

ФИЗИКА

УДК 535+57(023)

ОПТИЧЕСКАЯ БИОМЕДИЦИНСКАЯ ДИАГНОСТИКА

В.В. Тучин

Саратовский государственный университет,
кафедра оптики и биомедицинской физики
E-mail: tuchin@sgu.ru

В работе представлен обзор работ по оптической медицинской диагностике. Кратко обсуждается история вопроса. Основное внимание уделено рассмотрению современных методов оптической медицинской диагностики, основанных на спектрофотометрии, флуоресценции, доплеровской спектроскопии, спектроскопии упругого, квазиупругого и комбинационного рассеяния, а также на использовании оптотермического и оптоакустических эффектов.

OPTICAL BIOMEDICAL DIAGNOSTICS

V.V. Tuchin

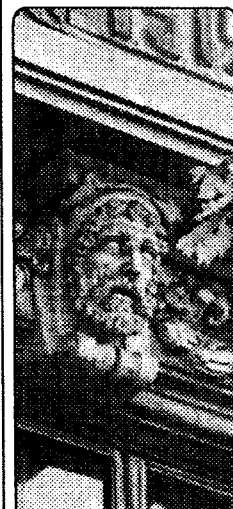
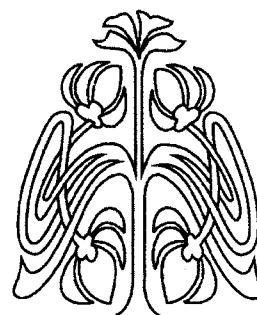
This paper presents an overview on optical biomedical diagnostics. It discusses briefly the history of the problem. The main attention is paid to description of the modern methods of optical medical diagnostics based on spectrophotometry, fluorescence, Doppler spectroscopy, elastic, quasi-elastic and Raman scattering spectroscopies, as well as optothermal and optoacoustic effects.

ВВЕДЕНИЕ

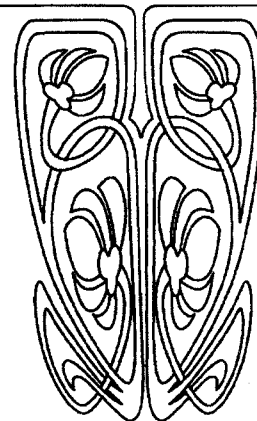
Свет видимого и ближнего инфракрасного диапазона длин волн является безопасным при малых уровнях плотности излучения, человеческий организм хорошо адаптирован к этому виду излучения. Свет этого диапазона длин волн хорошо проникает в биологическую ткань и, взаимодействуя с различными структурными и динамическими компонентами тканей, несет информацию о структурных и динамических изменениях, происходящих в тканях при различных заболеваниях. Такие хорошо известные в физике явления, как поглощение, дифракция, интерференция, флуоресценция, а также упругое, квазиупругое и молекулярное рассеяние, наблюдаются в биологических средах и являются источниками информации о патологических процессах. Конечно, не все так просто, биологические ткани относятся в оптике к так называемым мутным средам, то есть средам со сложными запутанными траекториями зондирующих фотонов. Поэтому получение изображения неоднородностей в тканях, например опухоли, затруднено. Тем не менее эти трудности преодолимы. В настоящей обзорной работе представлено описание наиболее перспективных оптических методов исследования биологических тканей. За последние 20 лет сотрудники кафедры оптики и биомедицинской физики физического факультета Саратовского государственного университета приняли самое активное участие в развитии этого научного направления.

ИСТОРИЧЕСКИЙ ОБЗОР

История использования света для мониторинга состояния биотканей и клеток с целью диагностики заболеваний представлена в работах [1–14]. Брайт (Bright) в 1831 г. показал, что солнечный свет или свет свечи может проходить через голову пациента больного гидроцефалией [10]. Позже, в 1843 г., возможность просвечивания биотканей была отмечена Курлингом (Curling), а в 1929 г. Катлером (Cutler) просвечивание было использовано для наблюдения патологических изменений молочной железы [11, 14, 15]. Хассельбалч (Hasselbalch)



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ





в 1911 г. [14] провел исследования пропускания ультрафиолетового излучения кожей, а в начале 1930-х гг. были доступны учебники, представляющие надежные научные данные по оптическому пропусканию, поглощению и флуоресценции биотканей; оптические свойства биотканей в ближней инфракрасной (БИК) области были представлены в 1933 г. Пирсоном (Pearson) и Норрисом (Norris), а также Харди (Hardy) и Мушенхеймом (Muschenheim) в 1935 г. [4]. Из-за сильного рассеяния света и автофлуоресценции ранние исследования позволили понять лишь некоторые самые общие оптические свойства биологической ткани.

Милликен (Millikan) был первым, кто предложил использовать метод двухволновой оптической спектроскопии для учета рассеяния света, и он был успешен в проведении метаболических анализов у человека [1, 12, 16]. В 1930-е, 1940-е и ранние 1950-е гг. было предпринято много исследований по спектроскопии гемоглобина в биотканях [1]. *In vivo* измерения БИК спектров пропускания мочки уха и щеки человека, сделанные Ильиной [17], показали много новых важных деталей спектра ткани, таких как полосу поглощения воды на длине волны 980 нм.

Использование БИК излучения для глубокого просвечивания тканей млекопитающих, включая голову взрослого человека, и диагностическое значение БИК для оценки степени насыщения гемоглобина кислородом и определения редокс состояния цитохрома а-а3 было продемонстрировано для объемных тканей в 1977 г. Джобсисом (Jobsis) [18, 19].

Чанс (Chance) в течение многих лет был первым в разработке проблем оптики биотканей и биомедицинской спектроскопии [1, 2, 12, 20–22]. Он использовал спектроскопию в физиологических исследованиях биоэнергетики для основополагающих измерений степени насыщения гемоглобина кислородом и окисления цитохрома. Для более прецизионного количественного определения поглощающих компонентов в тканях и, следовательно, для потенциально более эффективного использования в клинической диагностике Чанс (Chance) с сотрудниками [22], а также Дельпи (Delpey) с сотрудниками [23] предложили спектроскопию с временным разрешением, использующую импульсное просвечивание и детектирование, так называемый временной метод (time-domain). Позже он был разработан Паттерсоном (Patterson) с сотрудниками [24] и Жаком (Jacques) [25] в применении к измерениям на отражение и был использован многочисленными исследователями для изучения тканей

и создания диагностических приборов [1, 2, 5–14, 26–28].

В 1990 г. Лакович (Lakowicz) и Берндт (Berndt) [29] расширили возможности спектроскопии с временным разрешением путем использования частотного (frequency-domain) подхода, который математически эквивалентен временному методу, но позволяет создавать более робастные и чувствительные методы измерений [30]. Открытие на этой основе нового типа волн – волн фотонной плотности (photon-density waves) [8], и их интерференция [31] дали возможность существенно улучшить пространственное разрешение спектроскопического анализа биологической ткани [32].

Многочисленные *in vitro* и *in vivo* спектrophотометрические исследования тканей с использованием непрерывного (CW), временного или частотного методов проанализированы в работах [1–14, 26–28] и [32]. Разработка охлаждаемых ПЗС (CCD) камер, методов и приборов с временным и пространственным разрешением привела к расширению области исследований БИК спектроскопии и ее биомедицинских приложений. В настоящее время существует более 500 коммерческих клинических БИК спектрометров, предназначенных для мониторинга и получения изображений степени оксигенации, концентрации окисленного цитохрома и гемодинамики тканей [10].

Благодаря простоте получения спектров отражения и флуоресценции кожи человека они были впервые получены много лет назад, однако только последних два десятилетия могут характеризоваться разработкой количественных спектральных методик для *in vivo* мониторинга и диагностики определенных кожных и системных заболеваний [3, 14]. Исторический обзор можно найти в работах [3, 33].

Флуоресцентные методики, в том числе основанные на автофлуоресценции и микроскопии с использованием флуоресцентных маркеров, с разрешением во времени (с фазовой и временной селекцией) (phase- and time-gated), с лазерным сканированием и многофотонные были использованы для *in situ* неинвазивного изучения тканей и клеток человека [9, 14, 34–38]. Флуоресцентные методики применимы для медицинской диагностики разнообразных патологий многих типов тканей, включая ткани глаза. Недавно были разработаны разнообразные робастные комбинированные оптические диагностические методы, обладающие значительными возможностями, такие как основанные на одновременной регистрации флуоресценции и упругого рассеяния света (fluorescence/light



scattering) или флуоресценции и комбинационного рассеяния (fluorescence/Raman scattering) [35–37, 39].

В последние два десятилетия спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) (Raman spectroscopy), которая является мощным инструментом в изучении структуры и динамики биологически важных молекул [40], также широко использовалась для *in vitro* и *in vivo* мониторинга и диагностики заболеваний. Примеры включают катаракту, атеросклеротические нарушения сердечных артерий, предраковые и раковые нарушения мягких тканей человека, патологии костей и зубов [14, 39, 41–45]. Успех определяется достижениями в разработке инструментария для БИК, где влияние флуоресценции несущественно.

Среди перспективных неинвазивных методов определения содержания глюкозы в крови большой интерес у исследователей вызывают оптические методы, такие как спектрофотометрия БИК и среднего ИК (СИК) (2.5–50 μ), флуоресцентная и КР спектроскопия [34, 44]. СИК спектроскопия, в частности ИК спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения с Фурье-преобразованием (attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy), также важна для *in vivo* мониторинга компонентов кожи человека [14, 45]. СИК и КР спектроскопия являются примерами так называемой колебательной спектроскопии, характеризующейся высоко специфическими полосами, зависящими от концентрации компонентов ткани [41–45].

Спектроскопия рассеяния света (Light scattering spectroscopy) (СРС) является новым методом, способным идентифицировать и характеризовать патологические изменения в тканях человека на клеточном и субклеточном уровнях; он может быть использован для диагностики и обнаружения заболевания, включая неинвазивный мониторинг ранних изменений в эпителии человека, вызванных развитием рака [14, 46].

Спектроскопия квазиупругого рассеяния света (Quasi-elastic light scattering spectroscopy) (СКРС) в применении к мониторингу динамических систем в основном базируется на корреляционном или спектральном анализе временных флуктуаций интенсивности рассеянного света [47]. СКРС, также известная как спектроскопия оптических биений (light-beating spectroscopy) или корреляционная спектроскопия (correlation spectroscopy), широко используется в различных биомедицинских приложениях, особенно для измерений потоков крови и лимфы и диагностики катаракты [6, 13, 14, 48–51]. Для исследова-

ния объемных тканей, когда многократное рассеяние превалирует и миграция (диффузия) фотонов в ткани является важной для характера флуктуаций интенсивности, применима диффузионная волновая спектроскопия (ДВС) [8, 13, 14, 48, 49, 51].

Оптотермическая спектроскопия (ОТС), базирующаяся на детектировании зависящего от времени тепла, генерируемого в ткани импульсным или модулированным по интенсивности оптическим излучением, широко используется в биомедицине [13, 14, 52–54]. Среди ОТС методов наибольшее значение имеют оптоакустический (ОА) и фотоакустический (ФА) методы. Они позволяют оценивать оптические, тепловые и акустические свойства тканей, которые характеризуются особенностями их структуры.

1. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ

1.1. Непрерывное излучение

В приложении к *in vivo* спектроскопии объемных тканей (например, молочной железы или головы новорожденного) особенности оптических диффузионных методов, использующих непрерывный источник света и соответствующее детектирование, описываются следующим полуматричным экспоненциальным уравнением для коллимированного пропускания $T_c(\lambda)$ [13, 55]:

$$T_c(\lambda) = x_1 \exp[-\mu_a(\lambda) L(\lambda) x_2], \quad (1)$$

где $L(\lambda)$ – средняя длина полного пробега фотонов (total mean pathlength). Уравнение отражает зависимость от длины волны (λ) коэффициента поглощения, $\mu_a(\lambda)$, и приведенного (транспортного) коэффициента рассеяния, $\mu_s(\lambda)$; x_1 – учитывает вклад многократно рассеянных, но не поглощенных фотонов, которые не достигли детектора, а также геометрию измерений; x_2 – компенсирует ошибку при измерении толщины слоя d и неточности в определении приведенного коэффициента рассеяния $\mu'_s = \mu_s(1-g)$, μ_s и g – соответственно коэффициент рассеяния и параметр анизотропии рассеяния ткани. Для слоя толщиной d диффузионное уравнение может быть использовано для расчета средней длины полного пробега фотонов L [24].

Уравнение (1) было успешно использовано при обработке измеренных *in vivo* спектров молочной железы и определении концентрации следующих поглощителей: воды (H_2O), жира (f), деоксигемоглобина (Hb) и оксигемоглобина (HbO) [55]:

$$\mu_a = c_{H_2O} \sigma_{H_2O} + c_f \sigma_f + c_{Hb} \sigma_{Hb} + c_{HbO} \sigma_{HbO}, \quad (2)$$



где σ_i – поперечное сечение поглощения i -го компонента. Варьируя концентрации четырех компонентов ткани, теоретические спектры могут быть хорошо подогаданы под экспериментальные с помощью уравнения (2); коэффициенты корреляции были более 0.99 во всех случаях [55].

Для многих тканей *in vivo* измерения возможны только в геометрии обратного рассеяния [13, 14]. Соответствующее соотношение для отражения света R может быть получено на основе диффузионного приближения. Для спектроскопии обратного рассеяния в дополнение к измеренному коэффициенту отражения необходимо знать, с какой глубины приходит оптический сигнал. Для пространственно разнесенных источника света и приемника (например, два волоконных световода, установленных перпендикулярно поверхности ткани) такая глубина определяется функцией распределения длин путей фотонов для фотонов, мигрирующих от источника к приемнику. Эта пространственная функция распределения для однородной рассеивающей среды имеет форму банана. Кривая наиболее вероятного направления миграции фотонов в области банана достигает максимальной глубины, z^{\max} , которая определяется расстоянием между источником и детектором r_{sd} [13, 56]:

$$z^{\max} \approx (1/2\sqrt{2}) r_{sd}. \quad (3)$$

Вместо уравнения (1), используемого для *in vivo* исследований в геометрии просвечивания, модифицированный закон Бера–Ламберта для описания оптического затухания в геометрии обратного рассеяния записывается в следующей форме [13, 56]:

$$I/I_0 = \exp(-\varepsilon_{ab} c_{ab} r_{sd} \text{DPF} - G_s), \quad (4)$$

где I – интенсивность принятого света, I_0 – интенсивность падающего света, ε_{ab} – коэффициент поглощения, измеренный в единицах μ моль⁻¹ см¹, c_{ab} – концентрация поглотителя в μ моль, DPF – параметр дифференциального пробега, учитывающий увеличение длины пути миграции фотонов за счет рассеяния, а G_s – параметр затухания, учитывающий рассеяние и геометрию ткани.

Если r_{sd} , DPF и G сохраняются постоянными, то изменения концентрации поглощающей среды могут быть найдены с использованием измерений изменения оптической плотности (OD), $\Delta(\text{OD}) = \Delta(\log(I_0/I))$ [56]:

$$\Delta c_{ab} = \Delta(\text{OD}) / \varepsilon_{ab} r_{sd} \text{DPF}. \quad (5)$$

При использовании оптической спектроскопии или визуализации изменения в оптической плотности определяются следующим образом:

$$\begin{aligned} \Delta(\text{OD}) &= \log(I_0/I_{\text{test}}) - \log(I_0/I_{\text{rest}}) = \\ &= \log(I_{\text{rest}}) - \log(I_{\text{test}}), \end{aligned} \quad (6)$$

где I_{rest} и I_{test} представляют соответственно интенсивность детектируемого от объекта (ткани мозга, скелетной мышцы и т.д.) света в процессе отдыха и во время тестирования, включающего индуцированную активность мозга, холодовой или визуальной тесты, упражнения и пр. Например, используя зарегистрированные изменения OD на длинах волн 760 и 850 нм, можно получить изображения в виде пространственного распределения поглощения на этих длинах волн или функциональные изображения (пространственное распределение степени оксигенации или объема крови) в пределах области детектирования:

$$\begin{aligned} \Delta(\text{OD})_{\text{oxy}} &= \Delta(\text{OD})_{850} - \Delta(\text{OD})_{760}; \Delta(\text{OD})_{\text{total}} = \\ &= \Delta(\text{OD})_{850} + k_{\text{bvo}} \Delta(\text{OD})_{760}, \end{aligned} \quad (7)$$

где $(\text{OD})_{850}$ и $(\text{OD})_{760}$ – оптические плотности, измеренные на длинах волн 850 и 760 нм, k_{bvo} – модифицирующий параметр для уменьшения перекрестного влияния изменений объема крови и оксигенации.

Типичный *in vivo* спектр обратного рассеяния (400–700 нм) ткани содержит полосы поглощения гемоглобина (полоса Soret и Q полосы) [13, 57, 58]. Он также включает некоторое влияние поглощения таких компонентов, как флавины, бета-каротин, билирубин, цитохром и т.д. На основе измерения спектральных различий нормальной и патологической ткани может быть установлен соответствующий спектральный автограф для определения патологии – «идентификатор». Для *in vivo* медицинской диагностики такие спектральные «идентификаторы» обычно используют отношения интегральных (в пределах выделенных спектральных полос) коэффициентов отражения или измерение крутизны спектральных кривых для выделенных полос. В качестве внутреннего эталона для оценки абсолютных концентраций компонентов крови в ткани может быть использована полоса воды на 980 нм [57].

1.2. Ткани глаза

Даже такая прозрачная ткань, как роговица глаза человека, рассеивает свет, поэтому полное и аксиальное (коллимированное) пропускания не являются идентичными [59]. Благодаря слабому рассеянию пики поглощения воды хорошо видны на 300, 980, 1180, 1450, 1900 и 2940 нм, они обеспечивают малое пропускание через роговицу в УФ и ИК спектральных областях.



Усредненное спектральное пропускание, полученное на основе измерений пропускания роговицы в спектральном диапазоне от 320 до 700 нм для 10 человек (от 14 до 75 лет), было промоделировано следующими функциями для полного пропускания $T_t(\lambda)$ (угол приема близок к 180 град) и аксиального пропускания $T_c(\lambda)$ (угол приема около 1 град) [60]:

$$\begin{aligned} \text{Log } T_t(\lambda) &= -0.016 - 21 \cdot 10^8 \lambda_0^{-4}, \\ \text{Log } T_c(\lambda) &= -0.016 - 85 \cdot 10^8 \lambda_0^{-4}, \end{aligned} \quad (8)$$

где λ_0 – длина волны в нанометрах.

В видимой области нормальный хрусталик менее прозрачен, чем роговица, поскольку в дополнение к рассеянию важным является поглощение различными хромофорами, включая 3-гидрокси-L-кинуренин-*O*- β -глюкозид и возрастной белок (ответственный за пожелтение хрусталика с возрастом человека) [13, 14, 35, 61].

Склера является малопрозрачной тканью за счет сильного рассеяния света на структурных элементах (полидисперсной системе упакованных нерегулярных коллагеновых цилиндров, внедренных в основное вещество с меньшим показателем преломления) [13]. Такая фиброзная структура позволяет легко управлять пропусканием склеры человека при согласовании показателя преломления коллагеновых волокон и основного вещества путем пропитывания ткани иммерсионной жидкостью.

1.3. Временной метод

Нестационарная теория переноса излучения (ТПИ) позволяет анализировать временной отклик рассеивающих тканей [1, 2, 5–14, 22–26, 55]. Если плоскопараллельный слой рассеивающей среды зондируется коротким лазерным импульсом, то прошедший импульс формируется за счет баллистического (когерентного) компонента, группы фотонов, имеющих зигзагообразные траектории, и очень интенсивного диффузного компонента [62]. Обе группы – нерассеянные фотоны и фотоны, испытавшие однократное рассеяние строго в направлении «вперед», дают вклад в интенсивность компонента, распространяющегося непосредственно вдоль лазерного пучка. Этот компонент имеет экспоненциальное затухание по мере роста толщины образца. Это обстоятельство ограничивает возможность использования таких фотонов для практических диагностических целей в медицине.

Группа «змеевидных» фотонов с зигзагообразными траекториями включает фото-

ны, испытавшие только несколько столкновений на своем пути. Они распространяются вдоль траекторий, которые лишь немного отличаются от направления падающего пучка и формируют первопришедшую часть диффузного компонента. Эти фотоны несут информацию об оптических свойствах случайной среды.

Диффузионный компонент существенно уширен и имеет значительную интенсивность, поскольку он содержит большое количество из числа падающих фотонов, испытавших много актов рассеяния и поэтому мигрирующих по многим направлениям и имеющих различные длины путей. Более того, диффузионный компонент несет информацию об оптических свойствах рассеивающей среды, а его деформация может показывать присутствие локальной неоднородности в среде. При высокой интенсивности принятого света пространственное разрешение этого метода существенно ниже, чем у метода, регистрирующего прямопрошедшие фотоны. Возможны два принципа схем зондирования, один основан на регистрации прошедших фотонов, а второй использует способность фотонов рассеиваться в обратном направлении. Зависящая от времени отражательная способность определяется по формуле

$$\begin{aligned} R(r_{sd}, t) &= \frac{z_0}{(4\pi D)^{3/2}} t^{-5/2} \times \\ &\times \exp\left(-\frac{r_{sd}^2 + z_0^2}{2Dt}\right) \exp(-\mu_a ct), \end{aligned} \quad (9)$$

где t – время; $z_0 = (\mu_s')^{-1}$ и $D = c/3(\mu_s' + \mu_a)$ – коэффициент диффузии фотонов, см²/с [24, 25].

На практике μ_a и μ_s' определяются путем подгонки профиля импульса, измеренного с помощью метода счета фотонов с разрешением во времени, к теоретическому профилю, определяемому уравнением (9). Важным преимуществом импульсного метода является его применимость к *in vivo* исследованиям, поскольку μ_a и μ_s' могут быть найдены раздельно на основе лишь одного измерения.

1.4. Частотный метод

В рамках частотного метода измеряется глубина модуляции интенсивности рассеянного света $m_U \equiv AC_{\text{detector}}/DC_{\text{detector}}$ и соответствующий сдвиг фазы относительно фазы модуляции падающего света $\Delta\Phi$ (phase lag) [1, 2, 5–14, 29–32, 62]. По сравнению с временным методом этот метод является более



простым и надежным с точки зрения интерпретации данных и помехозащищенности, поскольку он использует амплитудную модуляцию при низких пиковых мощностях, медленном нарастании интенсивности и, следовательно, использует приемник с более узкой, чем у временного метода полосой. Характерны также более высокие отношения сигнал-шум. Медицинское оборудование на основе частотного метода является более экономичным и компактным [32]. Тем не менее частотный метод страдает от необходимости обеспечения одновременной передачи и приема сигналов и поэтому требует специальных мер для избежания нежелательных взаимных влияний (crosstalk) между передаваемым и принимаемым сигналами. Современные измерительные схемы основаны на гетеродинировании оптических и преобразованных сигналов [13, 32].

Развитие теории метода привело к открытию нового типа волн: волн фотонной плотности, или сильнозатухающих волн интенсивности. Микроскопически отдельные фотоны случайным образом мигрируют в рассеивающей среде, но коллективно они формируют волну фотонной плотности на частоте модуляции ω , которая движется от источника излучения. Волны фотонной плотности обладают типичными волновыми свойствами, т.е. они преломляются, дифрагируют, интерферируют, обладают дисперсией и затухают [1, 2, 5–14, 29–32, 62].

В сильнорассеивающей среде со слабым поглощением вдали от стенок и источника или детектора излучения распределение света может быть рассмотрено как затухающий диффузионный процесс, описываемый временным диффузионным уравнением для плотности фотонов. Для точечного источника света с гармонической модуляцией интенсивности на частоте $\omega = 2\pi\nu$, расположенного в точке $\vec{r} = 0$, переменный компонент (АС) интенсивности представляет собой уходящую сферическую волну с центром в точке $\vec{r} = 0$, осциллирующую на частоте модуляции с глубиной модуляции

$$m_i(\vec{r}, \omega) = m_1 \exp(\vec{r} \sqrt{D/c\mu_a}) \exp(-\vec{r} \sqrt{\omega/2D}), \quad (10)$$

и имеющую сдвиг фазы относительно значения фазы в точке $\vec{r} = 0$:

$$\Delta\Phi(\vec{r}, \omega) = \vec{r}(\omega/2D)^{0.5}, \quad (11)$$

где m_1 – глубина модуляции интенсивности падающего света, $D = c/3(\mu_s' + \mu_a)$. Длина волны фотонной плотности, Λ_Φ и ее фазовая скорость, V_Φ определяются как

$$\Lambda_\Phi^2 = 8\pi^2 D / \omega, \quad V_\Phi^2 = 2 D \omega. \quad (12)$$

Измерение $m_i(\vec{r}, \omega)$, $\Delta\Phi(\vec{r}, \omega)$ позволяет отдельно определять транспортный коэффициент рассеяния μ_s' и коэффициент поглощения μ_a и находить пространственное распределение этих параметров.

Для типичной ткани молочной железы на 800 нм ($\mu_s' = 15 \text{ см}^{-1}$, $\mu_a = 0.035 \text{ см}^{-1}$) для $\omega/2\pi = 500 \text{ МГц}$, и $c = (3 \times 10^{10} / 1.33) \text{ см/с}$, длина волны $\Lambda_\Phi \cong 5.0 \text{ см}$, а фазовая скорость $V_\Phi \cong 1.77 \times 10^9 \text{ см/с}$.

Описан целый ряд измерительных систем, использующих частотный метод и демонстрирующих достижения в области *in vivo* диагностики в приложении к клиническим исследованиям [13, 32]. Например, для получения количественных измерений абсолютных значений оптических параметров различных типов тканей был разработан компактный, с широким диапазоном частот модуляции (0.3–1000 МГц), многоволновый (674, 811, 849 и 956 нм) прибор на основе частотного метода регистрации мигрирующих фотонов [63, 64].

1.5. Метод интерференции волн фотонной плотности

Метод интерференции волн фотонной плотности (метод гашения фазы и амплитуды (phase and amplitude cancellation method), или метод фазированной решетки (phased-array method)), впервые описанный в работе [31], является многообещающим методом для повышения пространственного разрешения модуляционного способа [13, 32]. Идея метода основывается на использовании либо пары идентичных источников и одного детектора или пары идентичных приемников и одного источника, которые работают так, что амплитудные и фазовые характеристики могут быть скомпенсированы, а система становится дифференциальной. Если в качестве источников взяты источники с равными амплитудами, и их фазы равны соответственно 0 град и 180 град, то подходящее позиционирование приемника может привести к нулевому значению амплитуды с переходом фазового сдвига между 0 и 180 град, т.е. 90 град.

В однородных средах нулевая амплитуда и переход фазы могут наблюдаться по геометрической средней линии треугольника, в вершинах которого находятся приемники и источники. Этот метод чрезвычайно чувствителен к возмущениям, вносимым поглотителем или рассеивателем. При наблюдении поглощающей неоднородности удалось достигнуть пространственного разрешения около 1 мм, аналогичное разрешение ожидается и для рассеивающей неоднород-



ности. Другое достоинство метода заключается в том, что при нулевой настройке измерительная система относительно нечувствительна к амплитудным флуктуациям, общим для обоих источников. Однако, с другой стороны, неоднородности, занимающие значительный объем ткани, общий для двух оптических путей системы, не могут быть зарегистрированы. Амплитудный сигнал менее полезен при получении изображений, поскольку существует неоднородности в положении неоднородности. Хотя существует возможность преодоления этого недостатка за счет дополнительного кодирования сигнала, фазовый сигнал является более робастным и фазовый шум менее 0.1 град (отношение сигнал-шум более 400) для полосы в 1 Гц может быть обеспечен [32].

2. ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

2.1. Основы и методы

Флуоресценция возникает при поглощении света и обусловлена электронным переходом молекулы из возбужденного состояния в основное. В случае тонких образцов, например биоптатов толщиной в несколько микрон, интенсивность флуоресценции I_F пропорциональна концентрации c и квантовому выходу флуоресценции η поглощающих молекул [34, 65, 66]. В рассеивающей среде длины путей рассеянных и нерассеянных фотонов внутри образца различаются, и эти различия должны быть учтены [34].

При возбуждении биологических объектов ультрафиолетовым светом ($\lambda \leq 300$ нм) наблюдается флуоресценция белков и нуклеиновых кислот. Однако квантовый выход флуоресценции всех составляющих нуклеиновых кислот близок к 10^{-4} – 10^{-5} , что соответствует временам жизни возбужденных состояний, лежащим в пикосекундном временном диапазоне. Автофлуоресценция (АФ) белков обусловлена аминокислотами, триптофаном, тирозином и фенилаланином с максимумами поглощения, соответственно на 280 нм, 275 нм и 257 нм и максимумами излучения между 280 нм (фенилаланин) и 350 нм (триптофан) [34, 65, 66]. Флуоресценция коллагена или эластина возбуждается между 300 и 400 нм и имеет широкие эмиссионные полосы между 400 и 600 нм с максимумами около 400, 430 и 460 нм. В частности, флуоресценция коллагена и эластина может быть использована для различения разных типов тканей и их патологий, например эпителиальной и соединительной ткани [9, 14, 28, 58, 61, 65–72].

Редуцированная форма кофермента никотинамид-аденин-динуклеотида (NADH) возбуждается селективно в диапазоне длин волн между 330 и 370 нм. NADH сконцентрирован в основном в митохондриях, где он окисляется в пределах дыхательной цепи, локализованной во внутренней мембране митохондрии. Его флуоресценция является подходящим параметром для распознавания ишемических и неопластических тканей [65]. Было показано, что флуоресценция свободного и связанного с белком NADH чувствительна к концентрации кислорода. Было найдено, что флаavin мононуклеотид (FMN) и динуклеотид (FAD) с максимумами возбуждения около 380 нм и 450 нм также дают вклад во внутриклеточную флуоресценцию [65].

Порфириновые молекулы – например, протопорфирин, копропорфирин, уропорфирин или гематопорфирин – существуют в пределах цепочки биосинтеза гемоглобина, миоглобина и цитохромов [65]. Нарушения в синтезе гема, происходящие в случае порфирии и некоторых других гемолитических заболеваний, могут значительно увеличить уровень порфиринов в тканях. Несколько видов бактерий, например *Propionibacterium acnes*, или бактерии, содержащиеся в патологических образованиях при кариесе дентина, аккумулируют значительное количество протопорфирина. Поэтому обнаружение акне и кариеса на основе измерений внутренней флуоресценции является многообещающим методом.

В настоящее время разнообразные экзогенные флуоресцентные красители могут быть использованы для изучения анатомии и физиологии клетки. Такие красители, как флуоресцеин и индоцианин зеленый, используются для ангиографии или определения объема крови в органах человека [65].

Спектры флуоресценции часто дают детальную информацию о флуоресцирующих молекулах, их конформации, связях и взаимодействиях внутри клеток и тканей. Интенсивность флуоресценции может быть измерена как функция длины волны эмиссии или возбуждения. Эмиссионный спектр $I_F(\lambda)$ является специфичным для любого флуорофора и обычно используется во флуоресцентной диагностике. Флуоресцентные спектрометры для *in vivo* диагностики обычно используют волоконно-оптические системы и оптический многоканальный анализатор (ОМА) (линейку диодов или ПЗС камеру) в качестве детектора излучения флуоресценции [58, 65–68].

Сейчас доступны разнообразные по сложности и имеющие большие возможностями методы флуоресцентной спектроско-



пии, такие как микроспектрофлуориметрия, метод поляризационной анизотропии, метод с разрешением во времени при импульсном возбуждении и возбуждении модулированным излучением, метод с временной селекцией, флуоресцентная спектроскопия и микроскопия полного внутреннего отражения, флуоресцентный метод резонансной передачи энергии, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия и их комбинации [34, 65–72]. Эти методы позволяют обеспечить [65]

- трехмерную топографию объекта при измерениях в режиме отражения для изучения морфологии биологических образцов;
- микроскопию высокого разрешения при измерениях на просвет;
- трехмерное детектирование клеточных структур и флуоресцентную кинетику выщечивания (бличинга);
- изучение временной кинетики флуоресценции;
- исследования движений клеточных структур;
- визуализацию с временной селекцией для обнаружения специфически флуоресцирующих молекул или молекулярных взаимодействий;
- визуализацию на основе регистрации времени жизни флуоресценции;
- визуализацию со спектральным разрешением.

2.2. *In vivo* флуоресценция кожи человека

Отражательная и флуоресцентная спектроскопия являются наиболее развитыми среди всех доступных оптических методов в применении к исследованию кожи человека *in vivo*. Отражение от кожи и её флуоресценция дают информацию о структуре эпидермиса и дермы, количестве и плотности сосудов крови, концентрации и пространственном распределении хромофоров и флуорофоров и природе метаболических процессов в коже. Типичные применения включают *in vivo* количественный анализ эритемы и пигментации кожи, определение вариаций цвета кожи, мониторинг эффективности дерматологического лечения, определение фотостарения кожи, диагностику опухолей и изучение биофизики кожи [3, 66, 67, 69–71].

В работе [66] обсуждаются потенциальные преимущества и возможные области совместного применения отражательной и флуоресцентной спектроскопии кожи для оценки индексов эритемы и пигментации, определения степени оксигенации и концентрации гемоглобина, а также исследования эффективности солнцезащитных препаратов.

Большинство биологических компонентов, которые либо характеризуют структуру кожной ткани, либо вовлечены в метаболические или функциональные процессы, генерируют флуоресцентную эмиссию в УФ-видимом спектральном диапазоне. В результате различные морфофункциональные состояния кожи, относящиеся к гистологическим, биохимическим и физико-химическим изменениям, могут быть в принципе охарактеризованы на основе информации, получаемой с помощью карт возбуждения–эмиссии флуоресценции [6, 66, 68, 70].

Среди эндогенных флуорофоров кожи находятся различные формы никотинамидаденин-динуклеотида (NAD) и кератин, содержащиеся в эпидермисе, а также коллаген дермы. Редуцированная (NADH) и окисленная (NAD⁺) формы NAD участвуют в клеточном метаболизме, а интенсивность их специфической флуоресценции (максимумы флуоресценции соответственно около 460 нм и 435 нм) используется для дифференциальной диагностики метаболической дисфункции [66].

Для коллагена и эластина, которые в основном локализованы в пределах сосочкового и ретикулярного слоев дермы, оба – возбуждающий и испускаемый свет – ослабляются за счет поглощения меланина, а интенсивность света флуоресценции в диапазоне 400–480 нм ослабляется другими хромофорами кожи: гемоглобином, порфиринами, каротиноидами и пр. [66, 71].

2.3. Достижения многофотонной флуоресценции

Новым направлением в лазерной спектроскопии биологических объектов является многофотонная (двух-, трехфотонная) флуоресцентная сканирующая микроскопия, которая позволяет получать изображения функциональных состояний объекта, или в комбинации с автокорреляционным анализом сигнала флуоресценции определять внутриклеточную подвижность в малых объемах [13, 38]. Двухфотонный метод использует как баллистические, так и рассеянные фотоны на длине волны второй гармоники падающего света, которые попадают на широкоапертурный фотодетектор непосредственно из фокальной области возбуждающего пучка. Уникальным преимуществом двухфотонной микроскопии является возможность исследования трехмерных распределений хромофоров, возбуждаемых ультрафиолетовым излучением в объемных образцах. Такие исследования оказываются возможными благодаря тому, что хромофоры могут быть возбуждены (например, на длине волны 350 нм)



с помощью лазерного излучения, при котором длина волны попадает в диапазон длин волн (700 нм), где ткань имеет высокое пропускание. Такое излучение может достигать глубоких слоев и в меньшей степени повредить ткани. Излучение флуоресценции в этом случае лежит в видимом диапазоне (>400 нм) и сравнительно легко выходит из ткани, достигая детектора, который регистрирует только полезный сигнал из фокальной области без какого-либо постороннего фона. Трехфотонная флуоресцентная микроскопия ткани имеет те же преимущества, что и двухфотонная, однако обеспечивает несколько более высокое пространственное разрешение и возможность возбуждения хромофоров на более коротких длинах волн.

3. КОЛЕБАТЕЛЬНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Спектроскопия среднего инфракрасного диапазона (СИК) и спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) основаны на получении информации о составе, структуре и взаимодействиях молекул образца при возбуждении светом колебательных энергетических состояний молекул [40–45, 73, 74]. В СИК спектроскопии инфракрасный свет от широкополосного источника (обычно 2.5–25 μ или 4000 – 400 см^{-1}) непосредственно поглощается молекулами с возбуждением в более высокие колебательные состояния. При комбинационном рассеянии свет неупруго рассеивается молекулой с переходом небольшого количества энергии от фотона к молекуле (или наоборот). Разность энергии падающего и рассеянного фотонов выражается в виде сдвига волнового числа (см^{-1}).

Методы СИК и КР спектроскопии успешно применяются в разнообразных областях клинических исследований, таких как обследование раковых опухолей, мониторинг процесса минерализации костной и зубной ткани, определение глюкозы в крови, неинвазивная диагностика кожных нарушений путем определения наличия доброкачественных и злокачественных клеток, мониторинг процесса лечения и местного введения препаратов в кожу (например, лекарств, косметических и увлажняющих средств и т.д. [41–45, 73]).

КР спектроскопия широко используется в биологии – от изучения очищенных биологических соединений до исследования на уровне отдельных клеток [40, 74]. В настоящее время для локальной характеристики тканей или клеток образца путем картирования распределения молекул, имеющих специфические колебательные частоты, используются комбинации спектроскопических ме-

тодов, таких как СИК и КР с микроскопическим анализом изображений [73, 74]. Химическая визуализация становится все более важной в клинической диагностике.

Благодаря малой глубине проникновения СИК света в ткань, порядка нескольких микрометров, метод ИК спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения с Фурье-преобразованием (ATR-FTIR) хорошо подходит для исследования внешних клеточных слоев ткани [73].

КР метод обладает определенными характеристиками, делающими его особенно подходящим для исследования кожи как *in vitro*, так и *in vivo* [45, 73]. Конфокальное детектирование особенно полезно для изучения внешних слоев кожи, т.е. рогового слоя и живого эпидермиса. Так как дерма гораздо толще эпидермиса (1–4 мм), она может быть легко изучена с помощью неконфокальных схем с объемом детектирования большим толщины эпидермиса [73].

4. СПЕКТРОСКОПИЯ РАССЕЯНИЯ И ОПТИЧЕСКАЯ КОГЕРЕНТНАЯ ТОМОГРАФИЯ

Недавно были описаны новые методы, основанные на рассеянии света, которые способны идентифицировать и характеризовать патологические изменения в тканях человека на клеточном и субклеточном уровнях [14, 46, 58, 75–78]. Спектроскопия рассеяния света (СРС) обеспечивает получение информации о структуре и функционировании ткани. Эта информация, в свою очередь, может быть использована для диагностики и мониторинга заболевания. Одним из важных применений биомедицинской спектроскопии является неинвазивное раннее обнаружение рака эпителия человека [46, 75, 78]. Увеличение размеров, скопление и гиперхроматичность ядер эпителиальных клеток являются общими чертами всех типов предрака и раннего рака. СРС может быть использована для обнаружения ранних изменений, связанных с раком и другими заболеваниями, многих органов, таких как пищевод, прямая кишка, шейка матки, ротовая полость, легкие и мочевого пузыря [78].

Клетки и ткани имеют сложное строение с широким разнообразием размеров рассеивателей: от нескольких нанометров (размер макромолекулы) до 7–10 μ (размер ядра) и выше, до 20–50 μ (собственно размер клетки) [13, 14, 75]. Многие структуры клеточных органелл малы по сравнению с длиной волны. Рассеяние света такими частицами известно, как релейское (Rayleigh) рассеяние, характеризуемое широким угловым распределением и зависимостью поперечного



сечения рассеяния от линейного размера частицы a , как a^6 , и от длины волны λ , как λ^{-4} . Теория связанных диполей или другой подход, такой как приближение Релея–Ганса (Rayleigh-Gans) (ПРГ), могут быть использованы, когда частица недостаточно мала. ПРГ особенно хорошо для применения к частицам с размерами, сравнимыми с длиной волны, оно может быть полезно для изучения рассеяния света малыми органеллами, такими как митохондрии, лизосомы и пр. Для ПРГ рассеяние в направлении «вперед» превалирует, а полная интенсивность рассеяния возрастает с увеличением относительного показателя преломления частицы m , как $(m-1)^2$, а с размером возрастает, как a^6 .

Рассеяние частицей с размерами много больше длины волны, такой как ядро клетки, может быть описано в рамках приближения ван дер Хюлста (van de Hulst), которое позволяет получить амплитуды рассеяния вблизи направления «вперед» [75]. Для больших частиц интенсивность рассеяния сильно направлена вперед, а ширина первого лепестка рассеяния близка к λ/a ; чем больше частица, тем сильнее уже первый лепесток. Интенсивность в направлении «вперед» показывает колебания с длиной волны. Природа этих колебаний заключается в интерференции лучей, проходящих через центр частицы и не взаимодействующих с ней. Частота этих колебаний пропорциональна $a(m-1)$, поэтому она увеличивается с размером частицы и ее показателем преломления. Интенсивность рассеяния также имеет пик в направлении, близком к направлению «назад», но этот пик существенно меньше пика рассеяния «вперед».

Эти результаты хорошо согласуются со строгой теорией рассеяния, развитой для сферических частиц (теория Ми (Mie)) [79]. Для дифференциации вызванных патологией особенностей клеточных структур может быть использовано различие в рассеянии света. Структуры с большими размерами и большим показателем преломления дают рассеянное поле с пиками в направлениях «вперед» и близком к направлению «назад», в противоположность более мелкие и оптически мягкие структуры рассеивают свет более равномерно.

Фотоны, которые после однократного рассеяния возвращаются в обратном направлении или близком к нему, формируют так называемый однократно-рассеянный компонент. Фотоны, возвращаемые обратно после множественных актов рассеяния, формируют диффузное отражение. Спектры обоих однократно-рассеянного и диффузного сигналов содержат ценную информацию о свойствах

тканей. Тем не менее характер информации различен. Однократно-рассеянный компонент чувствителен к морфологии верхнего слоя ткани, который в случае любой слизистой оболочки практически всегда включает или ограничен только эпителием. Его спектроскопические особенности связаны с микроархитектурой эпителиальных клеток, размерами, формой и показателем преломления их органелл, включений и суборганелльных компонентов. Поэтому анализ этого компонента должен быть полезен для диагностики заболеваний, ограниченных эпителием, таких как преинвазивные стадии эпителиального рака, дисплазии и карциномы *in situ* (CIS) [46, 75, 78].

Однократно-рассеянный компонент наиболее важен в диагностике нарушений, связанных с начальными стадиями эпителиального предрака, в то время как диффузный компонент несет ценную информацию о более поздних стадиях заболевания. Тем не менее в тканях при *in vivo* исследованиях события с однократным рассеянием не могут наблюдаться непосредственно, поскольку при однократном рассеянии только малая доля падающего света рассеивается в обратном направлении.

Было предложено несколько методов, способных различать однократное рассеяние. Полевая спектроскопия рассеяния (field-based light-scattering spectroscopy) [80] и оптическая когерентная томография (optical coherence tomography (OCT)) [13, 81] были разработаны для получения послойных томографических и спектроскопических изображений. В этих методах, являющихся развитием обычного метода OCT [13, 14], информация о спектральном составе обратно рассеянного света получается при детектировании и обработке интерференционного OCT сигнала. Эти методы позволяют измерять спектр обратнорассеянного света либо на нескольких дискретных длинах волн [80], либо одновременно в пределах всей доступной оптической полосы от 650 до 1000 нм [81] за одно измерение.

Имеется также существенно более простая поляризационно-чувствительная методика, базирующаяся на том факте, что первоначально поляризованный свет теряет свою поляризацию при распространении в мутной среде [82]. Обычная методика регистрации обратного рассеяния с пространственным разрешением при условии достаточно малого расстояния между источником и приемником также может быть использована [46]. В этом случае однократно-рассеянный компонент (2–5%) должен быть выделен из полного спектра отражения.



Возможность СРС диагностировать дисплазию и CIS было протестировано в исследованиях на человеке *in vivo* для трех видов эпителия: цилиндрического эпителия прямой кишки и пищевода Барретта (Barrett's), переходного эпителия мочевого пузыря и многослойного плоского эпителия ротовой полости [78]. Был проанализирован спектр отраженного света и найдено распределение размеров ядер. Во всех исследованных органах отчетливо обнаруживается разница между диспластическим и недиспластическим эпителием. Как дисплазия, так и CIS показывают более высокий процент увеличенных размеров ядер и в среднем их более высокую популяционную плотность, что может быть использовано как основа спектроскопической диагностики тканей [78].

5. СПЕКТРОСКОПИЯ И ТОМОГРАФИЯ НА ОСНОВЕ ДИНАМИЧЕСКОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА

5.1. Фотон-корреляционная спектроскопия

Термины спектроскопия квазиупругого рассеяния (Quasi-elastic light scattering spectroscopy (QELSS)), фотон-корреляционная спектроскопия (photon-correlation spectroscopy), спектроскопия флуктуаций интенсивности (spectroscopy of intensity fluctuations) и доплеровская спектроскопия (Doppler spectroscopy) являются синонимами и имеют отношение к динамическому рассеянию света, которое лежит в основе неинвазивного метода изучения динамики частиц на сравнительно больших временных масштабах [13, 14, 47–51]. Осуществление режима однократного рассеяния и использование когерентных источников света являются фундаментальными требованиями в этом случае. Пространственный масштаб, на котором анализируется ансамбль биологических частиц, определяется обратной величиной волнового вектора $|\vec{s}|^{-1}$:

$$|\vec{s}| = (4\pi n / \lambda_0) \sin(\theta / 2), \quad (13)$$

где n – показатель преломления, а θ – угол рассеяния. При обеспечении самобиений за счет фотосмещения электрических компонентов рассеянного поля может быть изменена автокорреляционная функция флуктуаций интенсивности $g_2(\tau) = \langle I(t) I(t + \tau) \rangle$. Для гауссовой статистики такая корреляционная функция связана с автокорреляционной функцией первого порядка соотношением Зигерта (Siebert):

$$g_2(\tau) = A \left[1 + \beta_{sb} |g_1(\tau)|^2 \right]. \quad (14)$$

Здесь τ – время задержки; $A = \langle i \rangle^2$ – квадрат среднего значения фототока, или базовая линия автокорреляционной функции; β_{sb} – параметр эффективности самобиений, $\beta_{sb} \approx 1$; $g_1(\tau) = \exp(-\Gamma_T \tau)$ – нормированная автокорреляционная функция оптического поля для монодисперсной системы броуновских частиц, где $\Gamma_T = |\vec{s}|^2 D_T$ – релаксационный параметр, $D_T = k_B T / 6 \pi \eta r_h$ – коэффициент трансляционной диффузии, k_B – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура, η – абсолютная вязкость среды, r_h – гидродинамический радиус частицы. Многие биологические системы характеризуются бимодальным распределением коэффициентов диффузии, когда быстрая диффузия (D_{TF}) может быть отделена от медленной диффузии (D_{TS}), связанной с агрегацией частиц. Целью QELSS является реконструкция распределения рассеивающих частиц по размерам, что необходимо для диагностики и мониторинга заболевания.

Гомодинные и гетеродинные фотон-корреляционные спектрометры, лазерные доплеровские анемометры (ЛДА), дифференциальные схемы ЛДА и лазерные доплеровские микроскопы (ЛДМ) имеют широкую область медицинских применений, в основном для исследований тканей глаза (диагностика катаракты), гемодинамики в сосудах (сосуды глазного дна) и микроциркуляции крови [13, 14, 47–51].

5.2. Диффузионная волновая спектроскопия

Диффузионная волновая спектроскопия (ДВС) является методом нового класса в области динамического рассеяния света, позволяющим проводить исследование динамики частиц на очень коротких временных интервалах [8, 13, 14, 48, 49, 51]. Фундаментальным отличием этого метода от QELSS является то, что метод ДВС применим к исследованию плотных сред с многократным рассеянием. В противоположность случаю однократного рассеяния автокорреляционная функция поля $g_1(\tau)$ чувствительна к движению частицы на масштабе длины порядка $\lambda [L / l_t]^{-1/2}$, который в общем случае много меньше длины волны λ , так как $L \gg l_t$ (L – полная средняя длина пробега фотона, а l_t – транспортная длина пробега фотона, $l_t \approx 1/\mu'_s$). Поэтому затухание автокорреляционных функций ДВС происходит существенно быстрее, чем автокорреляционных функций, используемых в QELSS.

Экспериментально осуществить ДВС метод очень просто. Измерительная система должна обеспечить облучение объекта исследования непрерывным лазерным пучком



и измерение флуктуаций интенсивности рассеянного излучения в пределах одного спекла с помощью одномодового волоконного приемного световода, фотоумножителя, системы счета фотонов и быстрого цифрового коррелятора, работающего в наносекундном диапазоне [8, 13]. Возможности ДВС для медицинских применений были продемонстрированы на примере мониторинга микроциркуляции крови руки человека [13]. Измерительным параметром, характеризующим скорость кровотока, является наклон автокорреляционной функции. Нормированная автокорреляционная функция флуктуаций поля может быть представлена в виде двух компонентов, связанных с броуновским и направленным движением рассеивателей (эритроцитов или лимфоцитов):

$$g_1(\tau) \approx \exp\left\{-2\left[\tau/\tau_B + (\tau/\tau_s)^2\right]L/l_i\right\}, \quad (15)$$

где $\tau_B^{-1} \equiv \Gamma$ определяется в уравнении (14), $\tau_s^{-1} \equiv 0.18G_V \sqrt{s} l_i$ характеризует направленный поток, а G_V является градиентом скорости потока. Это позволяет выразить наклон автокорреляционной функции в терминах диффузионного коэффициента (характеризует микроциркуляцию крови или лимфы) и градиента направленного движения крови или лимфы.

6. ОПТОТЕРМИЧЕСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ И ТОМОГРАФИЯ

6.1. Оптотермические взаимодействия

Оптотермический (ОТ) метод регистрирует зависящее от времени тепло, генерируемое в ткани благодаря взаимодействию с импульсным или модулированным по интенсивности оптическим излучением [13, 52–54]. Тепловые волны, генерируемые путем освобождения тепла, приводят к ряду эффектов, которые лежат в основе разнообразных методов: оптоакустического (ОА) или фотоакустического (ФА); оптотермической радиометрии (ОТР), или фототепловой радиометрии (ФТР) и фоторефрактивных методов [13, 52–54]. Термин «оптоакустика» относится прежде всего к методу с временным разрешением, использующему импульсные лазеры и измерение профилей давления в тканях, а термин «фотоакустика» описывает спектроскопические эксперименты с использованием непрерывного модулированного света и фотоакустической ячейки. Информационные свойства ОА метода позволяют определять тепловые, оптические и акустические параметры тканей, которые зависят от особенностей структуры тканей.

В ОА и ФА методах в качестве детекторов, регистрирующих амплитуду и фазу ре-

зультирующей акустической волны, используются микрофон или пьезоэлектрический преобразователь, которые находятся в акустическом контакте с образцом. В ОТР методе для оценки поверхностного распределения температуры и ее визуализации применяются дистанционные ИК детекторы и матричные камеры. Получаемая в рамках любого из ОТ или ОА методов интенсивность сигналов зависит от величины поглощенной и преобразованной в тепло энергии и от термоупругих свойств образца и его окружения. Когда безызлучательная релаксация является основным процессом в затухании лазерного пучка, а ослабление не очень сильное, $\mu_a d \ll 1$ (d – длина цилиндра внутри образца, покрытая пучком импульсного лазера), то поглощенная импульсная энергия индуцирует локальное повышение температуры, определяемое соотношением

$$\Delta T \cong E \mu_a d / c_p V \rho, \quad (16)$$

где c_p – удельная теплоемкость при постоянном давлении; $V = \pi w^2 d$ – облучаемый объем; w – радиус лазерного пучка; ρ – плотность среды. Предполагая адиабатическое расширение облучаемого объема за счет поступления тепла при постоянном давлении, можно подсчитать соответствующие изменения объема ΔV . Это расширение индуцирует распространение волны со скоростью звука, v_a , в радиальном направлении. Соответствующее изменение давления Δp пропорционально амплитуде механических колебаний

$$\Delta p \sim (f_a/w)(\beta v_a/c_p) E \mu_a, \quad (17)$$

где f_a – частота акустической волны, а β – коэффициент объемного расширения.

Принципы разнообразных ОТ и ОА методов характеризуют уравнения (16) и (17). Информацию о коэффициенте поглощения μ_a на выбранной длине волны можно получить из прямых измерений изменения температуры ΔT (оптическая калориметрия), объема ΔV (оптогеометрический метод) или давления Δp (ОА или ФА методы).

6.2. ОА метод

Для сильно рассеивающих сред измерение профиля и амплитуды упругой волны должно сочетаться с измерениями полного диффузного отражения, тогда оказывается возможным определять независимо коэффициенты поглощения и рассеяния материала образца. Коэффициент поглощения в мутной среде может быть оценен из измерений акустического временного профиля только в том случае, если известна подповерхностная облученность (интегральная плотность потока) образца. Для мутной среды, облученной ши-



роким лазерным пучком ($>0.1\text{mm}$), действие обратного рассеяния приводит к более высокой подповерхностной облученности по сравнению с интегральной плотностью потока падающего лазерного излучения [13]. Поэтому распределение света в ткани по глубине и соответствующее распределение давления имеют сложный профиль с максимумом в подповерхностном слое. Тем не менее амплитуда давления, соответствующая облученной поверхности $\delta p(0)$, и экспоненциальный срез импульса по глубине образца ткани $\delta p(z)$ могут быть найдены, если процесс нагрева существенно быстрее процесса расширения среды [83]. Если длительность лазерного импульса существенно короче времени распространения механического напряжения поперек области проникновения света в глубь образца ткани, то давление ограничено во времени в течение теплового действия лазерного излучения. Такие условия временной ограниченности давления в объеме облученной ткани обуславливают наиболее эффективный режим генерации давления [83].

6.3. Метод ОТР

Импульсный лазерный нагрев ткани вызывает возмущения и соответствующую модуляцию собственного теплового (инфракрасного) излучения. Это является основой импульсной оптометрической радиометрии (ОТР) [13, 52, 54, 84]. Максимум интенсивности теплового излучения живых объектов приходится на область длин волн, близкую к $10\ \mu$. Детальный анализ ОТР сигнала требует знания распределения внутренней температуры образца ткани, скорости тепловой диффузии ткани и ее коэффициентов поглощения на длинах волн возбуждения μ_a и эмиссии μ_a' ($10\ \mu$). И, наоборот, знание некоторых из указанных параметров позволяет на основе измеренного ОТР сигнала реконструировать, например распределение коэффициента поглощения μ_a по глубине [84].

Импульсный ОТР метод имеет значительные потенциальные возможности для исследования оптических и тепловых свойств тканей *in vitro* и *in vivo* [13, 52–54, 84, 85]. Например, последовательность (пары) инфракрасных эмиссионных изображений, зарегистрированных вслед за облучением лазерным импульсом, были использованы для высокоточного определения скорости тепловой диффузии биоматериалов [85].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Краткий обзор исследований в области взаимодействия низкоинтенсивного оптиче-

ского и лазерного излучения с биотканями показывает обширные возможности применения оптических методов для неинвазивной диагностики в медицине. Каждый из описанных методов, как правило, имеет свою область наиболее оптимальных приложений. Некоторые методы взаимно дополняют друг друга и могут быть использованы при комплексных исследованиях патологических процессов на клеточном или молекулярном уровнях или на уровне органа.

Более подробное описание физических основ многих из представленных здесь методов и их биомедицинских приложений читатель может найти в монографиях [86–94].

Библиографический список

1. Chance B. Optical method // Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 1991. V. 20. P. 1–28.
2. Special Issue Honoring Professor Britton Chance / Eds. D. Benaron, I. Bigio, E. Sevick-Muraca, A.G. Yodh // J. Biomed. Opt. 2000. V. 5. P. 115–248; 269–282.
3. Anderson R.R., Parrish J.A., Optical properties of human skin // The Science of Photomedicine / Eds. J.D. Regan, J.A. Parrish. N. Y., 1982. P. 147–194.
4. Duck F.A. Physical Properties of Tissue: a Comprehensive reference book. L., 1990.
5. Medical Optical Tomography: Functional Imaging and Monitoring / Eds. G. Mueller, B. Chance, R. Alfano et al. Bellingham: SPIE Press, 1993. V. IS11.
6. Selected papers on tissue optics applications in medical diagnostics and therapy / Ed. V.V. Tuchin. Bellingham: SPIE Press, 1994. V. MS 102.
7. Patterson M.S. Noninvasive measurement of tissue optical properties: current status and future prospects // Comments Mol. Cell. Biophys. 1995. V. 8. P. 387–417.
8. Yodh A.G., Chance B. Spectroscopy and imaging with diffusing light // Physics Today. 1995. V. 48. P. 34–40.
9. 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.
10. Special Section on Clinical Near Infrared Spectroscopy/Imaging / Eds. M. Ferrari, D. Delpy, D.A. Benaron // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1. P. 361–434; 1997. V. 2. P. 7–41; 147–175.
11. Selected Papers on Optical Tomography, Fundamentals and Applications in Medicine / Eds. O. Minet, G. Mueller, J. Beuthan. Bellingham: SPIE Press, 1998. V. MS 147.
12. Okada K., Hamaoka T. Special Section on Medical Near-Infrared Spectroscopy // J. Biomed. Opt. 1999. V. 4. P. 391–428.
13. Tuchin V.V. Tissue optics: Light scattering methods and instruments for medical diagnosis // SPIE Tutorial Texts in Optical Engineering. Bellingham: SPIE Press, 2000. V. TT38.
14. Rodriguez J., Yaroslavsky I., Yaroslavsky A. et al. Time-resolved imaging in diffusive media // Handbook of Opt. Biomed. Diagnostics / Ed. V.V. Tuchin. Bellingham: SPIE Press, 2002. V. PM107. Chap. 6.
15. Cutler M. Transillumination as an aid in the diagnosis of breast lesions // Surg. Gynecol. Obstet. 1929. V. 48. P. 721.



16. Millikan G.A. A simple photoelectric colorimeter // *J. Physiol. (London)* 1933. V. 79. P. 152–157.
17. И'ина А.А. Transmittance of the near infrared rays by tissues of the human body // *Soviet Physiological J.* 1949. V. 35. P. 338–348.
18. Jobsis F. Non invasive monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters // *Science* 1977. V. 198. P. 1264–1267.
19. Jobsis-vander Vliet F.F. Discovery of the near-infrared window into the body and the early development of near-infrared spectroscopy // *J. Biomed. Opt.* 1999. V. 4. P. 392–396.
20. Chance B., Williams G.R. A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation // *Nature (London)* 1955. V. 176. P. 250–254.
21. Chance B., Cohen P., Jobsis F., Schoener B. Intracellular oxidation-reduction states *in vivo* // *Science* 1962. V. 137. P. 499–508.
22. Chance B., Leigh J.S., Miyake H. et al. Comparison of time-resolved and unresolved measurement of deoxygenation in tissue // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. V. 85. P. 4971–4975.
23. Delpy D.T., Cope M., Van Zee P. et al. Estimation of optical path-length through tissue from direct time of flight measurement // *Phys. Med. Biol.* 1988. V. 33. P. 1433–1442.
24. 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.
25. Jacques S.L. Time-resolved reflectance spectroscopy in turbid tissues // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1989. V. 36. P. 1155–1161.
26. Cheong W.-F., Prael S.A., Welch A.J. A review of the optical properties of biological tissues // *IEEE J. Quantum Electr.* 1990. V. 26. P. 2166–2185.
27. Quantitative Spectroscopy in Tissue / Eds. K. Frank, M. Kessler. Frankfurt am Main: pri-Verl., 1992.
28. Special Issue on Optical Radiation Technique in Medicine and Biology / Ed. H. Moseley // *Phys. Med. Biol.* 1997. V. 24. P. 759–996.
29. Lakowicz J.R., Berndt K. Frequency-domain measurements of photon migration in tissues // *Chem. Phys. Lett.* 1990. V. 166. P. 246–252.
30. 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.
31. Schmitt J.M., Knuettel A., Knutson J.R. Interference of diffusive light waves // *J. Opt. Soc. Amer. A.* 1992. V. 9. P. 1832–1843.
32. Chance B., Cope M., Gratton E. et al. Phase measurement of light absorption and scatter in human tissue // *Rev. Sci. Instrum.* 1998. V. 69. P. 3457–3481.
33. Parrish J.A., Anderson R.R., Urbach F., Pitts D. UV-A: Biologic Effects of Ultraviolet Radiation with Emphasis on Human Responses to Longwave Ultraviolet. N. Y., 1978.
34. Lakowicz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy: 2-nd ed. N. Y., 1999.
35. Special Section on Light Scatter and Fluorescence of the Eye Lens / Ed. B.K. Pierscionek // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1. P. 241–295.
36. Best J.A. van, 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. P. 243–250.
37. 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. P. 280–288.
38. Denk W. Two-photon excitation in functional biological imaging // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1. P. 296–304.
39. Ozaki Y., Medical application of Raman spectroscopy // *Appl. Spectroscopy Reviews.* 1988. V. 24. P. 259–312.
40. Tu A.T. Raman Spectroscopy in Biology. N. Y., 1982.
41. Mahadevan-Jansen A., Richards-Kortum R. Raman spectroscopy for detection of cancers and precancers // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1. P. 31–70.
42. Special Section on Biomedical Applications of Vibrational Spectroscopic Imaging / Ed. M.D. Morris // *J. Biomed. Opt.* 1999. V. 4. P. 6–34.
43. 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.
44. McNichols R. J., Cote G.L. Optical glucose sensing in biological fluids: an overview // *J. Biomed. Opt.* 2000. V. 5. P. 5–16.
45. Lucassen G.W., Veen G.N.A. van, 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.
46. Perelman L.T., Backman V., Wallace M. et al. 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.
47. Photon Correlation and Light Beating Spectroscopy / Eds. H.Z. Cummins, E.R. Pike. N. Y., 1974; Photon Correlation Spectroscopy and Velocimetry, N. Y., 1977.
48. Tuchin V.V. Coherence-domain methods in tissue and cell optics // *Laser Physics.* 1998. V. 8. P. 807–849.
49. Tuchin V.V. Coherent optical techniques for the analysis of tissue structure and dynamics // *J. Biomed. Opt.* 1999. V. 4. P. 106–124.
50. Special Section on Optical Diagnostics of Biological Fluids / Eds. A.V. Priezzhev, T. Asakura // *J. Biomed. Opt.* 1999. V. 4. P. 35–93.
51. Special Section on Coherence Domain Optical Methods in Biomedical Science and Clinics / Eds. V.V. Tuchin, H. Podbielska, C.K. Hitzengerger // *J. Biomed. Opt.* 1999. V. 4. P. 94–190.
52. Braslavsky S.E., Heihoff K. Photothermal methods // *Handbook of Organic Photochemistry* / Ed. J.C. Scaiano. Boca Raton: CRC Press, 1989.
53. Gusev V.E., Karabutov A.A. Laser Optoacoustics. N. Y., 1993.
54. Tuchin V.V. Lasers and fiber optics in biomedicine // *Laser Physics.* 1993. V. 3. P. 767–820; 925–950.
55. 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. P. 425–434.
56. Luo Q., Zeng S., Chance B., Nioka S. Monitoring of brain activity with near infrared spectroscopy // *Opt. Biomed. Diagnostics* / Ed. V.V. Tuchin. Bellingham: SPIE Press, 2001. Chap. 8.
57. Maicher S.J. Absolute quantification in tissue near-infrared spectroscopy // *Handbook of Opt. Biomed. Diagnostics* / Ed.



V.V. Tuchin. Bellingham: SPIE Press, 2001. Chap. 9.

58. *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.
59. *Sacks Z.S., Craig D.L., Kurtz R.M. et al.* Spatially resolved transmission of highly focused beams through cornea and sclera between 1400 and 1800 nm // *Proc. SPIE.* 1999. V. 3726. P. 522–527.
60. *Berg T.J.T.P. van den, 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.
61. *Dillon J.* The photophysics and photobiology of the eye // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1991. V. 10. P. 23–40.
62. *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. Amer. A.* 1993. V. 10. P. 127–140.
63. *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. P. 10–20.
64. *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.
65. *Schneckenburger H., Steiner R., Strauss W., Stock K., Sailer R.* Fluorescence technologies in biomedical diagnostics // *Handbook of Opt. Biomed. Diagnostics* / Ed. V.V. Tuchin. Bellingham: SPIE Press, 2002. Chap. 15.
66. *Sinichkin Yu.P., Kollias N., Zonios G. et al.* Reflectance and fluorescence spectroscopy of human skin *in vivo* // *Handbook of Opt. Biomed. Diagnostics* / Ed. V.V. Tuchin. Bellingham: SPIE Press, 2002. Chap. 13.
67. *Svanberg S.* New developments in laser medicine // *Phys. Scripta.* 1997. V. 72. P. 69–75.
68. *Richards-Kortum R.R., Rava R.P., Petras R.E. et al.* Spectroscopic diagnosis of colonic dysplasia // *Photochem. Photobiol.* 1991. V. 53. P. 777–786.
69. *Sternborg H.J.C.M., Motamedi M., Wagner R.F.* *In vivo* fluorescence spectroscopy and imaging of human skin tumors // *Lasers Med. Sci.* 1994. V. 9. P. 344–348.
70. *Zeng H., MacAulay C., McLean D. I. et al.* Spectroscopic and microscopic characteristics of human skin autofluorescence emission // *Photochem. Photobiol.* 1995. V. 61. P. 639–645.
71. *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.
72. *Malik Z., Amit I., Rothmann C.* Subcellular localization of sulfonated tetraphenyl porphines in colon carcinoma cells by spectrally resolved imaging // *Photochem. Photobiol.* 1997. V. 65. P. 389–396.
73. *Lucassen G.W., Caspers P.J., Puppels G.J.* Infrared and Raman spectroscopy of human skin *in vivo* // *Handbook of Opt. Biomed. Diagnostics* / Ed. V.V. Tuchin. Bellingham: SPIE Press, 2002. V. PM107. Chap. 14.
74. *Puppels G.J.* Confocal Raman microspectroscopy // *Fluorescent and luminescent probes for biological activity* / Ed. W. Mason. L., 1999. P. 377–406.
75. *Perelman L.T., Backman V.* Light scattering spectroscopy of epithelial tissues: principles and applications // *Handbook of Opt. Biomed. Diagnostics* / Ed. V.V. Tuchin. Bellingham: SPIE Press, 2002. V. PM107. Chap. 12.
76. *Mourant J.R., Freyer J.P., Hielscher A.H. et al.* Mechanisms of light scattering from biological cells relevant to non-invasive optical-tissue diagnosis // *Appl. Opt.* 1998. V. 37. P. 3586–3593.
77. *Drezek R., Dunn A., Richards-Kortum R.* Light scattering from cells: finite-difference time-domain simulations and goniometric measurements // *Appl. Opt.* 1999. V. 38. P. 3651–3661.
78. *Backman V., Wallace M., Perelman L.T. et al.* Diagnosing Cancers Using Spectroscopy // *Nature.* 2000. V. 406. № 6791. P. 35–36.
79. *Bohren C.F., Huffman D.R.* *Absorption and Scattering of Light by Small Particles.* N. Y., 1983.
80. *Yang C., Perelman L.T., Wax A. et al.* Feasibility of field-based light scattering spectroscopy // *J. Biomed. Opt.* 2000. V. 5. P. 138–143.
81. *Morgner U., Drexler W., Kartner F.X. et al.* Spectroscopic optical coherence tomography // *Optics Lett.* 2000. V. 25. P. 111–113.
82. *Backman V., Gurjar R., Badizadegan K. et al.* Polarized light scattering spectroscopy for quantitative measurement of epithelial cellular structures *in situ* // *IEEE J. Sel. Top. Quant. Elect.* 1999. V. 5. P. 1019–1026.
83. *Oraevsky A.A., Jacques S.J., Tittel F.K.* Measurement of tissue optical properties by time-resolved detection of laser-induced transient stress // *Appl. Opt.* 1997. V. 36. P. 402–415.
84. *Sathyam U.S., Prahl S.A.* Limitations in measurement of subsurface temperatures using pulsed photothermal radiometry // *J. Biomed. Opt.* 1997. V. 2. P. 251–261.
85. *Milner T.E., Goodman D.M., Tanenbaum B.S. et al.* Non-contact determination of thermal diffusivity in biomaterials using infrared imaging radiometry // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1. P. 92–97.
86. *Приезжев А.В., Тучин В.В., Шубочкин Л.П.* *Лазерная диагностика в биологии и медицине.* М., 1989.
87. *Тучин В.В.* *Лазеры и волоконные световоды в биомедицинских исследованиях.* Саратов, 1998.
88. *Tuchin V.V.* *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics.* Bellingham: SPIE Press, 2002. V. PM107
89. *Tuchin V.V.* *Biomedical Spectroscopy* // *Encyclopedia of Optical Engineering.* Marcel Dekker, Inc., USA, 2003.
90. *Tuchin V.V.* *Tissue Spectroscopy* // *Encyclopedia of Optical Engineering.* Marcel Dekker, Inc., 2003.
91. *Tuchin V.V.* *Light-Tissue Interactions* // *Biomedical Photonics Handbook.* Boca Raton: CRC Press, 2003.
92. *Zimnyakov D.A., Tuchin V.V.* *Speckle Correlometry* // *Biomedical Photonics Handbook.* Boca Raton: CRC Press, 2003.
93. *Coherent-Domain Optical Methods for Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science* / Ed. V.V. Tuchin. Boston, USA, 2004. V. 1–2.
94. *Tuchin V.V., Lihong Wang, Zimnyakov D.* *Optical Polarization in Biomedical Applications.* Boston: Springer-Verlag, 2006 (in press).