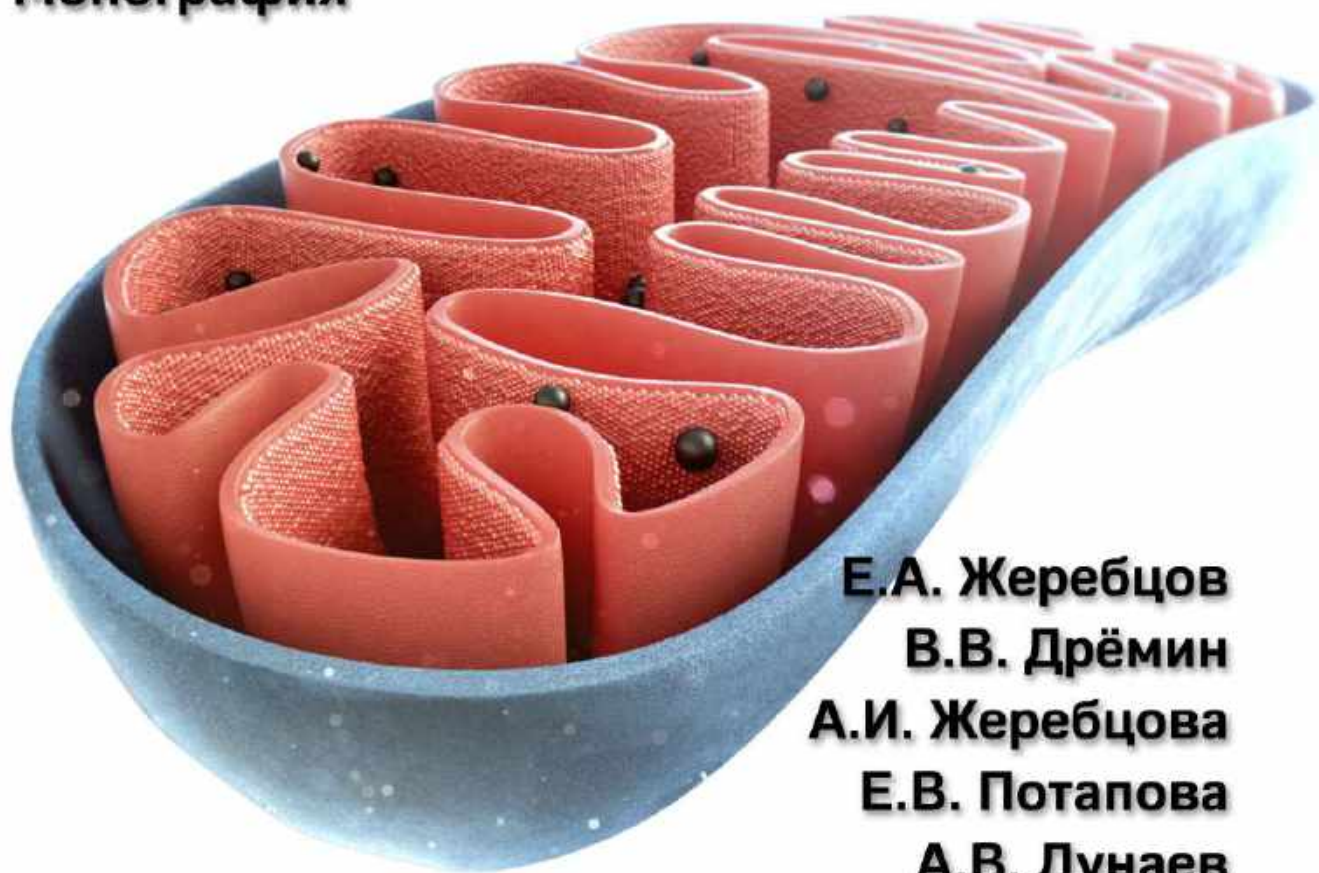


МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ И.С. ТУРГЕНЕВА»

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ТКАНЯХ IN VIVO

Монография



**Е.А. Жеребцов
В.В. Дрёмин
А.И. Жеребцова
Е.В. Потапова
А.В. Дунаев**

Орел 2018

УДК 615.47:616-072.7
ББК 53.433:28.706
Ф 737

Рецензенты:

доктор физико-математических наук, профессор,
заведующий кафедрой лазерных и биотехнических систем
федерального государственного автономного образовательного учреждения
высшего образования «Самарский национальный исследовательский
университет имени академика С.П. Королева»
В.П. Захаров

доктор технических наук, профессор,
заведующий кафедрой приборостроения, метрологии и сертификации
федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева»
К.В. Подмастерьев

Жеребцов, Е.А.

Ф 737 Флуоресцентная диагностика митохондриальной функции в эпителиальных тканях *in vivo*: монография / Е.А. Жеребцов, В.В. Дрёмин, А.И. Жеребцова, Е.В. Потапова, А.В. Дунаев. – Орел: ОГУ имени И.С. Тургенева, 2018. – 107 с.

ISBN 978-5-9929-0604-2

Настоящая монография посвящена разработке научных основ оценки митохондриальной функции в эпителиальных тканях методом флуоресцентной диагностики *in vivo*. В монографии, состоящей из пяти глав, рассмотрены различные подходы к изучению интенсивности и времени жизни флуоресценции в живых тканях, разработаны теоретические основы определения регистрируемой интенсивности флуоресценции, диагностического объема и времени жизни флуоресценции с разделением компонентов в смеси в приложении к диагностике эпителиальных тканей.

Монография предназначена практикующим врачам, специалистам в области медицинского приборостроения и биологической физики, а также может быть полезна учащимся высших учебных заведений, интересующимся проблемами разработки новых медицинских диагностических устройств.

Монография выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 18-15-00201).

УДК 615.47:616-072.7
ББК 53.433:28.706

ISBN 978-5-9929-0604-2

© ОГУ имени И.С. Тургенева, 2018
© Е.А. Жеребцов, В.В. Дрёмин,
А.И. Жеребцова, Е.В. Потапова,
А.В. Дунаев

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ПОДХОДОВ К ИЗУЧЕНИЮ ИНТЕНСИВНОСТИ И ВРЕМЕНИ ЖИЗНИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В ЖИВЫХ ТКАНЯХ	8
1.1 Физические основы флуоресценции	8
1.2 Спектрально-разрешенное время жизни флуоресценции: обнаружение и анализ.....	17
1.2.1 Флуоресцентная спектроскопия с временным разрешением	17
1.2.2 Анализ данных АФ с временным разрешением	20
1.2.3 Спектрально-разрешенная визуализация и визуализация времени жизни флуоресценции	22
1.3 Исследование спектрально-разрешенного времени жизни флуоресценции эндогенных флуорофоров.....	26
1.3.1 Эндогенные флуорофоры эпителиальных тканей	26
1.3.2 Методы оценки митохондриальной функции эпителиальных тканей	27
1.4 Практическое применение спектрально-разрешенной диагностики времени жизни флуоресценции	30
1.5 Перспективы исследования интенсивности и времени жизни флуоресценции в биотканях.....	32
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА РЕГИСТРИРУЕМЫЕ СИГНАЛЫ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ	34
2.1 Исследование влияния кровенаполнения	36
2.1.1 Окклюзионный тест	37
2.1.2 Влияние локальной окклюзии	40
2.1.3 Влияние температуры	43
2.2 Исследование влияния меланина.....	45
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ РЕГИСТРИРУЕМОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ.....	50
3.1 Обзор подходов к моделированию сигналов флуоресценции... 50	
3.1.1 Теория вероятностной миграции фотонов	52
3.1.2 Теория Кубелки-Мунка	54

3.1.3 Диффузионное приближение.....	55
3.1.4 Комбинированные аналитические методы	56
3.1.5 Метод Монте-Карло.....	57
3.2 Разработка аналитической модели флуоресценции кожи	60
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ОБЪЕМА И МОДЕЛИ ДЛЯ ОЦЕНКИ СООТНОШЕНИЯ СИГНАЛ-ШУМ РЕГИСТРИРУЕМОГО СИГНАЛА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КРОВЕНАПОЛНЕНИЯ ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ТКАНИ.....	65
4.1 Численное моделирование параметров диагностирования кожи	65
4.2 Численное моделирование параметров диагностирования мочевого пузыря.....	76
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ВРЕМЕНИ ЖИЗНИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ СООТНОШЕНИЯ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ КОМПОНЕНТОВ В ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ТКАНИ	83
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	89
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	91

ВВЕДЕНИЕ

Современные доклинические и клинические исследования показывают, что применение методов диагностики, основанных на регистрации флуоресцентного излучения, может улучшить раннюю диагностику как рака, так и иных деструктивных процессов различных органов [1-3]. Интенсивно развиваются новые конструкции приборов и аналитические инструменты для анализа получаемой диагностической информации. Однако, по-прежнему требуются значительные улучшения технологии для ее крупномасштабного внедрения в клиническую практику. В частности, должны проводиться исследования факторов, сопутствующих флуоресцентным измерениям, разрабатываться новые устройства и подходы к анализу получаемых результатов [4-7].

В настоящее время проводится множество исследований, направленных на изучение процессов окислительного метаболизма с использованием методов, регистрирующих флуоресценцию различных флуорофоров.

Митохондриальная функция является важным параметром жизнеспособности ткани. По показателям активности дыхательной цепи имеется возможность предсказывать гибель клетки, диагностировать состояние тканевой ишемии, либо напротив, говорить о ее злокачественной активности. Одной из оценок митохондриальной функции является соотношение коферментов NADH и FAD, определяемое по интенсивности их эндогенной флуоресценции. Известно, что одним из последствий нарушения в функционировании клеток при различных патологиях являются изменения в дыхательной цепи митохондрий. При этом наиболее вероятны изменения в накоплении таких коферментов как NADH (восстановленная форма) и FAD (окисленная форма). Выявление таких изменений методами флуоресцентной спектроскопии является одним из многообещающих направлений *in vivo* диагностики.

Одной из первых работ по определению параметров дыхательной цепи в клетках является основополагающая работа [8], посвященная определению митохондриального метаболического статуса ткани *in vitro*. Следует отметить, что исследования В. Chance являются пионерскими в области оценки митохондриальной функции оптическими

методами. В 60-х было установлено, что методы абсорбционной спектроскопии для определения параметров дыхательной цепи по поглощению NADH и NAD⁺ является тупиковой. С этого момента наибольшее распространение получают флуоресцентные методы. Первая работа по *in vivo* определению NADH относится к 1965 году [9].

С недавним развитием новых методов микроскопии и, в первую очередь, флуоресцентной микроскопии (технологии FLIM, FRET), оценка дыхательной цепи *in vitro* вышла на новый уровень, и были получены значительные успехи [10].

Однако определение митохондриальной функции *in vivo* до сих пор является практически не решенной задачей. Несмотря на то, что изучение флуоресценции NADH и FAD успешно проводится на протяжении последних 50 лет, сравнительно мало исследований проводится на органном уровне. Между тем, результаты экспериментов на конкретном органе или участке организма могут быть более успешно экстраполированы на клиническую практику по сравнению с исследованиями на клеточном и субклеточном уровне.

В данном направлении относительное распространение получили исследования в рамках так называемого мультипараметрического подхода. Наиболее яркими работами в данном направлении обладает коллектив А. Mayevsky et al. [11]. Данный подход заключается в использовании нескольких измерительных каналов с целью определения параметров дыхательной цепи (NADH/FAD) на фоне влияющих факторов. Одновременно используя методы флуоресцентной спектроскопии, абсорбционной спектроскопии и лазерной доплеровской флоуметрии в рамках одного эксперимента, данным коллективом были получены убедительные данные по определению митохондриальной функции в тканях мозга. Множество работ в настоящее время направлено на изучение эндогенной флуоресценции миокарда для оценки повреждений, индуцированных ишемией в условиях кардиохирургического вмешательства [12-14].

Однако задача определения параметров дыхательной цепи по соотношению флуоресценции коферментов NADH и FAD в эпителиальных тканях в настоящее время удовлетворительно не решена. Основная проблема, которая может влиять на результаты измерений, это учет влияния вклада в итоговый сигнал различных хромофоров, поглощающих излучение. Несовершенство приборной реализации также тормозит развитие данного метода.

Одним из самых современных подходов в *in vivo* флуоресцентной диагностике является измерение параметров времени жизни флуоресценции в одной точке (с использованием оптико-волоконных пробников), либо в границах некоторой площади (технологии визуализации). Данная техника реализуется главным образом во временной области с использованием дорогостоящих комплектующих, позволяющих проводить измерение оптических импульсов во временном масштабе 0-10 нс с разрешением от 0,1 нс. Другим подходом является реализация измерений в частотной области – оценка постоянной времени релаксации флуоресценции по сдвигу фазы и изменению коэффициента модуляции регистрируемого излучения флуоресценции относительно амплитудно-модулированного возбуждающего излучения. Реализация подобного способа обходится в значительной степени дешевле при сопоставимых возможностях по временному разрешению.

Данная монография посвящена разработке научных основ оценки митохондриальной функции в эпителиальных тканях путем определения времени жизни флуоресценции, используя реализацию измерений в частотной области.

Данная коллективная монография выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 18-15-00201).

ГЛАВА 1

АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ПОДХОДОВ К ИЗУЧЕНИЮ ИНТЕНСИВНОСТИ И ВРЕМЕНИ ЖИЗНИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В ЖИВЫХ ТКАНЯХ

1.1 Физические основы флуоресценции

Флуоресценция – это оптическое явление, происходящее, когда возбужденная молекула – флуорофор – релаксирует в основное состояние S_0 после электронно-возбужденного состояния S_1 , освобождая квант энергии – фотон (рисунок 1.1а).

Этот процесс может быть описан как реакция $S_1 \rightarrow S_0 + E$, в которой энергия фотона E обратно пропорциональна его длине волны λ и равна hc/λ , где h – постоянная Планка, c – скорость света. Так как испускаемый фотон имеет меньшую энергию, чем возбуждающий, длина волны света, излучаемого в виде флуоресценции, всегда больше, чем у возбуждающего света. В растворителях и биологических средах, оба состояния S_1 и S_0 имеют широкие полосы колебательных энергий, отражая взаимодействие молекулы с локальной окружающей средой. Таким образом, спектры возбуждения и излучения имеют характерный для каждого флуорофора вид (рисунок 1.1б). Когда группа флуорофоров возбуждается коротким импульсом света, начальная интенсивность флуоресценции падает со временем в соответствии с кривой, которая, в большинстве случаев, может быть описана некоторой формой экспоненциального затухания (рисунок 1.1в). В простейшем случае этот процесс подчиняется кинетике первого порядка и определяется формулой (1.1):

$$[S_1] = [S_1]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right), \quad (1.1)$$

где $[S_1]$ – концентрация возбужденных молекул в момент времени t ;
 $[S_1]_0$ – их начальная концентрация;
 τ – характеристическое время, проведенное молекулой в возбужденном состоянии.

При отсутствии других процессов девозбуждения, время затухания равно $\tau_F = 1/k_F$, где k_F – скорость флуоресценции, τ_F – радиационное время жизни. Радиационное время жизни является неотъемлемым свойством возбужденного состояния каждого флуорофора, независимо от его концентрации и окружающей среды. Однако в реальных условиях существует целый ряд других процессов девозбуждения (рисунок 1.1а), что приводит к кинетике с характеристическим временем τ меньшим, чем τ_F , так как $\tau = 1/(k_F + k_{NR} + k_{ISC})$, где k_{NR} – сумма скоростей всех нерадиационных процессов, возвращающих флуорофор в основное состояние, k_{ISC} – скорость интеркомбинационной конверсии.

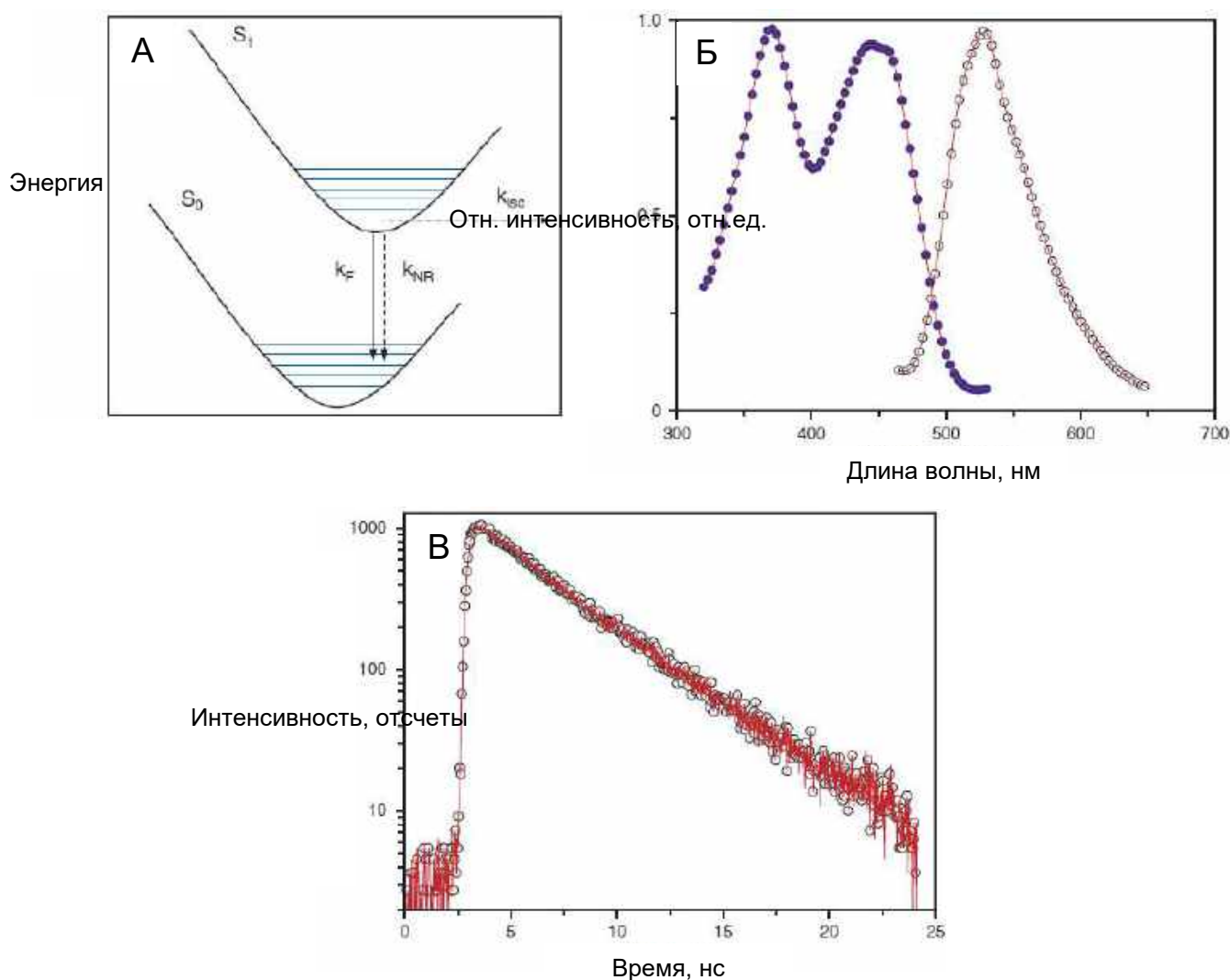


Рисунок 1.1 – Физические основы флуоресценции: (а) – упрощенная диаграмма Яблонского; (б) – спектры возбуждения ($\lambda_{exc} = 450$ нм) и эмиссии ($\lambda_{em} = 525$ нм) FAD в воде при 25 °С, отражающие структуру его электронных уровней и переходов; (в) – время-разрешенное затухание флуоресценции FAD в воде на 525 нм, отражающее кинетику его возбужденного состояния

Параметр τ , находящийся во временном масштабе от долей пикосекунд до микросекунд, называется временем жизни флуоресценции и зависит от множества факторов окружающей среды, например, от температуры, рН, вязкости, концентрации ионов, насыщения крови кислородом и т.д. [15-17].

Время жизни флуоресценции также можно эффективно рассматривать в качестве прямого показателя флуоресцентного резонансного переноса энергии от возбужденного флуорофора (донора) к другим молекулам, находящимся в непосредственной близости (акцепторам). Следовательно, в многокамерных системах, характерных для клеток или тканей, флуоресценция с временным разрешением дает точное представление о реальном состоянии флуоресцирующих молекул и может применяться для исследования внутриклеточной среды.

Спектральные характеристики каждого флуорофора являются уникальными, что обеспечивает их специфическую идентификацию и выделение в сложных биологических образцах. В то же время, характер затухания флуоресценции с временным разрешением дает дополнительные эффективные средства выделения флуорофоров, так как спектрально перекрывающиеся сигналы зачастую могут быть разделены по различному времени жизни флуоресценции [18].

Сочетание флуоресцентной спектроскопии и время-разрешенного детектирования обеспечивает синергетический эффект с большим потенциалом для сбора детальной информации о биохимических, функциональных и структурных изменениях биомолекулярных комплексов непосредственно в живых клетках и тканях. Ряд недавно разработанных комбинированных подходов, представляющих различные сочетания между разрешенными во времени, спектроскопическими системами и системами визуализации, вместе образуют целую линейку экспериментальных технологий в области биомедицинских исследований (рисунок 1.2).

В визуализации и диагностике живых тканей растущий интерес сосредотачивается на их собственной флуоресценции, а не флуоресцентном окрашивании. Данная тенденция тесно связана с последними достижениями в области высокопроизводительных спектроскопических и микроскопических методов [19-22], так как обнаружить собственную флуоресценцию, как правило, гораздо труднее, чем искусственно вводимые флуоресцентные маркеры.



Рисунок 1.2 – Методы флуоресцентного детектирования: FLIM – визуализация времени жизни флуоресценции, TRFS – время-разрешенная флуоресцентная спектроскопия, MSI – многоспектральная визуализация, sFLIM – спектрально-разрешенный FLIM

Собственную флуоресценцию клеток также называют автофлуоресценцией (АФ) в отличие от флуоресцентных сигналов, полученных путем добавления экзогенных меток. Клетки содержат молекулы, которые становятся флуоресцирующими при возбуждении излучением УФ или видимого диапазона с подходящей длиной волны. Большинство клеточной автофлуоресценции происходит от митохондрий и лизосом. В тканях внеклеточный матрикс часто способствует эмиссии автофлуоресценции больше, чем клеточный компонент, поскольку коллаген и эластин имеют среди эндогенных флуорофоров относительно высокий квантовый выход. Изменения, происходящие в состоянии клеток и тканей во время физиологических и / или патологических процессов, приводят к модификации количества и распределения эндогенных флуорофоров и химико-физических свойств их микроокружения.

Наиболее выражено собственно флуоресцирующими веществами в биологических системах являются NADH, флавины, коллаген и эластин, триптофан, тирозин, порфирин, липофусцины и меланин [18]. Обзор параметров данных флуорофоров приводится в таблицах 1.1 и 1.2, в которых дана информация о свойствах возбуждения, испускания, а также времени жизни флуоресценции.

Таблица 1.1 – Параметры флавин- и NADH-связанной собственной флуоресценции. $\langle \tau \rangle$ – время жизни, 2р – 2-х фотонное возбуждение, ↑ – увеличение, ↓ – уменьшение

Флуорофор	Длина волны возбуждения, нм	Длина волны испускания, нм	Время жизни флуоресценции, нс	Тип клетки/ткани	Изменения при патофизиологических состояниях	Ссылка
1	2	3	4	5	6	7
NAD(P)H	446	510-700	0,387 3,65	эндогенные вещества глазного дна		[23]
	340	450-470	0,3 2 (граничная оценка)	кожа		[24]
	765 (2P)		0,438 2,286	структурные компоненты кожи (фибропласты кожи)		[25]
	375	397, широкая полоса испускания	0,62 2,33 13,64	сердце (кардиомиоциты человека)		[26]
	375	397, широкая полоса испускания	0,65 1,98 9,34	сердце (кардиомиоциты крысы)		[26]
	335	440	0,4 1,9 5,7	митохондрии здорового сердца		[27]
	740 (2p)	350-550	0,155 0,599 2,154 6,040 0,948 $\langle \tau \rangle$	мозг (ткань гиппокампа)	↓ $\langle \tau \rangle$ до 0,780 при гипоксии	[28]
	370	420-480	0,58 2,46 9,00 7,23 $\langle \tau \rangle$	3T3-L1 адипоциты и фибробласты	↓ $\langle \tau \rangle$ до 6,73 при высоком уровне глюкозы	[29]
	740 (2p)	полоса испускания 450±40	1,011 $\langle \tau \rangle$	мезенхимальные стволовые клетки человека	↑ $\langle \tau \rangle$ в процессе дифференцировки до 1,165 с на 21-й день	[30]

Продолжение таблицы 1.1

1	2	3	4	5	6	7
	800 (2p)	490, узкая полоса испускания	2,35	эпителиальные клетки (защечные мешки)	↓ $\langle \tau \rangle$ в предраковых тканях: 2,35 нс и 2,25 нс (слабодифференцированная форма предрака) 2.25-2.35 нс и 2.15 нс (высокодифференцированная форма предрака)	[31]
	780 (2p)		0,29 2,03	защечный мешок хомяка <i>in vivo</i>	↓ τ_2 в предраковых тканях: 1,58 нс (слабодифференцированная форма предрака) 1,83 (высокодифференцированная форма предрака)	[32]
	364	435-485	2,51	NET-1 клетки пищевода здорового человека	↓ $\langle \tau \rangle$ в SEG-1 клетках аденокарциномы Баррета: 2,21 нс	[33]
	750 и 790 (2p)	640, узкая полоса испускания	0,5 2,4	культивированные НЕК293Т клетки		[34]
	750 и 790 (2p)	640, узкая полоса испускания	0,45 2,3	гепатоциты		[34]
	750 и 790 (2p)	640, узкая полоса испускания	0,48 2,5	HeLa		[34]
	750 (2p)	полоса испускания 450±40	1,3 $\langle \tau \rangle$	HeLa	↑ $\langle \tau \rangle$ после терапии апоптоза до 3,54 с	[35]
FAD	446	510-700	0,33 2,81	эндогенные вещества глазного дна		[23]
	370 450	530	5.2 1 (граничная оценка)	кожа		[24]

Продолжение таблицы 1.1

1	2	3	4	5	6	7
	438	470, широкая полоса испускания	0,15-0,20 0,46-0,94 1,48-3,67	сердце (кардиомиоциты левого желудочка крысы)		[36]
	890 (2p)		не определялось	грудь (молочная железа мыши, стромальные клетки)	$\uparrow \langle \tau \rangle$ в инвазированных клетках \uparrow в сравнении с первичными клетками опухоли вследствие $\uparrow \tau_1$ и $\uparrow \tau_2$	[37]
	890 2(p)	490, узкая полоса испускания	1,65-1,75 2,05	эпителиальные клетки (защечные мешки)	$\uparrow \tau_1$ и $\downarrow \tau_2$ в предраковых тканях: 1,65-1,75 нс и 1,95 нс (слабодифференцированная форма рака) 1,70-1,75 нс и 1,95 нс (высокодифференцированная форма рака)	[31]

Таблица 1.2 – Параметры флуоресценции других широко распространенных собственных флуорофоров. Символы эквивалентны используемым в таблице 1.1, PPIX – протопорфирин IX

Флуорофор	Длина волны возбуждения, нм	Длина волны испускания, нм	Время жизни флуоресценции, нс	Тип клетки/ткани	Изменения при патологических состояниях	Ссылка
1	2	3	4	5	6	7
Липофусцины						
	446	510-700	0,39 2,24	эндогенные вещества глазного дна		[23]
	УФ/видимый свет	570-590	мультиэкспоненциальное	кожа		[24]
Липофусцин А2Е	446	510-700	0,17 1,12	эндогенные вещества глазного дна		[23]

Продолжение таблицы 1.2

1	2	3	4	5	6	7
A2E, A2PE, A2PE-H2	450-490		не оце- нивалось	глазное дно сви- ньи		[38]
Зерна липофус- цина	450-490	>530	0,71 3,23	органоподобная проточная куль- тура глазного дна свиньи		[38]
AGE (ко- нечные про- дукты гликиро- вания)						
	446	510-700	0,865 4,17	эндогенные веще- ства глазного дна		[23]
Колла- ген						
	300-340	420-460	0,2-0,4 0,4-2,5	кожа		[24]
	890 (2p)		не оце- нивалось	грудь (молочная железа мышцы, стромальные клетки)	↓ $\langle \tau \rangle$ вслед- ствие ↓ τ_2 в опухолевых клетках	[39]
Колла- ген 1	446	510-700	0,67 4,04	эндогенные веще- ства глазного дна		[23]
Колла- ген 2	446	510-700	0,47 3,15	эндогенные веще- ства глазного дна		[23]
Колла- ген 3	446	510-700	0,345 2,80	эндогенные веще- ства глазного дна		[23]
Колла- ген 4	446	510-700	0,74 3,67	эндогенные веще- ства глазного дна		[23]
Эластин						
	446	510-700	0,38 3,59	эндогенные веще- ства глазного дна		[23]
	300-340	420-460	0,2-0,4 0,4-2,5	кожа		[24]
Меланин						
	446	510-700	0,28 2,4	эндогенные веще- ства глазного дна		[23]
	УФ/ви- димый свет	440, 520, 575	0,2 1,9 7,9	кожа		[24]
	(300- 800)			кожа		[40]
	720-930	<700	0,04 и 1,2	ДОФА-меланин		[41]
Кера- тин						
	720-930	<700	1,4	волос человека		[41]

Продолжение таблицы 1.2

1	2	3	4	5	6	7
Порфи-рин, РРІХ						
	410	633	1,76 8,14	нормальная слизи-стая оболочка по-лости рта чело-века	↓ τ_1 и ↑ τ_2 в предраковых поражениях слизистой оболочки по-лости рта: 1,76 и 12,59 (веррукозная (бородавчатая) гиперплазия) 1,65 и 12,97 (эпителиаль-ная гиперпла-зия) 1,43 и 10,66 (эпителиаль-ная дисплазия)	[42]
	425		15	нормальный уро-телей (мочевой пузырь человека)	нет суще-ственных из-менений в карциноме <i>in situ</i>	[43]
	398	LP590	3,6 7,4	эпителиальные клетки крысы при культивировании		[44]

Как уже упоминалось выше, излучение флуоресценции тканей можно охарактеризовать спектральным распределением, временем жизни флуоресценции или пространственно-разрешенной интенсивностью их эндогенных флуорофоров (рисунки 1.3 и 1.4). Так как излучение флуоресценции обычно происходит от нескольких видов молекул, АФ ткани зависит от многих факторов, отражающих сложность биологических систем. Следовательно, запись изменений в параметрах флуоресценции дает более полное описание биохимического состава и основного патофизиологического процесса в ткани в клинических условиях [45, 46]. Применительно к собственной клеточной флуоресценции, неинвазивные мультимодальные методы оптического детектирования в сочетании со сложным анализом цифровых данных могут значительно расширить знания об изменениях, наблюдаемых тканях. Это особенно важно в отношении ферментов и флуорофоров, участвующих в метаболизме эпителиальных тканей.

Таким образом, измерение спектров флуоресценции вместе с временем жизни флуоресценции может служить для разграничения специфических типов клеток в тканях или органах, а также для выявления изменений при патологических процессах. Все больше исследований направлены на обнаружение корреляции между временем жизни или спектром флуоресценции эндогенных флуорофоров и биологическими патологиями. Кроме того, раннее выявление, диагностика и мониторинг патологических состояний с помощью флуоресцентной спектроскопии может привести к более эффективному лечению критически важных заболеваний.

1.2 Спектрально-разрешенное время жизни флуоресценции: обнаружение и анализ

1.2.1 Флуоресцентная спектроскопия с временным разрешением

Методы флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением для пико- и наносекундных временных диапазонов работают либо в частотной области путем записи фазы и амплитуды сигнала флуоресценции в зависимости от частоты источника света возбуждения, либо во временной области с использованием возбуждения короткими световыми импульсами и обнаружением изменения интенсивности флуоресценции во времени [47]. Последнее, как правило, реализуется в каком-либо варианте прямого аналогового обнаружения (например, фотохронограмме), временной селекции (например, за счет ПЗС с усилением) или счета фотонов. Все эти подходы имеют свои преимущества и недостатки. Часто считается, что с помощью методов в частотной области можно достичь более короткое время сбора данных, в то время как методы во временной области обеспечивают более высокую точность за счет длительного сбора данных. Однако корректное сравнение обоих подходов должно включать в себя ряд технических параметров и практических соображений, так как с помощью данных методов рассматривается множество специфических областей, предъявляющих самые разнообразные требования.

Одним из наиболее распространенных и универсальных методов анализа времени жизни флуоресценции во временной области является TCSPC, основанный на возбуждении образца под воздействием лазерного излучения с высокой частотой повторения импульсов и обнаружении времени прибытия одиночных фотонов флуоресценции с построением гистограмм, изображающих вероятность обнаружения фотона как функцию времени (рисунок 1.1в, [48]).

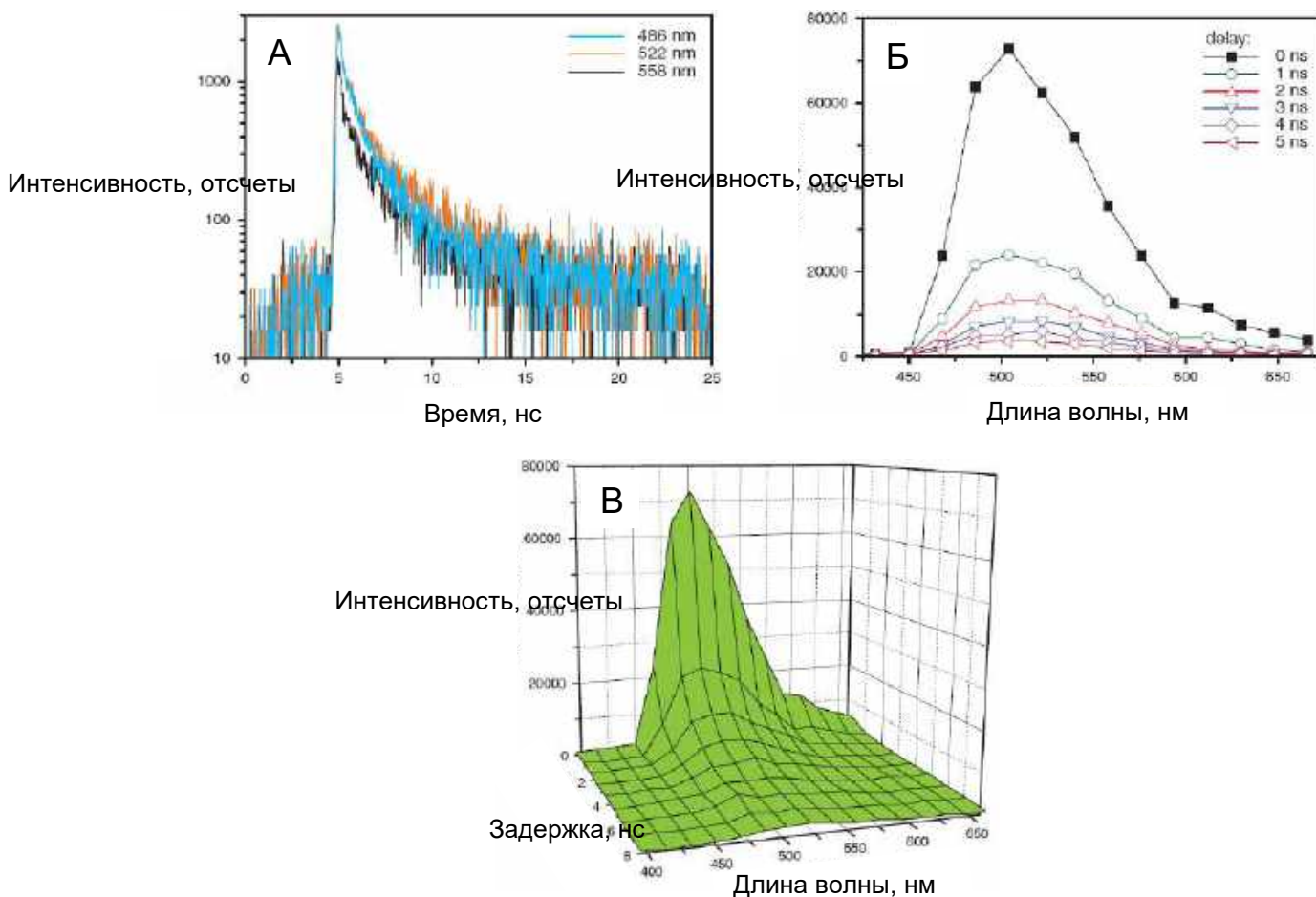


Рисунок 1.3 – Пример время-разрешенных спектров АФ флавина при возбуждении пикосекундным лазерным диодом на 438 нм: (а) – данные, рассматриваемые с точки зрения многоволнового затухания флуоресценции; (б) – те же данные с точки зрения зависящих от времени спектров; (в) – график, показывающий комплексное 3-х мерное представление данных

С новейшим TCSPC оборудованием [49], обеспечивающим режим мультidetектирования и имеющим свободную структуру адресной памяти, легко расширить оригинальную концепцию TCSPC с целью одновременного детектирования на нескольких излучающих спектральных каналах [19, 49, 50]. Наряду с новой размерностью(ями), добавленной к временным координатам, дополнительное преимущество мультиспектрального подхода заключается в увеличении скорости счета, достигающегося за счет многоканальных TCSPC-устройств, поскольку гистограммы затухания флуоресценции на каналах всех длин волн строятся одновременно. Этот тип записи имеет большое значение при многократном измерении, дублируя слабые флуоресцентные сигналы, такие как эндогенная флуоресценция тканей. Исходя из этих характеристик, многоволновый метод TCSPC является ключевой технологией исследования клеточной АФ для лучшего понимания метаболических окислительных изменений [36].

В типичном мультиспектральном TCSPC эксперименте собирают гистограммы счета фотонов спектрально-разрешенного затухания АФ, аналогично тому, как показано на рисунке 1.3 [36].

Гистограмма интенсивности I измеряется одновременно на нескольких спектральных каналах, обозначенных как λ_j в течение временного интервала t_k . Наличие мультианодных фотоумножителей приводит к типичному числу (16) спектральных каналов λ_j . Следуя упрощенной концепции динамики возбужденного состояния, анализ затухания флуоресценции, как правило, включает в себя сочетание независимых кинетик затухания первого порядка (сумма дискретных экспоненциальных затуханий). Затухание клеточной АФ, обычно представляющееся суммой от 1 до 4 экспоненциальных компонент, в соответствии с функциональной формой модели может быть описано уравнением (1.2):

$$I(\lambda_j, t) = I_{baseline} + \sum_{i=1}^{1...4} a_{i,j} \exp\left(-\frac{t-t_0}{\tau_{i,j}}\right) \quad (1.2)$$

где t_0 – переменный начальный сдвиг времени;

$I_{baseline}$ – интенсивность фона;

(a_i) – относительная заселенность молекул, ассоциированных с каждым компонентом затухания i .

Таким образом, каждый компонент времени жизни оценивается путем изучения времени жизни его флуоресценции (τ_i) и относительной амплитуды (a_i).

Уровень статистической точности в эксперименте обычно задается числом отсчетов в каждом канале, как результатов подсчета одиночных фотонов в кривых шума со статистикой Пуассона и дисперсией $\sigma = \sqrt{N}$, где N – число обнаруженных фотонов в отдельно взятом канале. Аналогичные правила применяются к обнаружению по спектральной координате. На основании этой статистики, данные TCSPC обычно анализируют с помощью метода наименьших квадратов [51]. С использованием коротких импульсов и быстродействующей электроники можно получить изначальное пикосекундное разрешение времени жизни, однако измерение коротких времен жизни часто оказывается ограниченным из-за эффектов свертки. Если импульсный отклик электрооптической системы известен, временное разрешение может быть дополнительно улучшено с использованием численных итеративных процедур обратной свертки.

1.2.2 Анализ данных АФ с временным разрешением

Затухание автофлуоресценции, зарегистрированное в клетках и тканях, как правило, оказывается мультиэкспоненциальным, зачастую из-за наличия нескольких флуорофоров, однако в основе данного процесса могут лежать и другие явления. Кинетика затухания флуоресценции может отражать несколько динамически меняющихся структур и/или различных сред, в которых находятся молекулы флуорофоров, особенно во время контакта с биологическими мембранами [52].

Другим важным явлением, которое следует принимать во внимание при создании корректной физической модели для данного флуорофора, является флуоресцентный резонансный перенос энергии (FRET) [53]. В этих случаях может быть применен анализ, основанный на модели распределения времени жизни. Данный анализ разработан для случаев, в которых не представляется возможным ассоциировать образец с определенным набором единичных экспоненциальных компонентов. Одна из популярных реализаций этого метода использует алгоритм максимальной энтропии [54], предоставляющий ценную информацию даже для очень сложных затуханий без априорных предположений кинетики их флуоресценции.

В системах с множеством флуорофоров или со сложными затуханиями, данные, записанные на нескольких длинах волн, могут помочь в установлении физически значимых компонентов затухания. Спектральные координаты могут быть обработаны для создания набора так называемых спектров затухания (Direct absorption spectroscopy – DAS), соответствующих индивидуально-разрешенным временам жизни. DAS, как правило, оценивается методом глобального анализа [55, 56]. С выбранными параметрами, например, специфическими временами жизни, связано несколько кривых затухания, соответствующих различным спектральным каналам; различные относительные амплитуды оцениваются для каждой длины волны и строятся на графике как спектральный профиль соответствующего компонента времени жизни. Недостатками являются относительно высокие время вычисления и ресурсы, необходимые для проведения такой оценки.

Одним из наиболее важных вопросов при анализе данных флуоресценции с временным разрешением является обеспечение физического смысла извлекаемых параметров. Это особенно важно, когда ле-

жащая в основе физика затухания неизвестна, так как существует множество решений, одинаково хорошо удовлетворяющих данным [57], поэтому успешная численная подгонка не доказывает саму модель. Корректная, физически релевантная модель кинетики возбужденного состояния должна быть выбрана, исходя из общих знаний об исследуемой системе, а также из различных статистических свойств остатков [51].

Был разработан метод анализа многоволновых TCSPC записей [58, 59], основанный на последовательном спектральном разделении [60] и применяемый в тех случаях, когда точная спектральная форма затухания флуорофора известна в каждый момент времени. Такой ряд убывающих по времени последовательных спектральных профилей называется спектром излучения с временным разрешением (TRES). TRES последовательность легко вычислить на основе исходных многоволновых записей TCSPC путем суммирования данных в нескольких последовательных временных окнах. Пример построения TRES графика затухания АФ фламина с временным разрешением 1 нс представлен на рисунке 1.3б [36]. Как правило, для правильной интерпретации TRES спектров необходима, по крайней мере, концептуальная математическая модель. Если физические явления, лежащие в основе затухания флуоресценции, неизвестны, необходимо сначала оценить, сколько компонентов присутствует в образце, а затем проанализировать, какая модель лучше всего описывает кинетику флуоресценции. Для решения первой части этого вопроса Koti с соавторами [61] разработали метод нормализованной по площади время-разрешенной эмиссионной спектроскопии (TRANES), который позволяет проанализировать данные затухания флуоресценции без априорной информации о кинетике возбужденного состояния. В TRANES подходе измеренные спектрально-разрешенные затухания флуоресценции подвергаются процедуре обратной свертки и строится поверхность равноудаленных по времени и нормализованных по площади спектров обратно свернутого затухания. Присутствие равноизлучающих точек в графиках с временной задержкой указывает на существование нескольких испускающих компонентов в образце [61] при условии, что их времена жизни флуоресценции и спектры излучения в достаточной степени отличаются по выбранной шкале времени.

После того, как известно число независимых спектральных компонент, анализ может продолжиться созданием базы данных эталон-

ных спектров. Это относительно легко реализуемая процедура для экзогенных флуоресцентных меток, для которых эталонные спектры можно измерить по отдельности для каждого флуорофора в образце [62] при условии, что они не изменяются в смеси из нескольких флуорофоров. Однако в случае клеточной АФ непросто и порой не представляется возможным биохимически изолировать различные нативные формы ферментов и коферментов, таких как флавинадениннуклеотид (FAD) и/или никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NAD(P)H). Сведения о базе данных эталонных спектров должны быть получены непосредственно из исследуемой системы. Для этой цели используют матрицу метаболической модуляции [58], подразумевающую естественные изменения в спектрах АФ от модуляторов митохондриального метаболизма и дыхания, в сочетании с методом главных компонент (РСА) для определения отдельных компонентов АФ. При таком подходе в образец вводятся различные модуляторы изучаемого явления с целью получения различных вариаций сложных спектров. РСА служит для идентификации наибольших спектральных изменений в данных, тогда как метод сингулярного разложения [63] применяется для расчета наиболее вероятных позиций компонента (спектральных максимумов).

С помощью набора эталонных спектров мультиспектральное множество данных TCSPC может быть разделено на отдельные компоненты с помощью техники линейного спектрального разделения [64, 65] с оценкой вклада всех эталонных компонентов в каждый момент времени затухания флуоресценции. Разделенные таким образом данные могут быть дополнительно обработаны с помощью соответствующих методов экспоненциального анализа.

1.2.3 Спектрально-разрешенная визуализация и визуализация времени жизни флуоресценции

С момента своего появления, FLIM [66] и флуоресцентная микроскопия с мультиспектральным детектированием [65] привлекали значительный интерес, и в настоящее время данные методы реализуются в самых разнообразных приборных решениях. В области микроскопии визуализации времени жизни ключевым вопросом является получение удовлетворительного контраста изображения при условии различий во времени жизни флуоресценции, которое для большинства

флуорофоров находится в диапазоне от пикосекунд до наносекунд. Последние разработки в области флуоресцентных технологий, особенно сочетание спектроскопии, время-разрешенных методов и методов визуализации в sFLIM, предоставили новые экспериментальные возможности для неинвазивного исследования биологических образцов. sFLIM позволяет пространственно установить различия во временах жизни флуоресценции и в спектрах исследованных образцов (рисунок 1.4а), а, следовательно, может быть использован для сбора детальной информации о молекулярном окружении флуорофора.

Функционально в основе визуализации времени жизни флуоресценции тканей может лежать широкоугольная оптическая система, оборудованная камерой с временной селекцией и обеспечивающая субнаносекундное разрешение [45], как это было показано, например, для визуализации изменений окисления-восстановления NADH [67] или для FLIM-визуализации АФ ткани в режиме реального времени [68]. Большое разнообразие установок FLIM на основе подходов в частотной и временной областях предложено для решения многочисленных проблем, связанных с исследованием локальных сред флуорофоров, молекулярных взаимодействий, FRET и т.д. [69-72]. В настоящее время данный подход интересен с точки зрения клинических применений (рисунок 1.4б).

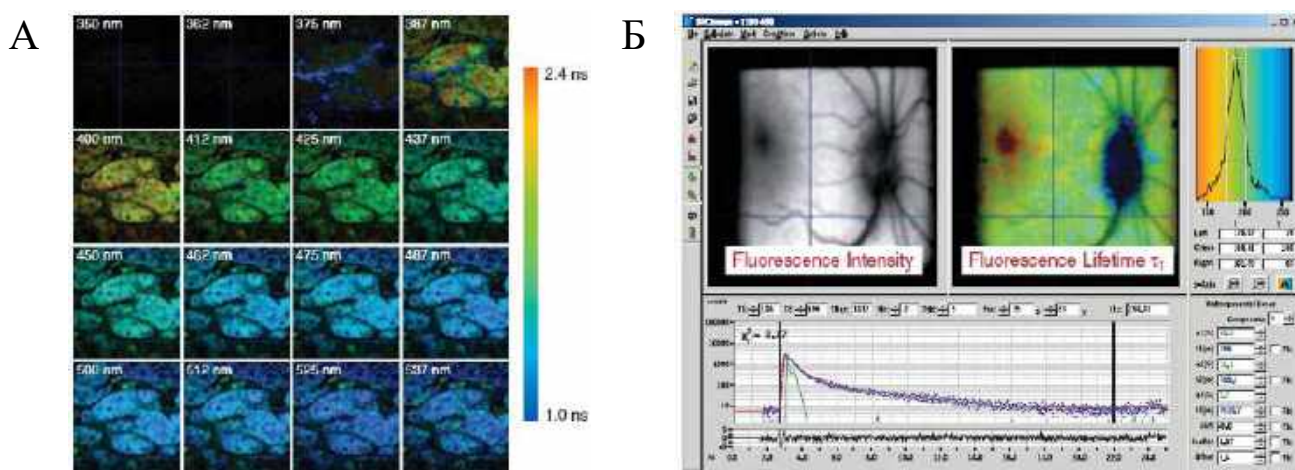


Рисунок 1.4 – Примеры эндогенной флуоресценции биотканей, исследованной различными методами обнаружения времени жизни флуоресценции:

- (а) – многоспектральное sFLIM изображений с использованием 2-х фотонного возбуждения на 750 нм; (б) – изображение времени жизни автофлуоресценции (FLIM) глазного дна человека *in vivo*, зарегистрированное с использованием возбуждения на 468 нм

Так как новые технологические решения, такие как программируемые многоканальные оптико-электронные приборы для контроля и детектирования освещенности или перестраиваемые импульсные лазеры, стали широко доступными, одновременное измерение спектров флуоресценции и времени жизни флуоресценции существенно упростилось. Записи sFLIM, полученные с применением методов электронно-оптического преобразования с временной селекцией и преобразования Адамара в частотной области, были выполнены Q.S. Hanley и др. [73]. Обнаружение и идентификация одиночных молекул в живых клетках с использованием sFLIM микроскопии наглядно продемонстрировали J.-P. Kne Meyer и др. [74, 75]. sFLIM также успешно применялся для оценки АФ со специфичностью, более высокой чем при обычной конфокальной микроскопии, с учетом разделения различных природных и/или экзогенных флуорофоров [75].

Так как новые технологические решения, такие как программируемые многоканальные оптико-электронные приборы для контроля и детектирования освещенности или перестраиваемые импульсные лазеры, стали широко доступными, одновременное измерение спектров флуоресценции и времени жизни флуоресценции существенно упростилось. Записи sFLIM, полученные с применением методов электронно-оптического преобразования с временной селекцией и преобразования Адамара в частотной области, были выполнены Q.S. Hanley и др. [73]. Обнаружение и идентификация одиночных молекул в живых клетках с использованием sFLIM микроскопии наглядно продемонстрировали J.-P. Kne Meyer и др. [74, 75]. sFLIM также успешно применялся для оценки АФ со специфичностью, более высокой чем при обычной конфокальной микроскопии, с учетом разделения различных природных и/или экзогенных флуорофоров [75].

Измерение клеточной АФ с помощью оптических методов не лишено артефактов. Например, из-за высокого потока возбуждения, необходимого для наблюдения относительно слабого сигнала, флуоресценция флавина подвергается фотобликингу как *in vitro* [76], так и *in vivo* [77]. Это явление может выборочно подавлять некоторые компоненты АФ и влиять на количественные результаты. Поэтому следует избегать излишней экспозиции тканей и клеток (особенно УФ-излучением). С развитием фемтосекундных лазерных источников, УФ возбуждение в микроскопии стало возможно заменить 2-х фотонной микроскопией [20], которая предоставляет целый ряд преимуществ, осо-

бенно для клинических исследований, обеспечивая меньшее повреждение и лучшее проникновение в ткань. FLIM, использующий TCSPC, является логичным вариантом совершенствования 2-х фотонной микроскопии и позволяет исследовать не только интенсивность флуоресценции, но и реальное микроокружение флуорофора внутри точно заданных 3D объемов в пределах образца. Измерения изотропии (однородности) флуоресценции также использовались для визуализации живых клеток [21, 78] и были предложены для выявления различий между молекулами, такими как NADH в связанном и свободном состояниях [28, 79].

Таким образом, объединяя несколько методов детектирования флуоресценции, становится технически возможным собрать полную картину флуоресценции, обнаруженной в строго определенном объеме биологического образца.

Тем не менее, анализ данных по-прежнему остается трудной научной задачей также при расшифровке сигналов автофлуоресценции, записанных с помощью sFLIM, то есть обнаружения времени жизни флуоресценции в сочетании с визуализацией. Качественный анализ отдельных флуорофоров в спектрально-разрешенном многокомпонентном изображении был подробно оценен P. Neher и E. Neher [80]. Метод спектрального разделения, разработанный для TCSPC и время-разрешенной спектроскопии в частотной области, может служить в качестве дополнения к другим методам многомерного анализа данных затухания флуоресценции. В sFLIM повышенные вычислительные потребности отражаются в различных алгоритмах, упрощающих первоначальную концепцию итеративного анализа моделей многоэкспоненциального затухания на основе метода наименьших квадратов, и использующих, например, неитеративные биэкспоненциальные расчеты на основе модифицированного метода Прони [25] или растянутой экспоненциальной функции, представляющей распределение флуоресценции [81]. Другой непараметрический способ оценки флуоресцентного излучения, сочетающий размерности времени и длины волны, был предложен O.V. Ivanova и др. [82], где линейная комбинация дискретных функций Лагерра моделировала отклик флуоресценции во времени.

1.3 Исследование спектрально-разрешенного времени жизни флуоресценции эндогенных флуорофоров

1.3.1 Эндогенные флуорофоры эпителиальных тканей

С помощью спектрально-разрешенной диагностики времени жизни флуоресценции возможно выявлять наличие нескольких групп эндогенных флуорофоров, например, аминокислот (триптофан, тирозин), структурных белков, таких как эластин и коллаген, или кофакторов ферментов, на основании сниженных NADH и NADPH или окисленных флавопротеинов (FAD, FMN) [18]. Наряду со специфическим спектрами возбуждения и излучения, различные времена жизни флуоресценции могут быть связаны с различными соединениями или их формами. По NAD(P)H и флавионам (таблица 1.1), можно выявлять высоко энергетически активные клетки и отмечать клетки с повышенной метаболической активностью, например, при сердечно-сосудистых заболеваниях или опухолях.

Доминирующий эндогенный флуорофор кожи – меланин (таблица 1.2) – является естественной защитой от солнца с широким спектром поглощения от ближней инфракрасной области спектра на 800 нм до УФ менее 300 нм [40]. Эта важная спектроскопическая особенность представляет собой серьезное препятствие для оптического обнаружения и спектрального выделения других метаболитов в теле, особенно при исследовании АФ через кожу. Основанные на времени жизни флуоресценции новые экспериментальные подходы к обнаружению меланина дают возможность лучшего выделения сигнала от других флуорофоров в некоторых видах тканей [23]. Селективное возбуждение меланина [83] упрощается за счет FLIM и может служить для различения меланина заполняющего меланомы. Эндогенный меланин и кератин, идентифицированные с помощью FLIM, также направлены на анализ различных флуоресцентных компонентов [41], а именно, пигментов внутри ткани.

Коллаген и эластин являются двумя другими флуорофорами, найденными во внеклеточном матриксе (ВКМ) и модифицирующимися в патологических условиях (например, при раке). В коже человека компоненты ВКМ, как и волокна эластина, можно отличить от коллагена [84] с помощью идентификации по спектрально-разре-

шенному времени жизни. Содержание коллагена и эластина уменьшается в опухолях, что приводит к лучшему выделению раковой ткани [39].

Другими сильно флуоресцирующими веществами практически во всех живых клетках являются липофусцины. Смесь соединений, полученная из липидов и посттрансляционной модификации белка хранится в лизосомальных клеточных компартментах. Увеличение АФ липофусцинов проявляется при патологических состояниях, возникающих, например, при возрастных изменениях [23, 85, 86].

Конечные продукты гликирования (Advanced Glycation End Products – AGE) являются еще одним источником эндогенной флуоресценции в тканях. Эти конечные продукты сложных химических реакций между сахарами, белками, липидами и нуклеиновыми кислотами [87] естественным образом накапливаются при определенных условиях, в том числе при старении и диабете. Образование AGE часто включает структурные изменения в белках, таких как коллаген. Флуоресценция некоторых AGE, например, пентозидина, хорошо изучена [88]. АФ, связанная с AGE, была описана в коже [24, 89].

Одними из доминирующих автофлуоресцирующих веществ в красной области спектра являются порфирины, точнее, образованный из σ -аминолевулиновой кислоты (ALA) протопорфирин IX (PPIX), полученный в клетках в процессе синтеза гема [90, 91]. Корреляция между митохондриальным и природно-встречающимся в клетках PPIX указывает на то, что изначальным местом PPIX в клетке являются митохондрии [92]. В присутствии избытка ALA, наблюдаемого при раке, в клетках накапливается значительное флуоресцентно детектируемое количество PPIX, обеспечивающее приемлемую для фотодинамической терапии светочувствительность и/или возможность использования PPIX как флуоресцентного маркера для визуализации.

1.3.2 Методы оценки митохондриальной функции эпителиальных тканей

Известно, что синяя АФ коррелирует с метаболическими изменениями и приписывается митохондриальному NAD(P)H [93-101], в то время как желтая/зеленая флуоресценция соотносится с окисленными флавопротеинами дыхательных комплексов [97, 99-103] после возбуждения ультрафиолетовым или видимым светом соответственно.

NADH сильно флуоресцирует в восстановленной форме и теряет флуоресценцию при окислении. В противоположность этому, флавины флуоресцируют в окисленной форме и теряют флуоресценцию при восстановлении.

Первоначальные исследования Chance [94, 104] показали, что различия в парциальном давлении кислорода могут быть определены путем измерения изменений в АФ окислительно-восстановительных пар коферментов (окисленного и восстановленного NAD-NADH, а также окисленного и восстановленного FAD-FADH₂). Эти окислительно-восстановительные пары выступают в качестве электронных носителей при окислительном фосфорилировании в митохондриях. В этой связи NADH и флавины широко используются для оценки параметров клеточной энергии и метаболизма тканей [105].

Цикл окислительного фосфорилирования является перспективным с позиций анализа метаболических изменений, поскольку в процессе разрушается или образуется несколько ключевых биомолекул, таких как NAD(P)H, FADH₂, кислород и аденозин-трифосфат (АТФ) [106, 107]. Цикл является конечной точкой образования АТФ за счет источников энергии, например, глюкозы и жирных кислот, которые первоначально метаболизируются в цитоплазме.

NADPH является еще одной внутренне флуоресцирующей молекулой, находящейся в клетках и тканях. При этом концентрация восстановленного NADH в клетках в 5 раз больше, чем у NADPH [108]. Кроме того, в митохондриях NADH был описан как средство повышения относительного квантового выхода с коэффициентом от 1,25 до 2,5 [109], подразумевающее, что вклад NADPH оценивается для выражения небольшой части флуоресценции NAD(P)H. В то же время, NADPH является кофактором ферментов, некоторые из которых участвуют в антиокислительных процессах для противодействия генерации активных форм кислорода [110]. NADPH является важным кофактором нескольких ферментов в различных метаболических путях (пентозофосфатном пути, цикле Кребса) и имеет важное значение для антиокислительных процессов в реакциях глутатионредуктазы. Этот фермент способствует рециркуляции глутатиона путем превращения его окисленной формы в восстановленный глутатион. Оксидативный стресс может модулировать клеточное содержание NADPH за счет выделения пероксидов и различных побочных продуктов, что было доказано уменьшением активности некоторых ферментов, таких как

NADP-изоцитратдегидрогеназа. Поэтому вклад NADPH может значительно увеличиваться при патологических состояниях, отражающихся значительным ростом оксидативного стресса.

Некоторые исследователи предполагают, что если кофакторы NADH и NADPH используются в качестве сигнальных медиаторов, то клеточный метаболический редокс-статус может быть непосредственно получен из соотношения между относительной концентрацией свободных NAD(P)H и NAD(P)H, вовлеченных в обменные процессы [80, 111]. Это привело к разработке методов, стремящихся точно измерить изменения их соотношения с использованием времен жизни флуоресценции. Время-разрешенная флуоресценция свободного NADH была относительно хорошо изучена *in vitro* [112-114], где для подгонки затухания обычно используются две экспоненциальные модели. Белковосвязанный NADH был описан как имеющий более длительное время жизни [114, 115]. В связи с этим, некоторые авторы предлагают использовать короткое время жизни (0,4 нс) эндогенной флуоресценции NAD(P)H в качестве индикатора «свободных» NAD(P)H молекул в клетках и тканях, в то время как более длительное время жизни (~2 нс) может относиться к «связанным» молекулам [25, 111, 116-118]. Этот подход основан на предположении о моноэкспоненциальном затухании NADH в растворах. Тем не менее, другие авторы показали, как минимум, биэкспоненциальный характер затухания флуоресценции NAD(P)H в чистых растворах [112, 119], указывая на то, что сопоставление одной экспоненциальной компоненты со свободным, а другой компоненты со связанным молекулярным состоянием NADH является, скорее всего, неприемлемым.

Некоторые исследователи отдают предпочтение соотношению NADH/FAD для оценки редокс-статуса, основываясь на предположении, что *in vitro* белковосвязанное состояние NADH имеет более продолжительное время жизни [114, 115], в то время как FAD характеризуется меньшим временем жизни [120]. Поэтому данное свойство было предложено в качестве способа разделения изменений метаболического статуса [15, 121].

Включение анизотропии флуоресценции в качестве дополнительного параметра в спектральных характеристиках и характеристиках времени жизни было предложено для совершенствования установления различий между NADH в связанном и свободном состояниях [28]. Показано, что связанный с белками NADH приводит к значительному увеличению времени затухания анизотропии флуоресценции [79], что

отражает большую разницу между размерами свободной молекулы NADH и размерами связывающего фермента. Эта особенность позволяет различать связанные и свободные состояния NADH в живых митохондриях с более высокой по сравнению с любым предыдущим методом специфичностью.

1.4 Практическое применение спектрально-разрешенной диагностики времени жизни флуоресценции

С учетом сложного характера устройства клетки, изменения метаболической функции почти всегда проявляются как ухудшение состояния здоровья на анатомическом уровне. При раке изменения метаболической функции сопровождаются анатомическими изменениями в раковых клетках. Микроокружение опухоли состоит из белков внеклеточного матрикса, в первую очередь, коллагена, а также широкого спектра ассоциированных с опухолью клеток, включающих фибробласты, макрофаги, гранулоциты и сосудистую сеть. Эти компоненты играют определенную роль в поддержании роста опухоли и, прежде всего, начальных стадий метастазирования; следовательно, требуется детальное понимание изменений в этой многоклеточной среде, и время-разрешенные измерения помогают идентифицировать подобные злокачественные инвазии [118]. Нормальные, предзлокачественные и злокачественные ткани содержат различные количества эндогенных флуорофоров, что может регистрироваться с помощью АФ спектроскопии. Предполагается, что на разных стадиях канцерогенеза клетки могут также обладать различными локальными средами, демонстрируя тем самым разные времена жизни флуоресценции. Таким образом, время-разрешенная оптическая визуализация проводится с целью обнаружения измененных метаболических функций в раковых клетках и клеточных линиях [33-35]. Различия во временах жизни флуоресценции между нормальной и раковой тканями с тех пор были описаны *in vivo* и *ex vivo*, в том числе в полости рта [42, 122] и пищеводе [123, 124].

Цикл окислительного фосфорилирования часто является привлекательным с точки зрения анализа [33] основных биомолекул, таких как NAD(P)H, флавопротеины, кислород, а также потребления/образования АТФ. Видоизмененные метаболические функции наблюдались с помощью время-разрешенной оптической визуализации в процессе дифференцировки стволовых клеток человека, где было обнаружено,

что среднее время жизни флуоресценции NAD(P)H увеличивается [30], так же как и в моделях живых раковых клеток человека. Данный подход применялся при визуализации метаболической активности в культивируемых клетках, включающих гепатоциты [34], остеосаркомы [35] и клетки HeLa [34, 35]. В [33] рассмотрены изменения эндогенной флуоресценции, происходящие во время прогрессирования рака пищевода, с использованием подхода время-разрешенной оптической молекулярной визуализации. Наличие уровня флуоресценции NAD(P)H в эпителиальных тканях человека *in vivo* явилось доказательством того, что NAD(P)H может быть использован в качестве количественного флуоресцентного биомаркера для выявления дисплазии пищевода *in vivo*. При сравнении клеток аденокарциномы Баррета с нормальными живыми клетками пищевода человека, с помощью FLIM были обнаружены более высокие уровни внутриклеточного кислорода и NADH, что объясняется измененными метаболическими путями в злокачественных клетках [33]. Метод визуализации изменений метаболического редокс-отношения, основанный на оценке времени жизни флуоресценции восстановленного NADH и окисленного FAD, испытывался на предраковых эпителиальных тканях [31, 32]. Обнаружено, что по сравнению с нормальными эпителиальными клетками предраковые клетки являлись причиной измененных вкладов флуоресценции NADH. В бронхиальных эпителиальных клетках наблюдалась ослабление АФ канцерогенно преобразованных клеток, что, предположительно, может быть результатом изменения степени окисления флуорофора [125].

Многофотонная микроскопия и спектрально-разрешенное детектирование времени жизни также служат мощным инструментом для оценки инвазионной способности опухолевых клеток, поскольку было обнаружено, что увеличение стромального коллагена значительно усугубляет образование опухоли и приводит к более выраженному инвазивному фенотипу [37]. Более высокая плотность коллагена усиливает онкогенез, местную инвазию и метастазирование, попутно связывая повышение стромального коллагена с формированием и прогрессированием опухоли. Также было показано, что FAD может рассматриваться в качестве метаболической характеристики раковых заболеваний с повышенной интенсивностью и временем жизни флуоресценции, связанной с поступлением метастатических клеток.

FLIM также применялся при исследованиях различий между базальноклеточной карциномой, наиболее распространенной формой

рака во всем мире, и окружающей здоровой незатронутой кожей [126] в биопсиях человека. Показано значительное снижение средних времен жизни флуоресценции между областями карцином и окружающей незатронутой кожей, в то время как никаких существенных изменений в интенсивности АФ в этих областях не наблюдалось.

Возбужденные эндогенные флуорофоры в клетках могут быть обусловлены различными гистотипами опухолей с собственными особенностями времен жизни флуоресценции для различных типов клеток [127]. Технология измерения затухания флуоресценции способна обеспечить неинвазивное оптическое обследование ткани, которое потенциально может применяться для интраоперационных процедур, таких как обнаружение остаточной ткани опухоли.

Раннее выявление, диагностика и мониторинг патологических состояний с помощью флуоресцентной спектроскопии в сочетании с измерениями времени жизни флуоресценции тканей может привести к более эффективному лечению таких опасных заболеваний как рак. Идентификация оптически различимых механизмов, которые последовательно проявляются при злокачественном процессе, может оказаться весьма полезной не только для дальнейшего развития терапевтических мишеней, но также для понимания патогенеза заболевания и разработки минимально инвазивных оптических технологий для его раннего выявления.

1.5 Перспективы исследования интенсивности и времени жизни флуоресценции в биотканях

Многочисленные заболевания связаны с изменениями в ткани и клеточной структуре и/или метаболическом статуса митохондрий, отражающимися в изменении их оптических свойств. Таким образом, это имеет весьма важное значение для разработки соответствующих экспериментальных инструментов для исследования данных явлений. Одним из наиболее перспективных подходов к достижению заданной цели является использование естественной флуоресценции клеток и тканей, наблюдаемой без добавления флуоресцентных маркеров, которые могут влиять на отдельно взятые нормально функционирующие клетки. Современные достижения в области флуоресцентной визуализации в сочетании со спектроскопией и время-разрешенным детектированием дают возможность проведения быстрых и воспроизводимых измерений с последующим разделением сложных смесей эндогенных

флуорофоров непосредственно в живых тканях. Таким образом, анализ спектрально-разрешенного времени жизни эндогенной флуоресценции способствует лучшему распознаванию, дискриминации и диагностике биологически активных тканей и их патологических изменений, включая структурную дискриминацию анатомических особенностей клеточной морфологии и изменения метаболического статуса при различных патологических состояниях. В дальнейшем, для лучшей интерпретации многомерных массивов данных автофлуоресценции необходимы новые усовершенствованные методы анализа сигналов. С инструментальной точки зрения мультимодальная визуализация, сочетающая спектрально-разрешенное обнаружение времени жизни с другими технологиями визуализации, открывает новые возможности *in vivo* диагностики тканей в режиме реального времени и без применения маркеров.

ГЛАВА 2

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА РЕГИСТРИРУЕМЫЕ СИГНАЛЫ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

В приборной реализации оценки митохондриальной функции в эпителиальных тканях методом флуоресцентной диагностики *in vivo* (структурная схема представлена на рисунке 2.1) излучение с длиной волны λ мощностью $P_{\text{изл}}(\lambda)$ от одного из источников излучения (365 нм, 470 нм, 532 нм или белого света) доставляется посредством оптической системы освещения в виде волоконного жгута к обследуемой биологической ткани.

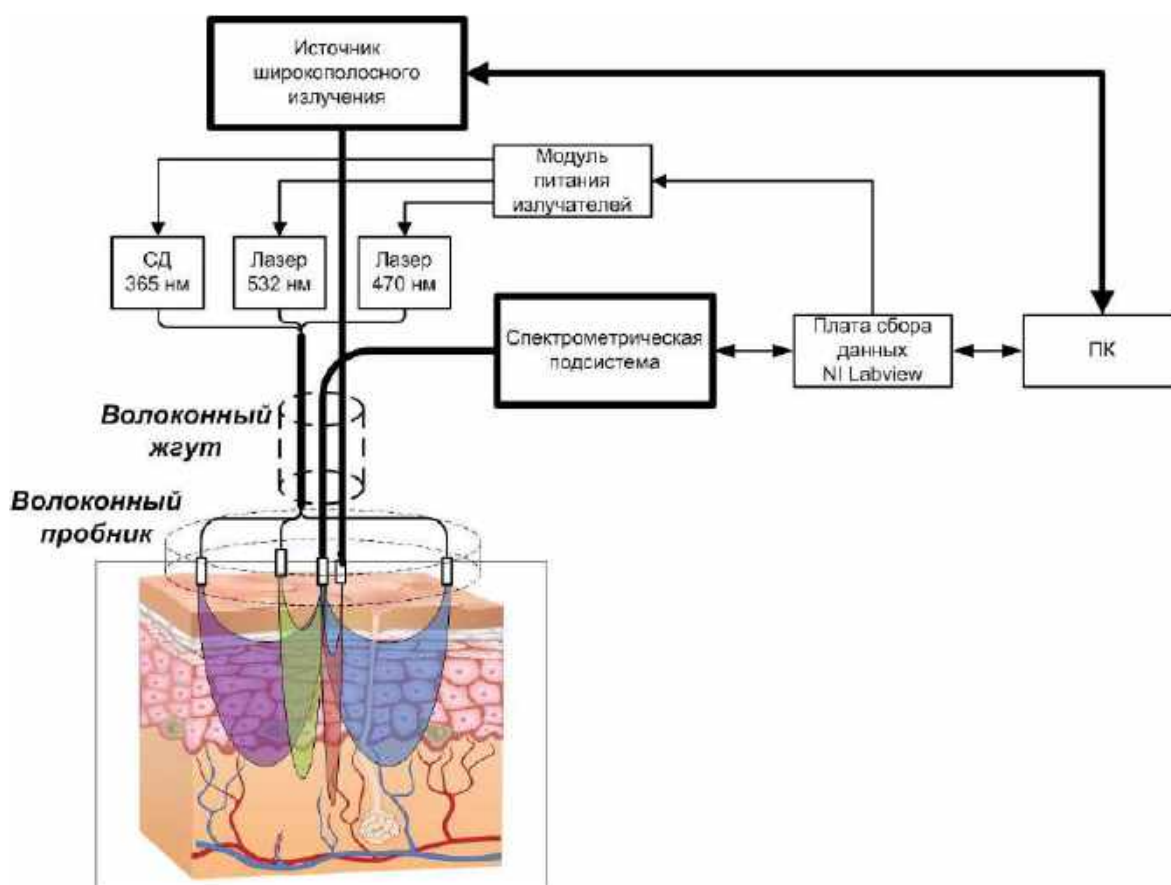


Рисунок 2.1 – Структурная схема приборной реализации оценки митохондриальной функции в эпителиальных тканях методом флуоресцентной диагностики *in vivo*

Внутри биоткани попадающее туда излучение претерпевает многократные рассеяния (переотражения) на границах неоднородностей анатомической и клеточной структур и частично поглощается составляющими биоткань веществами (рисунок 2.2): водой, меланином, гемоглобином крови и т.д. В результате возникает необходимость корректировки спектра флуоресценции с целью исключения данного влияния, а также более точной калибровки приборов флуоресцентной спектроскопии.

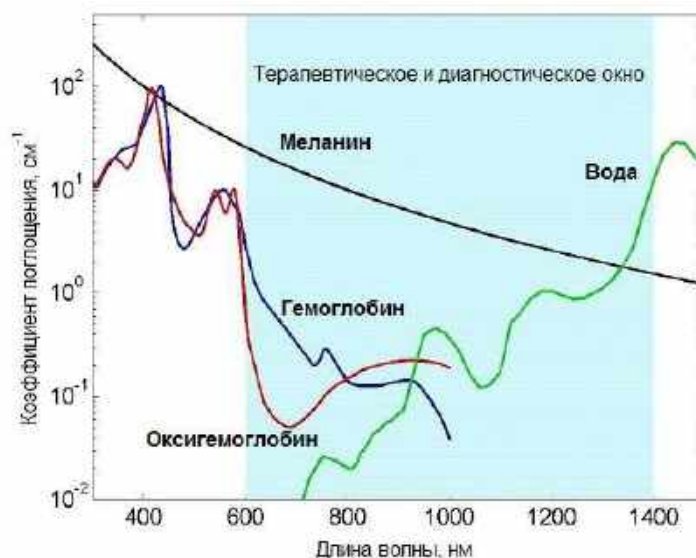


Рисунок 2.2 – Спектры поглощения кожных хромофоров

Излучение флуоресценции, а также часть ослабленного за счет поглощения и рассеяния зондирующего излучения, вследствие многократных актов рассеяния, выходит на поверхность биологического объекта, составляя поток обратно рассеянного излучения F_{BS} . С помощью системы сбора и транспортировки излучения часть F_{BS} с мощностью $P_{пр}(\lambda) < P_{изл}(\lambda)$ доставляется в блок спектроскопических измерений. Таким образом, спектроскопическая подсистема позволяет проводить регистрацию спектров флуоресценции, а также спектров диффузного отражения (в случае зондирования белым светом из широкополосного источника). Регистрация спектров диффузного отражения дает возможность оценивать кровенаполнение биологической ткани для коррекции данных измеренной флуоресценции.

Авторами монографии был проведен ряд экспериментальных исследований, направленных на изучение влияния основных поглощающих хромофоров кожи на регистрируемые сигналы флуоресценции.

2.1 Исследование влияния кровенаполнения

Как известно, кожа человека (дерма) пронизана артериолами, венулами и капиллярами. Следовательно, кровь вносит составляющую в регистрируемый спектр флуоресценции, поглощая зондирующее излучение (рисунок 2.3) [128]. Более того, в зависимости от процента оксигемоглобина (HbO_2) в общем объеме гемоглобина, содержащегося в крови, кровь имеет различные спектры поглощения.

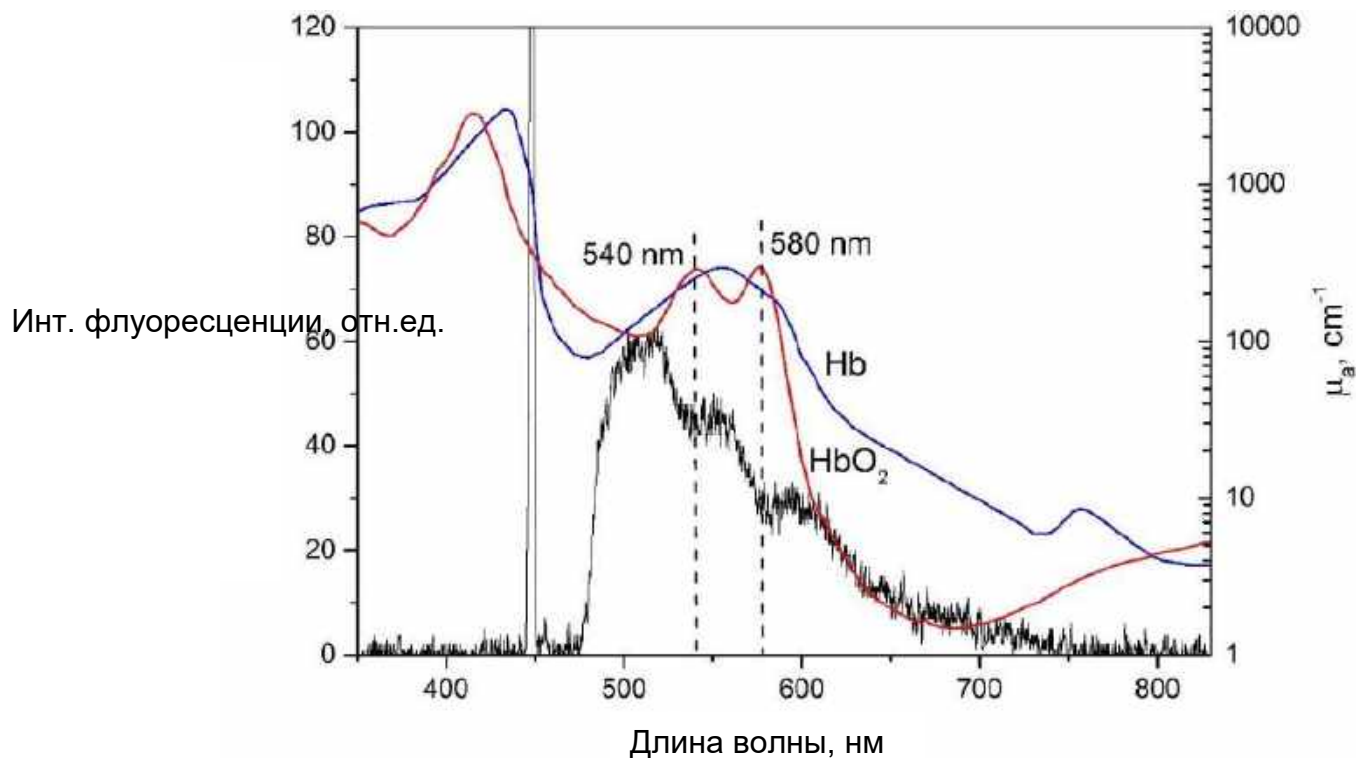


Рисунок 2.3 – Спектры поглощения крови (гемоглобина (Hb), оксигемоглобина (HbO_2)) и экспериментально зарегистрированный спектр флуоресценции кожи при возбуждении светом длиной волны 450 нм

Таким образом, очевидно, что уровень кровенаполнения зоны исследования вносит существенный вклад в спектр флуоресценции и не позволяет в полной мере оценить содержание какого-либо биомаркера в коже. Проведенные авторами монографии исследования представляли собой различные тестовые воздействия на периферический кровоток кожи с целью выявления его влияния на сигналы флуоресценции.

2.1.1 Окклюзионный тест

Для экспериментальных исследований применяли многофункциональный лазерный неинвазивный диагностический комплекс (МЛНДК) «ЛАКК-М» (ООО НПП «ЛАЗМА», г. Москва). Данный МЛНДК позволяет проводить исследования с помощью нескольких различных диагностических методов: лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ), оптическая тканевая оксиметрия (ОТО), пульсоксиметрия и ФС. Возбуждение эндогенной флуоресценции осуществлялось на длине волны 450 нм.

Экспериментальные исследования проводились с участием 19 условно здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 22 лет. Измерения проводились на подушечке безымянного пальца правой руки в первой половине дня. Все добровольцы находились в состоянии покоя. Оптическое волокно устанавливалось в одно и то же место, без оказания на него какого-либо давления, отсутствовали засветки и иные факторы, которые могли бы повлиять на точность измерений.

Спектры флуоресценции регистрировались во время применения артериальной плечевой окклюзии (окклюзионный тест) с давлением в манжете 200-220 мм рт.ст. (3 мин) а также в течение 3-х мин до и после окклюзионной пробы. Всего было зарегистрировано 298 спектров.

На основе закона Бера были экспериментально и теоретически определены коэффициенты пропускания (T). В общем виде упомянутый закон выглядит как:

$$I = I_0 \cdot T, \quad (2.1)$$

где I_0 – интенсивность входящего пучка света;

I – интенсивность после прохождения светом среды;

T – коэффициент пропускания.

Экспериментально данный коэффициент был рассчитан делением спектра флуоресценции до окклюзии на спектр флуоресценции во время окклюзии. Во время окклюзии кровенаполнение исследуемой области существенно уменьшалось, а, следовательно, исключалось влияние данного ослабления на интенсивность регистрируемой флуоресценции. Теоретический коэффициент пропускания рассчитывался по следующей формуле:

$$T = 10^{-l \cdot [C(\text{HbO}_2) \cdot 0,0054 \cdot \varepsilon(\text{HbO}_2) + (1 - C(\text{HbO}_2)) \cdot 0,0054 \cdot \varepsilon(\text{Hb})]}, \quad (2.2)$$

где $C(\text{HbO}_2)$ – процент оксигемоглобина;
 $\varepsilon(\text{Hb})$ и $\varepsilon(\text{HbO}_2)$ – коэффициенты экстинкции;
 l – глубина зондирующего излучения.

При расчете теоретического значения коэффициента пропускания такие параметры как глубина зондирующего излучения и процент гемоглобина, связанного с кислородом, подбирались эмпирически для каждого эксперимента. Таким образом, добивались максимального сходства теоретически рассчитанного коэффициента пропускания с экспериментальным значением (таблица 2.1).

Таблица 2.1 – Типовые результаты построения экспериментальных спектров флуоресценции

Экспериментальный спектр			Теоретический спектр			Глубина зондирования l , мкм	HbO ₂ , %
Пик флуоресценции FAD, отн. ед.	$\lambda(540)$, отн. ед.	$\lambda(580)$, отн. ед.	Пик флуоресценции FAD, отн. ед.	$\lambda(540)$, отн. ед.	$\lambda(580)$, отн. ед.		
129,0	101,0	62,0	100,0	71,4	44,1	300	0,97
168,0	150,0	106,0	247,8	193,1	133,3	450	0,89
132,0	99,0	59,0	115,0	90,0	53,2	400	0,94
119,0	86,0	56,0	125,3	80,3	51,3	600	0,92
192,0	162,0	110,0	241,4	193,0	125,3	500	0,8

Спектр флуоресценции, зарегистрированный во время окклюзионного теста (рисунок 2.4а), был умножен на теоретически рассчитанный коэффициент пропускания. Таким образом, были получены идентичные теоретически рассчитанный (рисунок 2.4б) и экспериментальный спектры флуоресценции (рисунок 2.4в), на которых присутствуют два характерных провала на длинах волн 540 и 580 нм.

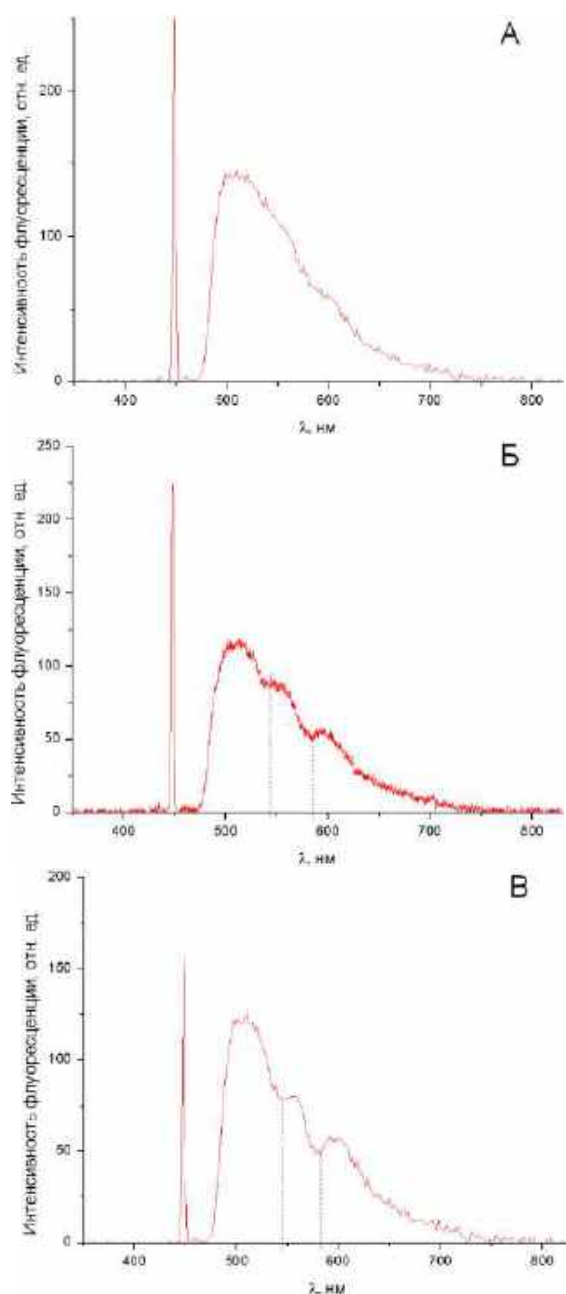


Рисунок 2.4 – Спектр флуоресценции во время окклюзии (а), экспериментальный (б) и теоретически рассчитанный (в) спектры флуоресценции при нормальном кровенаполнении зоны исследования

Таким образом, можно сделать вывод о том, что кровь оказывает существенное влияние на регистрируемый спектр флуоресценции кожи при возбуждении длиной волны 450 нм, которое необходимо учитывать при обосновании медико-технических требований к приборам ФС. Также следует отметить, что анализ данных регистрируемых спектров может давать дополнительную информацию о степени оксигенации крови в зондируемом объеме кожи, что может расширить диагностическую ценность метода ФС.

2.1.2 Влияние локальной окклюзии

Известно, что давление, оказываемое на оптический диагностический пробник, является значимым фактором, влияющим на результаты измерений. Одной из основных причин данного феномена является влияние, оказываемое этим давлением на локальный кровоток. Учет удерживающего локального давления необходим, в том числе, при разработке новых технологий носимой электроники. В связи с активным развитием данной области, в настоящее время актуальным является проведение количественных исследований влияния надавливания на результаты измерений, получаемых с помощью оптических технологий, перспективных для применения в носимых устройствах.

Кроме того, надавливание является известной техникой управления оптическими свойствами биологической ткани, позволяющей увеличивать глубину и объем диагностирования, а также оценивать действительные значения оптических параметров биологической ткани *in vivo* (параметров поглощения, рассеяния, поляризации, флуоресценции и др.), устраняя влияние поглощения лазерного излучения кровью.

С целью исследования влияния локального давления на кожу оптическим пробником на уровне сигналов, получаемых с помощью технологий флуоресцентной спектроскопии, проведена серия экспериментов. Для оценки изменений в кровотоке использовали метод ЛДФ.

Экспериментальные исследования проводились при помощи выше описанного диагностического комплекса «ЛАКК-М» (рисунок 2.5а). Для изменения величины давления на оптический пробник была разработана и напечатана на 3D-принтере специальная насадка (рисунок 2.5б), закрепляемая на оптическом волокне.

В ходе экспериментальных исследований давление постепенно увеличивалось от 0 до 40 кПа, а затем вновь уменьшалось до 0 кПа. Областью исследования являлись внутренняя поверхность среднего пальца правой руки (рисунок 2.5б), а также наружная поверхность запястья. Данные области были выбраны по той причине, что они достаточно часто применяются при исследованиях оптическими неинвазивными методами диагностики, а также в носимой электронике.

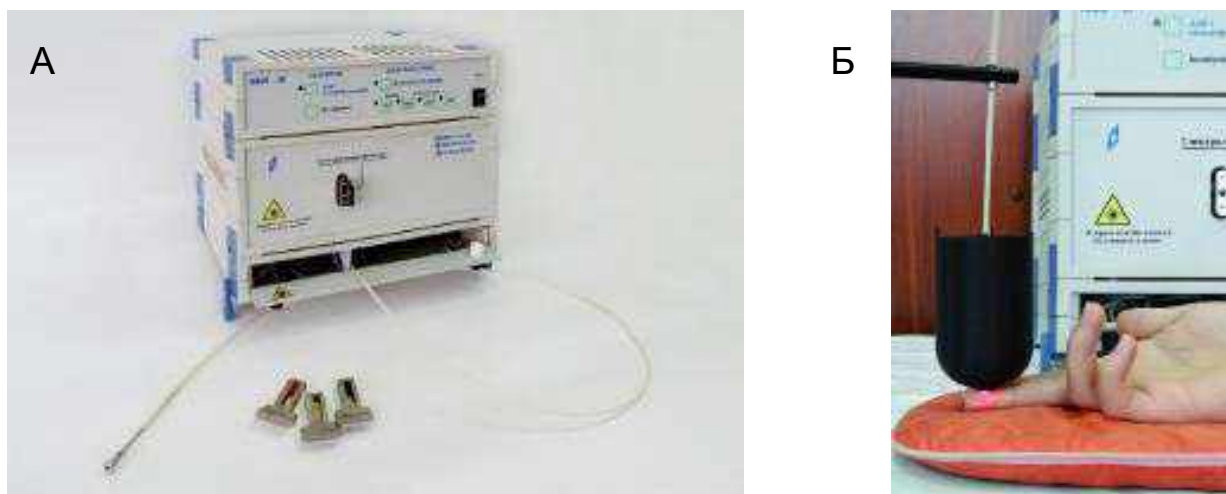


Рисунок 2.5 – Экспериментальное оборудование для исследования влияния локальной окклюзии на уровни сигналов ФС: а) внешний вид комплекса «ЛАКК-М»; б) размещение на пальце специальной насадки для оптического волокна

В исследовании приняли участие 7 условно-здоровых добровольцев в возрасте 24 ± 7 лет. В первой серии измерений исследовалось влияние надавливания на средний уровень сигнала ЛДФ. Проведенные измерения позволили получить усредненную кривую падения регистрируемой перфузии при надавливании, а также представить ее в форме экспоненциальной аппроксимации (рисунок 2.6).

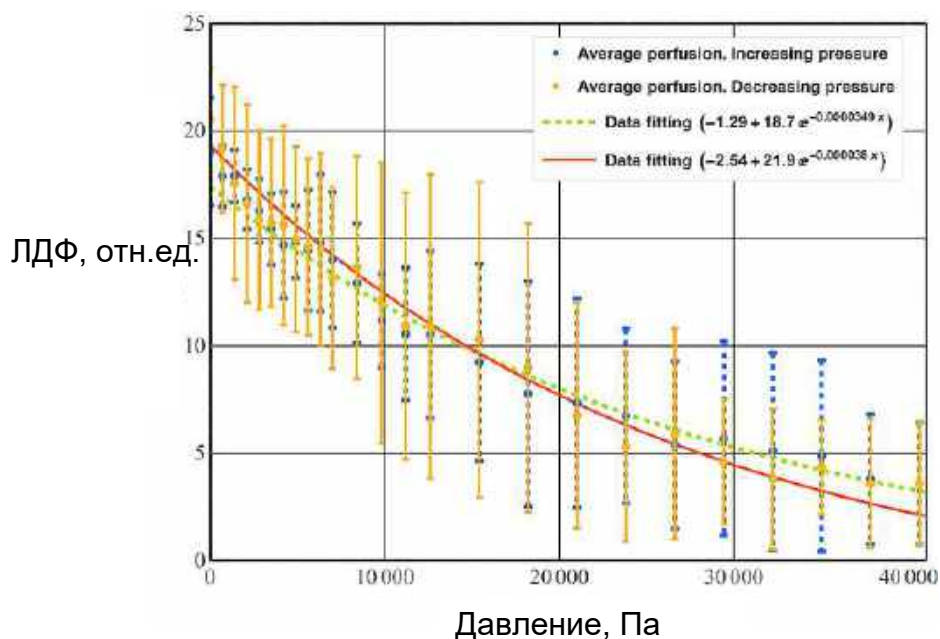


Рисунок 2.6 – Изменение среднего значения перфузии в циклах нагружения и разгружения

Во второй серии измерений исследовалось влияние давления на регистрируемый спектр флуоресценции кожи. Проводились измерения спектров флуоресценции при различных уровнях надавливания с последовательным ступенчатым увеличением и уменьшением нагрузки. После снятия давления проводилась повторная регистрация спектра диффузного отражения.

Проведенные измерения позволили получить усредненные по группе добровольцев кривые увеличения регистрируемой интенсивности флуоресценции при увеличении давления на оптический пробник (рисунок 2.7).

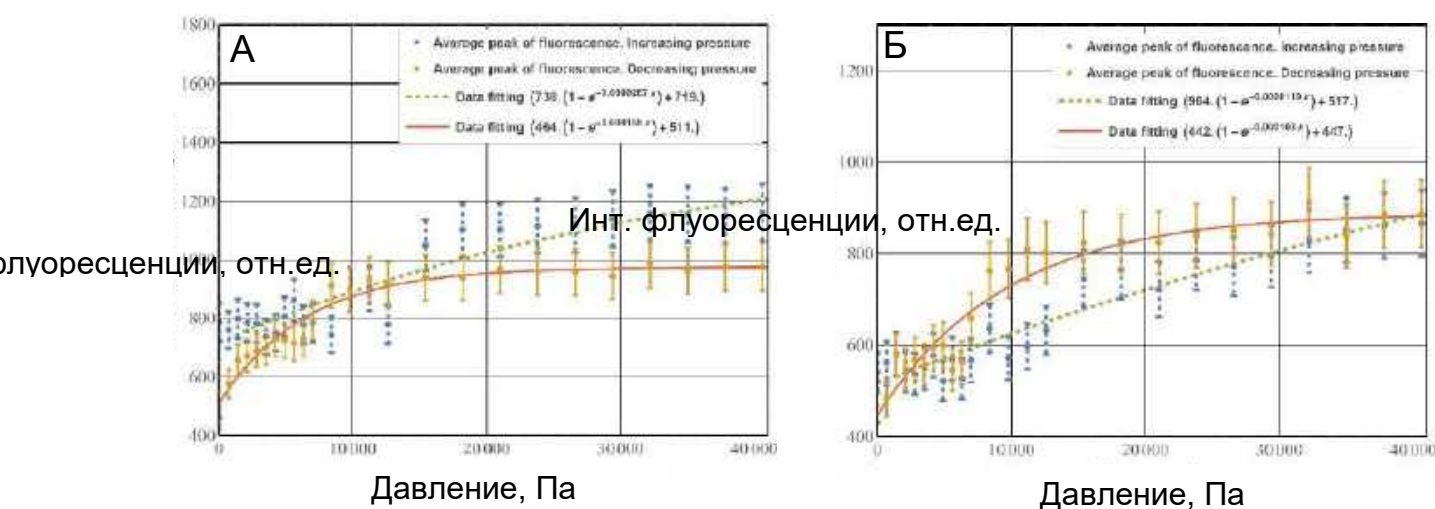


Рисунок 2.7 – Изменение средних значений пиков интенсивности флуоресценции в циклах нагружения и разгружения для длин волн 365 нм (а) 450 нм (б)

В среднем при максимальном прикладываемом давлении в 40 кПа уровень перфузии падал на 85 % от исходного уровня. При этом уже при давлении в 5 кПа наблюдалось снижение перфузии на 25 %.

При максимальном прикладываемом давлении в 40 кПа средняя интенсивность флуоресценции возрастала при возбуждении на длинах волн 365 нм на 95 %, 450 нм на 105 %, 532 нм на 40 % (рисунок 2.8). При этом уже при давлении в 5 кПа увеличение интенсивности флуоресценции 365 нм на 30 %, 450 нм на 25 %, 532 нм на 22 %. На длине волны 637 нм было выявлено отсутствие влияние давления на интенсивность флуоресценции.

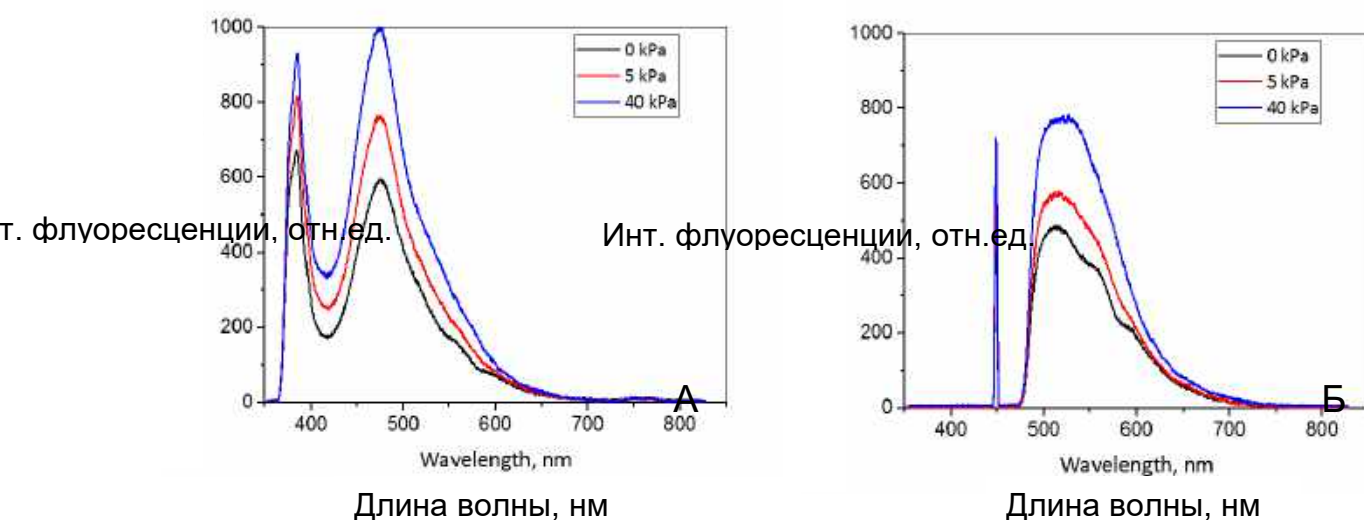


Рисунок 2.8 – Типичные спектры флуоресценции при давлении 0 кПа, 5 кПа и 40 кПа для длин волн 365 нм (а) 450 нм (б)

Увеличение регистрируемой интенсивности флуоресценции объясняется тем, что при увеличении нагрузки на исследуемую область происходит уменьшение кровенаполнения ткани за счет выдавливания крови из диагностического объема.

Таким образом, давление на оптический зонд является фактором, имеющим значительное влияние на микроциркуляцию крови в коже человека, что в свою очередь влияет на получаемые спектры флуоресценции. Полученные в результате данной работы данные представляют интерес для разработки и совершенствования технологий диагностики с помощью носимых устройств, а также дальнейшего исследования проблемы компенсации влияния кровенаполнения на регистрируемые спектры флуоресценции, что в перспективе позволит увеличить точность и воспроизводимость измерений методом ФС в оптической диагностике.

2.1.3 Влияние температуры

Экспериментальные исследования влияния температуры на спектр флуоресценции проводились на ладонной поверхности кожи среднего и безымянного пальцев правой руки здоровых добровольцев. Для оценки интенсивности кровотока перфузию регистрировали методом ЛДФ с помощью лазерного анализатора «ЛАКК-02» (ООО НПП «ЛАЗМА», Россия, длина волны зондирования – 1064 нм). Спектр флуоресценции биологических тканей регистрировали методом флуоресцентной спектроскопии с помощью соответствующего канала МЛНДК

«ЛАКК-М» для двух длин волн возбуждения эндогенных флуорофоров NADH и FAD – 365 и 450 нм, соответственно. Основной идеей исследования являлось осуществление провокационных действий (функциональных тестов) на кровотоки за счет изменения температуры конечностей (теплового и холодного прессорного теста) и применения дополнительного теста в виде плечевой артериальной окклюзии с давлением в манжете 200-220 мм рт. ст. (окклюзионный тест – ОТ). Специально спроектированная оснастка, напечатанная на 3D-принтере, позволяет размещать измерительные волокна каналов ЛДФ и ФС вдоль поверхности тела, а также дополнительно предусматривает расположение датчиков температуры разработанного 2-канального прибора для измерения температуры.

В одном исследовании регистрировали флуоресценцию NADH или FAD. Исследование состояло из 7 этапов, в течение которых одновременно регистрируются спектры флуоресценции и перфузия биологической ткани: фоновая запись при размещении руки в воздухе – 2 мин; в теплой воде (42 °С) – 4 мин (тепловой тест); в холодной воде (15-20 °С) – 10 мин (холодовой прессорный тест); окклюзия плечевой артерии в холодной воде – 3 мин (сочетание с окклюзионного и холодного прессорного теста); релаксация в холодной воде – 10 мин; нагрев в теплой воде (42 °С) – 11 мин (заключительный этап). Продолжительность эксперимента составляла 40 минут, в течение которых записывалось около 70-90 спектров флуоресценции биологических тканей. В общей сложности было выполнено 37 экспериментов на 10 добровольцах. Схема экспериментальной установки и диаграмма эксперимента представлены на рисунке 2.9.

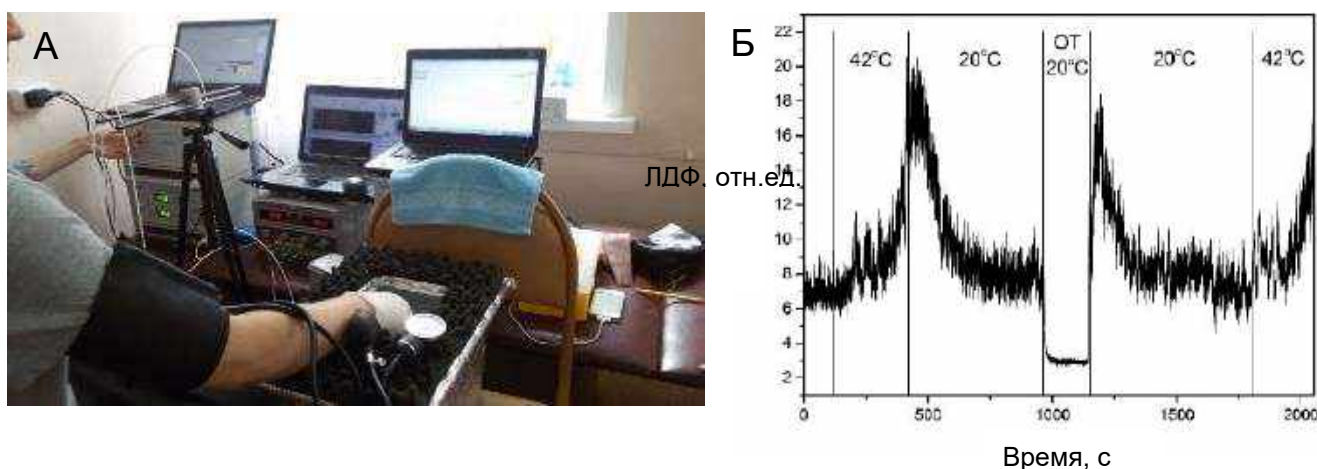


Рисунок 2.9 – Схема экспериментальной установки (а), включающая комплекс «ЛАКК-М» и анализатор «ЛАКК-02», а также временная диаграмма эксперимента (б)

С помощью неинвазивных методов ЛДФ и ФС, была показана взаимосвязь между кровотоком (перфузией) и регистрируемыми сигналами флуоресценции.

Для всех добровольцев зарегистрированное обратно отраженное излучение и интенсивность флуоресценции от биологической ткани показали высокую обратную корреляцию ($\sim 0,4-0,8$) с перфузией и температурой для обоих исследованных флуорофоров.

2.2 Исследование влияния меланина

Кожный пигмент меланин является важным поглощающим хромофором. Находящиеся в базальном слое клетки меланоциты вырабатывают кожный пигмент меланин и передают его соседним клеткам эпидермиса кератиноцитам, чтобы защитить их ядро от УФ-излучения. Независимо от этнической принадлежности в коже каждого человека находится одинаковое количество меланоцитов, но количество меланина, которое эти клетки производят, различно. От количества выработанного меланина зависит цвет кожи и ее чувствительность к воздействию света. У людей с различным этническим типом кожи концентрация меланина варьируется примерно в диапазоне 1,3-43 %. У слабопигментированных содержание меланина составляет 1,3-1,6 %, у среднепигментированных – 11-16 %, у темнокожих – 18-43 % [129].

Было проведено оценочное моделирование вклада рассеяния и поглощения в общее затухание зондирующего излучения на основе опубликованных оптических свойств биотканей человека путем добавления различного содержания меланина.

Кожа рассматривалась как многослойная структура, коэффициенты поглощения слоев которой учитывали концентрацию крови C_{blood} , содержание воды C_{H_2O} и меланина C_{mel} [130] и определялись как:

$$\mu_a^{Stratum\ corneum}(\lambda) = C_{H_2O}\mu_a^{H_2O}(\lambda) + (1 - C_{H_2O})\mu_a^{baseline}(\lambda), \quad (2.3)$$

$$\mu_a^{Epidermis}(\lambda) = (1 - C_{H_2O})(C_{mel}\mu_a^{mel}(\lambda) + (1 - C_{mel})\mu_a^{baseline}(\lambda)) + C_{H_2O}\mu_a^{H_2O}(\lambda), \quad (2.4)$$

$$\mu_a^{Dermis}(\lambda) = (1 - C_{H_2O})(C_{blood}\mu_a^{blood}(\lambda) + (1 - C_{blood})\mu_a^{baseline}(\lambda)) + C_{H_2O}\mu_a^{H_2O}(\lambda), \quad (2.5)$$

где $\mu_a^{H_2O}(\lambda)$ – коэффициент поглощения воды;

$\mu_a^{mel}(\lambda)$ – коэффициент поглощения меланина;

$\mu_a^{blood}(\lambda)$ – коэффициент поглощения крови;

$\mu_a^{baseline}(\lambda)$ – коэффициент поглощения других безводных тканей.

Параметры, используемые для расчета коэффициентов поглощения слоев, представлены в таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Параметры, используемые для расчета коэффициентов поглощения слоев

Слой	C_{blood}	C_{H_2O}	C_{mel}	$\mu_a^{H_2O}(\lambda)$	$\mu_a^{mel}(\lambda)$	$\mu_a^{blood}(\lambda)$	$\mu_a^{baseline}(\lambda)$
Роговой слой	0	0,05	0	ист. [131, 132]	ист. [133, 134]	ист. [135]	ист. [136]
Эпидермис	0	0,2	0,01- 0,43				
Дерма	0,002	0,5	0				

Коэффициенты рассеяния слоев рассчитывались с учетом комбинации Ми и рэлеевского рассеяния, предложенной в [130]:

$$\mu_s^{Rayleigh}(\lambda) = 2 \cdot 10^{12} \lambda^{-4}, \quad (2.6)$$

$$\mu_s^{Mie}(\lambda) = 2 \cdot 10^5 \lambda^{-1,5}, \quad (2.7)$$

$$\mu_s = \mu_s^{Rayleigh} + \mu_s^{Mie}, \quad (2.8)$$

Общий коэффициент затухания рассчитывался как:

$$\mu_t = \mu_a^{Stratum\ corneum} + \mu_a^{Epidermis} + \mu_a^{Dermis} + \mu_s, \quad (2.9)$$

В итоге были получены графические зависимости, поясняющие вклад рассеяния и поглощения в общее затухание зондирующего излучения для различных уровней меланина, представленные на рисунке 2.10.

Из полученных графических зависимостей видно, что с приближением к ближнему инфракрасному диапазону основной вклад в затухание зондирующего излучения при содержании меланина порядка 10 %

вносит в большей степени эффект рассеяния. При дальнейшем увеличении пигментации кожи доминирующим становится поглощение.

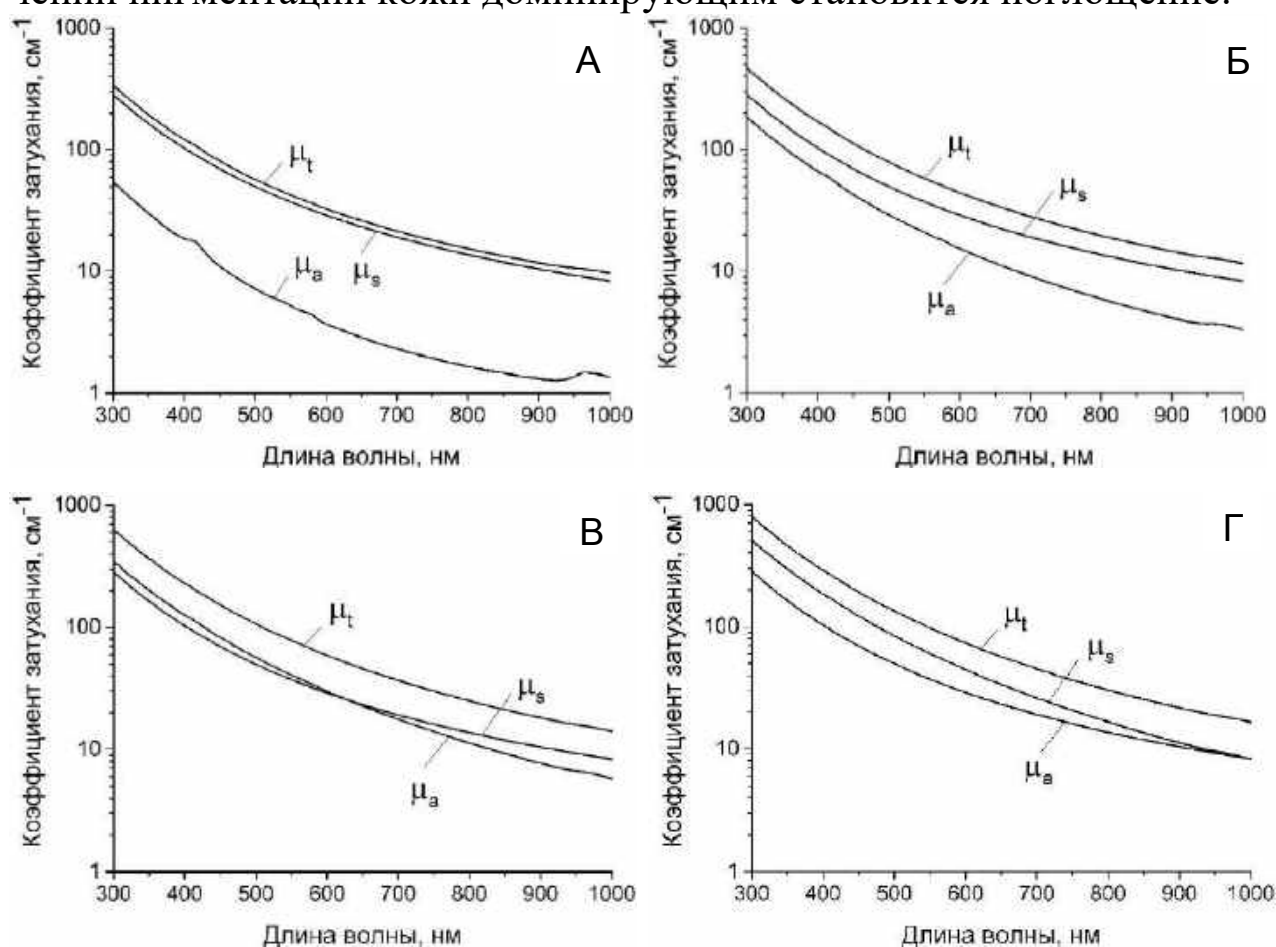


Рисунок 2.10 – Графические зависимости вклада рассеяния и поглощения в общее затухание зондирующего излучения для $C_{mel} = 1\%$ (а), $C_{mel} = 5\%$ (б), $C_{mel} = 10\%$ (в), $C_{mel} = 15\%$ (г)

В данном разделе сделана попытка исследовать влияние на регистрируемый сигнал флуоресценции хромофора биоткани – меланина, который является одним из наиболее распространенных природных пигментов и в значительной степени ответственен за оптические свойства кожи.

Для экспериментальных исследований также использовали МЛНДК «ЛАКК-М».

Тестовые экспериментальные исследования проводились с участием восьми условно здоровых добровольцев. Было исследовано влияние меланина на различных этнических типах кожи, включая европейский (3 добровольца, $m = 3$), индийский ($m = 1$), арабский ($m = 1$) и африканский ($m = 3$). При этом процентное содержание меланина в базальном слое эпидермиса может изменяться от 1 % до 43 %.

Измерения проводились в двух точках биоткани: на коже подушечки среднего пальца правой руки – слабо пигментированная область для всех добровольцев, и на коже предплечья (на срединной линии на 3-4 см выше шиловидных отростков локтевой и лучевой костей) в зоне с выраженными различиями в содержании меланина относительного каждого типа кожи. Анализируемыми регистрируемыми параметрами были интенсивность флуоресценции NADH I_{NADH} (пик в диапазоне 460-470 нм) и FAD I_{FAD} (около 550 нм) при возбуждении УФ светом (365 нм), а также показатель тканевого кислородного метаболизма – редокс-отношение RR :

$$RR = I_{NADH}/I_{FAD}. \quad (2.10)$$

Представленные параметры были усреднены с вычислением среднего арифметического M_n и среднеквадратического отклонения σ .

Из рисунка 2.11 и таблицы 2.3 видно, что для области предплечья с увеличением пигментации кожи уменьшается интенсивность, статистические различия были подтверждены по U -критерию Манна-Уитни.

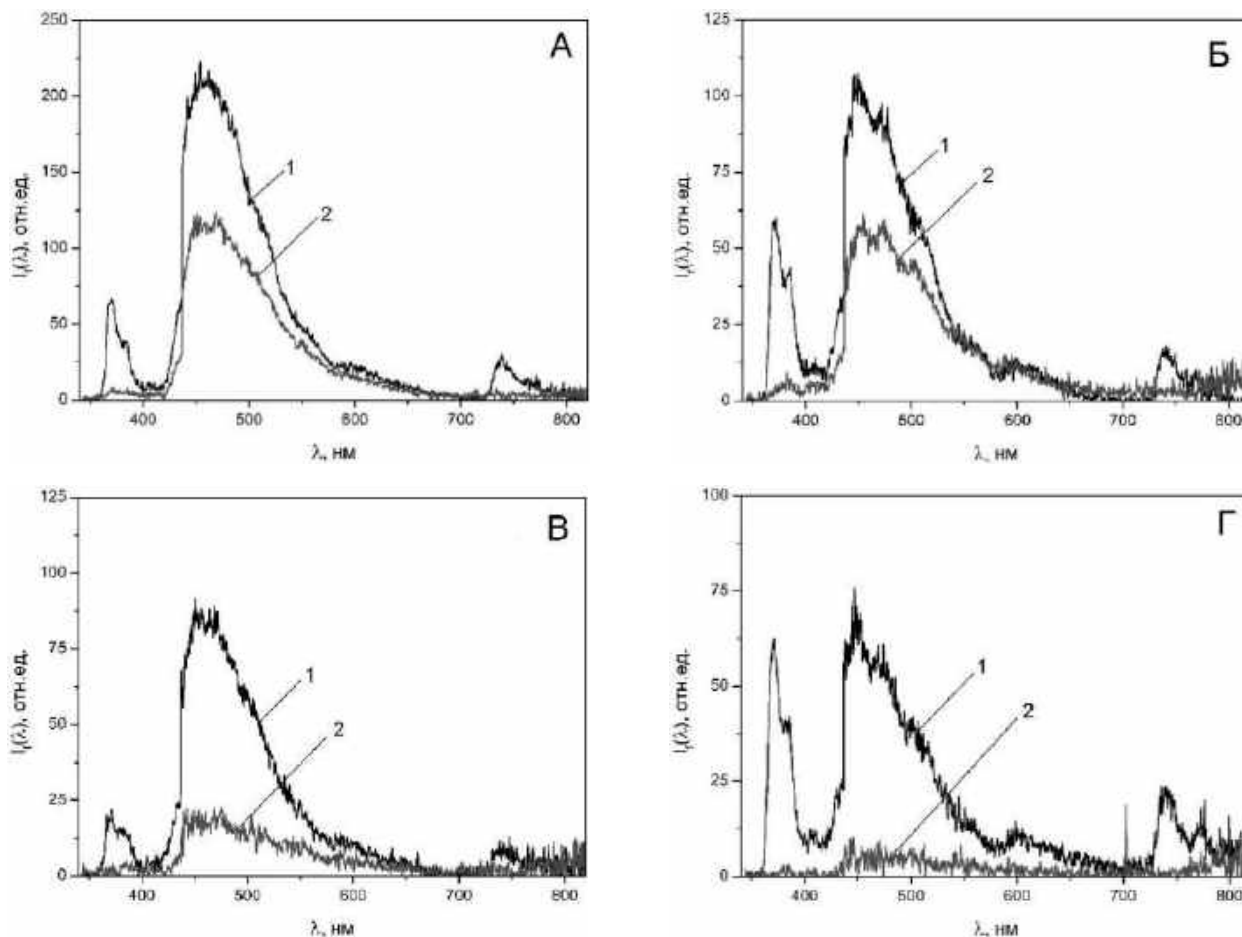


Рисунок 2.11 – Примеры спектров флуоресценции различных этнических типов кожи на поверхности пальца (1) и предплечья (2)

Таблица 2.3 – Результаты экспериментальных исследований

Длина волны, нм	Этнический тип кожи	$M_n \pm \sigma$, отн. ед.					
		Поверхность пальца			Предплечье		
		NADH	FAD	RR	NADH	FAD	RR
365 (УФ)	Европейский (А), $n = 50$	220,2±48,9	49,2±11,8	4,4±0,5	120,1±11,8	21,3±3,3	5,6±0,6
	Индийский (Б), $n = 27$	110,1±22,3	25,2±6,6	4,9±0,7	60,9±14,2	15,4±5,1	4,0±0,5
	Арабский (В), $n = 13$	84,3±37,7	25,5±12,6	3,3±0,3	25,9±3,9	8,9±2,5	2,9±0,4
	Африканский (Г), $n = 3$	75,4±30,5	22,3±17,5	3,4±0,4	→ 0	→ 0	–

Для добровольца Г сигнал флуоресценции фактически зафиксирован не был. Данные, полученные в отдельном дополнительном исследовании в тех же областях кожи на темнокожей женщине 25 лет, показывают, что флуоресценция при УФ и зеленой длин волн возбуждения также отсутствует. Для красной длины волны возбуждения флуоресценция регистрировалась более выраженной, чем в первых двух случаях возбуждения.

Разброс результатов измерений показал необходимость создания адекватной математической модели, описывающей свойства биоткани и непосредственно распространение флуоресценции.

ГЛАВА 3

РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ РЕГИСТРИРУЕМОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

3.1 Обзор подходов к моделированию сигналов флуоресценции

В то время как эмпирический анализ позволяет различать пораженные ткани, во многих случаях с помощью него невозможно установить четкую связь между диагностическим заключением и лежащими в его основе биологическими процессами. Зарегистрированный спектр флуоресценции может быть проанализирован с целью определения спектральных вкладов составляющих компонентов для получения концентрации отдельных флуорофоров. Тем не менее, ткань представляет собой мутную среду, в которой флуоресценция зависит от многих факторов: концентрации флуорофоров, их локализации, рассеяния и поглощения других хромофоров, геометрии зонда возбуждения/сбора и др. Эти эффекты могут исказить форму спектра и регистрируемую интенсивность излучения.

Например, при флуоресцентной спектроскопии двух образцов ткани с одинаковым составом и концентрацией флуорофоров, но с разным объемом крови будут регистрироваться существенно различающиеся спектры из-за поглощающих свойств гемоглобина. Без коррекции измерений точное определение концентрации флуорофора не может быть достигнуто.

Различные экспериментальные подходы были использованы для уменьшения влияния рассеяния и поглощения различных хромофоров на измеренные спектры флуоресценции. Но все они имеют ограничения в части особых условий проведения измерений. В качестве альтернативы для описания флуоресценции могут использоваться математические модели.

Математическое описание характеристик поглощения и рассеяния света может быть проведено двумя способами – с помощью аналитической теории и с помощью теории переноса. Первая основывается на уравнениях Максвелла и является наиболее фундаментальным

подходом. Однако его использование ограничено сложностью получения точных аналитических решений. С другой стороны, теория переноса в основном рассматривает перенос фотонов через поглощающие и рассеивающие среды, не основываясь на уравнениях Максвелла. Она имеет эвристический характер и ей не хватает строгости аналитических теорий. Тем не менее, теория переноса широко используется для описания взаимодействий оптического излучения с тканью, и экспериментально подтверждено, что во многих случаях ее прогнозы являются достаточными [137, 138].

Уравнение переноса является интегрально-дифференциальным уравнением лучевой интенсивности и записывается следующим образом:

$$\frac{dL(\vec{r}, \hat{s})}{ds} = -\mu_t(\vec{r}, \hat{s}) L(\vec{r}, \hat{s}) + \int_{4\pi} p(\hat{s}, \hat{s}') S(\vec{r}, \hat{s}') d\omega' \quad (3.1)$$

где $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ – полный коэффициент затухания;

μ_a – коэффициент поглощения, $[m^{-1}]$;

μ_s – коэффициент рассеяния, $[m^{-1}]$;

$p(\hat{s}, \hat{s}')$ – фазовая функция или функция рассеяния;

$S(\vec{r}, \hat{s})$ – функция источников, $\left[\frac{Вт \cdot ср}{м^3} \right]$;

$d\omega'$ – элемент телесного угла вдоль направления единичного вектора \hat{s}' .

Главная проблема, с которой имеет дело теория переноса, определение диффузной составляющей лучевой интенсивности, так как рассеяние фотонов носит случайный характер. Поэтому применяются различные приближения, в соответствии с которыми доминирующим процессом ослабления света является либо поглощение, либо рассеяние.

Несколько классов приближений были предложены в течение последних 30 лет, в том числе аналитические модели, основанные на теории вероятностной миграции фотонов, теории Кубелки-Мунка, теории диффузионного приближения, а также комбинации различных аналитических методов. Аналитические модели имеют преимущество обеспечения относительно простых формы решения. Однако часто требуют определенных граничных условий. Также были использованы различные модификации метода Монте-Карло. Этот подход имеет то преиму-

щество, что способен учитывать произвольную геометрию измерительного зонда, сложную структуру ткани. Вместе с тем этот метод требует относительно высокой вычислительной мощности. Рассмотрим каждый из подходов более подробно.

3.1.1 Теория вероятностной миграции фотонов

Теория миграции фотонов представляет собой подход, основанный на модели, которая использует функции распределения для описания взаимодействия фотонов в мутных средах [139, 140]. Этот метод моделирования рассматривает фотоны как частицы, которые испытывают акты поглощения, рассеяния или флуоресцентного взаимодействия. Этот метод отличается от метода Монте-Карло тем, что отдельные пути каждого фотона не моделируются и не записываются. Одним из существенных преимуществ данной модели является то, что она может обеспечить сравнительно простые аналитические выражения для рассеяния, поглощения и эффектов анизотропии. Первоначальное применение в биомедицинской оптике данной модели было в области спектроскопии диффузного отражения [141]. Используя эту модель, оптические свойства, μ_s и μ_a , можно легко рассчитать на основе измерений отражательной способности. Wu и др. расширил эту модель для описания флуоресценции в видимом диапазоне длин волн, где поглощение гемоглобина и воды не имеет существенного влияния (> 500 нм) [142]. Эта модель впоследствии была модифицирована для широкого диапазона длин волн излучения: 370-700 нм [143, 144]. Путем измерения диффузного отражения и флуоресценции ткани, «чистая» флуоресценция может быть извлечена с помощью этой модели. Этот подход может дать представление, например, о биохимических изменениях, происходящих в процессе злокачественной пролиферации.

Данная модель для описания флуоресценции ограничена тем, что она основывается на предположении, что флуоресценция и диффузное отражение имеют схожие пути фотонов [144]. Это предположение может не выполняться, когда поглощение значительно выше, чем рассеяние ($\mu_a \gg \mu_s$). Модель также может иметь ограничения, когда флуорофоры в измеряемой среде способствуют высокой степени рассеяния и поглощения (например, родамин, триптофан). Дополнительным ограничением является то, что данные модели рассматривают случай однослойной гомогенной среды.

Muller и др. экспериментально проверили эту модель на образцах ткани ротовой полости [144, 145]. На рисунке 3.1 показаны матрицы возбуждения-эмиссии флуоресценции измеренных образцов. На рисунке 3.1а виден пик поглощения гемоглобина в области 420 нм. Рисунок 3.1б демонстрирует способность модели компенсировать влияние поглотителя на измеренную флуоресценцию.

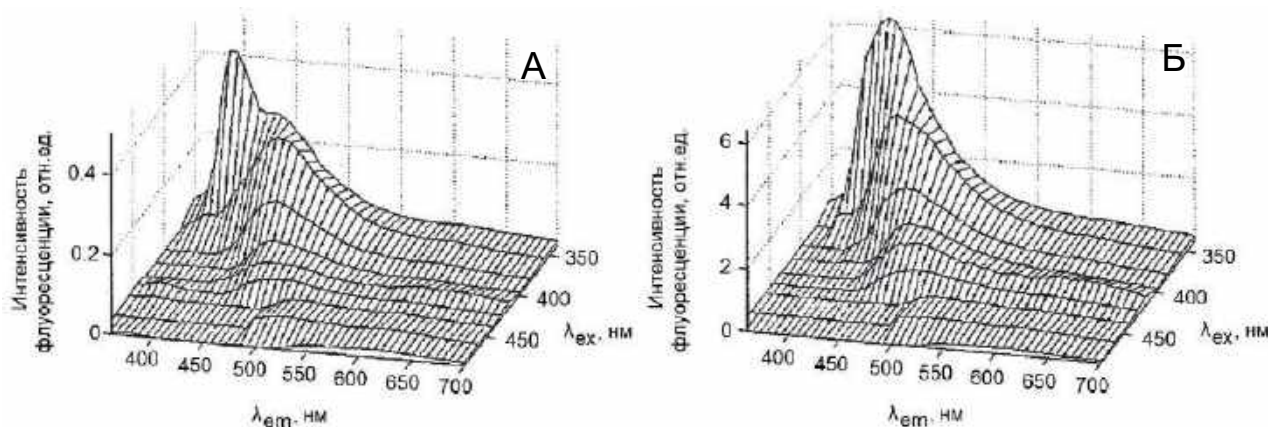


Рисунок 3.1 – Матрицы возбуждения-эмиссии измеренной (а) и скомпенсированной (б) флуоресценции тканей ротовой полости [144]

Georgakoudi и др. [146] использовал эту модель для описания эндогенной флуоресценции *in vivo* резекций шейки матки и тканей пищевода. Измерения проводились с помощью флуоресцентного зонда, интегрированного в биопсийный канал эндоскопа. Характерные спектры флуоресценции от обоих типов тканей были представлены в виде линейной комбинации флуоресценции NADH и коллагена. Измерения, проведенные до и после перевязки варикозно расширенных вен пищевода или увеличенных кровеносных сосудов, показали снижение интенсивности флуоресценции и красное смещение пиковой длины волны спектра излучения. Авторы связывают эти изменения с индуцированным снижением метаболизма, вызванным асфиксией и последующим снижением флуоресценции NADH.

Аналогичный анализ был проведен в ткани ротовой полости, где было обнаружено, что вклады коллагена и NADH могли бы помочь различить здоровую ткань от дисплазии и раковой ткани, а также в меньшей степени дисплазии от раковой ткани [147]. Когда флуоресцентная спектроскопия (ФС) сочеталась со спектроскопией диффузного отражения, чувствительность 96 % и специфичность 96 % были достигнуты при дифференциации нормальных и пораженных тканей полости рта. Этот метод также был применен при анализе данных диагностики рака молочной железы [148].

3.1.2 Теория Кубелки-Мунка

В 30-х годах XX века была разработана теория, основанная на модели двух световых потоков, распространяющихся в прямом и обратном направлениях [149]. Впоследствии многие авторы улучшали эту теорию и сравнивали ее выводы с данными эксперимента. Было найдено, что двухпоточковая теория хорошо описывает экспериментальные результаты, если освещение диффузно и среда достаточно замутнена, так что свет рассеивается диффузно. Двухпоточковая теория неприменима для описания падающего на среду коллимированного пучка, что в условиях интенсивного применения лазерных источников критично. В этом случае надо использовать четырехпоточковую теорию.

Аналитический метод решения для задачи моделирования флуоресценции на основе двухпоточкового приближения Кубелки-Мунка был предложен А. Kokhanovsky [150, 151]. В последствие различные группы в своих работах использовали и развивали данный подход [152-155].

В данном подходе рассматривается случай распространения в среде вдоль оси x двух разнонаправленных потоков $i(x)$ и $j(x)$ с исходной длиной волны при освещении внешним потоком излучения Φ_0 . Вследствие наличия поглощения рассеяния света в среде эти потоки частично поглощаются, конвертируются друг в друга, а также вызывают вынужденное излучение флуоресценции находящихся в среде флуорофоров, что приводит к образованию в среде дополнительных аналогичных потоков флуоресценции $I(x)$ и $J(x)$. Для потоков $i(x)$, $j(x)$, $I(x)$ и $J(x)$ можно записать две связанные системы линейных дифференциальных уравнений 1-го порядка [150, 152]:

$$\begin{cases} \frac{di}{dx} = -\beta_1 i(x) + \beta_2 j(x), \\ \frac{dj}{dx} = \beta_1 j(x) - \beta_2 i(x). \end{cases} \quad (3.2)$$

и

$$\begin{cases} \frac{dI}{dx} = -\beta_1 I(x) + \beta_2 J(x) + F(x), \\ \frac{dJ}{dx} = \beta_1 J(x) - \beta_2 I(x) - F(x), \end{cases} \quad (3.3)$$

где β_1 и β_2 – коэффициент ослабления и коэффициент обратного рассеяния излучения соответственно. В зависимости от конкретного решения могут представлять собой функции различной сложности.

Через функцию $F(x)$, описывающую формирование излучения флуоресценции внутри среды, осуществляется связь между системами уравнений (3.2) и (3.3):

$$F(x) = \frac{1}{2} (i(x) + j(x)) \mu_{af} \phi \Phi_0, \quad (3.4)$$

где μ_{af} – коэффициент поглощения исходного излучения флуорофором; ϕ – квантовый выход флуоресценции.

В целом эта теория не требует сложных алгебраических операций и, как было показано, дает сравнительно хорошее согласие с экспериментом. Недостатки же этих методов заключаются в том, что некоторые коэффициенты приходится подбирать эмпирически, границы применимости недостаточно хорошо установлены и нет полного теоретического обоснования. Другим неудобством теории Кубелки-Мунка является то, что она может быть применена только для одномерной геометрии системы.

3.1.3 Диффузионное приближение

Данное приближение предполагает, что диффузная интенсивность встречает много частиц и рассеивается на них почти равномерно во всех направлениях, поэтому ее угловое распределение почти изотропно [156]. Но угловая зависимость не может сводиться к константе, так как поток при этом обращается в нуль и распространение мощности отсутствует. Поэтому диффузная компонента интенсивности должна быть немного больше для направления полного потока, чем для обратного направления.

В средах, где рассеяние преобладает над поглощением, распространение света может быть описано с использованием уравнения диффузии. Это приближение, как правило, удовлетворяет случаю распространения света в тканях человека в видимом и ИК диапазоне.

Биоткани рассеивают свет преимущественно в направлении вперед. В результате диффузионное приближение не всегда является хорошей аппроксимацией теории переноса излучения вблизи источников или границ. Улучшением ситуации является включение δ -функции

в определение фазовой функции [157]. Это представление названо приближением δ -Эддингтона. Приближение δ -Эддингтона уменьшает степень направленности рассеяния. Интенсивность становится менее анизотропной, что приводит к улучшению ситуации вблизи границ и источников.

Аналитические решения уравнения диффузии были использованы для описания распространения флуоресценции тканях груди [158, 159]. Nair и др. и Hyde и др. использовали парные измерения отражения и флуоресценции для извлечения истинной флуоресценции из ткани. Nair и др. анализировали характерные спектры флуоресценции на радиальных расстояниях от источника, в то время как Hyde и др. были проанализированы концентрации флуорофора в зависимости от глубины в слоистой ткани. Важно отметить, что эти краевые задачи сильно зависят от геометрии системы освещения/сбора.

3.1.4 Комбинированные аналитические методы

Часто в эпителиальных тканях может быть необходимо учитывать дифференциальные биохимические и морфологические изменения, происходящие в каждом слое с целью выяснения диагностической информации. Были разработаны двухслойные модели на основе теории диффузии, но сравнительно слабое рассеяние тонкого эпителиального слоя препятствовало точному описанию распространения света в этом слое [158]. Для решения этой проблемы, были предложены модели с использованием сочетания аналитических методов.

Chang и др. предложил двухслойную модель для видимой и ИК областей с оптическими свойствами эпителия в верхнем слое и стромы в нижнем [160]. Распространение света в эпителии было смоделировано с помощью закона Бера и это было оправдано тем, что альбеда в эпителии является относительно небольшим, и толщина эпителия сравнима со средней длиной свободного пробега. Диффузионная теория была использована для моделирования распространения света в более рассеивающей строме.

Результаты модели были сопоставлены с моделированием методом Монте-Карло с хорошим согласованием. Эта модель была использована для анализа *in vivo* флуоресценции от больных с цервикальной интраэпителиальной дисплазией [161]. NADH, FAD, кератин и три компонента коллагена рассматривались как флуорофоры в модели, а концентрации были определены из измеренных данных. Было установлено, что произошло увеличение эпителиальной флуоресценции

от FAD и уменьшение от кератина в измерениях с дисплазией ткани по сравнению с нормальными. Стромальная флуоресценция от коллагена также уменьшалась. Эти результаты согласуются с предыдущими исследованиями [162, 163].

3.1.5 Метод Монте-Карло

Монте-Карло (МК) методы являются категорией вычислительных методов, которые предполагают случайное моделирование физической величины [164, 165]. Благодаря своей универсальности, этот метод находит применение во многих областях, включая оптику ткани. Метод МК способен решить уравнение переноса излучения с любой заданной точностью, при условии, что требуемая вычислительная нагрузка является доступной. По этой причине этот метод рассматривается как метод золотого стандарта для моделирования транспорта света в тканях и используется для верификации других менее строгих методов. Метод МК используется для решения как прямых, так и обратных задач. В прямой задаче распространение света моделируется для заданных оптических свойств, в то время как в обратной задаче оптические свойства оцениваются путем сопоставления (подгонки) модельных данных с экспериментально измеренными значениями.

В настоящее время с помощью метода МК моделируются процессы поглощения света, упругого и комбинационного рассеяния, флуоресценции. Коэффициент поглощения и коэффициент рассеяния используются для описания вероятности поглощения и рассеяния, соответственно. Коэффициент анизотропии g определяет средний косинус углов рассеяния. Кроме того, преломление света между любыми двумя областями в модели ткани или на границе раздела воздух-ткань будет определять угол преломления. Доля пакета фотонов, которая после прохождения в среде выходит со стороны падающего света, оценивается как диффузно отраженная составляющая. Доля, которая проходит через среду, оценивается в виде коэффициента пропускания.

Для имитации флуоресцентного излучения необходимо включить дополнительный параметр – квантовый выход флуоресценции, чтобы описать вероятность того, что поглощенный фотон может быть преобразован в флуоресцентный фотон на другой длине волны [166]. Если моделируется флуоресценция с временным разрешением, также время жизни флуоресценции должно быть определено. На рисунке 3.2 представлена последовательность шагов для реализации МК кода флуоресценции.

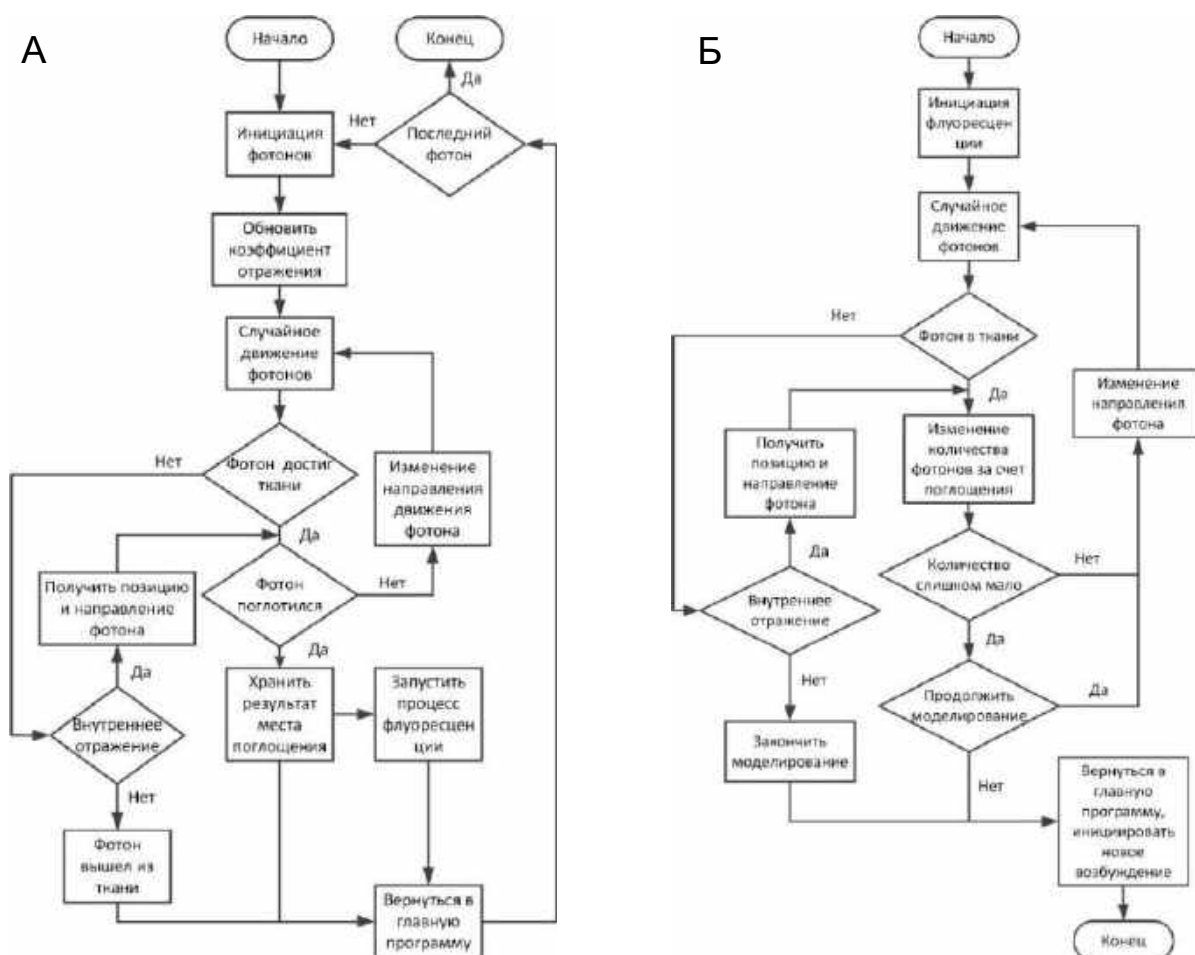


Рисунок 3.2 – Блок-схема возбуждения (а) и флуоресценции (б), поясняющая принцип МК моделирования

Несмотря на то, что метод МК является золотым стандартом для моделирования распространения света в мутных средах, основным его недостатком является требование интенсивных вычислений для достижения результатов с желаемой точностью из-за стохастической природы самого моделирования, что делает его чрезвычайно времязатратным по сравнению с другими аналитическими или эмпирическими методами. Значительные усилия были предприняты, чтобы ускорить процесс моделирования в течение последних десятилетий. Эти методы ускорения можно условно разделить на несколько категорий. В таблице 3.1 приведен сравнительный анализ этих методов по отношению к их производительности, относительной погрешности, соответствующим преимуществам и ограничениям. Следует отметить, что параллельные методы расчета не приведены в этой таблице, так как их производительность сильно зависит от вычислительной архитектуры, и скорость всех методов, суммированных в этой таблице может быть дополнительно увеличена применением параллельных вычислений.

Таблица 3.1 – Сравнение различных методов ускорения МК моделирования

Метод*	Ускорение по отношению к стандартному МК	Относительная погрешность	Преимущества	Ограничения
Scaling Monte Carlo	~200 [167]	Меньше 4 % [167]	Не использует приближения, точен, имеет высокую скорость.	Применим только к моделям слоистых тканей.
Perturbation Monte Carlo	~1300 [168]	Может быть меньше 4 % в зависимости от величины возмущения [168]	Применим к тканям со сложными структурами.	Чувствителен к искажениям в рассеивающих свойствах.
Hybrid Monte Carlo	~300 [169]	Около 5 % [169]	Имеет больший допустимый диапазон, чем РМС.	Относительно сложное вычисление. Конкретный регион должен быть однородным.
Variance reduction	~300 [170, 171]	Около 5 % [170, 171]	Имеет множество доступных вариантов.	Ограничения варьируются в зависимости от конкретного метода.
*Примечание: Методы на основе GPU не были перечислены в этой таблице, так как все перечисленные в таблице методы могут быть дополнительно ускорены с использованием GPU.				

По сравнению с диффузным отражением, моделирование флуоресценции является более сложным и гораздо более времязатратным процессом за счет генерации фотонов флуоресценции при каждом событии поглощения фотона возбуждения. Ряд групп [172-179] использовали МК моделирование для имитации флуоресценции в тканях из-за растущего интереса к флуоресцентной спектроскопии и визуализации для медицинских приложений. Как следствие, некоторые группы исследовали различные методы для ускорения МК моделирования флуоресценции в биологических тканях. Swartling и др. [180] предложил метод для ускорения моделирования спектров флуоресценции слоистых тканей. В отличие от обычного флуоресцентного МК кода,

этот метод вычисляет возбуждение и испускание света по отдельности. Метод Swartling был использован Palmer и др. [175] для создания МК базы данных для оценки флуоресцентных свойств модели ткани молочной железы.

Последние достижения в области компьютерного моделирования являются важным инструментом изучения биологических основ наблюдаемых сигналов во флуоресцентных исследованиях. Они способствуют более качественной идентификации важных флуорофоров, присутствующих в конкретных тканях. В зависимости от задачи и ограничений исследователь сам может выбирать необходимый инструмент моделирования и прибегнуть либо к аналитическому подходу, либо использовать модели на основе метода Монте-Карло.

3.2 Разработка аналитической модели флуоресценции кожи

Кожа принимается двухслойной средой, состоящий из слоя эпидермиса толщиной D и полубесконечного дермального слоя. Каждый из этих двух слоев предполагается однородными по отношению к оптическим свойствам, таким как коэффициент рассеяния, поглощения и эффективность флуоресценции.

Волоконно-оптический зонд, находящийся на одном уровне с поверхностью ткани, обеспечивает возбуждение и сбор флуоресценции. Зонд состоит из пучка оптических волокон (числовая апертура $NA = 0,22$) (рисунок 3.3).

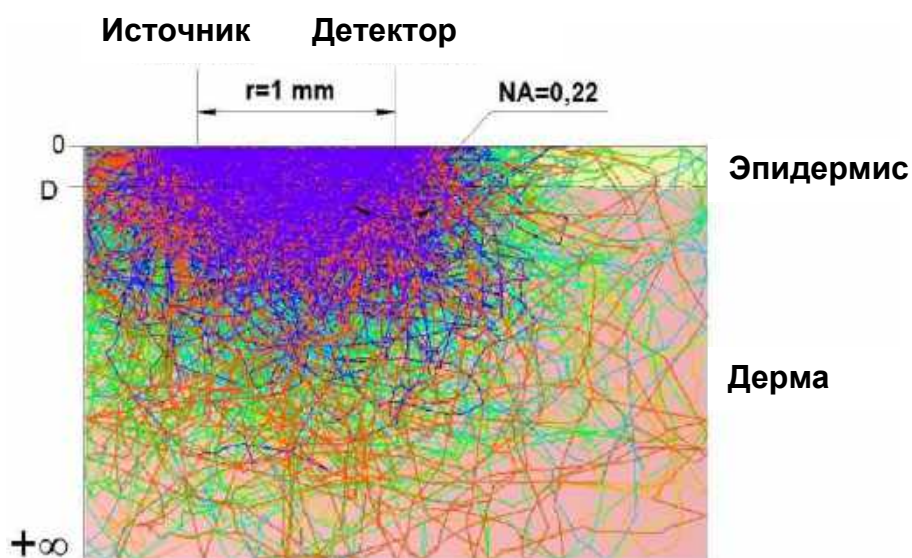


Рисунок 3.3 – Модель кожи

Общая флуоресценция ткани может быть рассчитана как сумма вкладов от двух слоев. В пределах каждого слоя модель должна учитывать распространение возбуждающего света, поглощение флуорофоров (задается коэффициентом поглощения μ_{af}), преобразование во флуоресценцию (описывается квантовой эффективностью ϕ_f флуорофора) и далее распространение флуоресцирующего излучения.

Распространение излучения возбуждения и эмиссии зависит от общего поглощения и рассеяния (задается коэффициентами μ_a и μ_s , соответственно), а также фактора анизотропии в пределах каждого слоя g . В диапазоне длин волн интереса (~ 350 нм до 650 нм) эти свойства весьма различны для эпидермиса и дермы. Было рассмотрено две различных модели для описания распространения света в двух слоях. Учитывая, что средняя длина свободного пробега $\delta = 1/(\mu_a + \mu_s)$ для эпидермиса (приблизительно 100 - 200 мкм) сравнима с его толщиной (как правило, 100 - 200 мкм), распространение света может быть аппроксимировано с помощью закона Бера [181]. В противоположность этому дермальный слой имеет относительно высокий уровень рассеяния с уменьшением альбеда порядка $0,9$ и средней длиной свободного пробега приблизительно 30 - 50 мкм. В этих условиях теория диффузии обеспечивает хорошее описание распространения света.

Для упрощения рассматривается одномерная геометрия с направлением распространения света перпендикулярно к поверхности ткани. Когда коллимированный возбуждающий свет с интенсивностью I_0 падает на эпителиальную поверхность, интенсивность света затухает экспоненциально. Флуоресценция генерируется изотропно на каждом точечном источнике, причем половина лучей распространяется по направлению к поверхности ткани (в $-z$ направлении) и половина в дерму (в $+z$ направлении). Результирующая флуоресценция направляется к поверхности ткани, $F_{epi}^-(z=0)$, и может быть рассчитана по формуле:

$$F_{epi}^-(z=0) = \frac{1}{2} \int_0^D I_0 \cdot \exp[-\mu_{eff1}(\lambda_{ex}) \cdot z] \times \\ \times \sum_{k=1}^N [\mu_{af1(k)}(\lambda_{ex}) \phi_{f1(k)}(\lambda_{ex}, \lambda_{em})] \cdot \exp(-\mu_{eff1}(\lambda_{em}) \cdot z) dz. \quad (3.5)$$

Индекс 1 для всех оптических параметров относится к эпидермису. Дермальные оптические параметры указаны с индексом 2.

Эффективность флуоресценции ($\mu_{af} \cdot \phi_f = \varepsilon_f \cdot C_f \cdot \phi_f$) является аддитивной, когда присутствуют несколько флуорофоров. В уравнении (3.5) разные флуорофоры обозначены индексом k . $F_{epi}^-(z=0)$ является фактически полусферическим потоком в направлении $+z$, и доля этого света, который собирается с помощью волоконно-оптического зонда $F_1^{detected}$, аппроксимируется отношением R_{NA} телесного угла с числовой апертурой волокна к телесному углу полусферы $\pi/2$.

$$F_1^{detected}(\lambda_x, \lambda_m) = R_{NA} \cdot F_{epi}^-(z=0). \quad (3.6)$$

Часть направленной вниз флуоресценции достигает дермы:

$$F_{epi}^+(z=D) = \frac{1}{2} \int_0^D I_0 \cdot \exp[-\mu_{eff1}(\lambda_{ex}) \cdot z] \times \\ \times \sum_{k=1}^N [\mu_{af1(k)}(\lambda_{ex}) \cdot \phi_{f1(k)}(\lambda_{ex}, \lambda_{em})] \cdot \exp[-\mu_{eff1}(\lambda_{em}) \cdot (D-z)] dz,$$

где она может быть рассеяна обратно к поверхности ткани. Часть этой флуоресценции, которая рассеяна вверх, $F_{epi}'^-(z=D)$, является просто результатом $F_{epi}^+(z=D)$ и диффузного отражения полубесконечного дермального слоя. С помощью 1-D теории диффузии $F_{epi}'^-(z=D)$ задается формулой:

$$F_{epi}'^-(z=D) = \pi \cdot [A(\lambda_{em}) + C_2(\lambda_{em})] - \\ - \frac{3 \cdot \mu_{s1}(\lambda_{em}) \cdot g_2 \cdot F_{epi}^+(z=D) + 4\pi \cdot [A(\lambda_{em}) \cdot \mu_{t2}(\lambda_{em}) + C_2(\lambda_{em}) \cdot \mu_{eff2}(\lambda_{em})]}{6 \cdot (\mu_{a2} + \mu_{s2}')} \quad (3.7)$$

При выведении формулы было использовано приближение δ -Эддингтона для того, чтобы достичь лучшего описания фазовой функции рассеяния вперед в дермальном слое [157].

$A(\lambda_{em})$ и $C_2(\lambda_{em})$ являются общим и частным решением уравнения диффузии [142, 156, 160, 161]. Свет затем затухает, возвращаясь обратно через эпидермис на поверхность ткани.

$$A(\lambda_{em}) = \frac{Q_0}{\mu_{t2}^2 - k_d^2}, \quad Q_0 = \frac{3I_0(\mu_{s2}\mu_{tr2} + g_2\mu_{s2}\mu_{t2})}{4\pi}, \quad k_d^2 = 3\mu_{a2}\mu_{tr2},$$

$$C_2(\lambda_{em}) = -\frac{A(\lambda_{em})(1 + \mu_{t2}h)}{1 + k_d h} - \frac{Q_1}{2\pi(1 + k_d h)},$$

$$Q_1 = \left[\frac{\mu_{s2}g_2}{\mu_{tr2}} \right] \cdot I_0, \quad h = \frac{2}{3}\mu_{tr2}, \quad \mu_{tr2} = \mu_{s2}(1 - g_2) + \mu_{a2}.$$

Детектируемый сигнал снова зависит от численной апертуры волоконно-оптического зонда и определяется как:

$$F_2^{\text{detected}}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = R_{NA} \cdot F'_{epi}(z = D) \cdot \exp[-\mu_{eff1}(\lambda_{em}) \cdot D]. \quad (3.8)$$

Возбуждающий свет, который достигает нижней части эпителия, задается как:

$$I_s^+(z = D) = I_0 \cdot \exp[-\mu_{eff1}(\lambda_{ex}) \cdot D].$$

Часть возбуждающего света, попадающего в дерму, отражается обратно к поверхности ткани. Обрато рассеянный свет возбуждения I_s^- может быть вычислен по формуле (3.7) с дермальными оптическими параметрами при длине волны возбуждения. Так как свет проходит обратно через эпидермис, он может возбудить дополнительную эпидермальную флуоресценцию. Долю этой флуоресценции можно рассчитать по формуле:

$$F_3^{\text{detected}}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = R_{NA} \int_0^D I_s^-(z = D) \cdot \exp[-\mu_{eff1}(\lambda_{ex}) \cdot z] \times$$

$$\times \sum_{k=1}^N [\mu_{af1(k)}(\lambda_{ex}) \cdot \Phi_{f1(k)}(\lambda_{ex}, \lambda_{em})] \cdot \exp[-\mu_{eff1}(\lambda_{em}) \cdot (D - z)] dz. \quad (3.9)$$

Возбуждающий свет, попадающий в дерму, может возбудить флуоресценцию в этом слое ткани. С помощью одномерной теории диффузии для описания флуоресценции в однородной однослойной среде флуоресценция дермы, ослабляемая на эпидермально-дермальной границе F_{der}^- , может быть описана:

$$F_{der}^-(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = \mu_{af2}(\lambda_{ex}) \cdot \Phi_{f2}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) \times$$

$$\times \left[\frac{4\pi \cdot A(\lambda_{ex}) + I'_0}{\mu_{t2}(\lambda_{ex}) + \mu_{eff2}(\lambda_{em})} + \frac{4\pi \cdot C_2(\lambda_{ex})}{\mu_{eff2}(\lambda_{ex}) + \mu_{eff2}(\lambda_{em})} \right] C(\lambda_{em}), \quad (3.10)$$

где

$$I'_0 = I_0 \cdot \exp[-\mu_{eff1}(\lambda_{ex}) \cdot D],$$

$$C(\lambda_{em}) = 3[\mu_{a2}(\lambda_{em}) + \mu'_{s2}(\lambda_{em})] / (3[\mu_{a2}(\lambda_{em}) + \mu'_{s2}(\lambda_{em}) + 2\mu_{eff2}(\lambda_{em})])$$

$$\text{и } \mu_{t2}(\lambda_{ex}) = \mu_{a2}(\lambda_{ex}) + \mu_{s2}(\lambda_{ex}).$$

Флуоресценция затухает, проходя через эпидермис. Доля этой флуоресценции может быть выражена следующим образом:

$$F_4^{\text{detected}}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = [R_{NA} \cdot F_{der}^-(\lambda_{ex}, \lambda_{em})] \cdot \exp[-\mu_{eff1}(\lambda_{em}) \cdot D]. \quad (3.11)$$

Общая флуоресценция может быть вычислена как сумма всех вкладов:

$$F_{total}^{\text{detected}} = F_1^{\text{detected}} + F_2^{\text{detected}} + F_3^{\text{detected}} + F_4^{\text{detected}}. \quad (3.12)$$

Применимость двухслойной модели обосновывается небольшой глубиной зондирования излучения возбуждения флуоресценции с длинами волн возбуждения компонентов дыхательной цепи клетки (NADH, FAD). Также двухслойная модель с применением алгоритмов фиттинга экспериментальных данных позволяет решать обратную задачу оценки концентрации флуорофоров.

ГЛАВА 4

РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ОБЪЕМА И МОДЕЛИ ДЛЯ ОЦЕНКИ СООТНОШЕНИЯ СИГНАЛ-ШУМ РЕГИСТРИРУЕМОГО СИГНАЛА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КРОВЕНАПОЛНЕНИЯ ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ТКАНИ

4.1 Численное моделирование параметров диагностирования кожи

Для количественной регистрации оптическими методами объемной концентрации различных биохимических веществ в толще ткани, при проведении сравнительных измерений в области патологии и/или в выбранной интактной (реперной) точке на теле пациента необходимо, чтобы глубина проникновения излучения, а также диагностический объем в исследуемый объект была во всех этих ситуациях известна и постоянна. В крайнем случае, у врача должна быть возможность для конкретного типа измерений на данном типе биоткани знать эффективный диагностический объем (ЭДО). Диагностический объем определяется как объем биологической ткани, который формирует заданную долю регистрируемого детектором сигнала.

Вследствие сложности реальных условий зондирования, а также сложной комбинированной структуры эпителиальных тканей, не представляется возможным получить общее аналитическое решение для оценки объема диагностируемой биологической ткани, которое могло бы имитировать регистрируемое рассеянное оптическое излучение и его взаимодействие с тканями, их структурными аномалиями и/или физиологическими изменениями. В этой связи в исследованиях был применен метод стохастического МК моделирования. В настоящее время известно ряд реализаций данного метода, используемых для моделирования распространения оптического излучения в оптических тканях. Одним из подходов является использование объектно-ориентированной модели МК [130], которая позволяет описывать фотоны и структурные компоненты ткани как взаимодействующие друг с другом независимые объекты. Таким образом, объект-фотон распространяется через объект-среду (или слой среды) и взаимодействует

с ее структурными компонентами, такими как клетки, кровеносные сосуды, коллагеновые волокна и т.д. Такое представление среды объектами позволяет разрабатывать реалистичные модели ткани с трехмерной вариацией биологических структур. Для достижения оптимальной производительности моделирования целесообразно реализовывать параллельную структуру вычислений. Это позволяет получить значительный прирост производительности за счет использования таких технологий параллельных вычислений как CUDA (Computer Unified Device Architecture), NVIDIA Corporation. С ее помощью появляется возможность моделировать одновременно тысячи фотонов и не несколько порядков ускорить процесс моделирования.

Необходимо отметить, что диагностический объем при измерениях флуоресценции определяется распределением зондирующего излучения. Это обусловлено тем фактом, что по правилу Стокса, спектр флуоресценции сдвинут в длинноволновую область относительно спектра поглощения того же соединения. При этом известно, что в оптическом диапазоне поглощение излучения в биологической ткани падает с ростом длины волны. Таким образом, для оценки диагностического объема достаточно оценить распределение излучения на длине волны возбуждения флуоресценции.

Для моделирования диагностического объема и глубины проникновения зондирующего излучения применялась модель ткани, имеющая 7 слоев. Данная модель, первоначально была предложена в работе [130]. В таблице 4.1 представлены основные параметры используемой 7-слойной модели кожи.

Таблица 4.1 – Параметры модели Монте-Карло

Слой	Название слоя	Номинальное кровенаполнение, %	Номинальная сатурация, %	Номинальное содержание воды, %	Глубина залегания границы слоя, мкм
1	Роговой слой	0	0	5	20,0
2	Эпидермис	0	0	20	100,0
3	Папиллярная дерма	4	70	50	250,0
4	Верхнее сосудистое сплетение	30	70	60	330,0
5	Ретикулярная дерма	4	70	70	1830,0
6	Нижнее сосудистое сплетение	10	70	70	1910,0
7	Подкожный жир	5	70	30	8000,0

Для расчета параметров поглощения каждого слоя использовались следующие выражения:

$$\mu_a^{Strat.corneum}(\lambda) = (1 - C_{H_2O})\mu_a^{baseline}(\lambda) + C_{H_2O}\mu_a^{water}(\lambda), \quad (4.6)$$

$$\begin{aligned} \mu_a^{Epidermis}(\lambda) = & (1 - C_{H_2O}) \left[C_{mel} (B_{mel}\mu_a^{mel}(\lambda) + (1 - B_{mel})\mu_a^{ph.mel}(\lambda)) + \right. \\ & \left. + (1 - C_{mel})\mu_a^{baseline}(\lambda) \right] + C_{H_2O}\mu_a^{water}(\lambda), \end{aligned} \quad (4.7)$$

$$\begin{aligned} \mu_a^{Layer}(\lambda) = & (1 - C_{H_2O}) \left[C_{blood} (F_{Hb}F_{RBC}Ht)(S\mu_a^{oxy}(\lambda) + (1 - S)\mu_a^{deoxy}(\lambda)) \right] + \\ & + (1 - C_{H_2O}) \left[1 - C_{blood} (F_{Hb}F_{RBC}Ht)\mu_a^{baseline}(\lambda) \right] + \\ & + C_{H_2O}\mu_a^{water}(\lambda), \end{aligned} \quad (4.8)$$

где $\mu_a^{mel}(\lambda)$ – поглощение эумеланина;

$\mu_a^{ph.mel}(\lambda)$ – поглощение феомеланина;

B_{mel} – коэффициент соотношения фракций меланина;

$\mu_a^{deoxy}(\lambda)$ – поглощение дезоксигемоглобина;

$\mu_a^{oxy}(\lambda)$ – поглощение оксигемоглобина;

$\mu_a^{baseline}(\lambda)$ – поглощение фоновое поглощение ткани;

Ht – гематокрит, принимается равным 45 %;

F_{Hb} – объемная доля гемоглобина в эритроците;

F_{RBC} – фракция эритроцитов.

Для расчета параметров рассеяния излучения в каждом слое использовались следующие выражения:

$$\mu_s^{Rayleigh}(\lambda) = 2,2 \cdot 10^{11} \cdot \lambda^{-4}, \quad (4.9)$$

$$\mu_s^{Mie}(\lambda) = 11,74 \cdot \lambda^{-0,22}, \quad (4.10)$$

$$\mu_s^{Layer}(\lambda) = N(\mu_s^{Rayleigh}(\lambda) + \mu_s^{Mie}(\lambda)). \quad (4.11)$$

Пусть N_{ph} – количество пакетов фотонов, соответствующих мощности зондирующего излучения. Из соображений безопасности, а также приемлемого уровня фотообесцвечивания ткани для длины волны зондирующего излучения 365 нм мощность на выходе волоконного зонда не должна превышать 1,5 мВт, что при апертуре 400 мкм

дает допустимый для полосы УФА уровень энергетической облученности $1,2 \text{ Вт/см}^2$. Для длины волны 450 нм уровень мощности на выход аналогичного оптического волокна не должна превышать $3,5 \text{ мВт}$ ($2,7 \text{ Вт/см}^2$). В данной области оптического диапазона для задач флуоресцентной диагностики данная величина ограничивается главным образом порогом фотообесцвечивания. Для оценки уровня шума зададимся уровнем шума $N_{noise} = 100$ фотонов, что соответствует уровню собственных шумов рядового детектора с зарядовой связью (CCD) на временах экспозиции порядка нескольких миллисекунд и комнатной температуре окружающей среды.

Моделирование по методу МК позволяет делать подсчет фотонов, проходящих через данный объем биологической ткани, а также фотонов, детектируемых данной геометрией приемника. В данном расчете моделирование проводилось на объемной сетке с шагом 2 мкм. Диаметры зондирующего и приемного волокон 400 мкм, приемный апертурный угол 0,22. Расстояние между волокнами – 1 мм. Пронормировав количество фотонов, проходящих через данную ячейку области моделирования на уровень шума детектора, возможно построить качественную карту оценки объемного распределения величины сигнал-шум по объему моделируемой ткани. На рисунке 4.1 представлен пример полученного распределения для вышеописанных параметров моделирования.

Отношение уровня детектируемого сигнала на приемнике к уровню шумов детектора дает количественную оценку типового достижимого соотношения сигнал-шум. Для длины волны 365 нм описанного моделирования уровень сигнал-шум был оценен на уровне 250. Таким образом, глубина диагностирования составляет порядка нескольких сотен микрометров и затрагивает эпидермис, а также 2 верхних слоя дермы. Оцененный таким образом диагностический объем составляет величину порядка $0,1 \text{ мм}^3$.

Для длины волны 450 нм описанного моделирования уровень соотношение сигнал-шум был оценен на уровне 370. Глубина диагностирования достигает 500 мкм проникает сквозь эпидермис, 2 верхних слоя дермы, а также затрагивает верхнее сосудистое сплетение (рисунок 4.2). Оцененный таким образом диагностический объем составляет величину порядка $0,35 \text{ мм}^3$.

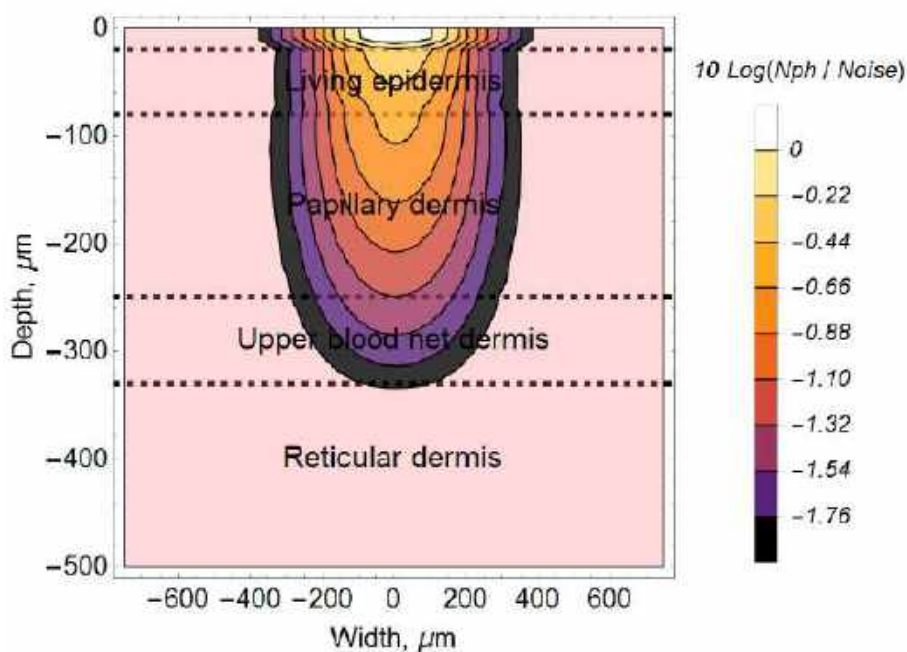


Рисунок 4.1 – Качественная оценка распределения величины сигнал-шум для измерений флуоресценции на длине волны 365 нм при параметрах оптического волоконного пробника: расстояние между волокнами – 1 мм, диаметр волокон 400 мкм, приемный апертурный угол – 0,22

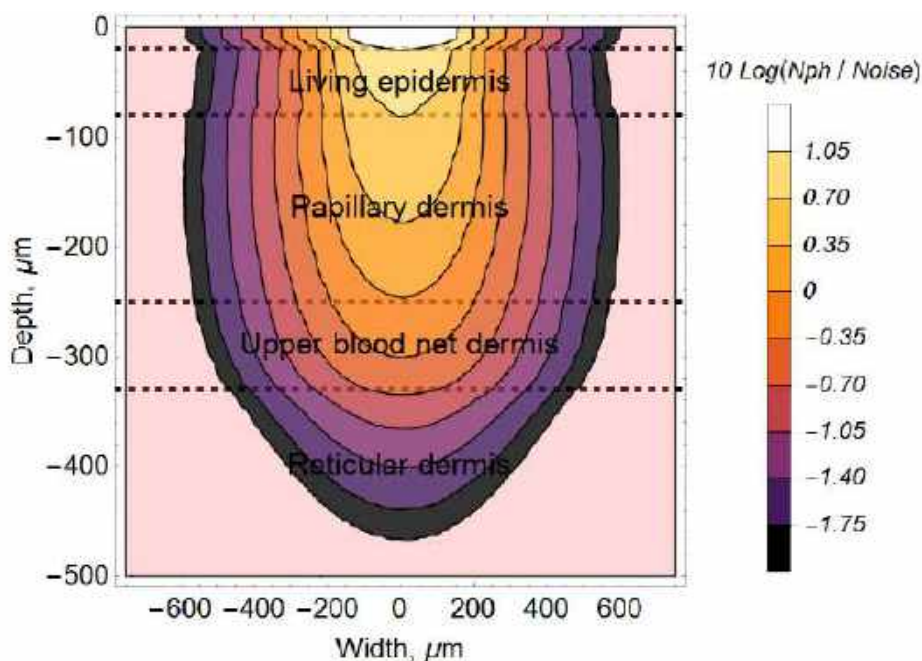


Рисунок 4.2 – Качественная оценка распределения величины сигнал-шум для измерений флуоресценции на длине волны 450 нм при параметрах оптического волоконного пробника: расстояние между волокнами – 1 мм, диаметр волокон 400 мкм, приемный апертурный угол – 0,22

Также был разработан вариант МК моделирования флуоресценции с использованием возможностей программной среды TracePro (Lambda Research Corporation), предназначенной для анализа распространения света в оптико-механических системах.

При данном моделировании на основе заданных оптических параметров биоткани поглощение учитывается законом Бера:

$$\Phi = \Phi_0 \exp(-\mu_a t), \quad (4.1)$$

где Φ и Φ_0 – пропущенный и падающий потоки;

μ_a – коэффициент поглощения;

t – толщина образца.

Для учета преломления или отражения на границе раздела двух слоев используется закон Френеля.

В качестве фазовой функции рассеяния выбрана наиболее часто применяемая функция Хени-Гринштейна:

$$SDF = p(\theta) = \frac{1 - g^2}{4\pi(1 + g^2 - 2g \cos\theta)}, \quad (4.2)$$

где g – фактор анизотропии.

Параметр g может принимать значения от -1 до 1. При положительном g лучи в большей степени рассеиваются в прямом направлении, при отрицательном – в обратном направлении. Когда g равен нулю, рассеяние изотропно, т.е. одинаково во всех направлениях.

Когда луч проходит рассеивающую среду, он распространяется на случайное расстояние x , регулируемое распределением вероятностей:

$$P(x)dx = \exp(-\mu_s x)dx, \quad (4.3)$$

где μ_s – коэффициент рассеяния.

Когда луч взаимодействует с материалом, который является тонким по сравнению с длиной свободного пробега, он проходит через материал без рассеяния. Если толщина материала велика, луч с большой вероятностью рассеется.

Флуоресценция моделируется в TracePro за счет использования флуоресцентных свойств в сочетании со свойствами материала объекта и описанными выше законами. Задаваемые параметры включают в себя относительное поглощение $ab(\lambda)$ и относительное возбуждение

$ex(\lambda)$, нормированные на молярный коэффициент экстинкции K_{peak} , и относительную эмиссию $em(\lambda)$. Концентрация флуоресцирующего материала устанавливается путем ввода молярной концентрации C_{molar} .

Коэффициент поглощения флуорофоров определяется в среде как:

$$\mu_a(\lambda) = ab(\lambda)K_{peak}C_{molar}. \quad (4.4)$$

Длина пути до поглощения:

$$d(\lambda) = -\log_{10}(x) / \mu_a(\lambda), \quad (4.5)$$

где x случайное число от 0 до 1.

Число фотонов, участвующих в процессе, к числу фотонов, предварительно поглощенных системой, определяется заданием в среде квантовой эффективности QE .

Была построена упрощенная четырехслойная оптическая модель кожи. Падающее излучение, проходя через эпидермис, поглощается в большей степени меланином и возбуждает флуоресценцию NADH. Прошедшая часть попадает в дерму, где поглощается преимущественно фракциями гемоглобина и возбуждает флуоресценцию коллагена. Оставшееся зондирующее излучение и вторичное излучение флуоресценции диффузно отражается от волокон коллагена и вновь проходит через слои кожи, поглощаясь гемоглобином и меланином.

На рисунке 4.3 представлены основные параметры, определяющие оптические свойства биотканей и связи между ними [129].

Расчет транспортных коэффициентов, определяющих оптические свойства биологических тканей, проводился на основе данных, представленных в [129]. Граничные условия, представленные в [182], были численно смоделированы методом МК.

Поглощение	μ_a	$[\text{мм}^{-1}]$
Рассеяние	μ_s	$[\text{мм}^{-1}]$
Функция рассеяния	$p(\theta)$	$[\text{ср}^{-1}]$
Фактор анизотропии	g	$[-]$
Индекс преломления	n	$[-]$
Приведенное рассеяние	$\mu_s' = \mu_s(1-g)$	$[\text{мм}^{-1}]$

Рисунок 4.3 – Основные оптические параметры биотканей

В целом интенсивность флуоресценции кожи в основном определяется флуоресценцией эпидермиса (NADH) и флуоресценцией дермы (коллаген) [128]. NADH обладает характерными спектрами поглощения, включающими две полосы в ультрафиолетовой области (при $\lambda = 260$ нм и $\lambda = 340$ нм), а также типичным спектром собственной флуоресценции с максимумом на интервале от 460 до 480 нм [128, 183, 184]. В [185] показано возбуждение и излучение максимумов для коллагена соответственно в 280 и 310 нм, 265 нм и 385, 330 и 390 нм и 450 и 530 нм. Спектры поглощения и флуоресценции NADH и коллагена для длины волны возбуждения 365 нм представлены на рисунке 4.4.

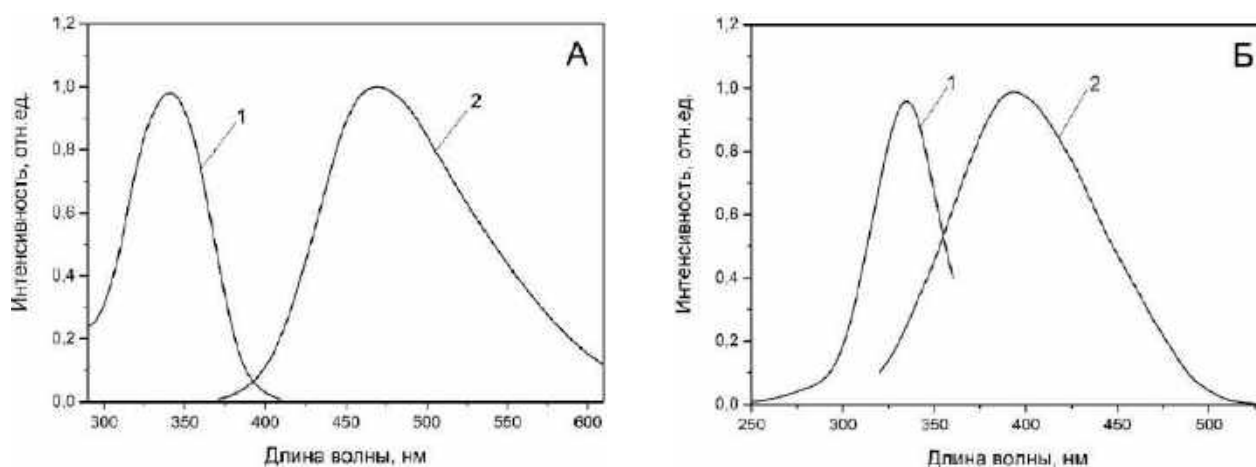


Рисунок 4.4 – Спектры поглощения (1) и флуоресценции (2) NADH (а) и коллагена (б)

Параметры используемых в модели флуорофоров приведены в таблице 4.2.

Таблица 4.2 – Параметры флуорофоров

Флуорофор	$\mu_s, \text{см}^{-1}$	ϕ_f	$\epsilon_f, \text{М}^{-1}\text{см}^{-1}$
NADH	3,15	0,05	6220
Коллаген	0,9	0,3	52940

Одновременное присутствие в тканях нескольких флуорофоров приводит к сложному регистрируемому суммарному спектру флуоресценции этих веществ, с разным количеством максимумов и минимумов [186]. В модели предлагается учитывать сигналы флуоресценции от основных флуорофоров биоткани – NADH и коллагена, при этом,

как видно из рисунка 4.4, часть спектра коллагена перекрывается спектром NADH. В результате в анализируемом диапазоне 400-550 нм будет регистрироваться суммарный сигнал. В зависимости от интенсивности флуоресценции каждого из учитываемых флуорофоров вид суммарного спектра может изменяться.

На рисунке 4.5 показаны возможности предлагаемого метода для моделирования распространения оптического излучения в коже человека.



Рисунок 4.5 – Вид сбоку (а) и полный вид 3D-модели (б).

Линии указывают прохождение отдельных фотонов через ткань

На рисунке 4.6 показано, как содержание в крови может влиять на спектр флуоресценции коллагена, а именно, на смещение пика в длинноволновую область.

Данная модель также была использована для описания и прогнозирования влияния меланина на сигнал флуоресценции. Кровенаполнение для дермы при моделировании находилось на постоянном среднем уровне в 0,2 % [187].

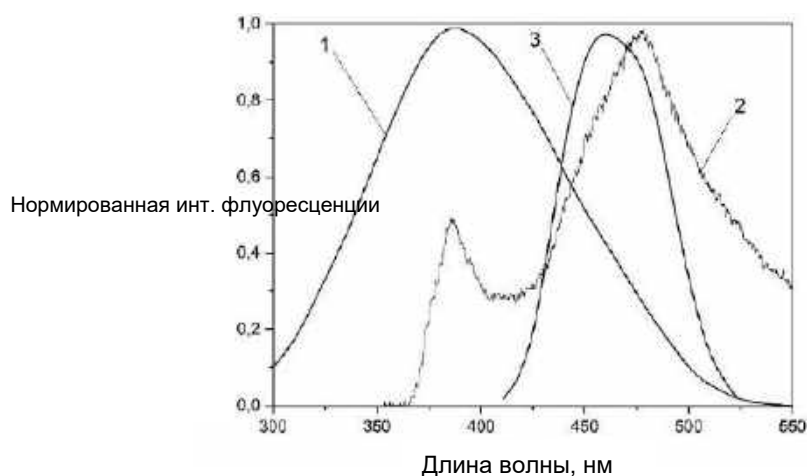


Рисунок 4.6 – Экспериментальные спектры флуоресценции чистого коллагена в пробирке (1), кожи в естественных условиях (2), а также смоделированного спектра флуоресценции коллагена с 5 %-ным содержанием в крови в дерме (3)

По результатам моделирования было получено семейство модельных спектров при изменении меланина в диапазоне 1-43 % (рисунок 4.7а). Как видно, после 15 %-ого содержания меланина сигнал флуоресценции практически отсутствует.

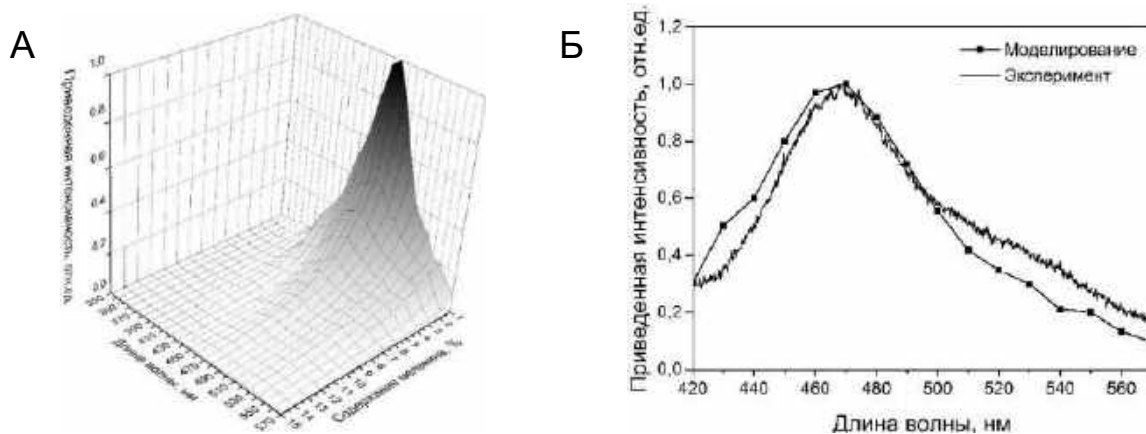


Рисунок 4.7 – Семейство модельных спектров, рассчитанных методом Монте-Карло (а), сравнение экспериментального и модельного спектров (б) для европейского типа кожи с 1 %-ным содержанием меланина

Стоит отметить некоторое отличие представленных модельных спектров от полученных экспериментальным путем суммарных спектров различных компонент (рисунок 4.6б). Более интенсивный экспериментальный сигнал в области 500-570 нм может быть обусловлен тем, что в суммарный спектр флуоресценции кожи в реальных условиях могут вносить вклад другие различные флуорофоры (FAD, пиридоксин и др.), не учитываемые при моделировании. Также в модификацию вида реального экспериментального спектра в диапазоне 400-480 нм вносят вклад и другие хромофоры (билирубин, порфирины, каратиноиды и др.), не включенные в моделирование, что также может вносить отличия в модельные и экспериментальные спектры [188].

Одной из проблем метода ФС является учет потерь интенсивности возбуждающего излучения, что в конечном итоге затрудняет калибровку данного типа диагностических устройств, а именно установлению зависимости между показаниями прибора и размером измеряемой величины. Таким образом, влияние меланина следует учитывать, как при калибровке средств регистрации сигнала флуоресценции, так и при обосновании медико-технических требований к приборам ФС.

Полученные результаты необходимо учитывать при проектировании электронных узлов устройства. Так, например, необходимо

предъявлять особые требования к выбору фотоприемника, так как необходима высокая фотометрическая точность.

Ниже приведен сравнительный анализ ПЗС-фотоприемников TCD1304AP и ILX511, широко применяемых в современной спектроскопии, и оценено отношение сигнал/шум (SNR) регистрируемого детектором сигнала. Целью расчета являлось определение пороговых (минимальных) значений потока излучения, попадающего на приемник, при которых уровень полезного сигнала равен значению темнового шума ПЗС, так как предполагается, что он вносит доминирующий вклад в общий шум фотоприемника. Проведенные расчеты показали, что при малом содержании меланина в коже на уровне 1 % SNR при времени накопления 10 мс составляет 60-70 дБ. При увеличении пигментации SNR уменьшается и на уровне 11-12 % составляет 0-5 дБ, что в итоге затрудняет выделение полезного низкоинтенсивного сигнала флуоресценции на фоне шумов. В абсолютных фотометрических величинах этому соответствует значение потока излучения $2,92 \cdot 10^{-15}$ Вт для TCD1304AP и $6,15 \cdot 10^{-15}$ Вт для ILX511. ПЗС-линейка ILX511 несмотря на более высокую чувствительность в целом обладает более худшим соотношением сигнал/шум, что иллюстрирует рисунок 4.8.

Таким образом, полученные результаты подтверждают необходимость обоснования медико-технических требований при проектировании оптико-электронных узлов приборов как в частности для ФС, так и в целом для неинвазивной диагностики в медицине.

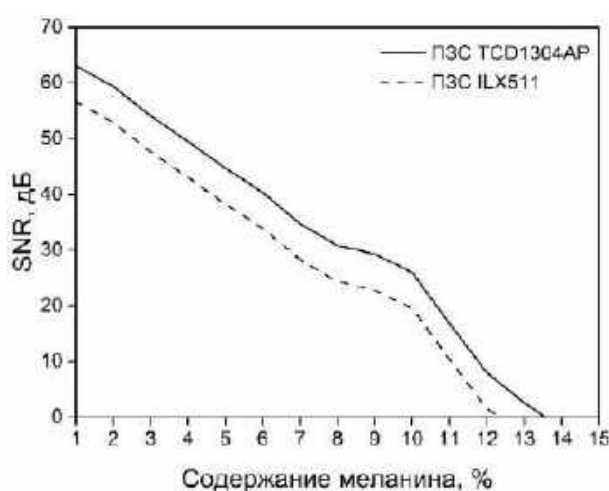


Рисунок 4.8 – Зависимость соотношения сигнал/шум от содержания меланина

На основе разработанной оптической модели и дальнейшего моделирования методом Монте-Карло, можно предсказать общее распространение света в ткани. Это может представлять интерес для различных неинвазивных оптических методов исследования и, в конечном счете, привести к развитию потенциально новых направлений моделирования и диагностики.

4.2 Численное моделирование параметров диагностирования мочевого пузыря

Были исследованы секции свежего мочевого пузыря свиньи, предоставленные поставщиком (WETLAB) (рисунок 4.9).



Рисунок 4.9 – Образцы мочевого пузыря свиньи

Исследование оптических свойств цельной стенки мочевого пузыря было выполнено в спектральном диапазоне 350-1800 нм на спектрофотометре Lambda 1050 (PerkinElmer, USA) с интегрирующей сферой, представляющей собой двухканальный двойной дифракционный монохроматор со встроенной системой управления и регистрации сигнала.

На рисунке 4.10 показаны спектры полного пропускания и диффузного отражения образца мочевого пузыря свиньи, измеренные на спектрофотометре Lambda 1050.

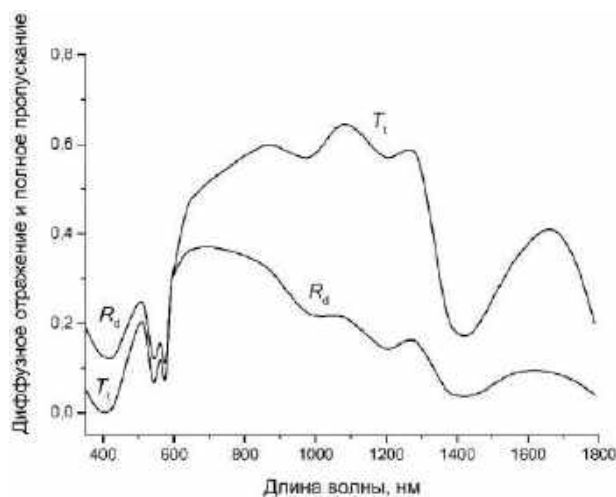


Рисунок 4.10 – Спектры полного пропускания (T_t) и диффузного отражения (R_d) образца мочевого пузыря свиньи

Помимо спектрофотометрического анализа образцы подвергались флуоресцентному анализу с помощью вышеописанного диагностического устройства «ЛАКК-М». Волоконный зонд устройства устанавливался в непосредственный контакт с тканью мочевого пузыря. Ткань сканировалась последовательно с помощью четырех различных источников возбуждения (365, 450, 532, 635 нм). Результирующая флуоресценция тканей была записана в диапазоне длин волн 300-800 нм. Вся процедура проводилась при комнатной температуре в темном помещении без окон, чтобы ограничить погрешность шумовой засветки.

Для обработки результатов экспериментов и определения оптических параметров использовался инверсный метод «добавления-удвоения» (ИДУ) [189], широко применяемый в оптике биотканей для обработки данных спектрофотометрии с использованием интегрирующих сфер.

Метод ИДУ позволяет определять коэффициент поглощения и транспортный коэффициент рассеяния биоткани, используя значения коэффициентов диффузного отражения и полного пропускания. При проведении расчетов фиксировался фактор анизотропии g . Для данного случая g полагалось равным 0,9, поскольку такое значение наиболее типично для большинства биотканей в видимом и ближнем инфракрасном (ИК) спектральных диапазонах [190].

Для корректировки потерь света на краях образца в последней версии программы используется расчет методом Монте-Карло. Потерянный свет учитывается в следующей итерации оценки оптических свойств инверсным методом «добавления-удвоения». Этот процесс повторяется до тех пор, пока оптические свойства не стабилизируются.

На рисунках 4.11 и 4.12 показаны спектры транспортных коэффициентов поглощения и рассеяния, полученные с помощью моделирования по методу ИДУ.

Для сравнения на рисунках 4.11 и 4.12 приведены экспериментальные данные, представленные в [191]. Видно, что они достаточно хорошо согласуются с полученными нами. Некоторые несоответствия обусловлены использованием различных методов обработки экспериментальных данных, а также различием свойств конкретных образцов биоткани.

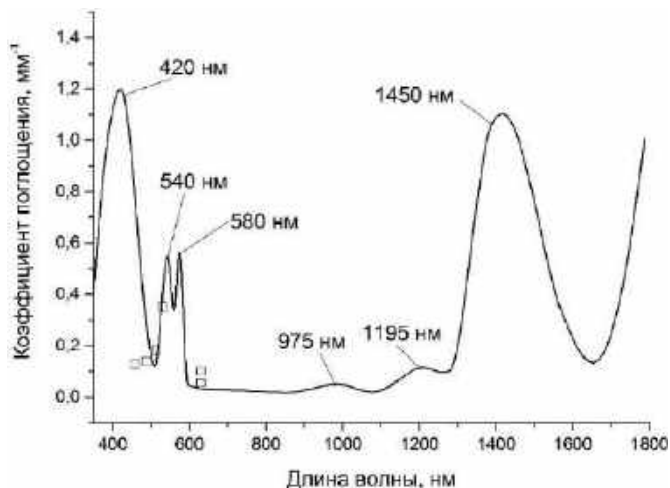


Рисунок 4.11 – Коэффициент поглощения образца мочевого пузыря свиньи

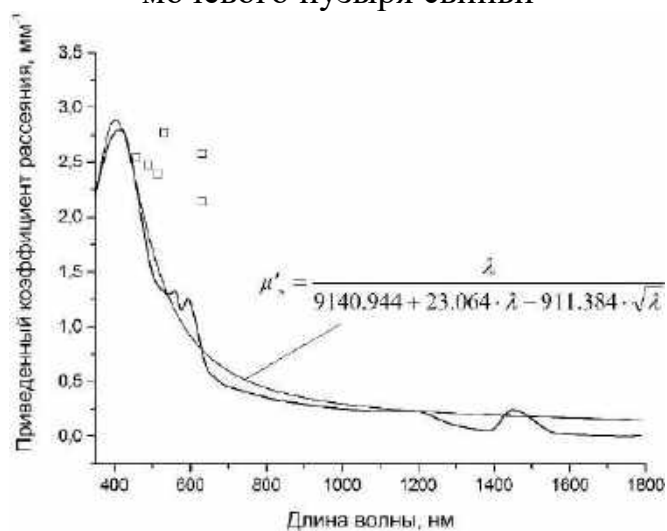


Рисунок 4.12 – Транспортный коэффициент рассеяния образца мочевого пузыря свиньи

В спектрах поглощения хорошо видны полосы поглощения гемоглобина крови (420, 540 и 580 нм) и воды (1195 нм). Менее выражены пики поглощения воды на 975 и 1195 нм. Для коэффициента рассеяния видно, как он спадает с увеличением длины волны, что согласуется с

общим поведением рассеивающих характеристик биотканей. Отклонение от монотонности обусловлено влиянием сильного поглощения в этих областях.

Стоит отметить, что полученную зависимость для транспортного коэффициента рассеяния в рассматриваемом диапазоне с большой точностью ($R^2 = 0,97$) можно аппроксимировать степенной функцией Гунари:

$$\mu'_s = \frac{\lambda}{9140,944 + 23,064 \cdot \lambda - 911,384 \cdot \sqrt{\lambda}}. \quad (4.12)$$

Глубина проникновения света является одной из важнейших характеристик для определения возможностей различных методов неинвазивной оптической диагностики, в том числе и флуоресцентной спектроскопии. Оценка глубины проникновения излучения в биоткань осуществлялась с использованием нижеприведенной формулы:

$$\delta = \frac{1}{\sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)}}. \quad (4.13)$$

Результат приведен на рисунке 4.13.

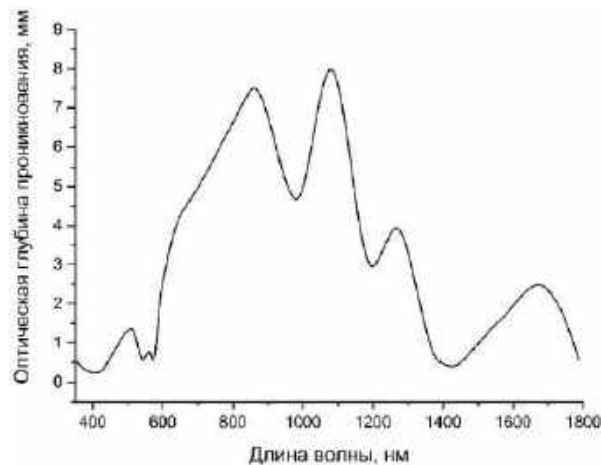


Рисунок 4.13 – Глубина проникновения излучения в ткань мочевого пузыря (диагностический объем)

В области спектра, представляющей интерес для флуоресцентной спектроскопии (350-600 нм), глубина проникновения излучения составляет 0,5-2 мм, что позволяет возбуждать флуоресценцию основных биомаркеров (NADH, FAD, коллаген и др.).

Далее полученные коэффициенты использовались при построении модели в программной среде TracePro. Было проведено численное

моделирование по методу Монте-Карло. В настоящее время это один из самых часто используемых методов для описания распространения света в биотканях. Главной идеей метода является учет явлений поглощения и рассеяния на всем оптическом пути фотона через непрозрачную среду. Для интересующего диапазона длин волн (360-610 нм) для ткани были заданы показатель преломления n , коэффициенты рассеяния μ_s , поглощения μ_a и фактор анизотропии g .

Ткань мочевого пузыря имеет сложную структуру и, следовательно, для теоретического моделирования, была построена упрощенная двухслойная оптическая модель. Падающее излучение, проходя через слизистую, частично поглощается и возбуждает флуоресценцию NADH. Пройдя часть попадает в мышечный слой, где также поглощается и диффузно отражается от волокон коллагена и других структурных компонент и вновь проходит через слои, поглощаясь и достигая детектора.

В итоге была получена модель, представленная на рисунке 4.14.

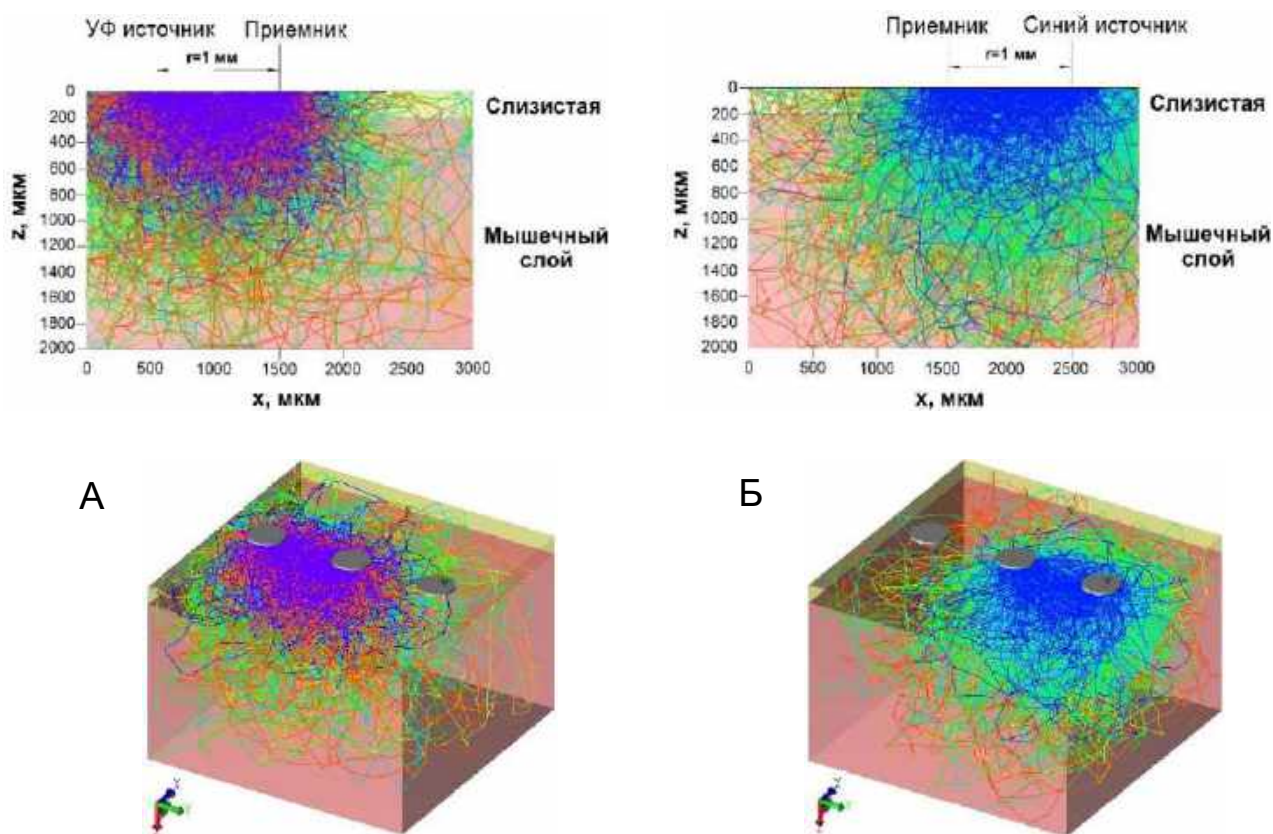


Рисунок 4.14 – Вид сбоку и полный вид 3D-модели, имитирующей прохождение излучения флуоресценции в ткани при возбуждении УФ (365 нм) длиной волны (а); вид сбоку и полный вид 3D-модели, имитирующей прохождение излучения флуоресценции в ткани при возбуждении синей (450 нм) длиной волны (б)

Расстояние между излучателем и приемником (так называемая, база измерений) было выбрано $r = 1$ мм. Диаметр приемника $d = 0,06$ мм (аналог волокна МЛНДК «ЛАКК-М»).

Из представленного рисунка видно, что диагностический объем составляет около 1-1,3 мм.

По результатам моделирования были получены спектры флуоресценции. Сравнение данных спектров с экспериментально полученными представлено на рисунке 4.15.

Наблюдается хорошая согласованность модельного и экспериментального спектров. Некоторые различия могут быть обусловлены наличием в реальной ткани флуоресценции других флуорофоров, которые не учитывались при моделировании. Также в модификацию вида реального экспериментального спектра могут вносить вклад и другие различные хромофоры-поглощители.

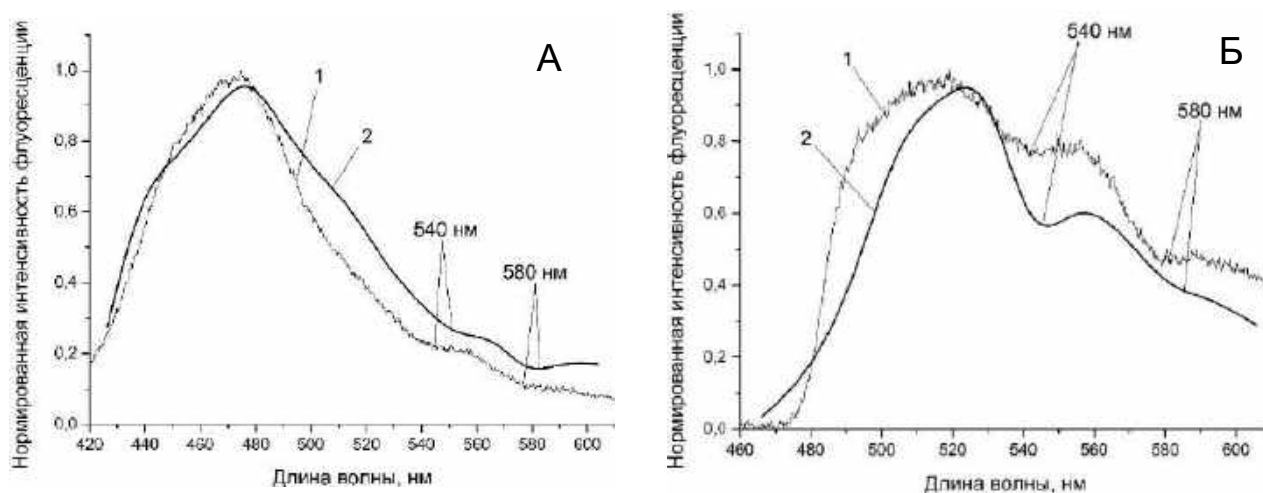


Рисунок 4.15 – Сравнение экспериментальных спектров (1) и модельных (2), рассчитанных с помощью метода Монте-Карло. Модель имитирует присутствие NADH + коллагена (а) и FAD + коллагена (б)

Кроме того, можно сделать вывод, что форма экспериментального спектра флуоресценции мочевого пузыря тканей во многом зависит от флуоресценции NADH и коллагена (при возбуждении 365 нм) или FAD и коллагена (при возбуждении 450 нм). Аналогичный вывод был сделан в [192, 193] при изучении ткани шейки матки с помощью флуоресцентной микроскопии. Исследования указывают, что митохондриальные NADH и FAD доминируют при флуоресценции эпителиальных клеток.

Таким образом, предложенная модель может быть использована для прямого сравнения с данными ФС *in vivo* для определения клинической ценности исследований. Также она позволяет моделировать влияние прогрессирования рака мочевого пузыря на оптические свойства ткани, обеспечивая диагностические критерии, по которым следует исследовать опухоли и проводить их классификацию.

ГЛАВА 5

**РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ВРЕМЕНИ ЖИЗНИ
ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ
СООТНОШЕНИЯ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ КОМПОНЕНТОВ
В ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ТКАНИ**

Предположим, что образец биоткани содержит флуорофор, который возбуждается δ -импульсом возбуждающего излучения. Это приведет к появлению молекул населенностью (n_0), находящихся в возбужденном состоянии. Переход молекул в основное состояние описывается уравнением:

$$\frac{dn(t)}{dt} = -(\Gamma + k_{nr})n(t), \quad (5.1)$$

где $n(t)$ – число молекул, находящихся в возбужденном состоянии,
 Γ – коэффициент перехода молекул из возбужденного состояния в основное с излучением квантов флуоресценции;
 k_{nr} – коэффициент безызлучательного перехода молекул в основное состояние.

Решением данного уравнения является экспоненциальная функция $n(t) = n_0 \exp(-t / \tau)$. С учетом того, что интенсивность излучения флуоресценции пропорциональна $I(t) \sim n(t)$, можно записать:

$$I(t) = I_0 \exp(-t / \tau). \quad (5.2)$$

Время жизни флуоресценции является величиной обратной полному коэффициенту интенсивности перехода флуоресцирующих объектов из возбужденного состояния в основное:

$$\tau = (\Gamma + k_{nr})^{-1}. \quad (5.3)$$

Одним из двух основных методов определения времени жизни флуоресценции является метод определения в частотной области (frequency-domain method). Пусть интенсивность возбуждающего излучения изменяется по синусоидальному закону с соотношением b/a , где a – средняя интенсивность возбуждающего излучения, b – размах колебания от пика до пика. В таком случае интенсивность флуоресценции будет изменяться также по синусоидальному закону с параметрами модуляции, задаваемыми отношением B/A , где A – это средний уровень интенсивности флуоресценции, B – размах колебания интенсивности флуоресценции от пика до пика. Коэффициент модуляции флуоресценции измеряется относительно изменения интенсивности возбуждения:

$$m = (B / A) / (b / a). \quad (5.4)$$

Кроме коэффициента модуляции, другим важным показателем, характеризующим время жизни флуоресценции, является наблюдаемый фазовый сдвиг изменения интенсивности флуоресценции относительно изменения интенсивности возбуждающего излучения (чаще всего отсчитывается по моментам времени перехода переменной составляющей сигнала через нуль).

Оба показателя фазовый угол ϕ и коэффициент модуляции m могут быть использованы для получения двух различных оценок времени жизни флуоресценции τ с помощью следующих основных выражений:

$$\tau_{\phi} = \omega^{-1} \tan(\phi), \quad (5.5)$$

$$\tau_m = 1 / \omega [1 / m^2 - 1]^{1/2}. \quad (5.6)$$

Таким образом, метод определения времени жизни флуоресценции в частотной области в рамках одного измерения позволяет получить сразу две оценки процесса спада флуоресценции во времени. Две данные величины далее естественным образом позволяют применить метод анализа комплексных амплитуд.

Одним из современных методов определения количественного содержания флуоресцирующих компонентов в смеси является метод, базирующийся на применении комплексных амплитуд в анализе спек-

тров интенсивности и времени жизни. Данный метод находит относительно широкое применение в анализе данных, полученных методами флуоресцентной микроскопии. Одним из перспективных направлений является применение данной группы методов в анализе спектров, получаемых в измерениях *in vivo* и *in situ* для задач количественного определения метаболической активности эпителиальных тканей.

Для случая одноэкспонентного спада флуоресценции после импульсного возбуждения оценки τ_m и τ_ϕ равны. Однако для случая флуоресцирующей смеси компонентов это утверждение несправедливо. На комплексной плоскости, если спад флуоресценции – одноэкспоненциальный $I(t) = Ae^{-t/\tau}$, координаты точки можно представить в виде известных выражений для комплексной передаточной функции инерционного звена первого порядка (апериодического звена):

$$g(\omega) = \frac{1}{1 + (\omega\tau)^2}, \quad (5.7)$$

$$s(\omega) = \frac{\omega\tau}{1 + (\omega\tau)^2}, \quad (5.8)$$

где τ – время жизни (постоянная времени спада) флуоресценции,
 ω – частота модуляции возбуждающего излучения.

Можно показать, что существует зависимость между видом годографа, описываемого выражениями (5.7), (5.8), и параметром τ . Все возможные времена τ будут лежать на полуокружности проходящей через точки (0,0) и (1,0) с радиусом 0,5. Точка (1,0) соответствует $\tau = 0$, в то время как точка (0,0) соответствует $\tau = \infty$. На комплексно плоскости времена жизни флуоресценции складываются в соответствии с правилами векторной алгебры. Так смесь из двух различных флуоресцирующих компонентов с одноэкспоненциальным спадом интенсивности флуоресценции (точки которых лежат на различных участках полуокружности комплексной плоскости), дают результирующую точку, которая находится внутри полуокружности и лежит на прямой, соединяющей точки исходных компонентов смеси. В системах с большим количеством компонентов, координаты g и s могут быть найдены как:

$$g(\omega) = \sum_k \frac{h_k}{1 + (\omega\tau_k)^2}, \quad (5.9)$$

$$s(\omega) = \sum_k \frac{h_k \omega \tau_k}{1 + (\omega\tau_k)^2}, \quad (5.10)$$

где h_k – доля вклада компонента с временем жизни τ_k в общую регистрируемую интенсивность на данной длине волны.

С другой стороны, для смеси компонентов τ_m и τ_ϕ в общем случае не равны друг другу. При их оценке в частотной области $g(\omega)$ и $s(\omega)$ могут быть оценены с помощью простых выражений:

$$g(\omega) = m \cos(\phi), \quad (5.11)$$

$$s(\omega) = m \sin(\phi). \quad (5.12)$$

Таким образом, для количественного определения соотношения флуоресцирующих компонентов необходим анализ не только времени жизни флуоресценции, но и также интенсивность регистрируемого излучения. Как известно, на интенсивность регистрируемой флуоресценции также сильное влияние оказывают поглощающие компоненты биологической ткани, наиболее важными из которых являются компоненты крови (гемоглобин, оксигемоглобин), а также пигмент меланин.

Для общего случая с учетом (5.9), (5.10) можно записать:

$$G(\omega) = \sum_n f_n g_n(\omega), \quad (5.13)$$

$$S(\omega) = \sum_n f_n s_n(\omega), \quad (5.14)$$

где f_n – доля вклада каждого компонента, характеризуемая фазовыми координатами $g_n(\omega)$ и $s_n(\omega)$.

Для двухкомпонентных смесей все возможные сочетания смеси приведут к тому, что все возможные соответствующие точки на фазовой комплексной плоскости будут лежать на прямой, соединяющей две точки, лежащие на главной полуокружности и соответствующие фазовым точкам исходных компонентов смеси (рисунок 5.1).

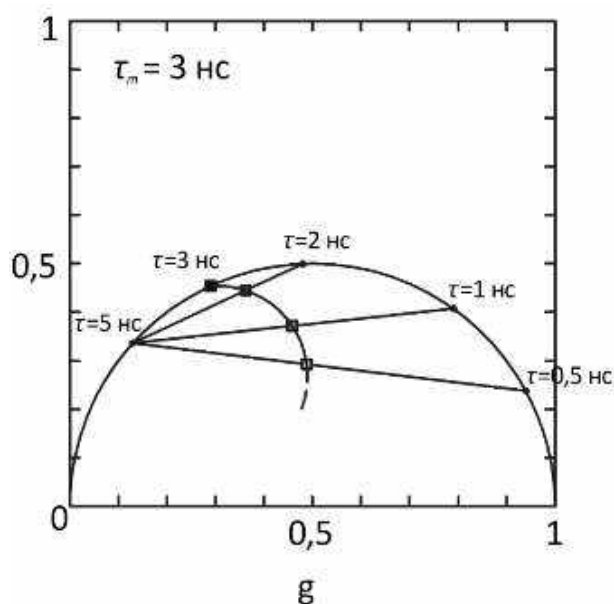


Рисунок 5.1 – К пояснению расположения фазовых точек для смеси флуоресцирующих компонентов

На рисунке 5.1 предоставлено расположения фазовых точек для смеси различных флуоресцирующих компонентов. Пусть регистрируемое время жизни флуоресценции 3 нс. Этому случаю, например, может соответствовать одно вещество с временем жизни 3 нс, либо смесь из двух компонентов временами жизни 5 и 2 нс, 5 нс и 1 нс, 5 нс и 0,5 нс. На рисунке 5.1 представлены соответствующие случаи.

Для смеси из трех компонентов возможные точки фазовой плоскости будут лежать в соответствующем треугольнике. Фазовые точки для n -компонентной смеси будут располагаться в пределах соответствующего n -угольника.

Таким образом, в рамках представленного подхода расчет соотношения флуоресцирующих компонентов в смеси наиболее естественно решается посредством решения системы уравнений (5.13), (5.14). Исходными данными для подобного анализа являются априорная информация о составе смеси, известные параметры флуоресценции компонентов (время жизни, квантовый выход), а также результаты измерения интенсивности и времени жизни флуоресценции для данной смеси на данной длине волны.

Следует отметить, что измерения с использованием различных частот модуляции позволяют разрешить состав более сложных смесей. Например, точке 1 на рисунке 4.2, а, измеренной с частотой модуляции 80 МГц, может соответствовать смесь из двух флуоресцирующих ком-

понентов с временами жизни 8 нс и 0,3 нс или 3 нс и 0,1 нс. Последующее измерение с частотой 160 МГц позволяет идентифицировать и разделить оба случая. Как видно из рисунка 5.2 увеличение частоты модуляции позволяет лучше идентифицировать компоненты с меньшим временем жизни (например, коллагены различных типов).

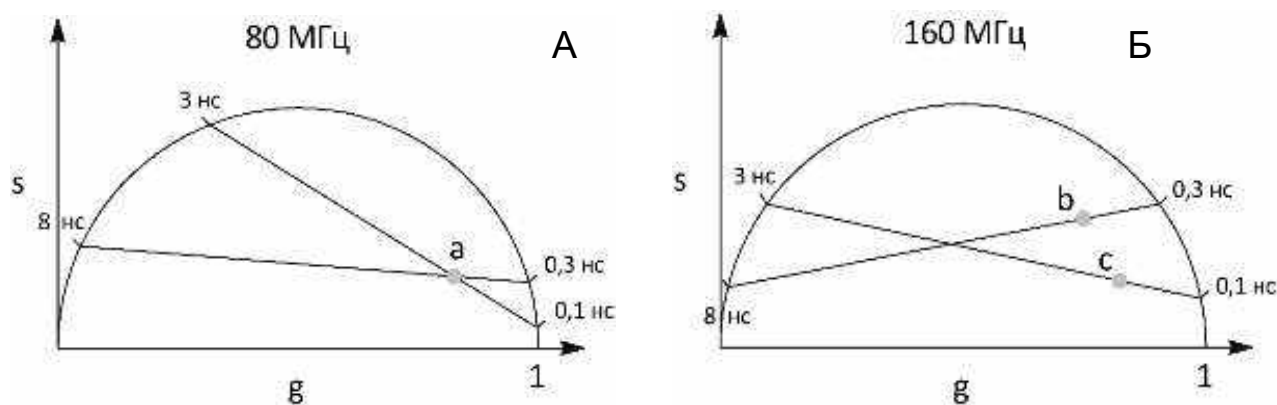


Рисунок 5.2 – Разделение компонентов с использованием различных частот

Таким образом, измерения на различных частотах модуляции возбуждающего излучения позволяют составить систему уравнений на базе выражений (5.13), (5.14), решив которую удастся получить количественную оценку соотношения флуоресцирующих компонентов в эпителиальной ткани. Перед тем как выполнять данную стадию обработки экспериментальных данных необходимо произвести компенсацию влияния сильно поглощающих хромофоров ткани (главным образом гемоглобина, оксигемоглобина, меланина). Применение подобного подхода позволяет избежать процедуры фиттинга с использованием аналитических моделей. Таким образом удастся избежать проблем, связанных с использованием фиттинга: значительных затрат времени, проблемы сходимости и связанной с этим не высокой точности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создание и применение компактных оптических приборов для измерения параметров флуоресценции биологических тканей, в том числе с использованием технологий визуализации, является одним из многообещающих направлений *in vivo* диагностики границ опухоли при скрининге и оперативном лечении.

В настоящее время научную и практическую новизну представляет разработка научных основ проработки технологии оптической диагностики с измерением интенсивности и времени жизни флуоресценции (в частотной области) в спектральном диапазоне 400-700 нм, сопровождающихся дополнительными оптическими измерениями параметров кровенаполнения, что позволит впервые реализовать достоверное измерение митохондриальной функции в эпителиальных тканях.

В монографии проведен комплексный аналитический обзор, включающий в себя анализ научно-технической литературы и научных публикаций и ориентированный на рассмотрение современных подходов к изучению интенсивности и времени жизни флуоресценции в живых тканях. Особое внимание в обзоре уделено методам оценки митохондриальной функции в эпителиальных тканях по данным эндогенной флуоресценции коферментов NADH и FAD. Кроме того, проанализированы вопросы клинического применения спектрально-разрешенной диагностики времени жизни флуоресценции.

Был проведен ряд экспериментальных исследований, направленных на изучение влияния основных поглощающих хромофоров кожи на регистрируемые сигналы флуоресценции. Продемонстрировано, что такие факторы как кровоток и меланин оказывают существенное влияние на регистрируемый уровень интенсивности флуоресценции при возбуждении на длинах волн 365 и 450 нм.

Предложена модель регистрируемой интенсивности флуоресценции, покидающей биологическую ткань. С помощью Монте-Карло моделирования, а также экспериментально, исследованы глубина и диагностический объем проводимой диагностики на примере эпителиальных тканей – кожи человека и мочевого пузыря свиньи. Исследовано

влияние параметров биоткани на соотношение сигнал-шум регистрируемого сигнала в случае использования детектора с зарядовой связью.

Разработаны теоретические основы определения времени жизни флуоресценции с разделением компонентов в смеси в приложении к диагностике эпителиальных тканей.

Выполнены исследования влияния хромофоров ткани на регистрируемый спектр флуоресценции. Теоретически и экспериментально исследовано влияние кровенаполнения, а также содержащихся в ткани фракций меланина.

Монография может стать научной основой при разработке диагностических методов для оценки митохондриальной функции в эпителиальных тканях с помощью флуоресцентной спектроскопии *in vivo*.

Монография предназначена практикующим врачам, специалистам в области медицинского приборостроения и биологической физики, а также может быть полезна учащимся высших учебных заведений, интересующимся проблемами разработки новых медицинских диагностических устройств.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Boas, D.A. Handbook of Biomedical Optics [Text] / D.A. Boas, C. Pitris, N. Ramanujam. – Boca Raton: CRC Press, 2011. – 831 p.
2. Bratchenko, I.A. Combined raman and autofluorescence ex vivo diagnostics of skin cancer in near-infrared and visible regions [Text] / I.A. Bratchenko, D.N. Artemyev, O.O. Myakinin, Y.A. Khristoforova, A.A. Moryatov, S.V. Kozlov, V.P. Zakharov // Journal of Biomedical Optics. – 2017 - Vol. 22. – № 2. – P. 27005.
3. Rafailov, I.E. Computational model of bladder tissue based on its measured optical properties [Text] / I.E. Rafailov, V.V. Dremin, K.S. Litvinova, A.V. Dunaev, S.G. Sokolovski, E.U. Rafailov // Journal of Biomedical Optics. – 2016. – Vol. 21. – № 2. – P. 025006.
4. Dunaev, A.V. Individual variability analysis of fluorescence parameters measured in skin with different levels of nutritive blood flow [Text] / A.V. Dunaev, V.V. Dremin, E.A. Zherebtsov, I.E. Rafailov, K.S. Litvinova, S.G. Palmer, N.A. Stewart, S.G. Sokolovski, E.U. Rafailov // Medical Engineering & Physics. – 2015. – Vol. 37. – № 6. – P. 574-583.
5. Дунаев, А.В. Анализ индивидуальной вариабельности параметров в лазерной флуоресцентной диагностике [Текст] / А.В. Дунаев, В.В. Дрёмин, Е.А. Жеребцов, С.Г. Палмер, С.Г. Соколовский, Э.У. Рафаилов // Биотехносфера. – 2013. – № 2(26). – С. 39-47.
6. Дрёмин, В.В. Влияние содержания меланина в коже на формирование сигнала флуоресцентной спектроскопии [Текст] / В.В. Дрёмин, А.В. Дунаев // Оптический журнал. – 2016. – Т. 83. – № 1. – С. 57-64.
7. Dremin, V.V. The development of attenuation compensation models of fluorescence spectroscopy signals [Text] / V.V. Dremin, E.A. Zherebtsov, I.E. Rafailov, A.Y. Vinokurov, I.N. Novikova, A.I. Zherebtsova, K.S. Litvinova, A.V. Dunaev // Proc. SPIE 9917. – P. 99170Y.
8. Chance, B. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization [Text] / B. Chance, G.R. Williams // Journal of Biological Chemistry. – 1955. – Vol. 217. – P. 383-393.
9. Chance, B. Properties and kinetics of reduced pyridine nucleotide fluorescence of the isolated and in vivo rat heart [Text] / B. Chance, J.R. Williamson, D. Jamieson, B. Schoener // Biochemical Journal. – 1965. – Vol. 341. – P. 357-377.
10. Bartolome, F. Measurement of mitochondrial NADH and FAD autofluorescence in live cells [Text] / F. Bartolome, A.Y. Abramov // Methods in Molecular Biology. – 2015. – Vol. 1264. – P. 263-270.
11. Mayevsky, A. Oxidation-reduction states of NADH in vivo: from animals to clinical use [Text] / A. Mayevsky, B. Chance // Mitochondrion. – 2007. – Vol. 7. – P. 330-339.

12. Papayan, G. Autofluorescence spectroscopy for NADH and flavoproteins redox state monitoring in the isolated rat heart subjected to ischemia-reperfusion [Text] / G. Papayan, N. Petrishchev, M. Galagudza // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2014. – Vol. 11. – № 3. – P. 400-408.
13. Aldakkak, M. Modulation of mitochondrial bioenergetics in the isolated Guinea pig beating heart by potassium and lidocaine cardioplegia: implications for cardioprotection [Text] / M. Aldakkak, D.F. Stowe, E.J. Lesnefsky, J.S. Heisner, Q. Chen, A.K. Camara // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. – 2009. – Vol. 54. – № 4. – P. 298-309.
14. An, J. Warm ischemic preconditioning improves mitochondrial redox balance during and after mild hypothermic ischemia in guinea pig isolated hearts [Text] / J. An, A.K. Camara, S.S. Rhodes, M.L. Riess, D.F. Stowe // *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. – 2005. – Vol. 288. – № 6. – P. H2620-2627.
15. Lakowicz, J.R. Principles of fluorescence spectroscopy [Text] / J.R. Lakowicz. – 2nd ed. – New York: Plenum, 1999. – 698 p.
16. Bufetova, G.A. Zonal doped crystal fibers for temperature measurements [Text] / G.A. Bufetova, V.V. Kashin, D.A. Nikolaev, Y.M. Papin, S.Y. Rusanov, V.F. Seregin, I.A. Shcherbakov, V.B. Tsvetkov, A.A. Yakovlev // *Laser Physics Letters*. – 2007. – Vol. 4. – № 6. – P. 440-443. – ISSN 1612-2011.
17. Bulakov, D.V. The study of structure and photophysical processes of polyelectrolyte-surfactant-dye molecules complex by laser spectroscopy [Text] / D.V. Bulakov, A.M. Saletsky // *Laser Physics Letters*. – 2007. – Vol. 4. – № 7. – P. 515-518. – ISSN 1612-2011.
18. Richards-Kortum, R. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis [Text] / R. Richards-Kortum, E. Sevick-Muraca // *Annual Review of Physical Chemistry*. – 1996. – Vol. 47. – № 1. – P. 555-606. – ISSN 0066-426X.
19. Bird, D.K. Simultaneous two-photon spectral and lifetime fluorescence microscopy [Text] / D.K. Bird, K.W. Eliceiri, C.H. Fan, J.G. White // *Applied Optics*. – 2004. – Vol. 43. – № 27. – P. 5173-5182. – ISSN 1559-128X.
20. Denk, W. 2-photon laser scanning fluorescence microscopy [Text] / W. Denk, J.H. Strickler, W.W. Webb // *Science*. – 1990. – Vol. 248. – № 4951. – P. 73-76. – ISSN 0036-8075.
21. Suhling, K. Time-resolved fluorescence microscopy [Text] / K. Suhling, P.M.W. French, D. Phillips // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2005. – Vol. 4. – № 1. – P. 13-22. – ISSN 1474-905X.
22. Zipfel, W.R. Nonlinear magic: Multiphoton microscopy in the biosciences [Text] / W.R. Zipfel, R.M. Williams, W.W. Webb // *Nature Biotechnology*. – 2003. – Vol. 21. – № 11. – P. 1368-1376. – ISSN 1087-0156.
23. Schweitzer, D. Towards metabolic mapping of the human retina [Text] / D. Schweitzer, S. Schenke, M. Hammer, F. Schweitzer, S. Jentsch, E. Birckner, W. Becker, A. Bergmann // *Microscopy Research and Technique*. – 2007. – Vol. 70. – № 5. – P. 410-419. – ISSN 1059-910X.
24. König, K. High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution [Text] / K. König,

I. Riemann // *Journal of Biomedical Optics*. – 2003. – Vol. 8. – № 3. – P. 432-439. – ISSN 1083-3668.

25. Niesner, R. Noniterative biexponential fluorescence lifetime imaging in the investigation of cellular metabolism by means of NAD(P)H autofluorescence [Text] / R. Niesner, B. Peker, P. Schlusche, K.H. Gericke // *Chemphyschem*. – 2004. – Vol. 5. – № 8. – P. 1141-1149. – ISSN 1439-4235.

26. Cheng, Y. Spectrally and time-resolved study of NAD(P)H autofluorescence in cardiac myocytes from human biopsies [Text] / Y. Cheng, D.J. Chorvat, N. Poirier, J. Miró, N. Dahdah, A. Chorvatova // *Proc. SPIE* 6771. – P. 677104.

27. Blinova, K. Distribution of mitochondrial NADH fluorescence lifetimes: Steady-state kinetics of matrix NADH interactions [Text] / K. Blinova, S. Carroll, S. Bose, A.V. Smirnov, J.J. Harvey, J.R. Knutson, R.S. Balaban // *Biochemistry*. – 2005. – Vol. 44. – № 7. – P. 2585-2594. – ISSN 0006-2960.

28. Vishwasrao, H.D. Conformational dependence of intracellular NADH on metabolic state revealed by associated fluorescence anisotropy [Text] / H.D. Vishwasrao, A.A. Heikal, K.A. Kasischke, W.W. Webb // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280. – № 26. – P. 25119-25126. – ISSN 0021-9258.

29. Evans, N.D. Glucose-dependent changes in NAD(P)H-related fluorescence lifetime of adipocytes and fibroblasts in vitro: Potential for non-invasive glucose sensing in diabetes mellitus [Text] / N.D. Evans, L. Gnudi, O.J. Rolinski, D.J.S. Birch, J.C. Pickup // *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*. – 2005. – Vol. 80. – № 2. – P. 122-129. – ISSN 1011-1344.

30. Guo, H.-W. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence lifetime separates human mesenchymal stem cells from differentiated progenies [Text] / H.-W. Guo, C.-T. Chen, Y.-H. Wei, O.K. Lee, V. Gukassyan, F.-J. Kao, H.-W. Wang // *Journal of Biomedical Optics*. – 2008. – Vol. 13. – № 5. – P. 050505-1-3. – ISSN 1083-3668.

31. Skala, M.C. In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia [Text] / M.C. Skala, K.M. Riching, A. Gendron-Fitzpatrick, J. Eickhoff, K.W. Eliceiri, J.G. White, N. Ramanujam // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2007. – Vol. 104. – № 49. – P. 19494-19499. – ISSN 0027-8424.

32. Skala, M.C. In vivo multiphoton fluorescence lifetime imaging of protein-bound and free nicotinamide adenine dinucleotide in normal and precancerous epithelia [Text] / M.C. Skala, K.M. Riching, D.K. Bird, A. Gendron-Fitzpatrick, J. Eickhoff, K.W. Eliceiri, P.J. Keely, N. Ramanujam // *Journal of Biomedical Optics*. – 2007. – Vol. 12. – № 2. – P. 024014. – ISSN 1083-3668.

33. Sud, D. Time-resolved optical imaging provides a molecular snapshot of altered metabolic function in living human cancer cell models [Text] / D. Sud, W. Zhong, D.G. Beer, M.A. Mycek // *Optics Express*. – 2006. – Vol. 14. – № 10. – P. 4412-4426. – ISSN 1094-4087.

34. Ramanujan, V.K. Multiphoton fluorescence lifetime contrast in deep tissue imaging: prospects in redox imaging and disease diagnosis [Text] / V.K. Ramanujan,

J.H. Zhang, E. Biener, B. Herman // *Journal of Biomedical Optics*. – 2005. – Vol. 10. – № 5. – P. 051407. – ISSN 1083-3668.

35. Wang, H.-W. Differentiation of apoptosis from necrosis by dynamic changes of reduced nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence lifetime in live cells [Text] / H.-W. Wang, V. Gukassyan, C.-T. Chen, Y.-H. Wei, H.-W. Guo, J.-S. Yu, F.-J. Kao // *Journal of Biomedical Optics*. – 2008. – Vol. 13. – № 5. – P. 054011. – ISSN 1083-3668.

36. Chorvat, D. Spectrally resolved time-correlated single photon counting: a novel approach for characterization of endogenous fluorescence in isolated cardiac myocytes [Text] / D. Chorvat, A. Chorvatova // *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*. – 2006. – Vol. 36. – № 1. – P. 73-83. – ISSN 0175-7571.

37. Provenzano, P.P. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression [Text] / P.P. Provenzano, D.R. Inman, K.W. Eliceiri, J.G. Knittel, L. Yan, C.T. Rueden, J.G. White, P.J. Keely // *BMC Medicine*. – 2008. – Vol. 6. – № 1. – P. 11. – ISSN 1741-7015.

38. Hammer, M. Intrinsic tissue fluorescence in an organotypic perfusion culture of the porcine ocular fundus exposed to blue light and free radicals [Text] / M. Hammer, S. Richter, K. Kobuch, N. Mata, D. Schweitzer // *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. – 2008. – Vol. 246. – № 7. – P. 979-988. – ISSN 0721-832X.

39. Provenzano, P.P. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion [Text] / P.P. Provenzano, K.W. Eliceiri, J.M. Campbell, D.R. Inman, J.G. White, P.J. Keely // *BMC Medicine*. – 2006. – Vol. 4. – № 1. – P. 38. – ISSN 1741-7015.

40. Birch, D.J.S. Metabolic sensing using fluorescence [Text] / D.J.S. Birch, A. Ganesan, J. Karolin // *Synthetic Metals*. – 2005. – Vol. 155. – № 2. – P. 410-413. – ISSN 0379-6779.

41. Ehlers, A. Multiphoton fluorescence lifetime imaging of human hair [Text] / A. Ehlers, I. Riemann, M. Stark, K. König // *Microscopy Research and Technique*. – 2007. – Vol. 70. – № 2. – P. 154-161. – ISSN 1059-910X.

42. Chen, H.M. Time-resolved autofluorescence spectroscopy for classifying normal and premalignant oral tissues [Text] / H.M. Chen, C.P. Chiang, C. You, T.C. Hsiao, C.Y. Wang // *Lasers in Surgery and Medicine*. – 2005. – Vol. 37. – № 1. – P. 37-45. – ISSN 0196-8092.

43. Glanzmann, T. Tissue characterization by time-resolved fluorescence spectroscopy of endogenous and exogenous fluorochromes: Apparatus design and preliminary results [Text] / I.J. Bigio, W.S. Grundfest, H. Schneckenburger, K. Svanberg, P.M. Viallet, A. Katzir // *Proc. SPIE* 2926. – P. 41-50.

44. Kress, M. Time-resolved microspectrofluorometry and fluorescence lifetime imaging of photosensitizers using picosecond pulsed diode lasers in laser scanning microscopes [Text] / M. Kress, T. Meier, R. Steiner, F. Dolp, R. Erdmann, U. Ortmann, A. Rück // *Journal of Biomedical Optics*. – 2003. – Vol. 8. – № 1. – P. 26-32. – ISSN 1083-3668.

45. Cubeddu, R. Use of time-gated fluorescence imaging for diagnosis in biomedicine [Text] / R. Cubeddu, P. Taroni, G. Valentini, G. Canti // *Journal*

of Photochemistry and Photobiology B-Biology. – 1992. – Vol. 12. – № 1. – P. 109-113. – ISSN 1011-1344.

46. Fang, Q.Y. Time-domain laser-induced fluorescence spectroscopy apparatus for clinical diagnostics [Text] / Q.Y. Fang, T. Papaioannou, J.A. Jo, R. Vaitha, K. Shastry, L. Marcu // Review of Scientific Instruments. – 2004. – Vol. 75. – № 1. – P. 151-162. – ISSN 0034-6748.

47. O'Connor, D.V. Time-correlated single photon counting [Text] / D.V. O'Connor, D. Phillips. – London: Academic Press, 1984. – 288 p.

48. Elson, D. Time-domain fluorescence lifetime imaging applied to biological tissue [Text] / D. Elson, J. Requejo-Isidro, I. Munro, F. Reavell, J. Siegel, K. Suhling, P. Tadrous, R. Benninger, P. Lanigan, J. McGinty, C. Talbot, B. Treanor, S. Webb, A. Sandison, A. Wallace, D. Davis, J. Lever, M. Neil, D. Phillips, G. Stamp, P. French // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2004. – Vol. 3. – № 8. – P. 795-801. – ISSN 1474-905X.

49. Becker, W. Advanced time-correlated single photon counting techniques [Text] / W. Becker. – Berlin: Springer, 2005. – Vol. 81: Springer Series in Chemical Physics. – 426 p.

50. Rüeck, A. SLIM: A new method for molecular imaging [Text] / A. Rüeck, C.H. Hüelshoff, I. Kinzler, W. Becker, R. Steiner // Microscopy Research and Technique. – 2007. – Vol. 70. – № 5. – P. 485-492. – ISSN 1059-910X.

51. Straume, M. Volume 2: Principles [Text] / M. Straume, S.G. Frasier-Cadoret, M.L. Johnson // Topics in fluorescence spectroscopy. / Ed. by J.R. Lakowicz. – New York: Plenum, 1991. – P. 177-240.

52. Williams, B.W. Effect of proteins on fluorophore lifetime heterogeneity in lipid bilayers [Text] / B.W. Williams, A.W. Scotto, C.D. Stubbs // Biochemistry. – 1990. – Vol. 29. – № 13. – P. 3248-3255. – ISSN 0006-2960.

53. Pelet, S. Comparing the quantification of forster resonance energy transfer measurement accuracies based on intensity, spectral, and lifetime imaging [Text] / S. Pelet, M.J.R. Previte, P.T.C. So // Journal of Biomedical Optics. – 2006. – Vol. 11. – № 3. – P. 34017. – ISSN 1083-3668.

54. Brochon, J.-C. Maximum-entropy method of data-analysis in time-resolved spectroscopy [Text] / J.-C. Brochon // Methods in Enzymology. – 1994. – Vol. 240. – P. 262-311. – ISSN 0076-6879.

55. Knutson, J.R. Simultaneous analysis of multiple fluorescence decay curves – A global approach [Text] / J.R. Knutson, J.M. Beechem, L. Brand // Chemical Physics Letters. – 1983. – Vol. 102. – № 6. – P. 501-507. – ISSN 0009-2614.

56. Verveer, P.J. Global analysis of fluorescence lifetime imaging microscopy data [Text] / P.J. Verveer, A. Squire, P.I.H. Bastiaens // Biophysical Journal. – 2000. – Vol. 78. – № 4. – P. 2127-2137. – ISSN 0006-3495.

57. Lakowicz, J.R. On spectral relaxation in proteins [Text] / J.R. Lakowicz // Photochemistry and Photobiology. – 2000. – Vol. 72. – № 4. – P. 421-437. – ISSN 0031-8655.

58. Chorvat, D.J. Spectral unmixing of flavin autofluorescence components in cardiac myocytes [Text] / D.J. Chorvat, J. Kirchnerova, M. Cagalinec, J. Smolka,

A. Mateasik, A. Chorvatova // *Biophysical Journal*. – 2005. – Vol. 89. – № 6. – P. L55-L57. – ISSN 0006-3495.

59. Kocanova, S. Multispectral confocal fluorescence imaging: Monitoring of intracellular distribution of PKC influenced by photoactive drug hypericin [Text] / S. Kocanova, A. Mateasik, D. Chorvat, Jr., R. Miskovsky // *Laser Physics Letters*. – 2005. – Vol. 2. – № 1. – P. 43-47. – ISSN 1612-2011.

60. Chorvat, D., Jr. Application of spectral unmixing in multi-wavelength time-resolved spectroscopy [Text] / D. Chorvat, Jr., A. Mateasik, J. Kirchnerova, A. Chorvatova // *Proc. SPIE* 6771. – P. 677105-12.

61. Koti, A.S.R. Time-resolved area-normalized emission spectroscopy (TRANES): A novel method for confirming emission from two excited states [Text] / A.S.R. Koti, M.M.G. Krishna, N. Periasamy // *Journal of Physical Chemistry A*. – 2001. – Vol. 105. – № 10. – P. 1767-1771. – ISSN 1089-5639.

62. Chorvat, D., Jr. Assessment of low-intensity fluorescence signals in living cardiac cells using time-resolved laser spectroscopy [Text] / D. Chorvat, Jr., F. Elzwiei, V. Bassien-Capsa, A. Mateasik, A. Chorvatova // *Computers in Cardiology*. – 2007. – Vol. 34. – P. 353-356. – ISSN 0276-6574.

63. Malinowsky, E.R. Factor Analysis in Chemistry [Text] / E.R. Malinowsky. – New York: Wiley, 1991. – 368 p.

64. Zimmermann, T. Spectral imaging and its applications in live cell microscopy [Text] / T. Zimmermann, J. Rietdorf, R. Pepperkok // *FEBS Letters*. – 2003. – Vol. 546. – № 1. – P. 87-92. – ISSN 0014-5793.

65. Dickinson, M.E. Multi-spectral imaging and linear unmixing add a whole new dimension to laser scanning fluorescence microscopy [Text] / M.E. Dickinson, G. Bearman, S. Tille, R. Lansford, S.E. Fraser // *Biotechniques*. – 2001. – Vol. 31. – № 6. – P. 1272-1278. – ISSN 0736-6205.

66. Bugiel, I. Investigation of cells by fluorescence laser scanning microscopy with subnanosecond time resolution [Text] / I. Bugiel, K. König, H. Wabnitz // *Lasers in the Life Sciences*. – 1989. – Vol. 3. – № 1. – P. 47-53.

67. Urayama, P. A UV-visible-NIR fluorescence lifetime imaging microscope for laser-based biological sensing with picosecond resolution [Text] / P. Urayama, W. Zhong, J.A. Beamish, F.K. Minn, R.D. Sloboda, K.H. Dragnev, E. Dmitrovsky, M.A. Mycek // *Applied Physics B-Lasers and Optics*. – 2003. – Vol. 76. – № 5. – P. 483-496. – ISSN 0946-2171.

68. Elson, D.S. Real-time time-domain fluorescence lifetime imaging including single-shot acquisition with a segmented optical image intensifier [Text] / D.S. Elson, I. Munro, J. Requejo-Isidro, J. McGinty, C. Dunsby, N. Galletly, G.W. Stamp, M.A.A. Neil, M.J. Lever, P.A. Kellett, A. Dymoke-Bradshaw, J. Hares, P.M.W. French // *New Journal of Physics*. – 2004. – Vol. 6. – № 180. – P. 13. – ISSN 1367-2630.

69. Lakowicz, J.R. Fluorescence lifetime imaging [Text] / J.R. Lakowicz, H. Szmanski, K. Nowaczyk, K.W. Berndt, M. Johnson // *Analytical Biochemistry*. – 1992. – Vol. 202. – № 2. – P. 316-330. – ISSN 0003-2697.

70. Squire, A. Multiple frequency fluorescence lifetime imaging microscopy [Text] / A. Squire, P.J. Verveer, P.I.H. Bastiaens // *Journal of Microscopy*. – 2000. – Vol. 197. – № 2. – P. 136-149. – ISSN 1365-2818.
71. French, T. Two-photon fluorescence lifetime imaging microscopy of macrophage-mediated antigen processing [Text] / T. French, P.T.C. So, D.J. Weaver, T. CoelhoSampaio, E. Gratton, E.W. Voss, J. Carrero // *Journal of Microscopy-Oxford*. – 1997. – Vol. 185. – P. 339-353. – ISSN 0022-2720.
72. French, T. Fluorescence lifetime imaging techniques for microscopy [Text] / T. French, P.T.C. So, C.Y. Dong, K.M. Berland, E. Gratton // *Methods in Cell Biology*. – 1998. – Vol. 56. – P. 277-304. – ISSN 0091-679X.
73. Hanley, Q.S. Spectrally resolved fluorescence lifetime imaging microscopy [Text] / Q.S. Hanley, D.J. Arndt-Jovin, T.M. Jovin // *Applied Spectroscopy*. – 2002. – Vol. 56. – № 2. – P. 155-166. – ISSN 0003-7028.
74. Knemeyer, J.-P. Detection and identification of single molecules in living cells using spectrally resolved fluorescence lifetime imaging microscopy [Text] / J.-P. Knemeyer, D.-P. Herten, M. Sauer // *Analytical Chemistry*. – 2003. – Vol. 75. – № 9. – P. 2147-2153. – ISSN 0003-2700.
75. Knemeyer, J.-P. Spectrally resolved fluorescence lifetime imaging microscopy (SFLIM) – an appropriate method for imaging single molecules in living cells [Text] / J.-P. Knemeyer, N. Marmé, J.D. Hoheisel // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2007. – Vol. 387. – № 1. – P. 37-40. – ISSN 1618-2642.
76. McCormick, D.B. On mechanisms of photochemical reductions of FAD and fAD-dependent flavoproteins [Text] / D.B. McCormick, J.F. Koster, C. Veeger // *European Journal of Biochemistry*. – 1967. – Vol. 2. – № 4. – P. 387-391. – ISSN 0014-2956.
77. Koke, J.R. Sensitivity of flavoprotein fluorescence to oxidative state in single isolated heart-cells [Text] / J.R. Koke, W. Wylie, M. Wills // *Cytobios*. – 1981. – Vol. 32. – № 127-128. – P. 139-145. – ISSN 0011-4529.
78. Suhling, K. Time-resolved fluorescence anisotropy imaging applied to live cells [Text] / K. Suhling, J. Siegel, P.M.P. Lanigan, S. Leveque-Fort, S.E.D. Webb, D. Phillips, D.M. Davis, P.M.W. French // *Optics Letters*. – 2004. – Vol. 29. – № 6. – P. 584-586. – ISSN 0146-9592.
79. Hones, G. Studies of enzyme-ligand complexes using dynamic fluorescence anisotropy. I. The substrate-binding site of malate-dehydrogenase [Text] / G. Hones, J. Hones, M. Hauser // *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*. – 1986. – Vol. 367. – № 2. – P. 95-102. – ISSN 0177-3593.
80. Neher, R. Optimizing imaging parameters for the separation of multiple labels in a fluorescence image [Text] / R. Neher, E. Neher // *Journal of Microscopy-Oxford*. – 2004. – Vol. 213. – P. 46-62. – ISSN 0022-2720.
81. Siegel, J. Studying biological tissue with fluorescence lifetime imaging: Microscopy, endoscopy, and complex decay profiles [Text] / J. Siegel, D.S. Elson, S.E.D. Webb, K.C.B. Lee, A. Vlanclas, G.L. Gambaruto, S. Leveque-Fort, M.J. Lever, P.J. Tadrous, G.W.H. Stamp, A.L. Wallace, A. Sandison, T.F. Watson, F. Alvarez, P.M.W. French // *Applied Optics*. – 2003. – Vol. 42. – № 16. – P. 2995-3004. – ISSN 1559-128X.

82. Ivanova, O.V. A nonparametric method for analysis of fluorescence emission in combined time and wavelength dimensions [Text] / O.V. Ivanova, L. Marcu, M.C.K. Khoo // *Annals of biomedical engineering*. – 2005. – Vol. 33. – № 4. – P. 531-544. – ISSN 0090-6964.
83. Teuchner, K. Femtosecond two-photon excited fluorescence of melanin [Text] / K. Teuchner, W. Freyer, D. Leupold, A. Volkmer, D.J.S. Birch, P. Altmeyer, M. Stucker, K. Hoffmann // *Photochemistry and Photobiology*. – 1999. – Vol. 70. – № 2. – P. 146-151. – ISSN 0031-8655.
84. König, K. Multiphoton autofluorescence imaging of intratissue elastic fibers [Text] / K. König, K. Schenke-Layland, I. Riemann, U.A. Stock // *Biomaterials*. – 2005. – Vol. 26. – № 5. – P. 495-500. – ISSN 0142-9612.
85. Schweitzer, D. In vivo measurement of time-resolved autofluorescence at the human fundus [Text] / D. Schweitzer, M. Hammer, F. Schweitzer, R. Anders, T. Doebbecke, S. Schenke, E.R. Gaillard, E.R. Gaillard // *Journal of Biomedical Optics*. – 2004. – Vol. 9. – № 6. – P. 1214-1222. – ISSN 1083-3668.
86. Delori, F.C. Age-related accumulation and spatial distribution of lipofuscin in RPE of normal subjects [Text] / F.C. Delori, D.G. Goger, C.K. Dorey // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2001. – Vol. 42. – № 8. – P. 1855-1866. – ISSN 0146-0404.
87. Singh, R. Advanced glycation end-products: A review [Text] / R. Singh, A. Barden, T. Mori, L. Beilin // *Diabetologia*. – 2001. – Vol. 44. – № 2. – P. 129-146. – ISSN 0012-186X.
88. Sell, D.R. Pentosidine – a molecular marker for the cumulative damage to proteins in diabetes, aging, and uremia [Text] / D.R. Sell, R.H. Nagaraj, S.K. Grandhee, P. Odetti, A. Lapolla, J. Fogarty, V.M. Monnier // *Diabetes-Metabolism Reviews*. – 1991. – Vol. 7. – № 4. – P. 239-251. – ISSN 0742-4221.
89. Na, R.H. Autofluorescence of human skin is age-related after correction for skin pigmentation and redness [Text] / R.H. Na, I.M. Stender, M. Henriksen, H.C. Wulf // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2001. – Vol. 116. – № 4. – P. 536-540. – ISSN 0022-202X.
90. Fukuda, H. Aminolevulinic acid: from its unique biological function to its star role in photodynamic therapy [Text] / H. Fukuda, A. Casas, A. Batlle // *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2005. – Vol. 37. – № 2. – P. 272-276. – ISSN 1357-2725.
91. Ajioka, R.S. Biosynthesis of heme in mammals [Text] / R.S. Ajioka, J.D. Phillips, J.P. Kushner // *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*. – 2006. – Vol. 1763. – № 7. – P. 723-736. – ISSN 0167-4889.
92. Ji, Z. Subcellular localization pattern of protoporphyrin IX is an important determinant for human carcinoma its photodynamic efficiency of and normal cell lines [Text] / Z. Ji, G. Yang, V. Vasovic, B. Cunderlikova, Z. Suo, J.M. Nesland, Q. Peng // *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*. – 2006. – Vol. 84. – № 3. – P. 213-220. – ISSN 1011-1344.
93. Chance, B. Fluorescence measurements of mitochondrial pyridine nucleotide in aerobiosis and anaerobiosis [Text] / B. Chance, B. Thorell // *Nature*. – 1959. – Vol. 184. – № 4691. – P. 931-934. – ISSN 0028-0836.

94. Chance, B. Intracellular oxidation-reduction states in vivo [Text] / B. Chance, P. Cohen, F. Jöbsis, B. Schoener // *Science*. – 1962. – Vol. 137. – № 3529. – P. 499-508. – ISSN 0036-8075.
95. Estabrook, R.W. Fluorometric measurement of reduced pyridine nucleotide in cellular and subcellular particles [Text] / R.W. Estabrook // *Analytical Biochemistry*. – 1962. – Vol. 4. – № 3. – P. 231-245. – ISSN 0003-2697.
96. Chance, B. Pyridine-nucleotide as an indicator of oxygen requirements for energy-linked functions of mitochondria [Text] / B. Chance // *Circulation Research*. – 1976. – Vol. 38. – № 5, Suppl. 1. – P. I31-I38. – ISSN 0009-7330.
97. Chance, B. Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals [Text] / B. Chance, B. Schoener, R. Oshino, F. Itshak, Y. Nakase // *Journal of Biological Chemistry*. – 1979. – Vol. 254. – № 11. – P. 4764-4771. – ISSN 0021-9258.
98. Griffiths, E.J. NADH fluorescence in isolated guinea-pig and rat cardiomyocytes exposed to low or high stimulation rates and effect of metabolic inhibition with cyanide [Text] / E.J. Griffiths, H. Lin, M.S. Suleiman // *Biochemical Pharmacology*. – 1998. – Vol. 56. – № 2. – P. 173-179.
99. Schneckenburger, H. Fluorescence decay kinetics and imaging of NAD(P)H and flavins as metabolic indicators [Text] / H. Schneckenburger, K. König // *Optical Engineering*. – 1992. – Vol. 31. – № 7. – P. 1447-1451. – ISSN 0091-3286.
100. Nakayama, S. Fluorescence Imaging of metabolic responses in single mitochondria [Text] / S. Nakayama, T. Sakuyama, S. Mitaku, Y. Ohta // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2002. – Vol. 290. – № 1. – P. 23-28. – ISSN 0006-291X.
101. Huang, S.H. Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein [Text] / S.H. Huang, A.A. Heikal, W.W. Webb // *Biophysical Journal*. – 2002. – Vol. 82. – № 5. – P. 2811-2825. – ISSN 0006-3495.
102. Eng, J. Nicotinamide adenine-dinucleotide fluorescence spectroscopy and imaging of isolated cardiac myocytes [Text] / J. Eng, R.M. Lynch, R.S. Balaban // *Biophysical Journal*. – 1989. – Vol. 55. – № 4. – P. 621-630. – ISSN 0006-3495.
103. Romashko, D.N. Subcellular metabolic transients and mitochondrial redox waves in heart cells [Text] / D.N. Romashko, E. Marban, B. O'Rourke // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1998. – Vol. 95. – № 4. – P. 1618-1623. – ISSN 0027-8424.
104. Barlow, C.H. Ischemic areas in perfused rat hearts: Measurement by NADH fluorescence photography [Text] / C.H. Barlow, B. Chance // *Science*. – 1976. – Vol. 193. – № 4256. – P. 909-910. – ISSN 0036-8075.
105. Chance, B. Changes in fluorescence in a frog sartorius muscle following a twitch [Text] / B. Chance, F.F. Jöbsis // *Nature* – 1959. – Vol. 184. – P. 195-196.
106. Cortassa, S. An integrated model of cardiac mitochondrial energy metabolism and calcium dynamics [Text] / S. Cortassa, M.A. Aon, E. Marbán, R.L. Winslow, B. O'Rourke // *Biophysical Journal*. – 2003. – Vol. 84. – № 4. – P. 2734-2755. – ISSN 0006-3495.

107. Stanley, W.C. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions [Text] / W.C. Stanley, G.D. Lopaschuk, J.L. Hall, J.G. McCormack // *Cardiovascular Research*. – 1997. – Vol. 33. – № 2. – P. 243-257. – ISSN 0008-6363.
108. Klaidman, L.K. High-performance liquid-chromatography analysis of oxidized and reduced pyridine dinucleotides in specific brain-regions [Text] / L.K. Klaidman, A.C. Leung, J.D. Adams // *Analytical Biochemistry*. – 1995. – Vol. 228. – № 2. – P. 312-317. – ISSN 0003-2697.
109. Avi-Dor, Y. Fluorescence of pyridine nucleotides in mitochondria [Text] / Y. Avi-Dor, J.M. Olson, M.D. Doherty, N.O. Kaplan // *Journal of Biological Chemistry*. – 1962. – Vol. 237. – № 7. – P. 2377–2383.
110. Benderdour, M. Decreased cardiac mitochondrial NADP(+)-isocitrate dehydrogenase activity and expression: a marker of oxidative stress in hypertrophy development [Text] / M. Benderdour, G. Charron, B. Comte, R. Ayoub, D. Beaudry, S. Foisy, D. deBlois, C. Des Rosiers // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. – 2004. – Vol. 287. – № 5. – P. H2122-H2131. – ISSN 0363-6135.
111. Bird, D.K. Metabolic mapping of MCF10A human breast cells via multiphoton fluorescence lifetime imaging of the coenzyme NADH [Text] / D.K. Bird, L. Yan, K.M. Vrotsos, K.W. Eliceiri, E.M. Vaughan, P.J. Keely, J.G. White, N. Ramanujam // *Cancer Research*. – 2005. – Vol. 65. – № 19. – P. 8766-8773. – ISSN 0008-5472.
112. Gafni, A. Fluorescence decay studies of reduced nicotinamide adenine-dinucleotide in solution and bound to liver alcohol-dehydrogenase [Text] / A. Gafni, L. Brand // *Biochemistry*. – 1976. – Vol. 15. – № 15. – P. 3165-3171. – ISSN 0006-2960.
113. König, K. Time-resolved and steady-state fluorescence measurements of beta-nicotinamide adenine dinucleotide-alcohol dehydrogenase complex during UVA exposure [Text] / K. König, M.W. Berns, B.J. Tromberg // *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*. – 1997. – Vol. 37. – № 1-2. – P. 91-95. – ISSN 1011-1344.
114. Lakowicz, J.R. Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH [Text] / J.R. Lakowicz, H. Szmecinski, K. Nowaczyk, M.L. Johnson // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1992. – Vol. 89. – № 4. – P. 1271-1275. – ISSN 0027-8424.
115. Jameson, D.M. Time-resolved fluorescence studies on NADH bound to mitochondrial malate-dehydrogenase [Text] / D.M. Jameson, V. Thomas, D.M. Zhou // *Biochimica Et Biophysica Acta*. – 1989. – Vol. 994. – № 2. – P. 187-190. – ISSN 0006-3002.
116. König, K. Two-photon excited lifetime imaging of autofluorescence in cells during UVA and NIR photostress [Text] / K. König, P.T.C. So, W.W. Mantulin, B.J. Tromberg, E. Gratton // *Journal of Microscopy*. – 1996. – Vol. 183. – P. 197-204. – ISSN 0022-2720.

117. Schneckenburger, H. Autofluorescence lifetime imaging of cultivated cells using a UV picosecond laser diode [Text] / H. Schneckenburger, M. Wagner, P. Weber, W.S.L. Strauss, R. Sailer // *Journal of Fluorescence*. – 2004. – Vol. 14. – № 5. – P. 649-654. – ISSN 1053-0509.
118. Provenzano, P.P. Multiphoton microscopy and fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to monitor metastasis and the tumor microenvironment [Text] / P.P. Provenzano, K.W. Eliceiri, P.J. Keely // *Clinical & Experimental Metastasis*. – 2009. – Vol. 26. – № 4. – P. 357-370. – ISSN 0262-0898.
119. Ladokhin, A.S. Evidence for an excited-state reaction contributing to NADH fluorescence [Text] / A.S. Ladokhin, L. Brand // *Journal of fluorescence*. – 1995. – Vol. 5. – № 1. – P. 99-106. – ISSN 1053-0509.
120. Nakashima, N. Picosecond fluorescence lifetime of the coenzyme of D-amino-acid oxidase [Text] / N. Nakashima, K. Yoshihara, F. Tanaka, K. Yagi // *Journal of Biological Chemistry*. – 1980. – Vol. 255. – № 11. – P. 5261-5263. – ISSN 0021-9258.
121. Maeda-Yorita, K. Effect of nicotinamide adenine-dinucleotide on the oxidation-reduction potentials of lipoamide dehydrogenase from pig-heart [Text] / K. Maeda-Yorita, K. Aki // *Journal of Biochemistry*. – 1984. – Vol. 96. – № 3. – P. 683-690. – ISSN 0021-924X.
122. Chang, C.L. Autofluorescence lifetime measurement on oral carcinogenesis [Text] / C.L. Chang, C. You, H.M. Chen, C.P. Chiang, C.T. Chen, C.Y. Wang // *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 4. – P. 2349-2351.
123. Pfefer, T.J. Temporally and spectrally resolved fluorescence spectroscopy for the detection of high grade dysplasia in Barrett's esophagus [Text] / T.J. Pfefer, D.Y. Paithankar, J.M. Poneros, K.T. Schomacker, N.S. Nishioka // *Lasers in Surgery and Medicine*. – 2003. – Vol. 32. – № 1. – P. 10-16. – ISSN 1096-9101.
124. DaCosta, R.S. New optical technologies for earlier endoscopic diagnosis of premalignant gastrointestinal lesions [Text] / R.S. DaCosta, B.C. Wilson, N.E. Marcon // *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. – 2002. – Vol. 17. – P. S85-S104. – ISSN 1440-1746.
125. Pitts, J.D. Autofluorescence characteristics of immortalized and carcinogen-transformed human bronchial epithelial cells [Text] / J.D. Pitts, R.D. Sloboda, K.H. Dragnev, E. Dmitrovsky, M.A. Mycek // *Journal of Biomedical Optics*. – 2001. – Vol. 6. – № 1. – P. 31-40. – ISSN 1083-3668.
126. Galletly, N.P. Fluorescence lifetime imaging distinguishes basal cell carcinoma from surrounding uninvolved skin [Text] / N.P. Galletly, J. McGinty, C. Dunsby, F. Teixeira, J. Requejo-Isidro, I. Munro, D.S. Elson, M.A.A. Neil, A.C. Chu, P.M.W. French, G.W. Stamp // *British Journal of Dermatology*. – 2008. – Vol. 159. – № 1. – P. 152-161. – ISSN 0007-0963.
127. Leppert, J. Multiphoton excitation of autofluorescence for microscopy of glioma tissue [Text] / J. Leppert, J. Krajewski, S.R. Kantelhardt, S. Schlaffer, N. Petkus, E. Reusche, G. Hüttmann, A. Giese // *Neurosurgery*. – 2006. – Vol. 58. – № 4. – P. 759-767.
128. Оптическая биомедицинская диагностика: Пер. с англ. под ред. В.В. Тучина: В 2 т. Т. 2 [Текст]. – М.: Физматлит, 2007. – 368 с.

129. Jacques, S.L. Optical properties of biological tissues: A review [Text] / S.L. Jacques // *Physics in Medicine and Biology*. – 2013. – Vol. 58. – № 11. – P. 37-61.
130. Petrov, G.I. Human tissue color as viewed in high dynamic range optical spectral transmission measurements [Text] / G.I. Petrov, A. Doronin, H.T. Whelan, I. Meglinski, V.V. Yakovlev // *Biomedical Optics Express*. – 2012. – Vol. 3. – № 9. – P. 2154-2161.
131. Buiteveld, H. The optical properties of pure water [Text] / H. Buiteveld, J.M.H. Hakvoort, M. Donze // *Proc. SPIE 2258*. – P. 174-183.
132. Kou, L. Refractive indices of water and ice in the 0.65- to 2.5- μm spectral range [Text] / L. Kou, D. Labrie, P. Chylek // *Applied Optics*. – 1993. – Vol. 32. – № 19. – P. 3531-3540.
133. Jacques, S.L. The melanosome: threshold temperature for explosive vaporization and internal absorption coefficient during pulsed laser irradiation [Text] / S.L. Jacques, D.J. McAuliffe // *Photochemistry and Photobiology*. – 1991. – Vol. 53. – № 6. – P. 769-775.
134. Jacques, S.L. Internal absorption coefficient and threshold for pulsed laser disruption of melanosomes isolated from retinal pigment epithelium [Text] / S.L. Jacques, R.D. Glickman, J.A. Schwartz // *Proc. SPIE 2681*. – P. 468-477.
135. Douven, L.F.A. Retrieval of optical properties of skin from measurement and modelling the diffuse reflectance [Text] / L.F.A. Douven, G.W. Lucassen // *Proc. SPIE 3914*. – P. 312-323.
136. Saidi, I.S. Transcutaneous optical measurement of hyperbilirubinemia in neonates: Ph.D. dissertation [Text] / I.S. Saidi // Rice University, Houston, TX, USA. – 1992. – 217 p.
137. Niemz, M.H. Laser-tissue interactions. Fundamentals and applications [Text] / M.H. Niemz. – Berlin: Springer, 1996. – 305 p.
138. Пушкарева, А.Е. Методы математического моделирования в оптике биоткани: Учебное пособие [Текст] / А.Е. Пушкарева. – СПб: СПбГУ ИТМО, 2008. – 103 с.
139. Bonner, R.F. Model for photon migration in turbid biological media [Text] / R.F. Bonner, R. Nossal, S. Havlin, G.H. Weiss // *Journal of the Optical Society of America A*. – 1987. – Vol. 4. – № 3. – P. 423-432.
140. Nossal, R. Influence of pathlength on remote optical sensing of properties of biological tissue [Text] / R. Nossal, R.F. Bonner, G.H. Weiss // *Applied Optics*. – 1989. – Vol. 28. – № 12. – P. 2238-2244.
141. Wu, J. Diffuse reflectance from turbid media. An analytical model of photon migration [Text] / J. Wu, F. Partovi, R.P. Rava // *Applied Optics*. – 1993. – Vol. 32. – № 7. – P. 1115-1121.
142. Wu, J. Analytical model for extracting intrinsic fluorescence in turbid media [Text] / J. Wu, M.S. Feld, R.P. Rava // *Applied Optics*. – 1993. – Vol. 32 – № 19. – P. 3585-3595.
143. Zhang, Q.G. Turbidity-free fluorescence spectroscopy of biological tissue [Text] / Q.G. Zhang, M.G. Muller, J. Wu, M.S. Feld // *Optics Letters*. – 2000. – Vol. 25. – № 19. – P. 1451-1453.

144. Muller, M.G. Intrinsic fluorescence spectroscopy in turbid media: Disentangling effects of scattering and absorption [Text] / M.G. Muller, I. Georgakoudi, Q. Zhang, J. Wu, M.S. Feld // *Applied Optics*. – 2001. – Vol. 40. – № 25. – P. 4633-4646.
145. Drezek, R. Understanding the contributions of NADH and collagen to cervical tissue fluorescence spectra: Modeling, measurements, and implications [Text] / R. Drezek, K. Sokolov, J. Utzinger, I. Boiko, A. Malpica, M. Follen, R. Richards-Kortum // *Journal of Biomedical Optics*. – 2001. – Vol. 6. – № 4. – P. 385-396.
146. Georgakoudi, I. NAD(P)H and collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes [Text] / I. Georgakoudi, B.C. Jacobson, M.G. Muller, E.E. Sheets, K. Badizadegan, D.L. Carr-Locke, C.P. Crum, C.W. Boone, R.R. Dasari, J. Van Dam, M.S. Feld // *Cancer Research*. – 2002. – Vol. 62. – № 3. – P. 682-687.
147. Muller, M.G. Spectroscopic detection and evaluation of morphologic and biochemical changes in early human oral carcinoma [Text] / M.G. Muller, T.A. Valdez, I. Georgakoudi, V. Backman, C. Fuentes, S. Kabani, N. Laver, Z. Wang, C.W. Boone, R.R. Dasari, S.M. Shapshay, M.S. Feld // *Cancer*. – 2003. – Vol. 97. – № 7. – P. 1681-1692.
148. Volynskaya, Z. Diagnosing breast cancer using diffuse reflectance spectroscopy and intrinsic fluorescence spectroscopy [Text] / Z. Volynskaya, A.S. Haka, K.L. Bechtel, M. Fitzmaurice, R. Shenk, N. Wang, J. Nazemi, R.R. Dasari, M.S. Feld // *Journal of Biomedical Optics*. – 2008. – Vol. 13. – № 2. – P. 024012.
149. Kubelka, P. Ein beitrage zur optik der farbanstriche [Text] / P. Kubelka, F. Munk // *Zeitschrift für Technische Physik*. – 1931. – Vol. 12. – P. 593-601.
150. Kokhanovsky, A. Radiative properties of optically thick fluorescent turbid media [Text] / A. Kokhanovsky // *Journal of the Optical Society of America A*. – 2009. – Vol. 26. – № 8. – P. 1896-1900.
151. Kokhanovsky, A. Radiative properties of optically thick fluorescent turbid media: Errata [Text] / A. Kokhanovsky // *Journal of the Optical Society of America A*. – 2010. – Vol. 27. – № 9. – P. 2084-2084.
152. Рогаткин, Д.А. Математическое моделирование регистрируемых сигналов в медицинской лазерной неинвазивной флюоресцентной диагностике [Текст] / Д.А. Рогаткин, О.Д. Смирнова // *Оптический журнал*. – 2013. – Т. 80. – № 9. – С. 54-60.
153. Simonot, L. Extension of the Kubelka–Munk theory for fluorescent turbid media to a nonopaque layer on a background [Text] / L. Simonot, M. Thoury, J. Delaney // *Journal of the Optical Society of America A*. – 2011. – Vol. 28. – № 7. – P. 1349-1357.
154. Yudovsky, D. Modeling the local excitation fluence rate and fluorescence emission in absorbing and strongly scattering multilayered media [Text] / D. Yudovsky, L. Pilon // *Applied Optics*. – 2010. – Vol. 49. – № 31. – P. 6072-6084.
155. Coppel, L.G. Fluorescence model for multi-layer papers using conventional spectrophotometers [Text] / L.G. Coppel, M. Andersson, M. Neuman, P. Edström // *Nordic Pulp & Paper Research Journal*. – 2012. – Vol. 27. – № 2. – P. 418-425.

156. Ishimaru, A. Wave propagation and scattering in random media [Text] / A. Ishimaru. – New York: Academic Press, 1978. – 600 p.
157. Star, W.M. Chapter 6. Diffusion theory of light transport [Text] / W.M. Star // Optical-thermal response of laser-irradiated tissue / Ed. by A.J. Welch, M.J.C. Van Gemert. – New York: Plenum, 1995. – P. 131-206.
158. Hyde, D.E. A diffusion theory model of spatially resolved fluorescence from depth-dependent fluorophore concentrations [Text] / D.E. Hyde, T.J. Farrell, M.S. Patterson, B.C. Wilson // Physics in Medicine and Biology. – 2001. – Vol. 46. – № 2. – P. 369-383.
159. Nair, M.S. Determination of optical parameters of human breast tissue from spatially resolved fluorescence: a diffusion theory model [Text] / M.S. Nair, N. Ghosh, N.S. Raju, A. Pradhan // Applied Optics. – 2002. – Vol. 41. – № 19. – P. 4024-4035.
160. Chang, S.K. Analytical model to describe fluorescence spectra of normal and preneoplastic epithelial tissue: Comparison with Monte Carlo simulations and clinical measurements [Text] / S.K. Chang, D. Arifler, R. Drezek, M. Follen, R. Richards-Kortum // Journal of Biomedical Optics. – 2004. – Vol. 9. – № 3. – P. 511-522.
161. Chang, S.K. Model-based analysis of clinical fluorescence spectroscopy for in vivo detection of cervical intraepithelial dysplasia [Text] / S.K. Chang, N. Marin, M. Follen, R. Richards-Kortum // Journal of Biomedical Optics. – 2006. – Vol. 11. – № 2. – P. 024008.
162. Drezek, R. Autofluorescence microscopy of fresh cervical-tissue sections reveals alterations in tissue biochemistry with dysplasia [Text] / R. Drezek, C. Brookner, I. Pavlova, I. Boiko, A. Malpica, R. Lotan, M. Follen, R. Richards-Kortum // Photochemistry and Photobiology. – 2001. – Vol. 73. – № 6. – P. 636-641.
163. Pavlova, I. Microanatomical and biochemical origins of normal and precancerous cervical autofluorescence using laser-scanning fluorescence confocal microscopy [Text] / I. Pavlova, K. Sokolov, R. Drezek, A. Malpica, M. Follen, R. Richards-Kortum // Photochemistry and Photobiology. – 2003. – Vol. 77. – № 5. – P. 550-555.
164. Metropolis, N. The Monte Carlo method [Text] / N. Metropolis, S. Ulam // Journal of the American Statistical Association. – 1949. – Vol. 44. – № 247. – P. 335-341.
165. Lux, I. Monte Carlo particle transport methods: Neutron and photon calculations [Text] / I. Lux, L. Koblinger. – Boca Raton: CRC Press, 1991. – 536 p.
166. Welch, A.J. Propagation of fluorescent light [Text] / A.J. Welch, C. Gardner, R. Richards-Kortum, E. Chan, G. Criswell, J. Pfefer, S. Warren // Lasers in Surgery and Medicine. – 1997. – Vol. 21. – № 2. – P. 166-178.
167. Liu, Q. Scaling method for fast Monte Carlo simulation of diffuse reflectance spectra from multilayered turbid media [Text] / Q. Liu, N. Ramanujam // Journal of the Optical Society of America A. – 2007. – Vol. 24. – № 4. – P. 1011-1025.
168. Sassaroli, A. Fast perturbation Monte Carlo method for photon migration in heterogeneous turbid media [Text] / A. Sassaroli // Optics Letters. – 2011. – Vol. 36. – № 11. – P. 2095-2097.

169. Wang, L.H.V. Rapid modeling of diffuse reflectance of light in turbid slabs [Text] / L.H.V. Wang // Journal of the Optical Society of America A. – 1998. – Vol. 15. – № 4. – P. 936-944.
170. Lima, I.T.J. Improved importance sampling for Monte Carlo simulation of time-domain optical coherence tomography [Text] / I.T.J. Lima, A. Kalra, S.S. Sherif // Biomedical Optics Express. – 2011. – Vol. 2. – № 5. – P. 1069-1081.
171. Lima, I.T.J. Fast calculation of multipath diffusivity reflectance in optical coherence tomography [Text] / I.T.J. Lima, A. Kalra, H.E. Hernández-Figueroa, S.S. Sherif // Biomedical Optics Express. – 2012. – Vol. 3. – № 4. – P. 692-700.
172. Ramanujam, N. In vivo diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia using 337-nm-excited laser-induced fluorescence [Text] / N. Ramanujam, M.F. Mitchell, A. Mahadevan-Jansen, S. Warren, S. Thomsen, E. Silva, R. Richards-Kortum // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1994. – Vol. 91. – № 21. – P. 10193-10197.
173. Qu, J.N. Laser-induced fluorescence spectroscopy at endoscopy: Tissue optics, Monte-Carlo modeling, and in-vivo measurements [Text] / J.N. Qu, C. Macaulay, S. Lam, B. Palcic // Optical Engineering. – 1995. – Vol. 34. – № 11. – P. 3334-3343.
174. Zonios, G.I. Morphological model of human colon tissue fluorescence [Text] / G.I. Zonios, R.M. Cothren, J.T. Arendt, J. Wu, J. Van Dam, J.M. Crawford, R. Manoharan, M.S. Feld // IEEE Transactions on Biomedical Engineering. – 1996. – Vol. 43. – № 2. – P. 113-122.
175. Palmer, G.M. Monte-Carlo-based model for the extraction of intrinsic fluorescence from turbid media [Text] / G.M. Palmer, N. Ramanujam // Journal of Biomedical Optics. – 2008. – Vol. 13. – № 2. – P. 024017.
176. Pavlova, I. Monte Carlo model to describe depth selective fluorescence spectra of epithelial tissue: Applications for diagnosis of oral precancer [Text] / I. Pavlova, C.R. Weber, R.A. Schwarz, M. Williams, A. El-Naggar, A. Gillenwater, R. Richards-Kortum // Journal of Biomedical Optics. – 2008. – Vol. 13. – № 6. – P. 024017.
177. Pavlova, I. Fluorescence spectroscopy of oral tissue: Monte Carlo modeling with site-specific tissue properties [Text] / I. Pavlova, C.R. Weber, R.A. Schwarz, M. Williams, A. Gillenwater, R. Richards-Kortum // Journal of Biomedical Optics. – 2009. – Vol. 14. – № 1. – P. 014009.
178. Zhu, C.F. Model based and empirical spectral analysis for the diagnosis of breast cancer [Text] / C.F. Zhu, T.M. Breslin, J. Harter, N. Ramanujam // Optics Express. – 2008. – Vol. 16. – № 19. – P. 14961-14978.
179. Zhu, C. Diagnosis of breast cancer using fluorescence and diffuse reflectance spectroscopy: A Monte-Carlo-model-based approach [Text] / C. Zhu, G.M. Palmer, T.M. Breslin, J. Harter, R. N. // Journal of Biomedical Optics. – 2008. – Vol. 13. – № 3. – P. 034015.
180. Swartling, J. Accelerated Monte Carlo models to simulate fluorescence spectra from layered tissues [Text] / J. Swartling, A. Pifferi, A.M. Enejder, S. Andersson-Engels // Journal of the Optical Society of America A. – 2003. – Vol. 20. – № 4. – P. 714-727.

181. Richards-Kortum, R. Chapter 20. Fluorescence spectroscopy of turbid media [Text] / R. Richards-Kortum // Optical-thermal response of laser irradiated tissue / Ed. by A.J. Welch, M.J.C. Van Gemert. – New York: Plenum, 1995. – P. 667-707.
182. Sinichkin, Y.P. In vivo fluorescence spectroscopy of the human skin: experiments and models [Text] / Y.P. Sinichkin, S.R. Utz, A.H. Mavlutov, H.A. Pilipenko // Journal of Biomedical Optics. – 1998. – Vol. 3. – P. 201-211.
183. Лакович, Д. Основы флуоресцентной спектроскопии: Пер. с англ. под ред. М.Г. Кузьмина [Текст] / Д. Лакович. – М.: Мир, 1986. – 496 с.
184. Wagnieres, G.A. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications [Text] / G.A. Wagnieres, W.M. Star, B.C. Wilson // Photochemistry and Photobiology. – 1998. – Vol. 68. – № 5. – P. 603-632.
185. Richards-Kortum, R. Optronic techniques in diagnostic and therapeutic medicine [Text] / R. Richards-Kortum, R.P. Rava, J. Baraga, M. Fitzmaurice, J. Kramer, M. Feld; Ed. by R. Pratesi. – New York: Plenum, 1991. – 309 p.
186. Рогаткин, Д.А. Физические основы лазерной клинической флуоресцентной спектроскопии *in vivo*. Лекция [Текст] / Д.А. Рогаткин // Медицинская физика. – 2014. – № 4. – С. 78-96.
187. Jacques, S.L. Origins of tissue optical properties in the UVA, visible, and NIR regions [Text] / S.L. Jacques // Advances in Optical Imaging and Photon Migration. – 1996. – Vol. 2. – P. 364-369.
188. Anderson, R.R. In vivo fluorescence of human skin [letter, comment] [Text] / R.R. Anderson // Archives of Dermatology. – 1989. – Vol. 125. – № 7. – P. 999-1000.
189. Prahl, S.A. Determining the optical properties of turbid media by using the adding-doubling method [Text] / S.A. Prahl, M.J.C. Van Gemert, A.J. Welch // Applied Optics. – 1993. – Vol. 32. – № 4. – P. 559-568.
190. Tuchin, V.V. Tissue optics: Light scattering methods and instruments for medical diagnosis [Text] / V.V. Tuchin. – Washington: SPIE Optical Engineering Press, 2000. – 352 p.
191. van Staveren, H. Integrating sphere effect in whole bladder wall photodynamic therapy at violet, green, and red wavelengths [Text] / H. van Staveren // Proc. SPIE 2323. – P. 13-20.
192. Karaoglu, I. The role of urine markers, white light cystoscopy and fluorescence cystoscopy in recurrence, progression and follow-up of non-muscle invasive bladder cancer [Text] / I. Karaoglu, A.G. van der Heijden, J.A. Witjes // World Journal of Urology. – 2013. – Vol. 32. – № 3. – P. 651-659.
193. Anidjar, M. Laser induced autofluorescence diagnosis of bladder tumors: Dependence on the excitation wavelength Laser induced autofluorescence diagnosis of bladder tumors: Dependence on the excitation wavelength [Text] / M. Anidjar, D. Etori, O. Cussenot, P. Meria, F. Desgrandchamps, A. Cortesse, P. Teillac, A. Le Duc, S. Avrillier // Journal of Urology. – 1996. – Vol. 156. – № 5. – P. 1590-1596.

Научное издание

Жеребцов Евгений Андреевич

Дрёмин Виктор Владимирович

Жеребцова Ангелина Ивановна

Потапова Елена Владимировна

Дунаев Андрей Валерьевич

**ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ
В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ТКАНЯХ IN VIVO**

Монография

Технический редактор Е.В. Потапова

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева»
302026, г. Орел, ул. Комсомольская, д. 95, <http://oreluniver.ru>

Подписано к печати __. __. 2018 Формат 60×90 1/16.

Усл. печ. л. 6,6. Тираж ___ экз.

Заказ № __

Отпечатано с готового оригинал-макета
на полиграфической базе ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева»
302030, г. Орел, ул. Московская, 65