



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 полумпирическим 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 поглощателей: 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 $\mu\text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$, c_{ab} – концентрация поглопителя в $\mu\text{ моль}$, 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 Core 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 -глокозид 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

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

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 MHz), 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. 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 моноклеотид (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 взаимодействии 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-