chen Y. F., Dong C. Y. Determination of collagen nanostructure from second-order susceptibility tensor analysis // *Biophys. J.* 2011. V. 100, № 8. P. 2053–2062.
1600. Hovhannisyan V. A., Hu P.-S., Tan H.-Y., Chen S.-J., Dong C.-Y. Spatial orientation mapping of fibers using polarization-sensitive second harmonic generation microscopy // *J. Biophoton.* 2012. V. 5, № 10. P. 768–776.
1601. Zimmerley M., McClure R. A., Choi B., Potma E. O. Following dimethyl sulfoxide skin optical clearing dynamics with quantitative nonlinear multimodal microscopy // *Appl. Opt.* 2009. V. 48, № 10. P. D79–D87.
1602. Li D., Zheng W., Zeng Y., Qu J. Y. *In vivo* and simultaneous multimodal imaging: Integrated multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering and two-photon microscopy // *Appl. Phys. Lett.* 2010. V. 97. P. 223702-1–3.
1603. Rodriguez L. G., Lockett S. J., Holtom G. R. Coherent anti-stokes Raman scattering microscopy: a biological review // *Cytometry A.* 2006. V. 69. P. 779–791.

1604. *Freudiger C. W., Min W., Saar B. G., Lu S., Holtom G. R., He C., Tsai J. C., Kang J. X., Xie X. S.* Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy // *Science*. 2008. V. 322. P. 1857–1861.
1605. *Krafft C., Popp J.* Raman and CARS microscopy of cells and tissues. Chapter 7 // *Handbook of Photonics for Biomedical Science* / Ed. by V. V. Tuchin. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 197–227.
1606. *Pohling C., Buckup T., Pagenstecher A., Motzkus M.* Chemoselective imaging of mouse brain tissue via multiplex CARS microscopy // *Biomed. Opt. Express*. 2011. V. 2, № 8. P. 2111–2116.
1607. *Yang Y., Li F., Gao L., Wang Z., Thrall M. J., Shen S. S., Wong K. K., Wong S. T. C.* Differential diagnosis of breast cancer using quantitative, label-free and molecular vibrational imaging // *Biomed. Opt. Express*. 2011. V. 2, № 8. P. 2160–2174.
1608. *Bélangier E., Crépeau J., Laffray S., Vallée R., De Koninck Y., Côté D.* Live animal myelin histomorphometry of the spinal cord with video-rate multimodal nonlinear microendoscopy // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17, № 2. P. 021107-1–7.
1609. *Parra S. G., Chia T. H., Zinter J. P., Levene M. J.* Multiphoton microscopy of cleared mouse organs // *J. Biomed. Opt.* 2010. V. 15, № 3. P. 036017-1–5.
1610. *Cicchi R., Pavone F. S., Massi D., Sampson D. D.* Contrast and depth enhancement in two-photon microscopy of human skin *ex vivo* by use of optical clearing agents // *Opt. Express*. 2005. V. 13. P. 2337–2344.
1611. *LaComb R., Nadiarnykh O., Carey S., Campagnola P. J.* Quantitative second harmonic generation imaging and modeling of the optical clearing mechanism in striated muscle and tendon // *J. Biomed. Opt.* 2008. V. 13, № 2. P. 021109.
1612. *Wenne M.* The most transparent research // *Nat. Med.* 2009. V. 15, № 10. P. 1106–1109.
1613. *Genina E. A., Bashkatov A. N., Tuchin V. V.* Tissue optical immersion clearing // *Expert Rev. Med. Devices*. 2010. V. 7, № 6. P. 825–842.
1614. *Larin K. V., Tuchin V. V.* Monitoring of glucose diffusion in epithelial tissues with optical coherence tomography. Chapter 9 // *Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues* / Ed. by V. V. Tuchin. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2009. P. 532–564.
1615. *Zhu D., Larin K., Luo Q., Tuchin V. V.* Recent progress in tissue optical clearing // *Laser Photonics Rev.* 2012.
1616. *Иванов А. П., Макаревич С. А., Хайруллина А. Я.* Распространение излучения в тканях и жидкостях с плотно упакованными рассеивателями // *ЖПС*. 1987. Т. 47. С. 662–668.
1617. *Аскарьян Г. А.* Увеличение прохождения лазерного и другого излучения через мягкие мутные физические и биологические среды // *Квант. электрон.* 1982. Т. 9, № 7. С. 1379–1383.
1618. *Veretout F., Delaye M., Tardieu A.* Molecular basis of lens transparency. Osmotic pressure and X-ray analysis of α -crystallin solutions // *J. Mol. Biol.* 1989. V. 205. P. 713–728.
1619. *Barer R., Joseph S.* Refractometry of living cells // *Q.J. Microsc. Sci.* 1954. V. 95. P. 399–406.
1620. *Eppich E., Beuthan J., Dressler C., Müller G.* Optical phase measurements on biological cells // *Laser Phys.* 2000. V. 10. P. 467–477.
1621. *Chance B., Liu H., Kitai T., Zhang Y.* Effects of solutes on optical properties of biological materials: models, cells, and tissues // *Anal. Biochem.* 1995. V. 227. P. 351–362.
1622. *Liu H., Beauvoit B., Kimura M., Chance B.* Dependence of tissue optical properties on solute — induced changes in refractive index and osmolarity // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1. P. 200–211.
1623. *Tuchin V. V.* Optical immersion as a new tool to control optical properties of tissues and blood // *Laser Phys.* 2005. V. 15, № 8. P. 1109–1136.
1624. *Tuchin V. V.* Optical clearing of tissue and blood using immersion method // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2005. V. 38. P. 2497–2518.

1625. *Bashkatov A. N., Tuchin V. V., Genina E. A., Sinichkin Yu. P., Lakodina N. A., Kochubey V. I.* The human sclera dynamic spectra: *in vitro* and *in vivo* measurements // Proc. SPIE. 1999. V. 3591. P. 311–319.
1626. *Tuchin V. V., Culver J., Cheung C., Tatarkova S. A., DellaVecchia M. A., Zimnyakov D. A., Chaussky A., Yodh A. G., Chance B.* Refractive index matching of tissue components as a new technology for correlation and diffusing-photon spectroscopy and imaging // Proc. SPIE. 1999. V. 3598. P. 111–120.
1627. Controlling of Tissue Optical Properties: Applications in Clinical Study // Proc. SPIE. V. 4162 / Ed. by V. V. Tuchin. Bellingham: SPIE, 2000.
1628. *Tuchin V. V.* Controlling of tissue optical properties // Proc. SPIE. 2000. V. 4001. P. 30–53.
1629. *Tuchin V. V.* Advances in immersion control of optical properties of tissues and blood // Proc. SPIE. 2003. V. 5254. P. 1–13.
1630. *Тучин В. В., Башкатов А. Н., Генина Э. А., Синичкин Ю. П., Лакодина Н. А.* *In vivo* исследование динамики иммерсионного просветления кожи человека // Письма ЖТФ. 2001. Т. 27, № 12. С. 10–14.
1631. *Wang R. K., Xu X., Tuchin V. V., Elder J. B.* Concurrent enhancement of imaging depth and contrast for optical coherence tomography by hyperosmotic agents // J. Opt. Soc. Am. B. 2001. V. 18. P. 948–953.
1632. *Wang R. K., Tuchin V. V.* Enhance light penetration in tissue for high resolution optical imaging techniques by the use of biocompatible chemical agents // J. X-Ray Sci. Technol. 2002. V. 10. P. 167–176.
1633. *Wang R. K., Elder J. B.* Propylene glycol as a contrast agent for optical coherence tomography to image gastrointestinal tissue // Lasers Surg. Med. 2002. V. 30. P. 201–208.
1634. *Bashkatov A. N., Genina E. A., Tuchin V. V.* optical immersion as a tool for tissue scattering properties control // Perspectives in Engineering Optics / Ed. by K. Singh, V. K. Rastogi. New Delhi: Anita Publications, 2003. P. 313–334.
1635. *Tuchin V. V.* Optical spectroscopy of tissue // Encyclopedia of Optical Engineering / Ed. by R. G. Driggers. N. Y.: Marcel-Dekker, 2003. P. 1814–1829.
1636. *Wang R. K., Xu X., He Y., Elder J. B.* Investigation of optical clearing of gastric tissue immersed with hyperosmotic agents // IEEE J. Select. Tops. Quant. Electr. 2003. V. 9. P. 234–242.
1637. *Xu X., Wang R. K.* Synergetic effect of hyperosmotic agents of dimethyl sulfoxide and glycerol on optical clearing of gastric tissue studied with near infrared spectroscopy // Phys. Med. Biol. 2004. V. 49. P. 457–468.
1638. *Khan M. H., Choi B., Chess S., Kelly K. M., McCullough J., Nelson J. S.* Optical clearing of *in vivo* human skin: implications for light-based diagnostic imaging and therapeutics // Lasers Surg. Med. 2004. V. 34. P. 83–85.
1639. *Zhou F., Wang R. K.* Theoretical model on optical clearing of biological tissue with semipermeable chemical agents // Proc. SPIE. 2004. V. 5330. P. 215–221.
1640. *Tuchin V. V., Pravdin A. B.* Dynamics of skin diffuse reflectance and autofluorescence at tissue optical immersion // Materials of European Workshop «BioPhotonics 2002,» October 18–20, 2002, Heraklion, Crete: Foundation for Research and Technology–Hellas, 2002. CD-edition.
1641. *Churmakov D. Y., Meglinski I. V., Greenhalgh D. A.* Amending of fluorescence sensor signal localization in human skin by matching of the refractive index // J. Biomed. Opt. 2004. V. 9. P. 339–346.
1642. *He Y., Wang R. K., Xing D.* Enhanced sensitivity and spatial resolution for *in vivo* imaging with low-level light-emitting probes by use of biocompatible chemical agents // Opt. Lett. 2003. V. 28, № 21. P. 2076–2078.
1643. *Galanzha E. I., Tuchin V. V., Luo Q., Cheng H., Solov'eva A. V.* The action of osmotically active drugs on optical properties of skin and state of microcirculation in experiments // Asian J. Phys. 2001. V. 10, № 4. P. 503–511.

1644. Vargas G., Readinger A., Dosier S. S., Welch A. J. Morphological changes in blood vessels produced by hyperosmotic agents and measured by optical coherence tomography // *Photochem. Photobiol.* 2003. V. 77, № 5. P. 541–549.
1645. Galanzha E. I., Tuchin V. V., Solovieva A. V., Stepanova T. V., Luo Q., Cheng H. Skin backreflectance and microvascular system functioning at the action of osmotic agents // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2003. V. 36. P. 1739–1746.
1646. Brezinski M., Saunders K., Jesser C., Li X., Fujimoto J. Index matching to improve ocr imaging through blood // *Circulation.* 2001. V. 103. P. 1999–2003.
1647. Xu X., Wang R. K., Elder J. B., Tuchin V. V. Effect of dextran-induced changes in refractive index and aggregation on optical properties of whole blood // *Phys. Med. Biol.* 2003. V. 48. P. 1205–1221.
1648. Grzegorzewski B., Kowalicska E. optical properties of human blood sediment // *Acta Physica Polonica A.* 2002. V. 101, № 1. P. 201–209.
1649. Grzegorzewski B., Kowalicska E., Gyrnicki A., Gutsze A. Diffraction measurement of erythrocyte sedimentation rate // *Optica Applicata.* 2002. V. 32, № 1. P. 15–21.
1650. Amerov A. K., Chen J., Small G. W., Arnold M. A. The influence of glucose upon the transport of light through whole blood // *Proc. SPIE.* 2004. V. 5330. P. 101–111.
1651. Башкатов А. Н., Генина Э. А., Синичкин Ю. П., Кочубей В. И., Лагодина Н. А., Тучин В. В. Определение коэффициента диффузии глюкозы в склере глаза человека // *Биофизика.* 2003. Т. 48, № 2. С. 309–313.
1652. Bashkatov A. N., Genina E. A., Sinichkin Yu. P., Kochubey V. I., Lakodina N. A., Tuchin V. V. Glucose and mannitol diffusion in human *dura mater* // *Biophysical J.* 2003. V. 85, № 5. P. 3310–3318.
1653. Genina E. A., Bashkatov A. N., Sinichkin Yu. P., Kochubey V. I., Lakodina N. A., Altshuler G. B., Tuchin V. V. *In vitro* and *in vivo* study of dye diffusion into the human skin and hair follicles // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7. P. 471–477.
1654. Tuchin V. V., Genina E. A., Bashkatov A. N., Simonenko G. V., Odoevskaya O. D., Altshuler G. B. A pilot study of ICG laser therapy of acne vulgaris: Photodynamic and photothermolysis treatment // *Lasers Surg. Med.* 2003. V. 33, № 5. P. 296–310.
1655. Genina E. A., Bashkatov A. N., Simonenko G. V., Odoevskaya O. D., Tuchin V. V., Altshuler G. B. Low-intensity ICG-laser phototherapy of *acne vulgaris*: A pilot study // *J. Biomed. Opt.* 2004. V. 9, № 4. P. 828–834.
1656. Синичкин Ю. П., Утц С. Р., Пилипенко Е. А. Спектроскопия кожи человека *in vivo*. 1. Спектры отражения // *Опт. спектр.* 1996. Т. 80, № 2. С. 260–267.
1657. Синичкин Ю. П., Утц С. Р., Долотов Л. Е., Пилипенко Е. А., Тучин В. В. Методика и прибор для оценки степени эритемы и меланиновой пигментации кожи человека // *Радиотехника.* 1997. № 4. С. 77–81.
1658. Dolotov L. E., Sinichkin Yu. P., Tuchin V. V., Utz S. R., Altshuler G. B., Yaroslavsky I. V. Design and evaluation of a novel portable erythema-melanin-meter // *Laser Surg. Med.* 2004. V. 34, № 2. P. 127–135.
1659. Wilson B. C., Patterson M. S., Lilge L. Implicit and explicit dosimetry in photodynamic therapy: a new paradigm // *Lasers Med. Sci.* 1997. V. 12. P. 182–199.
1660. Ito Y., Kennan R. P., Watanabe E., Koizumi H. Assessment of heating effects in skin during continuous wave near infrared spectroscopy // *J. Biomed. Opt.* 2000. V. 5. P. 383–390.
1661. Yeh S.-j., Khalil O., Hanna Ch. F., Kantor S. Near-infrared thermo-optical response of the localized reflectance of intact diabetic and nondiabetic human skin // *J. Biomed. Opt.* 2003. V. 8. P. 534–544.
1662. Yeh A. T., Kao B., Jung W. G., Chen Z., Nelson J. S., Tromberg B. J. Imaging wound healing using optical coherence tomography and multiphoton microscopy in an *in vitro* skin-equivalent tissue model // *J. Biomed. Opt.* 2004. V. 9, № 2. P. 248–253.
1663. Sakuma T., Hasegawa T., Tsutsui F., Kurihara S. Quantitative analysis of the whiteness of atypical cervical transformation zone // *J. Reprod. Med.* 1985. V. 30. P. 773–776.

1664. *Holoubek Ya.* Note on light attenuation by scattering: comparison of coherent and incoherent (diffusion) approximations // *Opt. Eng.* 1998. V. 37. P. 705–709.
1665. *Balas J.S., Themelis G.C., Prokopakis E.P., Orfanudaki I., Koumantakis E., Helidonis E.S.* *In vivo* detection and staging of epithelial dysplasias and malignancies based on the quantitative assessment of acetic acid-tissue // *J. Photochem. Photobiol.* 1999. V. 53. P. 153–157.
1666. *Agrawal A., Utzinger U., Brookner C., Pitris C., Mitchell M.F., Richards-Kortum R.* Fluorescence spectroscopy of the cervix: Influence of acetic acid, cervical mucus, and vaginal medications // *Lasers Surg. Med.* 1999. V. 25. P. 237–249.
1667. *Drezek R.A., Collier T., Brookner C.K., Malpica A., Lotan R., Richards-Kortum R., Follen M.* Laser scanning confocal microscopy of seralvical tissue before and after application of acetic acid // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2000. V. 182. P. 1135–1139.
1668. *Pogue B.W., Kaufman H.B., Zelenchuk A., Harper W., Burke G.C., Burke E.E., Harper D.M.* Analysis of acetic acid-induced whitening of high-grade squamous intraepithelial lesions // *J. Biomed. Opt.* 2001. V. 6. P. 397–403.
1669. *Choi B., Milner T.E., Kim J., Goodman J.N., Vargas G., Aguilar G., Nelson J.S.* Use of optical coherence tomography to monitor biological tissue freezing during cryosurgery // *J. Biomed. Opt.* 2004. V. 9. P. 282–286.
1670. *Stamatas G.N., Kollias N.* Blood stasis contributions to the perception of skin pigmentation // *J. Biomed. Opt.* 2004. V. 9. P. 315–322.
1671. *Rajadhyaksha M., Gonzalez S., Zavislan J.M.* Detectability of contrast agents for confocal reflectance imaging of skin and microcirculation // *J. Biomed. Opt.* 2004. V. 9. P. 323–331.
1672. *Barton J.K., Halas N.J., West J.L., Drezek R.A.* Nanoshells as an optical coherence tomography contrast agent // *Proc. SPIE.* 2004. V. 5316. P. 99–106.
1673. *Wang R.K., Tuchin V.V.* Enhance light penetration in tissue for high resolution optical techniques by the use of biocompatible chemical agents // *Proc. SPIE.* 2003. V. 4956. P. 314–319.
1674. *Wang R.K., He Y., Tuchin V.V.* Effect of dehydration on optical clearing and oct imaging contrast after impregnation of biological tissue with biochemical agents // *Proc. SPIE.* 2004. V. 5316. P. 119–127.
1675. *Lazebnik M., Marks D.L., Potgieter K., Gillette R., Boppart S.A.* Functional optical coherence tomography of stimulated and spontaneous scattering changes in neural tissue // *Proc. SPIE.* 2004. V. 5316. P. 107–112.
1676. *Xu X., Wang R., Elder J.B.* Optical clearing effect on gastric tissues immersed with biocompatible chemical agents investigated by near infrared reflectance spectroscopy // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2003. V. 36. P. 1707–1713.
1677. *He Y., Wang R.K.* Dynamic optical clearing effect of tissue impregnated with hyperosmotic agents and studied with optical coherence tomography // *J. Biomed. Opt.* 2004. V. 9. P. 200–206.
1678. *Guzelsu N., Federici J.F., Lim H.C., Chauhdry H.R., Ritter A.B., Findley T.* Measurement of skin stretch via light reflection // *J. Biomed. Opt.* 2003. V. 8. P. 80–86.
1679. *Zuluaga A.F., Drezek R., Collier T., Lotan R., Follen M., Richards-Kortum R.* Contrast agents for confocal microscopy: how simple chemicals affect confocal images of normal and cancer cells in suspension // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7. P. 398–403.
1680. *Schneckenburger H., Hendinger A., Sailer R., Strauss W.S.L., Schmitt M.* Laser-assisted optoporation of single cells // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7. P. 410–416.
1681. *Grzegorzewski B., Yermolenko S.* Speckle in far-field produced by fluctuations associated with phase separation // *Proc. SPIE, Bellingham, SPIE.* 1995. V. 2647. P. 343–349.
1682. *Tsai C.-L., Fouke J.M.* Noninvasive detection of water and blood content in soft tissue from the optical reflectance spectrum // *Proc. SPIE.* 1993. V. 1888. P. 479–486.
1683. *Shwartsman L.D., Fine I.* Optical transmission of blood: Effect of erythrocyte aggregation // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2003. V. 50. P. 1026–1033.

1684. Cohen O., Fine I., Monashkin E., Karasik A. Glucose correlation with light scattering patterns — a novel method for non-invasive glucose measurements // *Diabetes Technol. Ther.* 2003. V. 5. P. 11–17.
1685. Tuchin V., Maksimova I., Zimnyakov D., Kon I., Mavlutov A., Mishin A. Light propagation in tissues with controlled optical properties // *Proc. SPIE.* 1996. V. 2925. P. 118–132.
1686. Bashkatov A.N., Genina E.A., Sinichkin Yu.P., Lakodina N.A., Kochubey V.I., Tuchin V.V. Estimation of glucose diffusion coefficient in scleral tissue // *Proc. SPIE.* 2000. V. 4001. P. 345–355.
1687. Genina E.A., Bashkatov A.N., Lakodina N.A., Murikhina S.A., Sinichkin Yu.P., Tuchin V.V. Diffusion of glucose solution through fibrous tissues: *In vitro* optical and weight measurements,» *Proc. SPIE.* 2000. V. 4001. P. 255–261.
1688. Hedbys B.O., Mishima S. The thickness-hydration relationship of the cornea // *Exp. Eye Res.* 1966. V. 5. P. 221–228.
1689. Kholodnykh A.I., Hosseini K., Petrova I.Y., Esenaliev R.O., Motamedi M. *In vivo* OCT assessment of rabbit corneal hydration and dehydration // *Proc. SPIE.* 2003. V. 4956. P. 295–298.
1690. Xu X., Wang R.K. The role of water desorption on optical clearing of biotissue: Studied with near infrared reflectance spectroscopy // *Med. Phys.* 2003. V. 30. P. 1246–1253.
1691. Jiang J., Wang R.K. Comparing the synergetic effects of oleic acid and dimethyl sulfoxide as vehicles for optical clearing of skin tissue *in vitro* // *Phys. Med. Biol.* 2004. V. 49. P. 5283–5294.
1692. Tuchin V.V., Anishchenko T.G., Mishin A.A., Soboleva O.V. Control of bovine sclera optical characteristics with various osmolytes // *Proc. SPIE.* 1997. V. 2982. P. 284–290.
1693. Kon I.L., Bakutkin V.V., Bogomolova N.V., Tuchin S.V., Zimnyakov D.A., Tuchin V.V. Trazograph influence on osmotic pressure and tissue structures of human sclera // *Proc. SPIE.* 1997. V. 2971. P. 198–206.
1694. Zimnyakov D.A., Tuchin V.V., Larin K.V. Speckle patterns polarization analysis as an approach to turbid tissue structure monitoring // *Proc. SPIE.* 1997. V. 2981. P. 172–180.
1695. Bashkatov A.N., Genina E.A., Sinichkin Yu.P., Tuchin V.V. The influence of glycerol on the transport of light in the skin // *Proc. SPIE.* 2002. V. 4623. P. 144–152.
1696. Tuchin V.V., Maksimova I.L., Bashkatov A.N., Sinichkin Yu.P., Simonenko G.V., Genina E.A., Lakodina N.A. Eye tissues study — scattering and polarization effects // *OSA TOPS.* Washington, DC: Optical Society of America, 1999. P. 255–258.
1697. Tuchin V.V., Bashkatov A.N., Genina E.A., Sinichkin Yu.P. Scleral tissue clearing effects // *Proc. SPIE.* 2002. V. 4611. P. 54–58.
1698. Папаев А.В., Симоненко Г.В., Тучин В.В. Простая модель для расчета спектра пропускания поляризованного света образцом биологической ткани // *Оптич. журн.* 2004. Т. 71, № 5. P. 3–6.
1699. Shchyogolev S.Yu. Inverse problems of spectroturbidimetry of biological disperse systems: an overview // *J. Biomed. Opt.* 1999. V. 4. P. 490–503.
1700. Tuchin V.V., Xu X., Wang R.K. Sedimentation of immersed blood studied by OCT // *Proc. SPIE.* 2001. V. 4241. P. 357–369.
1701. Tuchin V.V., Xu X., Wang R.K., Elder J.B. Whole blood and RBC sedimentation and aggregation study using OCT // *Proc. SPIE.* 2001. V. 4263. P. 143–149.
1702. Bashkatov A.N., Genina E.A., Korovina I.V., Sinichkin Yu.P., Novikova O.V., Tuchin V.V. *In vivo* and *in vitro* study of control of rat skin optical properties by action of 40%-glucose solution // *Proc. SPIE.* 2001. V. 4241. P. 223–230.
1703. Bashkatov A.N., Genina E.A., Korovina I.V., Kochubey V.I., Sinichkin Yu.P., Tuchin V.V. *In vivo* and *in vitro* study of control of rat skin optical properties by acting of osmotic liquid // *Proc. SPIE.* 2000. V. 4224. P. 300–311.
1704. Bashkatov A.N., Korolevich A.N., Tuchin V.V., Sinichkin Yu.P., Genina E.A., Stoltitz M.M., Dubina N.S., Vecherinski S.I., Belsley M.S. *In vivo* investigation of human

- skin optical clearing and blood microcirculation under the action of glucose solution // *Asian J. Phys.* 2006. V. 15, № 1. P. 1–14.
1705. Cruz E. V., Kota K., Huque J., Iwaku M., Hoshino E. Penetration of propylene glycol into dentine // *Int. Endodontic J.* 2002. V. 35. P. 330–336.
1706. Chernova S. P., Kuznetsova N. V., Pravdin A. B., Tuchin V. V. Dynamics of optical clearing of human skin *in vivo* // *Proc. SPIE.* 2000. V. 4162. P. 227–235.
1707. Walling P. L., Dabney J. M. Moisture in skin by near-infrared reflectance spectroscopy // *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1989. V. 40. P. 151–171.
1708. Martin K. A. Direct measurement of moisture in skin by NIR spectroscopy // *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1993. V. 44. P. 249–261.
1709. Wichrowski K., Sore G., Khaiaat A. Use of infrared spectroscopy for *in vivo* measurement of the stratum corneum moisturization after application of cosmetic preparations // *Int. J. Cosmet. Sci.* 1995. V. 17. P. 1–11.
1710. Schmitt J. M., Hua J., Qu J. Imaging water absorption with OCT // *Proc. SPIE.* 1999. V. 3598. P. 36–46.
1711. Kolmel K. F., Sennhenn B., Giese K. Investigation of skin by ultraviolet remittance spectroscopy // *British J. Dermatol.* 1990. V. 122, № 2. P. 209–216.
1712. Schwarzmaier H.-J., Heintzen M. P., Müller W. *et al.* Optical density of vascular tissue before and after 308-nm excimer laser irradiation // *Opt. Eng.* 1992. V. 31. P. 1436–1440.
1713. Splinter R., Svenson R. H., Littman L. *et al.* Computer simulated light distributions in myocardial tissues at the Nd-YAG wavelength of 1064 nm // *Lasers Med. Sci.* 1993. V. 8. P. 15–21.
1714. Tuchin V. V. Control of tissue and blood optical properties // *Advances in Biophotonics* / Ed. by B. W. Wilson, V. V. Tuchin, S. Tanev. Amsterdam: IOS Press, 2005. P. 79–122.
1715. Tanev S., Tuchin V. V., Paddon P. Light scattering effects of gold nanoparticles in cells: FDTD modeling // *Laser Phys. Lett.* 2006. V. 3, № 12. P. 594–598.
1716. Tanev S., Sun W., Loeb N., Paddon P., Tuchin V. The finite-difference time-domain method in the biosciences: Modelling of light scattering by biological cells in absorptive and controlled extra-cellular media // *Advances in Biophotonics* / Ed. by B. W. Wilson, V. V. Tuchin, S. Tanev. Amsterdam: IOS Press, 2005. P. 45–78.
1717. Choi B., Tsu L., Chen E., Ishak T. S., Iskandar S. M., Chess S., Nelson J. S. Determination of chemical agent optical clearing potential using *in vitro* human skin // *Lasers Surg. Med.* 2005. V. 36. P. 72–75.
1718. Tuchin V. V., Altshuler G. B., Gavrilova A. A., Pravdin A. B., Tabatadze D., Childs J., Yaroslavsky I. V. Optical clearing of skin using flashlamp-induced enhancement of epidermal permeability // *Lasers Surg. Med.* 2006. V. 38. P. 824–836.
1719. Gavrilova A. A., Tabatadze D., Childs J., Yaroslavsky I., Altshuler G., Pravdin A. B., Tuchin V. V. *In vitro* optical clearing of rat skin using lattice of photoinduced islands for enhancement of transdermal permeability // *Proc. SPIE.* 2005. V. 5771. P. 344–348.
1720. Stumpp O. F., Welch A. J. Injection of glycerol into porcine skin for optical skin clearing with needle-free injection gun and determination of agent distribution using OCT and fluorescence microscopy // *Proc. SPIE.* 2003. V. 4949. P. 44–50.
1721. Stumpp O. F., Welch A. J., Milner T. E., Neev J. Enhancement of transdermal skin clearing agent delivery using a 980 nm diode laser // *Lasers Surg. Med.* 2005. V. 37. P. 278–285.
1722. Khan M. H., Chess S., Choi B., Kelly K. M., Nelson J. S. Can topically applied optical clearing agents increase the epidermal damage threshold and enhance therapeutic efficacy // *Lasers Surg. Med.* 2004. V. 35. P. 93–95.
1723. Khan M. H., Przeklasa C., Choi B., Kelly K. M., Nelson J. S. Laser assisted tattoo removal in combination with topically applied optical clearing agents // *Lasers Surg. Med.* 2005. Suppl. 17. P. 85.
1724. McNichols R. J., Fox M. A., Gowda A., Tuya S., Bell B., Motamedi M. Temporary dermal scatter reduction: quantitative assessment and implications for improved laser tattoo removal // *Lasers Surg. Med.* 2005. V. 36. P. 289–296.

1725. Zimnyakov D. A., Tuchin V. V., Mishin A. A. et al. *In vitro* human sclera structure analysis using tissue optical immersion effect // Proc. SPIE. 1996. V. 2673. P. 233–243.
1726. Tuchin V. V., Zimnykov D. A., Maksimova I. L., Akchurin G. G., Mishin A. A., Utz S. R., Peretochkin I. S. The coherent, low-coherent and polarized light interaction with tissues undergo the refractive indices matching control // Proc. SPIE. 1998. V. 3251. P. 12–21.
1727. Caspers P. J., Williams A. C., Carter E. A., Edwards H. G. M., Barry B. W., Bruining H. A., Puppels G. J. Monitoring the penetration enhancer dimethyl sulfoxide in human stratum corneum *in vivo* by confocal Raman spectroscopy // Pharmaceut. Res. 2002. V. 19, № 10. P. 1577–1580.
1728. Genina E. A., Bashkatov A. N., Tuchin V. V. Glucose-induced optical clearing effects in tissues and blood. Chapter 21 // Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues / Ed. by V. V. Tuchin. London: Taylor & Francis Group LLC: CRC Press, 2009. P. 657–692.
1729. Генина Э. А., Башкатов А. Н., Синичкин Ю. П., Тучин В. В. Оптическое просветление склеры глаза *in vivo* под действием глюкозы // Квант. электр. 2006. V. 36, № 12. С. 1119–1124.
1730. Hirshburg J., Choi B., Nelson J. S., Yeh A. T. Collagen solubility correlates with skin optical clearing // J. Biomed. Opt. 2006. V. 11, № 4. P. 040501.
1731. Yeh A. T., Hirshburg J. Molecular interactions of exogenous chemical agents with collagen implications for tissue optical clearing // J. Biomed. Opt. 2006. V. 11, № 1. P. 014003.
1732. Hirshburg J., Choi B., Nelson J. S., Yeh A. T. Correlation between collagen solubility and skin optical clearing using sugars // Lasers Surg. Med. 2007. V. 39. P. 140–144.
1733. Hirshburg J., Ravikumar K. M., Hwang W., Yeh A. T. Molecular basis for optical clearing of collagenous tissues // J. Biomed. Opt. 2010. V. 15, № 5. P. 055002.
1734. Mao Z., Zhu D., Hu Y., Wen X., Han Z. Influence of alcohols on the optical clearing effect of skin *in vitro* // J. Biomed. Opt. 2008. V. 13, № 2. P. 021104.
1735. Jiang J., Boese M., Turner P., Wang R. K. Penetration kinetics of dimethyl sulphoxide and glycerol in dynamic optical clearing of porcine skin tissue *in vitro* studied by Fourier transform infrared spectroscopic imaging // J. Biomed. Opt. 2008. V. 13, № 2. P. 021105.
1736. Bui A. K., McClure R. A., Chang J., Stoianovici C., Hirshburg J., Yeh A. T., Choi B. Revisiting optical clearing with dimethyl sulfoxide (DMSO) // Lasers Surg. Med. 2009. V. 41, № 2. P. 142–148.
1737. Wen X., Tuchin V. V., Luo Q., Zhu D. Control the scattering of Intralipid by using optical clearing agents // Phys. Med. Biol. 2009. V. 54. P. 6917–6930.
1738. Fox A. M., Diven D. G., Sra K., Boretsky A., Poonawalla T., Readinger A., Motamedi M., McNichols R. J. Dermal scatter reduction in human skin: a method using controlled application of glycerol // Lasers Surg. Med. 2009. V. 41. P. 251–255.
1739. Rylander C. G., Stumpp O. F., Milner T. E., Kemp N. J., Mendenhall J. M., Diller K. R., Welch A. J. Dehydration mechanism of optical clearing in tissue // J. Biomed. Opt. 2006. V. 11, № 4. P. 041117.
1740. Oliveira L., Lage A., Clemente M. P., Tuchin V. V. Rat muscle opacity decrease due to the osmosis of a simple mixture // J. Biomed. Opt. 2010. V. 15, № 5. P. 055004.
1741. Wen X., Mao Z., Han Z., Tuchin V. V., Zhu D. *In vivo* skin optical clearing by glycerol solutions: mechanism // J. Biophoton. 2010. V. 3, № 1. P. 44–52.
1742. Yu T., Wen X., Tuchin V. V., Luo Q., Zhu D. Quantitative analysis of dehydration in porcine skin for assessing mechanism of optical clearing // J. Biomed. Opt. 2011. V. 16, № 9. P. 095002.
1743. Tanaka Y., Kubota A., Yamato M., Okano T., Nishida K. Irreversible optical clearing of sclera by dehydration and cross-linking // Biomaterials. 2011. V. 32, № 4. P. 1080–1090.
1744. Liu C., Zhi Z., Tuchin V. V., Luo Q., Zhu D. Enhancement of skin optical clearing efficacy using photo-irradiation // Lasers Surg. Med. 2010. V. 42, № 2. P. 132–140.
1745. Chiang A. S. Aqueous tissue clearing solution // US Patent 6472216B1, 2002.

1746. Jiang J., Wang R.K. How different molarities of oleic acid as enhancer exert its effect on optical clearing of skin tissue *in vitro* // J. X-ray Sci. Technol. 2005. V. 13, № 3. P. 149–159.
1747. Karande P., Jain A., Ergun K., Kispersky V., Mitragotri S. Design principles of chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 4688–4693.
1748. Zhi Z., Han Z., Luo Q., Zhu D. Improve optical clearing skin *in vitro* with propylene glycol as a penetration enhancer // J. Innovat. Opt. Health Sci. 2009. V. 2, № 3. P. 269–278.
1749. Stumpp O., Chen B., Welch B. Using sandpaper for noninvasive transepidermal optical skin clearing agent delivery // J. Biomed. Opt. 2006. V. 11, № 4. P. 041118.
1750. Yoon J., Son T., Choi E.H., Choi B., Nelson J.S., Jung B. Enhancement of optical skin clearing efficacy using a microneedle roller // J. Biomed. Opt. 2008. V. 13, № 2. P. 021103.
1751. Yoon J., Park D., Son T., Seo J., Nelson J.S., Jung B. A physical method to enhance transdermal delivery of a tissue optical clearing agent: combination of microneedling and sonophoresis // Lasers Surg. Med. 2010. V. 42, № 5. P. 412–417.
1752. Genina E.A., Bashkatov A.N., Korobko A.A., Zubkova E.A., Tuchin V.V., Yaroslavsky I.V., Altshuler G.B. Optical clearing of human skin: comparative study of permeability and dehydration of intact and photothermally perforated skin // J. Biomed. Opt. 2008. V. 13, № 2. P. 021102.
1753. Xu X., Zhu Q. Evaluation of skin optical clearing enhancement with Azone as a penetration enhancer // Opt. Commun. 2007. V. 279. P. 223–228.
1754. Xu X., Zhu Q., Sun C. Combined effect of ultrasound-SLS on skin optical clearing // IEEE Photonic Tech. L. 2008. V. 20. V. 24. P. 2117–2119.
1755. Xu X., Zhu Q., Sun C. Assessment of the effects of ultrasound-mediated alcohols on skin optical clearing // J. Biomed. Opt. 2009. V. 14, № 3. P. 034042.
1756. Zhong H., Guo Z., Wei H., Zhang Z., Yang H., Xie S. Reflectance spectroscopy study of low-frequency ultrasound and glycerol on skin optical clearing // Spectrosc. Spectral Anal. 2009. V. 29, № 12. P. 3190–3194.
1757. Zhong H., Guo Z., Wei H., Guo L., Wang C., He Y., Xiong H., Liu S. Synergistic effect of ultrasound and thiazone-PEG 400 on human skin optical clearing *in vivo* // Photochem. Photobiol. 2010. V. 86. P. 732–737.
1758. Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V. Measurement of glucose diffusion coefficients in human tissues. Chapter 19 // Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues / Ed. by V.V. Tuchin. London: Taylor & Francis Group LLC, CRC Press, 2009. P. 587–621.
1759. Larina I.V., Carbajal E.F., Tuchin V.V., Dickinson M.E., Larin K.V. Enhanced OCT imaging of embryonic tissue with optical clearing // Laser Phys. Lett. 2008. V. 5, № 6. P. 476–479.
1760. Proskurin S.G., Meglinski I.V. Optical coherence tomography imaging depth enhancement by superficial skin optical clearing // Laser Phys. Lett. 2007. V. 4, № 11. P. 824–826.
1761. Kinnunen M., Myllylä R., Vainio S. Detecting glucose-induced changes in *in vitro* and *in vivo* experiments with optical coherence tomography // J. Biomed. Opt. 2008. V. 13, № 2. P. 021111.
1762. Guo X., Guo Z., Wei H., Yang H., He Y., Xie S., Wu G., Zhong H., Li L., Zhao Q. *In vivo* quantification of propylene glycol, glucose and glycerol diffusion in human skin with optical coherence tomography // Laser Phys. 2010. V. 20, № 9. P. 1849–1855.
1763. Sudheendran N., Mohamed M., Ghosn M.G., Tuchin V.V., Larin K.V. Assessment of tissue optical clearing as a function of glucose concentration using optical coherence tomography // J. Innov. Opt. Health Sci. 2010. V. 3, № 3. P. 169–176.
1764. Zhong H., Guo Z., Wei H., Zeng C., Xiong H., He Y., Liu S. *In vitro* study of ultrasound and different-concentration glycerol-induced changes in human skin optical attenuation assessed with optical coherence tomography // J. Biomed. Opt. 2010. V. 15, № 3. P. 036012.

1765. Ghosn M. G., Sudheendran N., Wendt M., Glasser A., Tuchin V. V., Larin K. V. Monitoring of glucose permeability in monkey skin *in vivo* using optical coherence tomography // J. Biophoton. 2010. V. 3, № 1–2. P. 25–33.
1766. Генина, Башкатов А. Н., Тучин В. В., Гхосн М. Г., Ларин К. В., Каменских Т. Г. Диффузия кортексина в склере глаза человека // Квант. электр. 2011. Т. 41, № 5. С. 407–413.
1767. Guo X., Guo Z., Wei H., Yang H., He Y., Xie S., Wu G., Deng X., Zhao Q., Li L. *In vivo* comparison of the optical clearing efficacy of optical clearing agents in human skin by quantifying permeability using optical coherence tomography // Photochem. Photobiol. 2011. V. 87, № 3. P. 734–740.
1768. Wen X., Jacques S. L., Tuchin V. V., Zhu D. Enhanced optical clearing of skin *in vivo* and OCT in-depth imaging // J. Biomed. Opt. 2012. V. 17, № 6. P. 066022.
1769. Ghosn M. G., Carbajal E. F., Befrui N. A., Larin K. V. Permeability of hyperosmotic agent in normal and atherosclerotic vascular tissues // J. Biomed. Opt. 2008. V. 13. P. 010505.
1770. Ghosn M. G., Mashiatulla M., Syed S. H., Mohamed M. A., Larin K. V., Morrisett J. D. Permeation of human plasma lipoproteins in human carotid endarterectomy tissues: Measurement by optical coherence tomography // J. Lipid Res. 2011. V. 52. P. 1429–1434.
1771. Ghosn M. G., Mashiatulla M., Mohamed M. A., Syed S., Castro-Chavez F., Morrisett J. D., Larin K. V. Time dependent changes in aortic tissue during cold storage in physiological solution // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1810. P. 555–560.
1772. Zhong H. Q., Guo Z. Y., Wei H. J., Zeng C. C., Xiong H. L., He Y. H., Liu S. H. Quantification of glycerol diffusion in human normal and cancer breast tissues *in vitro* with optical coherence tomography // Laser Phys. Lett. 2010. V. 7. P. 315–320.
1773. Zhu Z., Wu G., Wei H., Yang H., He Y., Xie S., Zhao Q., Guo X. Investigation of the permeability and optical clearing ability of different analytes in human normal and cancerous breast tissues by spectral domain OCT // J. Biophoton. 2012. V. 5. P. 1–8.
1774. Zhao Q. L., Si J. L., Guo Z. Y., Wei H. J., Yang H. Q., Wu G. Y., Xie S. S., Li X. Y., Guo X., Zhong H. Q., Li L. Q. Quantifying glucose permeability and enhanced light penetration in *ex vivo* human normal and cancerous esophagus tissues with optical coherence tomography // Laser Phys. Lett. 2011. V. 8, № 1. P. 71–77.
1775. Guo X., Wu G., Wei H., Deng X., Yang H., Ji Y., He Y., Guo Z., Xie S., Zhong H., Zhao Q., Zhu Z. Quantification of glucose diffusion in human lung tissues by using fourier domain optical coherence tomography // Photochem. Photobiol. 2012. V. 88. P. 311–316.
1776. Kamali T., Doronin A., Rattanapak T., Hook S., Meglinski I. Assessment of transcutaneous vaccine delivery by optical coherence tomography // Laser Phys. Lett. 2012. V. 9, № 8. P. 607–610.
1777. Zhu D., Lu W., Weng Y., Cui H., Luo Q. Monitoring thermal induced changes in tumor blood flow and micro-vessels with laser speckle contrast imaging // Appl. Opt. 2007. V. 46. P. 1911–1917.
1778. Zhu D., Zhang J., Cui H., Mao Z., Li P., Luo Q. Short-term and long-term effects of optical clearing agents on blood vessels in chick chorioallantoic membrane // J. Biomed. Opt. 2008. V. 13, № 2. P. 021106.
1779. Wang J., Zhu D., Chen M., Liu X. Assessment of optical clearing induced improvement of laser speckle contrast imaging // J. Innovat. Opt. Health Sci. 2010. V. 3, № 3. P. 159–167.
1780. Bonesi M., Proskurin S. G., Meglinski I. V. Imaging of subcutaneous blood vessels and flow velocity profiles by optical coherence tomography // Laser Phys. 2010. V. 20, № 4. P. 891–899.
1781. Zhu D., Wang J., Zhi Z., Wen X., Luo Q. Imaging dermal blood flow through the intact rat skin with an optical clearing method // J. Biomed. Opt. 2010. V. 15, № 2. P. 026008.
1782. Wang J., Liang Y., Zhang S., Zhou Y., Ni H., Li Y. Evaluation of optical clearing with the combined liquid paraffin and glycerol mixture // Biomed. Opt. Express. 2011. V. 2, № 8. P. 2329–2338.

1783. *Drew P. J., Shih A. Y., Driscoll J. D., Knutsen P. M., Blinder P., Davalos D., Akassoglou K., Tsai P. S., Kleinfeld D.* Chronic optical access through a polished and reinforced thinned skull // *Nat. Methods*. 2010. V. 7, № 12. P. 981–984.
1784. *Wang J., Zhang Y., Xu T., Luo Q., Zhu D.* An innovative transparent cranial window based on skull optical clearing // *Laser Phys. Lett.* 2012. V. 9, № 6. P. 469–473.
1785. *Jansen E., Pickett P., Mackanos M., Virostko J.* Effect of optical tissue clearing on spatial resolution and sensitivity of bioluminescence imaging // *J. Biomed. Opt.* 2006. V. 11, № 4. P. 041119.
1786. *Moulton K., Lovell F., Williams E., Ryan P., Lay Jr. D. C., Jansen D., Willard S.* Use of glycerol as an optical clearing agent for enhancing photonic transference and detection of salmonella typhimurium through porcine skin // *J. Biomed. Opt.* 2006. V. 11. P. 054027.
1787. *Matsui A., Lomnes S. J., Frangioni J.* Optical clearing of the skin for near-infrared fluorescence image-guided surgery // *J. Biomed. Opt.* 2009. V. 14, № 2. P. 024019.
1788. *Migacheva E. V., Pravdin A. B., Tuchin V. V.* Alterations in autofluorescence signal from rat skin *ex vivo* under optical immersion clearing // *J. Innov. Opt. Health Sci.* 2010. V. 3, № 3. P. 147–152.
1789. *Karma S., Homan J., Stoianovici C., Choi B.* Enhanced fluorescence imaging with DMSO-mediated optical clearing // *J. Innovat. Opt. Health Sci.* 2010. V. 3, № 3. P. 153–158.
1790. *Schulmerich M. V., Cole J. H., Dooley K. A., Morris M. D., Kreider J. M., Goldstein S. A.* Optical clearing in transcutaneous Raman spectroscopy of murine cortical bone tissue // *J. Biomed. Opt.* 2008. V. 13, № 2. P. 021108.
1791. *Huang D., Zhang W., Zhong H., Xiong H., Guo X., Guo Z.* Optical clearing of porcine skin tissue *in vitro* studied by Raman microspectroscopy // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17, № 1. P. 015004.
1792. *Plotnikov S., Juneja V., Isaacson A. B., Mohler W. A., Campagnola P. J.* Optical clearing for improved contrast in second harmonic generation imaging of skeletal muscle // *Biophys. J.* 2006. V. 90, № 1. P. 328–339.
1793. *Nadiarnykh O., Campagnola P. J.* Retention of polarization signatures in SHG microscopy of scattering tissues through optical clearing // *Opt. Express*. 2009. V. 17, № 7. P. 5794–5806.
1794. *Dotz H. U., Leischner U., Schierloh A., Jährling N., Mauch C. P., Deininger K., Deussing J. M., Eder M., Zieglnsberger W., Becker K.* Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain // *Nat. Methods*. 2007. V. 4, № 4. P. 331–336.
1795. *Fu Y., Tang S.* Optical clearing facilitates integrated 3D visualization of mouse ileal microstructure and vascular network with high definition // *Microvasc. Res.* 2010. V. 80. P. 512–521.
1796. *Fu Y., Lu C., Lin C., Juang J., Enkolopov G., Sibley E., Chiang A. S., Tang S. C.* Three-dimensional optical method for integrated visualization of mouse islet microstructure and vascular network with subcellular-level resolution // *J. Biomed. Opt.* 2010. V. 15, № 4. P. 046018.
1797. *Hama H., Kurokawa H., Kawano H., Ando R., Shimogori T., Noda H., Fukami K., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A.* Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain // *Nat. Neurosci.* 2011. V. 14. P. 1481–1488.
1798. *Ertürk A., Mauch C. P., Hellal F., Förstner F., Keck T., Becker K., Jährling N., Steffens H., Richter M., Hübener M., Kramer E., Kirchhoff F., Dotz H. U., Bradke F.* Three-dimensional imaging of the unsectioned adult spinal cord to assess axon regeneration and glial responses after injury // *Nat. Med.* 2012. V. 18. P. 166–171.
1799. *Tanev S., Tuchin V. V., Paddon P.* Cell membrane and gold nanoparticles effects on optical immersion experiments with normal and cancerous cells: FDTD modeling // *J. Biomed. Opt.* 2006. V. 11, № 6. P. 025606-1–6.
1800. *Tanev S., Tuchin V., Cheben P., Bock P., Schmid J., Janz S., Xu D., Lapointe J., Densmore A., Pond J.* Advances in the FDTD design and modeling of nano- and bio-photonics applications // *Photon Nanostruct. Fundam. Appl.* 2011. V. 9, № 4. P. 315–327.

1801. Генина Э. А., Долотов Л. Е., Башкатов А. Н., Терентюк Г. С., Маслякова Г. Н., Зубкина Е. А., Тучин В. В., Ярославский И. В., Альтшулер Г. Б. Фракционная лазерная микроабляция кожи для усиления ее проницаемости для наночастиц // Квант. электр. 2011. Т. 41, № 5. С. 396–401.
1802. Генина Э. А., Башкатов А. Н., Тучин В. В., Альтшулер Г. Б., Ярославский И. В. Исследование возможности повышения эффективности лазерного удаления татуировок с помощью оптического просветления кожи // Квант. электр. 2008. Т. 38, № 6. С. 580–587.
1803. Gurjarpadhye A. A., Vogt W. C., Liu Y., Rylander C. G. Effect of localized mechanical indentation on skin water content evaluated using OCT // Int. J. Biomed. Imag. 2011. V. 2011. P. 817250.
1804. Rylander C. G., Milner T. E., Baranov S. A., Nelson J. S. Mechanical tissue optical clearing devices: enhancement of light penetration in *ex vivo* porcine skin and adipose tissue // Lasers Surg. Med. 2008. V. 40. P. 688–694.
1805. Drew C., Milner T. E., Rylander C. G. Mechanical tissue optical clearing devices: evaluation of enhanced light penetration in skin using optical coherence tomography // J. Biomed. Opt. 2009. V. 14, № 6. P. 064019.
1806. Agrba P. D., Kirillin M. Y., Abelevich A. I., Zagaynova E. V., Kamensky V. A. Compression as a method for increasing the informativity of optical coherence tomography of biotissues // Opt. Spectrosc. 2009. V. 107, № 6. P. 853–858.
1807. Kirillin M. Y., Agrba P. D., Kamensky V. A. *In vivo* study of the effect of mechanical compression on formation of OCT images of human skin // J. Biophoton. 2010. V. 3. P. 752–758.
1808. Vargas G., Barton J. K., Welch A. J. Use of hyperosmotic chemical agent to improve the laser treatment of cutaneous vascular lesions // J. Biomed. Opt. 2008. 13, № 2. P. 021114.
1809. Cilip C. M., Ross A. E., Jarow J. P., Fried N. M. Application of an optical clearing agent during noninvasive laser coagulation of the canine *vas deferens* // J. Biomed. Opt. 2010. V. 15, № 4. P. 048001.
1810. Bashkatov A. N., Genina E. A., Tuchin V. V., Altshuler G. B. Skin optical clearing for improvement of laser tattoo removal // Laser Phys. 2009. V. 19, № 6. P. 1312–1322.
1811. Alekhin A. A., Ionin A. A., Kozhushko S. E., Kourylyova I. M., Kudryashov S. I., Kuz'min K. K., Likhvansteva V. G., Samoylov M. V., Seleznev L. V., Sinitsyn D. V., Zakharov S. D. *In vitro* femtosecond laser subsurface micro-disruption inside human cornea and pre-cleared sclera // Laser Phys. Lett. 2010. V. 7, № 6. P. 463–466.
1812. Lambert R., Rey J. F., Sankaranarayanan R. Magnification and chromoscopy with the acetic acid test // Endoscopy. 2003. V. 35. P. 437–445.
1813. Li W., Venkataraman S., Gustafsson U., Oyama J. C., Ferris D. G., Lieberman R. W. Using acetowhite opacity index for detecting cervical intraepithelial neoplasia // J. Biomed. Opt. 2009. V. 14. P. 014020.
1814. Wu T., Cheung T.-H., Yim S.-F., Qu J. Y. Clinical study of quantitative diagnosis of early cervical cancer based on the classification of acetowhitening kinetics // J. Biomed. Opt. 2010. V. 15, № 2. P. 026001-1–7.
1815. Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт. Междисциплинарный подход / Пер. с англ. под ред. Ю. А. Чизмаджева М.: Мир, 1980.
1816. Пирри А., ван Гейнингген Р. Биохимия глаза / Пер. с англ. с предисловием Т. В. Шлопак М.: Медицина, 1968.
1817. Физические величины. Справочник / Под ред. И. С. Григорьева, Е. З. Мейлихова. М.: Энергоатомиздат, 1991.
1818. Таблицы физических величин. Справочник / Под ред. акад. И. К. Кикоина. М.: Атомиздат, 1976.
1819. Schaefer H., Redelmeier T. E. Skin Barrier: Principles of Percutaneous Absorption. Basel: Karger, 1996.

1820. *Pirot F., Kalia Y.N., Stinchcomb A.L., Keating G., Bunge A., Guy R.H.* Characterization of the permeable barrier of human skin *in vivo* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997. V. 94. P. 1562–1567.
1821. *Blank I.H., Moloney J., Emslie A.G. et al.* The diffusion of water across the stratum corneum as a function of its water content // J. Invest. Dermatol. 1984. V. 82. P. 188–194.
1822. *von Zglinicki T., Lindberg M., Roomans G.H., Forslind B.* Water and ion distribution profiles in human skin // Acta Derm. Venerol. (Stockh). 1993. V. 73. P. 340–343.
1823. *Генина Э.А., Башкатов А.Н., Синичкин Ю.П., Тучин В.В.* Оптическое просветление кожи под действием глицерина: исследования *ex vivo* и *in vivo* // Опт. спектр. 2010. Т. 109, № 2. С. 256–263.
1824. *Altshuler G., Smirnov M., Yaroslavsky I.* Lattice of optical islets: a novel treatment modality in photomedicine // J. Phys. D: Appl. Phys. 2005. V. 38. P. 2732–2747.
1825. *Гаврилова А.А., Тучин В.В., Правдин А.Б., Ярославский И.В., Альтшулер Г.Б.* Спектрофотометрия кожи в условиях изменения проницаемости эпидермиса при островковом фототермическом воздействии // Опт. спектр. 2008. Т. 104, № 1. С. 151–157.
1826. *Wang R.K., Tuchin V.V.* Optical tissue clearing to enhance imaging performance for OCT // Optical Coherence Tomography: Technology and Applications / Ed. by W. Drexler, J. G. Fujimoto. Berlin: Springer, 2008. P. 851–882.
1827. *Михайлова П.* Медицинская косметология. М.: Медицина, 1984.
1828. *Kirjavainen M., Urtti A., Jaaskelainen I. et al.* Interaction of liposomes with human skin *in vitro*- the influence of lipid composition and structure // Biochem. Biophys. Acta. 1996. V. 1304. P. 179–189.
1829. *Peck K.D., Ghanem A.-H., Higuchi W.I.* Hindered diffusion of polar molecules through and effective pore radii estimates of intact and ethanol treated human epidermal membrane // Pharmaceutical Res. 1994. V. 11. P. 1306–1314.
1830. *Inamori T., Ghanem A.-H., Higuchi W.I., Srinivasan V.* Macromolecule transport in and effective pore size of ethanol pretreated human epidermal membrane // Intern. J. Pharmaceutics. 1994. V. 105. P. 113–123.
1831. *Sznitowska M.* The influence of ethanol on permeation behavior of the porous pathway in the stratum corneum // Int. J. Pharmacol. 1996. V. 137. P. 137–140.
1832. *Levang A.K., Zhao K., Singh J.* Effect of ethanol/propylene glycol on the *in vitro* percutaneous absorption of aspirin, biophysical changes and macroscopic barrier properties of the skin // Int. J. Pharm. 1999. V. 181. P. 255–263.
1833. *Bommannan D., Potts R.O., Guy R.H.* Examination of the effect of ethanol on human stratum corneum *in vivo* using infrared spectroscopy // J. Control Release. 1991. V. 16. P. 299–304.
1834. *Squier C.A., Kremer M.J., Wertz P.W.* Effect of ethanol on lipid metabolism and epidermal permeability barrier of skin and oral mucosa in the rat // J. Oral Pathol. Med. 2003. V. 32. P. 595–599.
1835. *Jacobi U., Bartoll J., Sterry W., Lademann J.* Orally administered ethanol: transepidermal pathways and effects on the human skin barrier // Arch. Dermatol. Res. 2005. V. 296. P. 332–338.
1836. <http://www.dmsso.org>, 20.08.2012.
1837. *Lademann J., Otberg N., Richter H., Weigmann H.-J., Lindemann U., Schaefer H., Sterry W.* Investigation of follicular penetration of topically applied substances // Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol. 2001. V. 14. P. 17–22.
1838. *Lademann J., Jacobi U., Richter H., Otberg N., Weigmann H.-J., Meffert H., Schaefer H., Blume-Peytavi U., Sterry W.* *In vivo* determination of UV-photons entering into human skin // Laser Phys. 2004. V. 14. P. 234–237.
1839. *Lademann J., Rudolph A., Jacobi U., Weigmann H.-J., Schaefer H., Sterry W., Meinke M.* Influence of nonhomogeneous distribution of topically applied UV filters on sun protection factors // J. Biomed. Opt. 2004. V. 9. P. 1358–1362.

1840. Lee S., McAuliffe D.J., Kollias N., Flotte T.J., Doukas A.G. Photomechanical delivery of 100-nm microspheres through the stratum corneum: Implications for transdermal drug delivery // *Laser Surg. Med.* 2002. V. 31. P. 207–210.
1841. Lee S., Anderson T., Zhang H., Flotte T.J., Doukas A.G. Alteration of cell membrane by stress waves *in vitro* // *Ultrasound Med. Biol.* 1996. V. 22. P. 1285–1293.
1842. Lee S., McAuliffe D.J., Zhang H., Xu Z., Taitelbaum J., Flotte T.J., Doukas A.G. Stress-waves-induced membrane permeation of red blood cells is facilitated by aquaporins // *Ultrasound Med. Biol.* 1997. V. 23. P. 1089–1094.
1843. McAuliffe D.J., Lee S., Zhang H., Flotte T.J., Doukas A.G. Stress-waves-assisted transport through the plasma membrane *in vitro* // *Laser Surg. Med.* 1997. V. 20. P. 216–222.
1844. Gay C.L., Guy R.H., Golden G.M., Mak V.H.W., Francoeur M.L. Characterization of low-temperature (i.e., < 65 °C) lipid transitions in human stratum corneum // *J. Invest. Dermatol.* 1994. V. 103. P. 233–239.
1845. Nelson J.S., McCullough J.L., Glenn T.C., Wright W.H., Liaw L.-H.L., Jacques S.L. Mid-infrared laser ablation of stratum corneum enhances *in vitro* percutaneous transport of drugs // *J. Invest. Dermatol.* 1991. V. 97. P. 874–879.
1846. Fang J.-Y., Lee W.-R., Shen S.-C., Fang Y.-P., Hu C.-H. Enhancement of topical 5-aminolaevulinic acid delivery by Erbium:YAG laser and microdermabrasion: a comparison with iontophoresis and electroporation // *British J. Dermatol.* 2004. V. 151. P. 132–140.
1847. Jacobi U., Waibler E., Sterry W., Lademann J. *In vivo* determination of the long-term reservoir of the horny layer using laser scanning microscopy // *Laser Phys.* 2005. V. 15, № 4. P. 565–569.
1848. Waibler E. Investigation of the long-term reservoir of the stratum corneum- Quantification, localization and residence time / Summary of the doctoral thesis, 22.01.2005. Berlin: Charité-Universitätsmedizin.
1849. Mordon S., Sumian C., Devoisselle J.M. Site-specific methylene blue delivery to pilosebaceous structures using highly porous nylon microspheres: an experimental evaluation // *Lasers Surg. Med.* 2003. V. 33. P. 119–125.
1850. Симоненко Г. В., Папаев А. В., Тучин В. В. Двухшаговая модель распространения света в биотканях // *Опт. журн.* 2007. Т. 74, № 10. С. 36–40.
1851. Симоненко Г. В., Зимняков Д. А., Тучин В. В. Дисперсионная зависимость оптической анизотропии и степени деполяризации фиброзных тканей // *Опт. журн.* 2010. Т. 77, № 9. С. 69–74.
1852. Симоненко Г., Тучин В., Зимняков Д. Оптические характеристики жидкокристаллических и биологических систем. Berlin: LAMBERT Academic Publishing GmbH & KG, 2010.
1853. Zimnyakov D. A., Sinichkin Yu. P. A study of polarization decay as applied to improved imaging in scattering media // *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* 2000. V. 2. P. 200–208.
1854. Dickie R., Bachoo R.M., Rupnick M.A., Dallabrida S.M., DeLoid G.M., Lai J., De-Pinho R.A., Rogers R.A. Three-dimensional visualization of microvessel architecture of whole-mount tissue by confocal microscopy // *Microvasc. Res.* 2006. V. 72, № 1–2. P. 20–26.
1855. Nazarov M., Shkurinov A., Tuchin V. V., Zhang X.-C. Terahertz tissue spectroscopy and imaging. Chapter 17 // *Handbook of Photonics for Biomedical Science* / Ed. by V. V. Tuchin. CRC Press, London, Taylor & Francis Group, 2010. P. 592–617.
1856. Назаров М. М., Шкуринов А. П., Кулешов Е. А., Тучин В. В. Терагерцовая импульсная спектроскопия биологических тканей // *Квант. электр.* 2008. Т. 38, № 7. С. 647–654.
1857. Png G.M., Choi J.W., Ng B.W.-H., Micken S.P., Abbott D., Zhang X.-C. The impact of hydration changes in fresh bio-tissue on THz spectroscopic measurements // *Phys. Med. Biol.* 2008. V. 53. P. 3501–3517.
1858. Oh S.J., Kang J., Maeng I., Suh J.-S., Huh Y.-M., Haam S., SonMarch J.-H. Nanoparticle-enabled terahertz imaging for cancer diagnosis // *Opt. Express.* 2009. V. 17, № 5. P. 3469–3475.

1859. Joseph C. S., Patel R., Neel V. A., Giles R. H., Yaroslavsky A. N. Imaging of *ex vivo* nonmelanoma skin cancers in the optical and terahertz spectral regions // *J. Biophoton.* 2012. P. 1–10; doi: 10.1002/jbio.201200111.
1860. Li P., Ni S., Zhang L., Zeng S., Luo Q. Imaging cerebral blood flow through the intact rat skull with temporal laser speckle imaging // *Opt. Lett.* 2006. V. 31. P. 1824–1826.
1861. Sun X., Li P., Luo W., Chen S., Feng N., Wang J., Luo Q. Investigating the effects of dimethylsulfoxide on hemodynamics during cortical spreading depression by combining laser speckle imaging with optical intrinsic signal imaging // *Lasers Surg. Med.* 2010. V. 42. P. 649–655.
1862. Виленский М. А., Агафонов Д. Н., Зимняков Д. А., Тучин В. В., Здражевский Р. А. Спекл-корреляционный анализ микрокапиллярного кровотока ногтевого ложа // *Квант. электрон.* 2011. Т. 41, № 4. С. 324–328.
1863. Виленский М. А., Семякина-Глушкова О. В., Тимошина П. А., Кузнецова Я. В., Семякин-Глушковский И. А., Агафонов Д. Н., Тучин В. В. Лазерная спекл-визуализация микроциркуляции крови в коре головного мозга лабораторных крыс при стрессе // *Квант. электрон.* 2012. Т. 42, № 6. С. 489–494.
1864. Priezzhev A. V., Ryaboshapka O. M., Firsov N. N., Sirko I. V. Aggregation and disaggregation of erythrocytes in whole blood: Study by backscattering technique // *J. Biomed. Opt.* 1999. V. 4, № 1. P. 76–84.
1865. Gandjbakhche A. H., Mills P., Snabre P. Light-scattering technique for the study of orientation and deformation of red blood cells in a concentrated suspension // *Appl. Opt.* 1994. V. 33. P. 1070–1078.
1866. Приезжев А. В., Фирсов Н. Н., Ладеманн Ю. Диагностика агрегации эритроцитов в пробах цельной крови методом обратного светорассеяния // *Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 2 / Под ред. В. В. Тучина. М.: Физматлит, 2007. С. 17–35.*
1867. Bertoluzzo S. M., Bollini A., Rsia M., Raynal A. Kinetic model for erythrocyte aggregation // *Blood Cells, Molecules, and Diseases.* 1999. V. 25, № 22. P. 339–349.
1868. Chien S. Physiological and pathophysiological significance of hemorheology // *Clinical Hemorheology / Ed. by S. Chien et al. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. P. 125–134.*
1869. Tycko D. H., Metz M. H., Epstein E. A., Grinbaum A. Flow-cytometric light scattering measurement of red blood cell volume and hemoglobin concentration // *Appl. Opt.* 1985. V. 24. P. 1355–1365.
1870. Кириллин М. Ю., Приезжев А. В. Моделирование распространения лазерного пучка в плоском слое суспензии эритроцитов методом Монте-Карло: сравнение вкладов рассеяния с различными кратностями в угловое распределение света // *Квант. электрон.* 2002. Т. 32, № 10. С. 883–887.
1871. Хлебцов Н. Г., Щеголев С. Ю. Учет несферичности частиц при определении параметров дисперсных систем методом спектра мутности. I. Характеристические функции светорассеяния систем несферических частиц с хаотической ориентацией в приближении Релея–Ганса // *Опт. спектр.* 1977. Т. 42, № 5. С. 956–962.
1872. Харуллина А. Я., Шумилина С. Ф. Определение функции распределения по размерам эритроцитов методом спектрального пропускания // *Ж. прикл. спектр.* 1973. Т. 19. С. 1078–1083.
1873. Beuthan J., Minet O., Herring M., Mueller G., Dressler C. Biological cells as optical phase-filters — a contribution to medical functional imaging // *Minimal Invasive Medizin.* 1994. V. 5, № 2. P. 75–78.
1874. Larin K. V., Akkin T., Motamedi M., Esenaliev R. O., Millner T. E. Phase-sensitive optical low-coherence reflectometry for detection of analyte concentration // *Appl. Opt.* 2004. V. 43. P. 3408–3414.
1875. Heinemann L., Kramer U., Klotzer H. M., Hein M., Volz D., Hermann M., Heise T., Rave K. Non-invasive task force: noninvasive glucose measurement by monitoring of scattering coefficient during oral glucose tolerance tests // *Diabetes Technol. Ther.* 2000. V. 2. P. 211–220.

1876. *Essenpreis M., Knüttel A., Boecker D.*: inventors; Boehringer Mannheim GmbH, assignee / Method and apparatus for determining glucose concentration in a biological sample // US patent 5, 710, 630, January 20, 1998.
1877. *Fine I.* Glucose correlation with light scattering patterns. Chapter 9 / Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues / Ed. by V. V. Tuchin. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2009. P. 95–138.
1878. *Nuttall F. O., Gannon M. C., Swaim W. R., Adams M. J.* Stability over time of glycohemoglobin, glucose, and red blood cells survival in hemologically stable people without diabetes // *Metabolism*. 2004. V. 53, № 11. P. 1399–1404.
1879. *Larin K. V., Larina I. V., Motamedi M., Gelikonov V., Kuranov R., Esenaliev R. O.* Potential application of optical coherent tomography for non-invasive monitoring of glucose concentration // *Proc. SPIE*. 2001. V. 4263. P. 83–90.
1880. *Esenaliev R. O., Prough D. S.* Noninvasive monitoring of glucose concentration with optical coherence tomography, Chapter 18 / Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues / Ed. by V. V. Tuchin. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2009. P. 506–528.
1881. *Schmidtke D. W., Freeland A. C., Heller A., Bonnacaze R. T.* Measurements and modeling of the transient difference between blood and subcutaneous glucose concentrations in the rat after injection of insulin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998. V. 95. P. 294–299.
1882. *Yaqoob Z., Psaltis D., Feld M. S., Yang C.* Optical phase conjugation for turbidity suppression in biological samples // *Nat. Photonics*. 2008. V. 2. P. 110–115.
1883. *Cui M., McDowell E. J., Yang C.* An *in vivo* study of turbidity suppression by optical phase conjugation (TSOPC) on rabbit ear // *Opt. Express*. 2010. V. 18. P. 25–30.
1884. *Gower D. P. M.* Optical phase conjugation. N. Y.: Springer-Verlag, 1994.
1885. *Chung S. H., Cerussi A. E., Klifa C., Baek H. M., Birgul O., Gulsen G., Merritt S. I., Hsiang D., Tromberg B. J.* *In vivo* water state measurements in breast cancer using broadband diffuse optical spectroscopy // *Phys. Med. Biol.* 2008. V. 53. P. 6713–6727.
1886. *Chance B., Luo Q., Nioka S., Alsop D. C., Detre J. A.* Optical investigations of physiology: a study of intrinsic and extrinsic biomedical contrast // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 1997. V. 352. P. 707–716.
1887. *Luo Q., Nioka S., Chance B.* Functional near-infrared imager // *Proc. SPIE*. 1997. V. 2979. P. 84–93.
1888. *Matcher S. J., Cooper C. E.* Absolute quantification of deoxyhaemoglobin concentration in tissue near infrared spectroscopy // *Phys. Med. Biol.* 1994. V. 39. P. 1295–1312.
1889. *Design of Pulse Oximeters* / Ed. by J. G. Webster. N. Y.: Taylor & Francis Group, 1997.
1890. *Moyle J. T. B.* *Pulse Oximetry* / London: BMJ Books, second editin, 2002.
1891. *Nachabé R., Evers D. J., Hendriks B. H. W., Lucassen G. W., van der Voort M., Rutgers E. J. Vrancken Peeters M.-J., Van der Hage J. A., Oldenburg H. S., Wesseling J., Ruers T. J. M.* Diagnosis of breast cancer using diffuse optical spectroscopy from 500 to 1600 nm: comparison of classification methods // *J. Biomed. Opt.* 2011. V. 16, № 8. P. 087010.
1892. *Thompson A. J., Coda S., Sørensen M. B., Kennedy G., Patalay R., Waitong-Brämning U., De Beule P. A. A., Neil M. A. A., Andersson-Engels S., Bendsøe N., French P. M. W., Svansson K., Dunsby C.* *In vivo* measurements of diffuse reflectance and time-resolved autofluorescence emission spectra of basal cell carcinomas // *J. Biophoton*. 2012. V. 5, № 3. P. 240–254.
1893. *Bish S. F., Rajaram N., Nichols B., Tunnell J. W.* Development of a noncontact diffuse optical spectroscopy probe for measuring tissue optical properties // *J. Biomed. Opt.* 2011. V. 16, № 12. P. 120505.
1894. *Wang C.-Y., Chuang M.-L., Chuang C.-C., Hsieh Y.-S., Sun C.-W.* The utility of far-infrared illumination in oxygenation dynamics as measured with near-infrared spectroscopy // *J. Biophoton*. 2012. V. 5, № 10. P. 719–723.
1895. *Сорвойя Х. С. С., Мюллюля Т. С., Кириллин М. Ю., Сергеева Е. А., Мюллюля Р., Элесуд А. А., Никкинен Ю., Тервонен О., Кивиниеми В.* Неинвазивный МРТ-совместимый

- волоконно-оптический прибор для функциональной рефлектометрии мозга человека в оптическом и ближнем ИК диапазонах // Квант. электр. 2010. V. 40, № 12. С. 1067–1073.
1896. *Chen P., Fernald B., Lin W.* Estimation of regional hemoglobin concentration in biological tissues using diffuse reflectance spectroscopy with a novel spectral interpretation algorithm // *Phys. Med. Biol.* 2011. V. 56. P. 3985–4000.
1897. *Darvin M.E., Sandhagen C., Koecher W., Sterry W., Lademann J., Meinke M.C.* Comparison of two methods for noninvasive determination of carotenoids in human and animal skin: Raman spectroscopy versus reflection spectroscopy // *J. Biophoton.* 2012. V. 5, № 7. P. 550–558.
1898. *Lilledahl M.B., Haugen O.A., Barkost M., Svaasand L.O.* Reflection spectroscopy of atherosclerotic plaque // *J. Biomed. Opt.* 2006. V. 11, № 2. P. 021005-1–7.
1899. *Heekeren H.R., Wenzel R., Obrig H. et al.* Functional human brain mapping during visual stimulation using near-infrared light // *Proc. SPIE.* 1997. V. 2979. P. 847–858.
1900. *Biomedical Imaging* / Ed. by F. Lin, M. Olivo, S. Y. Kung Heidelberg: Springer-Verlag, 2009.
1901. *Diagnostic and Therapeutic Applications of Breast Imaging* / Ed by J. S. Suri, S. V. Sree, K.-H. Ng, R. M. Rangayyan Bellingham, WA: SPIE Press, 2012. V. P. M211.
1902. *Delgado Atencio J.A., Jacques S.L., Vázquez y Montiel S.* Monte Carlo modeling of light propagation in neonatal skin // *Applications of Monte Carlo Methods in Biology, Medicine and Other Fields of Science* / Ed. by Ch. J. Mode. InTech, 2011. P. 297–314.
1903. *Chuang C.-C., Wang P.-N., Chen W.-T., Lan T.-H., Chen C.-M., Hsieh Y.-S., Wang C.-Y., Sun C.-W.* Near-infrared brain volumetric imaging method: Monte Carlo study // *IEEE J. Select. Tops. Quant. Electr.* 2012. V. 18, № 3. P. 1122–1129.
1904. *Choyke P.L., Kobayashi H.* Medical uses of fluorescence imaging: Bringing disease to light // *IEEE J. Select. Tops. Quant. Electr.* 2012. V. 18, № 3. P. 1140–1146.
1905. *Fang H., Ollero M., Vitkin E., Kimerer L.M., Cipolloni P.B., Zaman M.M., Freedman S.D., Bigio I.J., Itzkan I., Hanlon E.B., Perelman L. T.* Noninvasive sizing of subcellular organelles with light scattering spectroscopy // *IEEE J. Sel. Top. Quant. Elect.* 2003. V. 9, № 2. P. 267–276.
1906. *Qiu L., Turzhitsky V., Chuttani R., Pleskow D.K., Goldsmith J.D., Guo L., Vitkin E., Itzkan I., Hanlon E.B., Perelman L. T.* Spectral imaging with scattered light: from early cancer detection to cell biology // *IEEE J. Select. Tops. Quant. Electr.* 2012. V. 18, № 3. P. 1073–1083.
1907. *Nziachristos V., Ma X.H., Schnall M., Yodh A., Chance B.* Concurrent multi-channel time-resolved NIR with MR mammography: Instrumentation and initial clinical results // *Advances in Optical Imaging and Photon Migration: OSA TOPS. V. 21* / Ed. by J. G. Fujimoto, M. S. Patterson. Washington, DC: Optical Society of America, 1998. P. 284–288.
1908. *Ijichi S., Kusaka T., Isobe K., Islam F., Okubo K., Okada H., Namba M., Kawada K., Imai T., Itoh S.* Quantification of cerebral hemoglobin as a function of oxygenation using near-infrared time-resolved spectroscopy in a piglet model of hypoxia // *J. Biomed. Opt.* 2005. V. 10, № 2. P. 024026-1–9.
1909. NIM Inc., 3508 Market St., Philadelphia, PA 19104.
1910. *Ma H. Y., Du C. W., Chance B.* A homodyne frequency-domain instrument — I&Q phase detection system // *Proc. SPIE.* 1997. V. 2979. P. 826–837.
1911. *Chance B., Anday E., Nioka S. et al.* A novel method for fast imaging of brain function, non-invasively, with light // *Opt. Express.* 1998. V. 2. P. 411–423.
1912. *Nioka S., Zhou S., Anday E., Thayer W., Kurth D., Papadopoulos M., Chen Y., Chance B.* Phazed array functional imaging of neonate's neurological disorders // *Advances in Optical Imaging and Photon Migration: OSA TOPS. V. 21* / *Fujimoto J. G., Patterson M. S.* Washington, DC: Optical Society of America, 1998. P. 262–265.
1913. *Chance B., Anday E., Conant E., Nioka S., Zhou S., Long H.* Rapid and sensitive optical imaging of tissue functional activity, and breast // *Advances in Optical Imaging and Photon Migration: OSA TOPS. V. 21* / *Fujimoto J. G., Patterson M. S.* Washington, DC: Optical Society of America, 1998. P. 218–225.

1914. Daneu R. M., Wang Y., Li X. D. et al. // Regional imager for low-resolution functional imaging of the brain with diffusing near-infrared light // *Photochem. Photobiol.* 1998. V. 67. P. 33–40.
1915. Wolf M., Wolf U., Choi J. H., Toronov V., Paunescu L. A., Michalos A., Gratton E. Fast cerebral functional signal in the 100-ms range detected in the visual cortex by frequency-domain near infrared spectrophotometry // *Psychophysiology*. 2003. V. 40, № 4. P. 521–528.
1916. Choi J. H., Wolf M., Toronov V., Wolf U., Polzonetti C., Hueber D., Saionova L. P., Gupta R., Michalos A., Mantulin W., Gratton E. Noninvasive determination of the optical properties of adult brain: Near-infrared spectroscopy approach // *J. Biomed. Opt.* 2004. V. 9, № 1. P. 221–229.
1917. Zhao J., Ding H. S., Hou X. L., Zhou C. L., Chance B. *In vivo* determination of the optical properties of infant brain using frequency-domain near-infrared spectroscopy // *J. Biomed. Opt.* 2005. V. 10, № 2. P. 024028-1–7.
1918. Gratton E., Toronov V., Wolf U., Wolf M., Webb A. Measurement of brain activity by near-infrared light // *J. Biomed. Opt.* 2005. V. 10, № 1. P. 11008.
1919. Toronov V. Yu., Zhang X., Webb A. G. A spatial and temporal comparison of hemodynamic signals measured using optical and functional magnetic resonance imaging during activation in the human primary visual cortex // *NeuroImage*. 2007. V. 34. P. 1136–1148.
1920. Steinkellner O., Gruber C., Wabnitz H., Jelzow A., Steinbrink J., Fiebach J. B., Macdonald R., Obrig H. Optical bedside monitoring of cerebral perfusion: technological and methodological advances applied in a study on acute ischemic stroke // *J. Biomed. Opt.* 2010. V. 15, № 6. P. 061708.
1921. Liebert A., Wabnitz H., Elster C. Determination of absorption changes from moments of distributions of times of flight of photons: optimization of measurement conditions for a two-layered tissue model // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17, № 5. P. 057005.
1922. Jelzow A., Wabnitz H., Obrig H., Macdonald R., Steinbrink J. Separation of indocyanine green boluses in the human brain and scalp based on time-resolved *in vivo* fluorescence measurements // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 17, № 5. P. 057003.
1923. Schnorrenberg H.-J., Haßner R., Hengstebeck M., Schlinkmeier K., Zinth W. Polarization modulation can improve resolution in diaphanography // *Proc. SPIE*. 1995. V. 2326. P. 459–464.
1924. Demos S. G., Wang W. B., Alfano R. R. Imaging objects hidden in scattering media with fluorescence polarization preservation of contrast agents // *Appl. Opt.* 1998. V. 37. P. 792–797.
1925. Demos S. G., Wang W. B., Ali J., Alfano R. R. New optical difference approaches for subsurface imaging of tissues // *Advances in Optical Imaging and Photon Migration*. OSA TOPS. V. 21 / Ed. by J. G. Fujimoto, M. S. Patterson. Washington, DC: Optical Society of America, 1998. P. 405–410.
1926. Muccini A., Kollias N., Phillips S. B., Anderson R. R., Sober A. J., Stiller M. J., Drake L. A. Polarized light photography in the evaluation of photoaging // *J. Am. Acad. Dermatol.* 1995. V. 33. P. 765–769.
1927. Синичкин Ю. П., Зимняков Д. А., Агафонов Д. Н., Кузнецова Л. В. Визуализация рассеивающих сред при обратном рассеянии линейно поляризованного монохроматического света // *Опт. спектр.* 2002. Т. 93. С. 110–116.
1928. Jacques S. L., Lee K., Roman J. Scattering of polarized light by biological tissues // *Proc. SPIE*. 2000. V. 4001. P. 14–28.
1929. Tyo J. S. Enhancement of the point-spread function for imaging in scattering media by use of polarization-difference imaging // *J. Opt. Soc. Am. A*. 2000. V. 17. P. 1–10.
1930. Зимняков Д. А., Синичкин Ю. П., Тучин В. В. Поляризационная отражательная спектроскопия биотканей: диагностические приложения // *Известия вузов. Радиофизика*. 2004. Т. 47, № 10/11. С. 957–975.

1931. *Myakov A., Nieman L., Wicky L., Utzinger U., Richards-Kortum R., Sokolov K.* Fiber optic probe for polarized reflectance spectroscopy *in vivo*: Design and performance // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, № 3. P. 388–397.
1932. *Newton R. H., Brown J. Y., Meek K. M.* Polarised light microscopy technique for quantitative mapping collagen fibril orientation in cornea // *Proc. SPIE.* 1996. V. 2926. P. 278–284.
1933. *Inoué S.* Video imaging processing greatly enhance contrast, quality, and speed in polarization-based microscopy // *J. Cell Biol.* 1981. V. 89. P. 346–356.
1934. *Oldenbourg R., Mei G.* New polarized light microscope with precision universal compensator // *J. Microsc.* 1995. V. 180, № 2. P. 140–147.
1935. *Tower T. T., Tranquillo R. T.* Alignment maps of tissues: I. Microscopic elliptical polarimetry // *Biophys. J.* 2001. V. 81. P. 2954–2963.
1936. *Tower T. T., Tranquillo R. T.* Alignment maps of tissues: II. Fast harmonic analysis for imaging // *Biophys. J.* 2001. V. 81. P. 2964–2971.
1937. *Yakovlev D. A., Kurchatkin S. P., Pravdin A. B., Gurianov E. V., Kasatkin M. Yu., Zimnyakov D. A.* Polarization monitoring of structure and optical properties of the heterogenous birefringent media: Application in the study of liquid crystals and biological tissues // *Proc. SPIE* 2003. V. 5067. P. 64–72.
1938. *Gan X., Schilders S. P., Gu M.* Image enhancement through turbid media under a microscope by use of polarization gating methods // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1999. V. 16. P. 2177–2184.
1939. *Gan X., Gu M.* Image reconstruction through turbid media under a transmission-mode microscope // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, № 3. P. 372–377.
1940. *Huse N., Schönle A., Hell S. W.* Z-polarized confocal microscopy // *J. Biomed. Opt.* 2001. V. 6, № 3. P. 273–276.
1941. *Asundi A., Kishen A.* Digital photoelastic investigations on the tooth-bone interface // *J. Biomed. Opt.* 2001. V. 6. P. 224–230.
1942. *Kishen A., Asundi A.* Photomechanical investigations on post endodontically rehabilitated teeth // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, № 2. P. 262–270.
1943. *Tata D. B., Foresti M., Cordero J., Tomashefsky P., Alfano M. A., Alfano R. R.* Fluorescence polarization spectroscopy and time-resolved fluorescence kinetics of native cancerous and normal rat kidney tissues // *Biophys. J.* 1986. V. 50. P. 463–469.
1944. *Pradhan A., Jena S. S., Laxmi B. V., Agarwal A.* fluorescence depolarization of normal and diseased skin tissues // *Proc. SPIE.* 1998. V. 3250. P. 78–82.
1945. *Mohanty S. K., Ghosh N., Majumder S. K., Gupta P. K.* Depolarization of autofluorescence from malignant and normal human breast tissues // *Appl. Opt.* 2001. V. 40, № 7. P. 1147–1154.
1946. *Ghosh N., Majumder S. K., Gupta P. K.* Polarized fluorescence spectroscopy of human tissue // *Opt. Lett.* 2002. V. 27. P. 2007–2009.
1947. *Yaroslavsky A. N., Neel V., Anderson R. R.* Fluorescence polarization imaging for delineating nonmelanoma skin cancers // *Opt. Lett.* 2004. V. 29. P. 2010–2012.
1948. *Yaroslavsky A. N., Salomatina E. V., Neel V., Anderson R., Flotte T.* Fluorescence polarization of tetracycline derivatives as a technique for mapping nonmelanoma skin cancers // *J. Biomed. Opt.* 2007. V. 12, № 1. P. 014005.
1949. *Al-Arashi M., Salomatina E. V., Yaroslavsky A. N.* Multimodal confocal microscopy for the detection of nonmelanoma skin cancers // *Las. Surg. Med.* 2007. V. 39, № 9. P. 706–715.
1950. *Tannous Z., Al-Arashi M., Shah S., Yaroslavsky A. N.* Delineating melanoma using multimodal polarized light imaging // *Las. Surg. Med.* 2009. V. 41. P. 10–16.
1951. *Aizu Y., Asakura T.* Bio-speckle phenomena and their application to the evaluation of blood flow // *Opt. Laser Technol.* 1991. V. 23. P. 205–219.
1952. *Ruth B.* Measuring the steady-state value and the dynamics of the skin blood flow using the non-contact laser method // *Med. Eng. Phys.* 1994. V. 16. P. 105–111.
1953. *Stenov E. N. D., Öberg P. A.* Design and evaluation of a fibre-optic sensor for limb blood flow measurements // *Physiol. Meas.* 1994. V. 15, № 3. P. 261–270.

1954. *Tjin S. C., Ng S. L., Soo K. T.* New side-projected fiber optic probe for *in vivo* flow measurements // *Opt. Eng.* 1996. V. 35, № 11. P. 3123–3129.
1955. *Tjin S. C., Kilpatrick D., Johnston P. R.* Evaluation of the two-fiber laser Doppler anemometer for *in vivo* blood flow measurements: experimental and flow simulation results // *Opt. Eng.* 1995. V. 34, № 2. P. 460–469.
1956. *Ansari R. R.* Ocular static and dynamic light scattering: a non-invasive diagnostic tool for eye research and clinical practice // *J. Biomed. Opt.* 2004. V. 9, № 1. P. 22–37.
1957. *Chu B.* Laser Light Scattering: Basic Principles and Practice. N. Y.: Academic Press, 1991.
1958. *Tanaka T., Benedek G. B.* Observation of protein diffusivity in intact human and bovine lenses with application to cataract // *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 1975. V. 14, № 6. P. 449–456.
1959. *Bursell S. E., Magnante P. C., Chylack L. T.* *In vivo* uses of quasi-elastic light scattering spectroscopy as a molecular probe in the anterior segment of the eye // *Noninvasive Diagnostic Techniques in Ophthalmology* / Ed. by B. R. Masters. N. Y.: Springer-Verlag, 1990. P. 342–365.
1960. *Rovati L., Fankhauser II F., Rick J.* Design and performance of a new ophthalmic instrument for dynamic light scattering in the human eye // *Rev. Sci. Instrum.* 1996. V. 67, № 7. P. 2620–2627.
1961. *Boas D. A., Yodh A. G.* Spatially varying dynamical properties of turbid media probed with diffusing temporal light correlation // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1997. V. 14, № 1. P. 192–215.
1962. *Boas D. A., Meglinsky I. V., Zemaný L. et al.* Diffusion of temporal field correlation with selected applications // *Coherence — domain methods in biomedical optics* / Ed. by V. V. Tuchin. Bellingham: SPIE. 1996. V. 2732. P. 34–46.
1963. *Yodh A. G., Georgiades N.* Diffusing-wave interferometry // *Opt. Commun.* 1991. V. 83. P. 56–59.
1964. *Меглинский И. В., Боас Д. А., Йод А. Г., Чанс Б., Тучин В. В.* Развитие метода корреляции флуктуаций интенсивности лазерного излучения для неинвазивного мониторинга и измерения параметров кровотока // *Изв. вузов. Приклад. нелинейная динамика.* 1996. Т. 4, № 6. С. 72–81.
1965. *Хайруллина А. Я.* Информативность автокорреляционной функции временных флуктуаций радиации, рассеянной «назад» суспензией эритроцитов // *Опт. спектр.* 1996. Т. 80, № 2. С. 268–273.
1966. *Yu G., Lech G., Zhou C., Chance B., Mohler III E. R., Yodh A. G.* Time-dependent blood flow and oxygenation in human skeletal muscles measured with noninvasive near-infrared diffuse optical spectroscopies // *J. Biomed. Opt.* 2005. V. 10, № 2. P. 024027-1–7.
1967. *Frerichs K. U., Feuerstein G. Z.* Laser Doppler flowmetry: a review of its application for measuring cerebral and spinal cord blood flow // *Mol. Chem. Neuropathol.* 1990. V. 12. P. 55–61.
1968. *Belcaro G. V., Hoffman U., Bollinger A., Nicolaidis A. N.* Laser Doppler // London: Med-Orion Publishing Company, 1994.
1969. *Bioengineering of the Skin: Skin Surface Imaging and Analysis* / Ed. by K.-P. Wilhelm et al. Boca Raton et al.: CRC Press, 1997.
1970. *Riva C. E., Petring B. L., Shonat R. D., Pournaras C. J.* Scattering process in LDV from retinal vessels // *Appl. Opt.* 1989. V. 28. P. 1078–1083.
1971. *Ingofsson E. R., Tronstad L., Hersh E. V., Riva C. E.* Efficacy of laser Doppler flowmetry in determining pulp vitality of human teeth // *Endod. Dent. Traumatol.* 1994. V. 10. P. 83–87.
1972. *Приезжев А. В., Левенко Б. А., Савченко Н. Б.* Исследование динамики кровотока в эмбриогенезе *macropodus opercularis* // 1995. Т. 40, № 6. С. 1348–1353.
1973. *Barton J. K., Stromski S.* Flow measurements without phase information in optical coherence tomography images // *Opt. Express.* 2005. V. 13, № 14. P. 5234–5239.
1974. *de Mul F. F. M., Koelink M. H., Kok M. L. et al.* Laser Doppler velocimetry and Monte Carlo simulations on models for blood perfusion in tissue // *Appl. Opt.* 1995. V. 34, № 28. P. 6595–6611.

1975. Zang D. Y., Wilder-Smith P., Millerd J. E., Arrastia A. M. A. Novel approach to laser Doppler measurement of pulpal blood flow // *J. Biomed. Opt.* 1997. V. 2. С. 304–309.
1976. Logean E., Schmetterer L. F., Riva C. E. Optical Doppler velocimetry at various retinal vessel depths by variation of the source coherence length // *Appl. Opt.* 2000. V. 39, № 16. P. 2858–2862.
1977. Кудинов Д. В., Приезжев А. В. Численное моделирование рассеяния света в мутной среде с движущимися частицами применительно к задаче оптической медицинской томографии // *Вестник Моск. ун-та. Сер. 3. Физика. Астрон.* 1998. Т. 53, № 3. С. 30–35.
1978. Serov A., Lasser T. High-speed laser Doppler imaging of blood flow in biological tissue // *Proc. SPIE.* 2006. V. 6163. P. 616301-1–12.
1979. Aizu Y., Ogino K., Sugita T. et al. Evaluation of blood flow at ocular fundus by using laser speckle // *Appl. Opt.* 1992. V. 31. P. 3020–3029.
1980. Zang B., Pleass C. M., Ih C. S. Feature information extraction from dynamic biospeckle // *Appl. Opt.* 1994. V. 33. P. 231–237.
1981. Zakharov P., Bhat S., Schurtenberger P., Scheffold F. Multiple scattering suppression in dynamic light scattering based on a digital camera detection scheme // *Appl. Opt.* 2006. V. 45. P. 1756–1764.
1982. Dunn A. K., Bolay H., Moskowitz M. A., Boas D. A. Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2001. V. 21. P. 195–201.
1983. Yuan S., Devor A., Boas D. A., Dunn A. K. // Determination of optimal exposure time for imaging of blood flow changes with laser speckle contrast imaging // *Appl. Opt.* 2005. V. 44. P. 1823–1830.
1984. Forrester K. R., Stewart C., Tulip J., Leonard C., Bray R. C. Comparison of laser speckle and laser Doppler perfusion imaging: Measurement in human skin and rabbit articulat tissue // *Med. Biol. Eng. Comput.* 2002. V. 40. P. 687–697.
1985. Forrester K. R., Tulip J., Leonard C., Stewart C., Bray R. C. A laser speckle imaging technique for measuring tissue perfusion // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2004. V. 51. P. 2074–2084.
1986. Liu Q., Wang Z., Luo Q. Temporal clustering analysis of cerebral blood flow activation maps measured by laser speckle contrast imaging // *J. Biomed. Opt.* 2005. V. 10, № 2. P. 024019-1–7.
1987. Völker A. C., Zakharov P., Weber B., Buck F., Scheffold F. Laser speckle imaging with an active noise reduction scheme // *Opt. Express.* 2005. V. 13, № 24. P. 9782–9787.
1988. Weber B., Burger C., Wyss M. T., von Schulthess G. K., Scheffold F., Buck A. Optical imaging of the spatiotemporal dynamics of cerebral blood flow and oxidative metabolism in the rat barrel cortex // *Europ. J. Neurosci.* 2004. V. 20. 2004. P. 2664–2671.
1989. Serov A., Steenbergen W., de Mul F. Prediction of the photodetector signal generated by Doppler-induced speckle fluctuations: Theory and some validations // *J. Opt. Soc. Am. A.* 2001. V. 18. P. 622–639.
1990. Bonner R., Nossal R. Model for laser Doppler measurements of blood flow in tissue // *Appl. Opt.* 1981. V. 20. P. 2097–2107.
1991. Bolay H., Reuter U., Dunn A. K., Huang Z., Boas D. A., Moskowitz A. M. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model // *Nat. Med.* 2002. V. 8. P. 136–142.
1992. Wang Z., Luo Q. M., Cheng H. Y., Luo W. H., Gong H., Lu Q. Blood flow activation in rat somatosensory cortex under sciatic nerve stimulation revealed by laser speckle imaging // *Prog. Nat. Sci.* 2003. V. 13. P. 522–527.
1993. Ngai A. C., Meno J. R., Winn H. R. Simultaneous measurements of pial arteriolar diameter and laser-Doppler flow during somatosensory stimulation // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1995. V. 15. P. 124–127.
1994. Matsuura T., Kanno I. Quantitative and temporal relationship between local cerebral blood flow and neuronal activation induced by somatosensory stimulation in rats // *Neurosci. Res.* 2001. V. 40. P. 281–290.

1995. Tamaki Y., Araie M., Kawamoto E., Eguchi S., Fujii H. Noncontact, two-dimensional measurement of tissue circulation in choroid and optic nerve head using laser speckle phenomenon // *Exp. Eye Res.* 1995. V. 60. P. 373–383.
1996. Yaoeda K., Shirakashi M., Funaki S., Nakatsue T., Abe H. Measurement of microcirculation in the optic nerve head by laser speckle flowgraphy and scanning laser Doppler flowmetry // *Am. J. Ophthalmol.* 2000. V. 129. P. 734–739.
1997. Cheng H. Y., Luo Q. M., Zeng S. Q., Chen S. B., Cen J., Gong H. Modified laser speckle imaging method with improved spatial resolution // *J. Biomed. Opt.* 2003. V. 8, № 3. P. 559–564.
1998. Cheng H. Y., Luo Q. M., Zeng S. Q., Cen J., Liang W. X. Optical dynamic imaging of the regional blood flow in the rat mesentery under the effect of noradrenalin // *Prog. Nat. Sci.* 2003. V. 13. P. 198–201.
1999. Wang Z., Luo Q. M., Cheng H. Y., Luo W. H., Gong H., Lu Q. Blood flow activation in rat somatosensory cortex under sciatic nerve stimulation revealed by laser speckle imaging // *Prog. Nat. Sci.* 2006. V. 13, № 7. P. 522–527.
2000. Wang Z., Luo W. H., Li P. C., Qiu J. J., Luo Q. M. Acute hyperglycemia compromises cerebral blood flow following cortical spreading depression in rats monitored by laser speckle imaging // *J. Biomed. Opt.* 2008. V. 13. P. 064023.
2001. Choi B., Ramirez-San-Juan J. C., Lotfi J., Nelson J. S. Linear response range characterization and *in vivo* application of laser speckle imaging of blood flow dynamics // *J. Biomed. Opt.* 2006. V. 11. P. 041129.
2002. Huang Y. C., Ringold T. L., Nelson J. S., Choi B. Noninvasive blood flow imaging for real-time feedback during laser therapy of port wine stain birthmarks // *Lasers Surg. Med.* 2008. V. 40. P. 167–173.
2003. Durduran T., Burnett M. G., Yu G., Zhou C., Furuya D., Yodh A. G., Detre J. A., Greenberg J. H. Spatiotemporal quantification of cerebral blood flow during functional activation in rat somatosensory cortex using laser-speckle flowmetry // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2004. V. 24. P. 518–525.
2004. Jones P. B., Shin H. K., Boas D. A., Hyman B. T., Moskowitz M. A., Ayata C., Dunn A. K. Simultaneous multispectral reflectance imaging and laser speckle flowmetry of cerebral blood flow and oxygen metabolism in focal cerebral ischemia // *J. Biomed. Opt.* 2008. V. 13. P. 044007.
2005. Luo Z., Yuan Z., Pan Y., Du C. Simultaneous imaging of cortical hemodynamics and blood oxygenation change during cerebral ischemia using dual-wavelength laser speckle contrast imaging // *Opt. Lett.* 2009. V. 34. P. 1480–1482.
2006. Obrenovitch T. P., Chen S., Farkas E. Simultaneous, live imaging of cortical spreading depression and associated cerebral blood flow changes, by combining voltage-sensitive dye and laser speckle contrast methods // *Neuroimage.* 2009. V. 45. P. 68–74.
2007. Cheng H., Duong T. Q. Simplified laser-speckle-imaging analysis method and its application to retinal blood flow imaging // *Opt. Lett.* 2007. V. 32, № 15. P. 2188–2190.
2008. Cheng H., Yan Y., Duong T. Q. Temporal statistical analysis of laser speckle images and its application to retinal blood-flow imaging // *Opt. Express.* 2008. V. 16, № 14. P. 10214–10219.
2009. Le T. M., Paul J. S., Al-Nashash H., Tan A., Luft A. R., Sheu F. S., Ong S. H. New insights into image processing of cortical blood flow monitors using laser speckle imaging // *IEEE Trans. Med. Imaging.* 2007. V. 26, № 6. P. 833–842.
2010. Liu S., Li P., Luo Q. Fast blood flow visualization of high resolution laser speckle imaging data using graphics processing unit // *Opt. Express.* 2008. V. 16. P. 14321–14329.
2011. Tang X., Feng N., Sun X., Li P., Luo Q. Portable laser speckle perfusion imaging system based on digital signal processor // *Rev. Sci. Instrum.* 2010. V. 81. P. 125110.
2012. Jiang C., Zhang H., Wang J., Wang Y., He H., Liu R., Zhou F., Deng J., Li P., Luo Q. Dedicated hardware processor and corresponding system-on-chip design for real-time laser speckle imaging // *J. Biomed. Opt.* 2011. V. 16. P. 116008-1–10.

2013. Yang O., Cuccia D., Choi B. Real-time blood flow visualization using the graphics processing unit // J. Biomed. Opt. 2011. V. 16, № 1. P. 016009.
2014. Dunn A.K. Laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow // Ann. Biomed. Eng. 2012. V. 40, № 2. P. 367–377.
2015. Kalchenko V., Harmelin A., Fine I., Zharov V., Galanzha E., Tuchin V. Advances in intravital microscopy for monitoring cell flow dynamics *in vivo* // Proc. SPIE. 2007. V. 6436. P. 64360D-1–15.
2016. Kalchenko V., Brill A., Bayewitch M., Fine I., Zharov V., Galanzha E., Tuchin V., Harmelin A. *In vivo* dynamic light scattering imaging of blood coagulation // J. Biomed. Opt. 2007. V. 12, № 5. P. 052002-1–4.
2017. Kalchenko V., Madar N., Meglinski I., Harmelin A. *In vivo* characterization of tumor and tumor vascular network using a multi-mode imaging approach // J. Biophoton. 2011. V. 4, № 9. P. 645–649.
2018. Кузнецов Ю. Л., Кальченко В. В., Меглинский И. В. Мультимодальная визуализация сосудистого русла и микроциркуляции кровотока методами оптической диагностики // Квант. электр. 2011. Т. 41, № 4. С. 308–313.
2019. Kalchenko V., Kuznetsov Yu., Meglinski I., Harmelin A. Label free *in vivo* laser speckle imaging of blood and lymph vessels // J. Biomed. Opt. 2012. V. 17, № 5. P. 050502-1–3.
2020. Henning M., Gerdt D., Spraggins T. Using a fiber-optic pulse sensor in magnetic resonance imaging // Proc. SPIE. 1991. V. 1420. P. 34–40.
2021. Khanna S. M., Danliker R., Willemin J.-F. et al. Cellular vibration and motility in the organ of corti // Acta Oto-Laryngologica. 1989. Suppl. 467.
2022. Khanna S. M., Koester C. J., Willemin J. F. et al. A noninvasive optical system for the study of the function of inner ear in living animals // Proc. SPIE. 1996. V. 2732. P. 64–81.
2023. Stasche N., Foth H.-J., Hoermann K. et al. Middle ear transmission disorders- Tympanic membrane vibration analysis by laser-Doppler-vibrometry // Acta Oto-laryngologica. 1994. V. 114. P. 59–63.
2024. Maeta M., Kawakami S., Ogawara T., Masuda Y. Vibration analysis of the tympanic membrane with a ventilation tube and a perforation by holography // Proc. SPIE. 1991. V. 1429. P. 152–161.
2025. Hong H. D., Fox M. Noninvasive Detection of cardiovascular pulsations by optical Doppler techniques // J. Biomed. Opt. 1997. V. 2, № 4. P. 382–390.
2026. Хаст Ю., Миллиля Р., Сорвойа Х., Миеттинен Я. Использование автодинного эффекта в диодном лазере для измерения формы артериальной пульсовой волны // Квант. электр. 2002. Т. 32, № 11. С. 975–980.
2027. Hast J. Self-Mixing Interferometry and its Applications in Noninvasive Pulse Detection. PhD Dissertation. Oulu, Finland: Oulu University Press, 2003.
2028. Tuchin V. V., Ampilogov A. V., Bogoroditsky A. A. et al. Laser speckle and optical fiber sensors for micromovements monitoring in biotissues // Proc. SPIE. 1991. V. 1420. P. 81–92.
2029. Kuzmin S. Yu., Ul'yanov S. S., Tuchin V. V., Ryabukho V. P. Speckle and speckle-interferometric methods in cardiodiagnostics // Proc. SPIE. 1996. V. 2732. P. 82–99.
2030. Conerty M., Castracane J., Saravia E. et al. Development of otolaryngological interferometric fiber optic diagnostic probe // Proc. SPIE. 1992. V. 1649. P. 98–105.
2031. Ul'yanov S. S., Tuchin V. V. The analysis of space-time projection of differential and Michelson-type output signal for measurement // Proc. SPIE. 1992. V. 1981. P. 165–174.
2032. Berkovits R., Feng S. Theory of speckle-pattern tomography in multiple-scattering media // Phys. Rev. Lett. 1990. V. 65. P. 3120–3123.
2033. Zimnyakov D. A., Tuchin V. V. Fractality of speckle intensity fluctuations // Appl. Opt. 1996. V. 35. P. 4325–4333.
2034. Зимняков Д. А., Тучин В. В., Мишин А. А. Визуализация фрактальных структур биотканей с использованием метода пространственной спекл-коррелометрии // Изв. вузов, Приклад. нелин. динамика. 1996. Т. 4, № 1. С. 49–58.

2035. *Zimnyakov D. A., Tuchin V. V., Utz S. R., Mishin A. A.* Speckle imaging methods using focused laser beams in applications to tissue mapping // Proc. SPIE. 1995. V. 2433. P. 411–420.
2036. *Зимняков Д. А., Тучин В. В.* О двумодальности распределений интенсивности спекл-полей для крупномасштабных фазовых рассеивателей // Письма в ЖТФ. 1995. Т. 21, № 3. С. 44–51.
2037. *Zimnyakov D. A., Tuchin V. V.* «Lens-like» Local scatterers approach to the biotissue structure analysis // Proc. SPIE. 1995. V. 2647. P. 334–342.
2038. *Зимняков Д. А., Рябухо В. П., Ларин К. В.* «Микролинзовый» эффект при дифракции сфокусированных пучков на крупномасштабных фазовых экранах // Письма в ЖТФ. 1994. Т. 20. С. 14–19.
2039. *Зимняков Д. А.* Масштабные эффекты в частично развитых спекл-структурах. Случай гауссовых фазовых экранов // Опт. спектр. 1995. Т. 79, № 1. С. 155–162.
2040. *Zimnyakov D. A., Tuchin V. V., Utz S. R.* Human skin epidermis structure investigation using coherent light scattering // Proc. SPIE. 1994. V. 2100. P. 218–224.
2041. *Zimnyakov D. A., Tuchin V. V., Utz S. R., Mishin A. A.* Human skin image analysis using coherent focused beam scattering // Proc. SPIE. 1995. V. 2329. P. 115–125.
2042. *Зимняков Д. А., Тучин В. В., Мишин А. А., Ларин К. В.* Корреляционная размерность спекл-полей для рассеивающих структур с фрактальными свойствами // Изв. вузов. Приклад. нелинейн. динамика. 1995. Т. 3, № 6. С. 126–134.
2043. *Jacques S. J., Kirkpatrick S.* Acoustically modulated speckle imaging of biological tissues // Opt. Lett. 1998. V. 23, № 11. P. 879–881.
2044. *Kirkpatrick S., Cipolla M. J.* High resolution imaged laser speckle strain gauge for vascular applications // J. Biomed. Opt. 2000. V. 5, № 1. P. 62–71.
2045. *Duncan D. D., Kirkpatrick S.* Processing algorithms for tracking speckle shifts in optical elastography of biological tissues // J. Biomed. Opt. 2001. V. 6, № 4. P. 418–426.
2046. *Kishen A., Murukeshan V. M., Krishnakumar V., Asundi A.* Analysis on the nature of thermally induced deformation in human dentine by electronic speckle pattern interferometry (ESPI) // J. of Dentistry. 2001. V. 29. P. 531–537.
2047. *Lademann J., Weigmann H.-J., Sterry W., Tuchin V., Zimnyakov D., Müller G., Schaefer H.* Analysis of the penetration process of drugs and cosmetic products into the skin by tape strippings in combination with spectroscopic measurements // Proc. SPIE. 2000. V. 3915. P. 194–201.
2048. *Zaslansky P., Currey J. D., Friesem A. A., Weiner S.* Phase shifting speckle interferometry for determination of strain and Young's modulus of mineralized biological materials: a study of tooth dentin compression in water // J. Biomed. Opt. 2005. V. 10, № 2. P. 024020-1–13.
2049. *Тычинский В. П.* Когерентная фазовая микроскопия внутриклеточных процессов // УФН. 2001. Т. 171. С. 649–661.
2050. *Тычинский В. П.* Микроскопия субволновых структур // УФН. 1996. Т. 166. С. 1219–1229.
2051. *Dressler C., Perevedentseva E. V., Beuthan J., Minet O., Balano E., Grasczew G., Mueller G.* Research on human carcinoma cells in different physiological states using the laser phase microscopy // Proc. SPIE. 1999. V. 3726. P. 397–402.
2052. *Corcuff P., Bertrand C., Leveque J. L.* Morphometry of human epidermis *in vivo* by real-time confocal microscopy // Arch. Dermatol. Res. 1993. V. 285. P. 475–481.
2053. *Karпов V. B.* Study of biological samples with a laser fourier holographic microscopy // Laser Phys. 1994. V. 4. P. 618–623.
2054. *Hyde S. C. W., Barry N. P., Jones R., Dainty J. C., French P. M. W.* Sub-100 pm depth-resolution holographic imaging through scattering media in the near-infrared // Opt. Lett. 1996. V. 20. P. 2320–2322.
2055. *Dunsby C., French P.* Techniques for depth-resolved imaging through turbid media including coherence-gated imaging // J. Phys. D: Appl. Phys. 2003. V. 36, № 14. P. R207–R227.

2056. French P. Low-coherence holography // Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science / Ed. by V. V. Tuchin. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004. V. 1. P. 199–234.
2057. Tuchin V. V., Ryabukho V. V., Zimnyakov D. A. et al. Tissue structure and blood microcirculation monitoring by speckle interferometry and full-field correlometry // Proc. SPIE. 2001. V. 4251. P. 148–155.
2058. Tuchin V. V., Malinova L. I., Ryabukho V. P. et al. Optical coherence techniques for study of blood sedimentation and aggregation // Proc. SPIE. 2002. V. 4619. P. 149–156.
2059. Roper S. N., Moores M. D., Gelikonov G. V., Feldchtein F. I., Beach N. M., King M. A., Gelikonov V. M., Sergeev A. M., Reitze D. H. *In vivo* detection of experimentally induced cortical dysgenesis in the adult rat neocortex using optical coherence tomography // J. Neurosci. Meth. 1998. V. 80. P. 91–98.
2060. Drexler W., Morgner U., Kartner F. X., Pitris C., Boppart S. A., Li X. D., Ippen E. P., Fujimoto J. G. *In vivo* ultrahigh resolution optical coherence tomography // Opt. Lett. 1999. V. 24. P. 1221–1223.
2061. Wojtkowski M., Leitgeb R., Kowalczyk A., Bajraszewski T., Fercher A. F. *In vivo* human retinal imaging by Fourier domain optical coherence tomography // J. Biomed. Opt. 2002. V. 7. P. 457–463.
2062. Leitgeb R., Hitzingerberger C. K., Fercher A. F. Performance of Fourier domain vs. time domain optical coherence tomography // Opt. Express. 2003. V. 8. P. 889–894.
2063. Choma M. A., Sarunic M. V., Yang C., Izatt J. A. Sensitivity advantage of swept source and Fourier domain optical coherence tomography // Opt. Express. 2003. V. 11, № 18. P. 2183–2189.
2064. Maheshwari A., Choma M. A., Izatt J. A. Heterodyne swept-source optical coherence tomography for complete complex conjugate ambiguity removal // Proc. SPIE. 2005. V. 5690. P. 91–95.
2065. Kuranov R. V., Sapozhnikova V. V., Turchin I. V., Zagainova E. V., Gelikonov V. M., Kamensky V. A., Snopova L. B., Prodanetz N. N. Complementary use of cross-polarization and standard OCT for differential diagnosis of pathological tissues // Opt. Express. 2002. V. 10. P. 707–713.
2066. Matcher S. J., Winlove C. P., Gangnus S. V. Collagen structure of bovine intervertebral disc studied using polarization sensitive optical coherence tomography // Phys. Med. Biol. 2004. V. 49. P. 1295–1306.
2067. Ugrumova N., Attenburrow D. P., Winlove C. P., Matcher S. J. The collagen structure of equine articular cartilage, characterized using polarization-sensitive optical coherence tomography // J. Phys. D: Appl. Phys. 2005. V. 38. P. 2612–2619.
2068. Vabre L., Dubois A., Boccara A. C. Thermal-light-full-field optical coherence tomography // Opt. Lett. 2002. V. 27. P. 530–533.
2069. Dubois A., Grieve K., Moneron G., Lecaque R., Vabre L., Boccara A. C. Ultra-high resolution full-field optical coherence tomography // Appl. Opt. 2004. V. 43. P. 2874–2883.
2070. Wang H.-W., Rollins A. M., Izatt J. A. High speed, full field optical coherence tomography // Proc. SPIE. 1999. V. 3598. P. 204–212.
2071. Sergeev A. M., Gelikonov V. M., Gelikonov G. V., Feldchtein F. I., Kuranov R. V., Gladkova N. D., Shakhova N. M., Snopova L. B., Shakhov A. V., Kuznetzova I. A., Denisenko A. N., Pochinko V. V., Chumakov Yu. P., Streltsova O. S. *In vivo* endoscopic OCT imaging of precancer and cancer states of human mucosa // Opt. Express. 1997. V. 1. P. 432–440.
2072. Eigensee A., Häusler G., Herrmann J. M., Lindner M. W. A New method of short-coherence interferometry in human skin (*in vivo*) and in solid volume scatterers // Proc. SPIE. 1996. V. 2925. P. 169–178.
2073. Pitris C., Kartakoullis A., Bousi E. Optical coherence tomography theory and spectral time-frequency analysis. Chapter 14 // Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. by V. V. Tuchin. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 377–400.

2074. *Giacomelli M. G., Wax A.* Imaging contrast and resolution in multiply scattering low coherence interferometry // *IEEE J. Select. Tops. Quant. Electr.* 2012. V. 18, № 3. P. 1050–1058.
2075. *Bykov A. V., Kalkman J.* Analysis of Doppler optical coherence tomography signals in low and high scattering media. Chapter 21 // *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science. V. 2* / Ed. by V. V. Tuchin. Second edition. Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 2012. P. 923–944.
2076. *Chen Y., Huang S.-W., Zhou C., Potsaid B., Fujimoto J. G.* Improved detection sensitivity of line-scanning optical coherence microscopy // *IEEE J. Select. Tops. Quant. Electr.* 2012. V. 18, № 3. P. 1094–1099.
2077. *McLaughlin R. A., Lorensen D., Sampson D. D.* Needle probes in optical coherence tomography. Chapter 25 // *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science. V. 2* / Ed. by V. V. Tuchin. Second edition. Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 2012. P. 1065–1102.
2078. *Jung E. J., Lee J. H., Rho B. S., Kim M. J., Hwang S. H., Lee W.-J., Song J. J., Jeong M. Y., Kim C. S.* Spectrally sampled OCT imaging based on 1.7- μm continuous-wave supercontinuum source // *IEEE J. Select. Tops. Quant. Electr.* 2012. V. 18, № 3. P. 1200–1208.
2079. *Akca B. I., Nguyen V. D., Kalkman J., Ismail N., Sengo G., Sun F., Driessen A., van Leeuwen T. G., Pollnau M., Wörhoff K., de Ridder R. M.* Towards spectral-domain optical coherence tomography on a chip // *IEEE J. Select. Tops. Quant. Electr.* 2012. V. 18, № 3. P. 1223–1233.
2080. *Oldenburg A. L., Wu G., Spivak D., Tsui F., Wolberg A. S., Fischer T. H.* Imaging and elastometry of blood clots using magnetomotive optical coherence tomography and labeled platelets // *IEEE J. Select. Tops. Quant. Electr.* 2012. V. 18, № 3. P. 1100–1109.
2081. *McLaughlin R. A., Quirk B. C., Curatolo A., Kirk R. W., Scolaro L., Lorensen D., Robbins P. D., Wood B. A., Saunders C. M., Sampson D. D.* Imaging of breast cancer with optical coherence tomography needle probes: Feasibility and initial results // *IEEE J. Select. Tops. Quant. Electr.* 2012. V. 18, № 3. P. 1184–1191.
2082. *Gelikonov V., Gelikonov G., Kirillin M., Shakhova N., Sergeev A., Gladkova N., Zagaynova E.* Fiber-based OCT: from optical design to clinical applications. Chapter 16 // *Handbook of Photonics for Biomedical Science* / Ed. by V. V. Tuchin. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 423–444.
2083. *Schmoll T., Leitgeb R. A.* Next step in ocular imaging combining ultrahigh resolution and high speed OCT. Chapter 23 // *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science. V. 2* / Ed. by V. V. Tuchin. Second edition. Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 2012. P. 977–998.
2084. *Larina I. V., Dickinson M. E., Larin K. V.* Advanced optical imaging of early mammalian embryonic development. Chapter 22 // *Handbook of Photonics for Biomedical Science* / Ed. by V. V. Tuchin. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 575–590.
2085. *Jenkins M. W., Watanabe M., Rollins A. M.* Longitudinal imaging of heart development with optical coherence tomography // *IEEE J. Select. Tops. Quant. Electr.* 2012. V. 18, № 3. P. 1166–1175.
2086. *Ghosn M. G., Mashiatulla M., Morrisett J. D., Larin K. V.* Assessment of cardiovascular disease through permeability rate: quantified using optical coherence tomography. Chapter 26 // *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science. V. 2* / Ed. by V. V. Tuchin. Second edition. Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 2012. P. 1103–1124.
2087. *Manapuram R. K., Manne V. G. R., Larin K. V.* Phase-sensitive swept source optical coherence tomography for imaging and quantifying of microbubbles in clear and scattering media // *J. Appl. Phys.* 2009. V. 105. P. 102040-1–10.
2088. *An L., Jia Y., Wang R. K.* Label-free optical micro-angiography for functional imaging of microcirculations within tissue beds *in vivo*. Chapter 15 // *Handbook of Photonics for Biomedical Science* / Ed. by V. V. Tuchin. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 401–422.

-
2089. Leahy M. J., Nilsson G. E. Biophotonic functional imaging of skin microcirculation. Chapter 11 // Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. by V. V. Tuchin. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 323–342.
2090. Standish B. A., Mariampillai A., Leung M. K. K., Vitkin A. I. Optical coherence tomography. principles and applications of microvascular imaging. Chapter 22 // Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science. V. 2 / Ed. by V. V. Tuchin. Second edition. Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 2012. P. 945–974.
2091. Larin K. V., Ghosn M. G., Tuchin V. V. Noninvasive assessment of molecular permeability with OCT. Chapter 17 // Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. by V. V. Tuchin. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 445–464.
2092. Poupinet L., Jarry G. Heterodyne detection for measuring extinction coefficient in mammalian tissue // J. Optics (Paris). 1993. V. 24. P. 279–285.
2093. Jarry G., Poupinet L., Watson J., Lepine T. Extinction measurements in diffusing mammalian tissue with heterodyne detection and a Titanium: Sapphire laser // Appl. Opt. 1995. V. 34. P. 2045–2050.
2094. Inaba H. Photonic sensing technology is opening new frontiers in biophotonics // Opt. Rev. 1997. V. 4. P. 1–10.
2095. Devaraj B., Usa M., Chan K. P., Akatsuka T., Inaba H. Recent advances in coherent detection imaging (CDI) in biomedicine. Laser tomography of human tissue *in vivo* and *in vitro* // IEEE J. Select. Tops. Quant. Electron. 1996. V. 2. P. 1008–1016.
2096. Devaraj B., Takeda M., Kobayashi M. et al. *In vivo* laser computed tomographic imaging of human fingers by coherent detection imaging method using different wavelengths in near infrared region // Appl. Phys. Lett. 1996. V. 69. P. 3671–3673.
2097. Prapavat V., Mans J., Schutz R. et al. *In vivo*-investigations on the detection of chronic polyarthritis using a CW-transillumination method in interphalangeal joints // Proc. SPIE. 1995. V. 2626. P. 360–366.
2098. Wax A., Thomas J. E. Optical heterodyne imaging and wigner phase space distributions // Opt. Lett. 1996. V. 21. P. 1427–1429.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Aged protein (AP)** 156
Alpha-hydroxy-acids (AHA) 481
Attenuated Total Reflectance Fourier Transform InfraRed spectroscopy (ATR FTIR) 259, 470
- Carcinoma *in situ* (CIS)** 557, 559
Cerebral blood volume (CBV) 355
Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 545
Choroid layer (CH) 421
Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) 427
Complementary metal-oxide-semiconductor (CMOS) 410, 633, 634, 636, 637, 669, 674, 675
Constant-fraction discriminator (CFD) 564, 565
- D-периодичность** 441
Dimethyl sulfoxide (DMSO) 465
Diolelyphosphatidylethanolamine (DOPE) 481
- Erythema index (EI)** 600
Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 352, 508
- Fiber switch (FS)** 565
Finite-difference time-domain (FDTD) 524, 525
Fluorescence-lifetime imaging microscopy (FLIM) 256
Food Drug Administration (FDA) 216, 483
- Ganglion layer (GCL)** 421, 422
Glycated hemoglobin (GHb) 384
Gradient refractive index (GRIN) 618, 634
- Hematocrit (Hct)** 128, 131, 132, 278, 279, 348–354, 390, 435, 507–522
- Inner boundary layer (ILM)** 421, 422
In-phase/quadrature (IQ) 568–573, 581
- Kalium dihydrophosphate (KDP)** 68
Kerr-lens mode-locked (KLM) 668
- Lamina**
– *fusca* 136
– *propria* (LP) 488, 489
Laser speckle contrast analysis (LASCA) 406–410, 636, 640, 641
- Mean blood glucose (MBG)** 384
Multichannel
– analyzer (MCA) 563, 564
– optoelectronic near-infrared system for time-resolved image reconstruction (MONSTIR) 565
– plate-photomultiplier tube (MCP-PMT) 565, 566
Muscularis mucosae (MM) 488
- Numerical aperture (NA)** 182, 183, 196, 198, 200, 230, 234, 250–252, 336, 388, 399, 414–416, 604, 634, 675
- Optical density (OD)** 551, 552
- PЗ-приближение** 297
Picoseconds time analyzer (PTA) 565
Picotiming discriminator (PTD) 565
Polarization image (PI) 595
Porphyromonas gingivalis 240
Propionibacterium acnes 240
- Q-полосы** 552
- Rapid scanning optical delay line (RSODL)** 674
Relative contrast (RC) 498, 499
Retinal nerve fiber layer (RNFL) 603
Retinal pigment epithelium (RPE) 421
- Second harmonic convertor (SHC)** 176
***Staphylococcus toxin* (ST)** 624
Superluminescence diode (SLD) 420

- Surface-enhanced Raman scattering (SERS) 260, 261
- Time-resolved optical absorption and scattering tomography (TOAST) 566
- Time-to-amplitude converter (TAC) 566
- Transepidermal water lost (TEWL) 464
- Variable optical attenuator (VOA) 565
- White-light image (WLI) 596
- z -Поляризационный конфокальный микроскоп 610
- δ -Приближение Эддингтона 281, 329, 346
- А**бляция 485, 486, 543
- Абсолютная
- вязкость 403
 - концентрация компонентов крови 552
- Адвентициальный (ая)
- слой 43, 94
 - оболочка 277, 364
- Аденоматозные полипы 558
- Адиабатический пьезооптический коэффициент 210
- Автокорреляционная функция (АФ) 412, 618, 619, 627, 628, 678
- первого порядка 403
 - флуктуаций интенсивности 397, 413, 618, 619, 627, 648, 651
- Автофлуоресценция (АФ) 240, 243, 245–247, 255, 257, 427, 497, 538, 539, 618
- Агрегация 507, 508, 512–516, 526, 528, 546, 663
- Акантоцит 516
- Активная спектроскопия КР (АСКР) 427
- Активность головного мозга 92, 271, 551
- Акустическая волна 169–172, 181, 207–210, 230, 231, 269
- со свипируемой частотой 210–212
- Акустический импеданс 183, 231
- Акустооптическая томография (АОТ) 207, 210, 211, 233
- Акустооптические взаимодействия 207–211
- Альbedo 48, 51, 56, 57, 81–83, 89, 106, 335
- однократного рассеяния 48, 106
- Альбумин 379, 433, 518, 523, 526, 533
- Алгоритм обратной проекции 178, 684
- Альфа-гидроксикислоты 481
- Аминолевулиновая кислота (АЛК) 484, 486
- Амплитуда акустической волны 176, 185, 210, 219, 223, 224, 228
- Амфифильные препараты 482
- Анализ контраста лазерных спеклов (LASCA) 406–410, 636, 640, 641
- Антенные свойства 682
- Аорта 276, 309, 346, 362, 490
- Апоптоз 194, 200, 243
- Аппарат Гольджи 48, 361
- Артериальная стенка 642
- Артериолы 185, 503, 504, 506, 546, 638
- Артерия 219, 248, 507, 520, 630, 632, 638, 639, 642, 671, 672, 678
- Ассиметричное логарифмическое распределение 44, 126, 127, 129, 132
- Астроциты 280, 282, 319, 320
- Атеросклеротическая бляшка 177, 215, 243, 418, 554, 690
- Б**азально-клеточная карцинома 243, 304, 305
- Балансный детектор 423, 424, 668, 685
- Баллистический (когерентный) компонент потока фотонов 63, 64, 66, 108, 118, 182, 210, 213, 233, 248, 249, 342, 413, 417, 443, 444, 449, 513, 545, 561, 608, 690
- Банановая форма путей миграции фотонов 551, 552
- Барорефлекторный эффект 642
- Барьерная функция кожи 464, 472, 482, 483, 485
- Безызлучательная релаксация 170, 173, 190, 239, 250
- Белое вещество (БВ) мозга 118, 187, 280–282, 285, 287, 320, 345, 346, 355, 362
- Белки 44, 94, 126, 135, 137, 140, 141, 153, 156, 159, 161, 164, 202, 240–242, 259, 345, 360, 378, 379, 384, 386, 425, 426, 428, 456, 457, 460, 465, 483, 484, 499, 509, 518, 519, 523, 524, 526, 537, 541, 543, 620, 651
- агрегированные 140, 159, 164, 618, 619
 - возрастные 156
 - коагулированные 434, 542, 543
 - связанные с водой 94, 140, 470
 - флуоресцирующие 241, 242
- Белые клетки крови 194, 247
- Бета-каротин 553
- Билирубин 45, 553
- БИК-спектроскопия с временным разрешением 584, 585
- Бимодальная система рассеивателей 150, 403, 622
- Биотепловое уравнение 214

- Биоткань,
 — гидратированная 371, 372
 — двулучепреломляющая 93–96, 119, 141, 154, 167, 168, 432, 489, 492–494, 523, 595, 603, 605–607, 609, 672
 — желудка 307, 339, 369, 429, 432, 487–489, 503, 546, 679, 690
 — жировая 45, 68, 276, 287, 290, 291, 311, 347, 358, 363, 377, 378, 474
 — злокачественная 42, 222, 228, 243, 244, 258, 347, 358, 362, 386, 387, 429, 479, 549, 595, 596, 602, 612–616, 681, 688
 — кишечника 43, 323, 369, 557, 558, 679
 — коагулированная 134, 177, 222, 296, 345, 377, 542, 543
 — мозга 92, 118, 187, 214, 244, 245, 280, 286, 319, 344, 345, 355, 358, 362, 428, 541, 549, 555, 566, 574, 580, 584, 585, 590, 641
 — мышечная 41, 43, 44, 94, 151, 197, 214, 216, 224, 225, 293, 296, 307, 311, 312, 337, 340, 341, 364, 369, 377, 378, 427, 430, 435, 462, 488, 489, 500, 502, 528, 590, 630
 — обезвоженная 134, 161, 162, 441
 — сжатая 207, 321, 345, 429, 430, 432, 434, 441, 450, 453, 456, 457, 462, 465, 493, 498, 536, 537, 542, 545, 560, 561, 584, 611
 — соединительная 43, 94, 385, 431, 430, 435, 498
 — фиброзная 43, 47, 94, 126, 135, 138, 177, 226, 289, 290, 309, 358, 361, 363, 385, 429, 430, 435, 440–464, 487, 607, 654
 — эпителиальная 42, 121, 127, 240, 241, 253, 254, 361, 429, 430, 544, 555, 557, 603, 616
 Биовибрации 641, 643, 645
 Ближний порядок 130, 139, 140–142, 150
 Броуновское движение 403, 413, 627, 630
 Брыжейка 203–207, 360, 369, 370, 503, 623–626, 641, 671
 Бутандиол 432, 467, 468
 Быстрое преобразование Фурье (БПФ) 164, 581, 635
- Векторное уравнение переноса излучения** 105–108
 Вена 137, 185, 186, 219, 220, 299, 308, 363, 406, 490, 491, 588, 595, 638, 639, 671, 672
- Венула 185, 503–506, 546
 Верографин 430–433, 454, 470–472
 Веснушки 595, 596
 Визуализация 65–68, 72–77, 86, 92, 174, 179–181, 427, 428, 563
 — методом
 — — конфокальной микроскопии 242–249, 391, 414–425, 494, 495, 546, 657–678
 — — пространственной модуляции 84, 88, 585–590
 — микроциркуляции крови 632, 633, 637
 — нелинейно-оптическая 248–256, 391, 428, 499
 — ОА/ФА 217–236
 — ОКТ, 424, 476–479, 516
 — ОТ/ФТ, 199–203
 — ОТР/ФТР, 189–198
 — поляризационная 119–121, 490, 591–602
 — потока крови 503, 626–641
 — потока клеток в сосудах 205, 206, 505, 507
 — с когерентным детектированием (ВКД) 682–684
 — спекл- 617, 636, 638, 506
 — спектральная 594, 601, 602
 — с разрешением во времени 65, 66, 75, 563–583
 — тепловая 213–215
 — фазового контраста 194
 — флуоресцентная 240–245, 497
 Виртуальное окно прозрачности (ВОП) 472
 Внеклеточная жидкость 360
 Внутриклеточная инъекция 472, 473, 494,
 — глицерина 472, 473, 494,
 — глюкозы 472, 473, 494,
 Вода 44–47, 92, 128, 135, 140, 141, 153, 154, 159, 161, 176, 18392, 197, 211, 233, 258, 259, 267, 270, 272, 298, 345, 347, 360, 373, 378–382, 385, 428, 434, 437, 440–442, 449, 470, 481, 518
 — десорбция 487
 — оптическое поглощение 44, 45, 153, 161, 267, 434, 443, 485, 502
 — — спектры 47, 154, 159, 259, 267, 470, 487, 500, 536, 552
 — поток 437, 440, 450, 451, 453, 464, 468, 469
 — содержание в биотканях и крови 92, 135, 140, 434, 464, 481, 487, 509, 552
 — транспорт 429, 440, 450–453, 468, 472, 481–483, 522, 536, 537, 544, 545, 655
 Волоконная ОКТ сверхвысокого разрешения 666–668

- Волоконно-оптический
— зонд квазиупругого рассеяния света (КРС) 618
— ПЗС-спектрометр 328, 527, 340
— рефрактометр (ВОР) 363
— сканирующий катетер 678
Вращательная диффузия 240, 615
Временная
— автокорреляционная функция поля (интенсивности) 627
— теория переноса излучения (ТПИ) 63–66
Временное
— диффузионное уравнение 64–65
— разрешение (ВР) 428, 527, 549, 560–566, 625, 626
Временные флуктуации интенсивности 393, 411
Время тепловой релаксации 173, 186, 197
Высокомолекулярный декстран 512, 513
- Гамма-распределение по радиусам** 44, 126
Гауссов
— коэффициент корреляции 400
— профиль линии 158, 381
— пучок 58, 60, 397, 410, 618, 686
Гауссова
— корреляционная функция 395, 404
— случайная величина 412
— статистика 394–396, 401–404, 643, 645
— сфокусированный пучок 404, 645
Гауссово распределение по размерам 44, 126, 556
Гематокрит 128, 131, 132, 278, 279, 348–354, 390, 435, 507–522
Гематопорфирин 240, 321
Гемоглобин 46, 62, 131, 149, 181, 184, 195, 206, 240, 255, 282, 286, 347, 375, 379, 380, 384, 459, 520, 538, 599, 632
— гликированный 382–384, 527, 609
— концентрация 45, 219, 245, 279, 517–521, 558, 571, 566, 568
— оксигенация 32, 45, 72, 149, 184, 194, 220, 271, 345, 355, 433, 435, 506, 538, 558, 568, 576
— оптическое поглощение 47, 149, 184, 255, 271, 353, 374, 379, 508, 520, 600–603,
— полный 92, 384, 474, 552, 554, 555, 579, 632
Гемодинамика 234, 533, 617
Гемолиз 149, 187, 348, 503, 510, 517, 520, 522
Генерация второй гармоники (ГВГ) 252–256, 425–429, 500, 501, 534, 543, 546, 608
- Генетический обратный алгоритм (ГОА) 322
Гетеродинирование 566
Гиалиновый хрящ 678
Гиалуроновая кислота 481
Гигантское комбинационное рассеяние (ГКР) 260
Гидратация 126, 137, 138, 140, 155, 258, 259, 327, 347, 360, 371, 429, 441, 442, 451–453, 456, 464, 465, 470, 480, 482, 493, 494, 500, 524
— физиологическая 441
Гидродинамический радиус 403
Гидроксиапатит 94, 346, 347
Гидроксиэтилцеллюлоза 470
Гидроцефалия 580
Гипак 430, 432, 535
Гиперосмотические агенты 430, 431, 434, 451, 453, 457, 458, 464, 465, 489, 494, 498, 501, 507, 522, 545, 546, 654
Гиперполяризуемость молекулярная 426
Гипер-рэлеевское рассеяние (ГРР) 256
Глаз 41, 124, 128, 135–174, 226, 235, 333, 335, 370, 402, 405, 421, 452, 455, 458, 459, 460, 472, 617, 661, 622, 658,
— глазное дно 167, 226, 421, 422, 461, 688
— роговица 41, 44, 93, 94, 97, 126, 128, 131, 136, 154, 155, 167, 430, 462, 534, 605, 659
— сетчатка 43, 95, 273, 418
— склера 44, 94, 126, 138, 140, 161, 162, 385, 430–451, 455, 458, 460, 491, 492, 535, 654
— стекловидное тело 128, 157
— хрусталик 93, 128, 140, 141, 151, 157–159, 164, 167, 360, 468, 555, 618, 619, 621
Глаукома 620
Глобулин 523, 532
Голографический микроскоп 656
Гониометрический метод 346, 348
Гониофотометрические измерения (ГФИ) 276, 278, 291, 292, 307
Групповой показатель преломления 387, 507
- Давление,**
— внутриглазное 135
— гидростатическое 440, 453
— манжеты 631
— осмотическое 440, 451–453, 459, 523
— пиковое ультразвуковое 211, 215, 216
Дальняя зона поля 102, 111, 116, 151, 196, 219, 391, 404, 408, 411, 450, 492, 647, 649, 650, 653

- Двойной балансный смеситель (ДБС) 568, 569
 Двойная ИС (ДИС) 277, 278, 281, 282, 298, 312, 327, 336, 351, 353
 Двулучепреломление 93–96, 119, 141, 154, 168, 432, 489, 492–494, 523, 595, 603, 605, 607, 609, 672
 Двухлучевая интерферометрия 398, 418, 420, 661
 Двухфотонная
 — сканирующая микроскопия 497, 498
 — флуоресценция (ДФФ) 248–256, 425–427, 498, 499
 Деградация волнового фронта 682
 Дезагрегация 156, 403
 Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) 46, 47, 259, 485
 Декорреляция спеклов 409, 645
 Деполяризация 93, 114, 116, 117, 118, 121, 154, 168, 271, 491, 492, 520, 597, 599, 600, 611, 612, 615, 647, 672
 Диабет 205, 219, 374, 382, 504, 516, 526, 527, 528, 531, 609, 618, 620, 662
 Диабетическая ретинопатия 620
 Диагностическое окно 47, 55
 Диаграмма Яблонского 239, 250
 Дигидроксифенилаланин (ДОФА, ДОРА) 481
 Диметилсульфоксид (ДМСО) 465
 Диолеилфосфатидилэтаноламин (ДОФЭ) 481
 Дипропиленгликоль 470
 Дисперсия 644, 652
 — материальная 760
 — флуктуаций интенсивности 394, 408
 Дисплазия 42, 121, 215, 312, 322, 358, 357, 559
 Дифракционное приближение Фраунгофера 104, 396, 397
 Дифракция
 — диффузных волн фотонной плотности 581
 — сфокусированных лазерных пучков 404, 622, 624, 642, 643, 647
 Дифференциальная фазочувствительная ОКТ (ДФЧ ОКТ) 673, 674
 Диффузионная
 — теория (ДТ) 51, 89, 276, 475
 — ячейка Франца 467, 468
 Диффузионно-волновая спектроскопия (ДВС) 410–415, 626–633
 Диффузионно-корреляционная спектроскопия (ДКС) 410
 Диффузия
 — воды 464, 468
 — глюкозы 456
 — затрудненная (заторможенная) 438, 451, 460, 464, 480, 482
 — ОПА, 454, 655
 — свободная 435, 436, 438, 464
 Диффузионные волны фотонной плотности 69–84, 457, 685
 Диффузное отражение 44, 54, 56, 77, 81–86, 88–91, 175, 176, 244, 268, 275, 327, 329, 330, 332, 333, 335, 337, 340, 356, 434, 439, 445, 447, 449, 453, 461, 487, 527, 556, 558, 588
 Дихроизм 154, 168
 — круговой 97
 — линейный 96, 102
 Длина
 — деполяризации 116–118, 597, 599, 612
 — когерентности 393, 412, 421, 667, 680, 681
 — рассеяния 116
 — температуропроводности (тепловая, диффузии тепла) 173, 174, 191
 Доброкачественная мастопатия 549
 Доплеровский
 — анемометр 399
 — микроскоп 617, 656
 Доплеровская
 — ОКТ, 669–671
 — спектроскопия 404, 408
 — флоуметрия 618, 632

Желудок 307, 369, 488, 503, 546, 690
Жидкостный фантом 263

Закон
 — Бугера–Ламберта–Бера (Ламберта–Бера) 47, 148, 149, 170, 186, 278, 342, 435
 — Глэдстоуна и Дейла 125, 386
 — Фика 437
Золотые углеродные нанотрубки (ЗНТ) 226, 228, 229
Зрительный нерв 319, 320
Зубы 187–193, 240, 241, 256, 258, 307, 360, 372, 386, 397, 398, 424, 426, 546, 610, 611, 657, 659, 683
 — дентин 94, 189, 190, 307, 308, 372, 386, 659
 — эмаль 94, 190, 307, 308, 372

Изобестическая точка 185

Иммерсионный агент 466, 467, 492, 497, 520

- Индекс эритемы 600
Индоцианиновый зеленый 186, 244, 263
Интегрирующая сфера (ИС) 336, 337,
345–347, 351–353, 380, 385, 443–446,
449, 488, 513, 537, 603, 604
Интерференция 67–69, 77, 129, 131, 142,
153, 391, 395, 399, 400, 403, 420, 421,
422, 424, 477, 536, 556, 665, 690
— спекл-полей 394, 397, 642
Интерферометр
— Линника–Толанского 656
— Майкельсона 420, 476, 628, 642, 665, 667,
669, 675
— Маха–Цендера 679
— Фабри–Перо 210, 217, 235
Интралипид 179, 181, 216, 218, 263,
266–269, 628, 686, 687
Интраэпителиальная цервикальная неопла-
зия (ИЦН) 376
Инфаркт миокарда 516, 662
Инфракрасная (ИК) спектроскопия нару-
шенного полного внутреннего отражения
с фурье-преобразованием (ИКС НПВО
ФП) 259, 470
Инфранин 563
Ионофорез 484, 486
- Каротиноиды** 246, 538, 554
Карцинома 243, 289–291, 304, 305, 358, 550,
563, 564, 580, 596
— *in situ* (CIS) 289, 322
Катаракта 124, 140, 141, 150, 156, 158,
164–166, 258, 402, 422, 544, 555,
617–622, 662
Квазикристаллическое приближение 130
Квазиупругое рассеяние света (КРС) 391,
402, 404, 410, 412, 481, 620
Кератиноциты 433, 465, 657, 658
Кинуренин 156, 157
Кишечник 369, 378, 556–558, 626
Клапан
— лимфатического сосуда 204, 623
— сердца 607, 642
Клеевые отрывы кожи 329, 661
Клетки
— деформируемость 131, 235
— жировые 41, 224, 312, 347, 464
— карциномы 657
Коагуляция 59, 221, 222, 226, 276, 281–285,
345, 352, 430, 433, 434, 461, 504, 536,
541–544, 641
Когерентное антистоксово комбинационное
рассеяние (КАСКР) 427
- Кожа,
— автофлуоресценция 246, 247, 497, 538,
539
— барьерная функция 464, 472, 482–485
— гидратация 258, 464, 481, 482
— реплика 650
— псориазная 329, 398, 479, 650–652,
666
Колебательное состояние молекулы 238,
239, 256–261, 502
Коллаген 500, 537, 540–543, 605–608, 655,
672
Коллоидная изоэлектрическая точка 441
Коллимированное пропускание 156, 157,
162, 266, 274, 275, 327–329, 333,
335, 348, 351, 353, 435, 439, 444–450,
454–467, 491, 492, 548, 549
Комбинационное рассеяние 199, 237, 356,
257, 259–261, 271, 425, 501, 618
Комплементарный металло-оксидный полу-
проводник (КМОП) 410, 633, 634, 636,
637, 669, 674, 675
Компьютерная томография (КТ) 180, 684
Контраст 186, 202, 215, 216, 393–396, 400,
407, 408, 416, 477, 479, 490, 491, 494,
496, 498, 499, 665, 673, 680, 690
— дифференциальный 186, 588
— интерференционных полос 661, 664
— оптический 80, 86, 216, 233
— полос средней интенсивности 400, 401
— поляризационный 597, 598, 601
— по поглощению 89, 90, 91, 205, 230
— по рассеянию 89, 91, 588
— спекл-поля 396, 397, 406–410, 636–639
— средний 299
— ультразвуковой 216
— ФА- 227, 228, 229, 234, 235
— фазовый 194–196, 199, 205, 433, 524–526,
532
Конфокальный микроскоп 415–419, 424,
425, 429, 481, 486, 494, 495, 497,
501, 545, 546, 603, 608, 610, 617, 641,
656–660, 676–678, 682, 690
Конъюнктивит 333, 454, 459–460
Копропорфирин 240
Кора головного мозга 118, 214, 555, 641
Корнеоциты 482
Коронарная артерия 96, 507, 520,
Корреляционное уравнение диффузии 413
Кости черепа 294, 295, 506, 546, 639
Коферменты 240, 254, 614
Коэффициент диффузии 627, 630
— агента 436, 437, 457

- Коэффициент диффузии воды 457, 464, 468
 — глюкозы 474
 — тепла 197
 — фотонов 52, 53, 411, 413
 Коэффициент ослабления (затухания) 342, 435
 — полный 48, 348, 353,
 — эффективный 50, 356
 Коэффициент
 — отражения 80, 440, 473, 474, 507
 — поглощения 48, 72, 87, 131, 175, 184, 185, 192, 263–265, 269, 327, 333, 340, 351–353, 434, 435, 439, 457, 537, 542, 551, 585, 599
 — проницаемости 437
 — рассеяния 48, 131, 133, 134, 263, 265, 272, 327, 341, 345, 346, 351, 352, 353, 359, 379, 385, 430, 431, 432, 434, 466, 476, 479, 509, 516, 520, 532, 540
 — — транспортный 51, 265, 431, 541, 543, 558, 559, 612, 615
 — экстинкции 48, 49, 106, 130, 170, 237, 579
 Коэффициенты
 — Коши 377, 378
 — Ми 130, 152
 Кристаллины 140, 141, 159, 160, 161, 164, 166, 433, 619, 620
 Кровь 41, 45, 47, 118, 128, 131, 172, 187, 215, 269, 271, 273, 278, 298, 328, 348, 352, 354, 357, 373, 377, 378, 388, 429, 431, 432, 459, 464, 484, 506–515, 518, 519, 528, 537, 538, 549, 588, 664,
 — гемолиз 149, 187, 348, 503, 510, 517, 520, 522
 — оптическое просветление 506, 546
 — перфузия биоткани 213, 214, 355, 414, 459, 460, 549, 560, 635–637, 641
 — плазма 187, 241, 348, 349, 353, 374, 328, 378, 384, 389, 431, 506, 519, 520, 522, 528
 — — осмолярность 507, 519
 — седиментация 514, 662
 Кросс-поляризационное изображение 594, 673
 Кросс-поляризационная ОКТ, 672, 673
 Кубелки–Мунка
 — модель (КММ) 55, 274, 275, 328
 — теория 333
 Лавинный фотодиод (ЛФД) 413, 579, 580–581, 618
 Лазерная
 — абляция 485, 486, 543
 — доплеровская
 — — визуализация (ЛДВ) 633, 634, 636
 — — микроскопия (ЛДМ) 656
 — индуцированная интерстициальная термическая терапия (ЛИТТ), 355
 — циклофотокоагуляция 226
 Лазерно-индуцированные волны напряженности 484, 485
 Лазерный интерференционный ретинометр 402, 661–663
 Лейкоциты 41, 128, 194, 200–202, 205, 206, 347, 353
 Лизосомы 41, 48, 124, 361, 430, 556
 Лимфа 194, 201, 229, 622, 623
 — микрососуды 200–206, 227–229, 235, 545, 623–625, 641
 — потоки 201, 203, 206, 207, 617, 622–624, 626, 633, 670, 690
 Лимфатическая система 226, 228, 234, 506
 Лимфоузлы 226–228, 235
 — сторожевые 226, 228, 229, 236
 Лимфоциты 201–207, 626
 Линии натяжения кожи Лангера 540
 Липосомы 470, 481
 Магнитно-резонансная томография (МРТ) 554, 563, 564, 684, 685
 Магнитные наночастицы (МНЧ) 227, 228
 Маммограмма 182, 582, 584
 Маннитол 432, 462, 464, 482
 Матрица
 — Джонса 99, 672
 — Мюллера 96, 100–102, 104–106, 109, 110, 116, 119–122, 124, 163, 167, 168, 603, 604, 672
 — рассеяния света (МРС) 102, 103, 105, 111–117, 150, 151, 163–167
 Межклеточная жидкость 124
 Межмолекулярное расстояние (ММР) 136, 441
 Межфибрилярное
 — вещество 435, 438, 444
 — расстояние (МФР) 441, 453
 Межчастичные корреляционные эффекты 518
 Меланин 137, 189, 195, 226, 228, 230, 246, 247, 328, 361, 386, 538, 539, 596, 599
 — пигментация 538, 595
 — спектры поглощения 46
 Меланома 195, 200, 227–229, 236, 252, 280, 479, 616, 681
 Менингиома 283, 345

- Метиленовый синий 226, 235, 244, 263, 486
- Метод
- двойной интегрирующей сферы (ДИС) 275, 327, 328, 336, 351, 353
 - дискретных ординат 55
 - добавления-удвоения 108, 274, 275, 276, 331, 333, 352, 385, 445, 537
 - интегрирующей сферы (ИС) 271, 274, 275, 276, 312, 327, 328, 346, 385, 513, 537
 - наименьших квадратов 89, 356, 477, 588
 - счета фотонов 65, 682
 - Т-матриц 105
- Механическое напряжение 175, 176, 269, 402, 453, 484, 485, 540, 610
- Ми
- рассеяние 50, 116, 117, 345,
 - теория 41, 104, 106, 133, 134, 151, 152, 167, 264–268, 270, 271, 278, 343, 348, 382, 385, 431, 439, 492, 518, 556–558, 602
 - фазовая функция 324, 334, 335, 344, 349, 350
- Микродермабразия 486
- Микроскоп Линника 675
- Микроскопия
- голографическая 656
 - двухфотонная сканирующая 497
 - конфокальная 233, 255, 364, 391, 414, 416, 419, 425, 429, 494, 497, 545, 546, 603, 617, 656, 657, 660, 676
 - лазерная сканирующая 242, 414, 486, 657
 - мультиспектральная поляризационная 603
 - оптическая когерентная 312, 676
 - — поляризационная 603
 - отражательная конфокальная 414, 494, 545,
 - поляризационная 603, 606, 609,
 - поляризационно-интерференционная 609
 - флуоресцентная сканирующая 248
 - фотоакустическая (ФАМ) 182, 234
 - фототермическая 205
- Микрополяриметр мультиспектральных изображений 603
- Микроспектрофлуориметрия 242
- Микрофибриллы 43, 138
- Микроциркуляция 405, 504, 546, 626, 627, 630, 632, 633, 636, 641
- Минимальная эритемная доза (МЭД) 247
- Минимизация Ливенберга–Маркардта 558
- Миоглобин 240
- Миокард 43, 44, 68, 94, 96, 121, 221–223, 244, 295, 363, 516, 662
- Многопотоковые модели 275, 328
- Многофотонная флуоресценция 237, 248, 250, 427, 497
- Модуль упругости 642
- Мозжечок 282, 283, 345
- Молочная железа 40, 46, 47, 68, 73, 75, 180–182, 214, 227, 229, 230, 232, 235, 243, 289, 321, 344–347, 358, 362, 363, 386, 387, 427, 430, 548–550, 554, 560–563, 565, 577, 578, 580, 582, 584, 614, 615, 657
- Молярный коэффициент экстинкции 237
- Монте-Карло (МК)
- метод 55, 56, 77, 83, 108, 122, 143, 220, 241, 328, 333, 338, 418, 443, 444–447, 461, 494, 495, 541, 590
 - — обратный 274, 276, 333, 385, 445
 - Моделирование 40, 56, 59, 75, 78, 81–83, 108, 113, 115, 117, 443, 456, 460, 539, 540, 597, 598
- Мочевина 465, 470, 483, 533
- Мукополисахариды 137, 481, 537
- Мультиплексирование с разделением по длинам волн 567
- Мультиплексное когерентное антистоксово комбинационное рассеяние (М-КАСКР), 427, 428
- Мышцы 43, 44, 75, 92, 94, 96, 128, 140, 187, 358, 363, 533, 551, 630, 632
- бедренного бицепса 187, 583
 - скелетные 121, 533, 551
 - цилиарные 460, 461
- Набухание биоткани** 438, 441, 450, 452, 456, 457, 462, 545
- Наночастицы 202–205, 223, 226–228, 233, 235, 236, 242, 245, 255, 256, 273, 403, 427, 481, 485
- Наносферы 236, 481
- Нарушенное полное внутреннее отражение 259, 470, 501, 502
- Негауссова статистика 397, 401, 404, 408
- Неидентичные (некоррелированные) спекл-поля 400
- Нейрофибромы 595
- Нейрофиламенты 44
- Нелинейная восприимчивость 256, 425, 426, 500, 608
- Нелинейный метод регрессии 585, 607
- Неньютонский поток 408

- Непигментированный внутрикожный невус 595
- Никотинамидадениндинуклеотид (НАД) 240, 242–244, 253, 254, 614
- Обратимая потеря мутности** 493
- Обратное рассеяние 80, 84, 113, 117, 175, 252, 273, 322, 341, 342, 460, 472, 507, 513, 545, 549, 552, 557, 592, 671, 679
- геометрия 120
 - поляризационное изображение 120, 122
 - свойства 672
- Объективные спеклы 391
- Объемная доля 95, 111, 112, 125–129, 132, 133, 137, 143, 145–147, 150, 151, 157, 264, 271, 272, 383–385, 387, 389, 390, 438, 492, 507, 509, 510, 517–519,
- Однократное рассеяние 48, 51, 63, 93, 101, 105, 106, 108–117, 123, 124, 135, 141, 143–145, 150, 156–158, 161, 274, 331, 332, 334, 341, 342, 348, 349, 389, 394, 402, 412, 414, 435, 443, 444, 452, 477, 513, 556, 557, 602, 633, 650
- Однофотонная флуоресценция (ОФФ) 252–255, 497, 499
- Ожоги 215, 217, 313, 314, 317, 595, 601, 602, 632, 675
- Окисленный цитохром 194, 433
- Окклюзионная спектроскопия 528
- Олеиновая кислота 465, 468, 469, 483, 484
- Оптико-акустическая (ОА)
- визуализация 180, 181, 182, 217, 219, 222, 230, 232
 - томография (ОАТ) 169, 177, 180, 181, 185, 223, 230
- Оптико-акустический
- метод 169, 170–173, 175, 177, 217–220, 222, 226
 - преобразователь 232
 - — конфокальный 232
 - спектрометр 176
- Оптическая
- активность 41, 96, 97, 119, 141, 163
 - биопсия 237, 554, 583
 - длина 119, 209, 273, 387, 657, 677
 - иммерсия 372, 386, 429, 435, 439, 459, 480, 487, 491, 496, 500, 522, 545, 609
 - калориметрия 170, 172,
 - когерентная
 - — микроскопия (ОКМ) 312, 676
 - — — полного поля 676
 - — рефлектометрия 418
 - — — томография (ОКТ) 99, 236, 272, 274, 309, 322, 325, 341, 363, 367, 382, 387, 418, 424, 429, 507, 513, 528, 531, 546, 665
 - — — волоконно-оптическая 422, 423
 - — — волоконно-оптическая доплеровская 671
 - — — двухволновая волоконная 666
 - — — дифференциальная 673
 - — — кросс-поляризационная 672
 - — — полного поля 673
 - — — спекл- 679, 682
 - — — спектральная 668
 - — — фазочувствительная 673
 - — — эндоскопическая 678
 - плотность (ОП) 104, 131, 158, 537, 543, 551
 - толщина 113, 344, 387
 - томография поглощения и рассеяния с временным разрешением (TOAST) 566
- Оптическое
- мультиплексирование 568
 - поглощение 76, 178, 204, 230, 234, 563
 - просветление 402, 428, 434, 442, 462, 489, 499, 504, 507
 - секционирование 251, 255, 414–416
 - стробирование 608, 609
 - — временное 242, 243, 419
 - — пространственное 412
- Оптические
- параметры 59, 65, 77, 90, 91, 176, 177, 263, 264, 266, 267, 269, 274, 275, 333, 344, 349, 351, 353, 359, 517, 537, 589, 615, 630
 - томографы 567, 665, 666
- Оптическая когерентная
- микроскопия полного поля 676
 - томография полного поля 673
- Оптогеометрический метод 170, 172
- Оптотермическая радиометрия (ОТР) 170, 186
- Оптотермический (ОТ) метод 169, 171, 195, 217
- Оральный тест на толерантность к глюкозе (ОТТГ) 530, 532
- Ориентация коллагеновых волокон 96, 425, 500, 540, 605
- Осмотический стресс 546
- Острота зрения 402, 617, 661, 662
- Отбеливание биоткани 429, 544, 545
- Отек 434, 435, 442, 472, 473
- Относительный контраст 400, 401, 498

- Отражательная
— спектроскопия 245, 599
— конфокальная микроскопия (ОКМ) 494, 545
Отрицательный одноосный кристалл 95
- Папиллярная дерма** 246, 273, 322, 592, 594, 595, 598
- Паракератозный очаг 329
Параксиальная теория 251, 416
Параметр
— Грюнайзена 175, 176, 220
— релаксации 403
Параметрический генератор света (ПГС) 199, 204, 205, 226
Парная функция распределения 142
ПЗС-камера 89, 120, 121, 170, 198–201, 205, 211, 212, 227, 242, 252, 406, 407, 410, 563, 586, 589, 593, 597, 601, 602, 604, 607, 610, 632, 633, 636, 638, 653, 668, 669, 675, 679, 680,
— объединенная с волокном 328, 337, 340, 554, 563
— охлаждаемая 252, 549, 554, 593, 604
— цветная 227, 597
Пейсмейкер 623
Перегретая вода 192
Передняя камера глаза человека 135–137, 157, 158, 165, 402, 422, 461, 536, 661
Пигментация 229, 245, 449, 538, 539, 561, 595,
— индекс 245, 600
Пигментная глаукома 620
Пигментированный невус 245, 595, 596
Пищевод Баррета 559
Плоскоклеточный рак 312
Плотность
— упаковки 40, 75, 96, 106, 114, 128–130, 137, 139, 142–144, 148, 149, 151, 154, 167, 182, 207, 244, 245, 264, 359, 385, 426, 431, 442, 483, 504, 546, 559, 602
— потока излучения 49, 54, 55, 58, 59, 160, 161, 175, 176, 229, 244, 356, 460, 469, 485, 486, 541, 543, 593, 618, 635
Плотно упакованная дисперсная система 43, 94, 97, 124, 128, 129, 131, 132, 138, 142, 149, 150, 431, 439, 518, 556
Поглощение
— абсолютное 44, 566, 568, 578, 585
— динамическое 413,
— коэффициент 44, 48, 61, 63, 68, 72, 73, 75, 76, 86, 87, 89, 90, 91, 131, 172, 175, 177, 178, 181, 184, 185, 186, 192, 208, 221, 222, 237, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 272, 327, 328, 329, 330, 332, 333, 336, 337, 339, 340, 342, 345, 346, 351, 352, 353, 356, 422, 431, 434, 439, 445, 457, 476, 477, 507, 517, 518, 520, 537, 541–544, 551, 558, 563, 566, 568, 578, 585, 587, 588, 599, 612, 627, 665, 686, 689
— полоса 46, 47, 129, 148, 149, 153, 154, 159, 161, 170, 185, 186, 194, 202, 218, 223, 228, 238, 240, 241, 256, 381, 382, 426, 434, 442, 454, 459, 465, 470, 473, 474, 485, 487, 500, 519, 520, 533, 535, 537, 552, 553, 599, 600, 601
— сечение 148, 151, 249, 251, 255, 256, 264, 348, 431, 496, 518, 548, 686,
— спектр 44–47, 92, 149, 151, 154, 184, 192, 202, 216, 238, 256, 329, 330, 345, 379, 380, 381, 463, 487, 526, 552
Подкожная жировая клетчатка 41, 45–47, 68, 214, 224–226, 289–291, 293, 303, 311, 324, 341, 347, 363, 377, 378, 425, 464, 466, 467, 468, 474, 503, 533
Показатель преломления 40, 54, 55, 58, 80, 81, 95, 96, 98, 103, 104, 124, 129, 135, 141, 153, 163, 170, 194, 195, 270, 271, 331, 332, 335, 336, 339, 388, 421, 430, 431, 438, 439, 467, 468, 469, 475–477, 479, 480, 496, 499, 502, 510, 514, 516, 525, 527, 530, 534, 544, 546, 556, 581, 609, 618, 634, 654, 678
— биоткани 41, 48, 93, 94, 124–126, 128, 133, 137, 138, 149, 156, 167, 205, 209, 210, 217, 218, 265, 286, 327, 340, 345, 348–350, 359–362, 376–379, 381–390, 402, 422, 428, 430–435, 438, 442–447, 451, 453, 456, 459, 465, 466, 474, 480, 489, 492, 493, 502, 506–509, 513, 516–520, 522–524, 526, 528, 530, 532, 533, 537, 544, 545, 557, 561, 564, 588, 603, 610, 655, 660, 669,
— воды 268, 270, 360, 378, 379, 380, 382, 509, 510
— измерение 125, 137, 138, 183, 192, 196, 198, 199, 208, 209, 271, 274, 350, 359, 360, 361, 362, 366, 368, 369, 376, 377, 378, 382, 386, 387, 449, 451, 492, 523, 524, 609, 673
— комплексный 148, 152, 156, 264, 379, 380, 431, 502, 507, 517
— относительный 103, 111, 112, 135, 145–147, 149, 151, 264, 265, 270, 339, 340, 347, 390, 431, 432, 434, 438

- Показатель флуктуации 127, 140, 361, 376, 389, 390, 647, 649
 — эффективный 94, 96, 130, 131
 Поливинилиденфторид (ПВДФ) 224, 231, 232
 Полидисперсность 44, 126, 141, 143, 161, 442, 507, 517, 519, 520, 689
 Полимеры
 — на основе глицерина 263, 432
 — полиэтилена на гликолевой основе (ППЭГ) 432, 433
 — полипропилена на гликолевой основе (ППГО) 432, 433
 Полиорганосилоксан (ПОС) 270, 271
 Полипропиленгликоль (ППГ) 480
 Полиэтиленгликоль (ПЭГ) 227, 430, 432, 433, 449–451, 453, 462, 468, 480
 Полная концентрация гемоглобина (ПКГ) 45, 219, 245, 279, 379, 383, 384, 507, 509, 517–522, 549, 558, 566, 568, 576, 585
 Поляризационная спектроскопия отражения (ПСО) 599, 600, 602, 603
 Поляризационно-чувствительная ОКТ (ПЧ ОКТ) 96, 119, 506, 672
 Положительная одноосная двулучепреломляющая среда 94, 95
 Полоса Соре 194, 255, 459, 519, 520, 552
 Полупроницаемая мембрана 44, 104, 141, 149, 240, 254, 360, 425, 430, 436–438, 440, 457, 464, 467, 482–485, 508, 524, 526, 645
 Поляризационная
 — анизотропия 41, 48, 50, 51, 52, 56, 62, 79, 92, 93, 103, 116, 118, 128, 131, 140, 141, 153, 154, 239, 240, 242, 266, 331, 340, 343, 354, 432, 433, 477, 491, 492, 494, 539, 540, 590, 607, 609, 612, 615
 — визуализация 119–121, 490, 591–602
 — генерация второй гармоники (ГВГ) 252, 254, 391, 425, 426, 499, 500, 501, 608, 690,
 — диафаногрфия 591
 — конфокальная микроскопия 233, 242, 255, 364, 391, 414–416, 419, 425, 429, 486, 494, 497, 454, 546, 603, 617, 656, 657, 660, 676, 677, 690
 — микроскопия 603, 605–607, 609
 — — нелинейная 256, 425, 427, 428
 — — оптическая когерентная 96, 99, 119, 271, 272, 274, 309, 312, 341, 391, 418, 476, 557, 617, 665, 666, 676, 677, 679, 680, 687
 — спектроскопия 108, 599, 600, 603
 — — эпителиального слоя 602
 — флуоресценция 611, 612, 614–616
 Поляризационный микроскоп 490–492, 603, 607, 609
 Поляризационно-интерференционный микроскоп 374, 382, 603, 609
 Постоянная
 — Больцмана 240, 257, 403
 — проницаемости 437
 Потенциал оптического просветления (ПОП) 466–468
 Поток
 — вещества 440, 451, 452
 — иммерсионного агента 104, 408, 440, 451, 453, 464, 468, 469, 486, 655
 — капиллярной крови 410, 528, 624, 637, 638, 671, 672, 681
 — крови 41, 62, 201, 206, 348, 350, 514, 516, 528, 622, 623, 628–630, 633, 637, 638, 671, 672, 681, 684
 — лимфы 201, 203, 205–207, 622, 623, 626, 670
 — случайный 405, 413
 Преобразование
 — Гильберта 380, 381
 — Лапласа 597
 Приближение
 — Рэлея–Ганса (ПРГ) 104, 343, 349, 389, 528, 529, 556
 — Кирхгофа 645
 — Перкуса–Йевики 143
 — твердых сфер 41, 130, 131, 142–144, 149
 Прибор с зарядовой связью (ПЗС) 89, 120, 121, 170, 198–201, 205, 211, 212, 227, 242, 252, 325, 328, 337, 340, 405–407, 410, 527, 549, 554, 555, 563, 586, 589, 593, 597, 598, 601, 602, 604, 607, 610, 632, 633, 636, 638, 653, 668, 669, 674, 675, 679, 680
 Проницаемые мембраны 437, 438, 440
 Пропиленгликоль (ПГ) 432, 433, 454, 465, 468–470, 479–481, 483, 484, 486, 488, 498, 499, 503, 507, 508, 510, 609
 Пространственная кросс-корреляция 633
 Пространственные флуктуации 127, 140, 376, 397, 451, 649, 650, 683
 — интенсивности 209, 210, 392, 394, 397, 398, 402–408, 410, 411, 413, 618, 621–624, 626, 627, 629, 632, 633, 635, 644, 645, 647–656,
 — — фазы 393, 400, 476, 647

- Пространственно-
 — временной оптический модулятор 400, 585, 586
 — модулированный лазерный пучок (ПМЛП) 40, 76, 77, 79, 81, 399–401, 560, 586, 661, 663
 Протеогликаны 135, 441, 442
 Протопорфирин 240, 244, 270, 284, 589, 590
 Проточная цитометрия 104, 194, 199, 204, 226, 234, 235, 399
 Профилометрия 85, 189, 656
 Псориагическая бляшка 329, 650, 651, 652
 Пульсограмма 642, 645, 646
 Пьезоэлектрический
 — датчик 170, 181, 229,
 — преобразователь 231, 232, 666, 667
- Р**
 Радиальная функция распределения 130, 138, 139, 142–143
 Разность фаз 94, 143, 411, 533, 571, 585, 673
 — детерминированная 399
 — случайная 143, 391, 393, 399
 Распределение
 — скорости кровотока 62, 220, 405, 407, 504, 517, 521, 636–639, 682
 — фазового пространства Вигнера 685, 686
 — частиц по размерам 44, 50, 103, 112, 117, 124, 126–129, 132, 133, 135, 264, 270, 271, 385, 517, 519, 522, 543, 556, 557, 559, 603, 620, 621, 622
 Рассеяние
 — анизотропное 48, 51, 117, 266, 477
 — изотропное 50, 52, 111, 117, 157, 159, 257, 266, 339, 343, 345, 556
 — индикатриса 112, 146, 147, 274, 343, 443, 512
 — коэффициент 48, 56, 76, 89, 124, 133, 134, 163, 175, 192, 222, 265, 268, 274, 328, 329, 332, 333, 341, 345, 346, 348, 351–353, 379, 387, 422, 432, 434, 435, 460, 461, 466, 470, 475, 476, 479, 518–522, 537, 539, 540, 541, 549, 561
 — — приведенный 51, 53, 86, 87, 90, 91, 132, 134, 177, 223, 264, 266, 269, 322, 327, 336, 337, 339, 340, 345, 346, 352, 356, 359, 385, 431, 435, 439, 445, 457, 465, 509, 513, 516, 517, 520, 527, 528, 537, 540–544, 548, 558, 566, 578, 584, 585, 587, 588, 599, 612, 615
 — — транспортный 51, 72, 73, 75, 131, 132, 237, 263–266, 269, 272, 327, 336, 341, 342, 345, 359, 418, 430, 431, 438, 477, 507, 509, 516, 520, 530, 531, 532, 612
 — Ми 50, 116, 117, 345
 — многократное 40, 48, 49, 52, 76, 105, 107, 108, 111–116, 119, 121, 123, 129, 130, 131, 157, 161, 207, 209, 210, 221, 233, 274, 341, 394, 395, 408, 413, 414, 417, 425, 435, 442, 443, 452, 477, 491, 492, 496, 499, 513, 517, 535, 548, 592, 595, 597, 602, 611, 612, 630, 633, 647, 649, 655, 686, 687
 — поперечное сечение 48, 109, 128, 132, 134, 135, 148, 151, 264, 348, 359, 360, 431, 517, 539, 686
 — спектр 151, 156–158, 216, 330, 352, 558
 Раствор Рингера 626
 Рафинноза 482
 Регидратация 465, 493, 494, 500, 524
 Региональный мозговой кровотока 585, 641
 Рентгеновская
 — дифракция 371, 441
 — компьютерная томография (КТ) 180, 684
 — маммография 232, 560, 582
 Рефлектометрия
 — диффузная 539
 — наклонного падения 340
 Рефрактометр Аббе 366, 375
 Решетка островковых повреждений 469
 Рибонуклеиновая кислота (РНК) 259
 Рибосомы 126
 Рэлея
 — предел 95, 112, 154, 389
 — рассеяние 50, 111, 117, 157–159, 257, 339, 556
 — теория 103, 104
- С**
 Самосмещение
 — эффект 642
 — интерферометр 642
 Свет
 — глубина проникновения 44, 51, 60, 79, 175, 179, 189, 217, 233–235, 255, 259, 274, 326, 357, 428, 481, 489, 498, 500, 535, 549, 588, 670, 690
 — деполаризованный 102, 114, 591, 611
 — дозиметрия 262, 355, 356, 689
 Связки 685
 Сдвиговое течение 413, 279, 350
 Сердечная мышца 44, 94, 96
 Сетевой анализатор 567, 578, 579
 Серое вещество (СВ) мозга 118, 187, 280–283, 286, 345, 346, 355, 362
 Синерезис 140

- Синфазный/квадратурный (IQ) демодулятор 568–573, 581
- Скалярная стационарная теория переноса излучения (ТПИ) 49, 108
- Скорость
- акустических волн 171, 172
 - потока 63, 200, 202, 203, 205, 249, 348, 350, 624–626, 629, 630, 636–638, 669–672, 682,
 - сдвигового течения 413
- Слой ретинального нервного волокна (СРНВ) 603
- СЛ-томография (СЛТ) 215, 216
- Случайная
- разность фаз 393, 399
 - фаза 212, 391
- Случайный
- процесс 397
 - рельеф 93, 261
 - фазовый экран (СФЭ) 41, 392, 393, 395, 396, 649
 - — глубокий 396, 404
 - — движущийся 404
 - — слабо рассеивающий 93, 396
- Сонолюминесценция (СЛ) 169, 215, 216
- Соотношение Крамерса–Кронига 380, 381
- Спекл-
- интерферометр 394, 399, 642–645, 660
 - интерферометрия 617, 660, 690
 - картина 209, 391, 405, 406, 407, 638, 640
 - карты контраста 638
 - контраст 397, 400, 406, 408, 409, 636, 638
 - коррелометр 649, 650, 653
 - микроскоп 492, 622
 - модуляция 209, 399, 400, 492, 536, 642, 680, 681
 - ОКТ, 679, 681, 682
 - поле 391, 393–397, 400, 623, 637, 643–645, 649, 654–656
 - размер 391, 397, 399, 400, 409, 622, 623, 633, 638, 643, 644
 - структуры 120, 211, 391, 393, 394, 396, 397, 404, 406, 409, 410, 637, 642, 653, 680
 - топография 647
 - флуктуации 407, 408, 410, 411, 626, 648, 682
 - фотография одной экспозиции 406
- Спеклы
- изменяющиеся во времени 403, 408, 410
 - интегрированные во времени 406
 - обратного рассеяния 395, 679
 - развитые 393, 394, 395, 647, 650, 690
 - субъективные 391, 680
- Спектралон 82, 337
- Спектроскопия
- квазиупругого рассеяния 391, 402, 404, 410, 412
 - колебательная 237, 256, 500
 - комбинационного рассеяния 67, 237, 256, 258, 260, 414, 500, 502, 506, 554
 - окклюзионная 528
 - отражения непрерывного излучения 245, 470, 599
 - полного внутреннего отражения 259, 470
 - рассеяния света (СРС) 548, 552, 554, 555, 557, 559
 - с временным разрешением (СВР) 528, 560, 565
 - флуктуаций интенсивности 402
 - флуоресцентная 237, 241, 242, 243, 245
- Спектрофотометрия 165, 245, 429, 506, 545, 689
- Среднее значение
- длины пути 52, 548, 657
 - длины свободного пробега фотона 48, 51, 52, 116, 121, 174, 209, 210, 354, 355, 412, 418, 443, 477, 520, 548, 597, 612, 627
 - квадрата смещения 412
 - скорости потока 205, 214, 624–626, 638
- Стаж сосудов 503, 504
- Старческий кератоз 329
- Статистические
- моменты 394, 597, 647
 - свойства 393, 394, 400, 401, 645, 649, 651
- Степень
- временной когерентности света 398
 - линейной поляризации 102, 116, 117, 119, 120, 123, 490, 591, 593, 597
 - круговой поляризации 102, 116, 117
 - поляризации 93, 100, 102, 128, 168, 239, 490, 491, 595, 597–601, 612
 - проницаемости 440
 - сжатия 560, 561, 584
- Стокса
- вектор 99–102, 105–111, 116, 163, 604
 - матрица вращения 106
 - параметры 99–102
- Стрик-камера 66, 560
- Строма 44, 126, 128, 135–137, 155, 254, 322, 363, 371, 372, 386, 427, 430, 431, 442, 602, 605
- Структурный фактор 144–146, 148, 150
- Структурная функция 397, 398
- Сульфат бария 328

- Суперлюминесцентный диод (СЛД) 420–423, 476, 665, 667, 672, 677–680
Сухожилие 685
Сфероциты 167, 516
Сывороточный альбумин быка (САБ) 523, 525, 533
- Таламус** 282, 345
Твердая мозговая оболочка (ТМО) 41, 43, 94, 128, 429, 430, 433, 440, 462, 463, 504, 505, 639
Теория
— Рэлея–Дебая 104
— переноса излучения (ТПИ) 49, 63, 93, 131, 278, 327, 329, 336, 492
Тепловая
— визуализация 213, 215
— градиентная спектроскопия (ТГС) 218, 219
— линза 201, 204, 227, 544
Терагерцовый (ТГ) 502
Термоакустический (ТА) 233, 235
Тирозин 46, 240, 246
Токсин стафилококка 624
Тразограф 430, 432, 433, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 457, 458, 459, 490, 491, 497, 507, 508, 510, 520, 609, 654, 656
Транспортное альbedo 51
Транспортная средняя длина свободного пробега фотона 51, 54, 80, 118, 121, 210, 354, 355, 412, 520, 597, 612, 627
Трансэпидермальная потеря воды (ТЭПВ) 464
Триптофан 46, 47, 156, 157, 159, 240, 246
Тромбоциты 41, 128, 197, 347, 507
Тубулин 44,
- Уксусная кислота** 352, 433, 544, 545,
— отбеливающий эффект 433, 545
Ультразвуковое исследование (УЗИ) 182, 227, 235
Ультрафиолетовый (УФ) 44, 46, 47, 48, 140, 153, 154, 159, 160, 161, 218, 234, 240, 241, 246, 247, 248, 251, 252, 258, 329, 382, 429, 430, 434, 483, 486, 487, 537, 538, 539, 600,
— А-диапазона (УФА) 47, 48, 140, 246, 429
Уравнение
— биотепловое 213, 214,
— Орнштейна–Цернике 143
— переноса излучения 49, 52, 55, 57, 63, 80, 81, 105, 107, 108, 241, 332, 356,
Уроканиновая кислота 46, 47
- Уропорфирин 240
Устройство измерения фазовой задержки (УИФЗ) 568
- Фазные сокращения** 625
Фазовая
— задержка 69, 70, 94, 96, 167, 168, 173–174, 457, 568, 570, 604, 605, 607, 610
— пластинка 163, 164, 489, 604, 610
— функция рассеяния 49, 50, 52, 56, 62, 102, 103, 107–108, 117, 132, 163, 263, 274, 333–353, 431, 517
— — Хенъи–Гринштейна (ФФХГ) 62, 123, 278, 334, 339, 343, 351, 353
— — ядра Гегенбауэра (ФФЯГ) 334, 343, 349, 353
Фазовые
— вариации 399
— измерения 541, 566, 568, 573
— — флуктуации 393, 396, 401
— экраны 41, 392, 403, 649
— — движущиеся 403
Фазовый микроскоп 522, 524, 656, 657
Фактор анизотропии рассеяния 52, 56, 61, 62, 81, 118, 151, 263–269, 272, 274, 286, 327–329, 333–359, 385, 430–439, 509–522, 597, 612, 615
ФА-микроскопия (ФАМ) 175, 234
Фантом
— биоткани 54, 72, 121, 123, 179, 181, 217–219, 245, 262–266, 268, 271, 418, 425
— спеклограмма 400
— твердый 269, 628
Фарадеевский вращатель 672, 673
ФА-томография (ФАТ) 177, 223, 230, 232, 233, 235
Фенилаланин 240
Фибриллы 97, 125, 371, 454
Фибробласты 43, 254, 526, 637
Флавинадениндинуклеотид (ФАД) 240
Флавиномононуклеотид (ФМН) 240, 553
Флуоресцеин 241, 486
Флуоресцентная микроскопия визуализации времени жизни 256
Флуоресценция 49, 53, 61, 62, 118, 190, 237–243
— анизотропия 239, 240, 613, 615, 616
— время жизни 239, 242, 243, 245, 256
— поляризационная анизотропия 131, 243, 432

- Флуоресценция
 — поляризационные измерения 429, 611, 612, 616
 — сканирующая микроскопия 248, 497
 — спектрометры 242
 — спектры 238, 242, 243, 246, 294
 — томография 241
 Фолликулярный долговременный резервуар 486
 Формула Зигерта 402, 414, 627, 629
 Фосфатно-буферный раствор (ФБР) 227, 228, 263, 268, 348, 351, 353, 354, 498, 499, 526
 Фосфоресценция 237
 Фотоакустический (ФА)
 — метод 169, 170, 172–177, 195, 204, 219, 220, 222, 226, 229, 233–235, 276
 — микроскопия (ФАМ) 175, 182, 184, 234, 235
 — ячейка 170, 174
 Фотобиологические эффекты 356, 434
 Фотодинамическая терапия (ФДТ) 59, 61, 92, 226, 245, 269, 272, 355, 429, 486
 Фотокоагуляция 226
 Фотоны
 — дробовый шум 583, 682
 — змеевидные, с зигзагообразными траекториями 63, 65
 — пакет 56–57, 61, 106, 107
 — распределение по длине пути 412
 — средняя длина свободного пробега 48, 52, 116, 174, 354, 443, 612
 — эффект рециркуляции 60, 61
 Фотон-корреляционная спектроскопия 402
 Фотонный кристалл 129
 Фотоокисление 140
 Фоторазрушение биоткани 535, 536
 Фоторефрактивные методы 170, 172
 Фототерапия 262, 356, 434, 462
 Фототермическая
 — микроскопия (ФТМ) 205
 — проточная цитометрия (ФТПЦ) 199
 — радиометрия (ФТР) 170, 186
 Фотоупругость 610
 Фотофрин II 263
 Фрактальная размерность 127, 133, 134, 339, 346
 Фрактальное распределение 339
 Фракционная лазерная микроабляция (ФЛ-МА) 469, 486
 Френель
 — зона 396
 — отражение 40, 48, 333, 375
 — формулы 332, 335, 369
 Функция (кривая)
 — плотности вероятности (ФПВ) 49, 393, 394, 597, 650
 — — интенсивности 248
 — — оптических путей 597
 — распределения вероятности (ФРВ) 394, 443
 — Планка 213
 Фурье
 — преобразование 77, 78, 81, 104, 207, 470,
 — — обратное 669
 ФЭУ на основе многоканальной пластинки 565
 Химический агент 430, 435, 437, 438, 441, 449, 456, 466, 475, 480, 487, 546
 — гиперосмотический 431
 — коэффициент диффузии 436, 437, 450, 457, 459, 462, 468, 474, 546
 Химический потенциал 440, 451
 Хиральность 96, 97, 102
 Хрящ 94, 96, 128, 429, 430, 432
 Цветовые
 — координаты 454, 597
 — характеристики 151
 Цервикальные патологии 376, 545
 Церебральный
 — кровоток (ЦК) 504, 506, 632, 636, 638, 639, 641
 — насыщение кислородом 585,
 Цереброспинальная жидкость (ЦСЖ) 172, 273, 294, 580
 Цитометрия 194, 199, 226, 235, 256, 376
 Цитохромы 194, 206, 553
 Цифровая микроскопия просвечивания (ЦМП) 205
 Частицы 44, 48, 49, 57, 62, 93, 96–99, 102–105, 109, 112, 622, 670
 — взаимодействующие 150
 — произвольной формы 103
 Частотно-зависимый метод
 — люминесценция (ЧЗ-ЛЮМ) 189, 190, 192
 — оптическая маммография 72
 — оптотермическая радиометрия (ОТР) (ЧЗ-ОТР) 189,
 Чрескожная доставка лекарств 485
 Шеймпфлюг камера 618

- Шейка матки 104, 121, 243, 260, 263, 322, 376, 433, 544–546, 555, 602
Шероховатая поверхность 260, 261, 391, 399, 476, 586, 587, 644, 645
Шрам 595
- Щ**елевой сканирующий конфокальный микроскоп 272, 414
Щитовидная железа 215, 357
- Э**ластиновые волокна 44, 94, 341, 361, 433, 441, 465, 474, 498
Электронный коррелятор 626, 628
Электрооптический модулятор 163
Электрофоретический аппликатор 469
Электропорация 484, 486
Элемент оптической длины пути 106
Эмалевые призмы 94
Эпидермальные хромофоры 188
Эпидермальная мембрана человека (ЭМЧ) 482
Эписклера 136, 137
Эпителиальный рак 555, 557, 615
Эпителий 42, 127, 254, 255, 322, 359, 431, 487
- диспластический 359
— переходный 558
— плоский стратифицированный 558
— псевдостратифицированный 678
— роговицы 657
— цилиарный пигментированный 460,
Эритема 245, 247, 434, 472, 537, 538, 600
Эритродермия псориатическая 479, 666,
Эритроциты 41, 62, 128, 131, 149, 167, 194, 200, 201–203, 206, 207, 218, 220, 279, 334, 348, 349, 350, 351, 353, 354, 374, 378, 381, 507–513, 517–520, 609, 610, 630, 637, 657
— агрегация 167, 389, 503, 507, 512–515, 528, 663, 664
— объем 62, 131, 508, 516–521
— показатель преломления 167, 348–350, 379, 384, 507, 517, 518, 520, 527, 609
— седиментация 514, 662
— упаковка 518, 519
Эффективная апертура 682
- Я**зва 217
— некротическая 118