

ОРЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ И.С. ТУРГЕНЕВА

На правах рукописи



Дрёмин Виктор Владимирович

**МЕТОДЫ ОПТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ТКАНЕВОГО
МЕТАБОЛИЗМА В ЗАДАЧАХ БИМЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКИ**

Специальность 1.5.2 – Биофизика

Диссертация на соискание учёной степени
доктора физико-математических наук

Научный консультант
доктор технических наук, доцент
Дунаев Андрей Валерьевич

Орёл 2025 г.

Содержание

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ТКАНЕВЫЙ МЕТАБОЛИЗМ: ОСНОВЫ, МЕХАНИЗМЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
1.1 Основные компоненты тканевого метаболизма	36
1.2 Энергетический метаболизм: ключевые этапы.....	38
1.3 Физиологические аспекты регуляции тканевого метаболизма.....	41
1.4 Нарушения тканевого метаболизма	44
1.5 Методы исследования тканевого метаболизма.....	48
1.6 Выводы по главе 1	59
ГЛАВА 2. МЕТОД И УСТРОЙСТВО ПОЛЯРИЗАЦИОННО-ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ГИПЕРСПЕКТРАЛЬНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ.....	62
2.1 Регистрация диффузно-отраженного излучения биологических тканей	63
2.2 Поляризационно-чувствительная гиперспектральная система визуализации .	70
2.2.1 Разработка поляризационно-чувствительной гиперспектральной системы визуализации.....	71
2.2.2 Искусственная нейронная сеть для обработки гиперспектральных данных .	74
2.3 Монте-Карло моделирование спектров диффузного отражения для обучения искусственных нейронных сетей.....	76
2.4 Монте-Карло моделирование диагностического объема системы гиперспектральной визуализации.....	90
2.5 <i>In vivo</i> измерения кожных покровов человека	92
2.6 Исследование метаболических изменений кожи пациентов с сахарным диабетом	103
2.7 Классификация клинических данных на основе линейного дискриминантного анализа	108
2.8 Направления дальнейшего развития	114
2.9 Выводы по главе 2.....	123

ГЛАВА 3. МЕТОД И УСТРОЙСТВО СТОКС-ПОЛЯРИЗАЦИОННОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ	125
3.1 Основы поляриметрии	127
3.2 Разработка Стокс-поляризационной системы визуализации	131
3.3 Поляриметрическое исследование FFPE образцов рака молочной железы ...	135
3.3.1 Визуализация высокого разрешения с кластеризацией данных	140
3.4 Поляриметрическое исследование <i>ex vivo</i> образцов рака толстой кишки	144
3.4.1 Обнаружение рака толстой кишки с использованием сферы Пуанкаре и 2D поляриметрического картирования	145
3.4.2 Разработка дополнительной поляризационной метрики для гистопатологического анализа раковых образцов (симметричное разложение) .	153
3.4.3 Классификация онкологических образцов на основе методов машинного обучения	161
3.5 Выводы по главе 3	168
ГЛАВА 4. ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЭНДОГЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ	171
4.1. Физические основы флуоресценции	171
4.1.1 Эндогенные флуорофоры биологических тканей.....	177
4.2 Визуализация интенсивности эндогенной флуоресценции	184
4.2.1 Изучение возможности анализа метаболизма биологических тканей	184
4.2.2 Применение флуоресцентной визуализация для определения границ опухолевого поражения	192
4.3 Визуализация времени жизни флуоресценции в частотной области	197
4.3.1 Расширение возможностей поляриметрической системы с помощью регистрации времени жизни флуоресценции	197
4.3.2 Широкопольная визуализация времени жизни флуоресценции НАДН.....	200
4.3.3 Широкопольная визуализация времени жизни флуоресценции флавинов .	207
4.4 Выводы по главе 4.....	212
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОПТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО КРОВОТОКА НА ОСНОВЕ РЕГИСТРАЦИИ	

ДИНАМИЧЕСКОГО РАССЕЙЯНИЯ СВЕТА С АНАЛИЗОМ ЧАСТОТНО-ВРЕМЕННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК	214
5.1 Основы лазерной спекл-контрастной визуализации	214
5.2 Сравнительный анализ осцилляций динамики кровотока в отдельном капилляре и периферического кровотока.....	219
5.2.1 Взаимосвязь скорости движения эритроцитов и перфузии в базальном состоянии	225
5.2.2 Взаимосвязь скорости движения эритроцитов и перфузии при артериальной окклюзии	229
5.2.3 Динамика кровотока в артериальной и венозной частях капилляра	231
5.3 Частотно-временной анализ динамики сигналов лазерной спекл-контрастной визуализации.....	235
5.4 Картирование ритмов кровотока на основе частотно-временного анализа сигналов лазерной спекл-контрастной визуализации	243
5.5 Выводы по главе 5.....	251
ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА ТЕСТ-ОБЪЕКТОВ, ИМИТИРУЮЩИХ ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ, ДЛЯ ЗАДАЧ КАЛИБРОВКИ И КОНТРОЛЯ ТЕХНИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ СИСТЕМ ОПТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ.....	253
6.1 Тест-объекты, имитирующие поглощающие и рассеивающие свойства.....	255
6.1.1 Калибровочные измерения системы гиперспектральной визуализации.....	255
6.1.2 Калибровочные измерения системы поляризационной визуализации	260
6.2 Тест-объекты, имитирующие флуоресцентные свойства	261
6.3 Тест-объект динамического рассеяния света	274
6.4 Выводы по главе 6	277
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	279
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	282
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	284

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Нарушение тканевых метаболических процессов в организме человека связано с развитием большого числа заболеваний. Примерами таких патологий являются нарушения, возникающие при развитии онкологического процесса [1], прогрессировании и осложнениях сахарного диабета (СД) [2], ревматологических заболеваний [3] и др., которые могут быть связаны со сдвигами в процессах окислительного фосфорилирования [4], развитием гипоксии тканей [5], изменениями в морфологии тканей [6] и клеток, накоплением токсичных продуктов углеводного обмена [7] и т.п. Тканевый метаболизм представляет собой совокупность процессов, происходящих в тканях, и включает два ключевых компонента – клеточный метаболизм и периферический кровоток, неразрывно связанных между собой и обеспечивающих оптимальное функционирование тканей и органов [8,9].

Клеточный метаболизм – это серия биохимических реакций, которые происходят внутри каждой клетки для поддержания её жизнедеятельности. Он включает в себя два основных процесса – анаболизм и катаболизм. При анаболизме осуществляется синтез сложных молекул (белков, липидов, нуклеиновых кислот) из более простых компонентов. Данный процесс требует энергии, которая поступает в виде АТФ (аденозинтрифосфата). Катаболизм связан с расщеплением сложных молекул (например, глюкозы) на более простые соединения с выделением энергии, которая используется клеткой для выполнения различных функций, таких как движение, транспорт веществ через мембрану и восстановление поврежденных структур.

Периферический кровоток же играет ключевую роль в обеспечении клеточного метаболизма, поскольку именно через систему кровообращения клетки получают необходимые для их работы вещества и избавляются от продуктов метаболизма. В процессе кровообращения артериальная кровь доставляет кислород и питательные вещества, такие как глюкоза и аминокислоты, к тканям. Кислород

необходим для окислительного фосфорилирования в митохондриях, которое обеспечивает выработку АТФ. Венозная кровь забирает продукты метаболизма (углекислый газ, мочевины, лактат и пр.) из тканей и переносит их к органам, ответственным за их выведение (лёгкие, печень, почки). Интенсивность кровотока напрямую связана с уровнем метаболической активности тканей. Например, мышцы во время физической нагрузки требуют большего количества кислорода и питательных веществ, поэтому кровоток увеличивается, чтобы удовлетворить этот повышенный метаболический спрос. Аналогично, в состоянии покоя кровоснабжение тканей уменьшается, так как метаболические потребности снижаются.

Тканевый метаболизм – это динамическая процесс, где клеточный метаболизм и периферический кровоток постоянно взаимодействуют. Ускорение метаболизма требует увеличенного кровотока для поставки большего количества кислорода и питательных веществ. Организм регулирует тканевой метаболизм через различные механизмы. Гормоны, такие как инсулин, адреналин и тироксин, могут стимулировать или подавлять метаболические процессы. Например, инсулин способствует захвату глюкозы клетками и её утилизации для производства энергии. Симпатическая и парасимпатическая системы регулируют кровоток в зависимости от потребностей организма. Симпатическая система активируется в стрессовых ситуациях, увеличивая кровоснабжение жизненно важных органов, таких как сердце и мышцы. При недостатке кислорода (гипоксии) организм запускает механизмы компенсации, увеличивая кровоток и активируя анаэробные пути метаболизма, такие как гликолиз.

Таким образом, тканевый метаболизм представляет собой сложную и взаимосвязанную систему, в которой клеточные и сосудистые процессы работают вместе для поддержания здоровья и функции тканей. Эффективность метаболизма тканей напрямую зависит от адекватного кровоснабжения, а любые его нарушения могут серьезно повлиять на метаболизм клеток и, как следствие, на их способность выполнять свои функции. И, если для исследований на клеточном уровне инструментарий оценки метаболизма развит достаточно хорошо [10], включая

различные микроскопические технологии, то разработка средств визуализации, позволяющих комплексно анализировать тканевый метаболизм, в том числе *in vivo*, представляется актуальной задачей [11–14].

Степень проработанности темы

Общепризнанными технологиями в определении характеристик тканевого метаболизма являются методы оптической спектроскопии и визуализации. В частности, анализ флуоресцентного излучения может улучшить понимание тканевого метаболизма на клеточном уровне; методы регистрации динамического рассеяния света – лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ) и визуализация, лазерная спекл-контрастная визуализация (ЛСКВ) – дают информацию о состоянии микроциркуляции крови в исследуемых тканях; визуализация диффузного отражения и гиперспектральная визуализация (ГСВ), как одна из ее наиболее продвинутых реализаций, позволяют анализировать накопление различных хромофоров в биологических тканях, а также насыщение тканей кислородом (оксигенацию); поляризационные измерения дают представление о структурных и морфологических особенностях биотканей и т.д. В настоящее время внедрением оптических технологий в клиническую диагностику активно занимается ряд российских (под руководством Тучина В.В., Приезжева А.В., Захарова В.П., Загайновой Е.В., Дунаева А.В., Камшилина А.А., Мачихина А.С., Турчина И.В., Горина Д.А., Кистенева Ю.В., Лощенова В.Б. и др.) и зарубежных (Fredriksson I., Boas D., Meglinski I., Stefanovska A., Marcu L., Georgakoudi I., Yaroslavsky A. и др.) исследовательских групп. В последние годы все больше растет интерес к оптической визуализации тканевого метаболизма без введения дополнительных контрастных агентов с целью внедрения в реальную клиническую практику. Однако, несмотря на приложенные усилия, по-прежнему существуют проблемы реализации данных технологий в клинике, ввиду отсутствия обоснованной методологии использования, унифицированных диагностических параметров, классификаторов и алгоритмов для систем поддержки принятия врачебных решений и пр.

В настоящее время в биомедицинских оптических устройствах все больше распространение находит мультимодальный или многопараметрический подход [15–21]. Каждый из методов оптической визуализации имеет свои преимущества и недостатки, но, в сочетанном виде методы могут дополнять друг друга и, тем самым, комплексно оценивать параметры тканевого метаболизма исследуемого объекта. Анализ результатов нескольких методов может предоставить большее количество потенциально полезной информации при проведении исследований.

Таким образом, на сегодняшний день актуальными задачами являются развитие методов оптической визуализации для исследования биологических тканей и, в частности, их метаболизма, а также применение этих методов для получения новых знаний о взаимодействии оптического излучения с биологическими тканями при различных патологических процессах.

Целью диссертационного исследования является разработка и усовершенствование методов оптической визуализации тканевого метаболизма, направленных на повышение эффективности диагностики и качества анализа данных при исследовании социально значимых заболеваний.

Для достижения поставленной цели решены следующие **задачи**:

- 1) Анализ современных методов и технических средств диагностики тканевого метаболизма.
- 2) Разработка метода и устройства поляризационно-чувствительной ГСВ для определения параметров оксигенации, кровенаполнения и морфологических изменений биологических тканей.
- 3) Измерение и анализ оптических характеристик диффузного рассеяния и линейной поляризации *in vivo* кожи нижних конечностей здоровых добровольцев и пациентов с нарушениями тканевого метаболизма, вызванных СД.
- 4) Разработка метода и устройства Стокс-поляризационной визуализации для гистопатологического анализа онкологических неокрашенных образцов.
- 5) Измерение и анализ поляризационных характеристик при изменении тканевого метаболизма ввиду развития онкопроцесса фиксированных в формалине

парафинизированных (FFPE) образцов рака молочной железы и *ex vivo* образцов рака толстого кишечника.

6) Разработка метода и устройства визуализации эндогенной флуоресценции для определения границ опухолевой ткани.

7) Разработка метода и устройства визуализации времени жизни эндогенной флуоресценции для задач оценки тканевого метаболизма с реализацией измерений в частотной области.

8) Разработка метода лазерной спекл-контрастной визуализации с анализом частотно-временных характеристик динамики кровотока.

9) Разработка тест-объектов (оптических фантомов), имитирующих оптические свойства биологических тканей, для задач калибровки и контроля технического состояния систем оптической визуализации.

Методология и методы исследования. Теоретические исследования проведены с применением методов системного анализа, прикладной математической статистики, вейвлет-анализа, методов регрессионного, корреляционного и кластерного анализа и различных методов машинного обучения. Также при выполнении диссертации применялись методы физической и прикладной оптики, биофотоники, численных методов моделирования, решения прямых и обратных задач оптики. Экспериментальные исследования выполнены с использованием методов математического моделирования, планирования и проведения клинических исследований, методов визуализации, трансформации и анализа получаемых данных в реальном масштабе времени на основе компьютерных методов обработки данных в программных средах Matlab, C++ и Python.

Научная новизна:

1) Разработаны новый метод и устройство поляризационно-чувствительной гиперспектральной визуализации, реализующие измерения диффузного отражения и степени остаточной линейной поляризации в диапазоне 510-900 нм, а также нейросетевую обработку спектральных данных. Впервые экспериментально изучены оптические характеристики кожи пациентов с сахарным диабетом,

демонстрирующие статистически значимое снижение оксигенации тканей нижних конечностей диабетических пациентов, увеличение их кровенаполнения и увеличение степени остаточной линейной поляризации. Получены классификатор и решающее правило для дифференциации наличия или отсутствия диабетических осложнений на основе линейного дискриминантного анализа со значениями метрик классификации чувствительности и специфичности 0,95 и 0,85 соответственно.

2) Разработаны новый метод и устройство Стокс-поляризационной визуализации, позволяющие регистрировать полный вектор Стокса отраженного излучения и получать ряд расчетных поляриметрических характеристик. Разработаны классификаторы для дифференциации опухолей на основе методов опорных векторов, случайного леса и логистической регрессии и предложенных поляриметрических предикторов. Разработан метод кластеризации на основе метода k -средних и параметров Стокса для цифрового гистологического анализа FFPE опухолевых образцов без их окрашивания, снижающий трудоемкость и повышающий быстродействие стандартных рутинных гистологических процедур.

3) Разработаны новый метод и устройство визуализации эндогенной флуоресценции с возбуждающим излучением 455 нм для определения в режиме реального времени границ опухолевого образования. Проведенные экспериментальные исследования на *in vivo* модели опухолей печени у мышей доказали высокую чувствительность системы к изменениям эндогенной флуоресценции, обусловленным канцерогенезом, что позволяет без использования красителей визуализировать границы опухоли с высоким контрастом для последующей эффективной резекции.

4) Разработан метод визуализации времени жизни флуоресценции в частотной области на основе пространственного сканирования, применимый к FFPE-образцам биологических тканей. Показана возможность дифференциации доброкачественных и злокачественных изменений на основе анализа параметров флуоресцентного отклика в частотной области, а именно фазового сдвига. Проведены экспериментальные исследования образцов рака молочной железы, продемонстрировавшие высокую контрастность между различными

гистологическими структурами без использования красителей.

5) Предложен метод, основанный на широкопольной визуализации времени жизни флуоресценции в частотной области и ингибиторном анализе, предоставивший новые возможности в анализе содержания различных форм флавопротеинов – ключевых участников тканевого метаболизма. Проведенное исследование впервые демонстрирует возможность использования визуализации времени жизни флуоресценции для оценки действия ингибиторов моноаминоксидазы и других нейромодуляторов на тканевый метаболизм.

6) Разработан новый метод частотно-временного анализа данных лазерной спекл-контрастной визуализации, позволяющий визуализировать регуляционные механизмы кровотока. Использование дополнительных модальностей в виде высокоскоростной видеокапилляроскопии и лазерной доплеровской флоуметрии продемонстрировал возможность анализа осцилляционных компонент периферического кровотока человека в диапазоне 0,0005-2 Гц с помощью метода ЛСКВ. Предложенный новый метод обработки сигналов ЛСКВ впервые продемонстрировал возможность регистрации карт распределения миогенных вазомотий на частоте около 0,1 Гц в периферических сосудах мозга крысы, что позволяет более детализировано анализировать физиологические механизмы регуляции церебрального кровотока.

7) Разработаны оптические тест-объекты (фантомы), имитирующие поглощающие, рассеивающие и флуоресцентные свойства биологических тканей, позволившие калибровать и проводить контроль технического состояния систем оптической визуализации. Предложен новый подход к изготовлению стабильного эластичного полиакриламидного фантома флуоресценции флавинов, имитирующего оптические свойства стромальных тканей.

Достоверность научных положений и выводов подтверждается тщательной разработкой методик проведения эксперимента, использованием современных методов визуализации и измерения физических параметров, обеспечением воспроизводимости наблюдений и измерений, а также сопоставлением полученных данных с результатами существующих теоретических

и экспериментальных исследований; использованием апробированных и подтвержденных методов и методик обработки результатов измерений, согласованием результатов численного моделирования с данными натуральных экспериментов и обеспечением достаточного объема экспериментальных данных для проведения статистического анализа.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость диссертационного исследования заключается в развитии научных представлений о закономерностях взаимодействия оптического излучения с неоднородными биологическими средами, в частности, с тканями, характеризующимися высокой степенью рассеяния. Разработанные в работе численные модели, основанные на методе стохастического моделирования Монте-Карло, позволяют глубоко анализировать процессы распространения света в биологических тканях и учитывать влияние физико-технических параметров систем регистрации на формируемый оптический сигнал. Эти модели создают основу для научного обоснования медико-технических требований к системам оптической визуализации, таких как длина волны, параметры поляризации, конфигурация источников и детекторов и т.п. Важным элементом теоретической значимости является также разработка новых подходов к анализу получаемых данных, включая применение методов регрессионного анализа, кластеризации, нейросетевого моделирования и вейвлет-анализа, что способствует формированию современных междисциплинарных методик обработки информации в биофизике. Кроме того, работа расширяет фундаментальные представления о физических основах метаболических изменений в тканях при различных физиологических и патологических состояниях.

Практическая значимость диссертационного исследования определяется разработкой, реализацией и клинической апробацией новых методов и устройств для неинвазивной оптической визуализации параметров тканевого метаболизма, включая оксигенацию, параметры кровотока и морфологическое состояние тканей. Предложенные технологии, такие как гиперспектральная и Стокс-поляризационная визуализация, а также методы анализа флуоресценции и динамического рассеяния

света, обеспечивают высокую чувствительность к физиологическим и патологическим изменениям в тканях и позволяют проводить диагностику в режиме реального времени без использования экзогенных красителей. Полученные в ходе работы результаты уже внедрены в рамках прикладных проектов, поддержанных Российским научным фондом, РФФИ, Правительством РФ, Президентским грантом и программой Horizon 2020, и применяются при разработке медицинских диагностических систем нового поколения (имеются акты внедрения в ООО НПП «ЛАЗМА»). Разработанные методики используются в образовательном процессе, что подтверждает их ценность не только для научных, но и для образовательных задач. Таким образом, результаты работы представляют собой важный вклад в развитие технологий биомедицинской диагностики, способствуют повышению качества медицинской помощи и расширяют возможности персонализированной медицины.

Основные положения, выносимые на защиту:

1) Разработанная искусственная нейронная сеть для обработки гиперспектральных данных и обученная по выборке более 82000 смоделированных спектров диффузного отражения позволяет восстанавливать значения насыщения крови кислородом в диапазоне 30-100%, объёмной доли крови (0-40%), содержания меланина (1-10%) и толщины эпидермиса (50-250 мкм).

2) Остаточная линейная поляризация (*DOLP*) в диапазоне 510-900 нм является чувствительным маркером возрастных и диабетических изменений кожи. Введенный параметр «индекс поляризации» (*PI*), отражающий интегральную *DOLP*-активность, а также параметры тканевой оксигенации и объёмной доли крови совместно с разработанным классификатором на основе линейного дискриминантного анализа позволяют выявлять наличие или отсутствие диабетических осложнений у пациентов с сахарным диабетом 2 типа с диагностической точностью 0,9 на использованной экспериментальной выборке.

3) Предложенный метод Стокс-поляризационной визуализации с использованием в качестве зондирующего излучения лазера с длиной волны 450 нм, включая кластеризацию методом *k*-средних в пространстве полного вектора

Стокса, позволяет проводить цифровой гистологический анализ FFPE-образцов тканей молочной железы без окрашивания, выделяя опухолевые, фиброзные и жировые участки. Расчет матриц Мюллера и использование симметричного разложения, а также применение метода случайного леса позволяет выявлять опухолевые участки *ex vivo* образцов рака толстого кишечника с диагностической точностью 0,97.

4) Предложенный метод визуализации интенсивности эндогенной флуоресценции тканевых флуорофоров (флавинов, коллагена, порфирина) при возбуждающем излучении 455 нм обеспечивает определение границ опухолевой ткани гепатоцеллюлярной карциномы, достигая шестикратного улучшения контраста в сравнении с визуализацией в белом свете.

5) Измерение фазового времени жизни флуоресценции при возбуждающем излучении 450 нм позволяет проводить цифровой гистологический анализ FFPE-образцов тканей молочной железы без окрашивания. Фазовое время жизни флуоресценции в исследованной выборке опухолевых тканей молочной железы ($1,7 \pm 1,3$ нс) статистически значимо ниже, чем в фиброзной ткани ($4,3 \pm 1,8$ нс, $p < 0,01$).

6) Предложенный метод широкопольной визуализации времени жизни флуоресценции с реализацией измерений в частотной области с возбуждающим излучением 450 нм впервые продемонстрировал региональную специфику времени жизни флуоресценции флавопротеинов в различных отделах мозга лабораторных крыс (1,8-3 нс), отражающую метаболическое разнообразие, и позволил отслеживать влияние нейромодуляторов на тканевый метаболизм.

7) Разработанный метод частотно-временной декомпозиции сигналов ЛСКВ позволяет исследовать ключевые физиологические механизмы регуляции периферического кровотока на основе анализа осцилляционных компонент в диапазоне 0,005-2 Гц. Предложенный новый метод обработки сигналов ЛСКВ с картированием осцилляций кровотока демонстрирует высокую интенсивность миогенных вазомоций на частоте около 0,1 Гц в периферических сосудах мозга грызунов.

8) Разработанные оптические фантомы на основе поливинилхлорида и полиакриламида имитируют поглощающие, рассеивающие и флуоресцентные свойства биологических тканей, что позволяет стандартизировать оптические измерения и проводить калибровку систем визуализации тканевого метаболизма.

Апробация диссертации. Основные результаты исследований были доложены на международных и всероссийских конференциях: «SPIE Photonics West», Сан-Франциско, США, 2015-2023; «SPIE Photonics Europe», Страсбург, Франция, 2018, 2020, 2022; «Saratov Fall Meeting», Саратов, 2014-2024; «European Conferences on Biomedical Optics (ECBO)», Мюнхен, Германия, 2017, 2019, 2021, 2023; «International Conference Laser Optics (ICLO)», Санкт-Петербург, 2020, 2022, 2024; «Laser Applications in Life Sciences (LALS)», Рамат-Ган, Израиль, 2018, Мюгла, Турция, 2023, 2024; «Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии» (ФРЭМЭ), Владимир-Суздаль, 2016, 2018, 2020, 2022, 2024; «Микроциркуляция и гемореология», Ярославль, 2015; «Актуальные проблемы эндокринологии», 2017, Санкт-Петербург; «Биотехнические, медицинские и экологические системы, измерительные устройства и робототехнические комплексы – Биомедсистемы», Рязань, 2018-2022; «Современные методы исследования в клеточной биологии и медицине», Орёл, 2023; «Зимняя школа по механике сплошных сред», Пермь, 2021, 2023; «VII Съезд биофизиков России», Краснодар, 2023, а также ряде других.

Комплексная апробация завершённой диссертации проведена в Орловском государственном университете имени И.С. Тургенева, БУЗ Орловской области «Орловская областная клиническая больница», Медицинском центре Плявниеки и Клинической университетской больнице имени Паула Страдыня (Рига, Латвия), а также на базе научно-производственного предприятия «ЛАЗМА» (г. Москва).

Результаты диссертационной работы имеют практическое значение для развития оптических технологий, биофизики и биомедицинского приборостроения в целом. Актуальность диссертационных исследований подтверждается грантовой поддержкой ряда проектов по результатам российских и международных конкурсов.

Полученные в диссертационной работе результаты теоретических и прикладных исследований использовались при выполнении проекта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-02-00669 «Разработка технологии многопараметрической оптической биопсии патологических процессов органов брюшной полости», 2018-2020, исполнитель проекта); проектов Российского научного фонда (№ 18-15-00201 «Клинико-экспериментальное обоснование многопараметрической оптической биопсии органов гепатопанкреатодуоденальной зоны при малоинвазивных хирургических операциях», 2018-2020, основной исполнитель проекта; №21-15-00325 «Разработка мультимодальной оптической диагностической технологии для анализа структурно-функционального состояния печени при чрескожной пункционной биопсии», 2021-2023, основной исполнитель проекта; №19-79-00082 «Гиперспектральная Стокс-поляризационная визуализация малигнизации биологических тканей», 2019-2021, руководитель проекта; №22-75-10088 «Оптическая тераностика гипергликемических осложнений», 2022-2025, руководитель проекта); проекта Европейского Союза H2020 имени Марии Склодовской-Кюри для постдоков и опытных исследователей (№839888, «Multimodal hyperspectral system for imaging of biological tissues glycation (MultiBioScan)», 2020-2022, руководитель проекта); гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (№МК-398.2021.4 «Оптическая генерация и детекция синглетного кислорода в задачах редокс-биологии», 2021-2022, руководитель проекта); проектов Правительства Российской Федерации (№075-15-2019-1877, № 075-15-2022-1095 «Митохондрии как мишени в механизме нейродегенеративных заболеваний», 2019-2023, исполнитель проекта и №075-15-2024-621, №075-15-2025-011 «Механизм нейродегенерации: древняя молекула как необходимый элемент физиологии и патологии клеток мозга», 2024-2028, исполнитель проекта).

Разработанные в ходе диссертации методы и устройства используются в учебном процессе ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева» в лекционных курсах и лабораторных практикумах по дисциплинам: «Технические методы

диагностических исследований и лечебных воздействий», «Основы биофотоники», «Оптико-электронные устройства в диагностике, терапии и хирургии», «Биомедицинская спектроскопия и визуализация», «Компьютерное моделирование оптических свойств биотканей» и «Неинвазивные диагностические методы исследования системы микроциркуляции крови», которые разработаны и реализованы соискателем в 2015-2024 годах в рамках направлений подготовки «Биотехнические системы и технологии» (бакалавриат и магистратура), «Лечебное дело» и «Педиатрия» (специалитет).

Личный вклад автора и соавторы фрагментов работы.

Результаты, изложенные в настоящем диссертационном исследовании, в том числе постановка целей и задач, разработка и исследование защищаемых методов, моделей и алгоритмов, основные научные результаты, выводы и рекомендации, принадлежат автору лично. Часть работ выполнена при участии коллег из научно-технологического центра биомедицинской фотоники, включая лабораторию клеточной физиологии и патологии ОГУ имени И.С. Тургенева (г. Орел) и БУЗ Орловской области «Орловская областная клиническая больница» (г. Орел) при выполнении совместных проектов, а также в сотрудничестве с коллегами из других организаций – Университет Оулу (г. Оулу, Финляндия), Университет Астона (Бирмингем, Великобритания), Институт механики сплошных сред Уральского отделения Российской академии наук (г. Пермь), Университет ИТМО (г. Санкт-Петербург).

Структура и объём диссертационной работы. Работа состоит из введения, 6 глав, заключения, списка использованных источников, включающего 493 наименования и изложена на 341 страницах машинописного текста, содержит 107 иллюстраций, 9 таблиц.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 123 научные работы, в том числе 6 монографий (5 – в коллективных монографиях издательств Springer и CRC Press), 43 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК России, 58 зарубежных публикаций в рецензируемых изданиях, индексируемых Scopus или Web of Science (27 статей в журналах 1-ого квартиля), 7 патентов РФ и 9

свидетельств о государственной регистрации программ для ЭВМ, а также более 50 публикаций в других изданиях и в сборниках трудов конференций.

Статьи в изданиях, определённых ВАК Минобрнауки РФ:

1. **Дрёмин В.В.** Оценка уровня сигнала методом Монте-Карло при лазерной флуоресцентной диагностике биоткани [Текст] / **В.В. Дрёмин**, Е.А. Жеребцов, А.В. Дунаев // *Фундаментальные и прикладные проблемы техники и технологии.* – 2012. – Т. 293. – № 3. – С. 134-139.
2. Дунаев А.В. Анализ индивидуальной вариабельности параметров в лазерной флуоресцентной диагностике [Текст] / А.В. Дунаев, **В.В. Дрёмин**, Е.А. Жеребцов, П.С. Гордон, С.Г. Соколовский, Э.У. Рафаилов // *Биотехносфера.* – 2013. – Т. 26. – № 2. – С. 38-45.
3. Жарких Е.В. Возможности исследования изменений амплитуд колебаний кожного кровотока с помощью адаптивного вейвлет-анализа при проведении окклюзионных проб [Текст] / Е.В. Жарких, А.И. Жеребцова, И.Н. Маковик, **В.В. Дрёмин**, Е.А. Жеребцов, Е.В. Потапова, А.В. Дунаев // *Фундаментальные и прикладные проблемы техники и технологии.* – 2015. – № 6. – С. 114-121.
4. Долгушина Л.В. Анализ вклада рассеяния и поглощения в общее затухание сигналов в лазерной доплеровской флоуметрии при различном содержании меланина [Текст] / Л.В. Долгушина, **В.В. Дрёмин**, А.В. Дунаев, Е.А. Жеребцов, К.В. Подмастерьев // *Биотехносфера.* – 2015. – Т. 42. – № 6. – С. 2-6.
5. Новикова И.Н. Возможности применения вейвлет-анализа осцилляций параметров микроциркуляторно-тканевых систем при проведении холодовой прессорной пробы на пальцах рук [Текст] / И.Н. Новикова, **В.В. Дрёмин**, А.В. Дунаев, А.И. Крупаткин, В.В. Сидоров // *Биотехносфера.* – 2015. – Т. 42. – № 6. – С. 26-30.
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. **Дрёмин В.В.** Возможности применения сочетанных методов оптической неинвазивной диагностики при исследовании жизнеспособности тканей нижних

конечностей пациентов с сахарным диабетом [Текст] / **В.В. Дрёмин**, Е.В. Дрёмина, Е.В. Жарких, Е.В. Потапова, Е.А. Алимичева, Г.И. Масалыгина, А.В. Дунаев // *Фундаментальные и прикладные проблемы техники и технологии*. – 2016. – Т. 315. – № 1. – С. 136.

8. **Дрёмин В.В.** Аналитический обзор подходов к математическому моделированию флуоресценции биологических тканей [Текст] / **В.В. Дрёмин** // *Фундаментальные и прикладные проблемы техники и технологии*. – 2016. – Т. 320. – № 6. – С. 92-102.

9. Потапова Е.В. Комплексный подход к неинвазивной оценке микроциркуляторно-тканевых нарушений в стопах пациентов с сахарным диабетом методами спектроскопии [Текст] / Е.В. Потапова, **В.В. Дрёмин**, Е.А. Жеребцов, И.Н. Маковик, Е.В. Жарких, А.В. Дунаев, О.В. Пилипенко, В.В. Сидоров, А.И. Крупаткин // *Оптика и спектроскопия*. – 2017. – Т. 123. – № 6. – С. 946-956.

10. Потапова Е.В. Оценка микроциркуляторных нарушений у пациентов ревматологического профиля с использованием метода спектроскопии диффузного отражения [Текст] / Е.В. Потапова, **В.В. Дрёмин**, Е.А. Жеребцов, И.Н. Маковик, А.И. Жеребцова, А.В. Дунаев, К.В. Подмастерьев, В.В. Сидоров, А.И. Крупаткин, Л.С. Хахичева В.Ф. Мурадян // *Физиология человека*. – 2017. – Т. 43. – № 2. – С. 116-124.

11. Филина М.А. Функциональные изменения микроциркуляции крови в коже стопы при тепловых пробах у пациентов с сахарным диабетом [Текст] / М.А. Филина, Е.В. Потапова, И.Н. Маковик, Е.В. Жарких, **В.В. Дрёмин**, Е.А. Жеребцов, А.В. Дунаев, В.В. Сидоров, А.И. Крупаткин, Е.А. Алимичева, Г.И. Масалыгина, В.Ф. Мурадян // *Физиология человека*. – 2017. – Т. 43. – № 6. – С. 95-102.

12. **Дрёмин В.В.** Возможности лазерной доплеровской флоуметрии в оценке состояния микрогемолимфоциркуляции [Текст] / **В.В. Дрёмин**, И.О. Козлов, Е.А. Жеребцов, И.Н. Маковик, А.В. Дунаев, В.В. Сидоров, А.И. Крупаткин // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. – 2017. – Т. 16. – № 4. – С. 42-49.

13. Козлов И.О. Метод и устройство лазерной доплеровской флоуметрии для

регистрации интенсивности компонентов кожного кровотока [Текст] / И.О. Козлов, Е.А. Жеребцов, А.И. Жеребцова, **В.В. Дрёмин**, А.В. Дунаев // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2017. – № 6. – С. 68-76.

14. Жарких Е.В. Оптическая неинвазивная диагностика функционального состояния микроциркуляторного русла пациентов с нарушением периферической микрогемодинамики [Текст] / Е.В. Жарких, И.Н. Маковик, Е.В. Потапова, **В.В. Дрёмин**, Е.А. Жеребцов, А.И. Жеребцова, А.В. Дунаев, В.В. Сидоров, А.И. Крупаткин // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2018. – Т. 17. – № 3. – С. 23-32.

15. Потапова Е.В. Особенности локальной микроциркуляции крови у пациентов с псориазом [Текст] / Е.В. Потапова, М.А. Филина, И.О. Козлов, Е.В. Жарких, **В.В. Дрёмин**, Н.С. Малая, И.А. Снимщикова, А.В. Дунаев, В.В. Сидоров, А.И. Крупаткин // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2018. – Т. 17. – № 3. – С. 58-64.

16. Кандурова К.Ю. Методы оптической биопсии и их перспективы применения для интраоперационного анализа тканевого метаболизма и микроциркуляции крови в мини-инвазивной хирургии [Текст] / К.Ю. Кандурова, **В.В. Дрёмин**, Е.А. Жеребцов, А.Л. Альянов, А.В. Мамошин, Е.В. Потапова, А.В. Дунаев, В.Ф. Мурадян, В.В. Сидоров, А.И. Крупаткин // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2018. – Т. 17. – № 3. – С. 71-79.

17. Потапова Е.В. Разработка жидкого оптического фантома для флуоресцентных спектроскопических исследований [Текст] / Е.В. Потапова, **В.В. Дрёмин**, Е.А. Жеребцов, К.В. Подмастерьев, А.В. Дунаев // Фундаментальные и прикладные проблемы техники и технологии. – 2018. – Т. 332. – № 6. – С. 105-114.

18. Ставцев Д.Д. Совместное применение оптических методов для исследования параметров микрогемодинамики при ревматических заболеваниях [Текст] / Д.Д. Ставцев, М.В. Волков, Н.Б. Маргарянц, А.В. Потёмкин, **В.В. Дрёмин**, И.Н. Маковик, Л.С. Хахичева, В.Ф. Мурадян, К.В. Подмастерьев, А.В. Дунаев // Фундаментальные и прикладные проблемы техники и технологии. – 2019. – Т. 10. – № 6. – С. 064016.

19. Шуплецов В.В. Устройство для флуоресцентной визуализации опухолевой ткани [Текст] / В.В. Шуплецов, К.Ю. Кандурова, Е.С. Серёгина, Е.В. Потапова, **В.В. Дрёмин**, А.В. Мамошин, К.В. Подмастерьев, А.В. Дунаев // *Фундаментальные и прикладные проблемы техники и технологии.* – 2019. – Т. 61. – № 3. – С. 991-999.
20. Потапова Е.В. Лазерная спекл-контрастная визуализация микроциркуляции крови в тканях поджелудочной железы при лапароскопических вмешательствах [Текст] / Е.В. Потапова, Е.С. Серёгина, **В.В. Дрёмин**, Д.Д. Ставцев, И.О. Козлов, Е.А. Жеребцов, А.В. Мамошин, Ю.В. Иванов, А.В. Дунаев // *Квантовая электроника.* – 2020. – Т. 50. – № 1. – С. 33-40.
21. Кандурова К.Ю. Апробация тонкоигольного оптического зонда для регистрации изменений флуоресценции коферментов клеточного дыхания [Текст] / К.Ю. Кандурова, Е.В. Потапова, Е.А. Жеребцов, **В.В. Дрёмин**, Е.С. Серёгина, А.Ю. Винокуров, А.В. Мамошин, А.В. Борсуков, Ю.В. Иванов, А.В. Дунаев // *Оптика и спектроскопия.* – 2020. – Т. 128. – № 6. – С. 736-745.
22. **Дрёмин В.В.** Математическое моделирование взаимодействия поляризованного света с биологическими тканями [Текст] / **В.В. Дрёмин**, Е.В. Жарких // *Фундаментальные и прикладные проблемы техники и технологии.* – 2020. – Т. 33. – № 5. – С. 988-996.
23. Шуплецов В.В. Использование модельных образцов кожи человека на основе полиакриламида в задачах гиперспектральной флуоресцентной визуализации и спектроскопии [Текст] / В.В. Шуплецов, Е.А. Жеребцов, **В.В. Дрёмин**, А.П. Попов, А.В. Быков, Е.В. Потапова, А.В. Дунаев, И.В. Меглинский // *Квантовая электроника.* – 2021. – Т. 51. – № 2. – С. 118-123.
24. Потапова Е.В. Мультипараметрический подход к оценке кожной микроциркуляции у пациентов дерматологического профиля (на примере псориаза) [Текст] / Е.В. Потапова, М.А. Михайлова, А.К. Королева, Д.Д. Ставцев, **В.В. Дрёмин**, А.В. Дунаев, Н.Ю. Якушкина, А.И. Крупаткин, Н.Б. Маргарянц // *Физиология человека.* – 2021. – Т. 47. – № 6. – С. 33-42.
25. Мамошин А.В. Внедрение оптических технологий для повышения эффективности пункционной биопсии при диффузных и очаговых поражениях

печени / А.В. Мамошин, Д.С. Сумин, К.Ю. Кандурова, В.В. Шуплецов, Е.В. Потапова, **В.В. Дрёмин**, Е.А. Жеребцов, А.В. Дунаев // Лазерная медицина. – 2021. – Т. 25. – № 3S. – С. 24.

26. Новикова И.Н. Прямая оптическая генерация синглетного кислорода в регуляции перфузионно-метаболических изменений в тканях [Текст] / И.Н. Новикова, Е.В. Потапова, Л.В. Ератова, **В.В. Дрёмин**, А.В. Дунаев, А.Ю. Абрамов // Лазерная медицина. – 2021. – Т. 25. – № 3S. – С. 52-53.

27. Брянская Е.О. Цифровая диафаноскопия в диагностике патологических образований верхнечелюстных пазух [Текст] / Е.О. Брянская, Р.Ю. Гнеушев, И.Н. Новикова, Б.М. Шураев, **В.В. Дрёмин**, А.В. Дунаев // Лазерная медицина. – 2021. – Т. 25. – № 3S. – С. 57-58.

28. Корнаева Е.П. Концепция мехатронной установки для исследования реологических свойств физиологических жидкостей [Текст] / Е.П. Корнаева, А.В. Корнаев, И.Н. Стебаков, С.Г. Попов, Д.Д. Ставцев, **В.В. Дрёмин** // Фундаментальные и прикладные проблемы техники и технологии. – 2021. – Т. 1. – С. 83.

29. Корнаева Е.П. Экспериментальная установка для исследования реологических свойств физиологических жидкостей [Текст] / Е.П. Корнаева, С.Г. Попов, И.Н. Стебаков, **В.В. Дрёмин**, Д.Д. Ставцев // Фундаментальные и прикладные проблемы техники и технологии. – 2021. – Т. 50. – № 1. – С. 33.

30. Корнаева Е.П. Композиция моделей классификации для распознавания скорости течения жидкостей в капиллярах [Текст] / Е.П. Корнаева, И.Н. Стебаков, Д.Д. Ставцев, **В.В. Дрёмин**, А.В. Корнаев // Известия Юго-Западного государственного университета. – 2021. – Т. 25. – № 2. – С. 93-106.

31. Голубова Н.В. Мультимодальная лапароскопическая система для оценки перфузии и метаболизма биологических тканей [Текст] / Н.В. Голубова, **В.В. Дрёмин**, Е.В. Потапова, А.В. Дунаев // Фундаментальные и прикладные проблемы техники и технологии. – 2022. – Т. 15. – № 1. – С. 39.

32. Корнаева Е.П. Моделирование течения неньютоновских жидкостей в тороидальном канале инерционного вискозиметра с системой технического зрения

[Текст] / Е.П. Корнаева, И.Н. Стебаков, А.В. Корнаев, **В.В. Дрёмин** // Известия Юго-Западного государственного университета. – 2022. – Т. 26, № 1. – С. 129-147.

33. Шуплецов В.В. Дифференциация гепатоцеллюлярной карциномы и паренхимы печени при пункционной биопсии на основе параметров времени жизни флуоресценции [Текст] / В.В. Шуплецов, Е.В. Потапова, Е.А. Жеребцов, **В.В. Дрёмин**, К.Ю. Кандурова, Д.С. Сумин, А.В. Мамошин, А.В. Дунаев // Медицинская физика. – 2023. – № 2. – С. 104.

34. Адаменков Н.А. Возможности метода гиперспектральной визуализации для определения жизнеспособности кишечника при моделировании локальной ишемии [Текст] / Н.А. Адаменков, В.В. Шуплецов, И.А. Горюнов, А.А. Палалов, Е.Г. Чугунова, Н.И. Калуга, А.В. Мамошин, **В.В. Дрёмин** // Медицинская физика. – 2023. – № 2. – С. 17-18.

35. Голубова Н.В. Метод лазерной спекл-контрастной визуализации в задачах определения характеристик церебрального кровообращения у лабораторного животного [Текст] / Н.В. Голубова, Е.С. Серегина, Е.В. Потапова, **В.В. Дрёмин** // Медицинская физика. – 2023. – № 2. – С. 39.

36. Ератова Л.В. Лазерная индукция синглетного кислорода как реализация фотодинамической терапии без фотосенсибилизаторов [Текст] / Л.В. Ератова, **В.В. Дрёмин**, И.Н. Маковик // Медицинская физика. – 2023. – № 2. – С. 50-51.

37. Потапова Е.В. Устройство флуоресцентно-отражательной спектроскопии в диагностике заболеваний печени [Текст] / Е.В. Потапова, А.В. Мамошин, **В.В. Дрёмин**, Е.А. Жеребцов, К.Ю. Кандурова, В.В. Шуплецов, Д.С. Сумин, А.В. Дунаев // Медицинская физика. – 2023. – № 2. – С. 85.

38. Журило И.П. Возможности метода гиперспектральной визуализации при инфантильных гемангиомах у детей [Текст] / И.П. Журило, В.В. Шуплецов, И.А. Горюнов, Е.В. Потапова, А.И. Медведев, **В.В. Дрёмин** // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2023. – Т. 13. – С. 64.

39. Попов С.В. Современные оптические неинвазивные технологии в диагностике урологических заболеваний. Обзор литературы. Часть I [Текст] / С.В. Попов, Р.Г. Гусейнов, Е.В. Потапова, К.В. Сивак, **В.В. Дрёмин**, В.В. Перепелица,

- Т.А. Лелявина, А.В. Дунаев // Урология. – 2024. – № 5. – С. 109-115.
40. Попов С.В. Современные оптические неинвазивные технологии в диагностике урологических заболеваний. Обзор литературы. Часть II [Текст] / С.В. Попов, Р.Г. Гусейнов, Е.В. Потапова, К.В. Сивак, **В.В. Дрёмин**, В.В. Перепелица, Т.А. Лелявина, А.В. Дунаев // Урология. – 2024. – № 6. – С. 134-141.
41. Адаменков Н.А. Интраоперационная оценка жизнеспособности кишечной стенки [Текст] / Н.А. Адаменков, А.В. Мамошин, **В.В. Дрёмин**, Е.В. Потапова, В.В. Шуплецов, Ю.В. Иванов, Д.Н. Панченков, А.В. Дунаев // Клиническая практика. – 2024. – Т. 15. – № 4. – С. 46-58.
42. Адаменков Н.А. Оценка перфузии кишечной стенки в условиях ишемии с применением метода гиперспектральной визуализации [Текст] / Н.А. Адаменков, А.В. Мамошин, **В.В. Дрёмин**, Е.В. Потапова, В.В. Шуплецов, И.А. Горюнов, А.А. Палалов, А.В. Дунаев // Оперативная хирургия и клиническая анатомия (Пироговский научный журнал). – 2024. – Т. 8. – № 1. – С. 5-13.
43. Рыжков И.А. Параметры микроциркуляции в коже как диагностические маркеры нарушения центрального и церебрального кровообращения при геморрагическом шоке (экспериментальное исследование) [Текст] / И.А. Рыжков, Н.В. Голубова, К.Н. Лапин, С.Н. Калабушев, **В.В. Дрёмин**, Е.В. Потапова, А.В. Дунаев, В.Т. Долгих, В.В. Мороз // Общая реаниматология. – 2025. – Т. 21. – № 3. – С. 11-25.

Статьи в научных журналах, индексируемых в базах данных

Scopus и Web of Science:

44. 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 and Physics. – 2015. – Vol. 37. – № 6. – P. 574-583.
45. Zherebtsov E. Optical non-invasive diagnostics of microcirculatory-tissue systems of the human body: questions of metrological and instrumentation provision [Text] / E. Zherebtsov, **V. Dremin**, A. Zherebtsova, I. Makovik, A. Dunaev // Journal of Biomedical

Photonics & Engineering. – 2016. – Vol. 2. – № 4. – P. 040305.

46. 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.

47. **Dremin V.V.** Multimodal optical measurement for study of lower limb tissue viability in patients with diabetes mellitus [Text] / **V.V. Dremin**, E.A. Zherebtsov, V.V. Sidorov, A.I. Krupatkin, I.N. Makovik, A.I. Zherebtsova, E.V. Zharkikh, E.V. Potapova, A.V. Dunaev, A.A. Doronin, A.V. Bykov, I.E. Rafailov, K.S. Litvinova, S.G. Sokolovski, E.U. Rafailov // Journal of Biomedical Optics. – 2017. – Vol. 22. – № 8. – P. 085003.

48. Makovik I.N. Detection of angiospastic disorders in the microcirculatory bed using laser diagnostics technologies [Text] / I.N. Makovik, A.V. Dunaev, **V.V. Dremin**, A.I. Krupatkin, V.V. Sidorov, L.S. Khakhicheva, V.F. Muradyan, O.V. Pilipenko, I.E. Rafailov, K.S. Litvinova // Journal of Innovative Optical Health Sciences. – 2018. – Vol. 11. – № 1. – P. 1750016.

49. Mizeva I. Spectral analysis of the blood flow in the foot microvascular bed during thermal testing in patients with diabetes mellitus [Text] / I.A. Mizeva, E.V. Zharkikh, **V.V. Dremin**, E.A. Zherebtsov, I.I. Makovik, E.V. Potapova, A.V. Dunaev // Microvascular Research. – 2018. – Vol. 120. – P. 13-20.

50. Mizeva I.A. Optical probe pressure effects on cutaneous blood flow [Text] / I.A. Mizeva, E.V. Potapova, **V.V. Dremin**, E.A. Zherebtsov, M.A. Mezentsev, V.V. Shuleptsov, A.V. Dunaev // Clinical Hemorheology and Microcirculation. – 2019. – Vol. 72. – № 3. – P. 259-267.

51. Kandurova K. Fiber-optic system for intraoperative study of abdominal organs during minimally invasive surgical interventions [Text] / K. Kandurova, **V. Dremin**, E. Zherebtsov, E. Potapova, A. Alyanov, A. Mamoshin, Y. Ivanov, A. Borsukov, A. Dunaev // Applied Sciences. – 2019. – Vol. 9. – № 2. – P. 217.

52. Zherebtsova A.I. Multimodal optical diagnostics of the microhaemodynamics in upper and lower limbs [Text] / A.I. Zherebtsova, **V.V. Dremin**, I.N. Makovik, E.A. Zherebtsov, A.V. Dunaev, A. Goltsov, S.G. Sokolovski, E.U. Rafailov // Frontiers in

Physiology. – 2019. – Vol. 10. – P. 416.

53. **Dremin V.** Dynamic evaluation of blood flow microcirculation by combined use of the laser Doppler flowmetry and high-speed videocapillaroscopy methods [Text] / **V. Dremin, I. Kozlov**, M. Volkov, N. Margaryants, A. Potemkin, E. Zherebtsov, A. Dunaev, I. Gurov // Journal of Biophotonics. – 2019. – Vol. 12. – № 6. – P. e201800317.

54. Zherebtsov E. Hyperspectral imaging of human skin aided by artificial neural networks [Text] / E. Zherebtsov, **V. Dremin**, A. Popov, A. Doronin, D. Kurakina, M. Kirillin, I. Meglinski, A. Bykov // Biomedical Optics Express. – 2019. – Vol. 10. – № 7. – P. 3545-3559.

55. **Dremin V.** Influence of blood pulsation on diagnostic volume in pulse oximetry and photoplethysmography measurements [Text] / **V. Dremin**, E. Zherebtsov, A. Bykov, A. Popov, A. Doronin, I. Meglinski // Applied Optics. – 2019. – Vol. 58. – № 34. – P. 9398-9405.

56. **Dremin V.** Imaging of early stage breast cancer with circularly polarized light [Text] / **V. Dremin**, D. Anin, O. Sieryi, M. Borovkova, J. Näpänkangas, I. Meglinski, A. Bykov // Proceedings of SPIE. – 2020. – Vol. 11363. – P. 1136304.

57. Shupletsov V. Fluorescence imaging system for biological tissues diagnosis: phantom and animal studies [Text] / V. Shupletsov, K. Kandurova, **V. Dremin**, E. Potapova, M. Apanaykin, U. Legchenko, A. Dunaev // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. – 2020. – Vol. 6. – № 1. – P. 010303.

58. Ivanov D. Colon cancer detection by using Poincaré sphere and 2D polarimetric mapping of *ex vivo* colon samples [Text] / D. Ivanov, **V. Dremin**, A. Bykov, E. Borisova, T. Genova, A. Popov, R. Ossikovski, T. Novikova, I. Meglinski // Journal of Biophotonics. – 2020. – Vol. 13. – № 8. – P. e202000082.

59. Abramov A.Y. Interaction of oxidative stress and misfolded proteins in the mechanism of neurodegeneration [Text] / A.Y. Abramov, E.V. Potapova, **V.V. Dremin**, A.V. Dunaev // Life. – 2020. – Vol. 10. – № 7. – P. 101.

60. Mizeva I. Wavelet analysis of the temporal dynamics of the laser speckle contrast in human skin [Text] / I. Mizeva, **V. Dremin**, E. Potapova, E. Zherebtsov; I. Kozlov, A. Dunaev // IEEE Transactions on Biomedical Engineering. – 2019. – Vol. 67. – № 7. – P.

1882-1889.

61. Zharkikh E. Biophotonics methods for functional monitoring of complications of diabetes mellitus [Text] / E. Zharkikh, **V. Dremín**, E. Zherebtsov, A. Dunaev, I. Meglinski // *Journal of Biophotonics*. – 2020. – Vol. 13. – № 10. – P. e202000203.
62. **Dremín V.** Optical percutaneous needle biopsy of the liver: a pilot animal and clinical study [Text] / V. Dremín, E. Potapova, E. Zherebtsov, K. Kandurova, V. Shupletsov, A. Alekseyev, A. Mamoshin, A. Dunaev // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 14200.
63. Zherebtsov E. Machine learning aided photonic diagnostic system for minimally invasive optically guided surgery in the hepatoduodenal area [Text] / E. Zherebtsov, M. Zajnulina, K. Kandurova, E. Potapova, **V. Dremín**, A. Mamoshin, S. Sokolovski, A. Dunaev, E.U. Rafailov // *Diagnostics*. – 2020. – Vol. 10. – № 11. – P. 873.
64. **Dremín V.** Monitoring oxidative metabolism while modeling pancreatic ischemia in mice using a multimodal spectroscopy technique [Text] / **V. Dremín**, E. Potapova, A. Mamoshin, A. Dunaev, E. Rafailov // *Laser Physics Letters*. – 2020. – Vol. 17. – № 11. – P. 115605.
65. Saha M. Wearable laser Doppler flowmetry sensor: a feasibility study with smoker and non-smoker volunteers [Text] / M. Saha, **V. Dremín**, I. Rafailov, A. Dunaev, S. Sokolovski, E. Rafailov // *Biosensors*. – 2020. – Vol. 10. – № 12. – P. 201.
66. **Dremín V.** Histological imaging of unstained cancer tissue samples by circularly polarized light [Text] / **V. Dremín**, O. Sieryi, M. Borovkova, J. Näpänkangas, I. Meglinski, A. Bykov // *Proceedings of SPIE*. – 2021. – Vol. 11919. – P. 119190F.
67. **Dremín V.** Influence of melanin content on laser Doppler flowmetry and tissue reflectance oximetry signal formation [Text] / **V. Dremín**, N. Golubova, E. Potapova, A. Dunaev // *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. – 2021. – Vol. 7. – № 4. – P. 040306.
68. Bryanskaya E.O. Optical diagnostics of the maxillary sinuses by digital diaphanoscopy technology [Text] / E.O. Bryanskaya, I.N. Novikova, **V.V. Dremín**, R.Y. Gneushev, O.A. Bibikova, A.V. Dunaev, V.G. Artyushenko // *Diagnostics*. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 77.

69. **Dremin V.** Skin complications of diabetes mellitus revealed by polarized hyperspectral imaging and machine learning [Text] / **V. Dremin**, Z. Marcinkevics, E. Zharebtsov, A. Popov, A. Grabovskis, H. Kronberga, K. Geldnere, A. Doronin, I. Meglinski, A. Bykov // *IEEE Transactions on Medical Imaging*. – 2021. – Vol. 40. – № 4. – P. 1207-1216.
70. Mizeva I. Spatial heterogeneity of cutaneous blood flow respiratory-related oscillations quantified via laser speckle contrast imaging [Text] / I. Mizeva, E. Potapova, **V. Dremin**, I. Kozlov, A. Dunaev // *PLoS One*. – 2021. – Vol. 16. – № 5. – P. e0252296.
71. Ivanov D. Polarization and depolarization metrics as optical markers in support to histopathology of *ex vivo* colon tissue [Text] / D. Ivanov, **V. Dremin**, E. Borisova, A. Bykov, T. Novikova, I. Meglinski, R. Ossikovski // *Biomedical Optics Express*. – 2021. – Vol. 12. – № 7. – P. 4560-4572.
72. Piavchenko G. Impairments of cerebral blood flow microcirculation in rats brought on by cardiac cessation and respiratory arrest [Text] / G. Piavchenko, I. Kozlov, **V. Dremin**, D. Stavtsev, E. Seryogina, K. Kandurova, V. Shupletsov, K. Lapin, A. Alekseyev, S. Kuznetsov, A. Bykov, A. Dunaev, I. Meglinski // *Journal of Biophotonics*. – 2021. – Vol. 14. – № 12. – P. e202100216.
73. Ivanov D. Polarization-based histopathology classification of *ex vivo* colon samples supported by machine learning [Text] / D. Ivanov, **V. Dremin**, T. Genova, A. Bykov, T. Novikova, R. Ossikovski, I. Meglinski // *Frontiers in Physics*. – 2022. – Vol. 9. – P. 814787.
74. Baev A. Y. Interaction of mitochondrial calcium and ROS in neurodegeneration [Text] / A.Y. Baev, A.Y. Vinokurov, I.N. Novikova, **V.V. Dremin**, E.V. Potapova, A.Y. Abramov // *Cells*. – 2022. – Vol. 11. – № 4. – P. 706.
75. Zharebtsov E.A. Fluorescence lifetime needle optical biopsy discriminates hepatocellular carcinoma [Text] / E.A. Zharebtsov, E.V. Potapova, A.V. Mamoshin, V.V. Shupletsov, K.Y. Kandurova, **V.V. Dremin**, A.Y. Abramov, A.V. Dunaev // *Biomedical Optics Express*. – 2022. – Vol. 13. – № 2. – P. 633-646.
76. Potapova E. Endofluorescence imaging of murine hepatocellular carcinoma cell culture by fluorescence lifetime microscopy with modulated CMOS camera [Text] / E.

- Potapova, E. Zherebtsov, K. Kandurova, A. Palalov, **V. Dremin**, A. Dunaev // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. – 2022. – Vol. 8. – № 1. – P. 010303.
77. **Dremin V.** Simulation of thermal field distribution in biological tissue and cell culture media irradiated with infrared wavelengths / **V. Dremin**, I. Novikova, E. Rafailov // Optics Express. – 2022. – Vol. 30. – № 13. – P. 23078-23089.
78. Kandurova K. Optical properties of perfused rat liver tissues [Text] / K. Kandurova, A. Palalov, E. Seryogina, **V. Dremin**, A. Dunaev, E. Potapova // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. – 2016. – Vol. 2. – № 4. – P. 040305.
79. Novikova I.N. Laser-induced singlet oxygen selectively triggers oscillatory mitochondrial permeability transition and apoptosis in melanoma cell lines [Text] / I.N. Novikova, E.V. Potapova, **V.V. Dremin**, A.V. Dunaev, A.Y. Abramov // Life Sciences. – 2022. – Vol. 304. – P. 120720.
80. Kornaeva E.P. A method to measure non-Newtonian fluids viscosity using inertial viscometer with a computer vision system [Text] / E.P. Kornaeva, I.N. Stebakov, A.V. Kornaev, **V.V. Dremin**, S.G. Popov, A.Y. Vinokurov // International Journal of Mechanical Sciences. – 2023. – Vol. 242. – P. 107967.
81. Zherebtsov E. Diagnosis of skin vascular complications revealed by time-frequency analysis and laser Doppler spectrum decomposition [Text] / E. Zherebtsov, I. Kozlov, **V. Dremin**, A. Bykov, A. Dunaev, I. Meglinski // IEEE Transactions on Biomedical Engineering. – 2023. – Vol. 70. – № 1. – P. 3-14.
82. Golubova N. Time-frequency analysis of laser speckle contrast for transcranial assessment of cerebral blood flow [Text] / N. Golubova, E. Potapova, E. Seryogina, **V. Dremin** // Biomedical Signal Processing and Control. – 2023. – Vol. 85. – P. 104969.
83. **Dremin V.** Lesion detection and analysis using optical imaging [Text] / **V. Dremin** // Diagnostics. – 2023. – Vol. 13. – № 9. – P. 1565.
84. Zharkikh E.V. Sampling volume assessment for wearable multimodal optical diagnostic device [Text] / E.V. Zharkikh, **V.V. Dremin**, A.V. Dunaev // Journal of Biophotonics. – 2023. – Vol. 16. – № 9. – P. e202300139.
85. Bryanskaya E.O. Digital diaphanoscopy of maxillary sinus pathologies supported by machine learning [Text] / E.O. Bryanskaya, **V.V. Dremin**, V.V. Shupletsov, A.V.

Kornaev, M.Yu. Kirillin, A.V. Bakotina, D.N. Panchenkov, K.V. Podmasteryev, V.G. Artyushenko, A.V. Dunaev // *Journal of Biophotonics*. – 2023. – Vol. 16. – № 9. – P. e202300138.

86. Makovik I. Efficiency of direct photoinduced generation of singlet oxygen at different wavelengths, power density and exposure time of laser irradiation [Text] / I. Makovik, A. Vinokurov, A. Dunaev, E. Rafailov, **V. Dremin** // *Analyst*. – 2023. – Vol. 148. – № 15. – P. 3559-3564.

87. **Dremin V.** Direct laser-induced singlet oxygen in biological systems: application from *in vitro* to *in vivo* [Text] / **V. Dremin**, O. Semyachkina-Glushkovskaya, E. Rafailov // *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. – 2023. – Vol. 29. – № 4. – P. 7200911.

88. Galiakhmetova D. Ultra-short laser pulses propagation through mouse head tissues: experimental and computational study [Text] / D. Galiakhmetova, **V. Dremin**, A. Koviarov, D. Stoliarov, N. Ngum, R.C. Murugesan, R. Parri, S. Sokolovski, E.U. Rafailov // *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. – 2023. – Vol. 29. – № 4. – P. 7200311.

89. Potapova E.V. Detection of NADH and NADPH levels *in vivo* identifies shift of glucose metabolism in cancer to energy production [Text] / E.V. Potapova, E.A. Zherebtsov, V.V. Shupletsov, **V.V. Dremin**, K.Y. Kandurova, A.V. Mamoshin, A.Y. Abramov, A.V. Dunaev // *The FEBS Journal*. – 2024. – Vol. 291. – № 12. – P. 2674-2682.

90. Makovik I. Vascular targeted optical theranostics: enhanced photoplethysmography imaging of laser-induced singlet oxygen effects [Text] / I. Makovik, M. Volkov, L. Eratova, **V. Dremin** // *Optics Letters*. – 2024. – Vol. 49. – № 5. – P. 1137-1140.

91. **Dremin V.** Incremental residual polarization caused by aging in human skin [Text] / **V. Dremin**, E. Zharkikh, I. Lopushenko, Z. Marcinkevics, A. Bykov, I. Meglinski // *Journal of Biomedical Optics*. – 2024. – Vol. 29. – № 5. – P. 052912.

92. Kalyuzhnaya Y.N. An alternative photothrombotic model of transient ischemic attack [Text] / Y.N. Kalyuzhnaya, A.K. Logvinov, S.G. Pashkevich, N.V. Golubova, E.S. Seryogina, E.V. Potapova, **V.V. Dremin**, A.V. Dunaev, S.V. Demyanenko // *Translational*

Stroke Research. – 2024.

93. Khalid A. Dual-mode OCT/fluorescence system for monitoring the morphology and metabolism of laser-printed 3D full-thickness skin equivalents [Text] / A. Khalid, **V. Dremine**, A. El-Tamer, M. Surnina, C. Lancelot, E. Rafailov, S. Sokolovski // Biomedical Optics Express. – 2024. – Vol. 15. – № 11. – P. 6299-6312.
94. Potapova E.V. *In vivo* time-resolved fluorescence detection of liver cancer supported by machine learning [Text] / E.V. Potapova, V.V. Shupletsov, **V.V. Dremine**, E.A. Zhrebtsov, A.V. Mamoshin, A.V. Dunaev // Lasers in Surgery and Medicine. – 2024. – Vol. 56. – № 10. – P. 836-844.
95. Eratova L. Effects of 1267 nm illumination on microcirculation regulatory mechanisms [Text] / L. Eratova, I. Makovik, **V. Dremine** // Journal of Biophotonics. – 2024. – P. e202400296.
96. **Dremine V.** Blood flow dynamics in the arterial and venous parts of the capillary [Text] / **V. Dremine**, M. Volkov, N. Margaryants, D. Myalitsin, E. Rafailov, A. Dunaev // Journal of Biomechanics. – 2025. – Vol. 179. – P. 112482.
97. Golubova N. Effect of thinned-skull cranial window on monitoring cerebral blood flow using laser speckle contrast imaging [Text] / N. Golubova, I. Ryzhkov, K. Lapin, E. Seryogina, A. Dunaev, **V. Dremine**, E. Potapova // IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics. – 2025. – Vol. 31. – № 4. – P. 7000108.
98. Galiakhmetova D. Nonlinear optical properties of photosensory core modules of monomeric and dimeric bacterial phytochromes [Text] / D. Galiakhmetova, A. Koviarov, **V. Dremine**, T. Gric, D. Stoliarov, A. Gorodetsky, M. Maimaris, D. Shcherbakova, M. Baloban, V. Verkhusha, S. Sokolovski, E. Rafailov // Protein Science. – 2025. – Vol. 34. – № 5. – P. e70118.
99. Eratova L. Singlet oxygen detection: A review of recent advances [Text] / L. Eratova, E. Zharkikh, E. Rafailov, **V. Dremine** // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. – 2025. – Vol. 11. – № 2. – P. 020201.
100. Chiang J. Low-level light therapy alone versus combination therapy with intense pulsed light in the treatment of dry eye disease with meibomian gland dysfunction: A randomised paired-eye and mechanism of action trial [Text] / J. Chiang, **V. Dremine**, D.

Sempa, H. Lama, P. Tinga, M. Ayaza, J. Wolffsohn // Contact Lens and Anterior Eye. – 2025. – Vol. 11. – № 2. – P. 102456.

101. Stelmashchuk O. Laser-generated singlet oxygen is protective against beta-amyloid neurotoxicity [Text] / O. Stelmashchuk, **V. Dremin**, A. Abramov // Life Sciences. – 2025. – Vol. 378. – № 2. – P. 123823.

Монографии:

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

103. Potapova, E. Multimodal optical diagnostic in minimally invasive surgery [Text] / E. Potapova, **V. Dremin**, E. Zherebtsov, A. Mamoshin, A. Dunaev // Multimodal Optical Diagnostics of Cancer. – Springer International Publishing, 2020. – С. 397-424.

104. Vinokurov A.Y. Assessment of mitochondrial membrane potential and NADH redox state in acute brain slices [Text] / A.Y. Vinokurov, **V.V. Dremin**, G.A. Piavchenko, O.A. Stelmashchuk, P.R. Angelova, A.Y. Abramov // Mitochondrial Medicine: Volume 2: Assessing Mitochondria. – Springer International Publishing, 2021. – С. 193-202.

105. **Dremin V.** Hyperspectral imaging of diabetes mellitus skin complications [Text] / **V. Dremin**, E. Zherebtsov, A. Popov, I. Meglinski, A. Bykov // Biomedical Photonics for Diabetes Research. – CRC Press, 2022. – С. 177-195.

106. Zharkikh E. Fluorescent technology in the assessment of metabolic disorders in diabetes [Text] / E. Zharkikh, **V. Dremin**, A. Dunaev // Biomedical Photonics for Diabetes Research. – CRC Press, 2022. – С. 197-212.

107. **Dremin V.** *In vivo* fluorescence measurements of biological tissue viability [Text] / **V. Dremin**, S. Sokolovski, E. Rafailov, E. Zharkikh, E. Potapova, A. Dunaev, E. Zherebtsov // Advanced Photonics Methods for Biomedical Applications. – CRC Press, 2023. – С. 1-37.

Патенты и свидетельства о госрегистрации программ:

108. **Дрёмин В.В.** Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2017618099. Программа для моделирования спектров флуоресценции

биологических тканей / **В.В. Дрёмин**, А.В. Дунаев, М.: РосПатент; Заявитель и правообладатель: Дрёмин В.В. № 2017614797; заявлено 25.05.2017; дата регистрации 21.07.2017.

109. Патент № 2663938 Российская Федерация, СПК А61В 5/02. Устройство для оптической диагностики кровоснабжения и жизнеобеспечения биологических тканей / **В.В. Дрёмин**, И.Н. Маковик, Е.А. Жеребцов, А.И. Жеребцова, Е.В. Жарких, Е.В. Потапова, А.В. Дунаев; заявл. 25.05.2017; опубл. 13.08.2018, Бюл. № 23.

110. Патент № 2688811 Российская Федерация, МПК А61В 5/1455. Способ диагностики микроциркуляторно-тканевых нарушений в стопах пациентов с сахарным диабетом / **В.В. Дрёмин**, Е.В. Потапова, Е.В. Жарких, И.Н. Маковик, Е.А. Жеребцов, А.И. Жеребцова, А.В. Дунаев; заявл. 15.11.2017; опубл. 15.05.2019 Бюл. № 14.

111. Патент № 2709830 Российская Федерация, МПК А61В 6/00, G01N 21/47. Устройство флуоресцентно-отражательной спектроскопии для диагностики очаговых и диффузных новообразований при проведении тонкоигольной пункционно-аспирационной биопсии / А.В. Мамошин, Е.В. Потапова, **В.В. Дрёмин**, Е.А. Жеребцов, К.Ю. Кандурова, А.В. Дунаев – заявл. 21.12.2018; опубл. 23.12.2019 Бюл. № 36.

112. Михайлова М.А. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ №2020619474 Программный модуль контроля для спекл-контрастной визуализации в режиме реального времени / **Дрёмин В.В.**, Козлов И.О., Михайлова М.А., Сдобнов А.Ю. М.: РосПатент; – заявл. 31.07.2020; опубл. 31.07.2020.

113. Шуплецов В.В. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ №2020667760 Программный модуль для аппроксимации и анализа скорости изменения временного ряда интенсивности флуоресценции / Шуплецов В.В., **Дрёмин В.В.**, М.: РосПатент; – заявл. 18.12.2020; опубл. 29.12.2020.

114. Корнаева Е.П. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ №2021618101 Программа распознавания скорости течения физиологических жидкостей в капиллярах на основе данных лазерной спекл-контрастной визуализации / Корнаева Е.П., Стебаков И.Н., Дрёмин В.В., М.: РосПатент; – заявл.

04.05.2021; опубл. 24.05.2021.

115. Стебаков И.Н. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ №2022616835 Программа распознавания скорости течения физиологических жидкостей в капиллярах на основе данных лазерной спекл-контрастной визуализации / Стебаков И.Н., Корнаева Е.П., **Дрёмин В.В.**, М.: РосПатент; – заявл. 30.03.2022; опубл. 15.04.2022.

116. Горюнов И.А. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ №2022660839 Расширенный программный модуль для предварительной математической обработки спектра света с последующей визуализацией спектральных характеристик. / Горюнов И.А., Приземин В.Н., Козлов И.О., **Дрёмин В.В.**, М.: РосПатент; – заявл. 28.03.2022; опубл. 10.06.2022.

117. Патент № 2783111 Российская Федерация, МПК А61N 5/067, А61В 18/20. Способ защиты нейронов при нейродегенеративных заболеваниях и устройство для его осуществления / Стельмашук О.А., Новикова И.Н., Потапова Е.В., **Дрёмин В.В.**, Абрамов А.Ю., Жеребцов Е.А., Дунаев А.В.– заявл. 28.07.2021; опубл. 09.11.2022 Бюл. № 31.

118. Брянская Е.О. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2023660330 Программный модуль для количественного анализа изображений цифровой диафаноскопии верхнечелюстных пазух носа (диафаногамм) / Е.О. Брянская, Р.Ю. Гнеушев, **В.В. Дрёмин**, А.В. Дунаев, М.: РосПатент; – заявл. 16.03.2023; опубл. 19.05.2023.

119. Кандурова К.Ю. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2023666425 Программный модуль для управления мультимодальной установкой регистрации спектральных характеристик биологической ткани / К.Ю. Кандурова, И.А. Горюнов, В.Н. Приземин, В.В. Шуплецов, Н.В. Голубова, **В.В. Дрёмин**, Е.В. Потапова, А.В. Дунаев. – М.: РосПатент; – заявл. 18.07.2023; опубл. 01.08.2023.

120. Патент № 2823746 Российская Федерация, МПК А61В 17/24, А61В 1/04. Устройство цифровой диафаноскопии для диагностики патологий верхнечелюстных пазух / Брянская Е.О., **Дрёмин В.В.**, Дунаев А.В., Артюшенко В.Г. – заявл. 23.05.2023; опубл. 29.07.2024 Бюл. № 22.

121. Патент № 2831912 Российская Федерация, МПК А61В 1/313, СПК А61В 1/313. Устройство для интраоперационного определения нарушения микроциркуляции крови в тканях органов брюшной полости при проведении лапароскопических вмешательств / Голубова Н.В., Потапова Е.В., **Дрёмин В.В.**, Мамошин А.В., Дунаев А.В. – заявл. 26.06.2023; опубл. 16.12.2024 Бюл. № 35.
122. Патент № 2832375 Российская Федерация, МПК А61В 1/233. Способ диагностики верхнечелюстного синусита у беременных пациенток / Овчинников А.Ю., Мирошниченко Н.А., Бакотина А.В., Николаева Ю.О., **Дрёмин В.В.**, Дунаев А.В., Брянская Е.О., Баранов А.В., Панченков Д.Н., Астахов Д.А. – заявл. 08.12.2023; опубл. 23.12.2024 Бюл. № 36.
123. Стельмащук О.А. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2025614962 Программа для расчета параметров лазерного излучения / О.А. Стельмащук, Л.В. Ератова, **В.В. Дрёмин**. – М.: РосПатент; – заявл. 20.11.2024; опубл. 27.02.2025.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность коллегам: научному консультанту, д.т.н., доценту Дунаеву А.В., всему коллективу НТЦ биомедицинской фотоники (г. Орёл), а также коллегам из различных российских и зарубежных организаций, в частности д.ф.-м.н. Мизевой И.А. (ИМСС УрО РАН, Пермь), к.т.н. Маргарянц Н.Б. и к.т.н. Волкову М.В. (Университет ИТМО, Санкт-Петербург), к.т.н. Жеребцову Е.А. и к.ф.-м.н. Быкову А.В. (Университет Оулу, Финляндия), проф. Меглинскому И.В. и проф. Рафаилову Э.У. (Университет Астона, Великобритания), к.ф.-м.н. Новиковой Т.А. (Политехническая школа, Франция) и другим коллегам, с кем посчастливилось сотрудничать.

Неоценима поддержка и терпение жены Екатерины и сына Ивана, сестры Нины и родителей Владимира Алексеевича и Надежды Викторовны Дрёминых.

ГЛАВА 1. ТКАНЕВЫЙ МЕТАБОЛИЗМ: ОСНОВЫ, МЕХАНИЗМЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1 Основные компоненты тканевого метаболизма

Тканевый метаболизм представляет собой сложную систему биохимических и физиологических процессов, обеспечивающих жизнедеятельность клеток и тканей. Он включает два ключевых взаимосвязанных компонента: клеточный метаболизм и кровоток. Эти процессы находятся в постоянном взаимодействии, обеспечивая оптимальное функционирование тканей и органов [22].

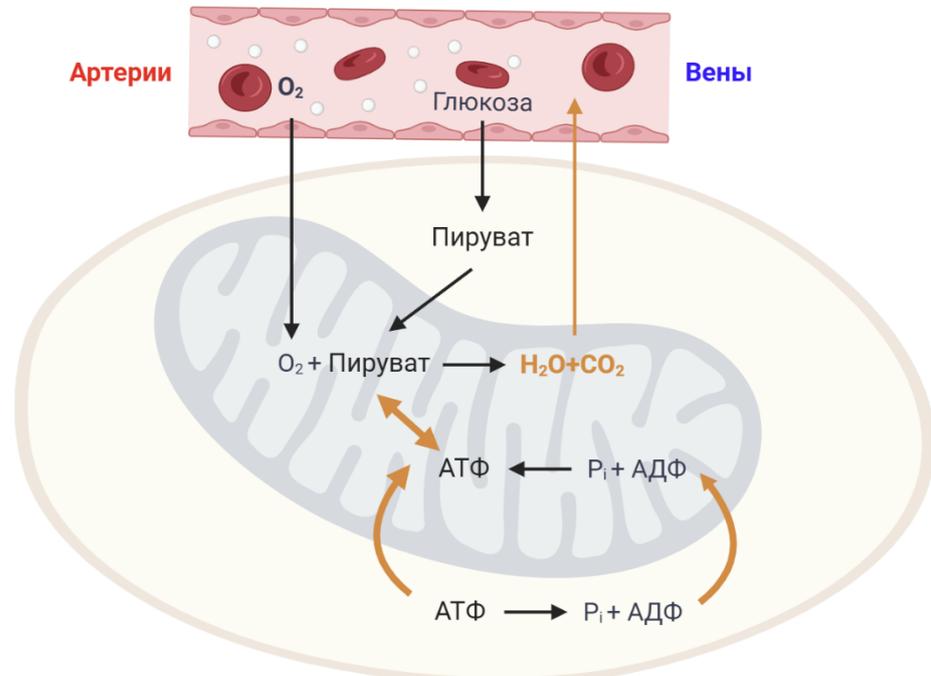


Рисунок 1.1 – Тканевый метаболизм: транспорт кислорода, окисление глюкозы и синтез АТФ

Клеточный метаболизм – это совокупность биохимических реакций, протекающих внутри клетки и направленных на поддержание её жизнедеятельности. Он включает два основных процесса: анаболизм и катаболизм. Анаболизм отвечает за синтез сложных молекул, таких как белки, липиды и нуклеиновые кислоты, из более простых компонентов. Этот процесс требует затрат

энергии, которая поставляется в форме аденозинтрифосфата (АТФ). Катаболизм, напротив, связан с расщеплением сложных молекул, например глюкозы, на более простые соединения, что сопровождается выделением энергии. Эта энергия используется клеткой для выполнения различных функций, включая транспорт веществ через мембрану, движение и восстановление повреждённых структур [23].

Кровоток играет критически важную роль в обеспечении клеточного метаболизма, так как именно через систему кровообращения клетки получают необходимые для их функционирования вещества и избавляются от продуктов обмена. Артериальная кровь доставляет к тканям кислород и питательные компоненты, такие как глюкоза и аминокислоты. Кислород используется в процессе окислительного фосфорилирования в митохондриях, где происходит генерация АТФ. Венозная кровь, в свою очередь, забирает из тканей продукты метаболизма, включая углекислый газ, мочевины и лактат, и транспортирует их к органам выделения – лёгким, печени и почкам [24]. Интенсивность кровотока напрямую зависит от уровня метаболической активности тканей. Например, при физической нагрузке мышцы требуют большего количества кислорода и питательных веществ, что приводит к увеличению кровоснабжения. В состоянии покоя, напротив, кровоток уменьшается, так как метаболические потребности тканей снижаются [25].

Таким образом, тканевый метаболизм – это динамическая система, в которой клеточные и сосудистые процессы тесно взаимосвязаны. Ускорение метаболических реакций требует усиленного кровотока для доставки большего количества кислорода и питательных веществ. Организм регулирует этот баланс с помощью гормонов, таких как инсулин, адреналин и тироксин, а также через вегетативную нервную систему. Например, симпатическая нервная система активируется в стрессовых ситуациях, увеличивая кровоснабжение жизненно важных органов, тогда как парасимпатическая система поддерживает базовый уровень метаболизма в состоянии покоя [26].

Нарушение любого из этих компонентов, будь то клеточный метаболизм или кровоснабжение, может привести к серьёзным последствиям для тканей.

Например, гипоксия, вызванная недостаточным кровотоком, нарушает процессы окислительного фосфорилирования и вынуждает клетки переходить на менее эффективные анаэробные пути получения энергии, такие как гликолиз. Это сопровождается накоплением лактата и других токсичных продуктов обмена, что в итоге может привести к повреждению тканей и развитию патологий [27].

В целом, тканевый метаболизм представляет собой высокоорганизованную систему, где клеточные и сосудистые механизмы работают согласованно для поддержания гомеостаза. Понимание этих процессов имеет фундаментальное значение для изучения физиологических и патологических состояний, а также для разработки новых методов диагностики и лечения заболеваний, связанных с нарушением метаболизма [28].

1.2 Энергетический метаболизм: ключевые этапы

Энергетический метаболизм представляет собой сложную последовательность взаимосвязанных биохимических процессов, обеспечивающих трансформацию питательных веществ в универсальную энергетическую валюту клетки – АТФ (рисунок 1.2). Этот многоступенчатый процесс начинается с расщепления глюкозы и завершается синтезом АТФ в митохондриях, проходя через несколько ключевых стадий, каждая из которых имеет свои особенности и регуляторные механизмы.

Начальным этапом энергетического обмена является гликолиз – универсальный метаболический путь, протекающий в цитозоле всех клеток [29]. Этот процесс включает десять последовательных ферментативных реакций, в ходе которых молекула глюкозы подвергается постепенному преобразованию. На подготовительной фазе гликолиза происходит активация глюкозы путем ее фосфорилирования с затратой двух молекул АТФ. Затем шестиуглеродная молекула расщепляется на две трехуглеродные, которые в дальнейшем окисляются с образованием пирувата. Важно отметить, что гликолиз может протекать как в аэробных, так и в анаэробных условиях, причем в последнем случае пируват

превращается в лактат, что позволяет регенерировать окисленный никотинамидадениндинуклеотид (NAD^+) для продолжения гликолитического процесса [30].

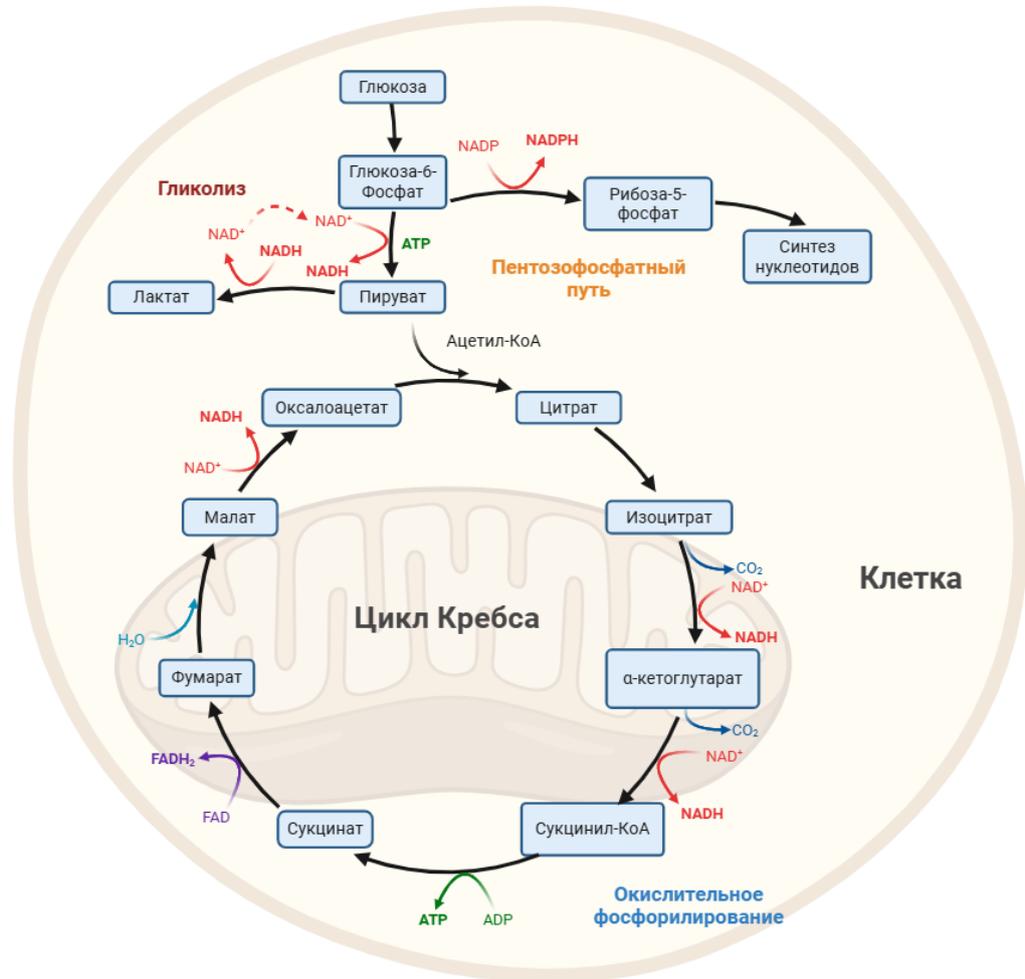


Рисунок 1.2 – Энергетический метаболизм клетки

Следующим критическим этапом является окислительное декарбоксилирование пирувата, осуществляемое мультиферментным пируватдегидрогеназным комплексом в митохондриальном матриксе. В ходе этой реакции происходит необратимое превращение трехуглеродного пирувата в ацетил-КоА – ключевой метаболит, связывающий углеводный и жировой обмен с циклом трикарбоновых кислот. Этот этап имеет особое регуляторное значение, так как пируватдегидрогеназный комплекс чувствителен к энергетическому статусу клетки, ингибируясь при избытке АТФ, НАДН и ацетил-КоА [31].

Центральное место в энергетическом метаболизме занимает цикл Кребса (цикл трикарбоновых кислот), представляющий собой циклическую последовательность восьми реакций, протекающих в митохондриальном матриксе [32]. В ходе этого процесса происходит полное окисление ацетильного остатка до углекислого газа с одновременным восстановлением коферментов НАД⁺ и флавинадениндинуклеотида (ФАД). Каждый оборот цикла сопровождается образованием трех молекул НАДН, одной молекулы ФАДН₂ и одной молекулы гуанозинтрифосфата (ГТФ – эквивалент АТФ), что делает этот путь чрезвычайно эффективным с точки зрения энергообразования. Примечательно, что цикл Кребса выполняет не только энергетическую, но и анаболическую функцию, поставляя промежуточные продукты для синтеза аминокислот и других важных соединений [33].

Завершающей и наиболее продуктивной стадией энергетического метаболизма является окислительное фосфорилирование (OXPHOS), объединяющее два взаимосвязанных процесса: транспорт электронов по дыхательной цепи и синтез АТФ. Дыхательная цепь, локализованная во внутренней митохондриальной мембране, состоит из четырех мультиферментных комплексов, через которые последовательно передаются электроны от НАДН и ФАДН₂ к конечному акцептору – молекулярному кислороду. Энергия, высвобождаемая при транспорте электронов, используется для создания протонного градиента, который затем преобразуется АТФ-синтазой в энергию химических связей АТФ. Этот процесс, описываемый хемиосмотической теорией Митчелла [34], обеспечивает синтез основной части клеточного АТФ – около 30-32 молекул на каждую окисленную молекулу глюкозы.

Следует особо подчеркнуть, что энергетический метаболизм обладает значительной пластичностью и может адаптироваться к изменяющимся условиям. При недостатке глюкозы клетки переключаются на использование альтернативных субстратов – жирных кислот и кетоновых тел, которые обеспечивают даже большее количество АТФ на единицу массы [35]. Кроме того, существуют механизмы взаимопревращения энергетических субстратов, такие как глюконеогенез,

позволяющий синтезировать глюкозу из неуглеводных предшественников при необходимости [36].

Нарушения энергетического метаболизма лежат в основе многих патологических состояний. Дефекты ферментов гликолиза, цикла Кребса или дыхательной цепи приводят к тяжелым митохондриальным заболеваниям, проявляющимся мышечной слабостью, неврологическими расстройствами и полиорганной недостаточностью [37]. Понимание тонких механизмов энергетического обмена имеет принципиальное значение для разработки новых подходов к лечению метаболических нарушений, нейродегенеративных заболеваний и других патологий, связанных с дефицитом энергообеспечения клеток [38].

1.3 Физиологические аспекты регуляции тканевого метаболизма

Регуляция тканевого метаболизма представляет собой сложную многоуровневую систему, обеспечивающую поддержание энергетического гомеостаза в условиях постоянно изменяющихся потребностей организма. Этот процесс осуществляется посредством взаимодействия нескольких взаимодополняющих механизмов, включающих гормональную регуляцию, нервные влияния, местные тканевые факторы и внутриклеточные сигнальные пути. Такая многокомпонентная система позволяет организму быстро адаптировать метаболические процессы к текущим физиологическим потребностям, будь то физическая нагрузка, стресс или состояние покоя.

Гормональная регуляция занимает центральное место в контроле тканевого метаболизма. Инсулин, вырабатываемый β -клетками поджелудочной железы, играет ключевую роль в анаболических процессах, стимулируя поглощение глюкозы клетками-мишенями через активацию GLUT-транспортёров, особенно в мышечной и жировой ткани [39]. Одновременно инсулин активирует синтез гликогена, подавляет гликогенолиз и глюконеогенез, а также усиливает синтез липидов. Противоположное действие оказывают контринсулярные гормоны –

глюкагон, адреналин, кортизол и гормон роста. Глюкагон преимущественно воздействует на печень, стимулируя распад гликогена и синтез глюкозы, в то время как адреналин мобилизует энергетические резервы во всем организме, активируя липолиз и гликогенолиз. Кортизол оказывает более пролонгированное действие, стимулируя глюконеогенез и вызывая инсулинорезистентность в периферических тканях [40].

Особое место в регуляции занимают тиреоидные гормоны (тироксин и трийодтиронин), которые действуют как универсальные метаболические регуляторы, увеличивая основной обмен практически во всех тканях организма. Они усиливают окислительное фосфорилирование в митохондриях, повышают чувствительность тканей к катехоламинам и стимулируют синтез Na^+/K^+ -АТФазы, что приводит к увеличению потребления кислорода и теплопродукции [41]. При этом тканеспецифичность действия гормонов обеспечивается различиями в плотности рецепторов и внутриклеточных сигнальных механизмах.

Вегетативная нервная система осуществляет быструю регуляцию метаболических процессов через прямое влияние на ткани и опосредованно – через изменение кровоснабжения. Симпатическая система, активируясь в стрессовых ситуациях, вызывает выброс адреналина из надпочечников и норадреналина из нервных окончаний, что приводит к мобилизации энергетических резервов – усилению липолиза в жировой ткани, гликогенолиза в печени и мышцах. Парасимпатическая система, напротив, преобладает в состоянии покоя, способствуя анаболическим процессам, таким как синтез гликогена и липогенез. Важно отметить, что вегетативные влияния тесно интегрированы с гормональной регуляцией, образуя единую нейроэндокринную систему контроля метаболизма [42].

На тканевом уровне важную регуляторную функцию выполняют местные факторы, такие как концентрация кислорода, рН, осмотическое давление и содержание метаболитов. Гипоксия вызывает активацию HIF-1 (индуцируемого гипоксией фактора), который переключает метаболизм на анаэробный гликолиз через увеличение экспрессии генов гликолитических ферментов и GLUT-

транспортеров [5]. Накопление лактата и снижение рН может ингибировать ключевые ферменты гликолиза, выполняя функцию отрицательной обратной связи. В мышечной ткани во время физической нагрузки важную роль играет местное увеличение концентрации аденозиндифосфата (АДФ), неорганического фосфата и аммиака, которые активируют процессы ресинтеза АТФ [43].

Внутриклеточная регуляция метаболических путей осуществляется через аллостерические механизмы и ковалентную модификацию ферментов. Ключевые точки контроля включают фосфофруктокиназу-1 в гликолизе, пируватдегидрогеназный комплекс на стыке гликолиза и цикла Кребса, изоцитратдегидрогеназу в цикле трикарбоновых кислот. Эти ферменты чувствительны к энергетическому статусу клетки, ингибируясь при высоком уровне АТФ, НАДН и цитрата, и активируясь при увеличении концентрации аденозинмонофосфата (АМФ), АДФ и неорганического фосфата [44]. Посттрансляционные модификации, особенно фосфорилирование/дефосфорилирование, позволяют быстро изменять активность ферментов в ответ на внеклеточные сигналы, такие как действие инсулина или адреналина [45].

Особого внимания заслуживает перекрестное взаимодействие между различными метаболическими путями. Так, избыток глюкозы приводит к усиленному синтезу жирных кислот через образование цитрата в цикле Кребса, который выходит в цитоплазму и активирует ацетил-КоА-карбоксилазу – ключевой фермент липогенеза [46]. В печени избыток ацетил-КоА при голодании или диабете перенаправляется в путь кетогенеза, обеспечивая альтернативный источник энергии для мозга и других тканей [47]. Эти взаимосвязи демонстрируют удивительную пластичность метаболических систем, позволяющую организму адаптироваться к различным пищевым и физиологическим условиям.

Нарушения регуляторных механизмов лежат в основе многих метаболических заболеваний. Инсулинорезистентность, характеризующаяся снижением чувствительности тканей к действию инсулина, является ключевым звеном патогенеза сахарного диабета (СД) 2 типа и метаболического синдрома [48].

Избыточная активность контринсулярных гормонов, например при синдроме Кушинга или феохромоцитоме, приводит к выраженным метаболическим нарушениям. Особую опасность также представляют долгосрочные последствия этих нарушений. Хроническая гипергликемия и окислительный стресс способствуют повреждению ДНК и неконтролируемой пролиферации клеток, увеличивая риск развития злокачественных новообразований [49]. Кроме того, метаболические дисфункции, включая нарушение утилизации глюкозы и накопление патологических белков (например, β -амилоида при болезни Альцгеймера или α -синуклеина при болезни Паркинсона), играют ключевую роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний [50].

Таким образом, расстройства тканевого метаболизма не только приводят к острым метаболическим нарушениям, но и создают предпосылки для тяжелых хронических заболеваний, что подчеркивает необходимость ранней диагностики и коррекции этих состояний. В следующем разделе нарушения тканевого метаболизма будут рассмотрены подробнее.

1.4 Нарушения тканевого метаболизма

Нарушения тканевого метаболизма представляют собой сложный комплекс патологических изменений, возникающих при дисбалансе между поступлением питательных веществ, их утилизацией и выведением продуктов обмена. Эти нарушения могут носить как локальный, так и системный характер, приводя к серьезным структурно-функциональным изменениям в различных тканях.

СД как пример системного нарушения метаболизма оказывает комплексное влияние на тканевый обмен. Гипергликемия вызывает неферментативное гликозилирование белков, что нарушает функцию многих ферментов и структурных белков [2]. В условиях инсулинорезистентности изменяется липидный обмен, усиливается липолиз в жировой ткани, увеличивается поток свободных жирных кислот в печень, где они превращаются в липопротеины очень низкой плотности. В мышечной ткани нарушается поглощение глюкозы, что

усугубляет гипергликемию. Особенно серьезные изменения происходят в эндотелии сосудов, где активируются пути полиолового обмена, усиливается образование конечных продуктов гликирования (КПГ) и активируется протеинкиназа С, что в совокупности приводит к развитию микро- и макроангиопатий [7].

Митохондриальные дисфункции представляют собой особую группу метаболических нарушений, которые могут быть как первичными (генетически обусловленными), так и вторичными (при гипоксии, интоксикациях, нейродегенеративных процессах). Дефекты дыхательной цепи приводят к снижению синтеза АТФ, усиленному образованию активных форм кислорода (АФК) и накоплению лактата [51]. В нервной ткани это проявляется нейродегенерацией, в мышцах – слабостью и непереносимостью физических нагрузок, в печени – стеатозом. Особенностью митохондриальных заболеваний является частое сочетание всех этих патологических проявлений.

Особую группу метаболических нарушений составляют нейродегенеративные заболевания, в основе которых лежат сложные нарушения энергетического обмена в нервной ткани. При болезни Альцгеймера наблюдается выраженное снижение утилизации глюкозы нейронами, особенно в височно-теменных областях коры. Этот «метаболический гипометаболизм» предшествует появлению клинических симптомов и связан с митохондриальной дисфункцией, накоплением β -амилоида и гиперфосфорилированного тау-белка, которые дополнительно нарушают энергетический обмен [50]. Болезнь Паркинсона характеризуется нарушением метаболизма в нигростриарной системе, где дефицит дофамина сочетается с митохондриальной недостаточностью и усиленным образованием АФК [52]. При болезни Хантингтона мутантный хантингтин нарушает функцию митохондрий и вызывает изменения в кальциевом гомеостазе, что приводит к энергетическому дефициту в стриатуме [53]. Общим для всех нейродегенеративных заболеваний является развитие оксидативного стресса, когда нарушается баланс между образованием свободных радикалов и работой антиоксидантных систем, что усугубляет повреждение нейронов [54].

Онкологические заболевания сопровождаются глубокими изменениями тканевого метаболизма, известными как эффект Варбурга [55]. Опухолевые клетки даже в условиях достаточного кислорода преимущественно используют гликолиз для получения энергии, что связано с активацией онкогенов и инактивацией генов-супрессоров опухолей, регулирующих метаболизм [56]. Это перепрограммирование обеспечивает опухолевым клеткам преимущества в виде быстрого получения энергии и субстратов для биосинтеза, необходимых для их бесконтрольного роста. Одновременно в опухолевом микроокружении развивается ацидоз, влияющий на функцию иммунных клеток и способствующий прогрессии заболевания [57].

Возрастные изменения тканевого метаболизма представляют собой особую форму нарушений, развивающихся постепенно и затрагивающих практически все системы организма. С возрастом снижается митохондриальная функция, накапливаются повреждения митохондриальной ДНК, уменьшается эффективность окислительного фосфорилирования [58]. Эти изменения сочетаются с прогрессированием инсулинорезистентности, снижением мышечной массы (саркопенией), изменением внеклеточного матрикса и накоплением жировой ткани. Одновременно уменьшается способность тканей к регенерации и адаптации к метаболическим нагрузкам, что создает предпосылки для развития возраст-ассоциированных заболеваний.

Нарушения кровотока также играют критическую роль в развитии метаболических расстройств в тканях. Ишемия, возникающая при снижении перфузии, приводит к каскаду патологических изменений. Сначала прекращается аэробный синтез АТФ, затем активируется анаэробный гликолиз, что вызывает накопление лактата и развитие ацидоза. При продолжительной ишемии нарушается работа ионных насосов, происходит накопление внутриклеточного кальция, активируются протеазы и фосфолипазы, что в итоге приводит к некрозу клеток [59]. Хроническая ишемия, наблюдаемая при атеросклерозе сосудов, вызывает адаптивные изменения метаболизма в тканях – снижается окислительное фосфорилирование, увеличивается доля гликолиза, изменяется экспрессия

транспортных белков. Особенно чувствительны к ишемии нейроны, кардиомиоциты и клетки почечных канальцев. При инсульте или инфаркте миокарда в зоне ишемии формируется ядро некроза, окруженное пенумброй – областью с выраженными метаболическими нарушениями, но потенциально обратимыми изменениями [60].

Гипоксические состояния, тесно связанные с нарушениями кровотока, вызывают глубокие изменения тканевого метаболизма. В условиях кислородного голодания происходит активация фактора HIF-1, который изменяет экспрессию более 100 генов, участвующих в ангиогенезе, гликолизе и транспорте глюкозы [61]. Хотя эти изменения носят адаптивный характер, длительная гипоксия приводит к патологическим последствиям. Усиление гликолиза вызывает ацидоз, активация ангиогенеза может способствовать опухолевому росту, а перераспределение кровотока усугубляет ишемию в отдельных органах. Хроническая гипоксия наблюдается при хронической обструктивной болезни легких, сердечной недостаточности, анемиях и вызывает системные метаболические нарушения.

Нарушения перфузии и микроциркуляции играют ключевую роль в развитии метаболических нарушений при многих патологических состояниях. При сепсисе происходит перераспределение кровотока с развитием зон гипоперфузии, что приводит к тканевой гипоксии и переходу на анаэробный гликолиз [62]. При артериальной гипертензии хронический вазоспазм вызывает ремоделирование сосудов и ухудшение перфузии органов-мишеней (мозга, сердца, почек). В опухолевой ткани аномальное строение сосудов создает зоны с нарушенной перфузией, что способствует формированию гипоксических участков с соответствующими изменениями метаболизма [63].

Диагностика нарушений тканевого метаболизма требует комплексного подхода, включающего оценку клинических проявлений, биохимических маркеров (лактат, кетоновые тела, аммиак), функциональные тесты (нагрузочные пробы) и современные методы визуализации. Понимание механизмов этих нарушений открывает перспективы для разработки новых методов коррекции, включая

метаболическую модуляцию, антиоксидантную терапию и воздействие на микроциркуляцию.

1.5 Методы исследования тканевого метаболизма

Современные клинические методы исследования тканевого метаболизма представляют собой диагностические подходы, позволяющие оценивать биохимические процессы на различных уровнях организации – от молекулярного до органного [11]. Эти методы можно условно разделить на несколько групп в зависимости от их принципа действия, разрешающей способности и области применения (см. таблицу 1.1).

Магнитно-резонансные технологии занимают важное место в исследовании тканевого метаболизма. Магнитно-резонансная спектроскопия (МРС) позволяет неинвазивно определять концентрацию ключевых метаболитов в различных тканях. В основе метода лежит явление ядерного магнитного резонанса, при котором ядра определенных атомов (преимущественно водорода, фосфора-31 и углерода-13) поглощают и переизлучают электромагнитную энергию в сильном магнитном поле. Фосфорная МРС особенно информативна для оценки энергетического метаболизма, так как позволяет измерять концентрации АТФ, фосфокреатина и неорганического фосфата, а также определять внутриклеточный рН [64]. Водородная МРС дает возможность детектировать такие метаболиты как лактат, N-ацетиласпартат, холинсодержащие соединения и другие, что особенно ценно в неврологической практике [65]. Современные технологии МРС с гиперполяризацией, использующие изотопы углерода-13, открывают новые возможности для изучения в реальном времени таких процессов как гликолиз, цикл трикарбоновых кислот и глюконеогенез [66].

Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) представляет собой мощный инструмент для визуализации метаболических процессов *in vivo*. Метод основан на регистрации излучения, возникающего при аннигиляции позитронов, испускаемых радиофармпрепаратами.

Таблица 1.1 – Методы анализа тканевого метаболизма и их ключевые параметры

Метод	Физический принцип	Ключевые измеряемые параметры	Пространственное разрешение	Временное разрешение
1	2	3	4	5
ПЭТ	Детекция гамма-излучения от позитрон-эмиссионного радиофармпрепарата (ФДГ и др.)	Поглощение глюкозы (метаболическая активность)	100 мкм-2 мм	мин, ч
ОФЭКТ	Детекция гамма-излучения от радиоактивного изотопа	Перфузия, плотность рецепторов	1-2 мм	мин, ч
Функциональная МРТ	Изменение магнитных свойств Hb в зависимости от оксигенации.	Нейрональная активность через потребление кислорода	0.5-3 мм	с
МР-спектроскопия	Ядерный магнитный резонанс ядер разных атомов (^1H , ^{31}P)	Концентрация метаболитов (лактат, холин, креатин, NAA, АТФ, PCr)	5 мм-1 см	мин
Масс-спектрометрия	Ионизация молекул в образце, разделение по массе/заряду и детекция	Полный метаболом, липидом, тысячи соединений одновременно	1-200 мкм	ч
Хромато-масс-спектрометрия (ЖХ-МС/ГХ-МС)	Хроматографическое разделение смеси с последующей детекцией на масс-спектрометре	Полный количественный анализ метаболома, липидома, протеома	Гомогенизированный образец	мин, ч
Имплантируемые биосенсоры	Электрохимическая или оптическая детекция специфичного аналита с помощью иммобилизованного фермента/рецептора	Непрерывное измерение глюкозы, лактата, глутамата, кислорода, ионов и др. в реальном времени	Точечное измерение (~100 мкм)	с, мин

Продолжение таблицы 1.1

1	2	3	4	5
Микроскопия с использованием флуоресцентных зондов	Возбуждение и детекция флуоресценции от введенных красителей	Концентрация ионов (Ca^{2+} , H^+), мембранный потенциал, АФК, поглощение глюкозы и др.	< 1 мкм	мс, с
Автофлуоресценция НАД(Ф)Н/ФАД (Широкопольная)	Однофотонное возбуждение флуоресценции УФ/синим светом	Интенсивность флуоресценции	~200-300 нм	с
Автофлуоресценция НАД(Ф)Н/ФАД (Многофотонная микроскопия)	Нелинейное многофотонное возбуждение НИР светом	Интенсивность флуоресценции	< 1 мкм	с, мин
Визуализация времени жизни флуоресценции (FLIM)	Измерение времени, которое молекула проводит в возбужденном состоянии	Время жизни флуоресценции (например, свободный и связанный НАДН)	< 1 мкм	с, мин
ДОТ, СДО	Измерение диффузного рассеяния и поглощения света в ткани	Концентрация окси/дезоксигемоглобина, насыщение кислородом, вода, липиды	1-10 мм	с, мин
Фотоакустическая томография	Поглощение лазерного импульса → термоупругое расширение → УЗ-волна	Концентрация окси/дезоксигемоглобина, насыщение кислородом, меланин, липиды	10-500 мкм	с, мин

Продолжение таблицы 1.1

1	2	3	4	5
Спектроскопия комбинационного рассеяния (рамановская)	Усиление колебательных сигналов молекул	Концентрация и распределение специфических молекул (СН ₂ -связи в липидах, белки, вода)	< 1 мкм	с, мин
Динамическое рассеяние света (ЛДФ, ЛСКВ)	Регистрация изменения частоты (Допплеровский сдвиг) или пространственной	Перфузия крови (скорость потока × концентрация эритроцитов), относительная скорость кровотока, микрогемодинамика	ЛДФ: ~1 мм (точечное); ЛСКВ: 10-100 мкм (изображение)	мс, с
Поляриметрия	Измерение изменения состояния поляризации света (степень деполяризации, азимут, эллиптичность) при взаимодействии с тканью	Архитектура и ориентация коллагеновых/эластиновых волокон, содержание фиброза, анизотропия	от мм до 1 мкм	от секунд до реального времени

Таблица 1.2 – Основные преимущества и недостатки методов анализа тканевого метаболизма

Метод	Основные преимущества	Основные недостатки и ограничения	Примеры применения
1	2	3	4
ПЭТ	Высокая чувствительность, полная количественная оценка, визуализация всего тела	Ионизирующее излучение, низкое пространственное разрешение, дорогое оборудование, требует инъекции	Онкология (поиск опухолей), нейронауки
ОФЭКТ	Более доступен, чем ПЭТ, возможность мультиплексирования изотопов	Более низкое разрешение и чувствительность, чем у ПЭТ, ионизирующее излучение	Кардиология, исследования костей
Функциональная МРТ	Хорошее мягкотканное контрастирование, неинвазивность, нет излучения	Непрямое измерение, низкое временное разрешение, дорогое оборудование, чувствительность к движению	Картирование функций мозга
МР-спектроскопия	Уникальная информация о биохимии <i>in vivo</i> , абсолютная количественная оценка	Очень низкое пространственное разрешение, длительное время сканирования, низкая чувствительность	Онкология (лактат), митохондриальные болезни
Масс-спектрометрия	Нецелевой скрининг, высочайшая специфичность и чувствительность, мультиомный анализ	Деструктивный метод, сложная пробоподготовка, количественная оценка требует стандартов, дорогое оборудование	Онкология (поиск биомаркеров), токсикология, нейронауки
Хромато-масс-спектрометрия (ЖХ-МС/ГХ-МС)	«Золотой стандарт» для количественного метаболомического анализа, высокая точность	Деструктивный метод, требует гомогенизации, теряется пространственная информация, сложный анализ данных	Открытие биомаркеров, мониторинг терапии, фундаментальные исследования метаболизма

Продолжение таблицы 1.2

1	2	3	4
Имплантируемые биосенсоры	Высокое временное разрешение, мониторинг в реальном времени <i>in vivo</i> , портативность	Инвазивная имплантация, биообрастание, дрейф сигнала, ограниченный срок службы (дни-недели), измеряют 1-2 аналита за раз	Нейронауки (нейротрансмиттеры), спортмедицина (лактат), диабет (глюкоза)
Микроскопия с использованием флуоресцентных зондов	Высокая специфичность, высокое разрешение, широкий выбор зондов	Фотовыгорание, фототоксичность, нарушение естественной физиологии, трудности долгосрочного мониторинга	Клеточная биология, нейронауки (кальциевые сигналы)
Автофлуоресценция НАД(Ф)Н/ФАД (Широкопольная)	Низкая стоимость, простота реализации, высокое разрешение	Поверхностная визуализация, УФ-фотоповреждение, нет разрешения по глубине	Скрининг клеточных культур, высокопроизводительный анализ
Автофлуоресценция НАД(Ф)Н/ФАД (Многофотонная микроскопия)	Большее проникновение, минимальные фотоповреждение/фотовыгорание, 3D визуализация <i>in vivo</i>	Дорогое оборудование (фемтосекундные лазеры), относительно медленное сканирование	Исследование метаболизма <i>in vivo</i> , онкология, нейронаука
Визуализация времени жизни флуоресценции (FLIM)	Не зависит от концентрации флуорофора, высокочувствителен к микроокружению	Очень длительное время сбора данных, сложный анализ данных, низкий сигнал	Исследование метаболических состояний, взаимодействий белок-лиганд

Продолжение таблицы 1.2

1	2	3	4
ДОТ, СДО	Низкая стоимость, портативность, безопасность, количественная оценка гемоглобина	Низкое пространственное разрешение, сложность решения обратной задачи	Мониторинг оксигенации мозга, маммография
Фотоакустическая томография	Высокий контраст от гемоглобина, хорошее соотношение разрешения и глубины	Ограниченная молекулярная специфичность (кроме Hb), артефакты от движения	Визуализация ангиогенеза опухолей, кардиология
Спектроскопия комбинационного рассеяния (рамановская)	Высокий контраст без меток, количественная визуализация химического состава	Требуется синхронизация лазеров, нерезонансный фон (CARS), сложная система	Визуализация липидов, фармакокинетика лекарств
Динамическое рассеяние света (ЛДФ, ЛСКВ)	Неинвазивность, высокое временное разрешение, количественная оценка перфузии <i>in vivo</i> , портативность	Полуколичественный метод (относительные единицы), чувствительность к движению артефактам, измеряет поток в объеме ткани, а не в отдельных сосудах	Оценка микроциркуляции кожи, мониторинг церебральной перфузии, оценка жизнеспособности тканей (трансплантаты, ожоги)
Поляриметрия	Высокая чувствительность к упорядоченным структурам, не требует красителей, количественная оценка фиброза, комбинируется с другими методами (ОКТ, микроскопия)	Косвенная оценка метаболизма (через оценку состояния ВКМ), чувствительность к настройкам системы, сложность интерпретации данных	Оценка фиброза печени, кардиология (рубцы миокарда), онкология (изменение стромы опухоли), дерматология

Наиболее широко используется фтордезоксиглюкоза (ФДГ), меченная фтором-18, которая позволяет оценивать интенсивность гликолиза в различных тканях. Этот подход особенно важен в онкологии, так как большинство злокачественных опухолей характеризуются повышенным захватом глюкозы [67]. Другие радиофармпрепараты, такие как меченные углеродом-11 аминокислоты или кислород-15, дают возможность изучать белковый обмен и кислородный метаболизм соответственно. Современные гибридные системы ПЭТ/МРТ сочетают высокую чувствительность ПЭТ с превосходным анатомическим разрешением МРТ, что значительно расширяет диагностические возможности [68].

Масс-спектрометрия, особенно в сочетании с хроматографическими методами, представляет собой мощный инструмент для метаболомного анализа. Методы жидкостной и газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХ/МС и ГХ/МС) позволяют одновременно определять сотни метаболитов в биологических образцах, что дает комплексную картину метаболических изменений при различных патологических состояниях [69]. Масс-спектрометрическая визуализация дает возможность изучать пространственное распределение метаболитов в тканях с высоким разрешением [70]. Эти подходы особенно важны для выявления новых биомаркеров заболеваний и понимания молекулярных механизмов патологических процессов.

Современные технологии микрочипов и биосенсоров открывают новые возможности для непрерывного мониторинга метаболических параметров. Имплантируемые глюкозные сенсоры уже нашли широкое применение в клинической практике, а разрабатываемые системы для измерения лактата, кетоновых тел и других метаболитов обещают революционизировать мониторинг метаболического статуса пациентов [71].

Однако для характеристики метаболизма с более высоким временным или пространственным разрешением возможно использовать недорогие оптические методы спектроскопии и визуализации. Эти методы уже стали неотъемлемой частью биомедицинских исследований, позволяющих получить функциональные, морфологические и композиционные данные о клетках, тканях и органах.

Методы оптической визуализации, предназначенные для характеристики метаболизма, можно условно разделить на две категории: использующие эндогенные (внутренние) источники контраста и требующие введения экзогенных (внешних) флуоресцентных маркеров. Методы, основанные на эндогенном контрасте, используют преимущества естественных оптических свойств биологических молекул – их способность к поглощению света, рассеянию или автофлуоресценции. На тканевом уровне ключевыми хромофорами являются окси- и дезоксигенированный гемоглобин, липиды и вода. Их концентрация и состояние эффективно исследуются с помощью света в диапазоне от видимого до среднего инфракрасного [72–74]. Для этой цели разработан целый арсенал мультиспектральных методов. Диффузная оптическая томография (ДОТ) позволяет реконструировать трехмерные карты концентрации гемоглобина и оксигенации в глубоких тканях [75], в то время как спектроскопия диффузного отражения (СДО) успешно применяется, например, для поверхностного анализа в дерматологии [76] и миниинвазивной хирургии [77]. Оптическая когерентная томография (ОКТ) с ее микрометровым разрешением способна визуализировать сосудистую сеть и кровотоки [78,79], а фотоакустическая визуализация комбинирует оптический контраст от гемоглобина с ультразвуковым разрешением для глубокой визуализации [73]. В совокупности эти технологии позволяют оценивать оксигенацию и метаболизм в различных пространственных масштабах.

Для исследований на клеточном и субклеточном уровнях широко применяются экзогенные флуорофоры, адаптированные для работы на стандартных научных микроскопах. С их помощью можно специфично изучать конкретные аспекты метаболизма. Например, этиловый эфир тетраметилродамина (TMRE) используется для маркировки активных митохондрий и измерения их мембранного потенциала [80]. Поглощение глюкозы клетками и тканями можно отслеживать с помощью флуоресцентных аналогов, таких как 2-NBDG [81]. Уровень АФК обычно оценивают с помощью чувствительных к окислению наборов, например, DCFDA для общего окислительного стресса [82], или CellROX™ и MitoSOX™ для специфичной детекции супероксид-аниона в

цитоплазме и митохондриях соответственно [83,84]. Кроме того, были разработаны многочисленные флуоресцентные метки и генетически кодируемые сенсоры для точного измерения окислительно-восстановительного состояния клеток, например, через мониторинг соотношения НАД⁺/НАДН или GSH/GSSG [85–87].

Однако фундаментальным ограничением всех экзогенных зондов является их потенциальная цитотоксичность и способность нарушать естественную биоэнергетику клетки, что вносит артефакты и затрудняет долгосрочные динамические исследования. В этом контексте методы микроскопии, основанные на измерении эндогенных источников контраста, представляются идеальным решением для неинвазивной количественной оценки живых клеток и организмов. Их ключевое преимущество – возможность неинвазивно изучать функцию клеток, не вмешиваясь в физиологию образца. При этом многофотонная микроскопия (МФМ) предлагает наиболее мощный инструментарий для изучения в том числе биологических тканей. МФМ использует нелинейные взаимодействия света и материи, которые локализованы в фокальной плоскости [88]. Использование ближнего инфракрасного (БИК) излучения и более эффективной оптики позволяет получать более глубокие и менее фототоксичные 3D-изображения по сравнению с классической конфокальной микроскопией [89,90]. Методы же регистрации комбинационного рассеяния, включая когерентное антистоксово комбинационное рассеяние (CARS) и стимулированное комбинационное рассеяние (SRS) показали свою исключительную эффективность для мониторинга внутриклеточного метаболизма липидов, отслеживания их накопления и мобилизации в различных типах клеток и тканей [91–93]. При этом современные методы сверхвысокого разрешения, такие как STED [94,95] и PALM/STORM [96,97], ещё больше расширяют возможности стандартной микроскопии, открывая новые возможности для изучения организации метаболических путей в клетке.

Тем не менее, центральное место в исследованиях клеточного метаболизма с помощью флуоресцентной микроскопии занимает визуализация автофлуоресценции двух ключевых коферментов: НАДН и ФАД. Автофлуоресценция этих молекул была впервые описана и связана с клеточным

дыханием пионерскими работами Бриттона Ченса и его коллег в середине двадцатого века [98–100]. Поскольку НАДН и ФАД являются основными переносчиками электронов в процессе окислительного фосфорилирования, их флуоресцентные свойства (интенсивность, время жизни, соотношение НАДН/ФАД) служат прямыми индикаторами метаболического состояния клетки. С момента широкого внедрения конфокальной микроскопии и МФМ произошел взрывной рост популярности и применения этого подхода. Как подчеркивается в многочисленных обзорах за последние 10 лет, автофлуоресцентная визуализация НАДН и ФАД стала краеугольным камнем в неинвазивном исследовании метаболизма в таких областях, как онкология (для выявления метаболической гетерогенности опухолей), нейробиология, исследования старения и регенеративной медицины [101–103].

Таким образом, современная оптическая визуализация предлагает комплексный и многоуровневый инструментарий для изучения биоэнергетики, позволяя перейти от грубых структурных данных к тонкой функциональной характеристике метаболических процессов как *in vitro*, так и *in vivo*.

Как видно из представленного обзора, метаболизм тканей – это сложный многоуровневый процесс, который включает в себя динамическое взаимодействие кислородного обмена, кровоснабжения, морфологических изменений и внутриклеточных метаболических реакций. Оптические методы исследования позволяют неинвазивно и с высокой точностью анализировать ключевые компоненты этого процесса. В данной диссертационной работе будут рассмотрены четыре новых подхода к изучению тканевого метаболизма, основанные на гиперспектральной, поляризационной, флуоресцентной и лазерная спекл-контрастная визуализации и разработанных алгоритмах обработки данных и методологии их применения. Каждый из них вносит свой вклад в комплексное понимание физиологических и патологических процессов. А именно:

1. Гиперспектральная визуализация – это мощный инструмент для оценки оксигенации тканей и распределения гемоглобина. Она позволяет измерять спектральные характеристики поглощения и рассеяния света, что дает

возможность количественно оценивать уровень насыщения кислородом, а также кровенаполнение и микроциркуляцию.

2. Поляризационная визуализация – метод, направленный на анализ морфологических свойств тканей. Поляризационные характеристики света позволяют выявлять структурные изменения, связанные с фиброзом, дегенеративными процессами и изменениями коллагеновой матрицы.

3. Флуоресцентная визуализация – ключевой инструмент для изучения внутриклеточных метаболических процессов. Она позволяет анализировать автофлуоресценцию эндогенных молекул, таких как НАДН и ФАД, что предоставляет информацию о клеточном дыхании и энергетическом статусе тканей. Дополнительное измерение времени жизни флуоресценции расширяет возможности детального анализа метаболических коферментов.

4. Лазерная спекл-контрастная визуализация – метод, позволяющий измерять динамику кровотока в микроциркуляторном русле. Путем анализа эволюции спеклов можно получить информацию о перфузии тканей, что критически важно для понимания метаболических адаптаций в условиях гипоксии или ишемии.

Эти методы не только дополняют друг друга, но и создают целостную картину тканевого метаболизма. Совместное их использование открывает новые перспективы для фундаментальных и клинических исследований, позволяя более точно диагностировать и контролировать состояние тканей при различных физиологических и патологических процессах. В данной же работе будет представлена новая приборная реализация данных технологий, разработаны интеллектуальные методы анализа данных, а также представлена методология их использования в различных экспериментальных и клинических условиях.

1.6 Выводы по главе 1

В данной главе диссертационной работы представлен комплексный обзор фундаментальных аспектов тканевого метаболизма, его регуляторных механизмов,

нарушений и современных методов исследования. Рассмотрены биохимические основы энергетического обмена, физиологические и патологические процессы, лежащие в основе поддержания гомеостаза тканей, а также возможности различных инструментальных технологий для изучения метаболических процессов. Особое внимание уделено оптическим методам визуализации, которые позволяют проводить неинвазивный анализ тканевого метаболизма с высокой точностью и пространственным разрешением.

Основные результаты главы можно сформулировать следующим образом:

1. Систематизированы основные компоненты тканевого метаболизма – клеточный метаболизм и кровоток, их взаимосвязь и роль в обеспечении энергетических и пластических потребностей тканей.

2. Подробно описаны ключевые этапы энергетического обмена: гликолиз, цикл Кребса, окислительное фосфорилирование и использование альтернативных субстратов, таких как жирные кислоты и кетоновые тела.

3. Рассмотрены механизмы регуляции тканевого метаболизма на разных уровнях – гормональном, нервном, тканевом и внутриклеточном, включая интеграцию нейроэндокринных и локальных факторов в адаптацию к изменяющимся физиологическим условиям.

4. Проанализированы патологические изменения тканевого метаболизма, включая сахарный диабет и инсулинорезистентность, митохондриальные дисфункции, нейродегенеративные заболевания (Альцгеймер, Паркинсон, Хантингтон), опухолевое ремоделирование метаболизма (эффект Варбурга), ишемические и гипоксические состояния, возрастные изменения энергетического обмена.

5. Дан обзор современных методов исследования тканевого метаболизма, включая магнитно-резонансные технологии (МРС, фМРТ), позитронно-эмиссионную томографию, масс-спектрометрию и хромато-масс-спектрометрию, биосенсоры для непрерывного мониторинга, передовые методы оптической визуализации (ДОТ, СДО, ОКТ, фотоакустика, многофотонная микроскопия,

измерение интенсивности и времени жизни флуоресценции НАДН/ФАД, CARS, SRS, регистрация динамического рассеяния света, поляриметрия и др.).

6. Обоснована роль оптических методов как наиболее перспективных для комплексного исследования тканевого метаболизма. Показано, что они позволяют неинвазивно оценивать оксигенацию, морфологические изменения, внутриклеточные метаболические процессы и динамику кровотока с высоким пространственным и временным разрешением.

7. Выделены четыре ключевых подхода оптической визуализации, которые будут развиваться в диссертационной работе.

ГЛАВА 2. МЕТОД И УСТРОЙСТВО ПОЛЯРИЗАЦИОННО-ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ГИПЕРСПЕКТРАЛЬНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ

Данная глава посвящена разработке нового поляризационно-чувствительного метода гиперспектральной визуализации (ГСВ), направленного на решение ключевой диагностической задачи – неинвазивного определения параметров оксигенации и кровенаполнения биологических тканей, которые являются критически важными маркерами тканевого метаболизма, особенно для диагностики ряда патологий, включая СД.

По данным Международной диабетической федерации, проблема ранней диагностики и контроля эффективности лечения СД является одной из самых острых в современном здравоохранении. В 2024 г. в мире насчитывалось 589 млн больных СД, а к 2050 г. эта цифра увеличится до 853 млн [104]. СД входит в десятку самых смертоносных болезней с ежегодным уровнем смертности более 1 млн человек. Исследования [104–109] демонстрируют, что своевременная диагностика и лечение, включая усиление контроля над пациентом, уменьшают количество осложнений и позволяют обратить вспять их развитие, при обнаружении на ранних доклинических стадиях.

У людей с СД с течением времени высокий уровень глюкозы в крови (известный как гипергликемия) вызывает повреждение многих биологических тканей в организме, что приводит к развитию инвалидности и опасных для жизни медицинских осложнений. Одним из последствий СД является появление поражения тканей стопы (синдром диабетической стопы). Основным фактором патогенеза поражения тканей стопы при СД является нарушение микроциркуляции крови. Недавние исследования [110] показали, что микрососудистые поражения различных органов, в том числе стопы, регистрируются уже в первые годы диабета и даже при преддиабетических состояниях задолго до клинических проявлений сосудистых осложнений. Поэтому повышение эффективности профилактики и лечения диабетических ангиопатий возможно только при своевременной диагностике и коррекции сосудистых нарушений на ранних стадиях.

Своевременное выявление микрососудистых нарушений с последующим соответствующим лечением снижает риск осложнений и позволяет обратить их развитие на ранней доклинической стадии [111]. Частота возникновения микроангиопатий зависит не только от продолжительности СД, но и от того, насколько рано был поставлен правильный диагноз, а также от эффективности лечения. На сегодняшний день общим недостатком доступных клиницистам методов диагностики осложнений СД является невозможность неинвазивно оценить степень гликирования ткани и контролировать ее метаболизм, а также определить местоположение участков кожи, наиболее вероятно подверженных развитию трофических язв.

Таким образом, в данной главе на примере СД показано, как нарушения микроциркуляции крови, вызванные гипергликемией и приводящие к нарушениям тканевого метаболизма, могут быть выявлены на ранних стадиях с помощью предложенного подхода. Предлагаемый новый метод объединяет преимущества гиперспектральной визуализации, нейросетевой обработки данных и поляризационного анализа, что позволяет преодолеть ограничения традиционных методов диагностики и повысить точность классификационных алгоритмов.

2.1 Регистрация диффузно-отраженного излучения биологических тканей

Одним из способов повышения качества диагностики в современной медицине и передовых медико-биологических исследованиях является использование методов оптической диагностики (ОД), многие из которых успешно применяются в клинической практике, например методы микроскопии [10,101,112], пульсоксиметрии и фотоплетизмографии (ФПГ) [113–116], ОКТ [79,117–119], флуоресцентной визуализации с использованием индоцианинового зеленого (ICG) [120–122] и др.

Также регистрация диффузно-отраженного излучения биологических тканей представляет собой важный метод ОД, основанный на анализе светового потока, рассеянного в результате многократного взаимодействия фотонов с компонентами

тканевой структуры [123]. Физической основой данного подхода служит явление диффузного отражения, возникающее при прохождении оптического излучения через неоднородную биологическую среду, характеризующуюся сложным сочетанием процессов поглощения и рассеяния.

Когда свет взаимодействует с биологической средой, часть его отражается в соответствии с уравнениями Френеля, не проникая внутрь. Такой тип отражения известен как зеркальное или specularное отражение. Другая часть после проникновения рассеивается и меняет направление внутри образца, в том числе отражаясь обратно. В процессе рассеивания часть света проходит определенное расстояние внутри ткани и в конечном итоге выходит из образца сверху, попадая на детектор. Поскольку свет излучается в направлении поверхности образца и регистрируется с той же стороны, это всё ещё считается отражением, но называется диффузным отражением. Термин «диффузный» указывает на случайный характер оптического пути внутри образца из-за рассеивания.

Доля света, которая будет зарегистрирована I_d , соответствует той части, что не поглощается образцом. Тогда коэффициент поглощения в зависимости от длины волны $\mu_a(\lambda)$ будет определять, сколько света поглощается на дифференциальном участке пути δl , согласно [124]:

$$\mu_a(\lambda) = -\frac{1}{I_d(\lambda)} \frac{\delta I_d(\lambda)}{\delta l(\lambda)}. \quad (2.1)$$

Для диффузной интенсивности это уравнение может быть переписано следующим образом:

$$I_d(\lambda) = e^{-\mu_a(\lambda)l(\lambda)} \in [0,1]. \quad (2.2)$$

Особенностью биологических тканей, как оптически активных сред, является их выраженная рассеивающая способность, обусловленная неоднородностью показателя преломления на границах клеточных структур, волокон коллагена и

других элементов внеклеточного матрикса. При этом регистрируемый сигнал диффузного отражения содержит информацию как о поглощающих свойствах тканевых хромофоров (гемоглобин, меланин, липиды, вода), так и о структурных особенностях исследуемого биологического объекта.

Теоретическое описание процессов диффузного отражения в биотканях обычно осуществляется в рамках приближений теории переноса излучения или диффузионной теории [123], где ключевыми параметрами выступают коэффициенты поглощения (μ_a) и рассеяния (μ_s), а также фактор анизотропии рассеяния (g).

В биомедицинских приложениях анализ диффузного отражения осуществляется с помощью спектроскопии диффузного отражения (СДО) и позволяет неинвазивно оценивать различные физиологические параметры, включая концентрацию гемоглобина, степень насыщения крови кислородом, содержание меланина и воды в тканях [125–131]. Особую диагностическую ценность метод приобретает при исследовании поверхностных патологий кожи, где пространственное разрешение традиционных спектроскопических подходов оказывается достаточным для выявления локальных изменений оптических свойств, связанных с развитием опухолевых процессов или воспалительных реакций. Современные технические решения в области волоконно-оптических зондов и спектрометрического оборудования существенно расширили возможности метода, позволяя проводить исследования как *in vitro*, так и *in vivo*, включая миниинвазивные хирургические вмешательства, с высоким временным разрешением.

Преыдушие исследования в области СД с использованием метода СДО показали, что регистрируемые параметры значимо коррелируют с измерениями лодыжечно-плечевого индекса [132], который широко используется для оценки риска развития осложнений СД [133]. Метод СДО применяется для диагностики нарушений кровотока, связанных с диабетом, уже более 20 лет. Было показано снижение уровня кровотока у пациентов с СД 1 типа по сравнению со здоровыми людьми как в состоянии покоя, так и при физической нагрузке [134]. Нарушения

кровотока при физической нагрузке также наблюдались у пациентов с СД 2 типа независимо от наличия или отсутствия окклюзионного заболевания периферических артерий [135]. Значительное снижение общей концентрации гемоглобина было зафиксировано с помощью СДО у диабетиков по сравнению с контрольной группой [136]. Метод также нашел применение в оценке изъязвлений стопы и процессов заживления ран. Обычно для диагностики уровня оксигенации используется оценка площади под кривой спектра диффузного отражения [137,138]. Некоторые авторы предлагают использовать соотношение диффузного отражения на разных длинах волн в качестве диагностического параметра, часто выбирая изобестические точки окси- и дезоксигемоглобина [138]. Такой подход позволил изучить изменения уровня оксигенации тканей для дифференциации пациентов с разной степенью тяжести осложнений [139] и прогнозирования заживления диабетических язв [138].

Спектроскопия в ближней инфракрасной области (БИКС) также является распространенной технологией для оценки концентрации кислорода в коже. Она была предложена в 1977 году [140] и широко используется для оценки кровообращения в мозге и других органах в норме и при патологии [141–143]. БИКС использует красный или ближний инфракрасный свет для зондирования тканей и анализирует поглощение света на определенных длинах волн, предоставляя информацию об общей концентрации гемоглобина, оксигемоглобина, дезоксигемоглобина и насыщении тканей кислородом. БИКС широко применяется для диагностики и оценки лечения диабетических язв стопы. Предыдущие исследования показали, что БИКС может прогнозировать исход язв [144,145]. Была подтверждена способность метода отличать заживающие и незаживающие язвы на основе степени поглощения ближнего инфракрасного света, связанного с концентрацией гемоглобина [145]. В последних исследованиях, связанных с диабетом, БИКС получила дальнейшее развитие: разрабатываются неинвазивные носимые беспроводные устройства для визуализации состояния язв в домашних условиях [146].

Однако традиционная оптическая спектроскопия анализирует свет, исходящий из одной точки пространства. Хотя этот подход нашел большое количество применений, такое ограничение измерений делает его непрактичным в ряде областей. Одной из областей, где точечная спектроскопия оказалась неприменима, стало дистанционное зондирование Земли (ДЗЗ). В результате исследователи в сфере ДЗЗ в начале 80-х годов [147,148] начали использовать и разрабатывать системы, способные получать спектральные данные для каждого пикселя изображения. В то время такие системы назывались спектрометрами визуализации. Сегодня они известны как мультиспектральные (от 4 до 20 длин волн) и гиперспектральные (более 20 длин волн) системы визуализации (рисунок 2.1).

В целом, ГСВ представляет собой закономерное развитие методов анализа диффузно-отраженного излучения, преодолевая ключевое ограничение традиционной спектроскопии – отсутствие пространственного разрешения.

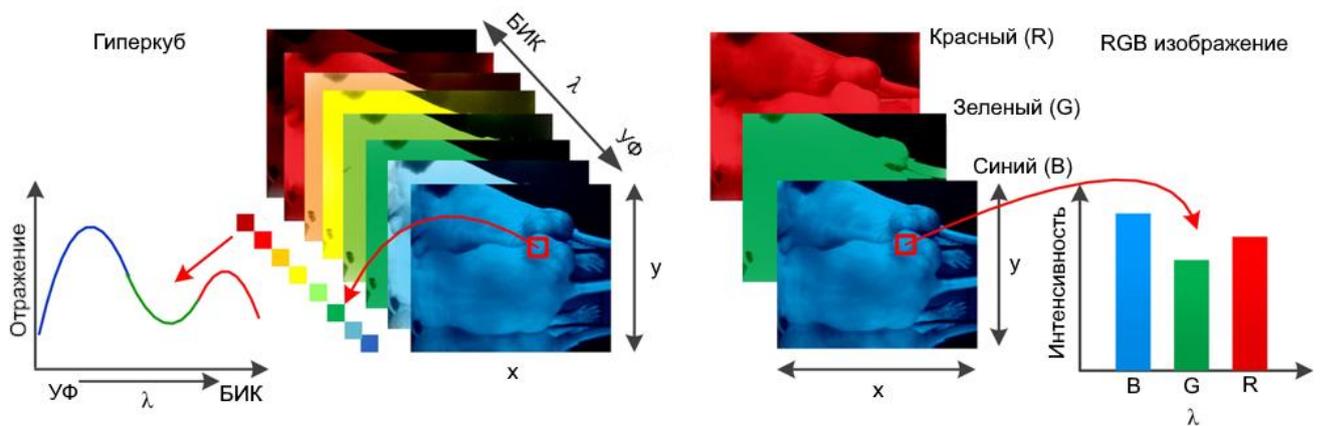


Рисунок 2.1 – Сравнение гиперкуба и RGB-изображения: гиперкуб представляет собой трёхмерный массив данных, состоящий из двумерных изображений, полученных на каждой длине волны (в левой части показан спектр отражения в отдельном пикселе); RGB-изображение, в отличие от гиперкуба, содержит всего три спектральных канала: красный, зелёный и синий [149]

Этот метод обеспечивает переход от точечных измерений к полномасштабному картированию оптических свойств биологических тканей,

создавая трехмерный массив данных (гиперкуб), где каждому пикселю изображения соответствует полный спектр отраженного излучения в широком диапазоне длин волн. Для проведения гиперспектральных измерений регистрируется серия изображений объекта в узких частотных диапазонах, формируя гиперкуб с двумя пространственными координатами (x , y) и одной спектральной (λ). Анализ данных гиперкуба по аналогии с анализом спектров СДО позволяет оценить содержание хромофоров в биологической ткани, толщину эпидермиса, кровенаполнение, насыщение крови кислородом и др.

Метод ГСВ широко используется в различных медицинских приложениях [150–154] и способен обнаруживать системные и местные изменения микроциркуляции крови, связанные с СД [155]. Данная технология чаще всего используется для анализа развития ран, включая диабетические язвы, ожоги [156] и синяки [152]. Исследования, проведенные при СД с использованием ГСВ, показали способность метода не только оценивать эффективность терапии диабетических язв, но и прогнозировать их развитие еще до их появления [157–159]. Был сделан вывод, что ГСВ может точно предсказать заживление язв в течение нескольких месяцев и идентифицировать язвы, которые подвержены риску незаживления и, следовательно, могут использоваться для скрининга осложнений нижних конечностей, вызванных СД [155]. Таким образом, разработка портативных и недорогих систем визуализации демонстрирует большой потенциал для внедрения технологии ГСВ в повседневную жизнь и повседневную практику врачей. Расширение возможностей сбора и анализа гиперспектральных данных, включая дополнение новыми модальностями и искусственным интеллектом, предполагают еще более широкое внедрение этой технологии в клиническую диагностику.

При этом существующие методы ГСВ используют регистрацию диффузного отражения в первую очередь для оценки концентрации определенных тканевых хромофоров/поглочителей. При этом непосредственно не учитываются возможные изменения рассеивающих свойств, вызванные изменением структуры исследуемой области.

В то же время изменения структурных свойств кожи являются важным фактором при оценке старения кожи и диабетических осложнений. Эндогенные процессы при СД, которые вызывают старение кожи, включают чрезмерное производство свободных радикалов, мутацию ядер/митохондриальных генов, клеточное старение, укорочение теломер, снижение клеточной пролиферации и нарушение иммунного функционирования [160,161]. В последние годы многие научные исследования показали, что конечные продукты гликирования также являются одними из важнейших факторов старения кожи [160,162,163]. Старение кожи также связано с микроструктурными изменениями коллагена и его молекулярной организацией [164]. Изучение образцов биопсии кожи с помощью атомно-силовой микроскопии [165] показало изменение механических свойств коллагена при диабете.

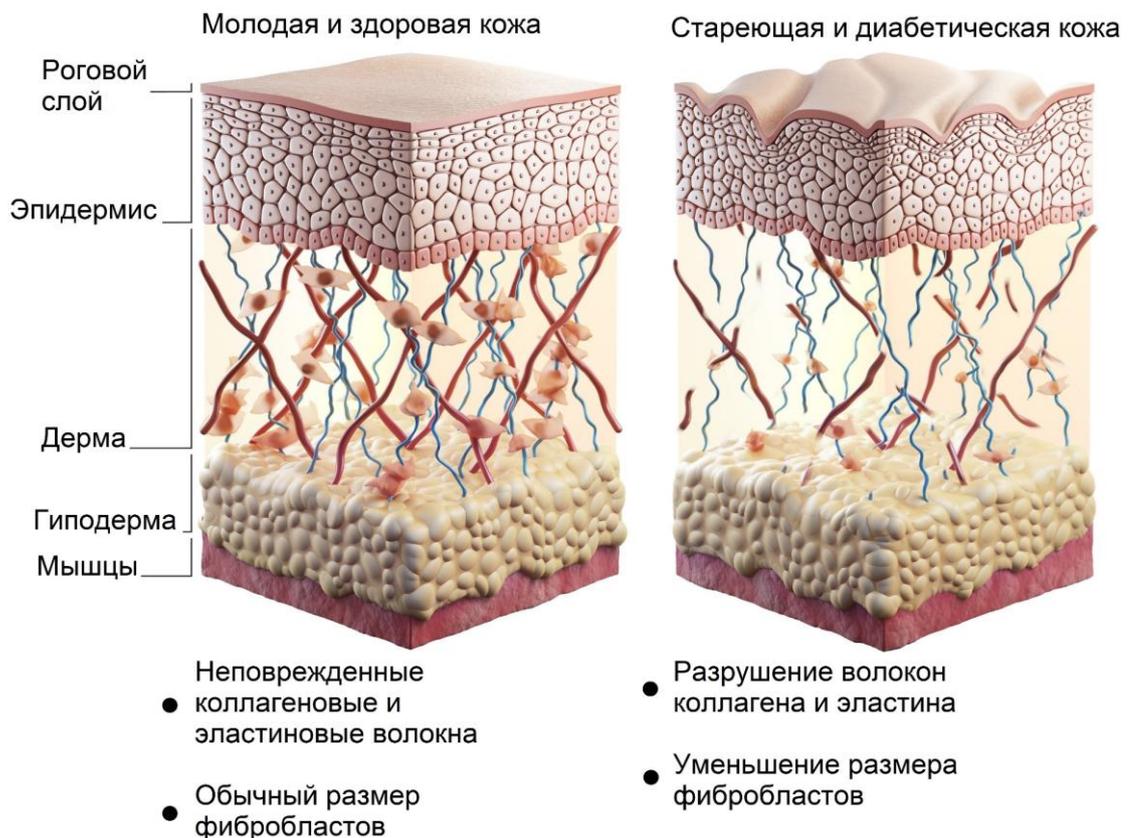


Рисунок 2.2 – Схематическое изображение возрастных и диабетических изменений кожи человека. Разрушение волокон коллагена и эластина и уменьшение размера фибробластов являются признаками структурных изменений в стареющей и диабетической коже

В частности, изменения включают нарушение целостности кожного коллагена, дезорганизацию коллагеновых фибрилл и наноразмерную фрагментацию (см. схематическую иллюстрацию возрастных и диабетических изменений в коже человека на рисунке 2.2).

Известно, что коллаген является одним из основных компонентов кожи, определяющих ее оптическое рассеяние, а также свойства двулучепреломления [166]. Величина рассеяния и двулучепреломления связана с плотностью и другими механическими свойствами коллагеновых волокон [167–169]. Недавние когортные исследования показали, что старение кожи и связанные с ним изменения коллагена имеют высокую обратную корреляцию с рассеивающими свойствами кожи [170,171]. Молодая и здоровая кожа с нефрагментированной структурой коллагена имеет повышенный коэффициент рассеяния по сравнению со стареющей кожей, что приводит к снижению степени поляризации рассеянного поляризованного света [172]. Следовательно, поляризация света также будет чувствительна к возрасту и структурным изменениям кожи. Уже было показано, что степень остаточной поляризации (*DOP*) является чувствительным параметром к изменениям в структуре коллагеновых волокон [168,173–175]. В частности, поляризационные методы использовались для оценки микроструктурных изменений биологических тканей, вызванных раком [176,177], диабетическими ранами [178], ожогами [179,180], нейродегенерацией [181,182] и т.д. Таким образом, поляризационно-чувствительные методы также выглядят многообещающими для оценки состояния кожи при возрастных и диабетических изменениях.

2.2 Поляризационно-чувствительная гиперспектральная система визуализации

Целью данного этапа исследования явилась реализация на практике нового подхода к регистрации и анализу гиперспектральных данных, основанного на искусственных нейронных сетях (ИНС), для количественной диагностики и

определения характеристик кожи человека, включая двухмерное отображение хромофоров кожи (гемоглобин, меланин и т.д.), отображения изменения насыщения крови кислородом и оценку кровенаполнения кожи, а также изучения изменения этих параметров у пациентов с СД.

2.2.1 Разработка поляризационно-чувствительной гиперспектральной системы визуализации

Компактная портативная система визуализации была построена с использованием гиперспектральной камеры (Senop Optronics, Финляндия) на основе интерферометра Фабри-Перо, обеспечивающего спектральное разрешение 6-10 нм в общем диапазоне 510-900 нм. Схематичное изображение разработанного устройства представлено на рисунке 2.3.

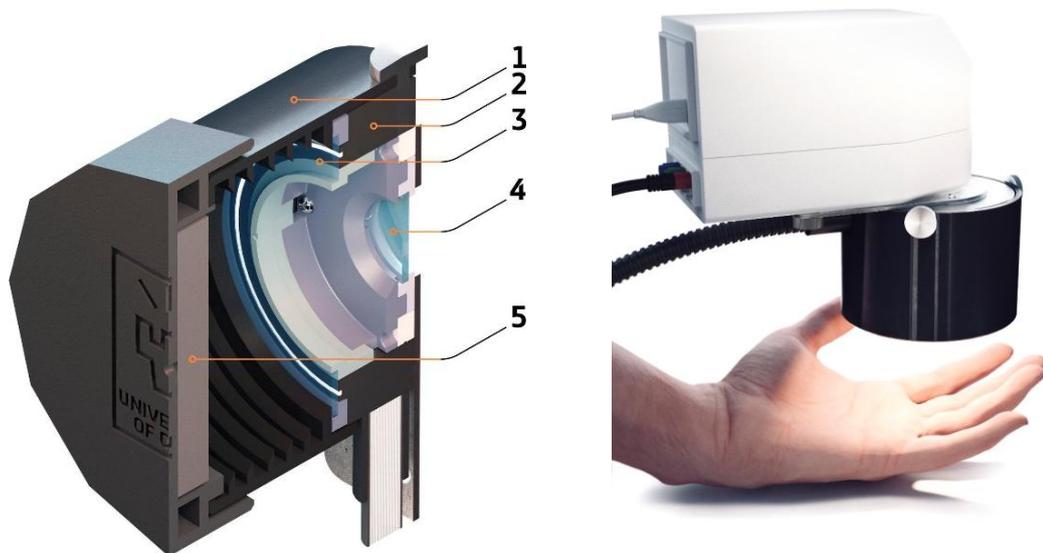


Рисунок 2.3 – Схема разработанного прототипа поляризационно-чувствительной гиперспектральной системы визуализации: 1 – бленда объектива, 2 – кольцевой волоконный осветитель, излучающий широкополосное излучение галогеновой лампы мощностью 50 Вт, 3 – кольцевой поляризатор блока подсветки, 4 – вращающийся поляризатор камеры; 5 – встроенный стандарт диффузного отражения (серый Spectralon – 50% отражения)

Широкополосный излучающий модуль, использующий 50 Вт галогеновую лампу, основан на оптоволоконном кольцевом осветителе (Edmund Optics, США), обеспечивающем равномерное распределение интенсивности света в фокальной плоскости камеры со средней яркостью $4,3 \pm 0,5$ мВт/см² в поле зрения камеры на поверхности кожи. Применение кольцевого осветителя позволило объединить оси освещения и обнаружения. Осветительное кольцо и камера оснащены широкополосными линейными поляризаторами. Трёхмерная модель устройства была реализована при помощи программного обеспечения САПР и напечатана на 3D-принтере. Рассмотренный измерительный подход позволяет захватывать отражённый сигнал из всего поля зрения в определённом диапазоне длин волн. Сканирование выполняется в спектральной области. Таким образом, разработанное устройство способно регистрировать пространственно и спектрально разрешённый коэффициент отражения для дальнейшего анализа ИНС. Нормированный пространственно разрешённый коэффициент отражения ткани рассчитывался, как отношение интенсивности света I_{Tissue} , скорректированной на темновой шум I_{Dark} и отражённой от объекта к отражению от стандарта $I_{Spectralon}$:

$$I = \frac{I_{Tissue} - I_{Dark}}{I_{Spectralon} - I_{Dark}}. \quad (2.3)$$

Использование серого стандарта (50% отражения) позволяет избежать перенасыщения матрицы КМОП-сенсора.

Система была оснащена вращающимся линейным поляризатором перед входным зрачком камеры, который возможно размещать параллельно (\parallel) или перпендикулярно (\perp) исходной поляризации источника света (см. рисунок 2.4), что позволило не только избежать зеркального отражения, но также измерять степень остаточной линейной поляризации ($DOLP$) излучения, отраженного от биоткани:

$$DOLP = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}. \quad (2.4)$$

Учет *DOLP* света, рассеянного от образца, значительно улучшает контраст изображения между незначительно различающимися тканевыми структурами и, как следствие, предлагает чувствительный параметр для дискриминантного анализа [183]. В качестве диагностического критерия для данных измерений предлагается индекс поляризации (*PI*). Индекс поляризации представляет собой площадь под кривой спектра *DOLP*, нормированную на количество полос гиперспектральной камеры:

$$PI = \frac{1}{B} \sum_{\lambda_i = \lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} DOLP(\lambda_i), \quad (2.5)$$

где $\lambda_{\min} = 510$ нм и $\lambda_{\max} = 900$ нм – длины волн, определяющие границы рассматриваемого спектрального диапазона;

$B = 79$ – количество спектральных полос системы ГСВ.

Нормализация к числу спектральных полос позволяет получить среднее значение *DOLP* в диапазоне от 0 до 1 и унифицировать измерения различными системами.

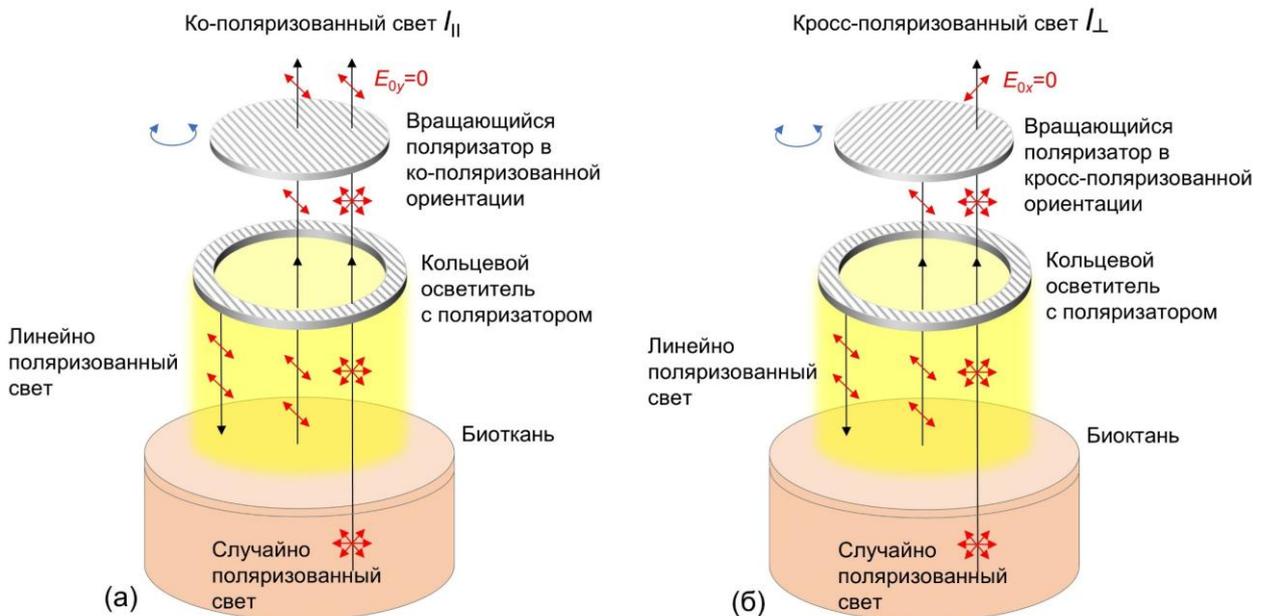


Рисунок 2.4 – Схематическое изображение поляризационно-чувствительных измерений: (а) визуализация ко-поляризованного света (\parallel), излучаемого тканью; (б) визуализация кросс-поляризованного света (\perp)

2.2.2 Искусственная нейронная сеть для обработки гиперспектральных данных

Matlab Deep Learning Toolbox был выбран для построения и обучения взаимосвязанного набора нейронных сетей для извлечения параметров кожи K_b , S , K_{mel} и K_{epi} , а также параметров фантома биоткани d и S (результаты представлены в главе 6). Данный программный пакет позволяет использовать многослойный перцептрон для подгонки кривой и регрессии. Данная ИНС прямого распространения состоит из входного слоя с количеством нейронов на входе i (размерность входных данных), скрытым слоем с количеством нейронов j , которые определяет ширину сети и выбирается эмпирически или через кросс-валидацию, и выходного слоя, который для задач регрессии обычно содержит один нейрон с линейной функцией активации (рисунок 2.5): w – матрица весов, связывающая входной и скрытый слой, b – вектор смещений, добавляемый к взвешенной сумме входов.

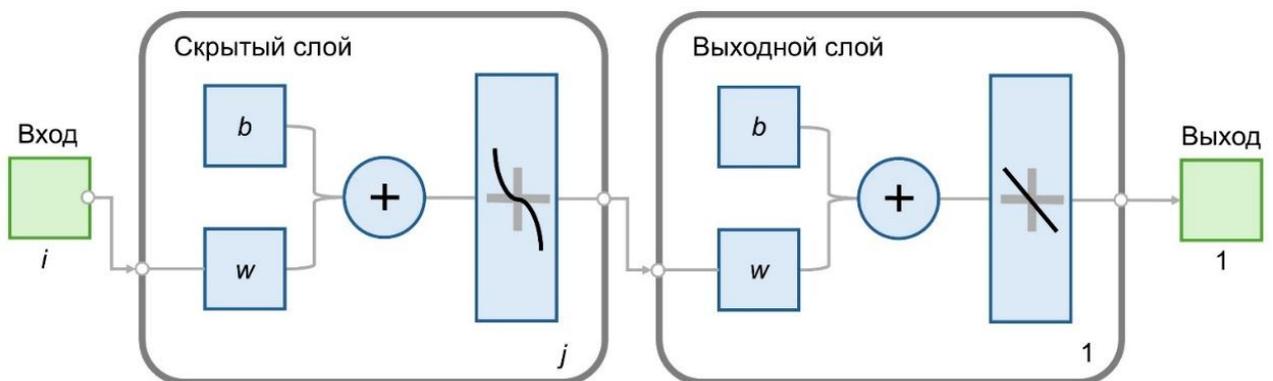


Рисунок 2.5 – Базовая архитектура используемой искусственной нейронной сети

В качестве алгоритма обучения использовался итеративный метод оптимизации Левенберга-Марквардта. Этот метод заключается в минимизации суммы квадратов ошибок между выходами сети и целевыми значениями:

$$E(w) = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N (y_i - f(x_i, w))^2, \quad (2.6)$$

где w – веса сети;

$f(x_i, w)$ – предсказание сети.

На каждом шаге веса корректируются по формуле:

$$w_{k+1} = w_k - (J_k^T J_k + \lambda I)^{-1} J_k^T e_k, \quad (2.7)$$

где J_k – матрица Якоби (производные ошибок по весам);

e_k – вектор ошибок;

λ – параметр демпфирования (регуляризации);

I – единичная матрица.

Если ошибка уменьшается, то λ уменьшается (алгоритм вырождается в метод Гаусса-Ньютона). Если ошибка растёт, то λ увеличивается (метод ближе к градиентному спуску).

Данные разделялись на три части: обучающую (70%), валидационную (15%) и тестовую (15%) выборки. Оценка качества обученной модели проводилась с использованием метрик RMSE (среднеквадратичная ошибка) и R^2 (коэффициент детерминации).

Общая блок-схема обработки данных показана на рисунке 2.6.



Рисунок 2.6 – Блок-схема обработки гиперспектральных данных. Шаги 1-3 выполняются до измерений. Шаг 4 – в соответствии со сбором данных

Все этапы можно разделить на две основные группы. Первая группа, состоящая из корректировки численной модели ткани, моделирования набора обучающих данных (подробно представлено в разделе 2.3) и обучения ИНС, является наиболее трудоемкой, но выполняется до измерений. Вторая группа – приложение обученной ИНС к результатам гиперспектральных измерений и получение заданных параметров. Данная группа не требует значительных вычислительных ресурсов и может быть выполнена в соответствии со сбором экспериментальных данных.

Сначала алгоритм оценивает толщину эпидермиса и содержание меланина, используя соответствующую обученную ИНС. Наилучшее соответствие этим параметрам было получено в спектральных диапазонах 680-725 нм и 725-770 нм, соответственно. Затем для расчетной толщины эпидермиса и содержания меланина определяется объемная доля крови и оксигенация крови для спектральных диапазонов 535-705 нм и 675-825 нм, соответственно. Предварительная обработка данных измерений с целью улучшения отношения сигнал/шум состоит из пространственного усреднения входного гиперспектрального куба в окне 5×5 пикселей. Все векторы входных данных измерений для рассматриваемых спектральных диапазонов, а также набор обучающих данных были нормализованы до процедуры обучения сети. Процедура нормализации была реализована в алгоритме обработки данных и предназначена для уменьшения возможных изменений высоты поверхности кожи в поле зрения камеры. Нормализация вектора (по L^2 -норма) как для обучающего набора данных, так и для измеренных данных была использована для получения соответствующих единичных векторов.

2.3 Монте-Карло моделирование спектров диффузного отражения для обучения искусственных нейронных сетей

Далее представлены разработанные численные модели, основанные на методе Монте-Карло (МК), позволяющие воспроизводить взаимодействие оптического излучения с неоднородными биологическими тканями, и являющиеся

универсальным инструментом для анализа и оптимизации методов оптической визуализации биотканей. Разработанные численные модели могут быть использованы для обоснования специализированных физико-технических требований при проектировании и оптимизации биомедицинских оптических систем, включая гиперспектральные, поляризационные и флуоресцентные методы; разработки алгоритмов обработки изображений для повышения точности диагностики; качественной интерпретации получаемых данных; создания новых методик неинвазивной диагностики тканевого метаболизма в различных областях медицины. Предложенные модели позволяют анализировать влияние различных морфологических и биохимических факторов на регистрируемые оптические сигналы.

Ранее автором диссертационной работы этот подход был применен для решения ряда задач, включая определение диагностического объема (глубины зондирования) различных оптоволоконных спектроскопических систем, влияния кровенаполнения и меланина на спектры флуоресценции и др. [20,77,184–187]. В данном же исследовании его применение позволило создать выборку спектров диффузного отражения для обучения ИНС для обработки гиперспектральных данных, рассчитать глубину зондирования системы гиперспектральной визуализации, смоделировать спектры остаточной линейной поляризации для фундаментального изучения влияния поглощения и рассеяния на поляризационные характеристики биотканей.

Для целей моделирования в данной диссертационной работе использовался метод МК [188–192], реализующий объектно-ориентированный подход для рутинного расчета распространения фотонов в среде [193–199]. Этот подход позволяет представить, так называемые, «пакеты фотонов» и структурные компоненты тканей в виде объектов и определить их взаимодействие. Таким образом, пакеты фотонов распространяется через рассеивающую среду, такую как биологическая ткань, представленную в виде набора объектов (клетки, кровеносные сосуды, коллагеновые волокна и т.д.), и взаимодействует с ними.

Моделирование траекторий пакетов фотонов осуществляется от точки входа в среду («источник») до области, где фотон покидает среду («детектор»). Объектно-ориентированное представление среды позволяет создавать реалистичные модели различных биологических тканей с учетом трёхмерных вариаций структурных изменений включая неоднородности, слоистость и динамические процессы, такие как кровоток или изменение гидратации. При этом каждый структурный элемент ткани (например, эпидермис, дерма, подкожная клетчатка) может быть параметризован с учетом его оптических свойств: коэффициента поглощения, коэффициента рассеяния, фактора анизотропии и показателя преломления.

В целом формирование траектории пакета фотонов состоит из следующих ключевых этапов: (1) запуск нового пакета фотонов с заданными начальными параметрами (положение, направление, интенсивность, поляризация и пр.); (2) выбор размера шага фотона на основе вероятностного распределения, определяемого оптическими свойствами среды; (3) перемещение пакета в среде с учетом возможного пересечения границ между различными тканевыми структурами; (4) отражение/пропускание на границах среды, описываемое законами Френеля или более сложными моделями для шероховатых поверхностей; (5) рассеяние фотона с изменением направления распространения в соответствии с индикатрисой рассеяния (например, функцией Хени-Гринштейна); (6) обнаружение детектором при выполнении условий регистрации (угол приема, пространственное положение и др.) (см. рисунок 2.7). На пути от источника излучения к детектору пакеты фотонов распространяются через рассеивающую среду и взаимодействуют с ней. Обновляется ряд представляющих интерес переменных: интенсивность, длина пути, поляризация, поглощение и т.д. Когда удовлетворяется условие обнаружения, включая требуемое количество пакетов фотонов, сохраняется траектория распространения. Интересующие параметры вычисляются на основе накопленной истории.

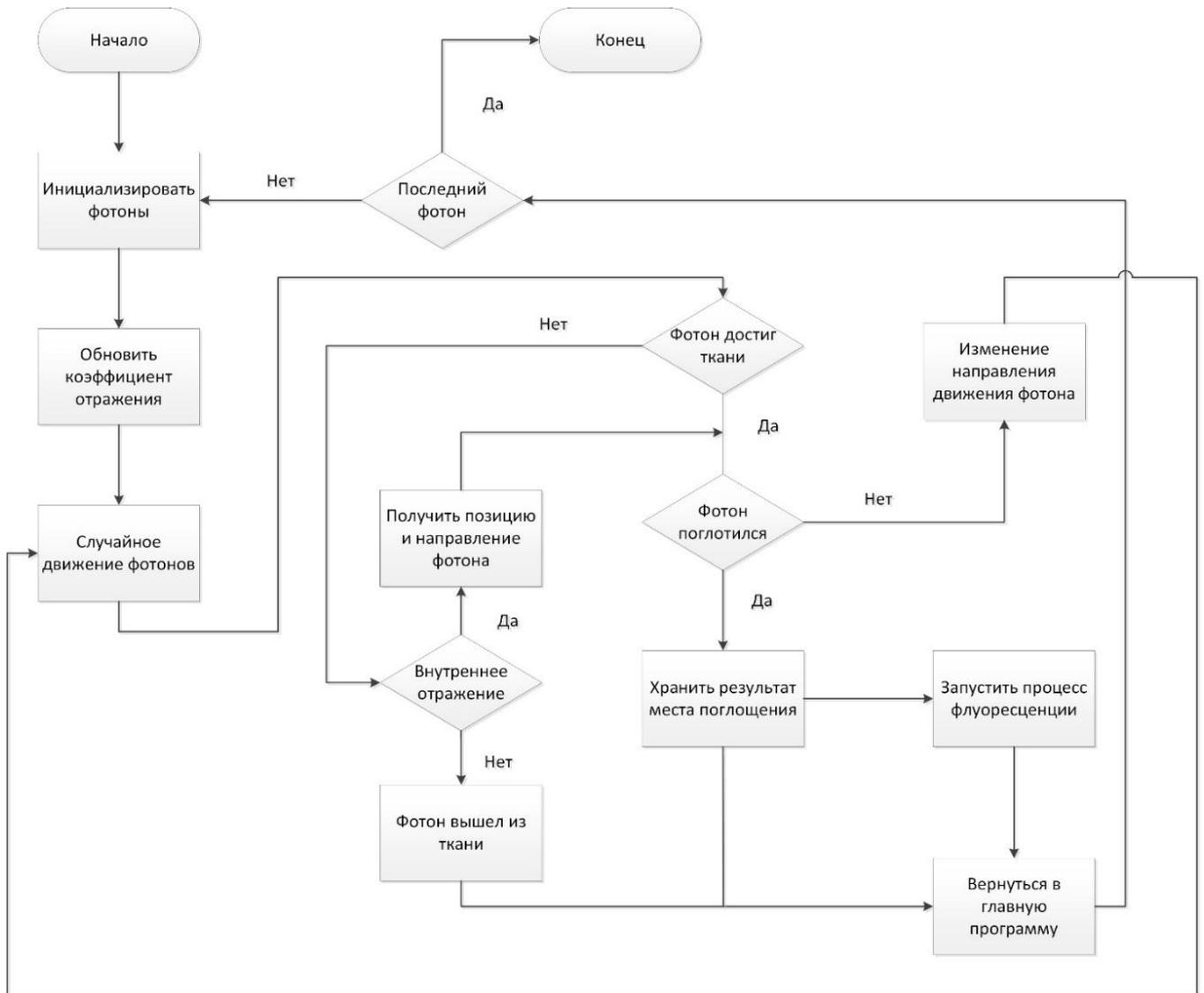


Рисунок 2.7 – Блок-схема, представляющая ключевые этапы распространения пакета одиночных фотонов

Начальное состояние каждого фотонного пакета в трехмерном пространстве описывается вектором положения:

$$\mathbf{r} = \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} \quad (2.8)$$

и вектором направления распространения:

$$\mathbf{s} = \begin{pmatrix} s_1 \\ s_2 \\ s_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \sin \theta \cos \varphi \\ \sin \theta \sin \varphi \\ \cos \theta \end{pmatrix}, \quad (2.9)$$

где θ и φ представляют собой полярный и азимутальный углы соответственно.

Такое параметрическое задание позволяет точно моделировать различные геометрии источников излучения – от точечных до протяженных с произвольным угловым распределением.

Длина свободного пробега фотона между актами взаимодействия подчиняется экспоненциальному распределению:

$$p(l) = \mu_t e^{-\mu_t l}, \quad (2.10)$$

где μ_t – коэффициент экстинкции, представляющий сумму коэффициентов рассеяния (μ_s) и поглощения (μ_a);

l – длина свободного пробега фотонов и вычисляется следующим образом:

$$l = -\frac{\ln(1-\xi)}{\mu_s}, \quad (2.11)$$

где ξ – случайное число, находящееся в диапазоне от 0 до 1.

Для многослойных биологических тканей с различными оптическими свойствами применяется адаптивный алгоритм коррекции длины пути, обеспечивающий плавный переход между слоями с разными характеристиками:

$$l^* = \Delta l \left(\frac{\mu_s^{(k-1)}}{\mu_s^{(k)}} \right), \quad (2.12)$$

Угловое распределение рассеянного излучения описывается фазовой функцией. Наиболее часто используется аппроксимация Хени-Гринштейна:

$$p(\cos \theta) = \frac{1 - g^2}{2(1 + g^2 - 2g \cos \theta)^{3/2}}, \quad (2.13)$$

где параметр анизотропии g ($-1 \leq g \leq 1$) определяет степень направленности рассеяния. Углы рассеяния определяются через случайные числа.

Пакет фотонов подвергается зеркальному отражению и преломлению, когда достигает границы раздела сред. Процедура заключается в разделении пакета фотонов на отраженную и пропущенную части по формулам Френеля. Если фазовое пространство i -го фотонного пакета дополнить исходным статистическим весом W_0 , то его затухание определяется как:

$$W_i = W_0 (1 - R_{in}) \left[\prod_{p=1}^M \mathfrak{R}(\xi) \right] (1 - R_{out}), \quad (2.14)$$

где M соответствует количеству отражений/преломлений пакета фотонов на внутренних границах раздела в рассеивающей среде;

R_{in} и R_{out} учитывают отражения, когда пакет фотонов начинает свое движение и покидает среду, соответственно.

Для границы раздела сред с различными показателями преломления n_1 и n_2 коэффициент отражения Френеля R определяется как:

$$R = \begin{cases} \frac{(n_2 - n_1)^2}{(n_2 + n_1)^2} & \text{if } \theta_1 = 0 \\ \frac{1}{2} \left[\frac{\sin^2(\theta_1 - \theta_2)}{\sin^2(\theta_1 + \theta_2)} + \frac{\tan^2(\theta_1 - \theta_2)}{\tan^2(\theta_1 + \theta_2)} \right] & \text{if } 0 < \theta_1 < \theta_{cr} \\ 1 & \text{if } \theta_{cr} < \theta_1 < \frac{\pi}{2} \end{cases} \quad (2.15)$$

Поглощение моделируется через экспоненциальное затухание статистического веса:

$$W = W_0 \exp\left(-\sum_i \mu_{a,i} l_i\right), \quad (2.16)$$

Это позволяет отдельно учитывать поглощение без пересчета траекторий.

Фотонный пакет регистрируется детектором при выполнении условий по положению и углу выхода. Траектории сохраняются для анализа. Моделирование прекращается при превышении определенного количества актов рассеяния.

Современные расширения классического метода МК включают моделирование когерентных свойств излучения через учет длины когерентности и интерференционных эффектов между различными путями распространения. Для поляризационно-чувствительных методик реализован полный учет состояния поляризации, например, через формализм Стокса или Джонса [200]. Особые возможности связаны с моделированием флуоресцентных процессов [201–203], где учитываются спектры возбуждения и испускания, квантовый выход и временная динамика. Метод также позволяет исследовать нелинейные эффекты, такие как двухфотонное поглощение, и моделировать сложные физические процессы, включая фотоакустическое преобразование и FRET-эффекты.

При этом прогресс в компьютерных технологиях и параллельных вычислениях, включая GPU-расчеты, позволяет выполнять чрезвычайно масштабные компьютерные симуляции за разумное время.

При разработке метода ГСВ было предложено использовать ИНС для обработки экспериментальных гиперспектральных данных (см. раздел 2.2.2). Обучение же ИНС было предложено осуществить с помощью смоделированных спектров диффузного отражения.

Основные физиологические параметры кожи, такие как объемная доля крови, насыщение крови кислородом и содержание меланина, обычно определяются путем подгонки измеренного спектра интенсивности под аналитическую или численную модель диффузного отражения кожи. К сожалению, аналитические выражения для отражения биотканей известны лишь для ограниченного числа упрощенных геометрий и граничных условий, например, для полубесконечной или

двухслойной среды [123]. В частности, Юдовский и соавт. [204] предложили аналитическое выражение для диффузного отражения однородной полубесконечной и двухслойной поглощающей и анизотропно рассеивающей среды на основе модифицированного двухпоточного приближения Кубелки-Мунка [205,206].

Диффузионная модель также часто используется для описания переноса излучения в биотканях. Соответствующее аналитическое решение для двухслойной среды было представлено Кинле и соавт. в [207], а затем обобщено для N -слойной среды [208]. Применение диффузионной модели для обработки гиперспектральных изображений кожи также продемонстрировано в [209]. Однако известно, что диффузионная модель имеет существенные ограничения [210] в точном описании переноса излучения в слабо рассеивающих или сильно анизотропных средах, а также на малых расстояниях между источником и детектором и в приповерхностных областях, где диффузионный режим рассеяния не свойственен распространению излучения.

Метод же МК позволяет учитывать реалистичную геометрию биоткани и сложные граничные условия. Использование ИНС естественным образом позволяет применять универсальность и гибкость МК подхода для обработки гиперспектральных данных в реальном времени. Все трудоемкие вычисления выполняются заранее, а полученные численные решения могут быть использованы в качестве обучающего набора данных для машинного обучения с учителем.

В этом исследовании общая интенсивность диффузного отражения была рассчитана с помощью метода МК как нормализованная сумма статистических весов пакетов фотонов, удовлетворяющих условию обнаружения в соответствии с микроскопическим законом Бугера-Ламберта-Бера, следующим образом:

$$I(\lambda) = \frac{1}{N_{ph}W_0} \sum_j^{N_{ph}} W_j \exp\left(-\sum_{i=1}^{K_i} \mu_{ai}(\lambda)l_i\right), \quad (2.17)$$

где N_{ph} – количество обнаруженных пакетов фотонов;

W_0 – начальный статистический вес пакета фотонов, попадающего в рассеивающую среду;

W_j – конечный вес j -го обнаруженного пакета фотонов;

K_i – общее количество событий рассеяния, испытываемых пакетом фотонов в среде;

μ_{ai} – среднее локальное поглощение среды;

l_i – длина пути пакета фотонов на i -м шаге.

Поглощающая способность биологической ткани обычно определяется значением среднего коэффициента поглощения μ_a , поскольку молекулярный состав ткани точно не определен. Таким образом, общее поглощение ткани может быть выражено через объемную долю компонента ткани C_i и коэффициент поглощения этого компонента μ_{ai} :

$$\mu_a(\lambda) = \sum_i C_i \mu_{ai}(\lambda). \quad (2.18)$$

Таким образом, коэффициенты поглощения слоев ткани были рассчитаны с учетом концентрации крови, насыщения кислородом, содержания воды в крови, гематокрита Ht , фракции меланина C_{mel} и содержания жира C_{fat} (рисунок 2.8а).

Коэффициент рассеяния каждого слоя в рамках текущего исследования (рисунок 2.8б) представлен комбинацией теорий Ми и Рэля [211], полученных из ряда источников [124,212–214], что позволяет наиболее точно описать рассеивающие свойства биологических тканей в широком спектральном диапазоне. Такой комбинированный подход особенно важен для корректного моделирования рассеяния на частицах разного размера – от крупных клеточных структур (теория Ми) до мелких белковых молекул (рэлеевское рассеяние). Коэффициент анизотропии рассеяния g для каждого слоя (рисунок 2.8в) был экстраполирован в зависимости от концентрации в крови и исходных экспериментальных данных для кожи [215] и крови [216].

Показатель преломления учитывает функциональную зависимость от длины волны (рисунок 2.8г) и для каждого из слоев был получен из ряда источников [217–219].

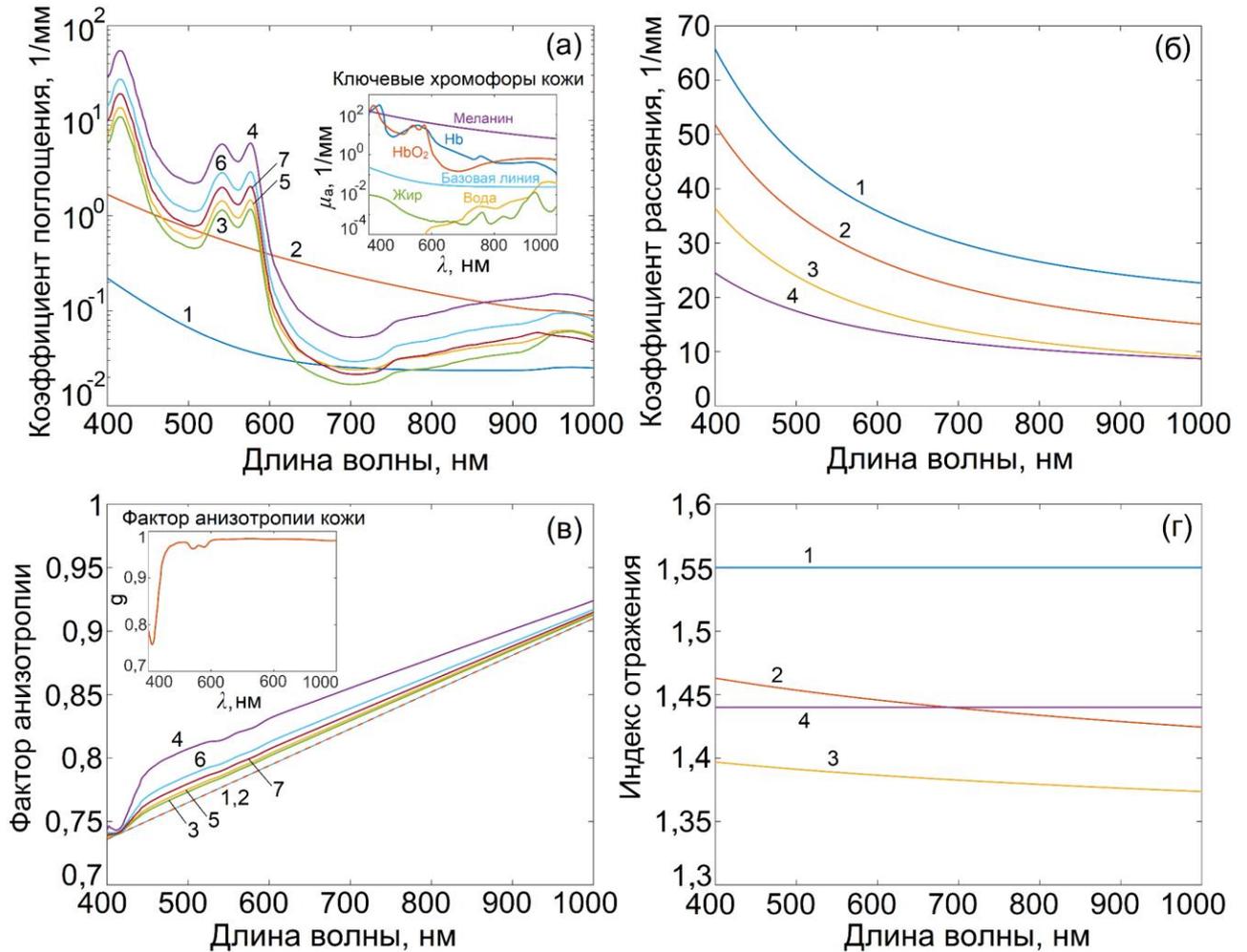


Рисунок 2.8 – (а) Коэффициенты поглощения слоев кожи: 1 – роговой слой, 2 – эпидермис, 3 – ретикулярная дерма, 4 – верхнее сосудистое сплетение, 5 – папиллярная дерма, 6 – нижнее сосудистое сплетение, 7 – подкожный жир. (б) Коэффициенты рассеяния: 1 – роговой слой, 2 – эпидермис, 3 – дерма, 4 – подкожный жир. (в) Фактор анизотропии: числовые обозначения соответствуют обозначениям, описанным для коэффициентов поглощения. (г) Показатель преломления: числовые обозначения соответствуют обозначениям, описанным для коэффициентов рассеяния. Оптические свойства были получены из ряда источников, описанных в тексте

GPU-ускоренная модель МК миграции фотонов в рассеивающих тканеподобных средах [193] использовалась для рутинного моделирования спектров в обучающем наборе данных для всех возможных комбинаций рассмотренных параметров. Используемая модель учитывает сложное распределение крови в дерме, которое отсутствует в двухслойных моделях, рассматривающих кожное распределение крови как однородное. Учет кожного распределения крови важен из-за зависимости глубины проникновения света от его длины волны. Были приняты во внимание различия в пространственном распределении крови, меланина, насыщения крови кислородом, гематокрита, содержания воды в коже, а также числовой апертуры детектора (см. рисунок 2.9 и таблицу 2.1). Все возможные комбинации четырех переменных параметров были получены для модельных спектров отражения кожи с учетом объемного коэффициента крови $K_b = [0-2]$ с шагом 0,1, насыщения крови кислородом $S = [30-100]\%$ с шагом 1%, концентрации меланина $K_{mel} = [0-0,1]$ с шагом 0,01 и коэффициента толщины эпидермиса $K_{epi} = [1-5]$ с шагом 1. Полный набор обучающих данных содержал 82 005 спектров в диапазоне 510-900 нм с шагом 5 нм.



Рисунок 2.9 – Семислойная модель кожи человека

Таблица 2.1 – Параметры, используемые для оценки коэффициентов поглощения слоев кожи [220]

Слой	Толщина, мкм	Кровенаполнение, %	Оксигенация, %	Вода, %	Меланин, %
Роговой слой	20 K_{epi}	0	0	5	0
Эпидермис	50 K_{epi}	0	0	20	K_{Mel}
Папиллярная дерма	100	4 K_b	S	50	0
Верхнее сосудистое сплетение	80	20 K_b	S	60	0
Ретикулярная дерма	1620	4 K_b	S	70	0
Нижнее сосудистое сплетение	200	10 K_b	S	70	0
Подкожный жир	5900	5 K_b	S	15	0

На рисунке 2.10а-г представлены типичные зависимости смоделированных спектров отражения кожи от переменных параметров (K_b , S , K_{mel} , K_{epi}), полученные для семислойной модели кожи.

Увеличение объемной доли крови в коже (рисунок 2.10а) приводит к снижению коэффициента отражения во всем спектральном диапазоне 500-900 нм, что связано с возрастанием поглощения в гемоглобиновых полосах. Однако наиболее значительные изменения наблюдаются в области максимального поглощения гемоглобина (500-600 нм).

Наиболее заметные изменения в отражении кожи, вызванные вариацией насыщения крови кислородом, наблюдаются в диапазоне 600-800 нм (рисунок 2.10б), где различие в поглощении окси- и дезоксигемоглобина достигает максимума.

Влияние содержания меланина в эпидермисе показано на рисунке 2.10в. Видно, что увеличение концентрации меланина снижает отражение во всем рассматриваемом спектральном диапазоне, однако форма спектров изменяется

иначе, чем при увеличении объемной доли крови. В отличие от гемоглибиновых полос поглощения, меланин демонстрирует монотонное возрастание коэффициента поглощения с уменьшением длины волны, что приводит к более равномерному изменению спектрального профиля.

Увеличение толщины эпидермиса (рисунок 2.10г) по-разному влияет на спектральные области 500-600 нм и 600-900 нм. В диапазоне ниже 600 нм рост толщины эпидермиса приводит к увеличению отражения кожи, что объясняется уменьшением доли света, достигающего богатых кровью слоев дермы. Тогда как для более длинных волн аналогичное увеличение вызывает снижение отражения. Этот эффект можно объяснить значительно меньшим (до двух порядков) поглощением оксигемоглобина в красной-ИК области по сравнению с поглощением в зеленой области спектра. Таким образом, оксигенированная кровь становится умеренным поглотителем, а снижение отражения в красной-ИК области обусловлено увеличением оптической плотности эпидермиса.

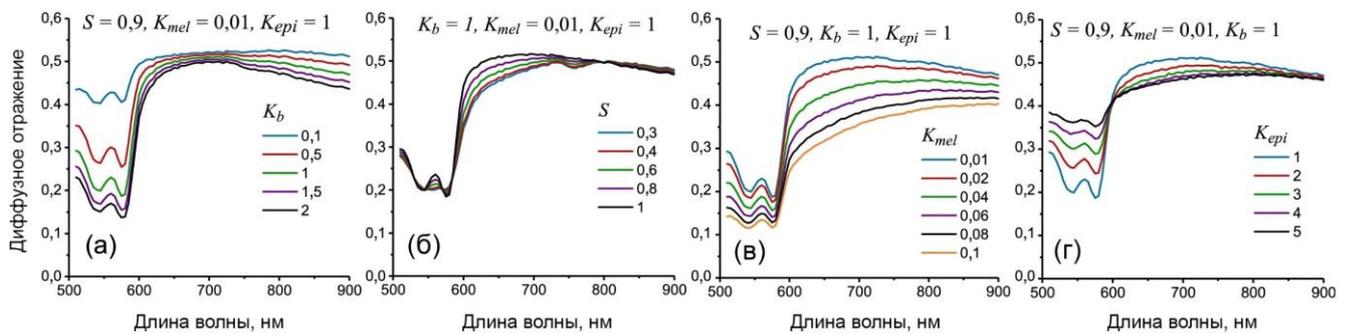


Рисунок 2.10 – Смоделированные спектры диффузного отражения кожи человека при различных значениях (а) коэффициента объемного кровенаполнения K_b , (б) насыщения крови кислородом S , (в) концентрации меланина K_{mel} и (г) коэффициента толщины эпидермиса K_{epi}

Для обучения ИНС для обработки гиперспектральных изображений фантома биоткани, представленного в главе 6, спектры диффузного отражения были так же смоделированы методом МК с использованием трехслойной модели, учитывающей глубину залегания кровеносного слоя d и его насыщение

кислородом S в качестве переменных параметров. Толщина кровеносного слоя была выбрана равной толщине канала фантома биоткани.

Всего было смоделировано 2 091 спектр с учетом следующих диапазонов и шагов: $d = [0-4]$ мм с шагом 0,1 мм, $S = [50-100]\%$ с шагом 1%, спектральный диапазон 510-900 нм с шагом 5 нм.

В моделировании использовались измеренные экспериментально оптические свойства фантома биоткани. Оптические свойства крови (гематокрит 45%) для различных уровней кислорода были взяты из работы [216].

Смоделированные спектры диффузного отражения фантома биоткани для двух значений глубины залегания кровеносного слоя d и различных уровней насыщения крови кислородом S представлены на рисунке 2.11а,б. Сильное поглощение крови в спектральной области $\lambda < 600$ нм приводит к низкому отражению в этом диапазоне.

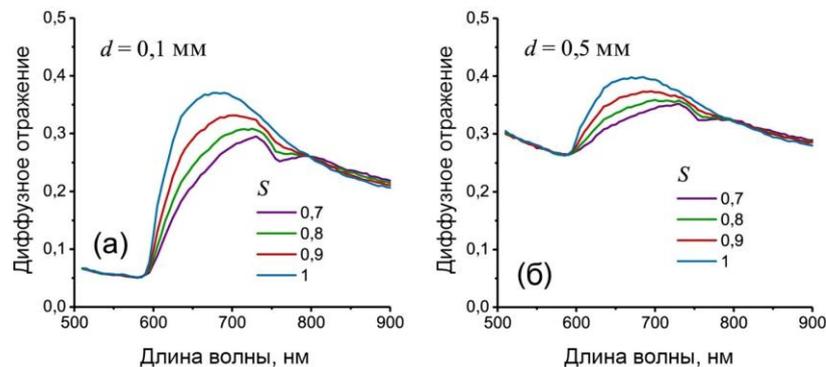


Рисунок 2.11 – Смоделированные спектры диффузного отражения фантома для различной глубины залегания капилляра d и насыщении кислородом S

Увеличение глубины залегания также повышает отражение в диапазоне 500-600 нм, поскольку поглощающий слой становится глубже, и меньше фотонов способны достичь его и поглотиться. Для рассматриваемого спектрального диапазона аналогичные изменения характерны и для спектров отражения кожи при уменьшении объемной доли крови (см. рисунок 2.10а) или увеличении толщины эпидермиса (рисунок 2.10г).

Отражение в диапазоне 600-800 нм менее чувствительно к глубине и в основном зависит от уровня насыщения крови кислородом. При снижении уровня

насыщения крови кислородом отражение в диапазоне 600-800 нм уменьшается, а характерный пик поглощения дезоксигемоглобина при 760 нм становится видимым как провал на спектрах отражения фантома. Подобные изменения спектров, вызванные вариациями насыщения крови кислородом, наблюдаются и для кожи (рисунок 2.10б).

2.4 Монте-Карло моделирование диагностического объема системы гиперспектральной визуализации

Для рутинного моделирования чувствительности детектора системы ГСВ по глубине (также известной как диагностический объем или объем выборки [221]) также использовалось МК моделирование.

Модель биологической ткани представлена в виде 3D-сетки, разделенной на отдельные воксели (трехмерный аналог пикселей). Для оценки функции плотности вероятности эффективных оптических путей траектория каждого фотонного пакета обрабатывается по вокселям, а объем выборки в конкретном вокселе рассчитывается по формуле:

$$Q(r) = -\frac{\partial}{\partial \mu_a(r)} \ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = \frac{\sum_{i=1}^{N_{ph}} l_i(r) W_{di}}{l_0 \sum_{i=1}^{N_{ph}} W_{di}}, \quad (2.19)$$

где W_{di} – конечный вес i -го обнаруженного фотона;

N_{pb} – количество фотонных пакетов, удовлетворяющих условиям детектирования;

l_i – длина пути i -го фотонного пакета во вокселе с центром в точке r ;

l_0 – размер вокселя.

Когда фотонный пакет регистрируется детектором, его конечный статистический вес определяется следующим образом:

$$W_d = W_0 \exp\left(-\sum_k \mu_{ak} l_k\right), \quad (2.20)$$

где W_d – статистический вес обнаруженного фотонного пакета;

μ_{ak} – коэффициент поглощения k -го вокселя;

l_k – общая длина пути фотонного пакета в k -м вокселе;

$W_0=1$ – начальный статистический вес фотонного пакета.

Для количественной оценки рассматривается сечение $Q(r)$ по координатам x и z ($Q(x,z)$), где x – горизонтальная ось, соответствующая расстоянию между источником и детектором, а z – глубина.

Для заданной конфигурации ГСВ системы в расчетах учитывалась окружающая среда (воздух с показателем преломления $n=1$), а также влияние полного внутреннего отражения на границе раздела ткань-воздух и апертура источника света и детектора. Результаты моделирования объема выборки для плоскости, проходящей через центр входного зрачка ГСВ системы, представлены на рисунке 2.12. Хорошо видно, что до 600 нм глубина зондирования не превышает 1 мм, тогда как для БИК-диапазона спектра она резко увеличивается и достигает 2,5-3 мм. Это подтверждает, что разработанная система в первую очередь чувствительна к изменениям содержания крови в ретикулярной дерме, верхнем сосудистом сплетении и способна охватывать верхнюю часть папиллярной дермы (см. рисунок 2.9) [222].

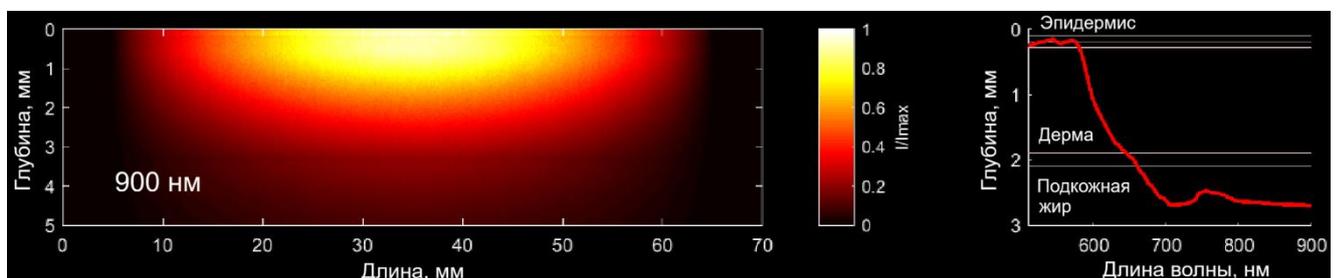


Рисунок 2.12 – Результат моделирования объема выборки для параметров экспериментальной ГСВ системы при 900 нм и глубина проникновения света в диапазоне от 510 до 900 нм при $1/e^2$ интенсивности падающего света

2.5 *In vivo* измерения кожных покровов человека

Разработанная система ГСВ была апробирована в тестах с артериальной и венозной окклюзией на условно-здоровых добровольцах. Исследовалась кожа белого мужчины, соответствующая II типу по шкале Фитцпатрика [223,224] (см. рисунок 2.13а). Во время измерений ось была направлена вдоль исследуемой конечности. При этом исследования показали, что положение объекта практически не влияет на измерение параметров объемной доли крови (BVF) и насыщения крови кислородом (S), что достигается за счет ортогонального освещения и стабильного расстояния до объекта, которое контролируется длиной бленды объектива.

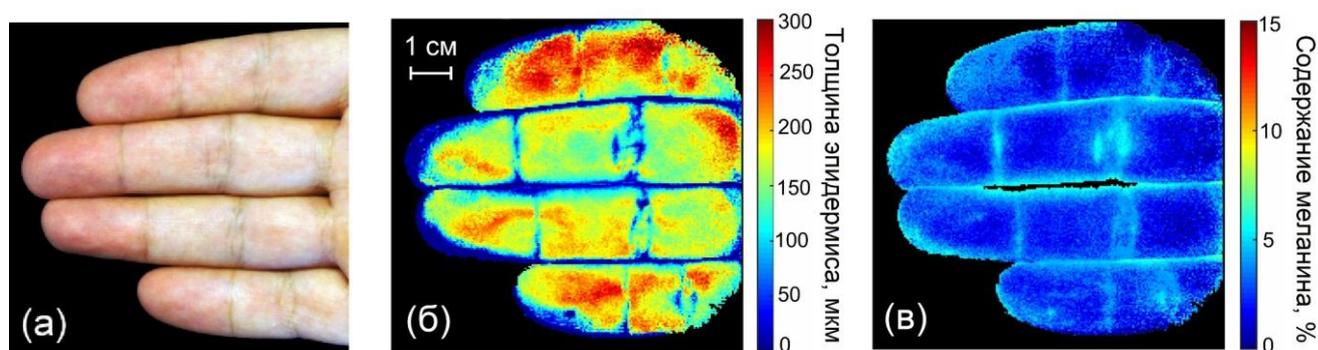


Рисунок 2.13 – (а) Фотографии кожи белого мужчины (тип II), принявшего участие в измерениях; (б) реконструированные значения толщины эпидермиса и (в) содержания меланина

Тесты артериальной и венозной окклюзии проводились на предплечье с использованием манжеты сфигмоманометра с давлением 200-220 мм рт. ст. и 80-100 мм рт. ст., соответственно [225]. Дополнительно был выполнен тест окклюзии пальца. Во время окклюзии пальца для подавления кровообращения и насыщения кислородом безымянный палец правой руки пережимался эластичной лентой. Были получены гиперспектральные изображения кожи ладони и пальцев до окклюзии, через 3 мин непрерывной окклюзии и через 1 мин после снятия манжеты или ленты. Каждый тест окклюзии проводился как отдельное измерение со значительным временным интервалом между ними для полного восстановления тканей.

Были получены гиперспектральные изображения внутренней стороны пальцев и ладони, а затем с помощью нейросетевой обработки реконструированы 2D-карты распределения BVF и S . Содержание меланина и толщина эпидермиса кожи были учтены для получения корректных значений объемной доли крови и насыщения кислородом. Реконструированные значения толщины эпидермиса и содержания меланина представлены на рисунке 2.13б,в. Среднее значение толщины эпидермиса находится в пределах 140-180 мкм, что характерно для кожи ладонной поверхности. Неравномерное распределение толщины эпидермиса по измеряемой области можно объяснить индивидуальной изменчивостью, связанной с неравномерной нагрузкой на разные части ладони в течение жизни. Средняя восстановленная величина содержания меланина составляет 1,3 %.

На рисунках 2.14а-г представлены реконструированные карты BVF ладони и пальцев во время различных тестов окклюзии. Во время артериальной окклюзии ладони и пальцев (рисунок 2.14а,б) и окклюзии пальца эластичной лентой (рисунок 2.14г) наблюдалось значительное снижение объемной доли крови. Венозная окклюзия (рисунок 2.14в) значительно увеличивала объемную долю крови в пальцах, что связано с прекращением оттока крови. При низком давлении в манжете сжимаются только вены, при этом артериальный кровоток сохраняется. Снятие манжеты или ленты вызывает реактивную гиперемия, что приводит к увеличению параметра BVF .

На рисунке 2.14д-з показаны карты распределения параметра S до, во время и после различных тестов окклюзии для рассматриваемых зон кожи. Средний уровень S составляет 80-85 % для неокклюзированных тканей. Эти значения соответствуют среднему насыщению кислородом между артериальной (95-99 %) и венозной (~75 %) кровью. Трехминутная окклюзия пальца снижает содержание кислорода в крови до уровня 60-65 % (рисунок 2.14з). Более щадящие артериальная и венозная окклюзии предплечья снижают насыщение кислородом до 70-75 % (рисунок 2.14д-ж). Видно, что снижение насыщения кислородом при венозной окклюзии носит более локальный характер. После снятия окклюзии насыщение кислородом быстро восстанавливается до исходного значения. Средние значения и

стандартное отклонение BVF и S для каждого этапа различных тестов окклюзии представлены на рисунке 2.14и,к соответственно.

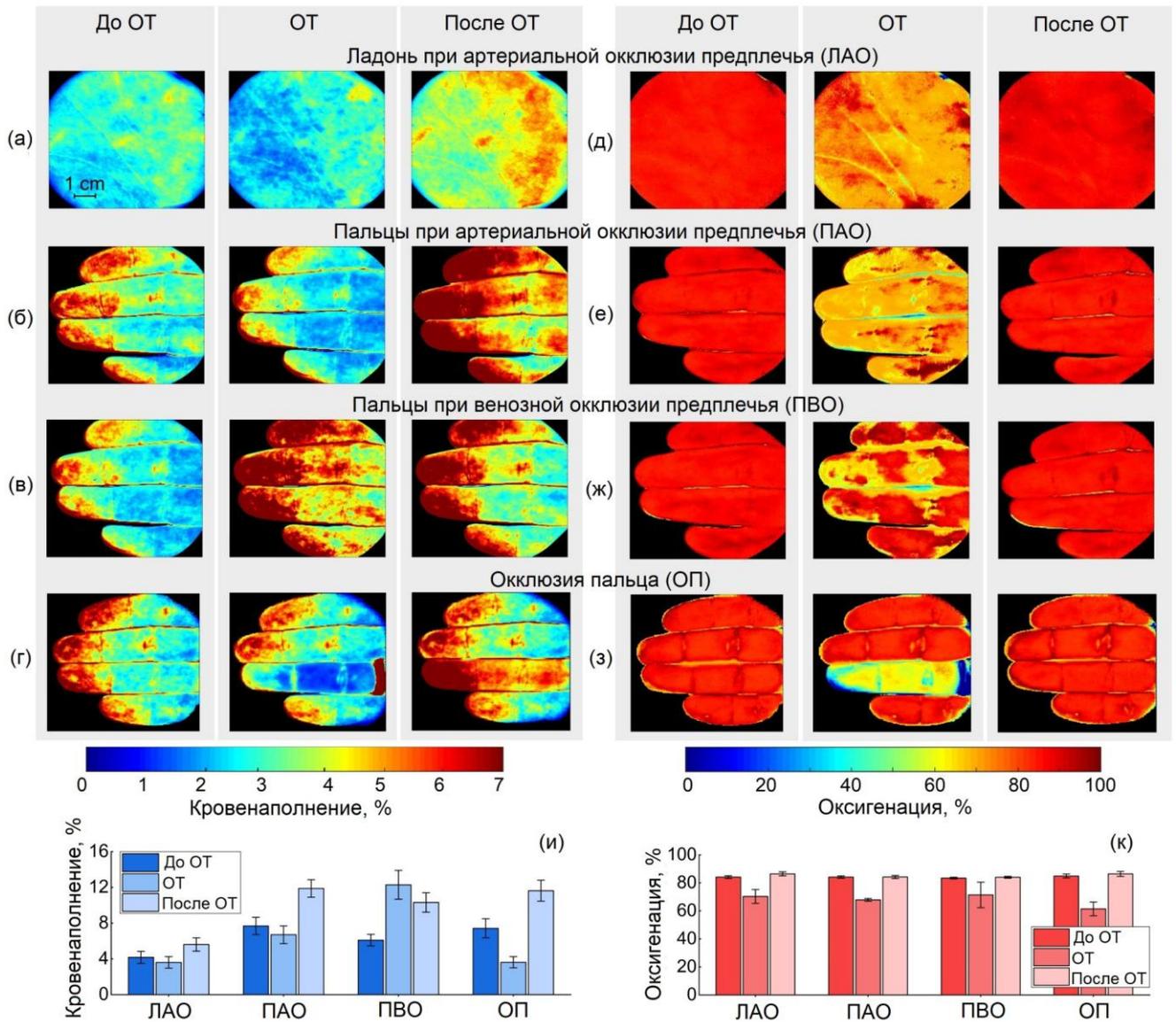


Рисунок 2.14 – Полученные карты BVF и S до, во время и через 1 минуту после различных тестов на окклюзию: (а) ладонь руки с артериальной окклюзией предплечья; (б) пальцы ладони с артериальной окклюзией предплечья; (в) пальцы ладони с венозной окклюзией предплечья; (г) пальцы ладони с артериальной окклюзией одного пальца; (д-з) соответствующие карты S до, во время и через 1 минуту после различных тестов на окклюзию для рассматриваемых зон кожи; (и) средние значения и стандартное отклонение BVF для каждой стадии окклюзии; (к) средние значения и стандартное отклонение S для каждой стадии окклюзии

Также была рассмотрена кожа мужчины индийского происхождения, соответствующая типу V шкалы Фитцпатрика (рисунок 2.15).

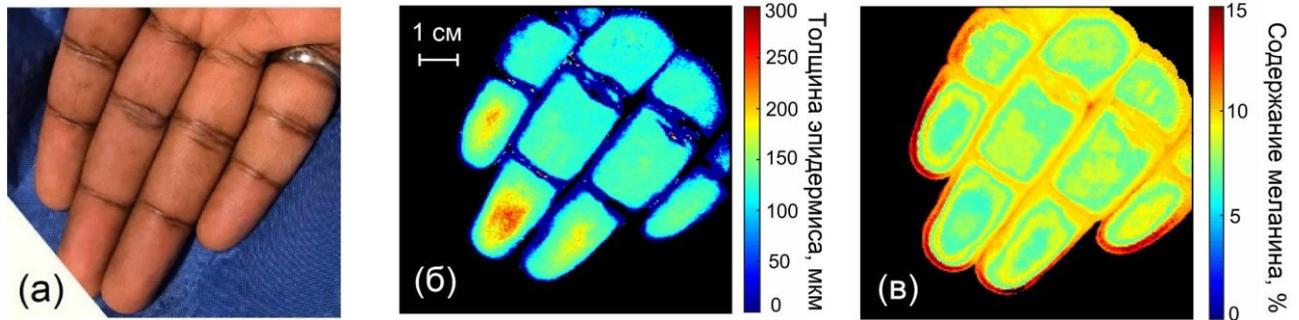


Рисунок 2.15 – (а) Реконструированные значения толщины эпидермиса и (б) содержания меланина для кожи типа V

Среднее значение толщины эпидермиса также находится в пределах 150 мкм. Средняя восстановленная величина содержания меланина составляет 8 %.

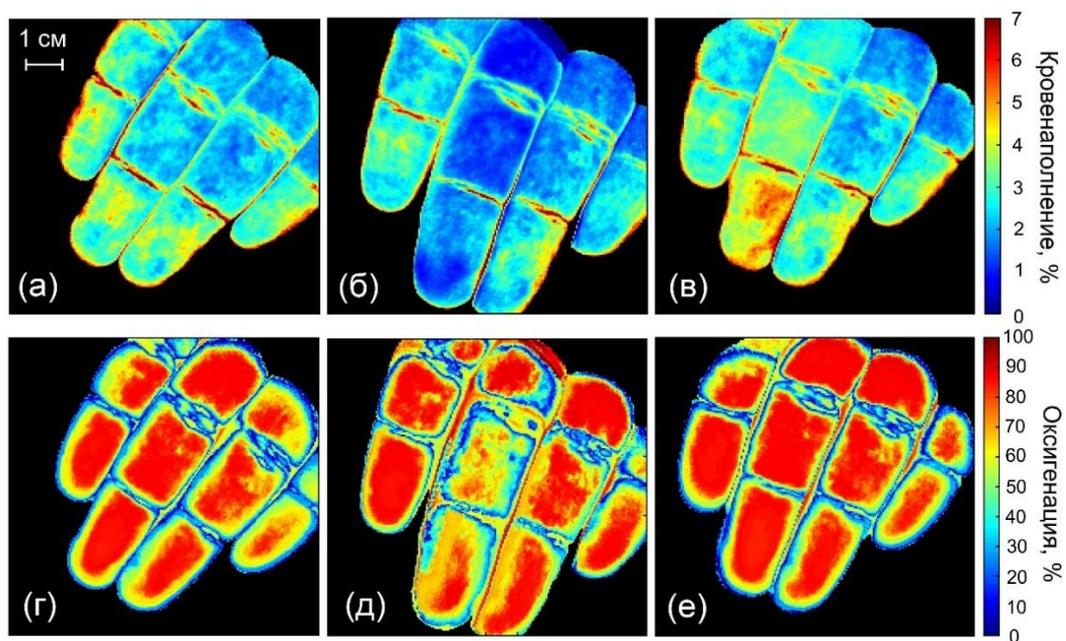


Рисунок 2.16 – Полученные карты BVF (а) до, (б) в течение и (в) через 1 минуту после окклюзии среднего пальца руки. Соответствующие карты S (г) до, (д) в течение и (е) через 1 мин после окклюзии

Во время окклюзии также наблюдается значительное снижение содержания крови (рисунок 2.16). Высвобождение окклюзированного кольца вызывает появление реактивной гиперемии, приводящей к увеличению объемной доли

крови, которая может быть надежно обнаружена разработанной системой даже в случае высокого содержания меланина в коже. Средний уровень оксигенации составляет около 80 %. Трехминутная окклюзия снижает содержание кислорода в крови до уровня 60-65 %.

Здесь стоит отметить, что при проведении этих измерений вращающийся поляризатор фиксировался в скрещенном положении по отношению к поляризатору на кольце подсветки для уменьшения зеркального отражения от измеряемого объекта.

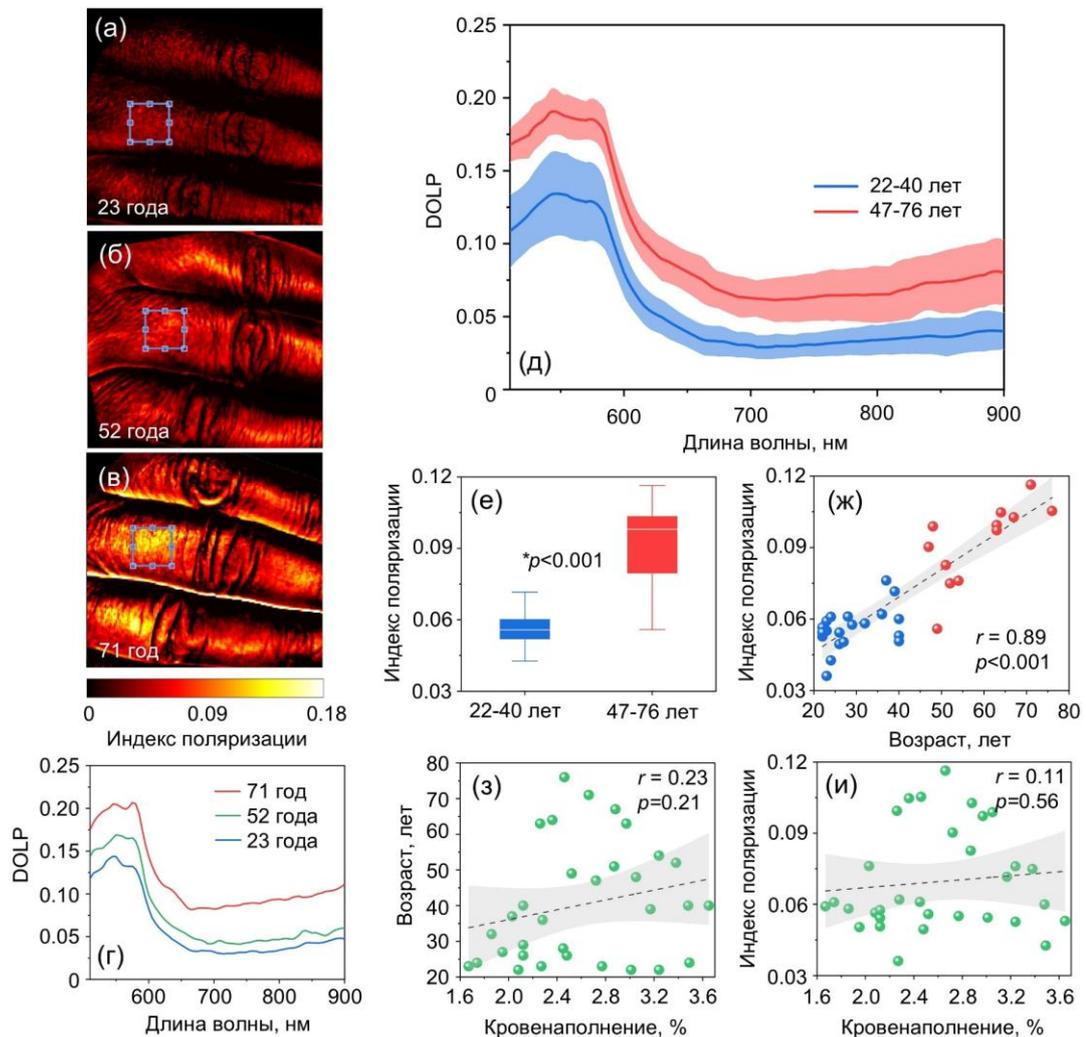


Рисунок 2.17 – Пример *PI* изображений кожи для различных возрастов: (а) 23 года; (б) 52 года; (в) 71 год. (г) Спектры *DOLP* для соответствующих ROI. (д) Усредненные спектры *DOLOP* для двух возрастных групп: до 40 лет и после 40 лет. (е) Сравнение *PI* между двумя возрастными группами; (ж) взаимосвязь между *PI* и возрастом; корреляция между (з) возрастом и кровенаполнением и (и) между *PI* и кровенаполнением

Далее были проведены предварительные исследования возможности использования предложенного подхода для оценки поляризационных свойств кожи и параметра PI (формула 2.5) для мониторинга возрастных изменений кожи человека. На рисунке 2.17(а-в) представлены примеры изображений PI и соответствующие спектры $DOLP$ поверхности кожи пальцев для трех женщин-добровольцев разного возраста.

Для детального анализа добровольцы были разделены на две возрастные группы (22-40 лет и 47-76 лет). На рисунке 2.17д показаны спектральные распределения $DOLP$ кожи в разных возрастных группах. Наблюдается общее увеличение параметра $DOLP$ с возрастом. Для старшей группы (47-76 лет) зафиксировано статистически значимое увеличение параметра PI (рисунок 2.17е). В частности, среднее значение PI для этой группы на 76% выше, чем у более молодых добровольцев (22-40 лет).

На рисунке 2.17ж показана корреляция между PI и возрастом ($r=0,89$, $p<0,001$, корреляция Пирсона). В данном случае линейная регрессия лучше всего описывает взаимосвязь между $DOLP$ и возрастом. Форма спектра до 600 нм в основном определяется пиками поглощения гемоглобина крови. За пределами сильных полос поглощения кривые на рисунке 2.17д демонстрируют снижение $DOLP$ с увеличением длины волны, что может быть вызвано уменьшением поглощения зондирующего излучения кровью и другими природными хромофорами кожи (в частности, меланином). Таким образом, на спектральные зависимости $DOLP$ в целом влияет наличие различных поглотителей (кровь, меланин и др.) и рассеивателей (коллаген, эластин и др.) в коже.

Используя возможности системы ГСВ и обработки с помощью ИНС, был рассчитан параметр объемной доли крови BVF и проанализирована зависимость $DOLP$ от поглощения крови. В данном исследовании не обнаружено корреляции этого параметра с возрастом (рисунок 2.17з), а также не выявлено связи с PI (рисунок 2.17и). Следовательно, можно сделать вывод, что возрастные изменения кровенаполнения кожи не оказывают существенного влияния на $DOLP$. Это

позволяет предположить, что на поляризацию влияют другие изменения оптических свойств, связанные со старением.

Что касается других поглотителей, в рассматриваемом видимом спектральном диапазоне они представлены меланином и желтыми пигментами (билирубином и β -каротином). Отношение, представленное формулой (2.4), устраняет фактор ослабления меланина. Билирубин и β -каротин содержатся в коже в низких концентрациях и могут достигать высоких значений только при некоторых заболеваниях. При этом основное поглощение наблюдается в спектральном диапазоне ниже 500 нм, который находится за пределами измерений системы.

Предполагается, что выявленные различия связаны с возрастными изменениями коллагена. Увеличение *DOLP* можно объяснить отрицательной корреляцией между коэффициентом рассеяния кожи и возрастом человека, обсуждавшейся ранее [170,171]. Для поляризованного света многократное рассеяние приводит к потере поляризации. Таким образом, более низкие значения коэффициента рассеяния в старшем возрасте приводят к меньшей деполяризации и, как следствие, к более высоким значениям *DOLP*. Это предположение было подтверждено по результатам моделирования, представленного далее.

Оценка вклада рассеяния и поглощения в изменения спектров *DOLP* была также выполнена с помощью МК моделирования.

Различные модели метода МК были разработаны для моделирования распространения поляризованного света в рассеивающих средах [172,200,226–243]. Для описания и отслеживания изменений поляризации в современных подходах МК обычно используются формализмы Джонса и/или Стокса-Мюллера. В данном исследовании был использован формализм Джонса для работы с линейной поляризацией света, проходящего через случайную мутную среду. В частности, вектор Джонса

$$\mathbf{P} = \begin{pmatrix} P_x \\ P_y \end{pmatrix}$$

назначался каждому фотону при испускании и всегда был ортогонален его направлению. Состояния параллельной ($|H\rangle$) и перпендикулярной ($|V\rangle$) поляризации фотона описывались векторами:

$$|H\rangle = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix}, \quad |V\rangle = \begin{pmatrix} 0 \\ 1 \end{pmatrix}.$$

Эволюция вектора поляризации \mathbf{P} в рассеивающей среде отслеживалась вдоль вычисленного пути фотона с помощью итеративного решения уравнения Бете-Солпитера, сводящегося к последовательным преобразованиям начальной поляризации:

$$\mathbf{P}_N = \hat{U}_N \hat{U}_{N-1} \hat{U}_{N-2}, \dots, \hat{U}_1 \mathbf{P}_0, \quad (2.21)$$

где P_0 – начальное состояние поляризации фотона при испускании;
 N – количество актов рассеяния для j -го фотона до детектирования;
 \mathbf{P}_N – результирующий вектор поляризации Джонса.

Также был введен действительный 3×3 оператор \hat{U}_i , который использует единичный вектор направления фотона $\mathbf{s}_i = [s_{iX}, s_{iY}, s_{iZ}]$ на i -м акте рассеяния для отслеживания состояния поляризации:

$$\hat{U}_i = \begin{pmatrix} 1 - s_{iX}^2 & -s_{iX} \cdot s_{iY} & -s_{iX} \cdot s_{iZ} \\ -s_{iX} \cdot s_{iY} & 1 - s_{iY}^2 & -s_{iY} \cdot s_{iZ} \\ -s_{iX} \cdot s_{iZ} & -s_{iX} \cdot s_{iZ} & 1 - s_{iZ}^2 \end{pmatrix}. \quad (2.22)$$

Эта процедура гарантирует, что каждый фотон остаётся полностью поляризованным, но его поляризация становится суперпозицией параллельного и перпендикулярного состояний. Усредняя по ансамблю фотонов, можно вычислить компоненты интенсивности рассеянного света:

$$I_{\parallel} = \frac{1}{N_{ph}} \sum_{j=1}^{N_{ph}} W_j P_{x_j}^2 \Gamma_R^N, \quad (2.23)$$

$$I_{\perp} = \frac{1}{N_{ph}} \sum_{j=1}^{N_{ph}} W_j P_{y_j}^2 \Gamma_R^N, \quad (2.24)$$

$$I_{+45^\circ} = \frac{1}{N_{ph}} \sum_{j=1}^{N_{ph}} \frac{W_j}{2} (P_{x_j}^2 + P_{y_j}^2 + 2P_{x_j} P_{y_j}) \Gamma_R^N, \quad (2.25)$$

$$I_{-45^\circ} = \frac{1}{N_{ph}} \sum_{j=1}^{N_{ph}} \frac{W_j}{2} (P_{x_j}^2 + P_{y_j}^2 - 2P_{x_j} P_{y_j}) \Gamma_R^N, \quad (2.26)$$

где $\Gamma_R = 2(1 + \cos^2 \theta)^{-1}$ – фактор Рэлея.

Тогда степень линейной поляризации (*DOLP*) может быть определена как:

$$DOLP = \frac{\sqrt{(I_{\parallel} - I_{\perp})^2 + (I_{+45^\circ} - I_{-45^\circ})^2}}{I}, \quad (2.27)$$

где $I = I_{\parallel} + I_{\perp} = I_{+45^\circ} + I_{-45^\circ}$.

В данной работе используется начальная поляризация |Н), и выражение для *DOLP* сводится к выражению (2.4).

Полное внутреннее отражение и/или преломление на границе среды учитывается путём разделения фотона на прошедшую и отражённую части.

С помощью моделирования была оценена роль поглощения и рассеяния в изменении спектров *DOLP*. Зависимость *DOLP* от коэффициентов рассеяния (μ_s) и поглощения (μ_a) моделировалась, как показано на рисунке 2.18 [244].

В обоих случаях исходные значения коэффициентов μ_a и μ_s умножались и делились на коэффициенты 1,5 и 2. При увеличении μ_a наблюдался рост *DOLP* (рисунок 2.18а). На рисунке 2.18б показано, что увеличение μ_s при отсутствии влияния других факторов приводит к соответствующему снижению *DOLP*.

Результаты моделирования демонстрируют, что четырёхкратное увеличение рассеяния снижает *DOLP* до 50%. В то же время аналогичное изменение поглощения увеличивает *DOLP* лишь на 20%.

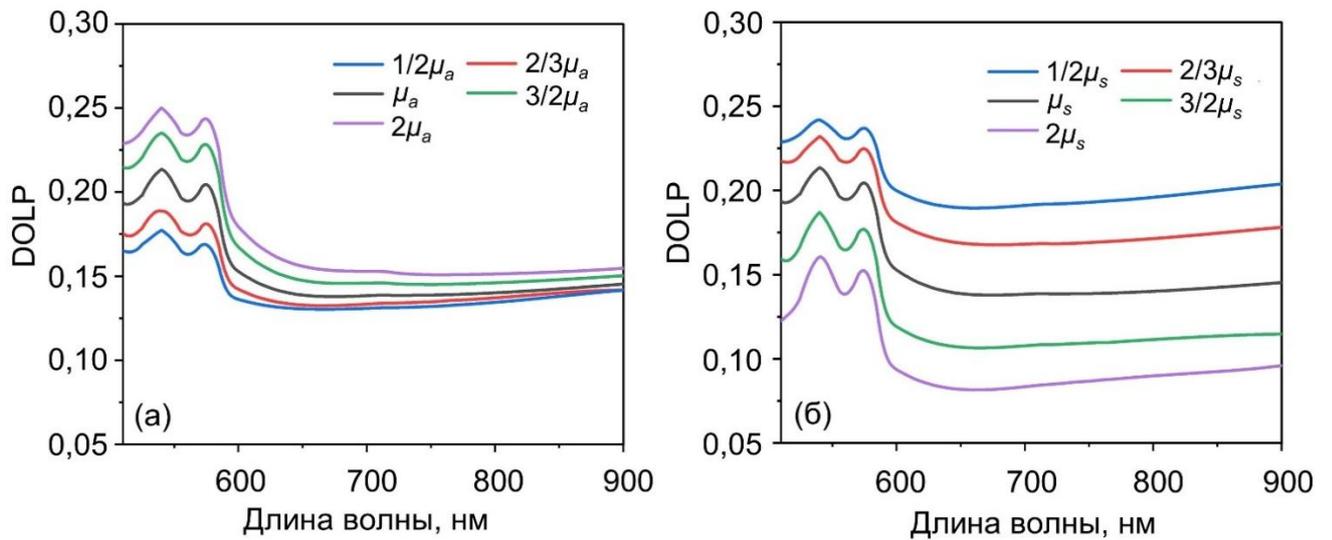


Рисунок 2.18 – Смоделированные спектры $DOLP$ для кожи человека при различных значениях коэффициентов (а) поглощения и (б) рассеяния дермы

Кроме того, при изменении рассеяния спектр $DOLP$ меняется во всём диапазоне длин волн, тогда как поглощение оказывает заметное влияние только в области сильного поглощения гемоглобина (500-600 нм). Как видно из экспериментально зарегистрированных спектров (рисунок 2.17), возрастные изменения спектра наблюдаются во всём диапазоне длин волн. Это позволяет предположить, что на поляризацию в большей степени влияет рассеяние. Возрастные и патологические изменения поляризации кожи также могут быть объяснены в основном изменениями этого параметра.

В работе [245] показано, что наибольшие изменения параметра $DOLP$ происходят при малом числе актов рассеяния. При множественном рассеянии изменения поляризации минимальны. Чтобы проверить чувствительность технологии к изменениям поляризации, была использована оценка глубины проникновения излучения в кожу (см. раздел 2.4 и рисунок 2.19а) и рассчитана транспортная длина свободного пробега фотонов, используя усреднённые значения коэффициентов поглощения и рассеяния.

Транспортная длина может быть приблизительно рассчитана как:

$$l^* = \frac{1}{\mu_s(1-g) + \mu_a}. \quad (2.28)$$

Из рисунка 2.19б видно, что в БИК-диапазоне транспортная длина достигает 0,5 мм.

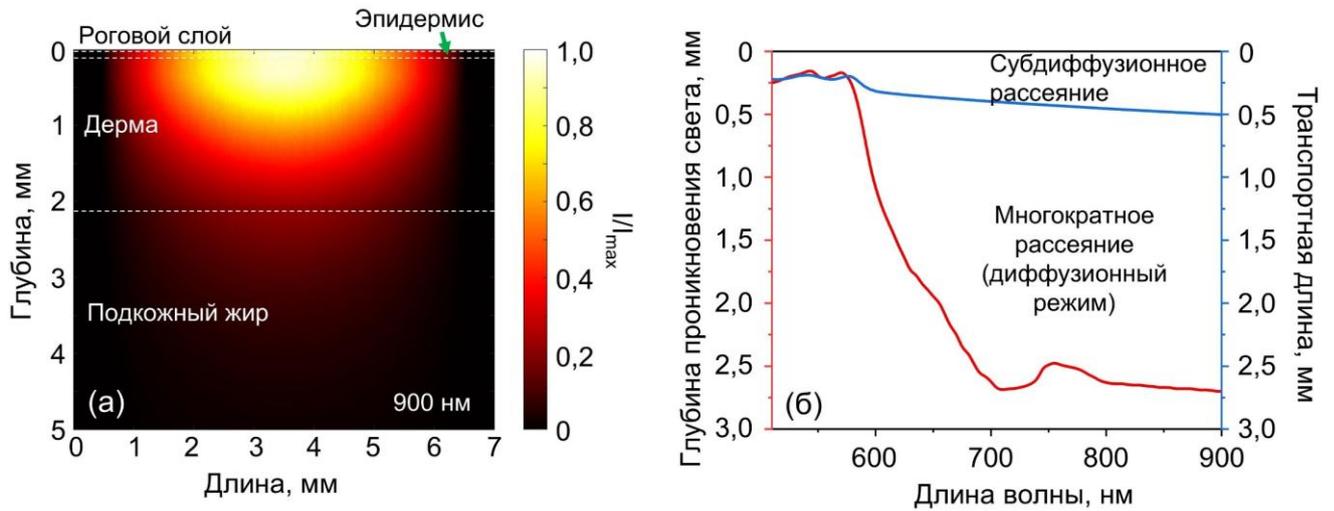


Рисунок 2.19 – (а) Результат моделирования объема выборки для экспериментальной гиперспектральной установки для длины волны 900 нм. (б) сравнение глубины проникновения света в диапазоне от 510 до 900 нм при $1/e^2$ интенсивности падающего света и расчетной транспортной длины

График показывает, что при работе в субдиффузионном режиме в спектральной области до 600 нм система будет наиболее чувствительна к изменениям поляризации. Стоит отметить, что большинство современных оптических методов исследования биологических тканей демонстрируют аналогичное поведение при рассеянии.

Таким образом, результаты моделирования показывают, что чувствительность поляризационной спектроскопии или визуализации к возрастным или патологическим изменениям кожи может быть в первую очередь обусловлена изменением рассеяния, которое, в свою очередь, связано с изменениями структуры коллагеновых волокон стромальных тканей.

Следует подчеркнуть, что в данной работе рассматривались только изменения линейной поляризации. Дальнейшие исследования могут быть направлены на изучение изменений всех компонент вектора Стокса, что позволит провести более детальное и комплексное изучение взаимосвязи между

изменениями поглощения и рассеяния биологических тканей и их поляризационными свойствами.

Таким образом, разработанная ГСВ система показала способность регистрировать изменения объемной доли крови и тканевой оксигенации человека *in vivo*. Реализация обработки на основе ИНС позволяет быстро восстановить рассматриваемые параметры кожи. Среднее время обработки одного гиперспектрального измерения, включая извлечение двумерных карт вышеупомянутых параметров на компьютере Intel Core i7 с 4 ядрами ЦП и 16 Гб ОЗУ, составляет около 3 с. Дальнейшее сокращение времени обработки с использованием графических процессоров также возможен.

Далее многопараметрическая система ГСВ была применена для проведения исследований метаболических изменений в тканях нижних конечностей пациентов с СД.

2.6 Исследование метаболических изменений кожи пациентов с сахарным диабетом

В экспериментальных клинических исследованиях приняли участие 20 пациентов (10 мужчин и 10 женщин, средний возраст 54 ± 11 лет) с европеоидным типом кожи и СД 2 типа Медицинского центра Плявниеки и Клинической университетской больницы им. Паула Страдыня (Рига, Латвия). Контрольную группу составили 20 здоровых добровольцев (средний возраст 48 ± 14 лет). Тринадцать участников (65%) были женщинами. Основные характеристики целевых групп представлены в таблице 2.2.

Сравниваемые группы пациентов были статистически однородны по основным демографическим и клиническим параметрам, за исключением ожидаемых различий в уровне глюкозы натощак и индексе массы тела ($p < 0,01$, согласно *U*-критерию Манна-Уитни). Обе группы были сопоставимы по возрасту и исходным характеристикам кожного покрова.

Таблица 2.2 – Характеристики диабетической и контрольной групп

Параметры	Пациенты с СД	Контрольная группа	Значение <i>p</i>
Пол М/Ж	10/10	7/3	0,35, НР
Возраст, лет	54±11	48±14	0,17, НР
Систолическое АД, мм.рт.ст.	139±19	131±9	0,16, НР
Диастолическое АД, мм.рт.ст.	81±7	79±5	0,35, НР
ИМТ, кг/м ²	34,6±5,8	23,2±2,2	< 0,001
Уровень глюкозы натощак, ммоль/л	8,7±3,1	4,7±0,5	< 0,001
Длительность диабета, лет	15±10	–	–
НbA1c, %	8,3±1,6	–	–
НbA1c, ммоль/моль	67±9	–	–
Общий холестерин, ммоль/л	5,3±1,2	–	–
Креатинин, мкмоль/л	79±26	–	–
АЛТ, МЕ/л	31±8	–	–
Нарушения микроциркуляции, %	–	–	–
Полинейропатия	95	–	–
Ангиопатия	20	–	–
Ретинопатия	45	–	–
Нефропатия	75	–	–
Стадия диабета, %	–	–	–
Компенсированная	30	–	–
Субкомпенсированная	70	–	–

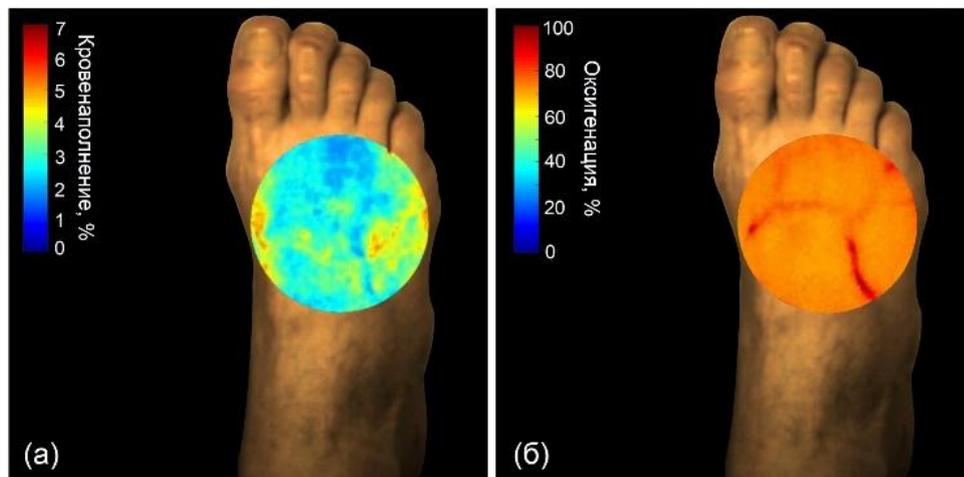
Данные представляют собой среднее±стандартное отклонение, если не указано иное. НР – нет статистически значимых различий. Контрольные значения: НbA1c 4,0%-6,0%, общий холестерин 3,5-5,0 ммоль/л, креатинин 70-110 моль/л и АЛТ 10-38 МЕ/л.

Измерения проводились с помощью разработанной ранее поляризационно-чувствительной системы ГСВ на дорсальной поверхности стопы, как наиболее репрезентативной для оценки микроциркуляторных изменений при диабете (см. рисунок 2.20). Все исследования проводились в сидячем положении с углом сгибания ноги в коленном суставе 90°. За 2 ч до исследования участники воздерживались от еды, курения и кофеина, чтобы исключить влияние этих факторов на микроциркуляцию крови. Также за 24 часа до исследования исключалось применение местных лекарственных средств. Комнатная температура стабильно поддерживалась на уровне 24-25 °С.



Рисунок 2.20 – Внешний вид портативной поляризационно-чувствительной системы ГСВ и ее расположение на специализированном штативе во время измерений в клинических условиях

В ходе проведенного исследования были получены и тщательно проанализированы гиперспектральные изображения дорсальной поверхности стоп у пациентов с СД и добровольцев контрольной группы. Для каждого участника исследования проводилась комплексная обработка данных, включающая реконструкцию двумерных карт распределения ключевых физиологических параметров BVF , S и PI с учетом содержания меланина и толщины эпидермиса. На рисунке 2.21а,б показана область измерения системы ГСВ с рассчитанными параметрами BVF и S соответственно. Типичные карты распределения рассчитанных параметров для контрольной и диабетической групп представлены на рисунках 2.21в-з.



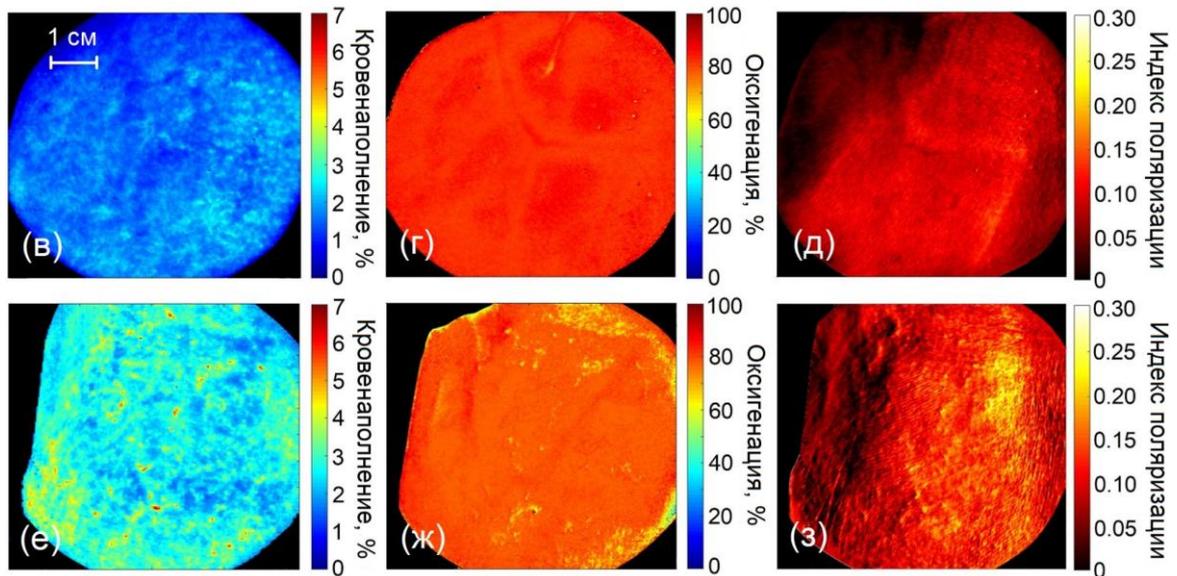


Рисунок 2.21 – Примеры регистрации с помощью ГСВ параметров BVF , S и PI на дорсальной поверхности стопы. (а,б) Область измерения системы ГСВ (8×8 см²) с рассчитанными параметрами (а) BVF (а) и (б) S . Типичные реконструированные карты (в,е) BVF , (г,ж) S и (д,з) PI для контрольной (верхний ряд, в-д) и диабетической (нижний ряд, е-з) групп, соответственно

Все параметры усреднялись по полю зрения системы ГСВ. Экспериментальные исследования показали, что пациенты с диабетом имеют повышенные значения параметров BVF и PI , а также более низкий уровень S (см. рисунок 2.22а). Непараметрический U-критерий Манна-Уитни использовался для подтверждения достоверности различий в результатах. Значения $p < 0,01$ считались значимыми. Корреляция параметров оценивалась с использованием коэффициента корреляции Пирсона.

Результаты расчета параметра BVF показывают, что у больных СД наблюдается повышенное содержание крови, что можно объяснить рядом факторов. При венозном застое, связанном с венозной недостаточностью, характерной для больных диабетом [246], все функционирующие вены становятся шире, а те венозные сосуды, которые ранее не функционировали, открываются. Капилляры также расширяются, в основном в венозных частях. Повышенные значения этого параметра также могут быть объяснены притоком крови к нижним конечностям из-за процессов воспаления и заживления, которые наблюдаются у

пациентов с СД [104]. Для пациентов с СД также необходимо учитывать наличие сложной сердечно-сосудистой патологии и нефропатии, которые могут приводить к колебаниям содержания крови.

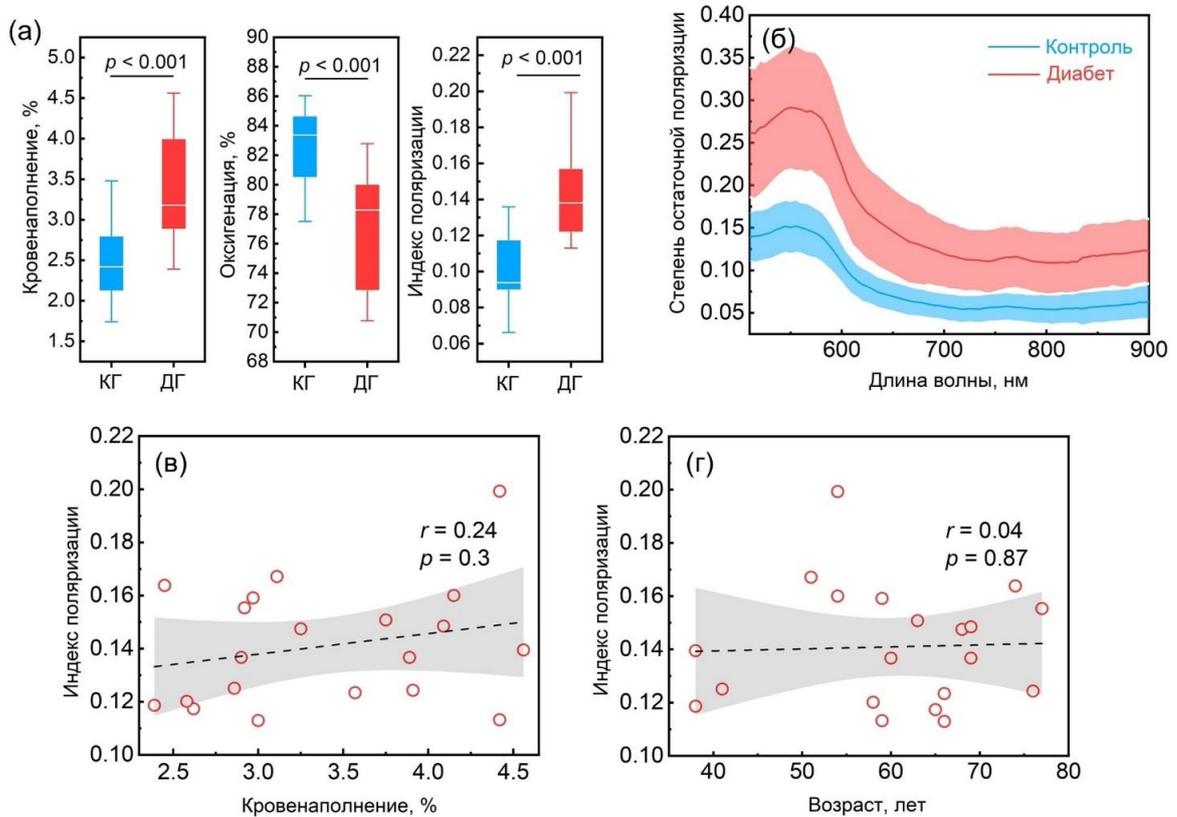


Рисунок 2.22 – Параметры BVF , S и PI имеют статистически значимое различие между контрольной и диабетической группами. (а) Сравнение параметров между контрольной (КГ, синие столбцы) и диабетической (ДГ, красные столбцы) группами. Центральная линия прямоугольника – медиана группы, края – 25-й и 75-й процентиля. (б) Средние спектральные зависимости $DOLP$ (сплошная линия) и стандартного отклонения для двух групп: контрольной (синяя линия) и диабетической (красная линия). Корреляция между (в) PI и BVF и между (г) PI и возрастом для группы пациентов с диабетом (уровень достоверности 95%)

Полученные данные о сниженных значениях тканевой сатурации у пациентов с СД по сравнению с контрольной группой совпадают с данными, полученными ранее в других исследованиях [247–249]. Известно, что гипергликемия может увеличивать потребление кислорода митохондриями, что приводит к клеточной

гипоксии [250,251]. В связи с этим определение содержания крови и насыщения кислородом может быть полезно при исследовании застоя крови, приводящего к отекам и трофическим нарушениям, а также для контроля терапевтических процедур, направленных на заживление трофических язв.

На рисунке 2.22б показаны усредненные спектры *DOLP* для контрольной и диабетической групп с разницей во всем диапазоне длин волн. Следует отметить, что спектральные зависимости *DOLP* отражают наличие крови в кожной ткани (увеличение *DOLP* в спектральных полосах поглощения гемоглобина) [252]. В связи с этим для оценки влияния содержания крови на различие спектров строили зависимость параметра *PI* от *BVF*. Как видно из рисунка 2.22в, между этими параметрами нет статистически значимой корреляции. Возможно, именно наличие СД и связанных с ним изменений кожи влияет на разницу в спектрах *DOLP*.

Учитывая связь диабетических изменений и процессов старения [104,160], можно предположить, что наличие СД, а также старение, снижают потерю поляризации. Кроме того, была проверена взаимосвязь между *PI* и возрастом для диабетической группы. Как видно из рисунка 2.22г, между этими параметрами также нет корреляции. Это подтверждает предположение о том, что наличие СД является основным фактором, влияющим на поляризационные свойства кожи пациентов.

2.7 Классификация клинических данных на основе линейного дискриминантного анализа

Анализируемые параметры (*BVF*, *S* и *PI*) использовались для синтеза решающего правила. Эти параметры удовлетворяют принципам статистической независимости и значимости различий их значений, рассчитанных для групп пациентов и контрольной группы. Был использован метод линейного дискриминантного анализа (ЛДА) для определения дискриминантной функции, позволяющей синтезировать искомое решающее правило, которое позволит вновь появляющийся объект отнести к одному из этих классов на основании значений

измеренных параметров [253–255]. Основная идея заключается в том, чтобы определить, отличаются ли разные совокупности по среднему какой-либо переменной (или линейной комбинации переменных), и затем использовать эту переменную, чтобы предсказать для новых членов их принадлежность к той или иной группе.

Дискриминантная функция в ЛДА имеет общий линейный вид:

$$D = \sum_{i=1}^n a_i x_i + c, \quad (2.29)$$

или для трех переменных ($x_1=BVF$, $x_2=S$ и $x_3=PI$) функция, задающая разделяющую гиперплоскость, будет выглядеть следующим образом:

$$D = a_1 x_1 + a_2 x_2 + a_3 x_3 + c, \quad (2.30)$$

где $A=(a_1, a_2, a_3)$ – вектор коэффициентов дискриминантной функции;
 c – свободный член.

Коэффициенты A вычисляются через обратную совместную ковариационную матрицу S_*^{-1} и разность векторов средних значений переменных в контрольной и диабетической группах:

$$A = S_*^{-1}(\overline{X}_2 - \overline{X}_1). \quad (2.31)$$

Свободный член c для случая с тремя переменными определяется как:

$$c = -A \cdot \frac{1}{2}(\overline{X}_1 + \overline{X}_2)^T. \quad (2.32)$$

Ковариационная матрица S для каждой группы рассчитывается на основе параметров рассеяния и описывает разброс и взаимосвязь переменных. Для каждой группы с тремя переменными она имеет вид:

$$S = \begin{pmatrix} \sigma_1^2 & \rho_{12}\sigma_1\sigma_2 & \rho_{13}\sigma_1\sigma_3 \\ \rho_{12}\sigma_1\sigma_2 & \sigma_2^2 & \rho_{23}\sigma_2\sigma_3 \\ \rho_{13}\sigma_1\sigma_3 & \rho_{23}\sigma_2\sigma_3 & \sigma_3^2 \end{pmatrix}, \quad (2.33)$$

где σ_i – стандартное отклонение, характеризующее разброс значений i -й переменной внутри группы;

ρ_{ij} – коэффициент корреляции, показывающий линейную зависимость между парой переменных.

Совместная ковариационная матрица S^* используется для определения коэффициентов дискриминантной функции и вычисляется как сумма ковариационных матриц обеих групп.

Верификация модели проводилась с помощью *leave-one-out* кросс-валидации, что позволило оценить её устойчивость. Оценка качества дискриминантного анализа была проведена с использованием ROC-кривой и расчетом интегральной характеристики – площади под ROC-кривой (AUC).

В таблице 2.3 приведены чувствительность (Se), специфичность (Sp) и AUC для разных комбинаций измеренных параметров. Чувствительность представляет долю правильно предсказанных истинно положительных значений (TP , в данном случае – класс диабетические осложнения), а специфичность связана с количеством правильно предсказанных истинно отрицательных значений (TN , класс тканей здоровых добровольцев). Для идеального классификатора точность (сумма всех правильно предсказанных классов, нормированная на сумму всех истинных и ложных предсказаний), чувствительность и специфичность должны составлять 100%. Однако из-за наличия ошибочно предсказанных значений (FP – здоровые ткани, классифицированные как диабетические, и FN – диабетические ткани, классифицированные как здоровые) производительность моделей снижается. Как

видно из таблицы, сочетание всех трех параметров обеспечивает наиболее высокие значения чувствительности и специфичности.

Таблица 2.3 – Чувствительность, специфичность и AUC для соответствующего правила классификации

Параметр	<i>BVF, S</i>	<i>BVF, PI</i>	<i>S, PI</i>	<i>BVF, S, PI</i>
Чувствительность	0,85	0,80	0,95	0,95
Специфичность	0,80	0,80	0,80	0,85
AUC	0,94	0,93	0,96	0,97

На рисунке 2.23 показан трехмерный график разброса экспериментальных данных с наложением дискриминантной поверхности (гиперплоскости), которая делит экспериментальные точки на две группы с лучшим сочетанием чувствительности и специфичности. Феноменологический диагностический критерий в виде дискриминантных функций (D) позволяет отнести вновь измеряемый объект к одной из двух групп:

$$D = 8,9 + 0,5BVF - 0,2S + 28,9PI . \quad (2.34)$$

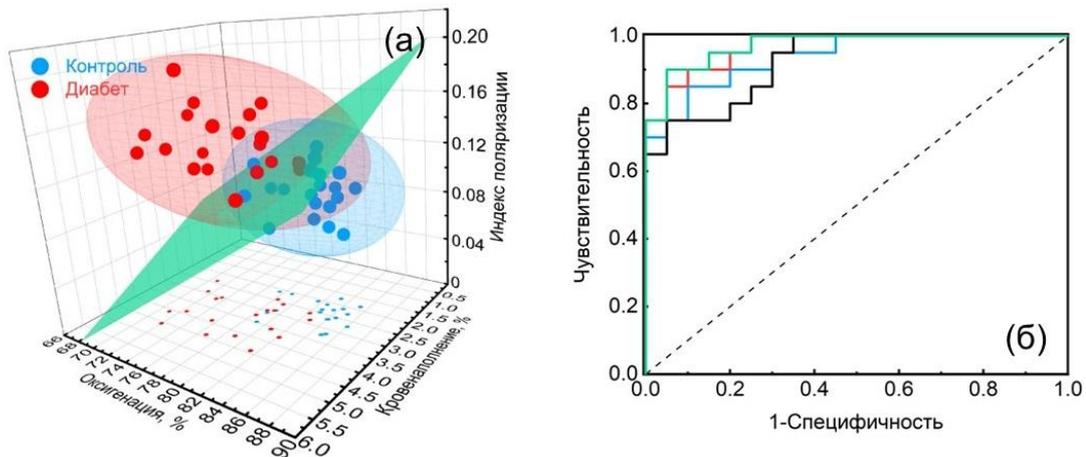


Рисунок 2.23 – (а) Трехмерное распределение значений и поверхность принятия решений для трехмерного ЛДА классификатора. 3D-эллипсоиды – доверительные области (доверительный уровень 95%). (б) ROC-кривые для оценки эффективности классификаторов. Здоровая группа показана синими кругами, диабетическая – красными. Для ROC-анализа: синяя линия обозначает BVF, S , черная линия – BVF, PI , красная линия – S, PI , зеленая линия – BVF, S, PI

Разработанная система ГСВ показала способность обнаруживать изменения содержания крови, оксигенации крови и структуры коллагена в коже человека *in vivo*. Реализация обработки на основе ИНС позволяет быстро определить рассматриваемые параметры кожи. Предложенная концепция была успешно продемонстрирована в клинических исследованиях и удовлетворяет основным требованиям, предъявляемым к современным методам медицинской визуализации, обеспечивая большое поле зрения, высокое спектральное разрешение, получение и обработку данных в режиме реального времени, высокий уровень чувствительности и специфичности.

Это первое клиническое исследование *in vivo* на людях, в котором сообщается о прямом, неинвазивном, чувствительном к поляризации подходе, который позволяет различать кожу пациентов с СД и участников контрольной группы. Было показано, что гиперспектральный анализ, усиленный поляризационными измерениями, может дифференцировать кожную ткань с возрастными изменениями и изменениями вследствие СД. Предполагается, что указанные различия в параметре PI , характеризующем возрастные изменения коллагена, могут лечь в основу диагностики осложнений СД. Прогнозирование развития трофических язв также может основываться на обнаружении изменений в структуре коллагена. Таким образом, гиперспектральная поляризационная визуализация, в отличие от стандартного подхода с регистрацией отраженного света, позволяет проводить более подробный анализ тканей, включая выборочное отслеживание изменений концентрации различных поглотителей и рассеивателей в биоткани.

Тем не менее, для будущего клинического применения данную технологию возможно улучшить. Разработанный алгоритм обработки данных позволяет обрабатывать гиперспектральные изображения практически в реальном времени, однако время получения гиперкуба и длительность передачи данных через USB-порт накладывают основное ограничение на производительность системы. Гиперспектральный сенсор с определенным спектральным разрешением и диапазоном длин волн можно гибко оптимизировать в соответствии с

требованиями приложения. В данном исследовании использовалась спектральная полоса 510-900 нм. Однако применение сенсора с расширенным спектральным диапазоном до 1000 нм может предоставить дополнительную возможность анализа содержания других хромофоров в тканях, например, воды и жира. Кроме того, использование источников УФ или синего света в канале освещения позволит использовать метод гиперспектральной визуализации для флуоресцентного анализа КПП, а также коферментов дыхательной цепи НАДН и ФАД [20,256]. Существует также дополнительный потенциал для увеличения числа клинических исследований, которые в итоге позволят внедрить рассматриваемые методы в практику лечащего врача.

Таким образом, была разработана компактная система гиперспектральной визуализации, использующая подход к обработке данных на основе ИНС для расчета карт распределения содержания крови в коже, оксигенации крови и индекса поляризации отраженного излучения. Предлагаемая система способна обрабатывать гиперспектральные изображения практически в режиме реального времени. Использование чувствительных к поляризации гиперспектральных изображений и параметров BVF , S и PI в комбинации или по отдельности может иметь важные клинические применения, поскольку они могут помочь идентифицировать пациентов с различной степенью нарушений микроциркуляции крови и метаболизма в нижних конечностях. Предложенные параметры могут служить биомаркерами диабетических осложнений. Их также можно использовать для оценки терапевтических процедур, направленных на предотвращение или устранение диабетических осложнений.

Использование параметра PI увеличивает чувствительность и специфичность метода до уровня 95% и 85% соответственно по сравнению с подходом, основанным на анализе только BVF и S (чувствительность 85%, специфичность 80%). Представленные результаты могут способствовать развитию техники гиперспектральной визуализации и дать новое направление в исследованиях возрастных заболеваний [220,222,244,257,258].

2.8 Направления дальнейшего развития

Проведенные исследования по оценке микроциркуляторных нарушений при СД с помощью ГСВ демонстрируют универсальность и высокий потенциал данного метода, что подтвердил ряд дальнейших пилотных исследований.

Примером применения разработанного подхода может являться исследование инфантильных гемангиом. Они являются наиболее распространенными сосудистыми доброкачественными опухолями в педиатрии, поражая около 5-10% детей в возрасте до 6 месяцев [259]. Примерно 12% диагностированных детских гемангиом требуют длительной терапии [260]. Прогрессирование таких гемангиом обычно исследуется относительно субъективными методами, основанными на визуальной аналоговой шкале и просмотре сделанных фотографий [261]. Измерения очагов, проведенные таким образом, и их последующая оценка могут быть неточными, поскольку они в значительной степени зависят от субъективного мнения врача. Отсутствие объективного инструмента для оценки гемангиом затрудняет решение о правильном курсе лечения поражения и сравнение эффективности различных методов лечения. Отсюда следует, что задача поиска и разработки нового неинвазивного метода измерения областей гемангиом является важной и актуальной.

Согласно предположению, что на появление гемангиом влияет гипоксический стресс локальных тканей, анализ оксигенации путем детекции диффузно отраженного излучения может быть использован при оценке эффективности лечения этого заболевания. С помощью разработанного гиперспектрального подхода и нейросетевой обработки данных были изучены инфантильные гемангиомы у двух детей в возрасте до 6 месяцев с различной локализацией новообразований (в височной и абдоминальной областях).

В данном исследовании в качестве гиперспектрального сенсора была использована гиперспектральная камера SpecimIQ (Specim, Spectral Imaging Ltd., Финляндия), которая обеспечивает спектральное разрешение 7 нм в общем

диапазоне от 400 до 1000 нм. Блок широкополосного освещения был основан на кольцевом волоконно-оптическом осветителе FRI61F50 (ThorLabs, США) и источнике излучения OSL2 (ThorLabs, США), обеспечивающем равномерное распределение интенсивности света в фокальной плоскости камеры со средней облученностью 50 мВт/см^2 в поле зрения камеры. Система была установлена на усиленный штатив.

На рисунке 2.24 представлены усредненные нормированные спектры диффузного отражения для области гемангиомы и интактной здоровой ткани. Выявленная разница в форме спектров отражения указывает на изменение оптических свойств очага гемангиомы по сравнению с интактной тканью, что позволяет проводить дальнейшую математическую обработку результатов.

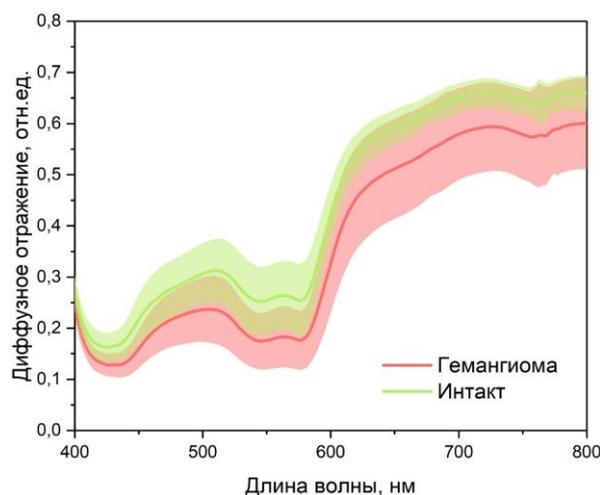


Рисунок 2.24 – Усредненные нормированные спектры диффузного отражения для гемангиомы и интактной здоровой ткани

Ранее разработанный алгоритм нейросетевой обработки (см. раздел 2.2.2) был адаптирован для новой технической реализации. Были рассчитаны двумерные карты объемной доли крови и оксигенации. Результаты, показанные на рисунке 2.25, включают усредненные значения объемной доли крови (рисунок 2.25а) и оксигенации (рисунок 2.25б) для опухолевой и интактной областей здоровых тканей.

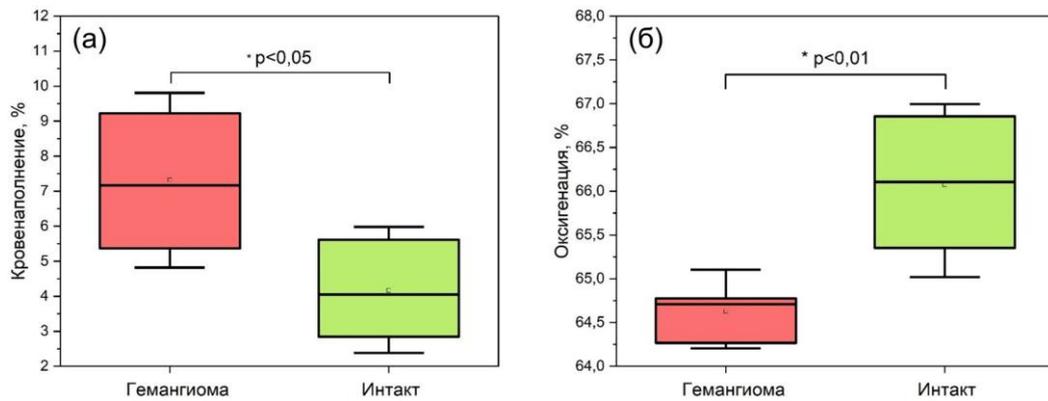


Рисунок 2.25 – (а) Расчетная объемная доля крови и (б) оксигенация для гемангиомы и интактной здоровой ткани

Известно, что ткань гемангиомы перенасыщена кровеносными сосудами [259] и похожа на плаценту, что подтверждается обнаруженным увеличением объемной доли крови в области гемангиомы по сравнению с интактной тканью (рисунок. 2.25а, $p < 0,005$). Также предполагается, что рост гемангиомы происходит, когда ткани и кровеносные сосуды получают недостаточно кислорода. Таким образом, выявленное снижение оксигенации в области гемангиом по сравнению с нормальными значениями в интактной ткани [262] (рисунок 2.25б, $p < 0,001$) указывает на возможность использования разработанной диагностической системы. Однако при изъязвлении в области гемангиом может наблюдаться увеличение насыщения кислородом, связанное с артериопортальными шунтами [263]. Из этого можно заключить, что правильная интерпретация мониторинга гемангиом зависит от многих факторов, включая стадию роста опухоли, а наличие инструмента в виде ГСВ может стать надежным диагностическим инструментом для данного класса задач.

Одним из интересных, клинически значимых и перспективных направлений для внедрения ГСВ также является интраоперационная оценка жизнеспособности стенки кишечника [264,265]. Проблема острой мезентериальной ишемии, несмотря на низкую распространенность (0,09-0,2% госпитализаций), остается критической в хирургической практике с чрезвычайно высокой летальности, достигающей 80%.

Традиционный визуальный метод оценки по Керте, основанный на субъективном определении цвета, перистальтики и пульсации сосудов, не

предоставляет объективных количественных данных и зачастую недостаточен для точного определения границ резекции. ГСВ, в свою очередь, как было показано выше, позволяет неинвазивно, в режиме реального времени и без контрастирования количественно оценить ключевой параметр – уровень тканевой оксигенации.

Потенциал ГСВ для подобной задачи был оценен в экспериментальных исследованиях с моделированием ишемии кишечника лабораторных крыс.

Эксперимент был проведен на шести лабораторных крысах линии Вистар (самцы). Животным было 3 месяца, средний вес составлял 194 ± 6 г. Работа выполнялась в соответствии с правилами Надлежащей лабораторной практики (GLP). Все выполняемые манипуляции были одобрены этическим комитетом Орловской областной клинической больницы (Протокол № 2 от 18.09.23). Животные содержались в карантинных условиях с контролем температуры, влажности и чистоты. Был разработан и использовался для всех животных единый протокол исследования. Рассматривалась модель кишечной ишемии, вызванной наложением лигатур и, как следствие, нарушением мезентериального кровотока. Хирургическое вмешательство выполнялось с использованием ингаляционного наркоза на основе 1,5% изофлурана в стандартных дозах.

Описанная выше система на основе гиперспектральной камеры SpecimIQ была использована для мониторинга состояния кишечника.

После применения наркоза животное помещалось на специальную фиксирующую платформу и операционное поле подготавливалось путем выбривания участка передней брюшной стенки и обработки его антисептическими растворами. В качестве операционного доступа использовалась срединная лапаротомия. Тонкая кишка была осторожно экстериоризирована из брюшной полости. Основное кровоснабжение кишки было приостановлено с использованием капроновых нитей 3-0. После наложения лигатуры кишка возвращалась в брюшную полость. Разрез лапаротомии ушивался полипропиленовой нитью 2-0.

Для определения пограничных состояний кишечника и его патологических изменений при моделировании ишемии помимо оптических измерений

проводилось морфологическое исследование в различные временные интервалы после наложения лигатуры: через 1, 6 и 12 ч.

В результате экспериментальных исследований были получены массивы гиперспектральных изображений тонкой кишки для каждого временного интервала ишемии. Для нормализации измеренных данных записывались спектры от стандарта диффузного отражения для каждого измерения. Стандарт диффузного отражения представлял собой пластину из фторопласта F4 с коэффициентом отражения 98%.

После визуального определения внешних симптомов ишемии и некроза стенки кишечника выполнялась резекция тонкой кишки с последующей фиксацией в 10% забуференном формалине в течение суток. Вырезались репрезентативные участки кишки, которые впоследствии гистологически обрабатывались по стандартной методике (с использованием гистологического процессора Milestone Medical LOGOS) и изготавливались парафиновые блоки. Срезы толщиной 4 мкм получали на ротационном микротоме Leica RM2125 RTS (Leica Biosystems, Германия) и окрашивали гематоксилином и эозином. Оценивались патоморфологические изменения в стенке кишечника в условиях моделированной ишемии тонкой кишки разной продолжительности. Выраженность морфологической картины ишемии оценивали по классификации Park/Chiu. Исследования завершались выведением животных из эксперимента согласно протоколу, утвержденному этическим комитетом

Ключевым этапом анализа являлась количественная оценка уровня насыщения тканей кислородом с использованием двухволнового алгоритма, основанного на различии коэффициентов поглощения оксигенированной и деоксигенированной форм гемоглобина в ближнем инфракрасном диапазоне (750 нм и 795 нм). Расчет производился пиксель за пикселем по формуле [126,266–268]:

$$SO_2 = \frac{\mu_{Hb}(\lambda_1) - \mu_{Hb}(\lambda_2) \cdot \frac{R(\lambda_2)}{R(\lambda_1)}}{\mu_{Hb}(\lambda_1) - \mu_{HbO_2}(\lambda_1)}, \quad (2.35)$$

где $R(\lambda)$ – измеренный коэффициент диффузного отражения на выбранной длине волны;

μ_{Hb} и μ_{HbO_2} – коэффициенты поглощения дезоксигенированной и насыщенной кислородом крови соответственно;

λ_1 и λ_2 – длины волн неизобестической и изобестической точек соответственно.

Данный подход позволил построить двумерные карты оксигенации, визуализирующие пространственное распределение ишемии (рисунок 2.26). Результаты показали прогрессивное снижение оксигенации от $66 \pm 2\%$ в интактной ткани до $21 \pm 3\%$ через 12 часов ишемии, что коррелировало с данными гистологического анализа.

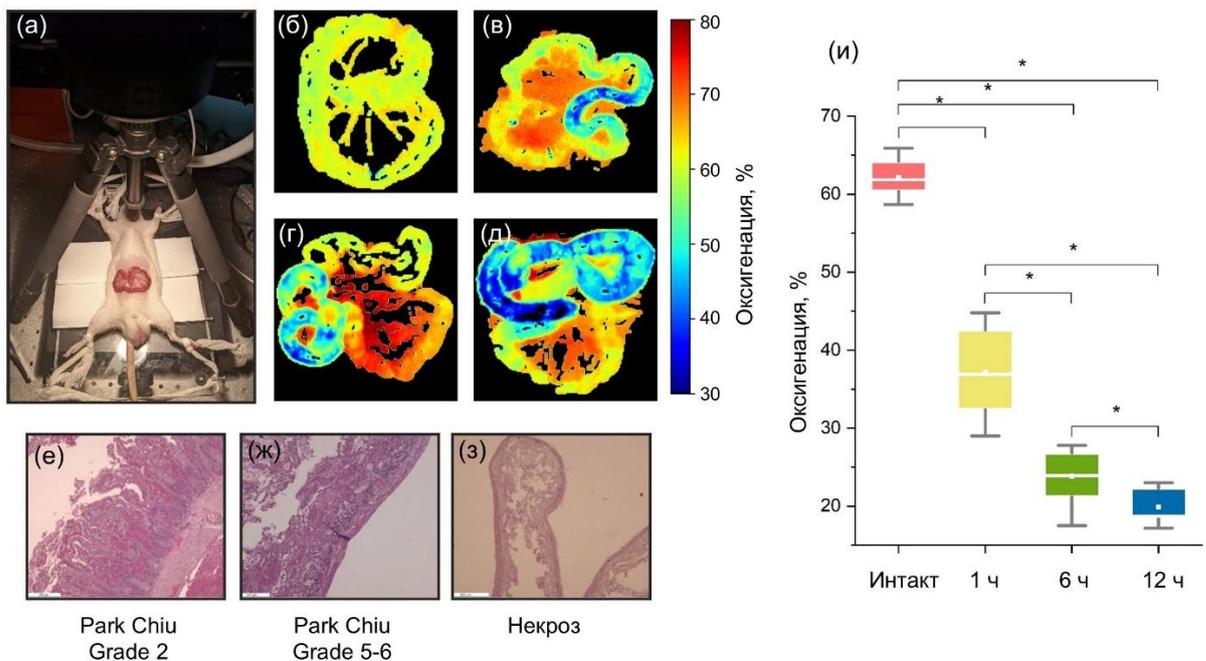


Рисунок 2.26 – (а) Фотография эксперимента по моделированию ишемии кишечной стенки. Двумерные карты оксигенации тканей во время ишемии: (б) интактная ткань кишечника; (в) через 1 час после начала ишемии; (г) через 6 часов после начала ишемии и (д) через 12 часов после начала ишемии. Соответствующие результаты гистологического анализа для (е) 1 часа после ишемии, (ж) 6 часов после ишемии и (з) 12 часов после ишемии. (и) Диаграммы размаха со значениями оксигенации со статистически значимым уровнем различий (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$)

Для автоматической классификации состояний ткани был применен комплексный подход машинного обучения (см. рисунок 2.27).

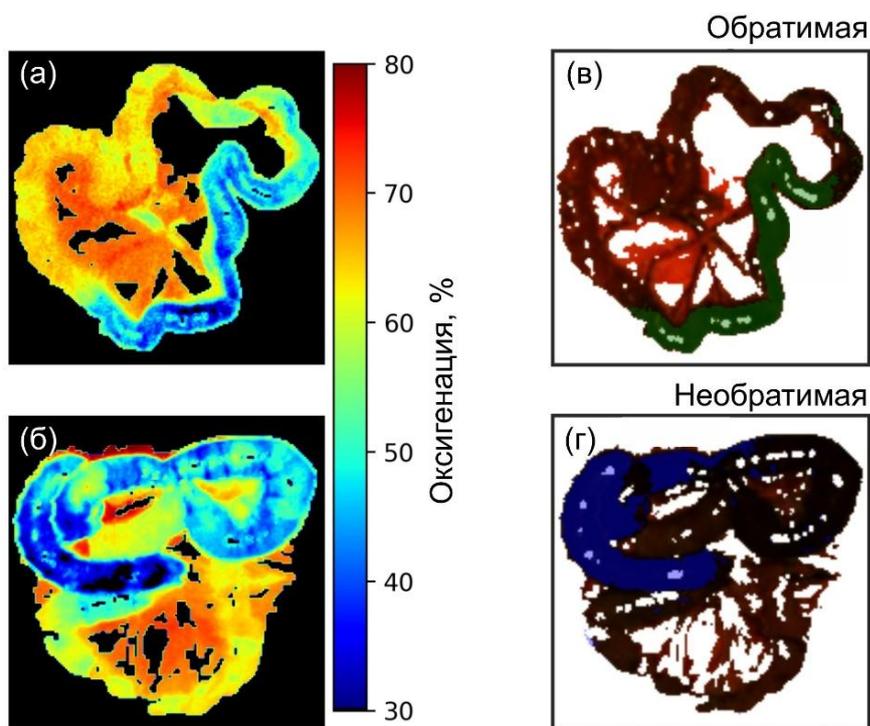


Рисунок 2.27 – (а) Двумерные карты оксигенации тканей для возможно обратимой ишемии, (б) для необратимой ишемии; классификационные карты (в) для возможно обратимой ишемии, (г) для необратимой ишемии

После предобработки данных (нормализации, удаления фона, сглаживания фильтром Савицкого-Голея) и их разметки согласно гистологической классификации Park/Chiu на три класса (интактная, обратимая и необратимая ишемия) проводилось выделение информативных признаков. Сравнение трех подходов – использование всего спектрального диапазона (450-950 нм), ключевых зон поглощения гемоглобина (520-620 нм и 700-860 нм) и использование метода главных компонент (РСА) – показало преимущество последнего. РСА позволил сократить размерность данных до 7 компонент (при сохранении 99% дисперсии), устранив шум и избыточность, при этом первая компонента содержала 88% информации. На основе отобранных признаков осуществлялось обучение алгоритма XGBoost с подбором гиперпараметров и кросс-валидацией. Модель

продемонстрировала высокую точность классификации: точность 98%, чувствительность 98%, специфичность 94% для интактной ткани; 95%, 95%, 96% для обратимой ишемии; 97%, 97%, 97% для необратимой ишемии, соответственно. Полученные карты классификации визуально соответствовали распределению оксигенации (см. рисунок 2.27), но обеспечивали более точное выделение зон необратимого повреждения и потенциальных границ резекции, что подтверждает целесообразность интеграции машинного обучения в систему поддержки принятия клинических решений.

Также было продемонстрировано, что разработанный метод ГСВ может быть эффективно использован в качестве контрольного инструмента для исследования влияния различных химических агентов на тканевой метаболизм и микроциркуляцию. В частности, методика позволила объективно оценивать *in vivo* эффекты воздействия биологически активных соединений, таких как полифосфат-65 (PolyP65) [269–273], на параметры оксигенации тканей в динамике.

Так, был проведен эксперимент по изучению влияния полифосфата-65 на процессы заживления кожных ран *in vivo*. Основной целью исследования являлась комплексная оценка воздействия данного соединения на скорость регенерации, параметры микроциркуляции, уровень оксигенации тканей и метаболические показатели в динамике.

Для достижения поставленных задач был применен мультимодальный диагностический подход с использованием современных методов оптической биомедицинской визуализации. ГСВ заняла ключевое место в исследовании, предоставив уникальную возможность неинвазивного мониторинга насыщения тканей кислородом на основе анализа спектральных характеристик гемоглобина. Метод позволил получать двумерные карты оксигенации с пространственным разрешением, необходимым для выявления локальных изменений в перифокальной зоне раны. Анализ спектральных данных осуществлялся с использованием алгоритма, основанного на различии коэффициентов поглощения окси- и дезоксигемоглобина, описанного ранее (см. формулу 2.35).

В эксперименте на лабораторных животных моделировались стандартизированные кожные раны диаметром 4 мм. На правую сторону наносился 1 мМ раствор полифосфата-65, левая сторона обрабатывалась контрольным раствором NaCl. Ежедневный мониторинг включал регистрацию всех изучаемых параметров с последующей статистической обработкой данных.

Предварительные результаты продемонстрировали выраженное положительное влияние полифосфата-65 на процессы заживления. Так, отмечено ускорение начальных стадий заживления по сравнению с контрольной группой. Также в первые дни наблюдалось повышение микроциркуляции и более стабильные показатели насыщения тканей кислородом (см. рисунок 2.28).

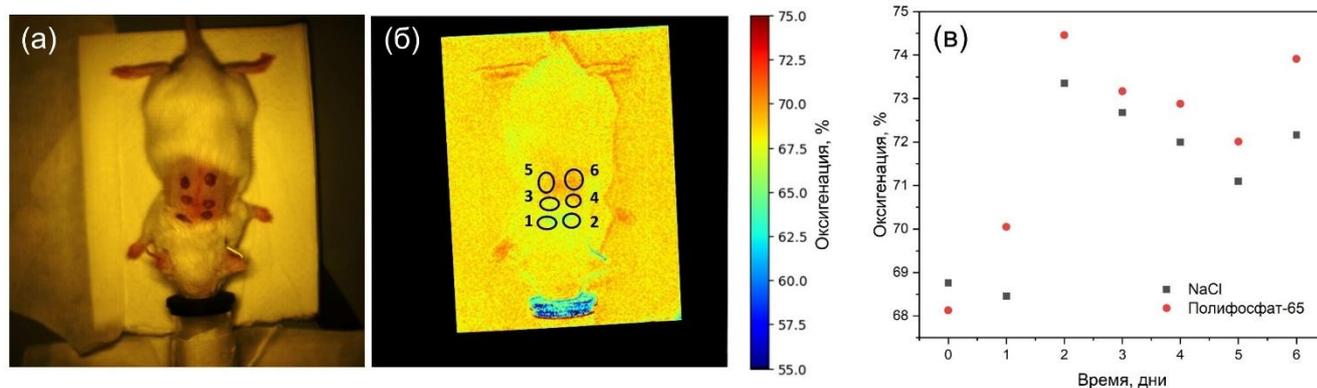


Рисунок 2.28 – (а) Моделирование ран лабораторного животного; (б) карта распределения оксигенации в области ран; (в) зависимость оксигенации от времени заживления (неопубликованное)

Применение современных методов оптической диагностики, в частности ГСВ, доказало свою эффективность для объективной количественной оценки динамики регенеративных процессов, что делает данный подход перспективным для доклинических исследований ранозаживляющих свойств новых фармакологических препаратов и биосовместимых материалов, обеспечивая точный мониторинг изменений тканевого метаболизма в ответ на применяемые воздействия.

2.9 Выводы по главе 2

В данной главе представлен инновационный метод поляризационно-чувствительной гиперспектральной визуализации, направленный на неинвазивную диагностику параметров оксигенации и кровенаполнения биологических тканей, что особенно актуально для выявления осложнений СД. Разработанный подход объединяет преимущества ГСВ, нейросетевой обработки данных и поляризационного анализа, что позволяет преодолеть ограничения традиционных методов и повысить точность диагностики. Также в данной главе диссертации представлены разработанные численные модели, основанные на методе МК, которые позволяют детально исследовать распространение оптического излучения в мутных рассеивающих средах, таких как биологические ткани.

Основные результаты и выводы главы:

1. Создана компактная портативная система ГСВ, оснащенная поляризационными модулями, что позволяет регистрировать не только спектральные, но и поляризационные характеристики отраженного света. Система обеспечивает высокое пространственное и спектральное разрешение, а также возможность обработки данных в режиме, близком к реальному времени.

2. Реализован алгоритм обработки гиперспектральных данных на основе ИНС, который позволяет быстро и точно реконструировать карты распределения ключевых параметров кожи, таких как объемная доля крови (BVF), насыщение кислородом (S), толщина эпидермиса и содержание меланина. Среднее время обработки одного измерения составляет около 3 с, что делает метод пригодным для клинического применения.

3. Метод МК был адаптирован для создания обширной базы данных для обучения искусственных нейронных сетей. Метод МК был использован для генерации спектров диффузного отражения, которые стали основой для обучения ИНС. Это позволило создать универсальный инструмент для обработки гиперспектральных данных в реальном времени, что особенно важно для задач диагностики и анализа биотканей.

4. Проведено исследование глубины проникновения света в биологические ткани для различных длин волн системы гиперспектральной визуализации. Результаты показали, что глубина зондирования варьируется от 1 мм в видимой области спектра до 2,5-3 мм в ближней инфракрасной области, что определяет чувствительность системы к изменениям в разных слоях кожи.

5. Проведены *in vivo* измерения на условно-здоровых добровольцах и пациентах с СД, подтвердившие способность системы выявлять изменения микроциркуляции крови и оксигенации тканей. Установлено, что у пациентов с СД наблюдаются повышенные значения BVF и индекса поляризации (PI), а также сниженный уровень S , что коррелирует с наличием диабетических осложнений.

6. Показано, что параметр PI чувствителен к структурным изменениям коллагена, связанным как с возрастом, так и с диабетическими осложнениями. Обнаружено, что PI не коррелирует с кровенаполнением, что указывает на его независимость от параметров микроциркуляции крови и делает его ценным биомаркером для оценки состояния кожи.

7. С помощью метода МК оценен вклад рассеяния и поглощения в изменение $DOLP$. Установлено, что рассеяние оказывает более значительное влияние на $DOLP$, чем поглощение, особенно в спектральном диапазоне 500-600 нм. Наибольшая чувствительность к изменениям структуры ткани наблюдается в субдиффузионном режиме. Результаты подтвердили, что поляризационные методы чувствительны к структурным изменениям тканей, таким как перестройка коллагеновых волокон.

8. На основе линейного дискриминантного анализа разработано решающее правило, позволяющее с высокой точностью (чувствительность 95%, специфичность 85%) дифференцировать пациентов с СД и здоровых добровольцев. Комбинация параметров BVF , S и PI обеспечивает наилучшие результаты, что подчеркивает важность комплексного подхода в диагностике.

9. Для повышения эффективности метода предложено расширение спектрального диапазона системы ГСВ, включение УФ- и синего света для флуоресцентного анализа.

ГЛАВА 3. МЕТОД И УСТРОЙСТВО СТОКС-ПОЛЯРИЗАЦИОННОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

Результаты 2-й главы продемонстрировали большие перспективы применения поляризационного анализа для определения структурных и морфологических изменений свойств биотканей, однако он был ограничен измерением только линейной поляризации, что послужило основой для разработки системы для регистрации полного вектора Стокса ($\mathbf{S} = (S_0, S_1, S_2, S_3) = (I, Q, U, V)$), которая была применена для дифференциации онкологических образцов.

Визуализация с использованием поляризованного света может предоставить богатую информацию о микроструктуре образцов благодаря высокой чувствительности изменений поляризации и фазы к внутреннему строению и составу исследуемой среды [168,252,274]. Одним из наиболее перспективных применений этого метода в биомедицине является оценка патологических метаболических изменений в биологических тканях, поскольку многие заболевания, включая онкологию, болезнь Альцгеймера, воспаления, аутоиммунные и инфекционные заболевания, связаны с изменениями микроструктуры [274–277]. В современной медицинской практике решения о лечении и прогнозы для пациентов с такими патологиями во многом основываются на гистологических исследованиях хирургически удаленных образцов тканей. Однако золотой стандарт анализа тканей, представленный традиционной гистопатологической процедурой с использованием микроскопии срезов, является трудоемким и включает несколько этапов подготовки образца (рисунок 3.1) [278,279]: фиксацию в формалине, этаноле и других веществах; обезвоживание и заливку в парафин или целлоидин; разрезание с помощью микротомы или вибротомы; размещение на стеклянных предметных стеклах; окрашивание гематоксилином, эозином и другими красителями; и, наконец, микроскопическое исследование квалифицированным гистологом. В большинстве случаев подготовка гистологических образцов и последующий анализ могут занимать от нескольких дней до нескольких недель. Такие сроки исследования приводят к длительному

ожиданию результатов и, следовательно, к потере времени, когда своевременное адекватное лечение необходимо. Традиционный подход сильно зависит от навыков и квалификации патолога, проводящего исследование. Кроме того, двумерное сечение срезов, доступное патологу, может вводить в заблуждение при изучении сложных структур, таких как железы и кровеносные сосуды. Ручной поиск редко расположенных патологических областей (например, редких агрессивных раковых клеток, способных к метастазированию) среди большого количества гистологических срезов также является сложной задачей. Несмотря на лучшие лабораторные практики, уровень окончательного диагноза при гистологическом анализе для ряда видов рака составляет всего 65-75%.

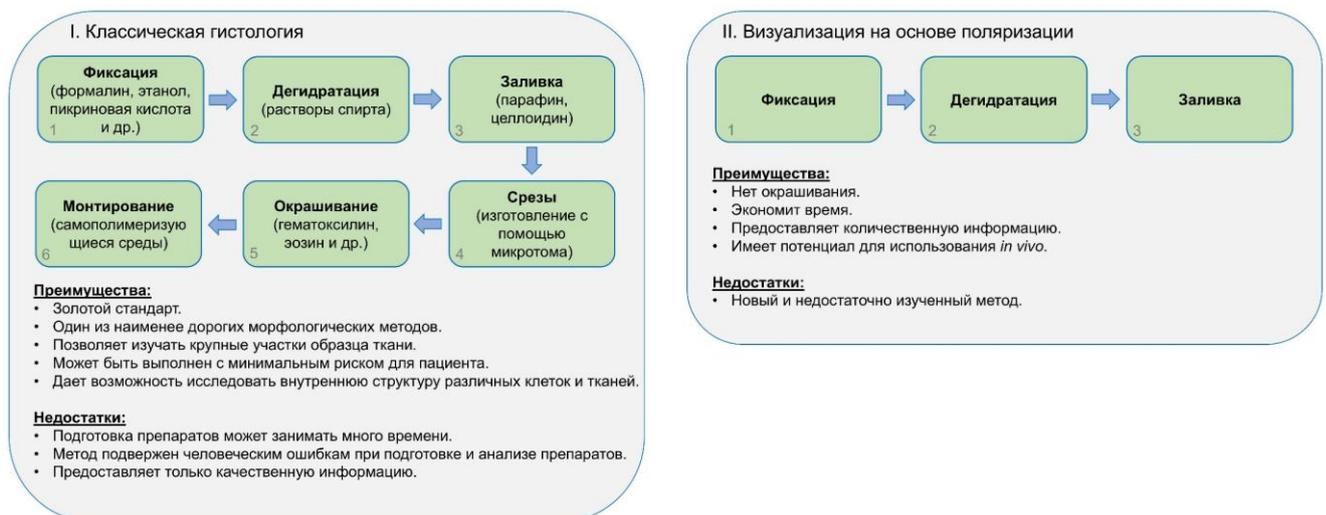


Рисунок 3.1 – Сравнение классической гистологии с потенциалом поляризационной визуализации

Таким образом, традиционный метод страдает от высокой степени вариабельности между наблюдателями, возможных ограничений выборки и неспособности визуализировать компоненты тканей в их естественной трехмерной среде. Все эти проблемы снижают прогностическую ценность метода. Новая технология для цифровой гистопатологической визуализации без срезов, окрашивания и разрушения образцов крайне необходима, и поляризационная визуализация может стать именно таким методом.

3.1 Основы поляриметрии

Поляризация определяется характером изменения вектора напряженности электрического поля световой волны в зависимости от времени в фиксированной точке пространства. Для плоской поляризованной монохроматической электромагнитной волны, распространяющейся в направлении z , электрическое поле может быть описано в момент времени t и в точке с координатами x, y следующим образом [280,281]:

$$E_x(z, t) = E_{0x} \cos(kz - \omega t + \delta_x), \quad (3.1)$$

$$E_y(z, t) = E_{0y} \cos(kz - \omega t + \delta_y), \quad (3.2)$$

где E_0 обозначает амплитуду;

$\omega = d\varphi/dt$ – угловая частота;

$k = 2\pi n/\lambda$ – волновое число для показателя преломления n ;

δ – фаза.

Если электрический вектор колеблется в одной фиксированной плоскости вдоль всего пучка, свет называют линейно поляризованным. Если же плоскость электрического поля вращается, свет называют эллиптически поляризованным или циркулярно поляризованным в случае, если эллипс оказывается окружностью [168].

Свет произвольной поляризации можно представить с помощью четырех чисел, известных как параметры Стокса – I , Q , U и V . I относится к интенсивности света, а параметры Q , U и V представляют меру горизонтальной линейной, линейной под углом 45° и круговой поляризации соответственно. В поляриметрии вектор Стокса \mathbf{S} светового пучка строится на основании шести измерений светового потока, полученных при различных анализаторах, расположенных перед детектором:

$$\mathbf{S} = \begin{pmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} E_{0x}^2 + E_{0y}^2 \\ E_{0x}^2 - E_{0y}^2 \\ 2E_{0x}E_{0y} \cos \delta \\ 2E_{0x}E_{0y} \sin \delta \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} I \\ Q \\ U \\ V \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} I_H + I_V \\ I_H - I_V \\ I_{+45^\circ} - I_{-45^\circ} \\ I_R - I_L \end{pmatrix}, \quad (3.3)$$

где I_H , I_V , I_{+45° , I_{-45° , I_R и I_L – интенсивности света, измеренные с помощью горизонтального линейного поляризатора, вертикального линейного поляризатора, линейного поляризатора, повернутого на угол $+45^\circ$, линейного поляризатора, повернутого на угол -45° , правовращающегося кругового анализатора и левовращающегося кругового анализатора соответственно.

На основании вектора Стокса можно определить общую степень поляризации DOP , степень линейной поляризации ($DOLP$) и степень круговой поляризации ($DOCP$):

$$DOP = \frac{\sqrt{Q^2 + U^2 + V^2}}{I}, \quad (3.4)$$

$$DOLP = \frac{\sqrt{Q^2 + U^2}}{I}, \quad (3.5)$$

$$DOCP = \frac{\sqrt{V^2}}{I}. \quad (3.6)$$

Если поляризация света остается равной единице после преобразования оптической системой, то система является недеполяризующей, в противном случае – деполяризующей.

Матрица рассеяния или матрица Мюллера M исследуемого образца преобразует вектор Стокса падающего света S_{in} в соответствующий вектор Стокса на выходе S_{out} :

$$\mathbf{S}_{out} = \mathbf{M} \times \mathbf{S}_{in}, \quad (3.7)$$

где \mathbf{M} – нормированная 4×4 -матрица рассеяния:

$$\mathbf{M} = \begin{bmatrix} M_{11} & M_{12} & M_{13} & M_{14} \\ M_{21} & M_{22} & M_{23} & M_{24} \\ M_{31} & M_{32} & M_{33} & M_{34} \\ M_{41} & M_{42} & M_{43} & M_{44} \end{bmatrix}. \quad (3.8)$$

Матрицу Мюллера можно получить экспериментально из измерений с различными комбинациями поляризаторов для источника и анализаторов для детектора. В наиболее общем случае 4×4 -матрица Мюллера имеет 16 независимых элементов, поэтому по крайней мере 16 независимых измерений необходимы для ее полного определения.

Элементы матрицы Мюллера зависят от угла рассеяния, длины волны и геометрических и оптических параметров рассеивающих частиц. M_{11} – это величина, которая измеряется, когда падающий свет не поляризован, ее зависимость от угла рассеяния есть фазовая функция рассеяния света. M_{12} характеризует степень линейной поляризации рассеянного света; M_{22} показывает долю деполаризованного света в полном рассеянном излучении; M_{34} характеризует преобразование падающего света, поляризованного под наклоном в 45° , в рассеянный свет круговой поляризации; разность между M_{33} и M_{44} – хорошая мера несферичности рассеивающих частиц [168,252].

Понятие эллипса поляризации полезно для описания различных состояний поляризации света с $DOP=1$. Однако, это представление не подходит для мутных сред, где $DOP < 1$. Поэтому более удобным является использование представления сферы Пуанкаре (рисунок 3.2). Для этого сначала необходимо преобразовать декартовы координаты параметров Стокса в сферические координаты:

$$\mathbf{S} = I(1, \mathbf{p})^T, \quad (3.9)$$

$$\mathbf{p} = DOP\mathbf{u}, \quad (3.10)$$

$$\mathbf{u} = [\cos(2\theta) \cos(2\varepsilon), \sin(2\theta) \cos(2\varepsilon), \sin(2\varepsilon)], \quad (3.11)$$

где \mathbf{p} и \mathbf{u} – векторы поляризации и Пуанкаре соответственно;

$\theta \in [-\pi/2; \pi/2]$ и $\varepsilon \in [-\pi/4; \pi/4]$ обозначают азимутальный угол и угол эллиптичности. Через параметры Стокса эти углы выражаются как:

$$\theta = \frac{1}{2} \arctan\left(\frac{S_2}{S_1}\right), \quad (3.12)$$

$$\varepsilon = \frac{1}{2} \arcsin\left(\frac{S_3}{S_0}\right). \quad (3.13)$$

Каждая точка на поверхности сферы Пуанкаре соответствует состоянию поляризации с $DOP=1$. Внутри сферы $DOP<1$, а в центре $DOP=0$.

Основные характеристики сферы Пуанкаре: (1) все линейные состояния поляризации располагаются строго на экваторе сферы; (2) два круговых состояния поляризации (правое и левое) находятся на полюсах сферы; (3) все остальные точки сферы соответствуют состояниям эллиптической поляризации; (4) верхняя полусфера включает в себя все состояния с положительной эллиптичностью ($\varepsilon>0$), тогда как нижняя полусфера содержит состояния с отрицательной эллиптичностью ($\varepsilon<0$); (5) любые две антиподальные точки (диаметрально противоположные) на поверхности сферы соответствуют взаимно ортогональным состояниям поляризации.

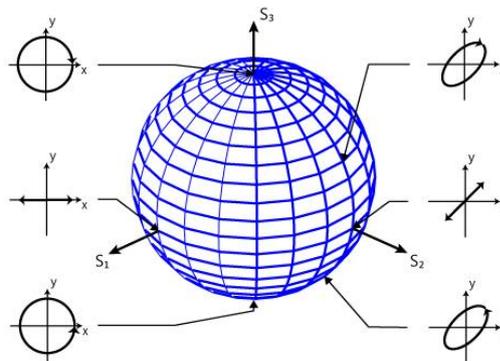


Рисунок 3.2 – Изображение поляризации на сфере Пуанкаре через параметры Стокса [282]

Таким образом, сфера Пуанкаре предоставляет удобный инструмент для визуализации и анализа состояний поляризации, особенно в случаях, когда степень поляризации меньше единицы, что характерно для биологических тканей и других мутных сред [282,283].

Декомпозиция матриц Мюллера также является распространенным подходом для анализа поляриметрических измерений и преобразует исходные «сырые» поляриметрические данные в диагностически значимые параметры. Подробнее этот аспект будет рассмотрен ниже в данной главе.

3.2 Разработка Стокс-поляризационной системы визуализации

В диссертационной работе была разработана оригинальная сканирующая система Стокс-поляризационной визуализации (рисунок 3.3) [284,285]. В осветительном канале использовалось излучение суперконтинуумного волоконного лазера (Leukos Ltd., Франция). Длина волны зондирования выбиралась с помощью высокоскоростного акустооптического перестраиваемого фильтра (Leukos Ltd., Франция) в диапазоне 450-650 нм, что также позволяет реализовывать мультиспектральные и гиперспектральные измерения. Линейно поляризованный свет с выхода фильтра изменялся четвертьволновой пластиной в состояние правосторонней циркулярной (круговой) поляризации и фокусировался на поверхность образца с помощью 45 мм линзы L_1 под углом 55° .

Состояние поляризации света, диффузно отраженного от образца, регистрировалось под углом 30° на переменном расстоянии d_{SD} от точки падения с помощью $20\times$ (или $100\times$ по выбору) апохроматического объектива с коррекцией на бесконечность (MY20X-804 или MY100X-806, Thorlabs, США). Используя стандартную схему пространственной фильтрации, включающую два дублета L_2 , L_3 и пинхол 100 мкм, исключались любые фотоны, находящиеся вне фокуса, что улучшало разделение между различными областями ткани во время измерений.

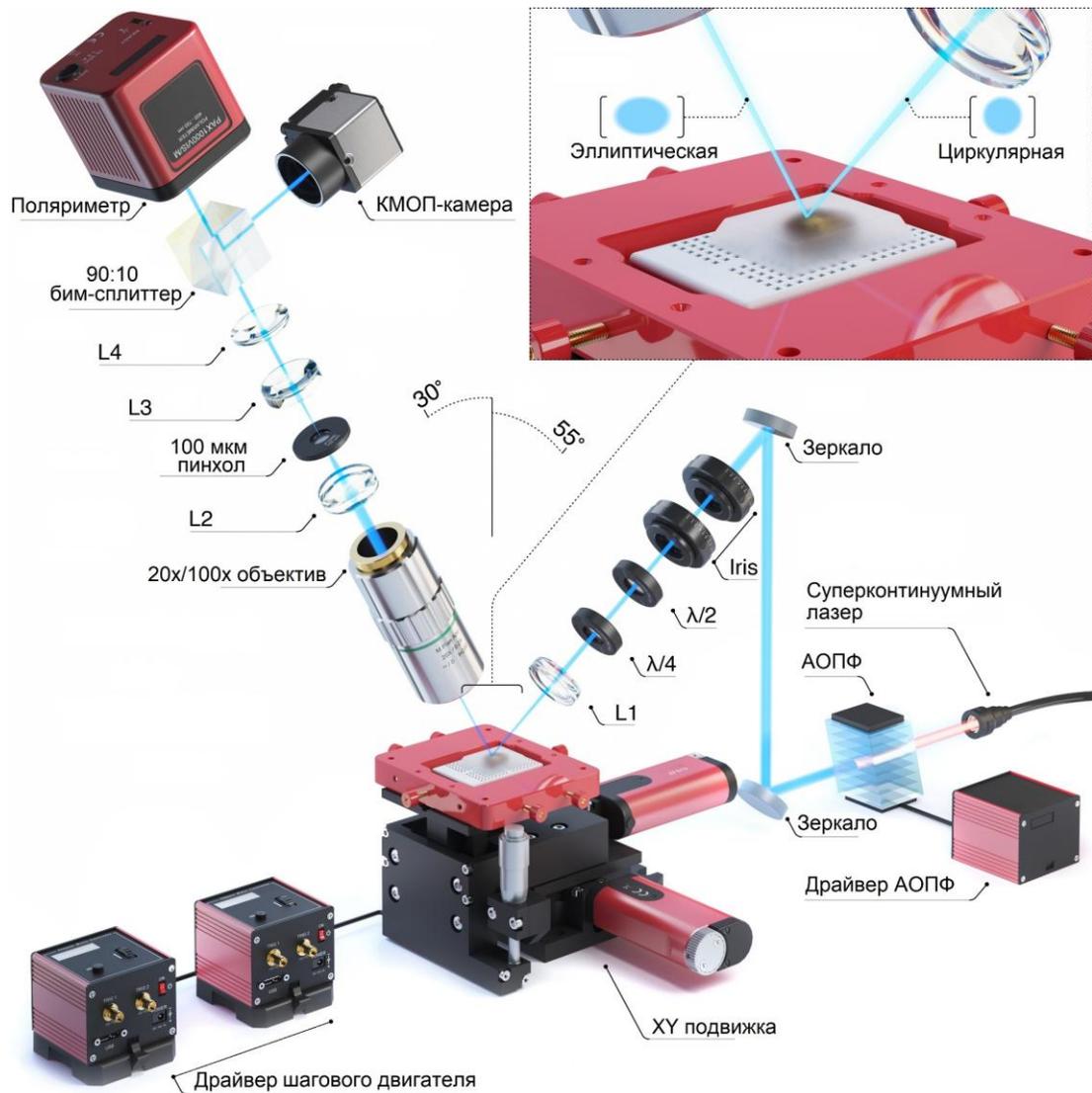


Рисунок 3.3 – Оптическая схема системы формирования изображений с круговой поляризацией. Система содержит осветительное плечо (правая часть) и измерительное плечо (левая часть)

Комбинация объектива и пинхола обеспечивает поле зрения диаметром 10 мкм. Затем свет был сфокусирован с помощью тубусной линзы L_4 и разделен бим-сплиттером: 10% оптической мощности поступает на КМОП-камеру для широкопольной контрольной съемки положения фокуса объектива, остальные 90% поступают на поляризметрическую систему Стокса (PAX1000VIS, Thorlabs, США), которая регистрирует и анализирует поляризационные данные. Вращающаяся четвертьволновая пластина и фиксированный линейный поляризатор внутри поляриметра периодически модулируют отраженный от образца свет, прежде чем

он попадает на кремниевый фотодиод. Система регистрирует вектор Стокса с последующей возможностью вычисления полной, линейной и круговой степени поляризации.

Частота дискретизации составляла 200 SPS, в каждой точке пространства измерения проводились три раза. Пространственное сканирование образцов осуществлялось с помощью моторизованного транслятора XY с шагом 0,5 или 5 мкм, в зависимости от размера интересующей области. Сканирование осуществлялось построчно («змейкой»). Управление всеми узлами системы и операции по обработке данных осуществлялись с помощью специализированного программного обеспечения, разработанного в средах C++ и MATLAB (см. рисунок 3.4).

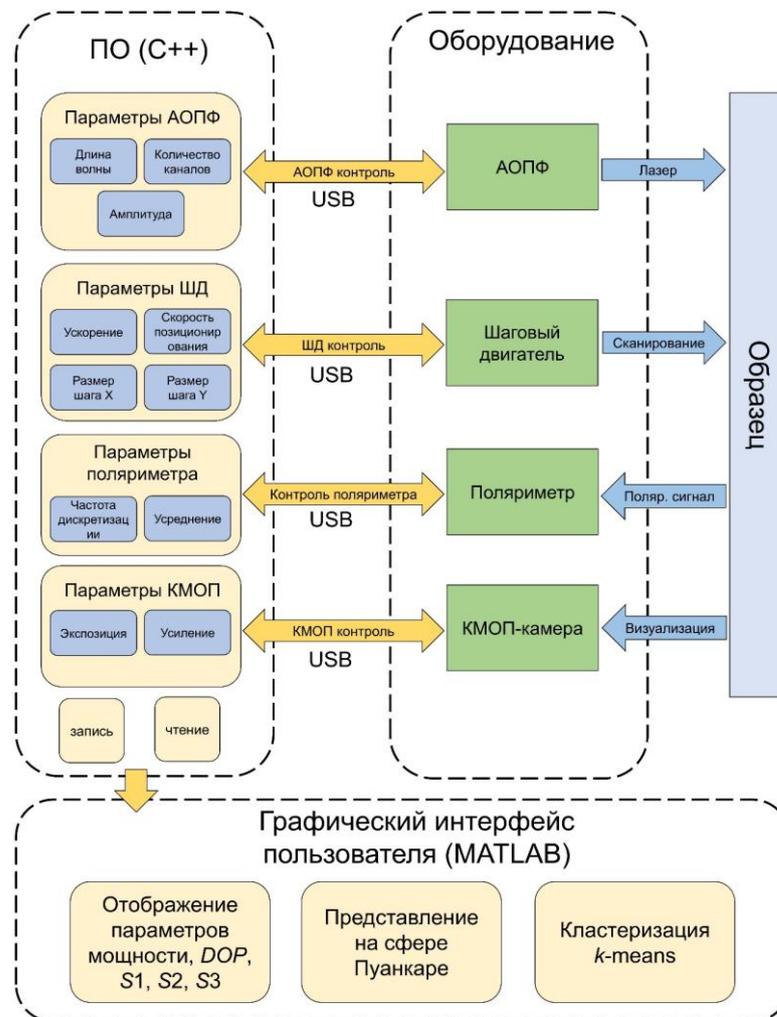


Рисунок 3.4 – Алгоритм управления системой и обработки экспериментальных данных: АОПФ – акустооптический перестраиваемый фильтр, ШД – контроллер шаговых двигателей

С помощью моделирования в программной среде TracePro (Lambda Research Corporation, США) оптическая схема канала освещения (рисунок 3.5а) была оптимизирована таким образом, чтобы размер сканирующего пучка в точке фокусировки не превышал 5 мкм (см. распределение освещенности на рисунке 3.5б). Реальный пространственный профиль лазерного пучка составлял 4 мкм и контролировался профилометром лазерного пучка (BeamMaster, Coherent, США).

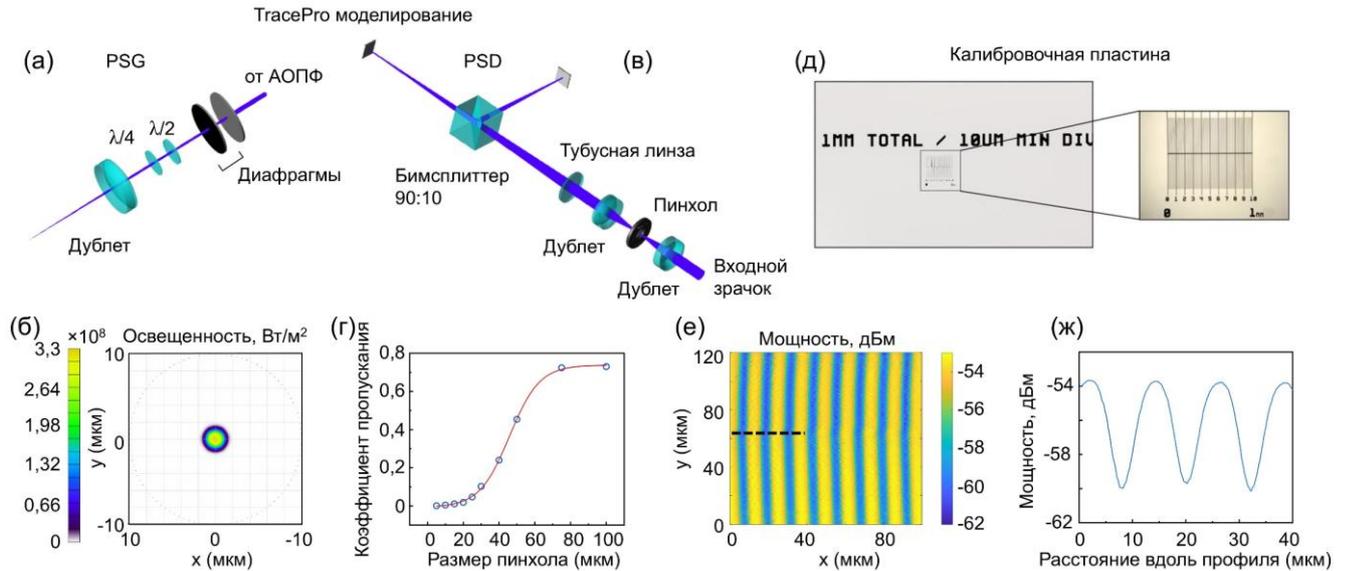


Рисунок 3.5 – (а) Оптическая схема осветительного канала; (б) расчетный размер лазерного пучка в точке фокуса; (в) оптическая схема канала регистрации; (г) зависимость коэффициента ослабления от размера пинхола; (д) калибровочная пластина R1L3S2P; (е) экспериментально измеренный параметр мощности от калибровочной пластины; (ж) профиль интенсивности, соответствующий черной пунктирной линии на (е)

Также был рассчитан коэффициент пропускания канала регистрации излучения (рисунок 3.5в). Учитывая низкие значения мощности диффузно рассеянного излучения, выходящего из образца, и пороговые значения чувствительности поляриметра, важно обеспечить максимально возможный коэффициент передачи системы при сохранении достаточного разрешения. Моделирование и экспериментальные исследования показали, что использование в схеме пространственной фильтрации отверстия диаметром 100 мкм, позволяет

обеспечить достаточную мощность при сохранении хорошего разрешения. В расчетах общий поток на выходе линзы принимался равным 1, а коэффициент пропускания излучения оптической системы регистрации с пинхолом диаметром 100 мкм составлял $\sim 0,75$ (см. рисунок 3.5г).

Калибровочная пластина (R1L3S2P, Thorlabs, США) была использована в качестве образца для характеристики пространственного разрешения системы (рисунок 3.5д). На рисунках 3.5е,ж показано сканированное изображение параметра мощности калибровочной пластины и соответствующий профиль интенсивности, демонстрирующие разрешение системы выше 5 мкм.

3.3 Поляриметрическое исследование FFPE образцов рака молочной железы

Далее разработанная система был использована для сканирования фиксированных в формалине парафинизированных (FFPE) образцов рака молочной железы ранней стадии (протоковая карцинома *in situ*, DCIS) и образцов развитого рака (инвазивная протоковая карцинома, IDC). Перед проведением измерений соседний срез ткани из блока был охарактеризован стандартным гистопатологическим анализом.

Образцы рака молочной железы и их гистологические данные были предоставлены Биобанком Borealis Северной Финляндии (Оулу, Финляндия). Исследование проводилось в соответствии с рекомендациями по обработке патологических образцов, утвержденными локальным этическим комитетом.

Выбранный тип рака является наиболее распространенным онкологическим заболеванием среди женщин и второй по частоте причиной смерти от рака у женщин во всем мире, с уровнем заболеваемости более 2 млн случаев (11,5% от общего числа) и смертностью более 600 000 случаев (6,8% от общего числа смертей от рака) [286]. Для успешного лечения крайне важна ранняя диагностика. Миллионы женщин выживают и живут полноценной жизнью с раком молочной железы, если он обнаружен и пролечен на ранней стадии.

Маммография с использованием малодозного рентгеновского излучения является наиболее распространенным методом скрининга микрокальцинатов при раке молочной железы. Однако маммография неэффективна при плотной ткани молочной железы и не позволяет различить, является ли обнаруженное образование доброкачественным или злокачественным. Поэтому она всегда сопровождается хирургической биопсией, повышение эффективности которой является одной из актуальных задач биомедицинских исследований.

Измерения включали 13 образцов жировой ткани, 11 образцов доброкачественного фиброза и по 5 образцов DCIS и IDC.

Разработанная система и программное обеспечение позволяет проводить измерения в широком диапазоне длин волн (450-650 нм, шаг 5 нм) в каждой точке сканирования, что позволяет получать 5 гиперспектральных кубов основных поляриметрических параметров (мощность, DOP , Q , U и V). В качестве примера получаемых спектров в каждом пикселе изображения см. рисунок 3.6, на котором представлен нормированный на спектралон спектр мощности (диффузного отражения) тестовой RGB пластины. Каждый спектр соответствует определенному цвету области пластины.

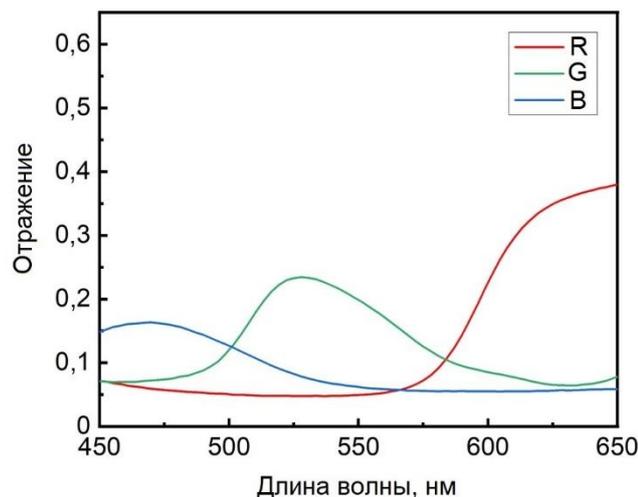


Рисунок 3.6 – Нормированный спектр мощности тестовой RGB пластины, регистрируемый разработанной экспериментальной системой

Однако, было установлено, что наилучший контраст изображения достигается при длине волны 450 нм (см. рисунок 3.7).

Оптимальное расстояние между источником и детектором находится в диапазоне 50-100 мкм (рисунок 3.8). Меньшие расстояния приводят к снижению чувствительности к присутствию раковых клеток и повышению чувствительности к дефектам поверхности. Увеличение расстояния между источником и детектором в указанном диапазоне приводит к более существенной деполяризации света, потере поляризационного сигнала и сильному шуму в измерениях.

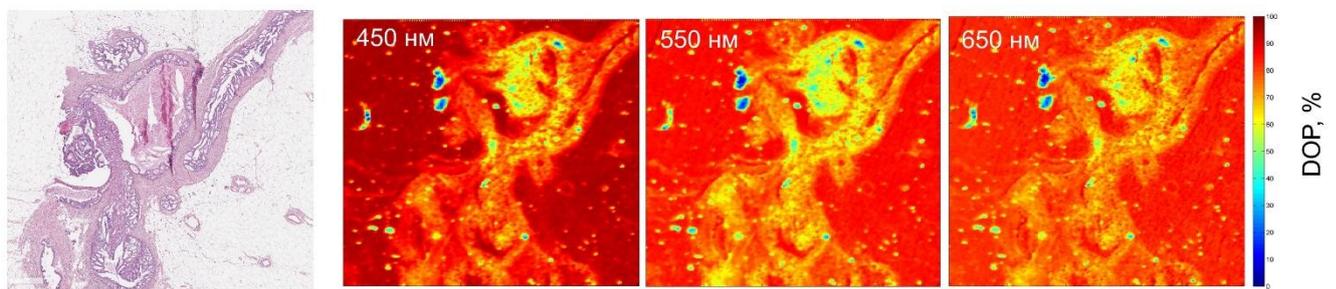


Рисунок 3.7 – Выбор длины волны зондирования

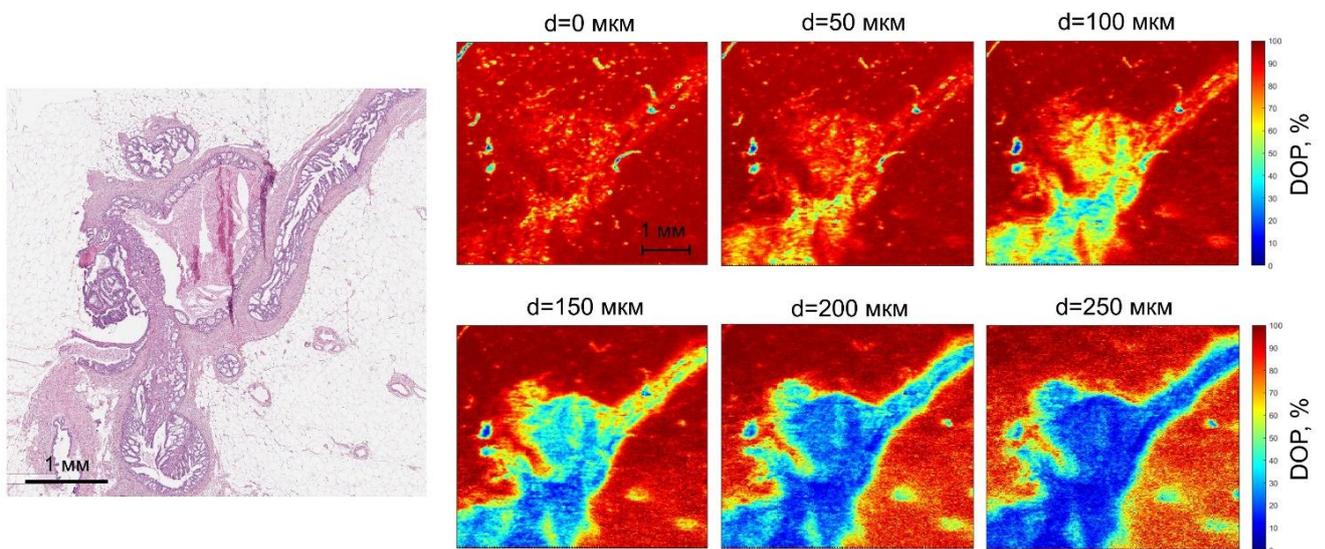


Рисунок 3.8 – Выбор расстояния между источником и детектором

На рисунках 3.9а,и и 3.9б,н представлены фотографии FFPE образцов с DCIS и IDC и классические гистологические изображения, предоставленные с описанием сертифицированным гистологом. Рассматриваемые зоны представлены четырьмя

типами тканей: окружающая жировая ткань, доброкачественный фиброз и эпителиальные раковые ткани, расположенные внутри и вне молочного протока.

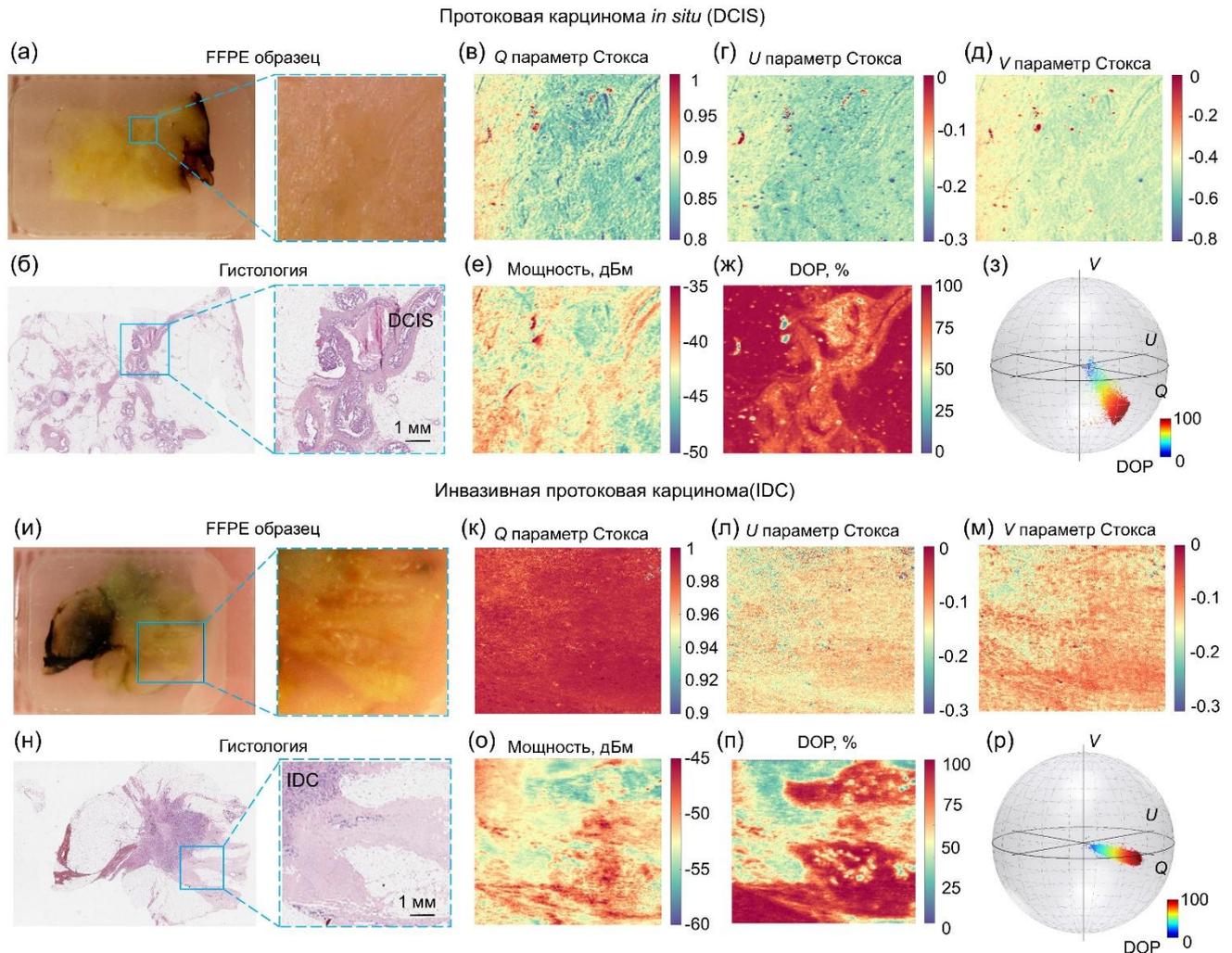


Рисунок 3.9 – (а,и) Фотографии и (б,н) гистологические изображения DCIS (верхний ряд) и IDC (нижний ряд) молочной железы; 2D пространственные распределения нормированного вектора Стокса: (в,к) Q параметр, (г,л) U параметр, (д,м) V параметр, (е,о) мощность и (ж,п) DOP отраженного света; (з,р) соответствующее распределение параметров Стокса на сфере Пуанкаре

Пространственные карты (2D распределения) четырех компонент вектора Стокса (Q , U , V , мощность), измеренные в выбранной области при оптимизированных параметрах установки для DCIS и IDC, представлены на рисунках 3.9в-е и 3.9к-о, соответственно. Рассчитанное значение DOP показано на рисунке 3.9ж,п. Карта первой компоненты вектора Стокса, представляющей

скалярную интенсивность, не показывает значительной корреляции с гистологическим изображением из-за нечувствительности этого параметра к структурным изменениям в ткани. Из полученных результатов видно, что *DOP* является наиболее чувствительным параметром, указывающим на злокачественность опухоли. Однако остальные измеренные параметры (параметры Стокса) могут быть использованы для отображения данных на сфере Пуанкаре для детального анализа изменений в поляризации (рисунок 3.9з,р).

Результаты серии измерений на наборе образцов показали, что средние значения *DOP* для интактной жировой ткани составляют 95 %, для DCIS – 70-80 %, присутствие IDC снизило значение *DOP* до уровня 60-70 % (см. рисунок 3.10). Статистически значимые различия были подтверждены тестом Краскела-Уоллиса с последующим апостериорным анализом (*post-hoc*, $p < 0,01$). Наблюдаемые различия могут быть связаны с увеличением среднего размера ядер при более развитом типе рака. Это приводит к более высокой анизотропии и увеличению последовательных событий прямого рассеяния, что уменьшает *DOP*.

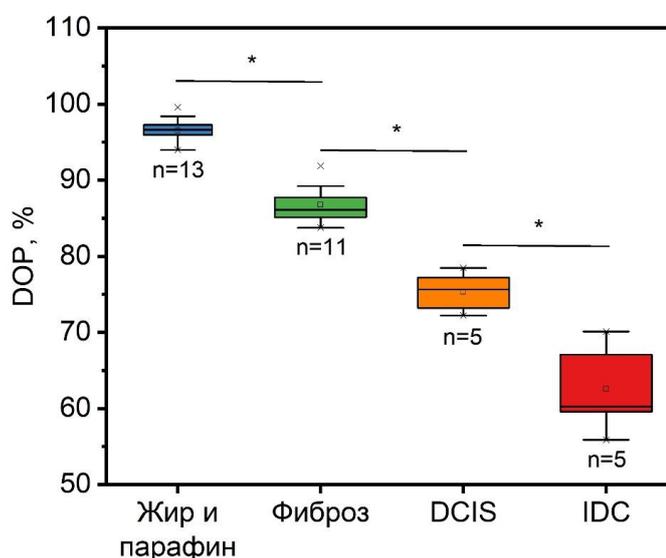


Рисунок 3.10 – Результаты серии экспериментальных исследований.

*Статистическая значимость различий между различными типами тканей с вероятностью $p < 0,01$. Подтверждена с помощью теста Краскела-Уоллиса с последующим *post-hoc* анализом (тест Данна)

3.3.1 Визуализация высокого разрешения с кластеризацией данных

Разработанная система имеет гибкую настройку разрешения, которая достигается за счет изменения шага сканирования и сменных микроскопических объективов. Это позволяет сканировать как большие области интереса для изучения общей картины изменения поляризации всего образца, так и проводить детальный анализ взаимодействия поляризованного света с раковыми клетками. Использование $100\times$ объектива и шага сканирования в $0,5\text{ мкм}$ позволило получить поляризационные изображения, близкие по разрешению к гистологическим снимкам (рисунок 3.11).

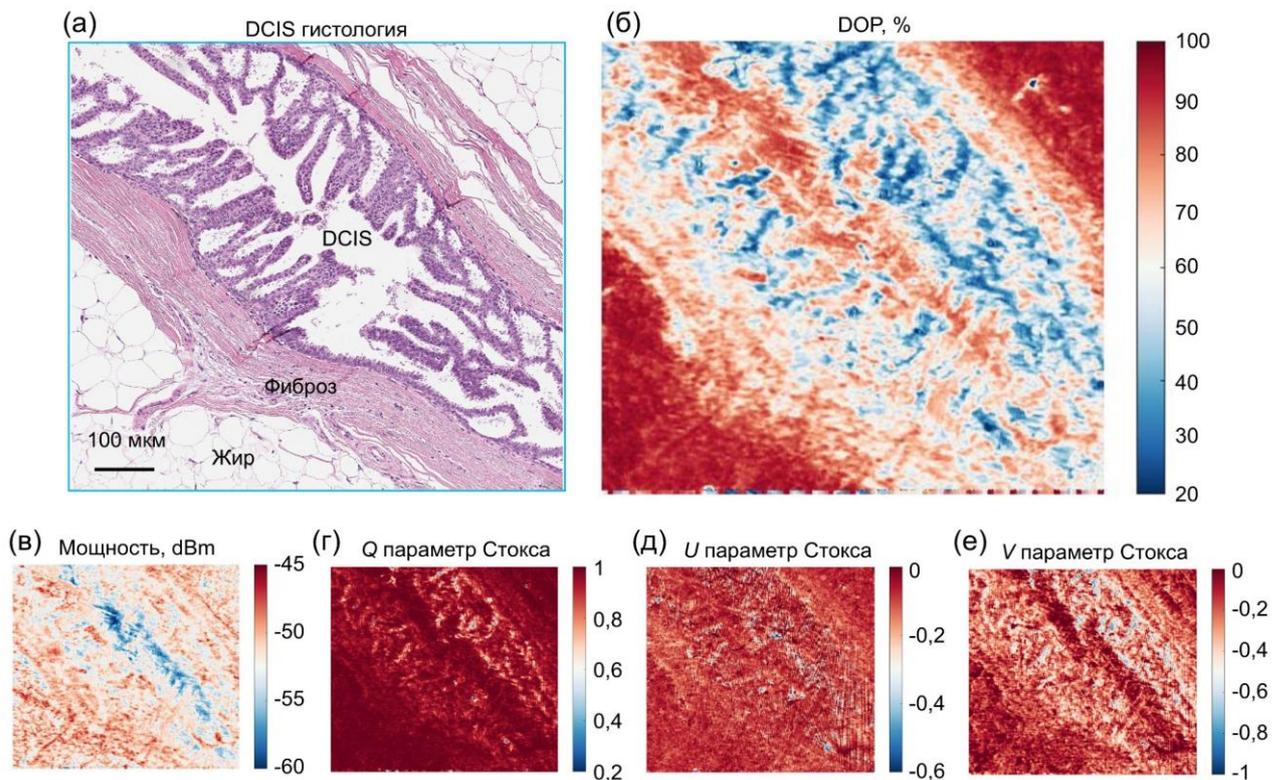


Рисунок 3.11 – (а) Гистологическое изображение образца DCIS; (б) распределение параметра DOP отраженного излучения в области интереса; распределения измеренного вектора Стокса: (в) мощность, (г) Q , (д) U и (е) V компоненты

Из распределения компоненты V вектора Стокса видно, что раковые области имеют более низкие значения V , чем окружающие ткани, что подтверждает увеличение анизотропии рассеяния в этих областях из-за увеличения размера рассеивателей.

Левосторонняя спиральность является показателем того, что большинство регистрируемых фотонов претерпевают изменение спиральности при взаимодействии с образцами. Это типичный признак рэлеевского режима, при котором свет в основном рассеивается частицами, которые малы по сравнению с длиной волны [287]. Измерения проводились при длине волны 450 нм, поэтому диаметр клеточных ядер (несколько мкм) был намного больше длины волны света. Если свет в основном рассеивается клеточными ядрами, то стоит предположить режим рассеяния Ми. Однако результаты показывают, что предположение о том, что ядра клеток являются основным источником рассеяния биологической тканью в конфигурации обратного рассеяния, не соответствует действительности для образцов рака молочной железы. Данные свидетельствуют о том, что свет в основном рассеивается небольшими объектами (например, коллагеновыми фибриллами, различными компонентами клеток). Между тем, в любом случае, увеличение среднего размера ядер может привести к повышению анизотропии и увеличению числа последовательных событий прямого рассеяния, что снижает *DOP*.

Для осуществления автоматизированной классификации полученных данных и выделения зон рака в FFPE образцах был проведен кластерный анализ на основе алгоритма *k*-средних (*k*-means). Кластерные алгоритмы являются хорошо зарекомендовавшим себя методом анализа изображений [288–291]. Кластеризация методом *k*-средних – это широко используемый метод разделения данных, основные принципы которого были описаны МакКуином [292]. В общем случае метод предполагает разделение набора данных на кластеры таким образом, чтобы минимизировать различия между данными внутри каждого кластера и максимизировать различия между кластерами в соответствии с заданной метрикой расстояния (обычно используется евклидово расстояние). Алгоритм выбирает *k* случайных значений в качестве начальных центроидов (центроид обозначает центр или среднее значение кластера). Затем вычисляются расстояния между каждым значением в наборе данных и этими центроидами, после чего каждое значение присваивается кластеру с ближайшим центроидом. После того, как все значения

распределены по k центроидам, вычисляется новый набор центроидов на основе среднего значений, связанных с каждым кластером. Этот процесс повторяется до тех пор, пока распределение не перестанет изменяться, а прирост точности не станет меньше заданного порога. Полученный вектор может быть преобразован в изображение в псевдоцветах, где каждый цвет соответствует определенному кластеру.

Его математическая основа может быть формализована следующим образом. Рассмотрим набор данных $X = \{x_1, x_2, \dots, x_n\}$, где каждый элемент $x_i \in \mathbb{R}^d$ представляет собой вектор признаков. В данном исследовании в качестве входной информации для кластеризации использовались значения параметров Q , U и V . Алгоритм ставит целью разбиение множества X на k кластеров $C = \{C_1, C_2, \dots, C_k\}$ таким образом, чтобы минимизировать целевую функцию – сумму квадратов расстояний внутри кластеров:

$$J(C) = \sum_{i=1}^k \sum_{x \in C_i} \|x - \mu_i\|^2, \quad (3.14)$$

где μ_j – центроид кластера C_i , вычисляемый как среднее всех точек в кластере;
 $\| \cdot \|$ – евклидова норма (расстояние).

Процедура кластеризации методом k -средних включает несколько последовательных этапов. На этапе инициализации выбираются k начальных центроидов $\mu_1^{(0)}, \mu_2^{(0)}, \dots, \mu_k^{(0)}$, которые могут быть определены либо случайным образом (случайные точки из X), либо с использованием специализированных методов инициализации. На каждой итерации t алгоритма происходит распределение точек данных по кластерам согласно критерию минимального расстояния до соответствующего центроида:

$$C_i^{(t)} = \left\{ x_p : \|x_p - \mu_i^{(t)}\|^2 \leq \|x_p - \mu_j^{(t)}\|^2 \forall j, 1 \leq j \leq k \right\}, \quad (3.15)$$

а затем пересчет положений центроидов как средних значений точек, отнесенных к каждому кластеру:

$$\mu_i^{(t+1)} = \frac{1}{|C_i^{(t)}|} \sum_{x_j \in C_i^{(t)}} x_j. \quad (3.16)$$

Итерационный процесс продолжается до тех пор, пока распределение не перестанет изменяться, а прирост точности не станет меньше заданного порога ε : ($\|\mu_i^{(t+1)} - \mu_i^{(t)}\| < \varepsilon$), либо стабилизируются значения целевой функции $J(C)$.

Зная априорную информацию о типе исследуемых тканей, в данном исследовании были использованы три кластера. На рисунке 3.12а показаны векторы Стокса, соответствующие области рака, фиброза и жировой ткани. Видна разница в положении точек в пространстве сферы.

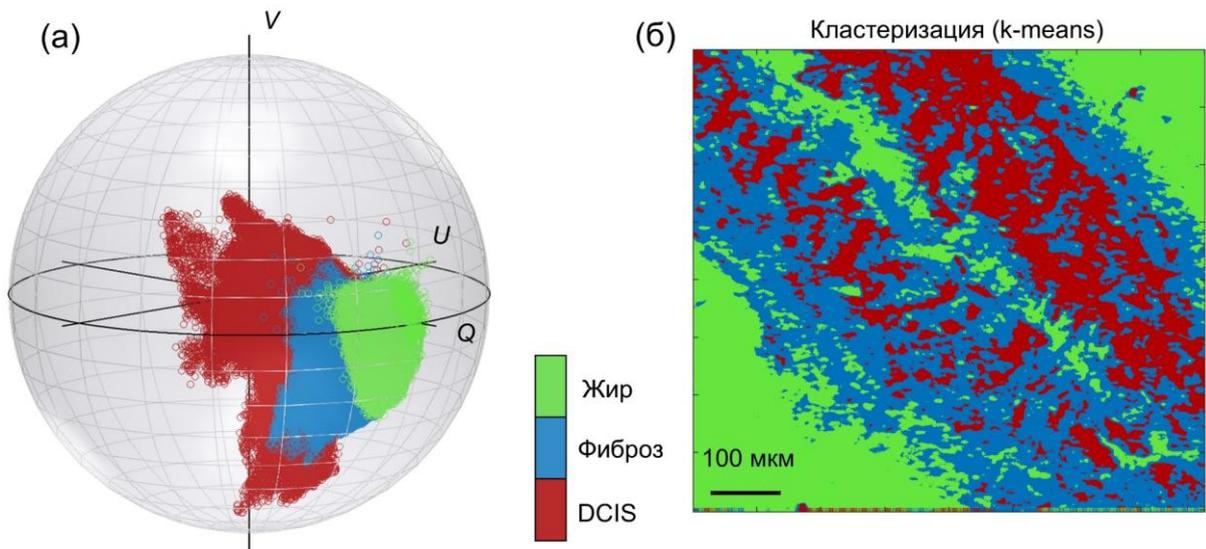


Рисунок 3.12 – (а) Результаты кластеризации в пространстве сферы Пуанкаре: зеленые маркеры – жировая ткань, синие – доброкачественный фиброз, красные – DCIS; (б) соответствующая сегментация изображения на основе кластеризации k -средних

Автоматизированная автономная сегментация выделяет основные области блока ткани, которые хорошо согласуются с данными стандартного

гистологического анализа (рисунке 3.12б). Показано, что раковые клетки расположены внутри протока в окружении фиброзной и жировой ткани. Таким образом, была продемонстрирована высокая чувствительность разработанной системы поляризационной визуализации для анализа FFPE онкологических образцов. В следующем разделе данная система была применена для анализа не фиксированных в парафине *ex vivo* образцов рака.

3.4 Поляриметрическое исследование *ex vivo* образцов рака толстой кишки

Далее разработанная система была применена для исследования *ex vivo* образцов рака толстой кишки. Рак толстой кишки является одним из ведущих случаев злокачественных новообразований, и, к сожалению, из-за его анатомического происхождения он часто диагностируется на более поздней стадии развития. Опухоли желудочно-кишечного тракта ответственны за высокий уровень смертности (почти 9 случаев смерти из 20 первоначальных диагнозов, по данным Глобальной обсерватории по борьбе с раком – GCO), особенно когда скрининг проводился на поздней стадии [286]. В целом, стадии рака толстой кишки могут быть классифицированы как: морфологические и биохимические изменения в клетках эпителия с дополнительным ростом клеточной плотности; вторжение опухолевых клеток в соседние ткани, что приводит к разрушению здоровых тканей; метастазирование в результате распространения опухоли в других местах тела через лимфу или кровь.

Ex vivo образцы толстой кишки были получены в результате операции пациента с опухолью толстой кишки – G2-аденокарциномой. Биологический образец был предоставлен после удаления и диагностики патологом из University Hospital Tzaritza Yoanna-ISUL (София, Болгария). Образец ткани, использованный в данном исследовании, был отобран с достаточной степенью знания без учета критериев включения, таких как: возраст, пол пациента и т.д., за исключением оценки наличия аденокарциномы толстой кишки во втором классе развития, что позволило нам наблюдать значительное состояние роста опухоли, но до появления

метастатической активности и некротических участков в очаге поражения. Были соблюдены все требования этического комитета больницы. Сам образец состоит из двух разделов – здорового участка и опухоли. Области измерений (ROI) отмечены на рисунке 3.13.

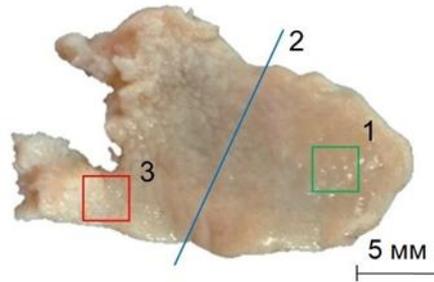


Рисунок 3.13 – *Ex vivo* образец толстой кишки: 1 – здоровая ткань, 2 – линия сечения образца, 3 – опухоль

Толщина обоих ROI составляет 1 мм. Никаких дополнительных окрашивающих и контрастных агентов не использовалось. Перед проведением измерений образец хранили в формалине. Обе области образца толстой кишки были просканированы с ROI 1×1 мм и размером шага 0,2 мм. Включая нулевые координаты обеих осей, было получено 36 измерений от обоих ROI. Точки были выбраны произвольно, удовлетворяя условию нахождения в гистологических зонах, отмеченных патологоанатомом.

3.4.1 Обнаружение рака толстой кишки с использованием сферы Пуанкаре и 2D поляриметрического картирования

В этом разделе сравниваются результаты, предоставленные патологоанатомом и рассматриваемые в качестве справочных, и результаты поляриметрических экспериментов. Было рассмотрено несколько диагностических величин: чувствительность (Se), специфичность (Sp), точность, положительные/отрицательные прогностические значения (PPV/NPV), индекс подозрительности (IS) и показатель угрозы (TS), которые все определяются через концепцию истинных положительных/отрицательных и ложных

положительных/отрицательных значений, обозначаемых соответственно, как TP , TN , FP и FN . Для большей ясности TP представляет собой гистологическую зону исследуемой ткани, классифицированную как злокачественная по гистологии и поляриметрии. Аналогично, TN оценивается обоими методами как здоровая зона. FP – гистологически диагностированная ткань как нормальная и злокачественная с помощью поляриметрии, и, наконец, FN – гистологически диагностированная ткань как злокачественная, но здоровая по результатам измерений с помощью поляриметрии.

На рисунке 3.14 координаты каждой точки на сфере Пуанкаре представляют параметры Стокса (S_1 , S_2 и S_3), измеренные с помощью поляризационной экспериментальной системы. Это представление не включает нормировку на DOP . Следовательно, все точки находятся на поверхности сферы Пуанкаре, тогда как при использовании этой поправок точки были бы внутри сферы ближе к ее началу.

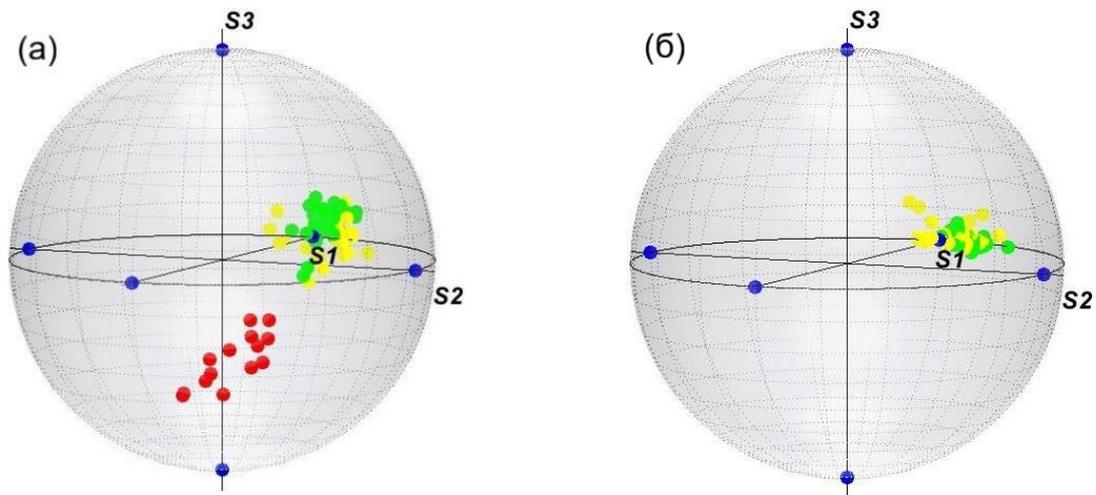


Рисунок 3.14 – Распределение параметров Стокса на сфере Пуанкаре относительно гистологического состояния и входной поляризации: (а) входная круговая поляризация и (б) входная горизонтальная поляризация. Синие точки представляют шесть опорных состояний поляризации (Н, V, P/MP, R/LCP), зеленые – значения TN (36 для обоих состояний поляризации), желтые – значения FN (36 для линейной поляризации и 22 для круговой поляризации), красные – значения TP (получено 14 только для циркулярной поляризации). Общее количество измерений – 36

Ранее сообщалось, что для рассеяния Ми (когда в рассеивании преобладают крупные сферические частицы с диаметром, превышающим длину волны падающего лазерного света), циркулярно поляризованный свет сохраняет свою спиральность в течение большего количества событий рассеяния, свойство, известное как поляризационная память [293–296]. Линейная поляризация не способна хорошо поддерживать свои поляризационные свойства для большого числа рассеивающих событий. Следовательно, это явление обеспечивает большую глубину проникновения без деполяризации для циркулярно поляризованного света по сравнению с линейно поляризованным светом [282,283,297,298]. На рисунке 3.14 синие точки – это шесть эталонных состояний поляризации (H, V, R/MP, R/LCP), зеленые точки – результаты TN , желтые – FN и красные – TP , соответственно. Как видно, круговая поляризация имеет лучшие диагностические возможности, чем линейная.

При незначительных морфологических изменениях в тканях во время роста опухоли рассеяние света приведет к различным изменениям поляризации в детектируемом сигнале из разных гистологических областей. Из-за более высокой анизотропии тканей в интактных зонах начальная круговая поляризация была изменена на линейную. Напротив, в срезах раковых образцов, особенно там, где опухоль максимально инфильтрирована, выходное состояние поляризации ближе к исходному. Тем не менее, в областях с меньшей инфильтрацией опухоли выходные поляризационные состояния имеют вклад в значения FN . При обеих поляризациях нет измерений FP (то есть $FP = 0$), и в распоряжении есть 36 значений TN из сканов обоих гистологических срезов. К сожалению, использование горизонтальной поляризации для падающего света не дает результатов TP . С циркулярной поляризацией было обнаружено 22 из 36 FN , где только для последнего состояния поляризации доступны результаты TP – 14 из 36. Вышеупомянутые диагностические величины суммированы в таблице 3.1 как для входных состояний поляризации, так и для обеих гистологических зон ткани.

Таблица 3.1 – Диагностические величины для обоих состояний поляризации

[%]	Se	Sp	Точность	PPV	NPV	IS	TS
RCP	39	100	70	100	62	39	39
H	0	100	50	0	50	0	0

На рисунке 3.14а показано, что можно качественно дифференцировать с помощью входной круговой поляризации здоровые ткани и ткани опухоли в зависимости от изменений состояний поляризации, отслеживаемых на сфере Пуанкаре. С другой стороны, это не относится к линейной поляризации на рисунке 3.14б. Критерий Манна-Уитни использовался для линейной поляризации для сравнения значений S_{TNi} vs S_{FNI} , где $i = 1,2,3$ (соответствующие элементы вектора Стокса). Результаты тестов показывают отсутствие значимых различий в сравниваемых значениях ($p < 0,05$). Поскольку мы имеем параметр TP при сканировании с круговой поляризацией, то в этом случае следует использовать тест Крускала-Уоллиса. В этом случае сравнение проводилось для значений S_{TNi} vs S_{FNI} vs S_{FNI} , где результаты испытаний показывают, что на уровне достоверности 0,05 существует значимая разница между группами. Результаты апостериорного анализа показывают, что для $p < 0,05$ значения S_{FNI} vs S_{TPi} , S_{TNi} vs S_{TPi} и $S_{TN2,3}$ vs $S_{FN2,3}$ относятся к разным выборкам, исключая только S_{TNi} vs S_{FNI} .

Далее представлены результаты 2D поляриметрического картирования областей исследования толстой кишки. Это позволяет отобразить любые изменения в поляриметрических параметрах и связать их с гистологическим состоянием сканируемой области.

Правозакрученную круговую поляризацию можно охарактеризовать ее вектором Стокса $S_{RCP} = (1,0,0,1)^T$ и углом эллиптичности 45° при неопределенном азимуте. Из рисунка 3.15 видно, что после сканирования оба среза образца по-разному меняются по параметрам Стокса. Например, в здоровом сечении круговая поляризация была преобразована в горизонтальную, в то время как в сечении опухоли, где опухоль имела наибольшую инфильтрацию, значения параметров Стокса были ближе к исходным, а обнаруженная выходная поляризация является эллиптической.

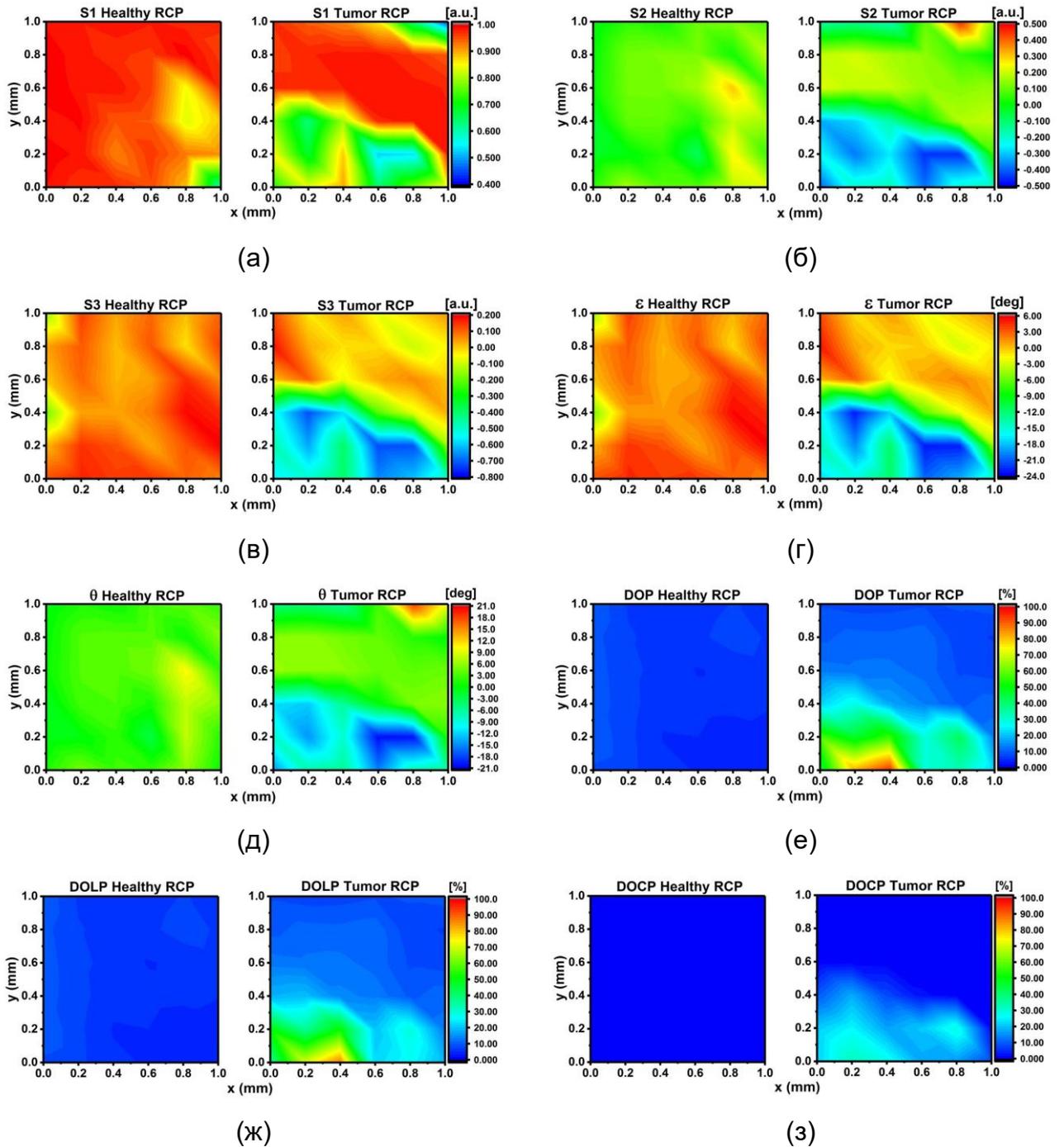


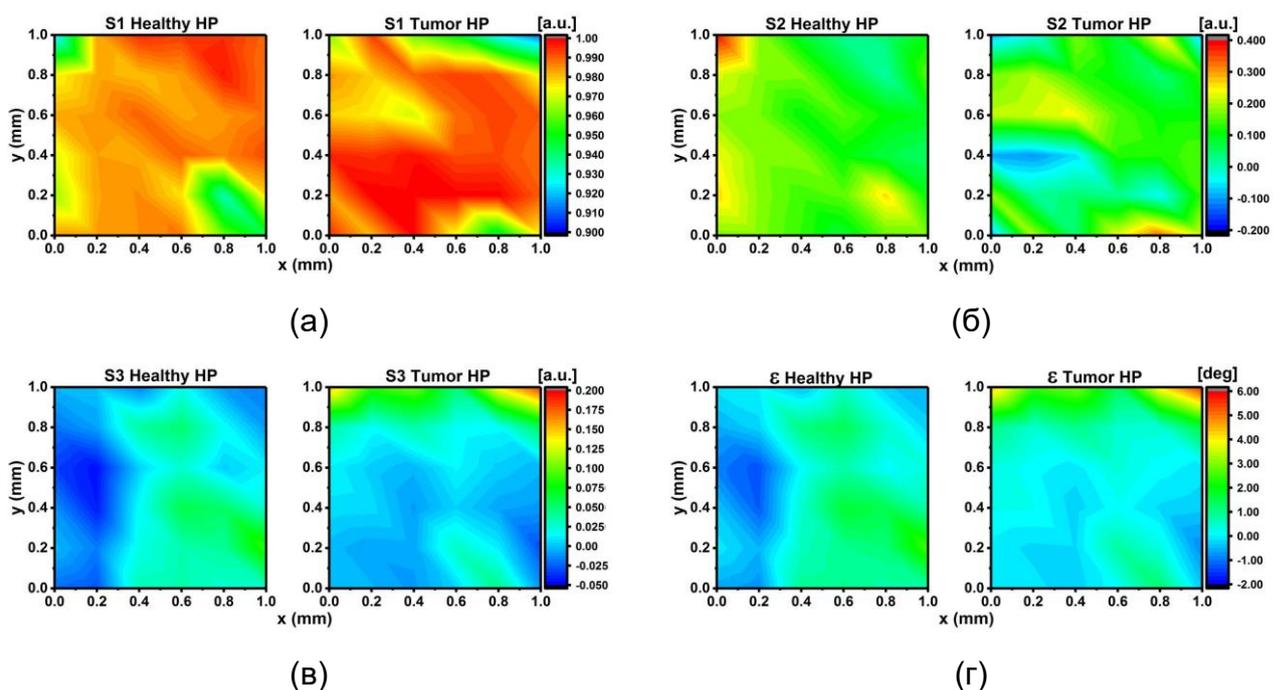
Рисунок 3.15 – 2D-поляриметрическое отображение параметров обеих областей интереса с круговой поляризацией в зависимости от гистологического условия: (а) S_1 , (б) S_2 , (в) S_3 , (г) угол эллиптичности θ , (д) азимут ε , (е) DOP , (ж) $DOLP$, (з)

$DOCP$

Еще одно подтверждение этого явления можно проследить на сфере Пуанкаре на рисунке 3.14а и соответствующих кластерах значений TP , TN и FN . Сравнивая пространственное распределение углов эллиптичности и азимута,

возможно подтвердить более слабые изменения поляризации в сечении опухоли. Значения DOP приводят к выводу, что опухолевые зоны могут сохранять более высокую степень поляризации по сравнению со здоровыми. Следует также отметить, что начальная ориентация круговой поляризации была правозакрученной, однако некоторые поляриметрические параметры из измерений опухолевой ткани указывают на левозакрученность. Это уникальное свойство также возможно использовать в диагностических целях.

Аналогично круговой поляризации возможно классифицировать горизонтальную поляризацию с помощью следующего вектора Стокса $S_{HP} = (1, 1, 0, 0)^T$, азимута 0° и угла эллиптичности 0° . Однако, в отличие от циркулярной поляризации, линейная не может обеспечить такие диагностические возможности с точки зрения изменения поляризации, особенно это заметно на рисунке 3.13б. Динамические диапазоны всех поляриметрических значений для обоих гистологических срезов, за исключением DOP , ниже для линейной поляризации, что также ограничивает возможности диагностики. В случае DOP линейная поляризация по сравнению с циркулярной сохраняет более высокие значения в мутных средах, таких как биологические ткани. Это становится очевидным из рисунков 3.15(е-з) и 3.16(е-з).



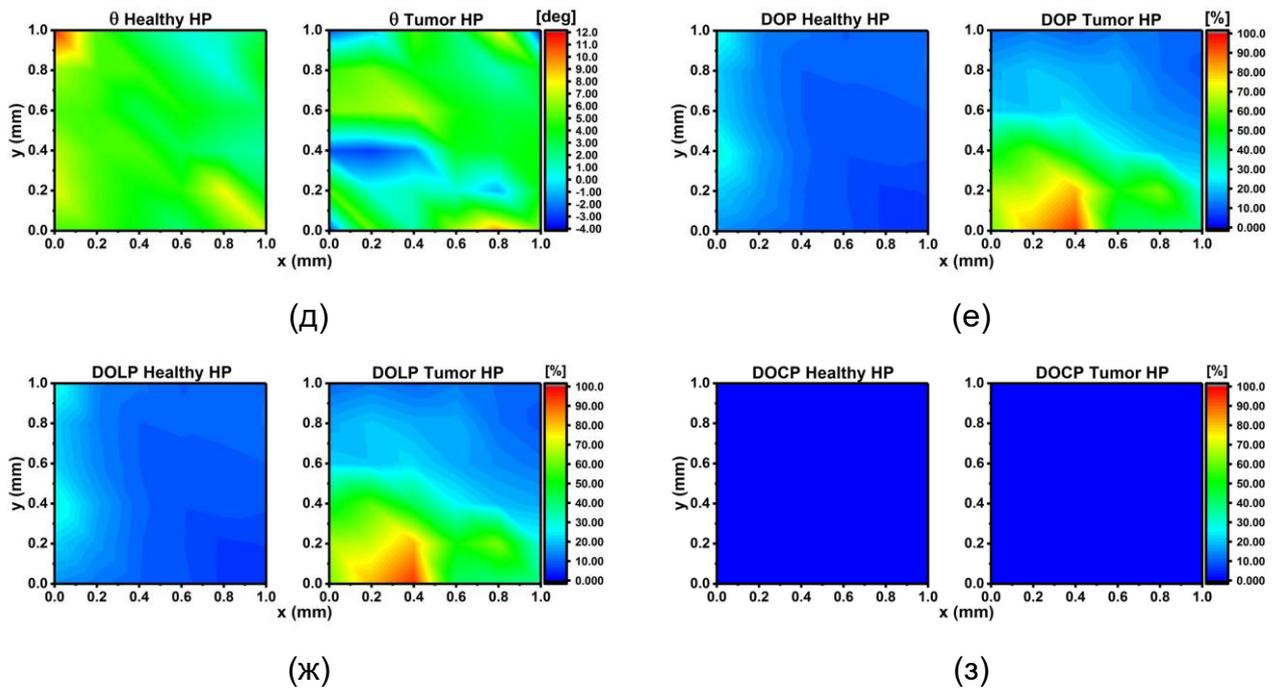


Рисунок 3.16 – 2D-поляриметрическое отображение параметров обеих областей интереса с линейной поляризацией в зависимости от гистологического условия: (а) S_1 , (б) S_2 , (в) S_3 , (г) угол эллиптичности θ , (д) азимут ε , (е) DOP , (ж) $DOLP$, (з) $DOCP$

Таким образом, круговая поляризация была оценена как более чувствительная к изменениям ткани, с более высокими динамическими диапазонами поляриметрических величин и в целом как лучшая для диагностики по сравнению с линейной. Кроме того, при сканировании с круговой поляризацией сохраняется определенная степень линейной поляризации ($DOLP$), в то время как при использовании линейной поляризации не наблюдается сохранения степени круговой поляризации ($DOCP$). Также было отмечено, что деполаризация круговой поляризации в мутных средах, таких как биологические ткани, выражена сильнее, чем у линейной поляризации, что связано с зависимостью деполаризации от размера рассеивателей, длины волны падающего света и транспортных параметров для различных гистологических зон.

Результаты подтверждают предположение о режиме рэлеевского рассеяния и меньшей анизотропии тканей в опухолевых участках. Изменения поляризации, вызванные различными гистологическими состояниями исследуемых областей,

могут быть качественно отслежены на сфере Пуанкаре. Количественно эти изменения оценивались с помощью двумерного сканирования и анализа ряда поляриметрических параметров. Пространственное распределение поляриметрических величин позволяет выявить небольшие, но значимые морфологические изменения в сканируемой области.

Важно отметить, что только круговая поляризация позволила обнаружить истинно положительные (TP) значения, что имеет решающее значение для диагностики. Проведенный статистический анализ подтвердил, что линейная поляризация нечувствительна к TP -значениям и не позволяет различить TN и FN -значения. Диагностические показатели, рассчитанные для обоих типов поляризации, оказались либо выше, либо ненулевыми в пользу круговой поляризации.

Таким образом, комбинированный поляриметрический подход позволяет дифференцировать здоровые ткани от раковых и/или предраковых. Хотя показатели чувствительности, индекса подозрительности (IS) и угрозы (TS) требуют дальнейшего улучшения, точность и отрицательная прогностическая ценность (NPV) являются удовлетворительными, а специфичность и положительная прогностическая ценность (PPV) – отличными даже для пилотного исследования [299].

Результаты также согласуются с исследованиями других групп в области тканевой поляриметрии, где, например, было показано, что эллиптическая поляризация при длине волны 633 нм обеспечивает лучшую чувствительность и контраст по сравнению с линейной [300]. Другие исследования в ближнем инфракрасном диапазоне также подтверждают меньший коэффициент деполяризации для рака толстой кишки [301], а использование сферы Пуанкаре позволяет различить предраковые и нормальные ткани [302].

3.4.2 Разработка дополнительной поляризационной метрики для гистопатологического анализа раковых образцов (симметричное разложение)

Вышеописанные образцы были также проанализированы с точки зрения *симметричного разложения* матриц Мюллера, косвенно полученных из Стоксполяризационных измерений. Измеряя выходной вектор Стокса (\mathbf{S}_0) для каждого из четырех различных состояний входной поляризации \mathbf{i} (горизонтальное линейное, вертикальное линейное, $+45^\circ$ линейное и правое круговое), можно получить полную матрицу Мюллера: $\mathbf{S}_0 = \mathbf{M} \cdot \mathbf{S}_i$.

Поляриметрическая установка была протестирована путем измерения матрицы Мюллера зеркала (\mathbf{M}_{exp}), которая сравнивалась с теоретической матрицей Мюллера отражения (\mathbf{M}_{th}) без каких-либо деполяризующих свойств, т.е. $\text{diag}(1,1,1,1)$. После этого был выполнен расчет среднеквадратичной ошибки (RMSE) для каждого элемента матрицы, за исключением m_{11} .

$$\mathbf{M}_{\text{th}} = \text{diag}(1,1,1,1), \quad \mathbf{M}_{\text{exp}} = \begin{bmatrix} 1 & 0,024 & 0,039 & -0,020 \\ 0,010 & 0,938 & -0,002 & 0,004 \\ -0,006 & 0,002 & 0,978 & 0,002 \\ -0,003 & 0,002 & 0,006 & 1,013 \end{bmatrix}, \quad \text{RMSE} = 0,022. \quad (3.17)$$

Для извлечения как поляризационных, так и деполяризационных свойств может быть применено симметричное разложение матрицы Мюллера [281,303]:

$$\mathbf{M} = \mathbf{M}_{D_2} \mathbf{M}_{R_2} \mathbf{M}_{\Delta} \mathbf{M}_{R_1} \mathbf{M}_{D_1}, \quad (3.18)$$

где канонические формы \mathbf{M}_{Δ} , \mathbf{M}_R и \mathbf{M}_D определяются как:

$$\mathbf{M}_{\Delta} = \text{diag}(1, d_1, d_2, d_3), \quad \mathbf{M}_R = \begin{bmatrix} 1 & \vec{0}^T \\ \vec{0} & \mathbf{m}_{\varphi} \end{bmatrix}, \quad \mathbf{M}_D = \begin{bmatrix} 1 & \vec{D}^T \\ \vec{D} & \mathbf{m}_D \end{bmatrix}. \quad (3.19)$$

\mathbf{M}_{Δ} описывает диагональный деполяризатор I типа [281] с коэффициентами

деполяризации $d_i (i = 1, 2, 3)$, где индекс 1 обозначает деполяризацию горизонтальной и вертикальной линейной поляризации, 2 – $\pm 45^\circ$ линейной поляризации и 3 – правого и левого кругового поляризованного состояния, соответственно. \mathbf{M}_R и \mathbf{M}_D обозначают соответствующие матрицы Мюллера ретардера (замедлителя) и диаттенюатора. 3×3 подматрица \mathbf{m}_φ представляет собой трехмерную матрицу поворота на угол, заданный фазовым сдвигом или ретардацией φ , тогда как подматрица \mathbf{m}_D строится на основе диаттенюации $\bar{\mathbf{D}}$. Суммарная деполяризация Δ , диаттенюация D , поляризуемость P и ретардация φ могут быть выражены как [281]:

$$\Delta = 1 - \frac{|d_1| + |d_2| + |d_3|}{3}, \quad 0 \leq \Delta \leq 1, \quad (3.20)$$

$$D = \frac{1}{M_{11}} \left[\sum_l M_{1l}^2 \right]^{1/2}, \quad l = 2, 3, 4, \quad 0 \leq D \leq 1, \quad (3.21)$$

$$P = \frac{1}{M_{11}} \left[\sum_k M_{k1}^2 \right]^{1/2}, \quad k = 2, 3, 4, \quad 0 \leq P \leq 1, \quad (3.22)$$

$$\varphi = \arccos \left[\frac{\text{tr}(\mathbf{m}_\varphi) - 1}{2} \right]. \quad (3.23)$$

Также каждая матрица Мюллера может быть преобразована в форму так называемой ковариационной матрицы \mathbf{H} (Эрмитовой матрицы), определяемой как [304–306]:

$$\mathbf{H} = \frac{1}{4} \sum_{k,l=1}^4 M_{k,l} (\sigma_k \otimes \sigma_l), \quad (3.24)$$

где σ_k – четыре спиновые матрицы Паули, а символ \otimes обозначает произведение Кронекера. Собственные значения матрицы \mathbf{H} , расположенные в порядке убывания ($\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \lambda_3 \geq \lambda_4$), используются для определения индекса поляриметрической чистоты (IPP) [304–308]:

$$P_1 = \frac{\lambda_1 - \lambda_2}{tr\mathbf{H}}, \quad P_2 = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 - 2\lambda_3}{tr\mathbf{H}}, \quad P_3 = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 - 2\lambda_4}{tr\mathbf{H}}, \quad (3.25)$$

где tr обозначает след матрицы.

Из значений IPP можно также рассчитать поляриметрический индекс чистоты IP и индекс деполаризации Хилля-Бернабеу P_{Δ} [309]:

$$IP = \left[\frac{1}{2} (P_1^2 + P_2^2 + P_3^2) \right]^{1/2}, \quad P_{\Delta} = \left[\frac{1}{3} (2P_1^2 + \frac{2}{3}P_2^2 + \frac{1}{3}P_3^2) \right]^{1/2}. \quad (3.26)$$

В конечном счете, вводя параметр поляризационной энтропии S в дополнение к IP и P_{Δ} , можно улучшить параметризацию деполаризации. S может быть вычислен на основе собственных значений λ_i ковариационной матрицы \mathbf{H} с использованием следующего выражения:

$$S = - \sum_{i=1}^4 \lambda_i \log_4(\lambda_i). \quad (3.27)$$

Значение $S=1$ соответствует идеальному деполаризатору (т.е. $\lambda_1 = \lambda_2 = \lambda_3 = \lambda_4$). Соответствующая мутная рассеивающая среда обладает поляризационными свойствами, которые изменяются совершенно случайным образом. И наоборот, мутная среда с $S=0$ является недеполяризующей, т.е. она полностью сохраняет степень поляризации поляризованного света [303].

Была исследована способность предложенных параметров отличать опухолевую зону образца толстой кишки от здоровой.

В начале была исследована способность диаттенуации D , поляризуемости P и двух пар параметров поляризации (D_i и φ_i , $i=1, 2$) из симметричного разложения отличать опухолевую зону образца толстой кишки от здоровой.

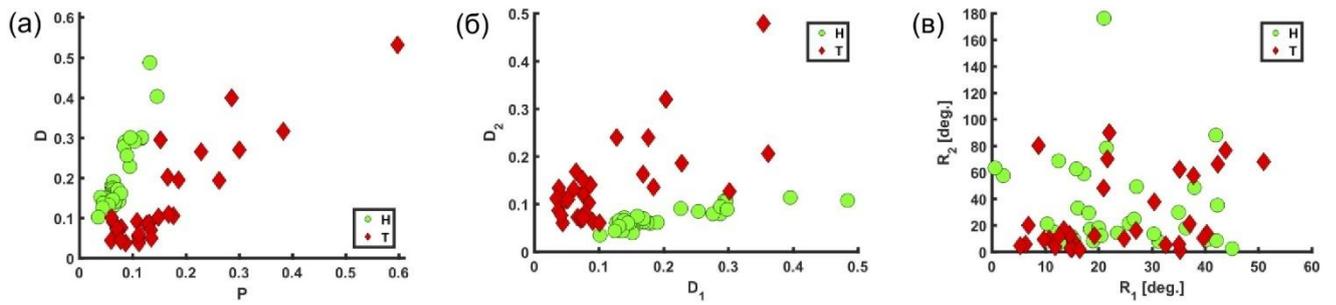


Рисунок 3.17 – Диаграммы рассеяния: (а) D vs P , (б) D_2 vs D_1 и (в) φ_2 vs φ_1 , для здоровой и раковой тканей

На рисунке 3.17а,б показаны диаграммы рассеяния D vs P и D_2 vs D_1 , соответственно. Параметры поляризации были рассчитаны по экспериментальным матрицам Мюллера для всех точек измерения. Оба графика имеют большой потенциал для того, чтобы рассматриваться как диагностически значимые и для поддержки гистопатологического анализа рака, поскольку точки, представляющие две различные зоны (здоровую и опухолевую), четко формируют два различных кластера. Значения диаттенуации значительны для обоих участков ткани. Параметр D_2 демонстрирует большой разброс значений для опухолевой зоны по сравнению со здоровой, что позволяет использовать параметр D_2 в качестве переменной принятия решения. Значения же ретардации φ (фазового замедления) демонстрируют большие пространственные флуктуации как в тканях, так и в раковых зонах и не могут предоставить точную диагностическую информацию (см. рисунок 3.17в). Тем не менее, определенную диагностическую информацию все же можно извлечь из средних значений параметра ретардации.

Таблица 3.2 – Средние значения ретардации и их стандартные отклонения

	$\overline{\varphi_1}$	$\sigma_{\overline{\varphi_1}}$	$\overline{\varphi_2}$	$\sigma_{\overline{\varphi_2}}$
Здоровая ткань	27,58°	1,86°	35,12°	4,14°
Опухоль	26,47°	2,24°	29,98°	4,72°

Как видно из таблицы 3.2, зона здоровой ткани вносит большее фазовое замедление по сравнению с опухолевой. Уменьшение значений замедления в злокачественной зоне может быть связано с уменьшением двулучепреломления

ткани из-за разрушения и деформации внеклеточного коллагенового матрикса (ВКМ) развивающимся раком. Стоит отметить, что ретардация также может быть использована для расчета оптической активности из соотношения: $\tan \psi = [(\mathbf{m}_\varphi(1,2) - \mathbf{m}_\varphi(2,1)) \cdot (\mathbf{m}_\varphi(1,1) + \mathbf{m}_\varphi(2,2))^{-1}]$. В представленных исследованиях оптическая активность не была обнаружена как в раковых, так и в здоровых зонах образца толстой кишки.

Далее представлены пространственные 3D графики значений поляризуемости (P) и выходной диаттенуации (D_2) в зонах раковой и здоровой тканей, поскольку эти два поляризационных параметра демонстрируют наиболее различимые поляриметрические отклики для двух зон.

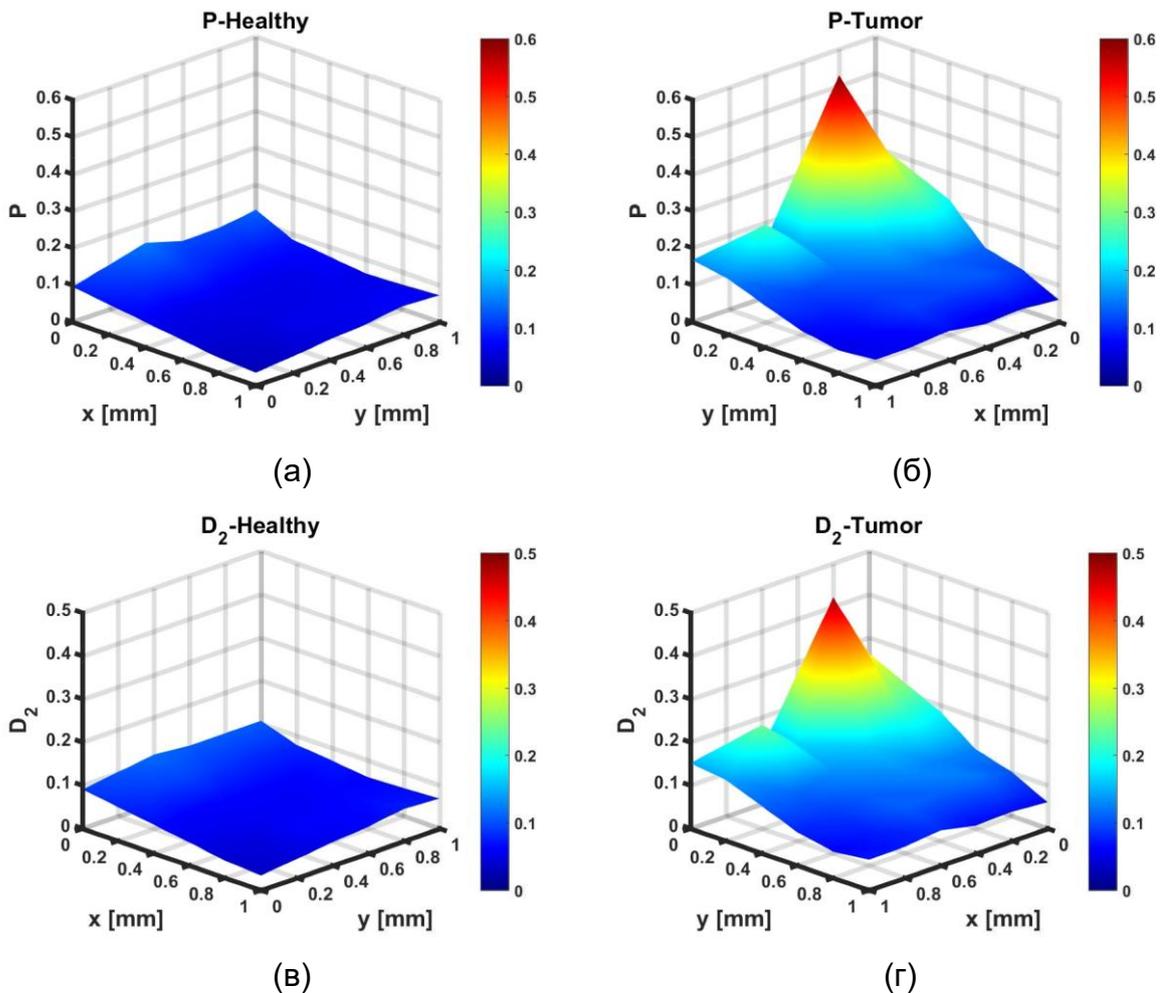


Рисунок 3.18 – Пространственное распределение значений поляризуемости и диаттенуации в обеих тканевых зонах: (а) P здоровой ткани, (б) P опухоли, (в) D_2 здоровой ткани, (г) D_2 опухоли

Как видно из рисунка 3.18, значения P и D_2 сильно отличаются для раковой и здоровой зон образца толстой кишки. Поскольку поляризметрические измерения проводились под углами падения и обнаружения, отличными от нормали к поверхности образца, влияние топографии поверхности усиливается. Последнее может объяснить повышенную диагностическую ценность параметров P и D_2 , на которые, вероятно, влияет поверхностное и/или объемное рассеяние. Действительно, образец толстой кишки, использованный в исследованиях, имел более высокую шероховатость поверхности в зоне опухоли.

Наконец, внутренняя деполяризация может быть охарактеризована пространственным распределением параметра деполяризации Δ . Низкие значения Δ указывают на низкую деполяризацию зондирующего света образцом. Известно, что опухолевые ткани менее деполяризованы, так как морфологические изменения, вызванные раком, нарушают тонкую сложную структуру здоровой ткани и, следовательно, уменьшают рассеяние света и благоприятствуют переходу рассеяния из рэлеевского режима в режим Ми [275]. Следовательно, низкие значения Δ могут быть использованы в качестве оптического индикатора распространения опухоли по всей зоне сканируемой ткани (рисунок 3.19).

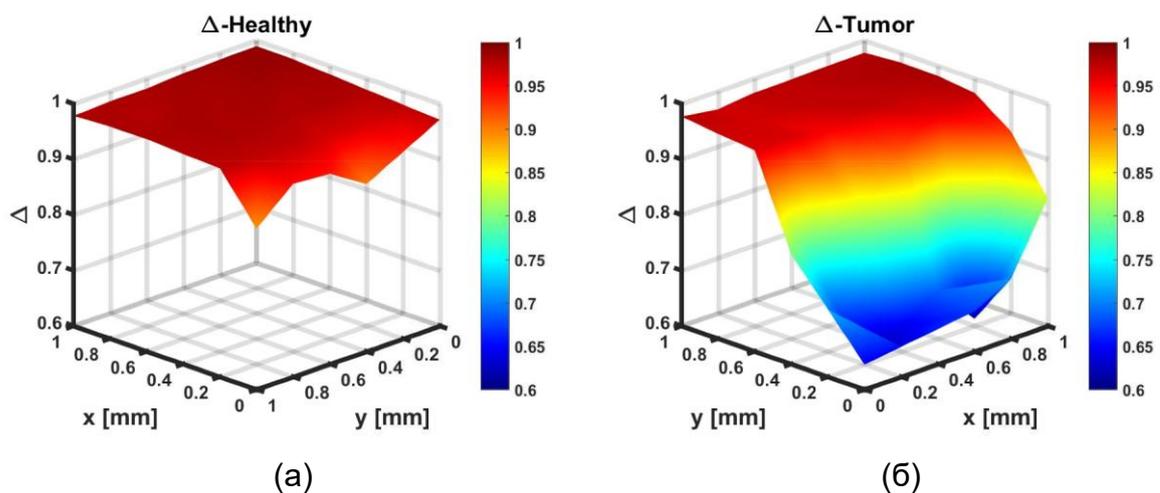


Рисунок 3.19 – Пространственное распределение деполяризации Δ в зонах сканируемой ткани: (а) Δ здоровой ткани, (б) Δ опухолевой ткани.

Также экспериментальные данные были проанализированы с использованием различных метрик деполяризации.

При структурных изменениях в тканях, вызванных злокачественной опухолью, происходит изменение ВКМ, сопровождающееся разрушением коллагеновых швов. Также изменяется эффективный размер составляющих его рассеивающих частиц. Таким образом, поляризационные и деполяризационные свойства тканей неизбежно изменяются при развитии опухолей. По этой причине косвенное измерение поляризационной энтропии S можно рассматривать как репрезентативную величину пространственной неоднородности ткани. Рисунок 3.20 показывает более низкую энтропию для зоны рака по сравнению с зоной здоровой ткани. Точнее, одно и то же пространственное место в пределах раковой зоны характеризуется как более низкой деполяризацией Δ из рисунка 3.19, так и более низкой энтропией S . Следовательно, поляризационная энтропия S может быть хорошим диагностическим показателем расположения и организации внутренней структуры образца.

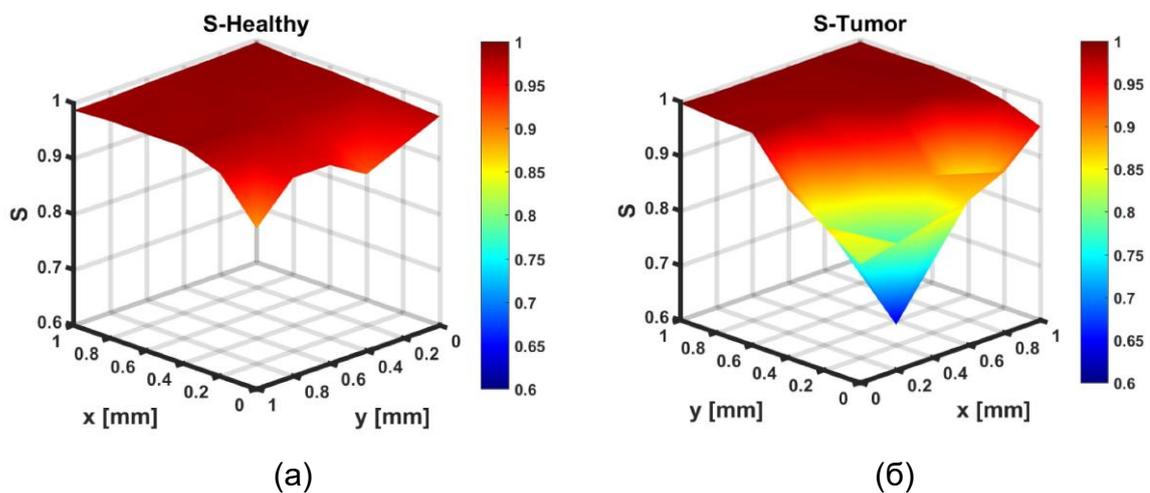


Рисунок 3.20 – Пространственное распределение поляризационной энтропии S в зонах сканируемой ткани: (а) S здоровой ткани, (б) S опухоли

Рисунок 3.21 выявляет две важные особенности для обоих гистологических состояний, а именно более высокую поляриметрическую чистоту и увеличенное значение индекса деполяризации Хили-Бернабеу P_{Δ} для зоны опухолевой ткани по

сравнению со здоровой. В результате зона раковой ткани действует как более слабый деполяризатор по сравнению со здоровой тканью толстой кишки, как обсуждалось ранее. На этом этапе следует провести параллель между деполяризацией Δ и индексом деполяризации P_{Δ} . Следует избегать их взаимозаменяемого использования, поскольку эти параметры происходят из разных пространств деполяризации. Более того, как видно из рисунков 3.19 и 3.21, одна и та же сканируемая область характеризуется противоположными по величине значениями Δ и P_{Δ} .

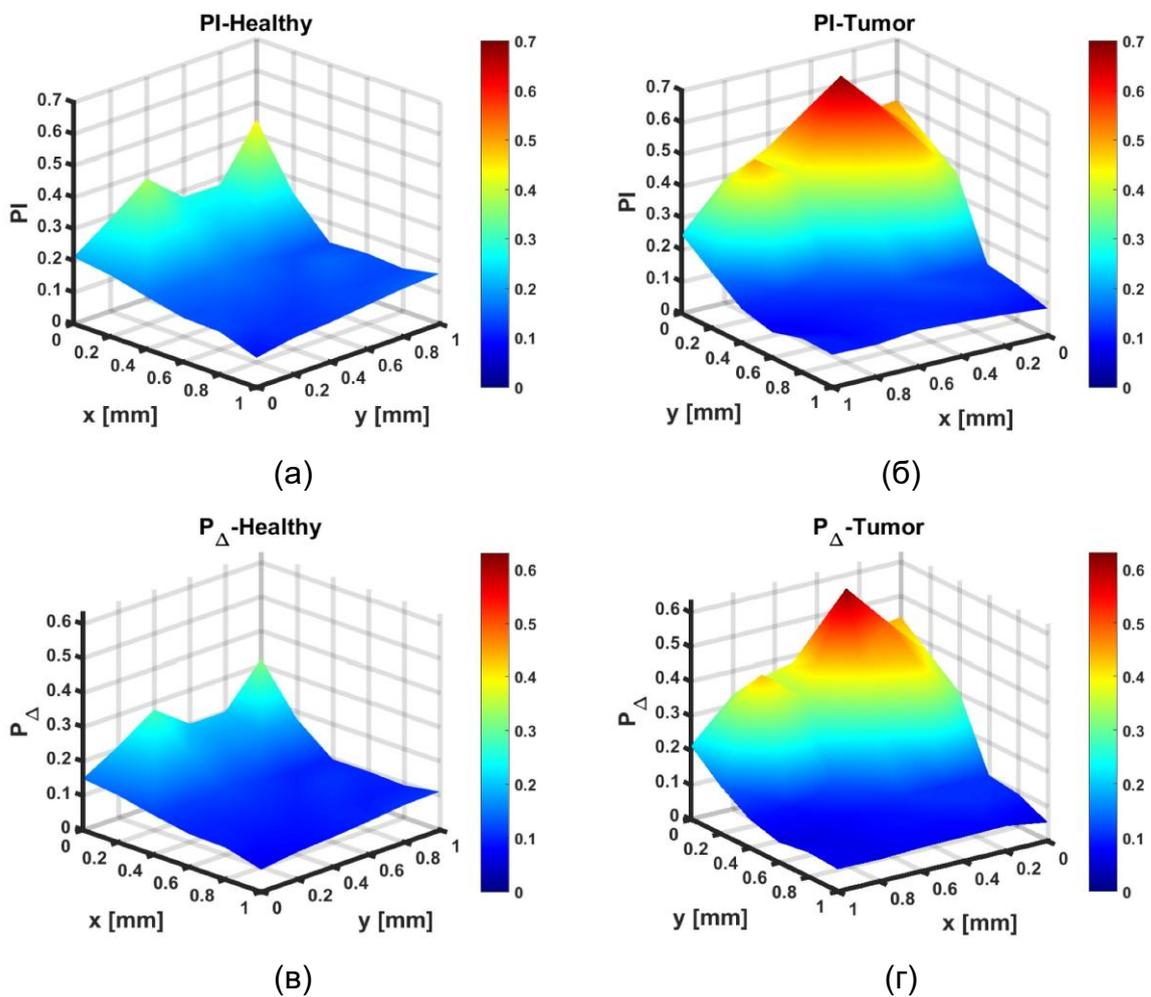


Рисунок 3.21 – Пространственное распределение поляриметрической чистоты PI и индекса деполяризации Гил-Бернабеу P_{Δ} сканируемой зоны ткани: (а) PI здоровой ткани, (б) PI опухоли, (в) P_{Δ} здоровой ткани, (г) P_{Δ} опухоли

Как итог, согласно результатам, как поляризуемость P , так и диаттенуация D , могут быть классифицированы как поляриметрические параметры с высокой степенью чувствительности. Более того, диаттенуация может быть использована в качестве диагностической величины, полученной либо из его чистого значения, либо из симметричного разложения. Все показатели деполяризации указывают на большую деполяризацию и большую пространственную неоднородность для здорового участка, в то время как более высокая поляриметрическая чистота при меньшей деполяризации и неоднородности была выявлена для злокачественной зоны образца толстой кишки. Таким образом, измеряя и раскладывая полные матрицы Мюллера, можно получить больше поляриметрических параметров, потенциально улучшая характеристики анализа образцов и, следовательно, улучшая диагностическую поддержку гистопатологического анализа. При этом расчет набора поляриметрических характеристик потенциально может способствовать созданию классификационной модели на основе алгоритмов машинного обучения и предоставлению клиницистам более точной и комплексной поляриметрической диагностики [310].

3.4.3 Классификация онкологических образцов на основе методов машинного обучения

После анализа исходных данных удалось выделить 20 поляриметрических величин, однозначно описывающих отклик образцов ткани и использованных в дальнейшем в качестве предикторов: $\lambda_{1,2,3,4}$, $P_{1,2,3}$, P_{Δ} , IP , S , D , P , $D_{1,2}$, $d_{1,2,3}$, Δ и $\varphi_{1,2}$. Сначала были рассчитаны средние значения и их стандартные отклонения, при этом для обеих групп дисперсия значения φ_2 оказалось примерно втрое выше, чем для φ_1 , что сделало φ_2 ненадёжным предиктором, и он был исключён. Затем при уровне значимости $p = 0,05$ был применён критерий Шапиро-Уилка, который показал ненормальность распределений всех поляриметрических величин, поэтому далее использовали непараметрические статистические методы и алгоритмы машинного обучения, не требующие нормального распределения данных. Для каждой пары «здоровая ткань – опухоль» применялся критерий Манна-Уитни при

том же α , чтобы выяснить, принадлежат ли выборки различным распределениям. Статистически значимые различия были выявлены только для $\lambda_{1,2}$, P_1 , D , P и $D_{1,2}$. Затем данные были реорганизованы: каждый столбец j представлял поляриметрическую величину, измерения обеих групп объединялись построчно, после чего была добавлена переменная, указывающая состояние ткани (0 – здоровая, 1 – опухолевая). Все количественные параметры, кроме этой метки, были нормированы по формуле $F_n = (x(j) - x_{\min}(j)) \cdot (x_{\max}(j) - x_{\min}(j))^{-1}$, чтобы сделать их безразмерными в интервале $[0,1]$. Для предотвращения высокой корреляции предикторов и мультиколлинеарности Δ , S , P_Δ и IP были исключены, поскольку они выводятся из d_i , λ_i и P_i . Дальнейший анализ уравнения (3.25) показал априори сильную корреляцию между λ_i и P_i , поэтому было сформировано две подмодели: одна, в которой опущены все индикаторы деполяризации P_i , кратко обозначена как «модель *eigenvalue*», а другая, в которой опущены все собственные значения ковариационной матрицы (Эрмитовой матрицы) λ_i , обозначена как «модель *IPP*». При этом предикторы D , P , $D_{1,2}$, $d_{1,2,3}$ и φ_1 были включены в обе подмодели.

Полученные и описанные выше параметры далее были использованы для построения классификаторов на основе различных методов машинного обучения.

На первом этапе для снижения избыточности данных был применен метод главных компонент (РСА). Этот метод снижения размерности данных, преобразующий исходные коррелированные переменные в новый набор некоррелированных переменных (главных компонент), сохраняющих максимальную дисперсию данных. Для каждой подмодели был выполнен собственный анализ, и, как видно из рисунка 3.22а, семь главных компонент сохраняют более 95% общей дисперсии для «модели *eigenvalue*», а шести компонент достаточно для «модели *IPP*». Таким образом РСА можно сочетать с последующей классификацией, используя только нередундантные признаки обеих подмоделей и избегая любых линейно зависимых или сильно коррелированных параметров (все такие признаки сведутся к одной компоненте РСА). Было установлено, что между всеми оценками главных компонент обеих подмоделей

корреляция отсутствует, тогда как 95% дисперсии данных сохраняется (рисунок 3.22б,в). Такой подход повышает итоговую точность классификации.

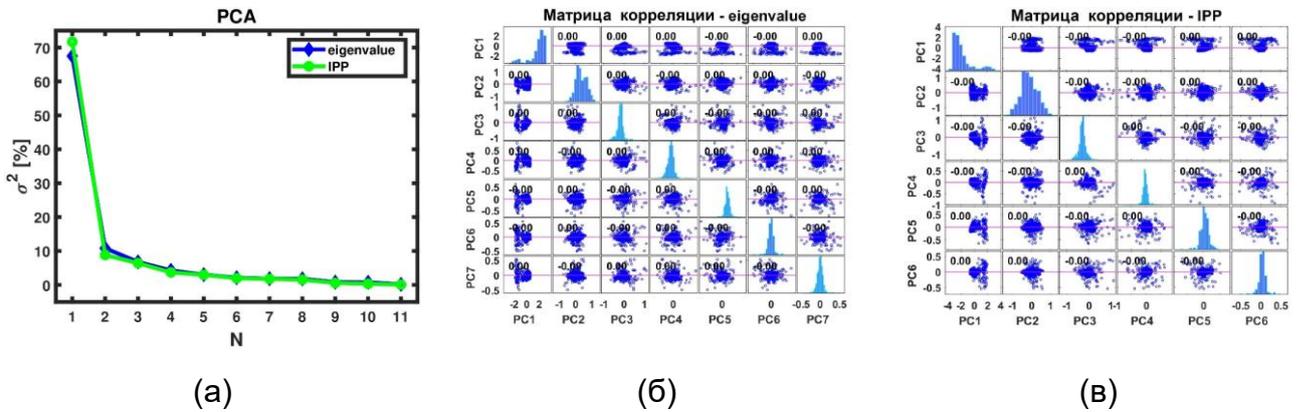


Рисунок 3.22 – (а) PCA для N компонент и соответствующий процент дисперсии σ^2 для обеих подмоделей. Корреляционные матрицы для (б) 7 главных компонент – «модель *eigenvalue*» и (в) 6 главных компонент – «модель *IPP*»

Далее, для целей классификации алгоритмы логистической регрессии, метода случайного леса (*random forest, RF*) и метода опорных векторов (*support vector machine, SVM*) были обучены на наборах данных главных компонент для обеих подмоделей, случайным образом разделенных в пропорциях 85 для обучения и 15 для тестирования. Все модели машинного обучения прошли первоначальную настройку для выбора наилучших гиперпараметров.

Логистическая регрессия использовалась для предсказания вероятности принадлежности области измерений к одному из двух классов наличия или отсутствия опухолевой патологии. В отличие от линейной регрессии, которая предсказывает непрерывные значения, логистическая регрессия выдаёт вероятностную оценку в диапазоне от 0 до 1 благодаря использованию логистической функции (сигмоиды):

$$P(y=1|x) = \sigma(z) = \frac{1}{1+e^{-z}}, \quad (3.28)$$

где $z = w_0 + w_1x_1 + w_2x_2 + \dots + w_px_p$ – линейная комбинация признаков;

w – веса модели, определяющие вклад каждого признака.

Смысл сигмоиды заключается в преобразовании линейной комбинации z в вероятность, принимающую значения между 0 и 1. Для классификации обычно используется порог 0,5: если $P \geq 0,5$, объект относят к одному классу, иначе – к другому.

Обучение модели заключается в подборе весов w , минимизирующих логистическую функцию потерь:

$$L(w) = -\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n [y_i \log(\sigma(z_i)) + (1 - y_i) \log(1 - \sigma(z_i))]. \quad (3.29)$$

Эта функция штрафует модель за отклонение предсказанных вероятностей от истинных значений. Минимизация осуществляется методами оптимизации, такими как градиентный спуск.

В случае *RF* случайно выбиралась подгруппа из $k=N^{1/2}$ предикторов без повторений для создания ансамбля решающих деревьев. Для обеих подмоделей наиболее оптимальным выбором оказалось использование трех предикторов на каждое разбиение. Установка количества деревьев равным 30 позволила достичь той же точности классификации, что и при 500 деревьях, при этом время обучения сократилось на порядок. Без повторений для «модели *eigenvalue*» существует 35 возможных комбинаций предикторов (3 случайно выбранные главные компоненты из 7), а для «модели *IPP*» – 20 комбинаций (3 случайно выбранные главные компоненты из 6), посчитанные как: $C_N^k = N! / (k!(N-k)!)$. Для всех деревьев в ансамбле (включая повторения) общее количество возможных комбинаций предикторов для обучения составляет 4 960 для обеих подмоделей, посчитанное как: $K_N^k = (N+k-1)! / (k!(N-k)!)$. Таким образом, алгоритм RF можно считать более надежным для классификации опухолей, даже если размер набора данных

мал или присутствуют коррелированные предикторы. Ошибка *out-of-bag* (OOB) составила около 5% для «модели *eigenvalue*» и около 11% для «модели *IPP*».

Что касается метода *SVM*, то его основная идея заключается в нахождении оптимальной гиперплоскости, разделяющей классы данных в многомерном пространстве признаков. Для того чтобы найти оптимальную гиперплоскость, необходимо максимизировать расстояние между этой гиперплоскостью и ближайшими точками выборки из обоих классов. Задача *SVM* сводится к следующей задаче оптимизации:

$$\min_{w,b} \frac{1}{2} |w|^2 \quad (3.30)$$

при условии:

$$y_i (w^T x_i + b) \geq 1, \quad \forall i = 1, \dots, n. \quad (3.31)$$

где w – вектор нормали к гиперплоскости;

b – смещение.

Если не все данные являются линейно разделимыми, вводится концепция мягких зазоров, которые позволяют некоторым объектам нарушать ограничение. В этом случае задача оптимизации переписывается с учетом штрафов за ошибки:

$$\min_{w,b,\xi} \left(\frac{1}{2} |w|^2 + C \sum_{i=1}^n \xi_i \right) \quad (3.32)$$

при условии:

$$y_i (w^T x_i + b) \geq 1 - \xi_i, \quad \xi_i \geq 0, \quad \forall i = 1, \dots, n, \quad (3.33)$$

где ξ_i – это переменные зазора (ошибки);

C – это коэффициент, который контролирует баланс между максимизацией зазора и минимизацией ошибок.

Для решения нелинейных задач используется метод ядерных функций, преобразующих исходное пространство признаков в пространство более высокой размерности. Решающая функция принимает вид:

$$f(x) = \text{sign} \left(\sum_{i=1}^n \alpha_i y_i K(x_i, x) + b \right), \quad (3.34)$$

где $K(x_i, x)$ – ядерная функция;

α_i – множители Лагранжа.

Решение задачи сводится к максимизации двойственной функции, что позволяет исключить переменные w и b . Двойственная задача формулируется следующим образом:

$$\max_{\alpha} \sum_{i=1}^n \alpha_i - \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^n \alpha_i \alpha_j y_i y_j K(x_i, x_j) \quad (3.35)$$

при условии:

$$\sum_{i=1}^n \alpha_i y_i = 0, \quad 0 \leq \alpha_i \leq C. \quad (3.36)$$

В данной работе после перекрестной проверки было обнаружено, что полиномиальное ядро третьей степени обеспечивает наилучшую точность классификации для обеих подмоделей. Дополнительная регуляризация C была необходима для введения штрафа за каждую неправильно классифицированную точку данных. Обычно малые значения C приводят к меньшему зазору, низкому смещению и высокой дисперсии модели, и наоборот для больших значений C . После цикла перекрестной проверки оптимальные значения C были установлены равными 1 для обеих подмоделей.

После применения указанных алгоритмов машинного обучения для классификации были использованы различные метрики для оценки производительности классификаторов, включая чувствительность, специфичность, точность, ROC-кривую и площадь под кривой (AUC).

В идеале меньшее количество ошибок приводит к тому, что ROC-кривая приближается к ступенчатому профилю. Поскольку не существует идеальной модели, потери, вызванные ошибочными предсказаниями, всегда остаются значимым фактором и могут быть рассчитаны как $1 - \text{AUC}$. Итоговые показатели всех применённых алгоритмов машинного обучения приведены на рисунке 3.23 и в таблице 3.3.

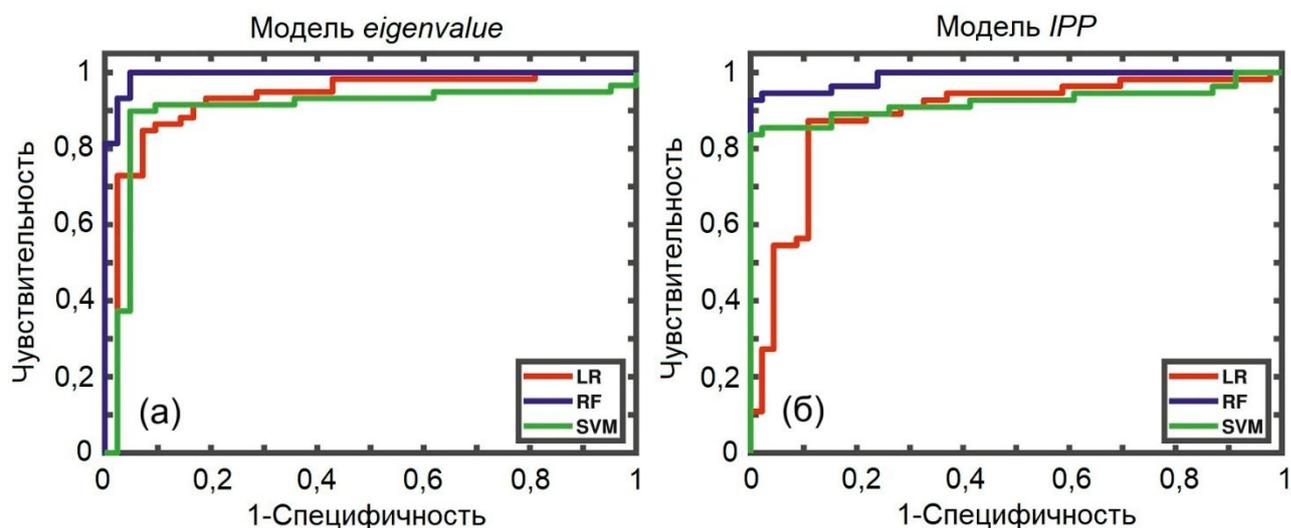


Рисунок 3.23 – ROC-кривые для (а) «модели *eigenvalue*» и (б) «модели *IPP*»

Таблица 3.3 – Сводные результаты эффективности классификаторов

	<i>Se</i>	<i>Sp</i>	Точность	AUC
<i>LR (eigenvalue)</i>	85	91	87	93
<i>LR (IPP)</i>	80	89	84	87
<i>RF (eigenvalue)</i>	100	93	97	99
<i>RF (IPP)</i>	93	98	95	98
<i>SVM (eigenvalue)</i>	92	83	88	90
<i>SVM (IPP)</i>	93	59	77	92

Из графического представления и значений в таблице 3.3 можно оценить производительность обеих подмоделей в классификации опухолевых тканей. В

целом, все алгоритмы, обученные на главных компонентах, обеспечивают надежную точность и значения AUC, близкие к 1. «Модель *eigenvalue*» демонстрирует лучшую производительность по сравнению с «моделью *IPP*», с меньшей ошибкой *OOB* и более высокими диагностическими показателями.

Хотя алгоритм *LR* лучше подходит для оценки вероятности обнаружения опухоли и имеет более высокую специфичность по сравнению с *SVM*, последний демонстрирует более высокую чувствительность и лучше предсказывает здоровый класс. С другой стороны, алгоритм *RF* показал наилучшие результаты для классификации с незначительными потерями и риском ошибочной классификации.

Однако стоит провести параллель между *RF* и *SVM*. Первый может быть вычислен всего с двумя гиперпараметрами – количеством переменных на каждое разбиение и количеством деревьев. Второй, напротив, зависит и сильно чувствителен к выбору ядра и его степени, параметрам регуляризации, а также к выбору опорных векторов и зазоров, что влияет на компромисс между смещением и дисперсией. Кроме того, апостериорные вероятности для обоих классов оказались наиболее различимыми для *RF*, тогда как для *SVM* разница между этими значениями была очень мала, что снижает надежность *SVM* для классификации в данном исследовании [311].

Данное исследование включало небольшое число измерений, поэтому задача классификации сводилась к двум классам (здоровая или опухолевая ткань). При увеличении выборки предложенные методы можно расширить до многоклассовой классификации в том числе с применением методов глубокого обучения.

3.5 Выводы по главе 3

В данной главе были представлены результаты разработки и применения системы Стокс-поляризационной визуализации для анализа биологических тканей, включая фиксированные в формалине парафинизированные (FFPE) образцы рака молочной железы и *ex vivo* образцы рака толстой кишки. Поляриметрический метод продемонстрировал высокую чувствительность к структурным изменениям

тканей, что позволяет рассматривать его как перспективную альтернативу традиционным гистопатологическим методам. Проведенные исследования открывают новые возможности для неинвазивной и высокоточной диагностики онкологических заболеваний, что может существенно улучшить качество медицинской помощи.

Основные выводы и результаты главы можно сформулировать следующим образом:

1. Была создана оптическая система, способная регистрировать полный вектор Стокса и анализировать степень поляризации света, отраженного от биологических тканей. Система показала высокое пространственное разрешение (до 5 мкм) и возможность работы в широком спектральном диапазоне (450-650 нм), что обеспечило детальное изучение микроструктуры тканей.

2. Установлено, что степень остаточной поляризации (DOP) и компоненты вектора Стокса (Q , U , V) являются чувствительными маркерами для различения здоровых и опухолевых тканей молочной железы.

3. Использование сферы Пуанкаре и алгоритма k -средних позволило визуализировать и автоматически классифицировать ткани различных стадий образцов рака молочной железы на основе их поляризационных свойств. Это подтвердило возможность автоматизированной сегментации (цифрового гистологического анализа) изображений с высокой точностью.

4. Циркулярная поляризация показала лучшие диагностические возможности по сравнению с линейной, особенно для выявления злокачественных изменений в тканях толстой кишки. Это связано с её способностью сохранять поляризационную память в мутных средах.

5. Анализ деполяризации, диаттенуации и других параметров, полученных из матриц Мюллера, выявил значимые различия между здоровыми и опухолевыми тканями. Например, опухолевые зоны характеризовались меньшей деполяризацией и более высокой поляриметрической чистотой.

6. Применение методов логистической регрессии, случайного леса и опорных векторов позволило достичь высокой точности классификации (до 97% для случайного леса).

7. Результаты главы подтверждают, что поляризационная визуализация может стать ценным инструментом для ранней диагностики онкологических поражений, сокращения времени анализа и снижения зависимости от субъективной оценки гистологов. Дальнейшие исследования могут быть направлены на расширение методов машинного обучения и адаптацию системы для работы с другими типами тканей.

ГЛАВА 4. ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЭНДОГЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Результаты исследований, представленные во 2-й и 3-й главах, показали, что оксигенация, кровенаполнение, изменение клеточной и тканевой морфологии, являются мощным инструментом оценки патологических изменений тканей. Однако, эти параметры в полной мере не описывают метаболические изменения на клеточном уровне. В этой связи данная глава диссертационного исследования посвящена развитию метода флуоресцентной визуализации, позволяющего изучать изменения в содержании метаболических кофакторов и других эндогенных флуорофоров.

4.1. Физические основы флуоресценции

Основными физическими механизмами взаимодействия оптического излучения с биологическими образцами выступают следующие процессы: поглощение светового излучения, его отражение от поверхности, упругое (известное также как релеевское) и неупругое рассеяние, а также явление люминесценции [312–314]. Следует особо отметить, что люминесценция как физическое явление включает в себя два принципиально различных типа: флуоресценцию и фосфоресценцию [315].

Флуоресценция представляет собой процесс, соответствующий разрешенным оптическим переходам между энергетическими уровнями молекул, для которого характерны два ключевых параметра: высокий квантовый выход излучения и чрезвычайно малое время жизни возбужденного состояния, составляющее порядка наносекунд (нс) [315,316]. В противоположность этому, фосфоресценция возникает в результате спино-запрещенных оптических переходов и отличается существенно более низким квантовым выходом при

значительно большем времени жизни возбужденного состояния, которое может достигать микросекунд (мкс) или даже миллисекунд (мс) [312,315].

Процесс поглощения светового излучения имеет фундаментальную природу и обусловлен электронными переходами молекул из основного энергетического состояния в возбужденное. Количественное описание ослабления интенсивности светового потока при прохождении через образец определенной толщины d дается математической формулой (4.1):

$$I(\lambda) = I_0 10^{-\varepsilon(\lambda)cd} = I_0 e^{-\mu_a d}, \quad (4.1)$$

где $I(\lambda)$ – интенсивность прошедшего света (поток квантов);

I_0 – интенсивность падающего света;

$\varepsilon(\lambda)$ – молярный коэффициент экстинкции;

c – концентрация поглощающих молекул.

В рассеивающих образцах коэффициент поглощения μ_a и коэффициент рассеяния μ_s , не учитываемый в уравнении (1.6), суммируются, что приводит к дополнительному ослаблению прошедшего света.

Флуоресценция возникает после поглощения света и связана с электронным переходом из возбужденного состояния молекулы в основное. Ее интенсивность определяется формулой (4.2):

$$I_f(\lambda) = I_0 (1 - 10^{-\varepsilon(\lambda)cd}) \varphi \frac{\Omega}{4\pi}, \quad (4.2)$$

где φ – квантовый выход флуоресценции;

Ω – телесный угол регистрации изотропного излучения флуоресценции.

В случае тонких образцов, например, монослоев клеток или образцов биопсии, имеющих толщину нескольких микрометров, выражение (4.2) может быть аппроксимировано формулой (4.3):

$$I_f(\lambda) = I_0 \ln 10 \varepsilon(\lambda) c d \varphi \frac{\Omega}{4\pi}. \quad (4.3)$$

Приведенное математическое выражение устанавливает фундаментальную зависимость: величина интенсивности флуоресцентного излучения (I_f) находится в прямой пропорциональной зависимости от двух ключевых параметров - концентрации флуоресцирующих молекул (c) в исследуемом образце и величины квантового выхода (φ) процесса флуоресценции для данных молекул.

При рассмотрении оптических свойств рассеивающих сред необходимо учитывать существенное различие в длинах пробега фотонов, подвергшихся рассеянию, и фотонов, сохранивших первоначальное направление распространения внутри образца. Это принципиальное различие требует соответствующей модификации исходных уравнений (4.2) и (4.3), описывающих процесс флуоресценции. Однако в случае исследования оптически однородных образцов сохраняется первоначальная линейная зависимость между тремя указанными параметрами: интенсивностью флуоресценции, концентрацией молекул и квантовым выходом.

Энергетические характеристики электронных состояний молекулы представляют собой сложные многопараметрические функции, зависящие от пространственных координат атомных ядер, входящих в состав молекулы. Графически эти энергетические зависимости принято изображать в виде так называемых «потенциальных ям», что наглядно продемонстрировано на рисунке 4.1 для двух основных электронных состояний молекулы: основного состояния S_0 и первого возбужденного состояния S_1 . Каждая такая потенциальная яма отражает

изменение энергии молекулярной системы в зависимости от конфигурации атомных ядер.

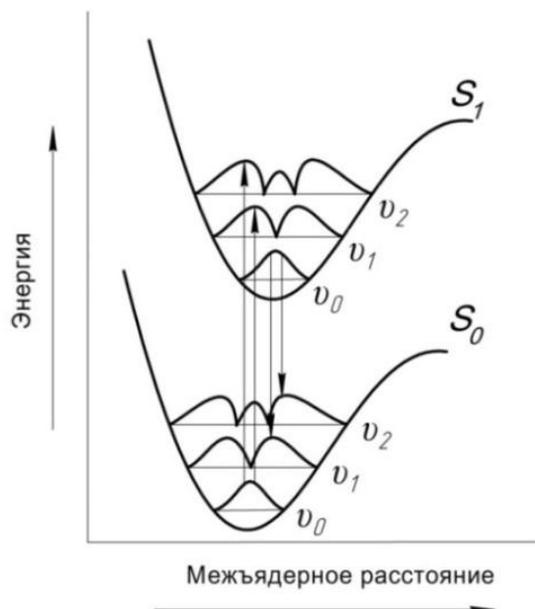


Рисунок 4.1 – Диаграмма потенциальных энергий

В рамках каждой потенциальной ямы существует дискретный набор колебательных энергетических уровней (ν_i), характеризующих колебательные состояния молекулы. Эти колебательные уровни дополнительно подразделяются на более тонкие вращательные подуровни (на рисунке 4.1 не отображены).

Согласно принципу Франка-Кондона, электронные переходы между различными состояниями происходят по «вертикальной» траектории на энергетической диаграмме. Это обусловлено тем, что за чрезвычайно короткое время электронного перехода (порядка 10^{-15} - 10^{-16} с) положения атомных ядер практически не успевают измениться. Наиболее вероятными являются переходы, начинающиеся с основного колебательного уровня: из состояния ν_0 основного электронного состояния S_0 при поглощении света, и из состояния ν_0 возбужденного электронного состояния S_1 при флуоресценции.

Количественно вероятность каждого конкретного перехода определяется двумя ключевыми факторами: квадратом величины дипольного момента перехода

и степенью перекрытия колебательных волновых функций, соответствующих начальному и конечному электронным состояниям молекулы.

Именно комбинация (суперпозиция) множества таких вибронных переходов приводит к образованию широких полос в спектрах поглощения и флуоресценции. Как видно из рисунка 4.1, прямой 0-0 переход между самыми нижними колебательными уровнями различных электронных состояний имеет низкую вероятность реализации, поскольку волновые функции этих состояний практически не перекрываются. Это объясняет наблюдаемый на практике стоксов сдвиг – характерное смещение спектра флуоресценции в длинноволновую область (соответствующую меньшим энергиям) на величину ΔW по сравнению со спектром поглощения:

$$\lambda = \frac{\Delta W}{hc}, \quad (4.4)$$

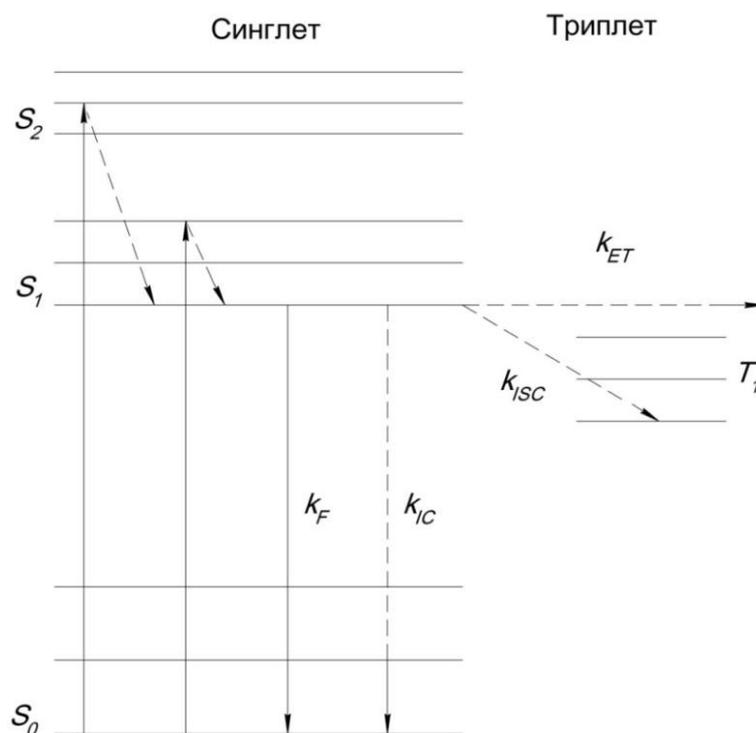
где c – скорость света;

h – постоянная Планка.

Это явление называется стоксовым сдвигом.

При рассмотрении энергетических состояний молекулы без учета зависимости от ядерных координат их можно графически представить с помощью диаграммы Яблонского (рисунок 4.2). Данная схема демонстрирует, что процесс возбуждения молекулы преимущественно начинается с основного синглетного состояния S_0 , после чего происходит переход на различные вибронные уровни возбужденных синглетных состояний S_n (где $n > 1$). Характерной особенностью таких возбужденных состояний является их крайне короткое время жизни. Посредством процесса внутренней конверсии – быстрых безызлучательных переходов, происходящих за фемтосекундные временные интервалы (порядка 10^{-15} с) – возбужденная молекула релаксирует в наиболее стабильное из возбужденных состояний, а именно в первое возбужденное синглетное состояние S_1 . Этот

каскадный переход через промежуточные возбужденные состояния представляет собой важный этап в последующей эволюции возбужденной молекулярной системы.



тонкие линии – радиационные переходы;

пунктирные – безызлучательные переходы

Рисунок 4.2 – Диаграмма Яблонского

Переходы из S_1 могут быть разных типов: флуоресценция с переходом на различные колебательные уровни основного состояния S_0 со скоростью k_f , внутренняя конверсия в состояние S_0 со скоростью k_{IC} , интеркомбинационный переход из синглетного в триплетное состояние T_1 со скоростью k_{ISC} и безызлучательная передача энергии соседним молекулам со скоростью k_{ET} . Все эти скорости суммируются:

$$k = k_f + k_{IC} + k_{ISC} + k_{ET} = \frac{1}{\tau}, \quad (4.5)$$

где τ – время жизни возбужденного состояния S_1 .

Квантовый выход флуоресценции численно равен отношению k_f/k . Следует отметить, что методы оптической спектроскопии позволяют непосредственно регистрировать только излучательные (радиационные) переходы. Однако изменения в скоростях безызлучательных процессов (внутренней конверсии или переноса энергии) могут быть косвенно определены путем точных измерений времени жизни флуоресцентного состояния.

Особого внимания заслуживает тот факт, что радиационный переход $T_1 \rightarrow S_0$ является спиново-запрещенным. Такие переходы наблюдаются лишь у ограниченного круга специализированных молекул. В этом контексте хелатные комплексы лантаноидов представляют особый интерес как высокоэффективные фосфоресцентные маркеры. Их уникальной характеристикой является исключительно долгое время жизни возбужденного состояния (порядка 1 миллисекунды), что позволяет надежно детектировать их сигнал на фоне собственной флуоресценции биологических тканей и клеток [314].

4.1.1 Эндогенные флуорофоры биологических тканей

В области визуализации и диагностики живых тканей всё большее внимание уделяется их собственной автофлуоресценции, а не использованию искусственных флуоресцентных меток. Этот интерес обусловлен развитием высокочувствительных спектроскопических и микроскопических методик [317,318], поскольку детектирование автофлуоресценции представляет собой более сложную задачу по сравнению с регистрацией сигнала от экзогенных маркеров.

Ключевыми эндогенными флуорофорами в биологических системах являются НАДН, флавины, коллаген, эластин, триптофан, тирозин, порфирины, липофусцины и меланин [319]. Эти соединения различаются спектрами поглощения и испускания, квантовыми выходами и временами жизни возбуждённых состояний.

При УФ-возбуждении ($\lambda \leq 300$ нм) наблюдается флуоресценция белков и нуклеиновых кислот, однако квантовый выход последних крайне низок (10^{-4} - 10^{-5}), что соответствует пикосекундным временам затухания. Белковая флуоресценция обусловлена главным образом триптофаном, тирозином и фенилаланином с максимумами поглощения при 280, 275 и 257 нм и испускания в диапазоне 280–350 нм, причём доминирует вклад триптофана.

Коллаген и эластин, возбуждаемые в области 300-400 нм, демонстрируют широкие полосы испускания (400-600 нм) с пиками около 400, 430 и 460 нм. Их флуоресцентные свойства позволяют дифференцировать типы тканей, например, эпителий и соединительную ткань.

Порфирины (протопорфирин, копропорфирин и др.) участвуют в синтезе гемоглобина и цитохромов. В норме их концентрация в тканях невелика, но при порфириях и гемолитических нарушениях уровень этих соединений возрастает. Кроме того, некоторые бактерии в кариозных полостях способны накапливать протопорфирин [320].

Спектральные характеристики основных эндогенных флуорофоров представлены на рисунке 4.3.

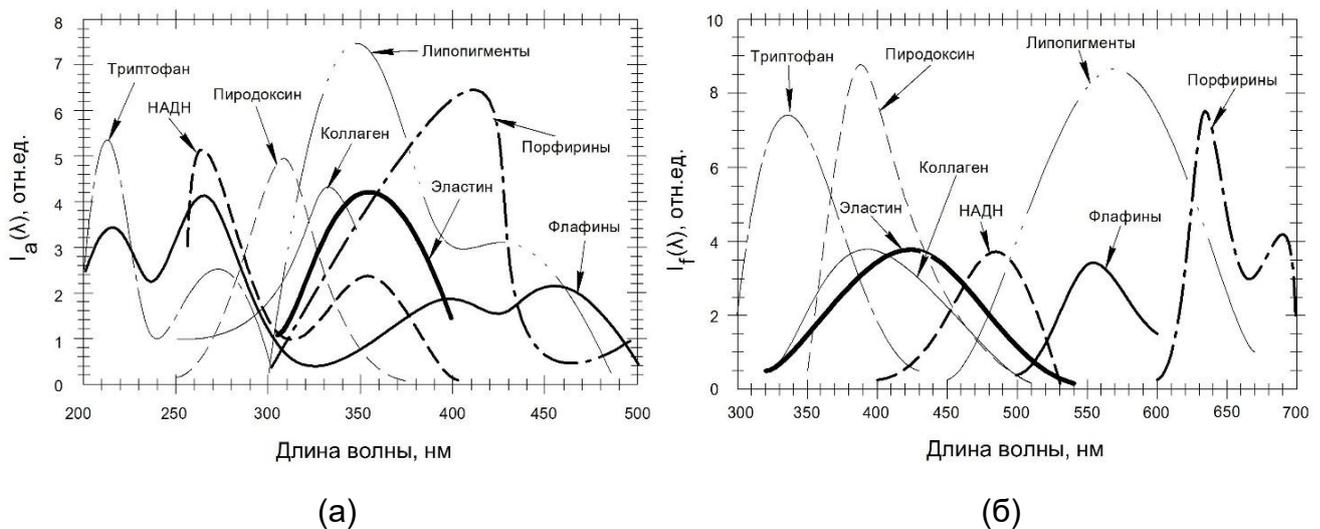


Рисунок 4.3 – Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) основных флуорофоров биоткани

Восстановленная форма кофермента НАДН демонстрирует селективную флуоресценцию при возбуждении в диапазоне 330-370 нм. Основная концентрация НАДН наблюдается в митохондриях, где он участвует в окислительных процессах дыхательной цепи. Нарушения в работе ферментных комплексов этой цепи могут изменять соотношение окисленной НАД⁺ и восстановленной НАДН форм, что отражается на интенсивности флуоресценции. Это свойство позволяет использовать НАДН в качестве маркера для диагностики ишемии, опухолевых процессов и митохондриальных миопатий. Кроме того, флуоресценция НАДН коррелирует с метаболической активностью клеток, что открывает возможности для оценки энергетического обмена при различных патологиях и стрессовых состояниях.

Флуоресценция НАДН (как свободного, так и связанного с белками) зависит от концентрации кислорода, что делает его полезным индикатором метаболической адаптации к гипоксии. Аналогичными свойствами обладает НАДФН – цитоплазматический кофермент со схожими спектральными характеристиками. Однако его вклад в автофлуоресценцию клетки считается незначительным, за исключением случаев резких изменений дыхательной активности.

Флавиновые коферменты (ФМН и ФАД), возбуждаемые при 380 и 450 нм, также участвуют в клеточной автофлуоресценции. В отличие от НАДН, флуоресцирует преимущественно окисленная форма ФАД, что позволяет оценивать редокс-статус митохондрий. Однако в ближнем УФ-диапазоне их сигнал слабее по сравнению с НАДН [320].

Для оценки окислительно-восстановительного состояния клеток используют редокс-отношение (*RR*) – отношение интенсивностей флуоресценции НАДН и ФАД. Этот параметр позволяет отслеживать метаболические изменения без введения экзогенных маркеров [321,322].

Основные спектральные и временные характеристики эндогенных флуорофоров приведены в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Параметры флавин- и НАДН-связанной собственной флуоресценции и других широко распространенных эндогенных флуорофоров:

$\langle \tau \rangle$ – время жизни, $2p$ – 2-х фотонное возбуждение, \uparrow – увеличение, \downarrow – уменьшение [323]

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
НАД(Ф)Н	446	510-700	0,387 3,65	эндогенные вещества глазного дна		[324]
	340	450-470	0,3 2	кожа		[325]
	765 (2p)		0,438 2,286	структурные компоненты кожи (фибропласты кожи)		[326]
	375	397, широкая полоса испускания	0,62 2,33 13,64	сердце (кардиомиоциты человека)		[327]
	375	397, широкая полоса испускания	0,65 1,98 9,34	сердце (кардиомиоциты крысы)		[327]
	335	440	0,4 1,9 5,7	митохондрии здорового сердца		[328]
	740 (2p)	350-550	0,155 0,599 2,154 6,040 0,948	мозг (ткань гиппокампа)	$\downarrow \langle \tau \rangle$ до 0,780 при гипоксии	[329]
	370	420-480	0,58 2,46 9,00 7,23	ЗТЗ-L1 адиipoциты и фибробласты	$\downarrow \langle \tau \rangle$ до 6,73 при высоком уровне глюкозы	[330]

Продолжение таблицы 4.1

1	2	3	4	5	6	7
	740 (2p)	полоса испускания 450±40	1,011	мезенхимальные стволовые клетки человека	↑ $\langle \tau \rangle$ в процессе дифференцировки до 1,165 с на 21-й день	[331]
	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)	[332]
	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)	[333]
	364	435-485	2,51	NET-1 клетки пищевода здорового человека	↓ $\langle \tau \rangle$ в SEG-1 клетках аденокарциномы Баррета: 2,21 нс	[334]
	750 и 790 (2p)	640, узкая полоса испускания	0,5 2,4	культивированные НЕК293Т клетки		[335]
	750 и 790 (2p)	640, узкая полоса испускания	0,45 2,3	гепатоциты		[335]
	750 и 790 (2p)	640, узкая полоса испускания	0,48 2,5	HeLa		[335]

Продолжение таблицы 4.1

1	2	3	4	5	6	7
	750 (2р)	полоса испускания 450±40	1,3	HeLa	↑ $\langle \tau \rangle$ после терапии апоптоза до 3,54 с	[336]
ФАД	446	510-700	0,33 2,81	эндогенные вещества глазного дна		[324]
	370 450	530	5.2 1 (граничная оценка)	кожа		[325]
	438	470, широкая полоса испуска ния	0,15-0,20 0,46-0,94 1,48-3,67	сердце (кардиомиоциты левого желудочка крысы)		[337]
	890 (2р)		не определял ось	грудь (молочная железа мыши, стромальные клетки)	↑ $\langle \tau \rangle$ в инвазированных клетках ↑ в сравнении с первичными клетками опухоли вследствие ↑ τ_1 и ↑ τ_2	[338]
	890 2(р)	490, узкая полоса испуска ния	1,65-1,75 2,05	эпителиальные клетки (защечные мешки)	↑ τ_1 и ↓ τ_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)	[332]
Липофусцины	446	510-700	0,39 2,24	эндогенные вещества глазного дна		[324]
	УФ/видимый свет	570-590	мультиэкспоненциальное	кожа		[325]
Липофусцин А2Е	446	510-700	0,17 1,12	эндогенные вещества глазного дна		[324]

Продолжение таблицы 4.1

1	2	3	4	5	6	7
A2E, A2PE, A2PE-H2	450-490		не оценивал ось	глазное дно свиньи		[339]
Зерна липофусци на	450-490	>530	0,71 3,23	проточная культура глазного дна свиньи		[339]
AGE (конечны е продукты гликирова ния)						
	446	510-700	0,865 4,17	эндогенные вещества глазного дна		[324]
Коллаген	300-340	420-460	0,2-0,4 0,4-2,5	кожа		[325]
	890 (2p)		не оценивал ось	грудь (молочная железа мыши, стромальные клетки)	↓ $\langle \tau \rangle$ вследствие ↓ τ_2 в опухолевых клетках	[338]
Коллаген 1	446	510-700	0,67 4,04	эндогенные вещества глазного дна		[324]
Коллаген 2	446	510-700	0,47 3,15	эндогенные вещества глазного дна		[324]
Коллаген 3	446	510-700	0,345 2,80	эндогенные вещества глазного дна		[324]
Коллаген 4	446	510-700	0,74 3,67	эндогенные вещества глазного дна		[324]
Эластин						
	446	510-700	0,38 3,59	эндогенные вещества глазного дна		[324]
	300-340	420-460	0,2-0,4 0,4-2,5	кожа		[325]
Меланин	446	510-700	0,28 2,4	эндогенные вещества глазного дна		[324]
	УФ/види мый свет	440, 520, 575	0,2 1,9 7,9	кожа		[325]

Продолжение таблицы 4.1

1	2	3	4	5	6	7
	(300-800)			кожа		[340]
	720-930	<700	0,04 и 1,2	ДОФА-меланин		[341]
Кератин	720-930	<700	1,4	волос человека		[342]
Порфирины, PPIX	410	633	1,76 8,14	нормальная слизистая оболочка полости рта человека	↓ τ_1 и ↑ τ_2 в предраковых поражениях слизистой оболочки полости рта: 1,76 и 12,59 (веррукозная (бородавчатая) гиперплазия) 1,65 и 12,97 (эпителиальная гиперплазия) 1,43 и 10,66 (эпителиальная дисплазия)	[342]
	425		15	нормальный уротелий (мочевой пузырь человека)	нет существенных изменений в карциноме <i>in situ</i>	[343]
	398	LP590	3,6 7,4	эпителиальные клетки крысы при культивировании		[344]

Флуоресценция биологических тканей представляет собой сложный процесс, на который влияют не только упомянутые параметры, но и такие факторы, как температура среды, топологическая неоднородность тканей, индивидуальные особенности каждого исследуемого образца и др.

4.2 Визуализация интенсивности эндогенной флуоресценции

4.2.1 Изучение возможности анализа метаболизма биологических тканей

В отличие от флуоресцентных методов исследования метаболизма клеток корректная регистрация флуоресценции биологических тканей может быть связана

с рядом проблем, главные из которых – поглощающее и рассеивающее окружение и перекрывающие спектры флуоресценции флуорофоров. Для оценки возможностей исследования метаболизма тканей был проведен ряд тестовых экспериментов. Как упоминалось ранее, цикл трикарбоновых кислот обеспечивает переносчики электронов в форме никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) и флавинадениндинуклеотида (ФАДН₂), которые отдают свои электроны комплексу I и II соответственно, обеспечивая функционирование дыхательной цепи. Таким образом, оценка количества НАДН и ФАДН₂ в клетках позволяет оценить окислительную активность клеток и тканей и может быть использована для оценки метаболической активности и функционирования комплексов I и II [256]. В условиях ишемии НАДН, производимый гликолизом, накапливается в цитоплазме. Более того, НАДН и ФАДН₂ внутри митохондрий не могут быть окислены комплексом I и комплексом II соответственно. Следовательно, количество НАДН и ФАДН₂ может быть использовано в качестве маркера дефицита кислорода или гипоксии.

С помощью мультимодального спектроскопического подхода была оценена возможность анализа метаболических изменений в тканях поджелудочной железы мыши при моделировании искусственной ишемии [21]. Совместно с методом ФС был использован метод СДО для измерения оксигенации тканей. Волоконно-оптический зонд, содержащий излучающие и собирающие волокна, использовался для измерения интенсивности флуоресценции и диффузного отражения. Оптические волокна (400 мкм) были расположены вокруг центрального волокна, которое доставляло собранный свет к спектрометру. Числовая апертура волокон составляла 0,22.

Канал ФС включал источники света с длинами волн 365 нм и 450 нм. Выбор этих длин волн был обусловлен требованием возбуждения флуоресценции НАДН и ФАД. Свет, собранный из ткани, фильтровался оптическим фильтром для ослабления обратнорассеянного излучения, а затем анализировался ПЗС-спектрометром (Ocean Optics, США) в диапазоне 400-900 нм. Фильтры FGL400 и FGL495 (Thorlabs, Inc. США) использовались для ослабления обратнорассеянного

излучения от источников. Эти фильтры использовались только в канале ФС и затем удалялись при измерении каналом СДО. По соображениям безопасности, а также для поддержания фотообесцвечивания ткани на приемлемом уровне, мощность зондирующего излучения на длине волны возбуждения 365 нм на выходе волоконного зонда не превышала 1,5 мВт. Выходная мощность на длине волны возбуждения 450 нм не превышала 3,5 мВт. Канал СДО включал вольфрамово-галогенный источник света HL-2000-FHSA (Ocean Optics, США) с диапазоном длин волн 360-2400 нм. Оптическая мощность используемой галогенной лампы не превышала 5 мВт. Перед измерениями экспериментальная установка была откалибрована (см. формулу 2.3). Калибровочный спектр измерялся на плоском стандарте диффузного отражения Spectralon (Ocean Optics, США), и регистрировался темновой сигнал для коррекции спектров диффузного отражения и флуоресценции.

Оксигенация тканей определялась через коэффициенты отражения на длинах волн, соответствующих изобестическим и неизобестическим точкам оксигемоглобина, с помощью выражения 2.35 [266–268,345].

Экспериментальное исследование проводилось на клинически здоровых мышцах-самцах линии Balb/c. Мыши были получены из вивария «Андреевка» (Россия). Основные правила содержания и ухода соответствовали стандартам санитарно-эпидемиологических требований к устройству, оборудованию и содержанию экспериментальных биологических клиник, а также «Руководству по уходу и использованию лабораторных животных» и принципам GLP. Эксперимент был одобрен Этическим комитетом Орловского государственного университета (протокол заседания № 10 от 16.10.2017). Во время исследования мыши были анестезированы Золетилом 100 в стандартных дозировках. Животных помещали на специальную фиксирующую платформу в положении на спине. Каждому животному проводили поперечную лапаротомию и обеспечивали доступ к верхнему отделу задней стенки брюшной полости в забрюшинном пространстве. Поджелудочную железу помещали на лабораторный стол с сохранением целостности кровеносных сосудов. Толщина поджелудочной железы мыши

составляла менее 1 мм. Затем на область головки поджелудочной железы накладывали лигатуру из полиэфирной нити, что обеспечивало компрессию основных питающих сосудов. Дополнительно в операционное поле помещали стерильную марлевую салфетку, смоченную 0,9% раствором хлорида натрия.

Спектры как флуоресценции, так и диффузного отражения записывались три раза до лигирования и каждые 5 минут после лигирования в течение часа. В конце исследования животное выводили из эксперимента в соответствии с экспериментальными правилами.

Результаты измерений и расчетов показаны на рисунке 4.4. Рисунок 4.4(а) демонстрирует временную динамику сигнала (длина волны возбуждения 365 нм), зарегистрированную во время моделирования ишемии.

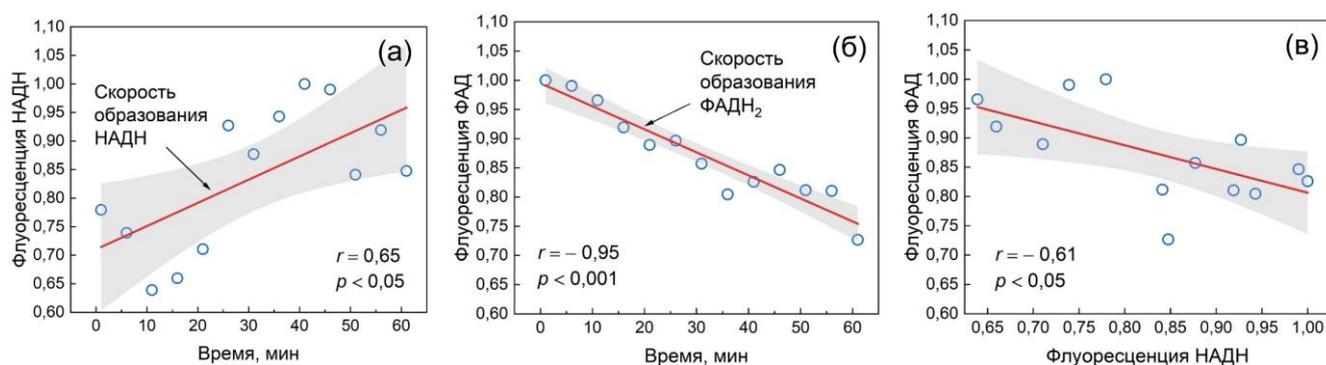


Рисунок 4.4 – Корреляция между (а) флуоресценцией НАДН и временем лигирования, (б) флуоресценцией ФАД и временем лигирования, (в) флуоресценцией НАДН и флуоресценцией ФАД (95% доверительный интервал).

Максимальный уровень флуоресценции принят за 1

Направление изменений сигнала на длине волны возбуждения 365 нм согласуется с предыдущими наблюдениями, демонстрирующими увеличение флуоресценции НАДН во время ишемии [14,346,347]. Скорость продукции НАДН является прямым отражением эффективности цикла трикарбоновых кислот. В условиях гипоксии, при недостатке кислорода, который служит конечным акцептором электронов в дыхательной цепи митохондрий, скорость окисления НАДН ограничивается скоростью, связанной с комплексом I. Течение реакций

окислительного фосфорилирования становится невозможным, в то время как концентрация НАДН увеличивается.

Для удовлетворения потребности в АТФ клетка переключается на анаэробный гликолиз, что приводит к восстановлению НАД⁺ до НАДН с образованием пирувата и АТФ. Отсутствие окисления НАДН через цепь переноса электронов и увеличение концентрации НАДН в результате гликолиза приводит к увеличению интенсивности флуоресценции НАДН в клетке во время гипоксии.

Изменения флуоресценции ФАД во время ишемии были противоположны тем, которые были обнаружены для НАДН (рисунок 4.4(б)). Контрастные изменения, наблюдаемые в флуоресценции НАДН и ФАД во время ишемии после возбуждения на разных длинах волн, также согласуются с наблюдениями, сделанными другими исследователями [346].

Результаты этих измерений также позволяют проанализировать работу митохондриальных комплексов. На рисунке 4.4(в) показана взаимосвязь комплекса I и II при гипоксии. Очевидно, что имеет место более эффективная работа комплекса II и недостаточность комплекса I. Другими словами, максимальная скорость утилизации ФАДН₂ была значительно меньше максимальной скорости утилизации НАДН, что свидетельствует о значительном резервном потенциале комплекса II. Наблюдается 40% увеличение интенсивности НАДН при 25% уменьшении флуоресценции ФАД. Таким образом, изменения флуоресцентной интенсивности коферментов очень чувствительны для обнаружения ранних признаков ишемии ткани.

Также анализировалась взаимосвязь параметров флуоресценции с уровнем оксигенации ткани. Производство клеточной энергии в аэробных условиях зависит от доступности кислорода. Во время искусственно вызванного ишемического состояния кровотока прекращается, что приводит к снижению поступления кислорода. Наклон линии на рисунке 4.5(а) характеризует скорость окислительных реакций в условиях продолжающейся ишемии.

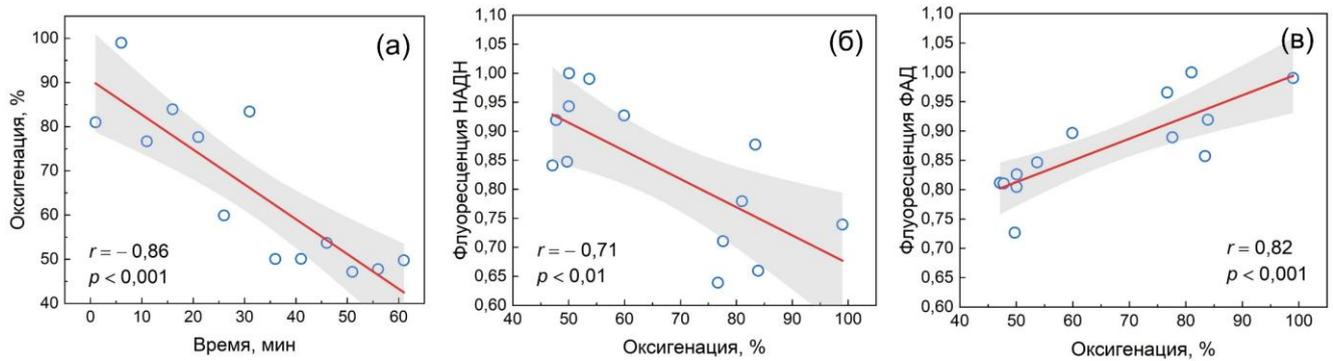


Рисунок 4.5 – Корреляция между (а) оксигенацией тканей и временем лигирования, (б) флуоресценцией НАДН и оксигенацией, (с) флуоресценцией ФАД и оксигенацией (95% доверительный интервал). Максимальный уровень флуоресценции принят за 1

Как видно из рисунка 4.5(а), в течение часа искусственной ишемии произошло двукратное снижение оксигенации. Рисунки 4.5(б) и (в) характеризуют чувствительность дыхательных комплексов к кислороду. Эти рисунки также подтверждают наблюдение более выраженной недостаточности комплекса I.

Для доказательства взаимосвязи полученных данных были также вычислены коэффициенты корреляции Пирсона. Результаты этого анализа представлены на рисунке 4.6.

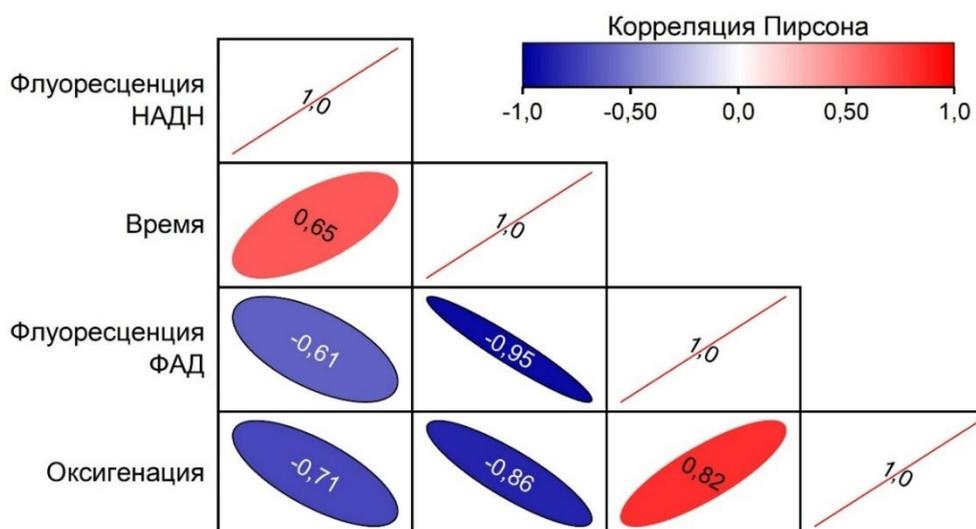


Рисунок 4.6 – Результаты корреляции Пирсона для основных переменных (матрица корреляции Пирсона)

Стоит отметить, что при возбуждении флуоресценции на длине волны 365 нм также происходило частичное возбуждение флуоресценции ФАД. Это наблюдалось по наклону интегрального спектра в области 530-540 нм. В то же время, если предположить, что ФАД может влиять на спектры флуоресценции НАДН, то в условиях гипоксии это должно быть видно, как уменьшение сигнала. Однако было зарегистрировано значительное увеличение сигнала. Наряду с этим увеличением, большие отклонения значений НАДН могут быть объяснены влиянием ФАД. В условиях гипоксии остальные флуорофоры (коллаген, эластин, липо пигменты и т.д.) не претерпевают количественных изменений и, таким образом, не изменяются во время динамических измерений, являясь аддитивной компонентой.

Также были проведены измерения в области ногтевого ложа с использованием флуоресцентной визуализации [348]. Данная область выбрана из соображений возможности визуального контроля с помощью метода видеокапилляроскопии (ВКС) параметров кровотока и зон газообмена (периваскулярных зон). Область ногтевого ложа среднего пальца кисти руки освещалась светодиодным источником излучения с длиной волны 365 нм (мощность 3 мВт) и широкополосным галогенным источником излучения HL-2000 (Ocean Optics, США, 360-2400 нм, мощность ~5-7 мВт). Светосильный микрообъектив с апертурой 0,12 и проекционный длиннофокусный объектив формировали изображение на монохромной ПЗС-матрице видеокамеры. Фильтрация флуоресцентного изображения осуществлялась с помощью длинноволнового отрезающего фильтра. Для динамического наблюдения за изменениями флуоресценции в качестве провокационного воздействия был выбран окклюзионный тест (наложение манжеты на плечевую артерию). Таким образом, создавалось состояние искусственной ишемии. Молекулы НАДН, образованные в шестой реакции гликолиза, в зависимости от наличия кислорода имеют два пути своего дальнейшего превращения: либо остаться в цитозоле и вступить в одиннадцатую реакцию гликолиза (анаэробные условия), либо передать свои восстановительные эквиваленты (электроны) в митохондрии через челночные

системы для окисления в дыхательной цепи цикла Кребса (аэробные условия). При возникновении гипоксии окисление НАДН в митохондриях замедляется, при этом также активируется гликолизный (анаэробный) путь образования НАДН. В этой связи можно предположить, что регистрируемый уровень амплитуды интенсивности флуоресценции при проведении подобного эксперимента должен возрастать.

Исследование включало в себя проведение окклюзии с давлением в манжете 220 мм рт. ст. в течение 1,5 мин. Пара изображений (флуоресценции и диффузного отражения) регистрировалась до и в конце окклюзионного теста. Далее производилась стабилизация и наложение кадров. В результате экспериментальных исследований были получены изображения флуоресценции прекапиллярных зон, нормированные на изображения диффузного отражения (рисунок 4.7). Нормировка позволила учесть влияние изменение поглощающих свойств среды во время проведения окклюзионного теста.

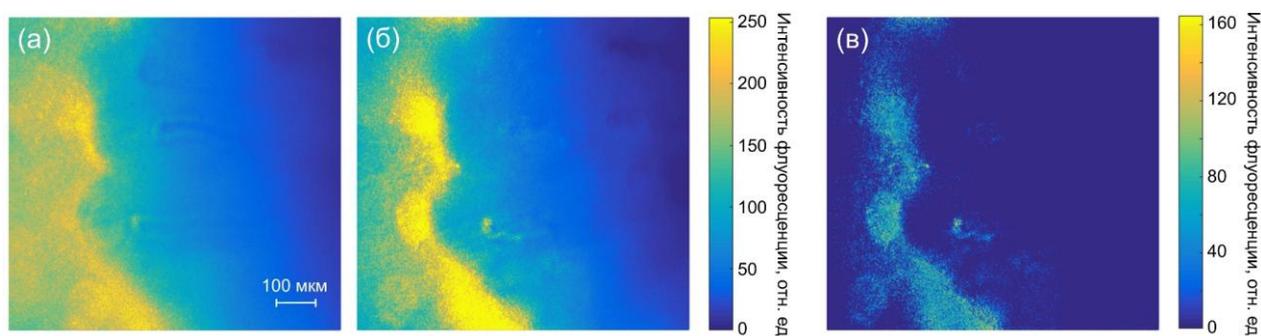


Рисунок 4.7 – Изображения флуоресценции (а) до, (б) в конце окклюзионного теста; (в) разность изображений

Как видно из полученных данных, к концу окклюзионного теста происходит увеличение флуоресценции. Особенно ярко это выражено в области прекапиллярных зон, что может говорить о накоплении НАДН из-за гипоксии тканей.

Таким образом, представленные исследования демонстрируют большой потенциал флуоресцентных измерений для оценки метаболического статуса клеток и тканей и их функционального состояния.

4.2.2 Применение флуоресцентной визуализация для определения границ опухолевого поражения

Известно, что в процессе канцерогенеза клетки претерпевают трансформации, приводящие к изменениям их морфологических и биохимических свойств, которые могут быть обнаружены флуоресцентными методами. Как и при изучении ишемии, особый интерес представляет изучение изменений концентрации в опухолевых клетках таких коферментов как НАДН и ФАД, участвующих в реакциях гликолиза, окислительного фосфорилирования и цикла Кребса. Как было показано выше, максимальная флуоресценция НАДН проявляется в синем свете при воздействии излучением ближнего ультрафиолетового диапазона (пик возбуждения флуоресценции 365 нм), в то время как флуоресценция ФАД проявляется в зеленом свете при возбуждении синим излучением, преимущественно с длиной волны 450 нм [349]. Проведенные клинические исследования НАДН и ФАД показали, что изменения флуоресценции этих коферментов тесно связаны с патологическими процессами в тканях [320,350]. Активная пролиферация в условиях гипоксии вынуждает опухолевые клетки переходить на гликолитический тип метаболизма. Так, изменение концентраций НАДН в клетках при гипоксии объясняется отсутствием окисления через электронно-транспортную цепь [12,351]. В условиях аномальной метаболической активности опухолевых тканей также наблюдаются изменения флуоресценции ФАД [352], что по сравнению со здоровой тканью также может указывать на рост опухоли [353]. Также известно, что при онкологических заболеваниях наблюдаются процессы аномально повышенного накопления порфиринов в пораженной ткани, связанные со специфическими метаболическими особенностями опухолевых клеток [354,355]. Таким образом, вклад перечисленных флуорофоров (НАДН, ФАД, порфирины) в спектры эндогенной флуоресценции находится в тесной зависимости от метаболического статуса ткани, что определяет актуальность их изучения при патологических процессах.

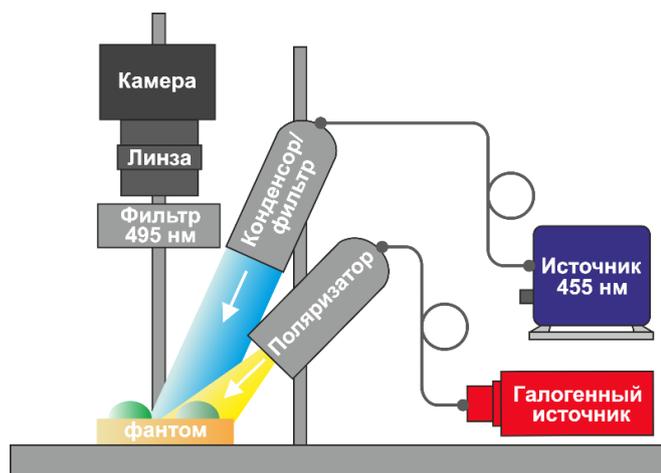


Рисунок 4.8 – Схема экспериментальной установки визуализации интенсивности флуоресценции

Для проведения исследований с целью выявления онкологической трансформации в тканях путем использования метода флуоресцентной визуализации была использована экспериментальная установка флуоресцентной визуализации, схема которой представлена на рисунке 4.8.

Канал возбуждения эндогенной флуоресценции включал светодиод LLS-455 (455 нм; Ocean Optics, USA). Излучение, проходя через конденсор и полосовой фильтр MF445-45 (Thorlabs, USA), формировало узкую полосу возбуждения, снижая вклад флуоресценции иных флуорофоров. Диаметр пятна освещения задавался в диапазоне 1-3 см.

Канал регистрации содержал оптические фильтры FGL495 и FGL610 (Thorlabs, USA) с граничными длинами волн 495 нм и 610 нм, которые подавляли обратное рассеяние возбуждающего света и пропускали соответствующие полосы флуоресценции к детектору, а также монохромную ПЗС-камеру 340M-USB (Thorlabs, USA) с диаметром поля зрения объектива 2,5 см.

Для дополнительных контрольных измерений методом флуоресцентной спектроскопии использовался многофункциональный лазерный диагностический комплекс ЛАКК-М (НПП «ЛАЗМА», Россия). Этот прибор обеспечивал возбуждение флуоресценции на длинах волн 365 и 450 нм и был оснащён оптоволоконным зондом диаметром 3 мм (волокна 400 мкм, NA = 0,22). Спектры регистрировались встроенным спектрометром в диапазоне 340-800 нм.

Кроме того, для получения изображений в белом свете и их сравнения с флуоресцентными изображениями применялся стабилизированный широкополосный источник излучения SLS201L-M (Thorlabs, США) с диапазоном 360-2600 нм.

Исследования проводились на лабораторных мышах линии BDF (C57Bl6xDBA) с привитым штаммом гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) H33 в правую часть средней доли печени (100 мкл, 50 тыс. клеток). Исследования были одобрены Этическим комитетом ОГУ имени И.С. Тургенева (протокол №12 от 6.09.2018) и проводились в соответствии с принципами GLP. Оперативное вмешательство, препарация тканей, визуальная и пальпаторная оценка онкопатологии печени были проведены врачом-хирургом. Во время исследования мышь была подвергнута анестезии препаратом Золетил 100 (Vibrac, Франция) в стандартных дозировках. Животное размещалось на специальной фиксирующей платформе в положении на спине. Для каждого животного была сделана поперечная лапаротомия и производился доступ к печени. Затем животное помещали под оптическую систему для визуализации исследуемой области. После окончания исследования животное выводили из опыта в соответствии с правилами проведения экспериментов. Методология исследования предполагала пошаговую регистрацию изображений пораженной печени лабораторной мыши сначала в белом свете без светофильтров, а затем с использованием источника с длиной волны 450 нм и оптических фильтров для получения флуоресцентных изображений. Перед матрицей камеры устанавливали и поочередно меняли светофильтры с длинами волн среза 495 и 610 нм и проводили регистрацию флуоресцентных изображений. Измерения повторяли 3 раза. Полученные результаты обрабатывали на персональном компьютере с помощью программного обеспечения в среде MATLAB.

В ходе исследований были получены изображения органов двух лабораторных животных с экспериментальной злокачественной опухолью печени. На рисунках 4.9 и 4.10 представлены изображения в белом свете (а), флуоресцентные изображения с использованием ослабляющего светофильтра на

495 нм (б) и флуоресцентные изображения с использованием ослабляющего светофильтра на 610 нм (в).

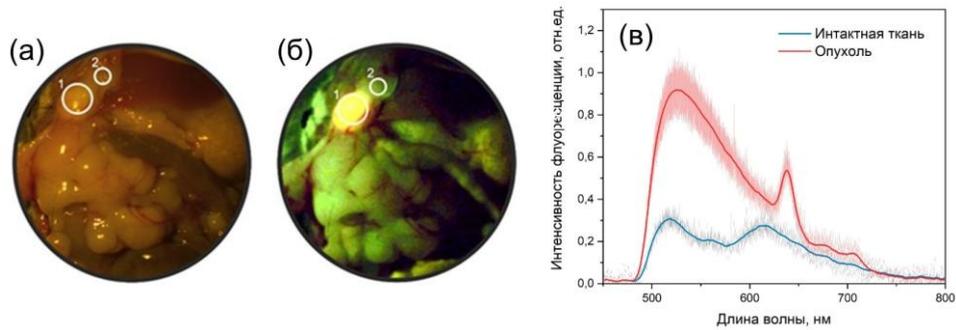


Рисунок 4.9 – Изображения печени мыши №1: а) в белом свете, б) флуоресцентное изображения с использованием светофильтра на 495 нм. (в) Зарегистрированные спектры флуоресценции

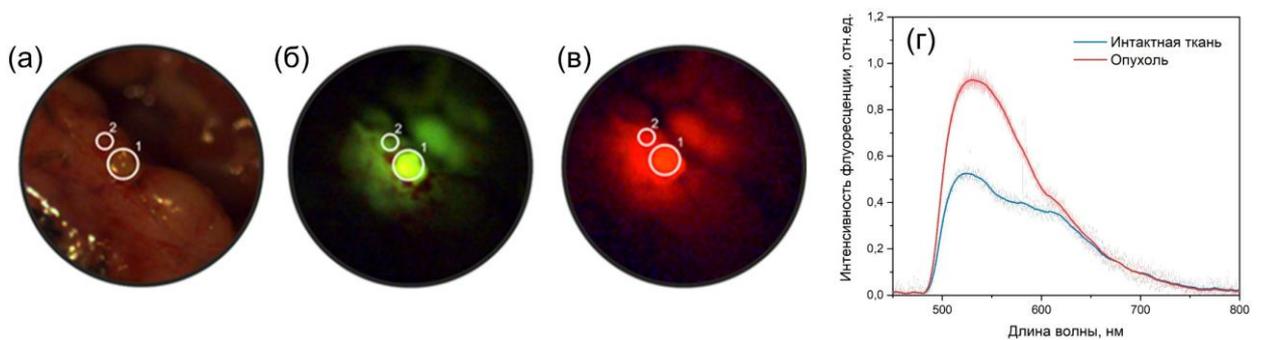


Рисунок 4.10 – Изображения печени мыши №2: (а) в белом свете, (б) флуоресцентное изображения с использованием светофильтра на 495 нм, (в) флуоресцентное изображения с использованием светофильтра на 610 нм. (г) Зарегистрированные спектры флуоресценции

Области, выделенные кругом с цифрой 1, соответствуют локализации опухолевого очага; области, выделенные кругом с цифрой 2, соответствуют окружающим тканям. При использовании фильтра с длиной волны 495 нм возможна визуализация преимущественно флуоресценции в диапазоне 500-540 нм, а при использовании фильтра с длиной волны 610 нм происходит отчетливое контрастирование флуоресценции в диапазоне 620-640 нм. Отмечается, что для мыши №1 были получены флуоресцентные изображения только при

использовании светофильтра с длиной волны 495 нм и диаметром области зондирования лазером около 3 см. В ходе анализа первоначальных изображений было замечено, что опухоль приобрела не зеленый цвет, характерный для пика флуоресценции ФАД (около 530 нм), а желтый, что предположительно было связано в том числе со значительным накоплением порфиринов в очаге опухоли и, таким образом, сложением флуоресценции ФАД и флуоресценции порфиринов (флуоресценция в диапазоне 620-640 нм), в связи с чем были внесены изменения в протокол экспериментальных исследований и экспериментальную установку для проверки данной гипотезы. Таким образом, для мыши №2 были получены изображения при использовании двух светофильтров с диаметром области зондирования около 1 см. Значения интенсивности отражения и флуоресценции по областям, выделенным на рисунках 4.9 и 4.10, в дальнейшем были усреднены для сравнения данных от опухолевого очага и окружающих тканей, получаемых в белом свете и при флуоресцентной визуализации.

Было установлено, что в то время, как относительный контраст ($C = |I_1 - I_2| / (I_1 + I_2)$) между опухолью и интактной тканью в белом свете составил 0,074, при использовании флуоресцентной визуализации значение данного параметра составило 0,45 для изображения с фильтром 495 нм и 0,16 с фильтром 610 нм, что позволяет более четко различить очаг опухоли и ее границы. Увеличение интенсивности флуоресценции в злокачественных тканях по сравнению с окружающими тканями на изображениях, полученных с использованием фильтра 495 нм, может свидетельствовать об изменениях содержания эндогенных флуорофоров, которые в свою очередь обусловлены метаболическими нарушениями, сопровождающими процесс роста опухоли.

Повышенная интенсивность флуоресценции у мыши №2 при использовании фильтра 610 нм указывает на присутствие повышенного содержания порфиринов, что также связано с активным развитием опухоли [356], так как ряд исследователей отмечает, что клетки злокачественных тканей проявляют тенденцию к более активному синтезу и накоплению порфиринов, в частности протопорфирина IX [357,358]. На полученных изображениях видно, что для мыши №2 при

использовании фильтра 495 нм не проявился выраженный желтый цвет очага опухоли, в связи с чем можно предположить, что увеличение флуоресценции порфиринов для мыши №1 составило бы большее значение, чем для мыши №2. Также по полученным изображениям можно судить о том, что процессы канцерогенеза протекали индивидуально в каждом из лабораторных животных, что также следует принять во внимание при планировании и проведении дальнейших экспериментальных исследований.

Таким образом, полученные изображения и рассчитанная разница в соотношении средней интенсивности в опухолевой/интактной ткани свидетельствуют о высокой чувствительности метода флуоресцентной визуализации к наличию злокачественных изменений в тканях по сравнению с регистрацией изображений в белом свете. В зависимости от соотношения интенсивностей флуоресценции опухоли и окружающих тканей возможно более точное определение мест накопления различных флуорофоров в структуре ткани исследуемого органа.

Проведенные исследования показали, что разработанная система флуоресцентной визуализации позволяет в реальном времени получать информацию о наличии злокачественных клеток по линии резекции при онкохирургических операциях. Внедрение этой технологии в клиническую практику способно повысить эффективность хирургических вмешательств: сократить время операции и снизить вероятность ложноотрицательных результатов при определении границ резекции.

4.3 Визуализация времени жизни флуоресценции в частотной области

4.3.1 Расширение возможностей поляриметрической системы с помощью регистрации времени жизни флуоресценции

Как видно из представленных результатов, регистрация интенсивности флуоресценции действительно позволяет изучать метаболизм тканей через измерение интенсивности флуоресценции определенных молекул, которые

участвуют в клеточном метаболизме. Однако визуализация времени жизни флуоресценции может предоставить гораздо больше информации и имеет ряд преимуществ, включая меньшую зависимость от поглощающего окружения флуоресцирующих молекул, фотообесцвечивания, а также возможность разрешения различных состояний молекул (например, свободной формы НАДН и формы НАДН, связанной с белками) и т.п.

В рамках диссертационного исследования была адаптирована сканирующая система визуализации, представленная в 3-й главе и на рисунке 3.3, для измерения времени жизни флуоресценции в частотной области. Основой такого подхода является возбуждение образца модулированным по интенсивности излучением заданной частоты и анализ отклика флуоресцентного сигнала в частотной области. Интенсивность флуоресценции колеблется с той же угловой частотой что и возбуждение, но с фазовым сдвигом и с ослабленной модуляцией, обусловленной конечным временем жизни флуоресценции. Одним из основных преимуществ реализации измерений времени жизни в частотной области по сравнению с методами во временной области, является скорость сбора данных, что делает частотную область более предпочтительной техникой для измерения быстрых динамических процессов. Однако использованию данного подхода посвящено намного меньше исследований. В разработанной в диссертационной работе системе в качестве источника оптического излучения был использован описанный ранее суперконтинуумный лазер в сочетании с акустооптическим фильтром, обеспечивший длину волны возбуждения флуоресценции 450 нм. Частота следования импульсов лазера 40 МГц и длительность импульса ~150 пс позволили провести измерения времени жизни флуоресценции с пороговым значением порядка 1 нс. Для отсекающего обратного рассеянного излучения возбуждения использовался флуоресцентный фильтр 490 нм. В качестве детектора использовался фотоумножитель PMTSS (Thorlabs, США) совместно с трансимпедансным усилителем TIA60 (Thorlabs, США). Для регистрации задержки фазового сдвига между импульсами возбуждения и регистрируемыми импульсами флуоресцентного излучения использовался высокоскоростной

синхронный усилитель на программно-конфигурируемой аппаратной платформе Moku:Lab (Liquid Instruments, США).

Система была использована для оценки FFPE образцов рака молочной железы, представленных ранее в третьей главе. Типичные примеры соответствующего гистологического среза и полученные изображения времени жизни флуоресценции и интенсивности флуоресценции приведены на рисунке 4.11.

В данной серии экспериментов регистрация времени жизни флуоресценции осуществлялась с измерением фазовой задержки φ между сигналом флуоресценции и сигналом модуляции возбуждения флуоресценции с частотой ω в приближении модели затухания флуоресценции по экспоненциальному закону, которая дает среднее значение времени жизни согласно выражению:

$$\tau_{\varphi} = \omega^{-1} \tan(\varphi). \quad (4.7)$$

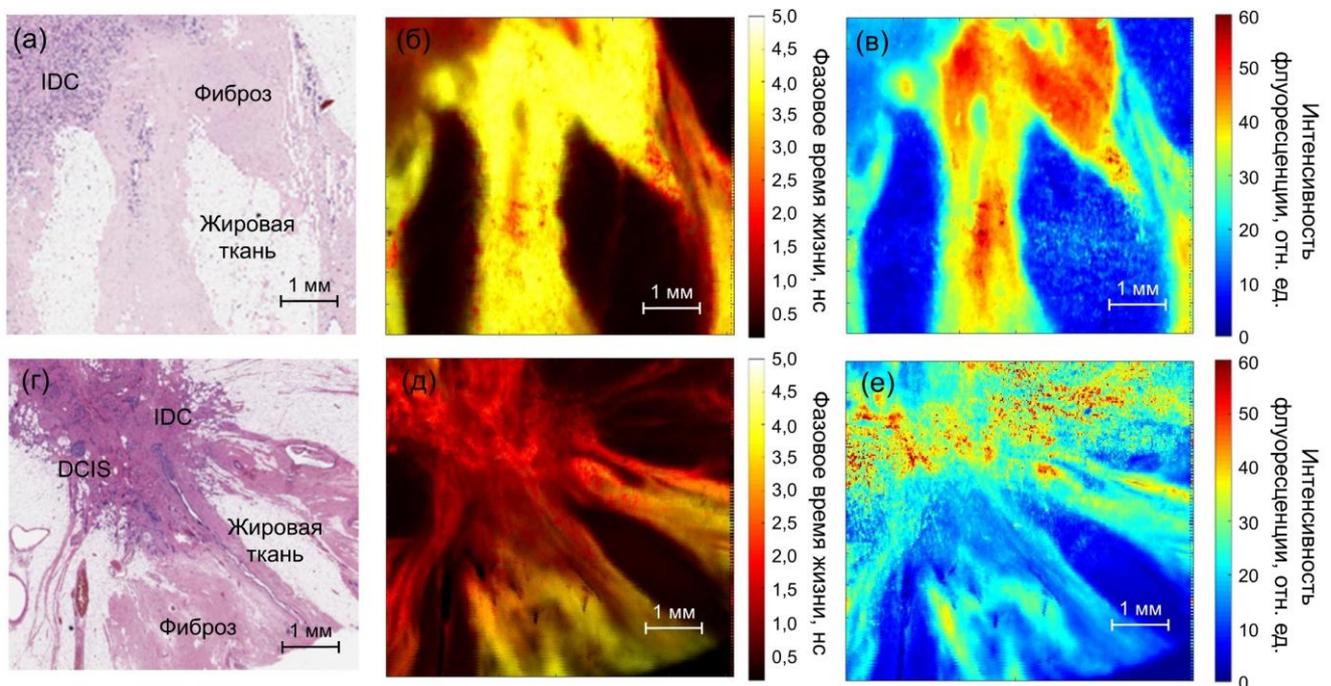


Рисунок 4.11 – Визуализация времени жизни флуоресценции образцов ткани молочной железы: (а,г) гистология; (б,д) фазовое время жизни флуоресценции; (в,г) интенсивность флуоресценции

Дополнительно при частотном подходе возможно рассчитать модуляционное время жизни через измерение индекса демодуляции m :

$$\tau_m = \omega^{-1} \sqrt{\frac{1}{m^2} - 1}. \quad (4.8)$$

Злокачественные участки ткани демонстрировали значительно более низкое время жизни флуоресценции (опухоль: $\tau_\phi = 1,7 \pm 1,3$ нс, доброкачественный фиброз: $\tau_\phi = 4,3 \pm 1,8$ нс, $p < 0,01$, $n = 6$). Напротив, данные об интенсивности флуоресценции не позволили надежно отличить опухолевую ткань от доброкачественного фиброза. Повышенное время жизни флуоресценции в фиброзной ткани по сравнению с опухолевой обусловлено, по всей видимости, преобладанием коллагена с длинным временем жизни. Результаты исследований также показали, что время жизни флуоресценции и поляризационные измерения могут взаимно дополнять друг друга, повышая общее качество и надежность гистопатологического анализа раковых образцов.

4.3.2 Широкопольная визуализация времени жизни флуоресценции НАДН

Хотя предложенный подход визуализации времени жизни флуоресценции на базе поляриметрической системы позволил значительно расширить её диагностические возможности без использования дорогостоящих компонентов, необходимость поточечного сканирования образца, ограничивает её потенциальное применение. При этом показанные различия во времени жизни флуоресценции в FFPE образцах в первую очередь отражают структурные и белковые особенности ткани, а не её активный метаболизм.

В этой связи, был разработан метод широкопольной (полнокадровой) визуализации времени жизни флуоресценции в частотной области на основе КМОП-камеры с возможностью модуляции сигнала и были проведены исследования по апробации системы для регистрации времени жизни флуоресценции метаболических кофакторов НАДН и ФАД.

На первом этапе была разработана микроскопическая система для оценки возможностей камеры (рисунок 4.12). Система была собрана на основе модулируемого источника лазерного излучения 375 нм и камеры pco.FLIM (PCO AG, Германия) с модуляцией сигнала в частотном интервале 5 кГц-40 МГц, что обеспечивает регистрацию времени жизни в диапазоне от 1 нс до 100 мкс. Детектор камеры имеет рабочий спектральный диапазон 370-780 нм, с максимальной квантовой эффективностью в 39% при длине волны 520 нм. Камера была подключена к инвертированному биологическому микроскопу IX73 (Olympus, Япония) с 40× объективом.

Важным дополнительным преимуществом рассматриваемого подхода в частотной области является возможность визуализировать и интерпретировать сложные многокомпонентные затухания флуоресценции без необходимости подбора экспоненциальных моделей на основе фазорного подхода (анализа комплексных амплитуд).



Рисунок 4.12 – Микроскопическая система визуализации времени жизни флуоресценции

Такой подход переводит анализ из временной области в плоскость амплитудно-фазовых соотношений сигнала, позволяя оперировать понятиями

фазового сдвига и степени модуляции вместо прямого анализа многокомпонентных экспоненциальных кривых. Фазор можно декартово разложить на G- и S-компоненты, соответствующие действительной и мнимой части его комплексного представления. Эти компоненты вычисляются из нормированных косинусной и синусной составляющих флуоресцентного сигнала:

$$\begin{aligned} G_{i,j}(\omega) &= m_{i,j} \cos(\varphi_{i,j}), \\ S_{i,j}(\omega) &= m_{i,j} \sin(\varphi_{i,j}). \end{aligned} \quad (4.9)$$

В качестве объекта исследования была использована культура клеток гепатоцеллюлярной карциномы мыши Н33. Клетки культивировали в модифицированной среде DMEM, дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой, пенициллином и стрептомицином, при 37 °С, 100% относительной влажности, в атмосфере, содержащей 5% CO₂ и 95% воздуха.

Для моделирования изменений метаболизма в культуре клеток Н33 использовались известные фармакологические агенты – дегидроэпиандростерон (ДНЕА), йодуксусную кислоту (IA), карбонилцианид-4-(трифторметокси)фенилгидразон (FCCP) и ротенон. ДНЕА является ингибитором глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PDH), ограничивающим скорость в пентозофосфатном пути. IA является ингибитором гликолиза, действующим в первую очередь на фермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, который катализирует превращение глицеральдегид-3-фосфата в высокоэнергетическое фосфатное соединение, 1,3-бисфосфоглицерат с восстановлением НАД до НАДН. FCCP является разобщающим агентом митохондриальной цепи переноса электронов. FCCP может нарушить синтез АТФ путем отсоединения протонного градиента, генерируемого митохондриальной мембраной. Ротенон действует как сильный ингибитор комплекса I дыхательной цепи митохондрий.

Измеренные клетки включали контрольную группу ($n=9$), одну, обработанную IA (20 мкм, $n=4$) за 2 часа до измерений, и одну, обработанную ДНЕА (10 мкм, $N=4$) за 15 минут до измерений. Измерения включали регистрацию

сигнала базовой флуоресценции, сигнала флуоресценции после добавления FCCP (0,2 мМ) и ингибитора комплекса I ротенона (0,02 мМ). Измерения длились 15 минут.

Реализация измерений времени жизни флуоресценции в диапазоне значений от 0,4 до 10 нс требует предварительной калибровки измерительной установки для компенсации всех временных задержек оптического сигнала. Система визуализации была откалибрована на свежем 0,1 мМ растворе НАДН. Данная калибровка позволяет установить значение нулевой фазы, относительно которой осуществляется измерение задержки фазы модулированного сигнала при регистрации флуоресценции в области поля зрения.

Репрезентативные примеры фазовых графиков автофлуоресценции, полученных из раствора НАДН и клеток ГЦК после процедур калибровки, показаны на рисунке 4.13а и б, соответственно.

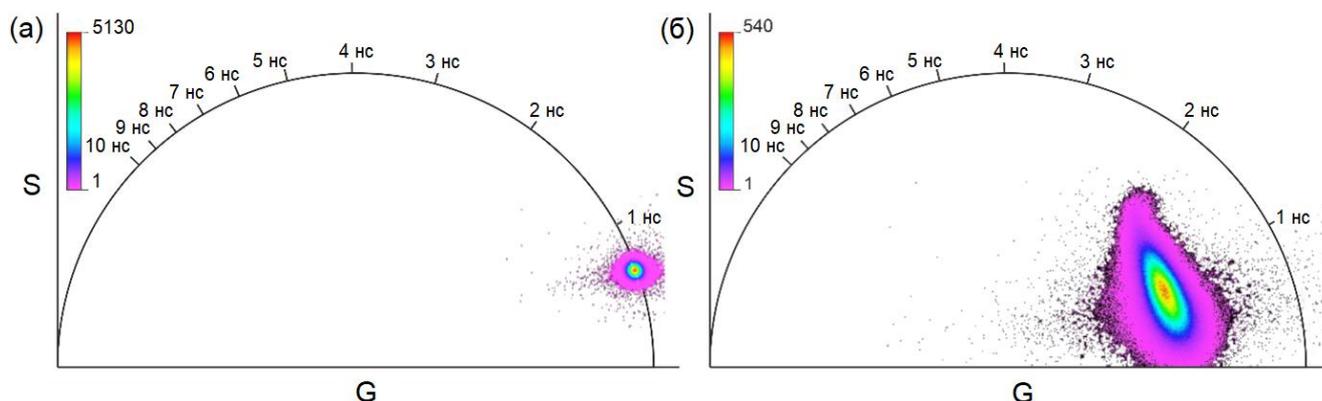


Рисунок 4.13 – Репрезентативные примеры фазовых графиков автофлуоресценции, зарегистрированной на (а) растворе НАДН и (б) в клетках гепатоцеллюлярной карциномы Н33

Распределение точек на полуокружности предполагает одноэкспоненциальное затухание измеренного сигнала от раствора НАДН. Распределение точек данных на изображениях, полученных из клеток Н33, имело форму овала внутри полуокружности, что указывает на многоэкспоненциальное затухание во временной области и наличие нескольких независимых времен жизни.

На рисунке 4.14 показаны результаты измерения клеток НЗЗ и репрезентативные карты интенсивности флуоресценции и фазового и модуляционного времени жизни флуоресценции в контроле и IA и DHEA экспериментах.

Анализируемые параметры включали содержание НАДН, редокс-индекс НАДН, а также сдвиги фазы и модуляции, характеризующие первую и вторую компоненты затухания времени жизни флуоресценции (рисунок 4.14а-в). Статистическую значимость различий оценивали с помощью одностороннего теста ANOVA ($p < 0,05$).

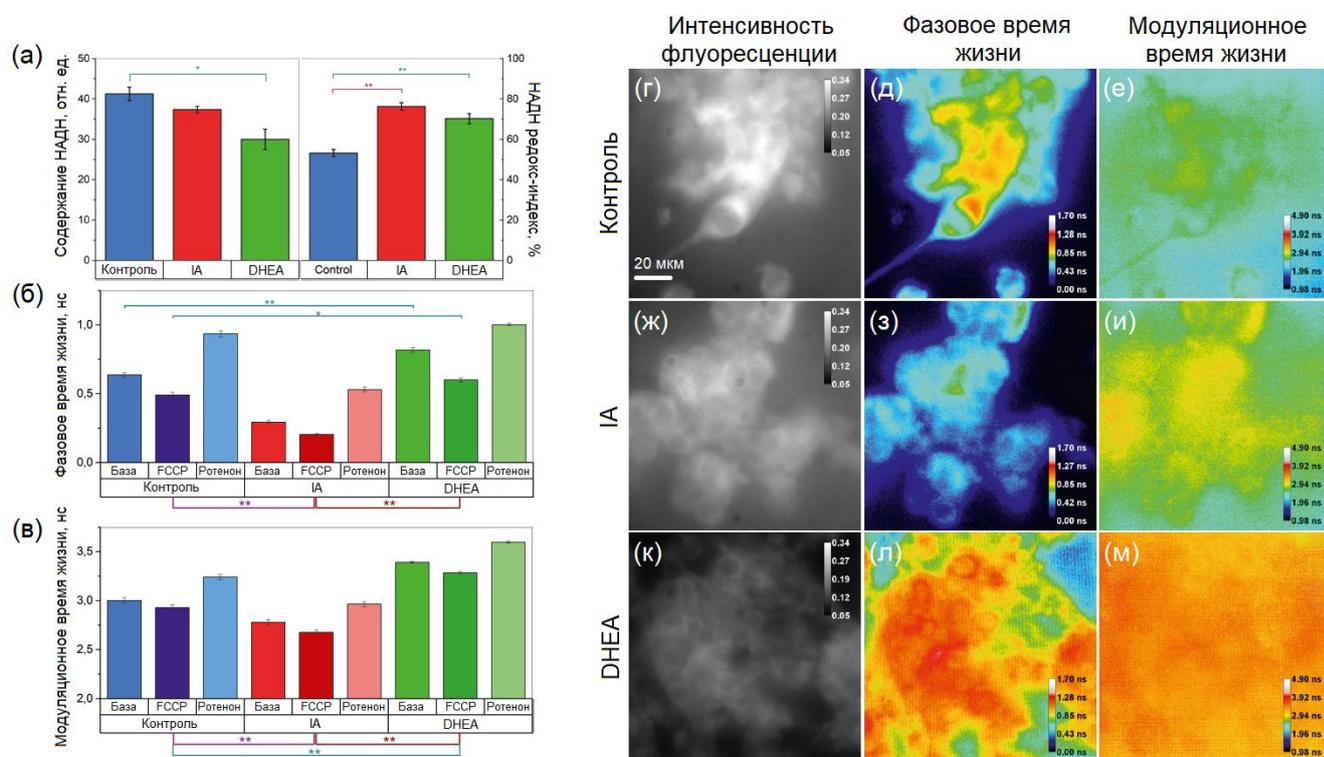


Рисунок 4.14 – Вычисленные параметры (а – левая часть) содержания НАДН, (а – правая часть) редокс-индекса НАДН и параметры времени жизни флуоресценции на основе (б) фазы и (в) модуляции. Репрезентативные карты интенсивности и времени жизни флуоресценции клеток НЗЗ в (г,д,е) контрольных, (ж,з,и) IA и (к,л,м) DHEA экспериментах

Результаты продемонстрировали снижение среднего пула НАДН как в группе IA, так и в группе DHEA (41 ± 27 отн.ед., 37 ± 7 отн.ед., 30 ± 18 отн.ед.

соответственно), в то время как редокс-индекс НАДН увеличился больше в группе IA ($53\pm 27\%$, $76\pm 16\%$, $70\pm 17\%$). Более низкие значения редокс-индекса указывают на более выраженную дыхательную активность клеток. Разобщающее фосфорилирование с помощью FCCP вызывало уменьшение первого и второго компонентов времени жизни флуоресценции в экспериментах с контролем, IA и DHEA. Ингибирование активности цепи переноса электронов путем добавления ротенона, блокатора НАДН-дегидрогеназы (комплекс I), увеличивало взвешенное время жизни двух компонентов во всех экспериментах. Следовательно, можно сделать вывод, что применение ингибиторов в разной степени ухудшало состояние клеток. Наблюдаемые изменения могут указывать на то, что раковые клетки печени используют процесс гликолиза для окисления глюкозы и выработки энергии в форме АТФ в большей степени, чем пентозофосфатный путь. Ингибирование гликолиза более важно для жизнеспособности этой культуры клеток. Ингибирование гликолиза IA привело к значительному снижению первого и второго компонентов времени жизни флуоресценции в базальных измерениях ($53,8\%$ и $7,4\%$ соответственно). Напротив, ингибирование пентозофосфатного пути с использованием DHEA привело к статистически значимому увеличению этих параметров в базовом тесте ($22,2\%$ и $11,4\%$ соответственно). Все три группы показали схожую динамику изменений. Однако в контрольной группе наблюдался значительный разброс полученных значений, что затрудняло более подробную оценку возможных изменений соотношения связанного и несвязанного НАД(Ф)Н.

Полученные данные о применении нового типа камеры продемонстрировали возможность визуализации параметров эндогенной флуоресценции и времени жизни флуоресценции, которые могут использоваться для оценки метаболических процессов в клетках и тканях.

Далее была разработана макроскопическая оптическая система ортогонального типа для широкопольной визуализации времени жизни флуоресценции в частотной области (рисунок 4.15).



Рисунок 4.15 – Внешний вид разработанной макроскопической системы для визуализации времени жизни флуоресценции в частотной области

Система была собрана также на основе модулируемого источника лазерного излучения 375 нм и камеры pco.flim (PCO AG, Германия). Оптический канал системы также включал 5× объектив, дихроичное зеркало MD416 и эмиссионный фильтр FELH0400. Для апробации разработанной системы были исследованы срезы опухоли (гепатоцеллюлярной карциномы H33) печени лабораторной мыши. Были получены карты распределения интенсивности флуоресценции и расположение точек комплексных амплитуд (рисунок 4.16). Как видно из рисунка времена жизни флуоресценции сгруппированы в области 2 и 5,5 нс для опухоли и интактной ткани, соответственно. Опухолевые зоны имеют более короткие времена жизни, что согласуется с их гипоксическим и гликолитическим фенотипом [359–362]. Опухолевые клетки демонстрируют повышенный гликолиз, что приводит к преобладанию свободного НАДН с коротким временем жизни. Интактные же клетки содержат больше НАДН, связанного с дыхательными ферментами, что увеличивает время жизни из-за ограниченной вращательной диффузии в белковом окружении.

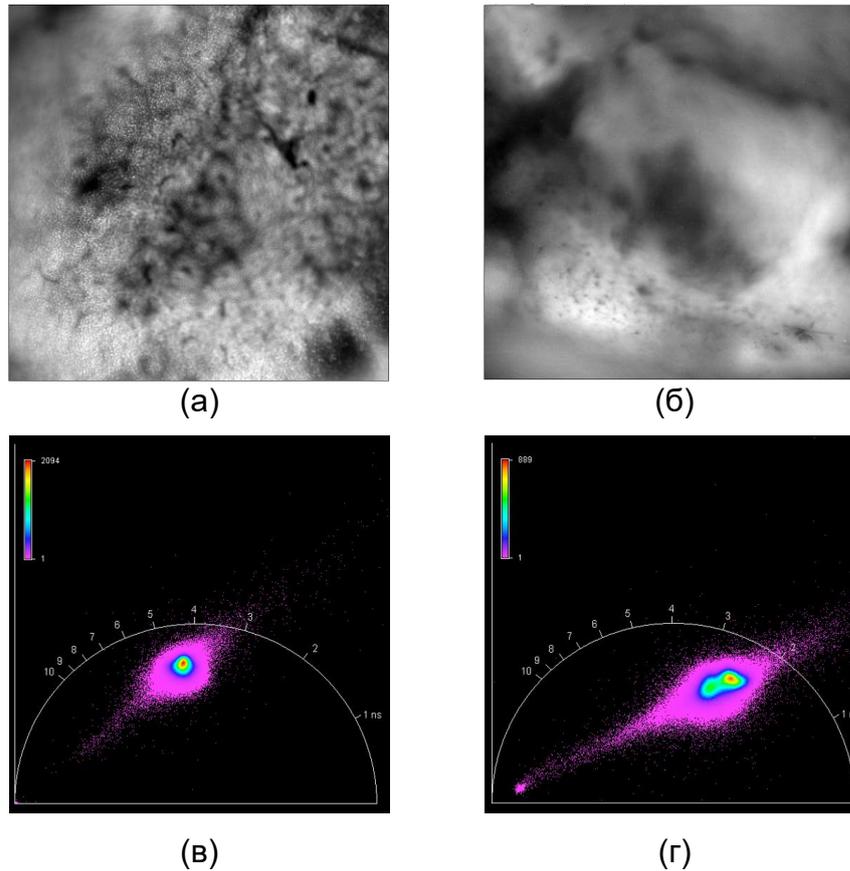


Рисунок 4.16 – Интенсивность флуоресценции (а) неизменной печени и (б) опухоли, (в) фазовый график неизменной печени и (г) опухоли

Разработанный подход для регистрации времени жизни флуоресценции в частотной области позволил разрешить временные характеристики с высоким контрастом между тканями. Результаты подтверждают, что время жизни НАДН может служить маркером метаболического перепрограммирования в опухоли, а сам подход перспективен для интраоперационной диагностики опухолевых границ и исследований метаболизма *in vivo*.

4.3.3 Широкопольная визуализация времени жизни флуоресценции флавинов

В целом, за последние годы были разработаны надежные методики разделения сигнала от различных форм НАДН и НАДФН с использованием измерений времени жизни флуоресценции [363–365]. Это позволило сделать значительный шаг в понимании роли НАДН в клеточном метаболизме. При этом,

несмотря на не менее важную роль флавинов в клетке (также обеспечивают синтез АТФ в результате окислительного фосфорилирования), их изучению на сегодняшний день уделяется гораздо меньше внимания и тем более на тканевом уровне.

Представленная макроскопическая система визуализации была модифицирована для возбуждения флуоресценции флавинов, а именно использовался модулируемый лазерный источник 450 нм. Оптический канал системы также включал 5× объектив, дихроичное зеркало MD480 и эмиссионный фильтр FELH0500.

В данном исследовании калибровку осуществляли по свежеприготовленному флуоресцирующему раствору ФАД в концентрации 1 мМ со средним временем жизни флуоресценции равным 2,4 нс. На рисунке 4.17 представлен типовой пример расположения точек комплексных амплитуд при проведении данной калибровки.

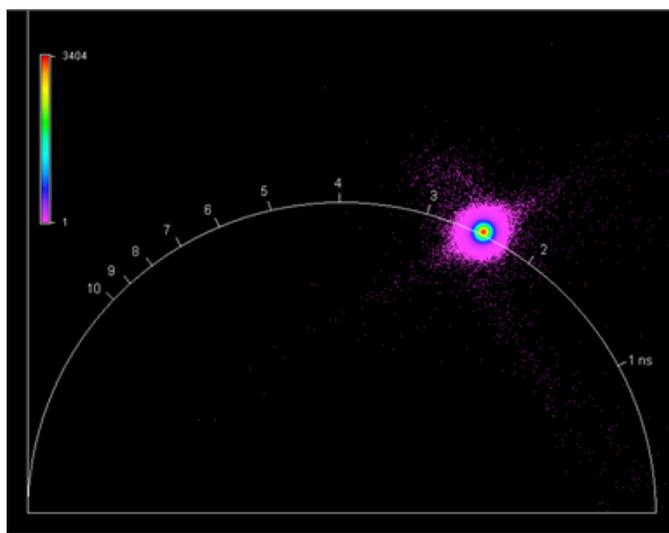


Рисунок 4.17 – Пример изображения расположения точек комплексных амплитуд при проведении калибровки по раствору ФАД

Анализ чувствительности камеры (рисунок 4.18а) показал наличие линейной зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации ФАД, растворенного в PBS, в границах, соответствующих содержанию кофермента в животных тканях [366,367].

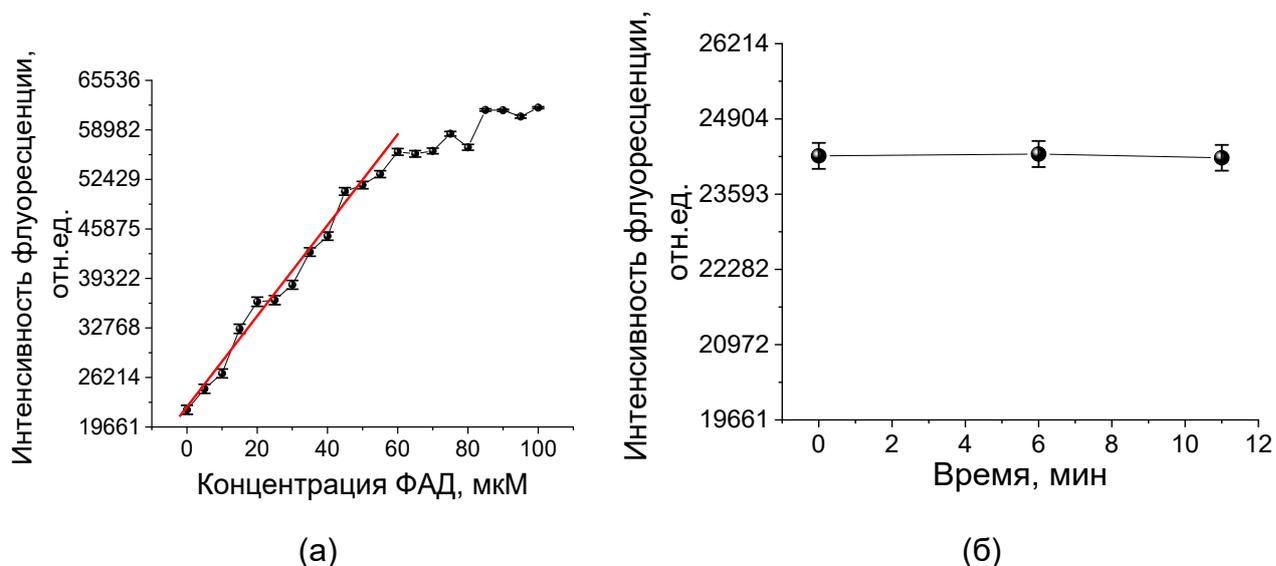


Рисунок 4.18 – (а) Концентрационная зависимость интенсивности флуоресценции ФАД. (б) Стабильность интенсивности флуоресценции ФАД при постоянном воздействии лазерного излучения

При этом при выходной мощности возбуждающего лазера 34 мВт в системе отсутствовали признаки фотобликинга даже при 11-минутном облучении (рисунок 4.18б), что имеет большое значения в условиях относительно невысокого уровня выхода автофлуоресценции флавинов.

Тестирование системы для определения времени жизни было выполнено на монослойной культуре эпителиальных клеток MDCK. С учетом того, что общий флуоресцентный сигнал обусловлен рядом флавиновых коферментов, помимо определения параметров времени жизни в интактных клетках была выполнена оценка возможности выделения составляющей, определяемой ФАД сукцинатдегидрогеназы. Для этого после анализа базовых параметров значения интенсивности флуоресценции и времени жизни были получены также в клетках, обработанных митохондриальным разобщителем FCCP (2 μM) и блокирующим комплекс IV ЭТЦ цианидом натрия (2 мМ) (см. рисунок 4.19).

В ходе эксперимента происходило ожидаемое увеличение интенсивности флуоресценции после полного перехода флавинадениндинуклеотида в окисленную форму в результате FCCP-обусловленного роста дыхания и снижение при блокировании дыхания и соответствующего накопления нефлуоресцирующей

восстановленной формы кофермента. При этом добавление FCCP и NaCN привело к незначительному последовательному снижению времени жизни флуоресценции, определенного по сдвигу фаз (τ_ϕ), в то время как аналогичный параметр, рассчитанный на основании модуляции амплитуды флуоресценции (τ_m), был значительно выше в сравнении с базовым состоянием и экспериментом с блокированием комплекса IV.

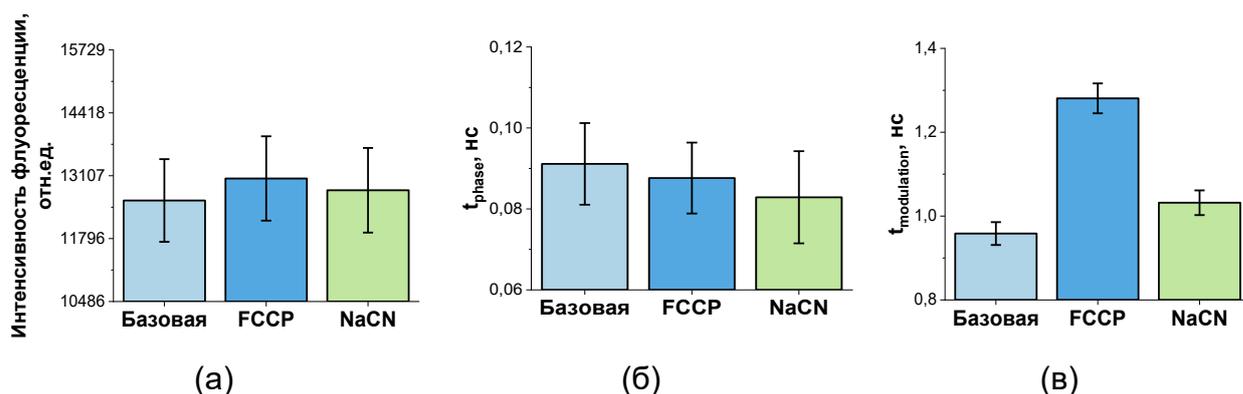


Рисунок 4.19 – Результаты оценки параметров времени жизни в условиях изменения состояния ФАД, связанного с комплексом II ЭТЦ: (а) значения интенсивности флуоресценции ФАД на базовом уровне, а также после разобщения митохондрий и блокирования комплекса IV; результаты расчета времени жизни флуоресценции по (б) сдвигу фаз и (в) модуляции амплитуды

Далее с помощью ингибиторного анализа с использованием селегилина, способного избирательно блокировать активность моноаминоксидазы (МАО) и таким образом модулировать окислительно-восстановительные процессы, и измерения содержания флавопротеинов с помощью предложенной системы в переживающих срезах мозга удалось продемонстрировать высокую чувствительность подхода к метаболическим изменениям, а именно их региональную специфику и изменение активности в ответ на блокирование МАО (рисунок 4.20).

Полученные данные демонстрируют значительные различия между отделами головного мозга по величине фазового времени жизни на базовом уровне. С учетом того, что флавины входят в структуру большого количества белков, являющихся

участниками разнообразных метаболических процессов, данные результаты не могут получить однозначного физиологического объяснения.

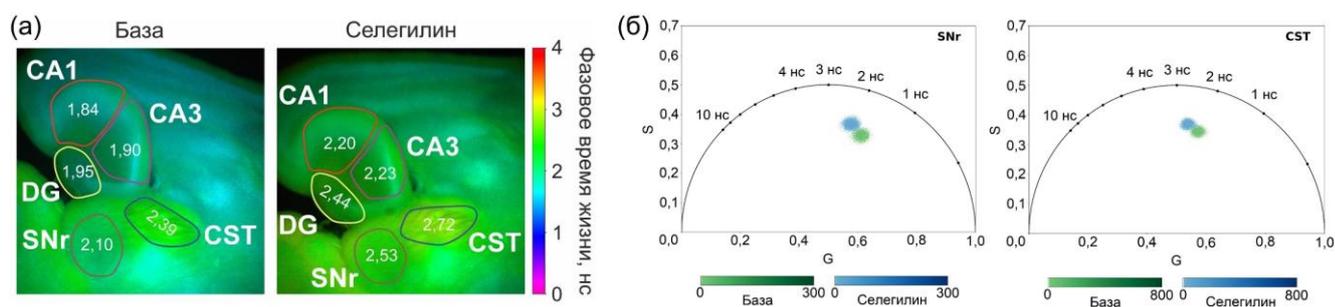


Рисунок 4.20 – (а) Измерение фазового времени жизни флуоресценции в различных областях мозга крысы до и после ингибирования MAO с помощью селегилина: CA1, CA3 – поля гиппокампа, DG – зубчатая извилина, SNr – ретикулярная часть черной субстанции, CST – кортикоспинальный тракт. (б)

Пример фазовых графиков для SNr и CST

В то же время с использованием ингибиторного анализа можно выполнить оценку вклада отдельных флавопротеинов в общий регистрируемый сигнал. Так, введение селегилина приводит к увеличению фазового времени жизни флуоресценции, которое, однако, различается между исследованными зонами мозга: наибольший рост параметра выявлен в DG и SNr, наименьший – CA3 и CST. В целом, сдвиг облака точек на фазовом графике влево и вверх указывает на увеличение вклада длиннокомпонентной флуоресценции, что может быть связано как с более высоким уровнем соответствующего флавина, так и со снижением содержания кофермента с короткоживущей флуоресценцией. К факторам, определяющим флуоресцентные характеристики флавинов, относятся их химическое строение (флуоресценция флавинмононуклеотида (ФМН) характеризуется существенно более высоким в сравнении с ФАД временем жизни) и нахождение в свободном или связанном с белками состоянии. С учетом литературных данных, а также механизма действия использованного ингибитора можно утверждать, что наблюдаемое в ответ на добавление селегилина изменение характеризует переход кофермента MAO в восстановленное состояние,

неспособное к флуоресценции. При этом величина такого ответа может быть использована для оценки активности данного фермента и, следовательно, исследования роли метаболизма моноаминов в функционировании тканей. Полученные результаты коррелируют с известной информацией о распределении активности МАО между отделами мозга, однако получены в исследованиях *ex vivo*, максимально приближенных к физиологическим условиям. Эти наблюдения позволяют рассматривать предложенный метод как мощный инструмент для оценки действия физиологически активных веществ, в частности нейромодуляторов и препаратов антиоксидантной терапии на тканевом уровне.

4.4 Выводы по главе 4

Данная глава диссертации была посвящена исследованию метода флуоресцентной визуализации эндогенной флуоресценции биологических тканей, который позволяет оценивать метаболические изменения и диагностировать патологические состояния на клеточном уровне. Основное внимание уделено характеристикам эндогенных флуорофоров, а также применению методов визуализации интенсивности и времени жизни флуоресценции для изучения тканевого метаболизма на примере моделирования ишемии, онкологических заболеваний и с использованием ингибирующих метаболизм агентов.

1. Описаны ключевые аспекты флуоресценции биологических тканей. Определены основные эндогенные флуорофоры, их спектральные характеристики и роль в метаболизме. Показано, что изменения интенсивности и времени жизни флуоресценции этих молекул могут служить маркерами патологических процессов, таких как гипоксия, опухолевый рост и митохондриальные нарушения.

2. Продемонстрирована возможность использования флуоресцентной визуализации для оценки метаболических изменений в тканях, например, при ишемии, где наблюдается накопление НАДН.

3. Разработана экспериментальная установка для визуализации опухолевых очагов, показавшая высокую чувствительность метода в определении границ злокачественных новообразований по сравнению с традиционными методами.

4. Предложен метод и экспериментальная система визуализации времени жизни флуоресценции в частотной области. Применение метода позволило выявить различия между опухолевыми и интактными тканями FFPE образцов.

5. Предложен метод, основанный на широкопольной визуализации времени жизни флуоресценции в частотной области и ингибиторном анализе, предоставивший новые возможности в анализе содержания различных форм флавопротеинов – ключевых участников тканевого метаболизма. Проведенное исследование впервые демонстрирует возможность использования визуализации времени жизни флуоресценции для оценки действия ингибиторов моноаминоксидазы и других нейромодуляторов на тканевый метаболизм.

6. Разработанные методы флуоресцентной визуализации могут быть использованы в клинической практике для ранней диагностики и мониторинга заболеваний, включая онкологию и метаболические нарушения. Технологии визуализации времени жизни флуоресценции открывают новые возможности для изучения клеточного метаболизма и оценки эффективности терапевтических вмешательств.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОПТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО КРОВОТОКА НА ОСНОВЕ РЕГИСТРАЦИИ ДИНАМИЧЕСКОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА С АНАЛИЗОМ ЧАСТОТНО-ВРЕМЕННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК

Рассмотренные выше методы могут давать практически исчерпывающую комплексную информацию о состоянии тканевого метаболизма. Однако наряду с оксигенацией и кровенаполнением ещё одной важной характеристикой кровотока является его динамика и механизмы регуляции. В данной главе предложен метод частотно-временного анализа данных ЛСКВ, который предоставляет пространственную информацию о скоростных характеристиках кровотока. Стоит отметить, что анализ и физиологическая интерпретация колебаний кровотока остаются нерешенной задачей. В этой связи значительная часть исследований данной главы была посвящена подтверждению возможности такого анализа с использованием ряда оптических технологий, включая скоростную видеокапилляроскопию, лазерную доплеровскую флоуметрию и ЛСКВ, а также математических методов спектрального анализа на основе вейвлет-преобразования.

5.1 Основы лазерной спекл-контрастной визуализации

В настоящее время существует ряд оптических технологий, способных контролировать микроциркуляторные нарушения *in vivo* в режиме реального времени. К ним относятся видеомикроскопические методы: видеокапилляроскопия ногтевого ложа [368,369] и конъюнктивы глазного яблока [370], конфокальная и двухфотонная микроскопия [371–373], ортогональная поляризационная спектроскопия [374,375] и темнопольная спектроскопия [376,377]; оптическая когерентная томография [378,379]; методы динамического рассеяния света: лазерная доплеровская флоуметрия, лазерная доплеровская визуализация и ЛСКВ [380–382] и др.

Технология ЛСКВ относительно недавно получила распространение в исследовательской и клинической практике, показав высокую чувствительность к микроциркуляторным нарушениям в различных биологических тканях [383–387]. Метод ЛСКВ основан на регистрации случайной спекл-интерференционной картины, формирующейся на детекторе, собирающем обратно рассеянный свет от поверхности ткани, освещенной когерентным лазерным излучением (см. рисунок 5.1а) [388,389]. Как правило, для освещения объекта используется источник когерентного света (лазер). Кроме того, для освещения определенной области используется расширитель пучка или диффузор (рассеиватель). Необработанные спекл-паттерны, отраженные от наблюдаемого объекта, регистрируются цифровой камерой (КМОП или ПЗС). Также, для получения лучшего контраста зарегистрированных необработанных спекл-изображений и отсекающей зеркальной составляющей излучения между камерой и наблюдаемым объектом может быть установлен поляризатор.

Классическая теория формирования спеклов была впервые описана Гудманом [390]. Движение частиц внутри освещенной среды вызывает пространственную неоднородность рассеянного излучения, регистрируемого детектором, и приводит к размытию изображения из-за усреднения за время установленной выдержки. Чем интенсивнее движение рассеивающих частиц, тем более размытая спекл-картина появляется на зарегистрированном кадре. Далее временная и пространственная статистика структуры спекла используется для получения информации о движении рассеивающих частиц (при исследовании микроциркуляции выбирают длины волн красного и ИК диапазонов для регистрации движения эритроцитов). Результаты ЛСКВ не являются количественными, а выражаются в виде значений интенсивности светового потока и пересчитываются в относительных единицах пространственного или временного спекл-контраста для формирования изображений перфузии исследуемой области (см. рисунок 5.1б).

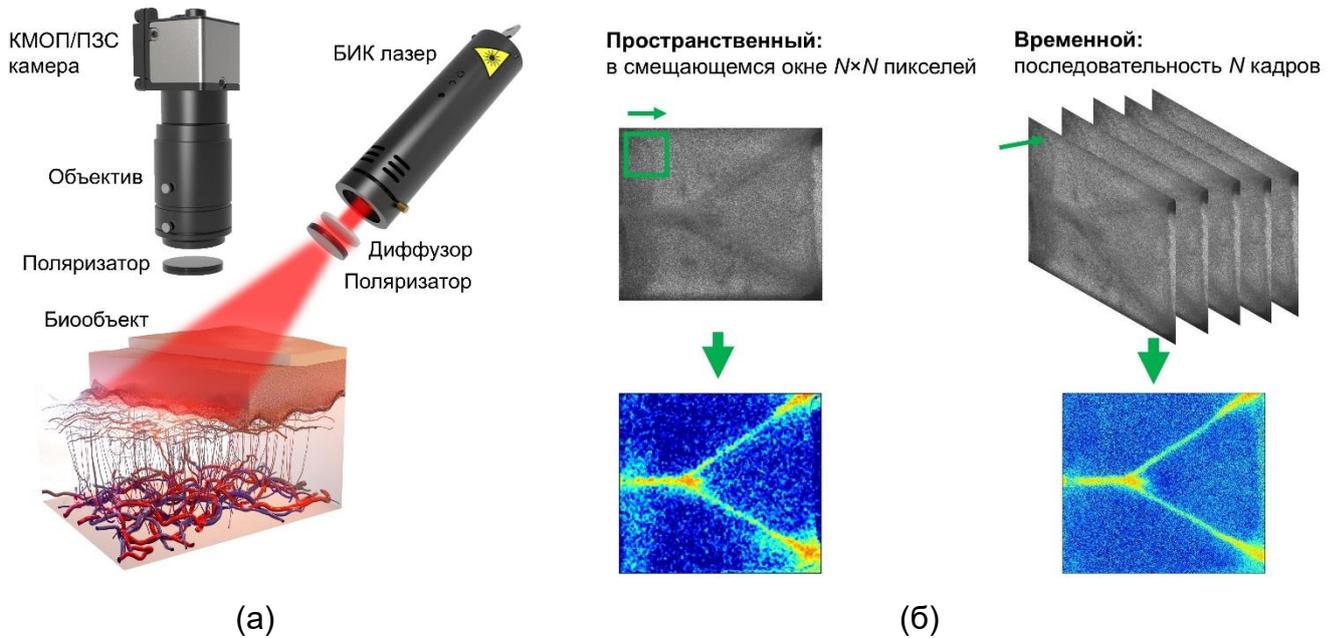


Рисунок 5.1 – (а) Общая схема реализации лазерной спекл-контрастной визуализации; (б) пространственный и временной алгоритм обработки спеклов

При использовании пространственного алгоритма статистика спеклов накапливается с использованием скользящего окна поверх необработанного изображения [391,392]. В большинстве случаев для измерений используются окна размером от 3×3 до 7×7 пикселей [391–393]. Естественно, использование скользящего окна приводит к потере пространственного разрешения конечного спекл-изображения, определяемого размером окна. Чтобы избежать потери пространственного разрешения, был предложен статистический анализ по времени [394]. Для этого метода регистрируется несколько последовательных необработанных спекл-изображений. Кроме того, значение спекл-контраста может быть рассчитано для каждого пикселя зарегистрированной последовательности необработанных изображений. Таким образом, анализ временных спеклов позволяет сохранить исходное разрешение необработанных изображений в обмен на низкое временное разрешение. Таким образом, следует учитывать соотношение между пространственным и временным разрешением, а выбор метода должен основываться на потребностях эксперимента. На практике эти два метода часто объединяются в пространственно-временной метод с контролируемым выбором пространственного и временного разрешения.

В общем виде для оценки динамики изменения микроциркуляции крови производится расчет контраста по формуле:

$$K = \frac{\sigma_n}{\langle I \rangle_n}, \quad (5.1)$$

где n – размер области расчета при пространственном усреднении или количество кадров при временном алгоритме обработки;

σ_n – стандартное отклонение интенсивности;

$\langle I \rangle_n$ – средняя интенсивность.

При этом зачастую для анализа используют расчет параметра ЛСКВ перфузии:

$$P = 1 / K^2. \quad (5.2)$$

Ферхер и Брайерс развили теорию спекл-контраста, связав его с временем корреляции (τ) и временем экспозиции камеры (T), используя для описания корреляционную функцию [395]. Для количественной оценки скорости частиц используется нормированная временная автокорреляционная функция электрического поля $g_1(\tau)$ (автокорреляционная функция первого порядка), описываемая теорией Эйнштейна:

$$g_1(\tau) = \frac{\langle E(t)E^*(t+\tau) \rangle}{\langle E(t)E^*(t) \rangle}, \quad (5.3)$$

где $E(t)$ – электрическое поле регистрируемого света;

E^* – комплексно-сопряжённое поле.

Однако КМОП/ПЗС камеры не могут напрямую измерять $g_1(\tau)$. Вместо этого регистрируется автокорреляционная функция интенсивности $g_2(\tau)$ (автокорреляционная функция второго порядка):

$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(t)I^*(t+\tau) \rangle}{\langle I(t)^2 \rangle}. \quad (5.4)$$

Эти две функции связаны соотношением Зигерта [45]:

$$g_2(\tau) = 1 + \beta |g_1(\tau)|^2, \quad (5.5)$$

где β – коэффициент, учитывающий потери контраста из-за шумов камеры, поляризации, неидеальной когерентности источника и других факторов [396,397].

С учётом времени экспозиции камеры T спекл-контраст может быть выражен как:

$$K = \frac{\sigma_n}{\langle I \rangle_n} = \left(\frac{2\beta}{T} \int_0^T \left| \frac{g_1(\tau)}{g_1(0)} \right|^2 \left(1 - \frac{\tau}{T} \right) d\tau \right)^{\frac{1}{2}}. \quad (5.6)$$

Средняя скорость рассеивающих частиц связана обратной зависимостью с характерным временем корреляции интенсивности наблюдаемой спекл-динамики τ . Если время интегрирования камеры T намного больше, чем время корреляции τ , все изменения интенсивности будут усреднены и вычисленный контраст будет стремиться к нулю. Наоборот, если движение рассеивающих частиц минимально, контраст спекл-изображения будет максимальным. Гудманом было показано, что в данном случае при наиболее благоприятных условиях (при использовании одночастотного лазера с достаточно большой длиной когерентности, линейной поляризацией и идеально диффузно рассеивающей средой) наблюдаемое стандартное отклонение интенсивности спекл-изображения стремится к значению средней интенсивности, а значение спекл-контраста приближается к 1 [390]. При

вариации отношения τ/T в пределах от 10^{-2} до 10^1 , спекл-контраст будет изменяться в пределах между значениями 0 и 1 в виде гладкой S -образной кривой.

Таким образом, параметры K и P можно рассматривать как индикаторы абсолютной скорости движения частиц. Однако для точных измерений необходимо знать τ , что является сложной задачей при использовании стандартных камер. Это ограничивает применение ЛСКВ в основном качественным анализом. Вот почему поиск новых алгоритмов для расширения диагностических возможностей этого метода выглядит весьма актуальным.

5.2 Сравнительный анализ осцилляций динамики кровотока в отдельном капилляре и периферического кровотока

Методы динамического рассеяния света широко используются в биомедицинской диагностике, включая оценку кровотока [398]. Однако существуют определенные трудности в анализе и количественной интерпретации сигналов обратно рассеянного света с точки зрения диагностической информации. Известный метод лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) [399] широко используется во многих исследовательских приложениях. Однако высокая пространственная изменчивость кровотока в живых тканях ограничивает клиническую полезность односточечных измерений ЛДФ [400]. Лазерная доплеровская визуализация позволяет преодолеть это ограничение, но не обеспечивает достаточно высокого отношения сигнал/шум и, следовательно, высокой скорости оценки, которая может быть достигнута, например, при лазерной спекл-контрастной визуализации (ЛСКВ) [400,401], но с ограниченным разрешением, вызванным пространственным усреднением. Диффузно-волновая спектроскопия (ДВС), также называемая диффузной корреляционной спектроскопией [402,403], позволяет изучать динамику рассеянного света в предположении сильного многократного рассеяния. Однако этот метод связан с аналитическим решением сложных уравнений теории переноса, что приводит к сложности интерпретации результатов. Все эти методы относятся к хорошо

известным подходам в исследовании микроциркуляции крови для ранней диагностики различных заболеваний и мониторинга эффективности терапевтических воздействий. Однако анализ и физиологическая интерпретация осцилляций кровотока остаются для этих методов открытой проблемой. Колебания кровотока часто рассматриваются как источник неповторяемости сигнала, возникающей из-за стохастической природы флуктуаций скорости движения эритроцитов [404]. В то же время локальное спектральное разложение записей длительной перфузии позволяет выявить осцилляторные компоненты, соответствующие конкретным физиологическим механизмам. Такое локальное спектральное разложение может быть обеспечено, в частности, вейвлет-преобразованием ЛДФ-сигналов. Сердечные частоты (0,45-1,6 Гц) и дыхательные частоты (0,2-0,45 Гц) дают информацию о влиянии частоты сердечных сокращений и движения грудной клетки на периферический кровоток. Миогенный механизм регуляции сосудистого тонуса отражает реакцию гладкомышечных клеток сосудов на трансмуральное давление. Он характеризуется осцилляциями кровотока с частотой 0,05-0,15 Гц. Нейрогенная симпатическая вазомоторная активность вызывает движение стенок сосудов с частотой 0,02-0,05 Гц. Медленные волны кровотока (0,005-0,0095 Гц и 0,0095-0,02 Гц) свидетельствуют о регуляции сосудистого тонуса за счет активности эндотелия, как NO-зависимой, так и независимой. Эти механизмы подробно рассмотрены в работах [225,404–422]. Таким образом, полезная диагностическая информация содержится в различных спектральных диапазонах, и частотно-временной анализ сигнала имеет большое значение. Однако до сих пор остается невыясненным ряд вопросов, например, соответствует ли интегральный параметр перфузии реальному изменению скорости кровотока в капиллярах. Важно уточнить механизмы возникновения сигнала при регистрации динамического рассеяния света, будь то методом ЛДФ или методами визуализации, включая ЛСКВ.

В диссертационном исследовании было предложено в качестве опорного использовать метод высокоскоростной ВКС как прямой подход для оценки скорости кровотока в отдельных капиллярах. ВКС основана на

высокоразрешающей регистрации и анализе движущихся эритроцитов с оценкой их скорости в отдельном капилляре путем записи серии видеок кадров, представляющих капиллярный кровоток области интереса. При этом имеется возможность извлекать параметры капиллярного кровотока как в отдельных капиллярах, так и в капиллярной сети [114,423–425].

На данном этапе мы сравнивали ВКС с результатами измерений методом ЛДФ, так как в настоящее время он наиболее часто используется для анализа осциллирующих компонент кровотока. Совместное использование методов ВКС и ЛДФ может разрешить многие сомнения, связанные с методом ЛДФ, например, относительно происхождения осциллиций сигнала ЛДФ. Метод ВКС позволяет напрямую измерить скорость движения эритроцитов в капилляре, что дает представление об истинной осцилляционной природе сигнала, вызванного движущимися эритроцитами. Таким образом, этот метод позволяет верифицировать данные, полученные с помощью ЛДФ, а также обосновать интерпретацию выявленных особенностей ЛДФ-сигналов.

Выбранные методы использовались для анализа динамики перфузии в дистальной фаланге пальца и капиллярного кровотока (скорости движения эритроцитов) в области ногтевого ложа. Реализация ЛДФ была основана на оптико-электронной схеме, представленной слева на рисунке 5.2. В качестве источника излучения использовался одномодовый лазер с длиной волны 1064 нм. С точки зрения распределения интенсивности света в ткани, диагностический объем для длины волны 1064 нм меньше зависит от поглощения крови и насыщения кислородом, что снижает нежелательную вариабельность регистрируемого сигнала от измерения к измерению [20,426]. Следовательно, оценка параметров перфузии при длине волны 1064 нм характеризует в основном скорость рассеивающих частиц, а не поглощающие свойства биологической ткани. Оптические волокна использовались для доставки излучения к поверхности кожи и сбора обратно рассеянного света.

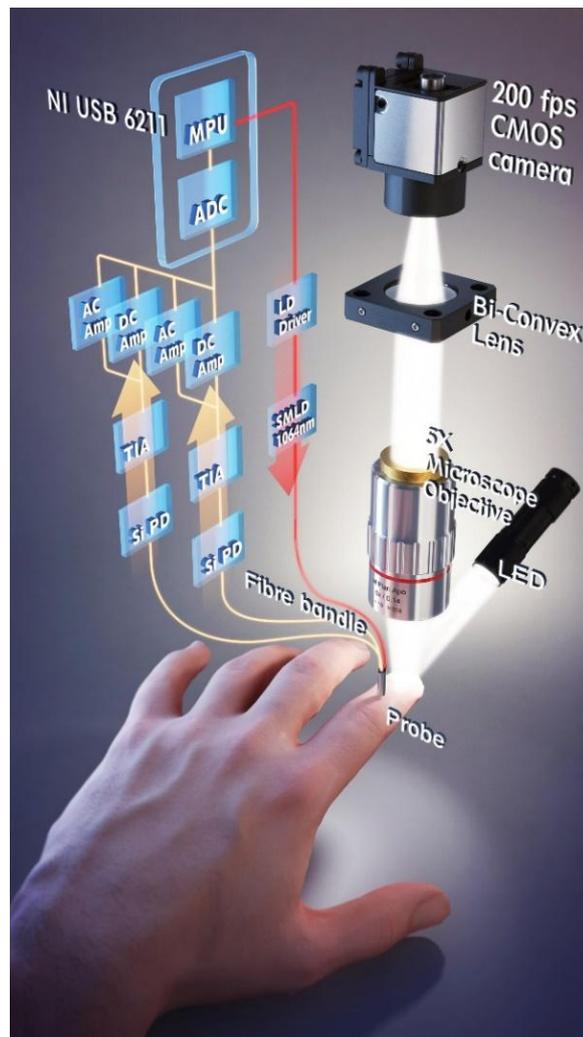


Рисунок 5.2 – Общая схема системы: SMLD – одномодовый лазерный диод; LD Driver – драйвер лазерного диода; Si PD – кремниевый фотодиод; TIA – трансимпедансный усилитель; AC Amp – усилитель сигнала переменного тока; DC Amp – усилитель сигнала постоянного тока; ADC – аналогово-цифровой преобразователь; MP – микропроцессорный блок

Si-фотодиоды использовались для преобразования обнаруженного обратно рассеянного излучения в фототок. Затем сигнал усиливался с помощью специализированной электронной платы. В данной реализации ЛДФ-установки использовалась дифференциальная схема, позволяющая удалить синфазные неинформативные компоненты сигнала двух каналов. Аналого-цифровое преобразование осуществлялось платой сбора данных модели NI USB 6211 (National Instruments, США). Обработка сигнала проводилась в ПК со средой NI LabVIEW.

В связи с использованием контактного оптоволоконного зонда запись сигналов ЛДФ осуществлялась на средней фаланге того же пальца.

Исследование ногтевого ложа капиллярной сети проводилось с помощью экспериментальной установки ВКС (см. рисунок 5.2 справа), позволяющей непосредственно оценить скорость движения эритроцитов в мм/с. Область ногтевого ложа указательного пальца руки освещалась белым светодиодом. Микроскопический 5× объектив с апертурой 0,14 и длиннофокусная линза использовались для проецирования изображения капилляра на фоточувствительной матрице. Для решения задачи стабилизации видеокадров был использован алгоритм, основанный на принципе фазовой корреляции [427]. После этого была применена межкадровая обработка изображений для оценки скорости эритроцитов. Сигналы, исходящие от движущихся эритроцитов, сравнивались друг с другом на предмет взаимного межкадрового сдвига. Величина сдвига оценивалась по критерию максимальной корреляции между каждой парой сигналов, относящихся к соседним видеокадрам. Полученные значения были усреднены по всем точкам центральной капиллярной линии, что позволило получить стабильную оценку скорости поступления эритроцитов в капилляр. Подробное описание алгоритмов обработки видеокадров представлено в работах [423,428,429].

Сигналы ЛДФ и ВКС содержат полезную информацию о кровотоке, но в разной форме. Важно оценить соответствие между сигналами с учетом дополнительной информации, предоставляемой данными ВКС, чтобы убедиться в происхождении сигнала ЛДФ. Ввиду специфических и локально-переменных свойств сигналов, упомянутых выше и присущих исследованию кровотока, целесообразно применять локальный спектральный анализ, реализованный в виде непрерывного вейвлет-преобразования (НВП).

Сигналы ВКС и ЛДФ были разложены с помощью НВП в виде:

$$W(s, \tau) = \frac{1}{\sqrt{s}} \int_{-\infty}^{\infty} x(t) \psi^* \left(\frac{t - \tau}{s} \right) dt, \quad (5.7)$$

где $x(t)$ – целевой сигнал;
 τ – локальный временной индекс;
 s – масштабный коэффициент;
 * означает комплексное сопряжение.

Декомпозиция была выполнена с использованием вейвлета Морле с параметром затухания $\sigma=1$:

$$\psi(t) = e^{2\pi i t} e^{-t^2/\sigma}. \quad (5.8)$$

Данный вейвлет позволяет обеспечить достаточное разрешение по временной частоте и хорошо локализуется во временной области и считается самым надежным вейвлетом для частотно-временного анализа нестационарных временных рядов данных, особенно биологической природы.

Совместное исследование сигналов ВКС и ЛДФ должно проводиться как локально во времени, так и на разных частотах. Такое частотно-временное сравнение двух нестационарных сигналов может быть обеспечено с помощью расчета когерентности на основе вейвлет-преобразования. Когерентность на основе вейвлет-преобразования позволяет вычислить локальную корреляцию двух функций $x(t)$ и $y(t)$ с вейвлет-преобразованиями $W^x(s, \tau)$ и $W^y(s, \tau)$ в частотно-временной области [430–432]. Эта величина вычисляется в виде:

$$R^2(s, \tau) = \frac{|H(s^{-1}W^{xy}(s, \tau))|^2}{H(s^{-1}|W^x(s, \tau)|^2) \cdot H(s^{-1}|W^y(s, \tau)|^2)}, \quad (5.9)$$

где $R^2(s, \tau)$ лежит в диапазоне от 0 до 1;
 $W^{xy}(s, \tau) = W^x(s, \tau)W^{y*}(s, \tau)$ – кросс-вейвлет спектр;
 H – оператор сглаживания.

Сглаживание в уравнении (5.9) основано на взвешенном скользящем среднем во временном и масштабном направлениях, как это подробно описано Торренсом

и Компо [433]. Сглаживание помогает устранить артефакты в вейвлет-спектрах мощности и повышает надежность расчетов.

Степень корреляции между фазами анализируемых сигналов также оценивалась с точки зрения вейвлет-фазовой когерентности [434]:

$$C_{\phi} = \sqrt{\langle \cos \Delta\phi(s, \tau) \rangle^2 + \langle \sin \Delta\phi(s, \tau) \rangle^2}, \quad (5.10)$$

где $\Delta\phi(s, \tau) = \phi^x(s, \tau) - \phi^y(s, \tau)$ – разность фаз сигналов.

Если разность фаз почти постоянна, то фазовая когерентность стремится к 1, если она случайна, то C_{ϕ} стремится к нулю.

Значимость корреляции проверялась путем построения суррогатных данных. Для построения суррогатных данных был использован метод amplitude-adjusted Fourier transform (AAFT). AAFT позволяет получить суррогаты, в которых исходные значения сохраняются во временном ряду, но перегруппированы таким образом, что в значительной степени сохраняется спектр, но при этом разрушается временная информация [435]. Для каждой пары образцов экспериментального сигнала было получено 100 пар суррогатных данных. Уровни значимости рассчитывались как 95-й перцентиль суррогатных данных.

5.2.1 Взаимосвязь скорости движения эритроцитов и перфузии в базальном состоянии

Для изучения общей взаимосвязи в базальном состоянии сигнал ЛДФ и скорость эритроцитов в одном капилляре регистрировались параллельно в течение 14 минут. Данные были получены при частоте дискретизации 250 Гц в методе ВКС и 20 Гц в методе ЛДФ. Для сравнительного анализа данных были взяты данные ВКС в моменты времени, соответствующие образцам данных ЛДФ. Для получения достоверной статистики необходимо включить не менее 10 циклов для каждой из исследуемых частотных составляющих. С учетом длины записи в 14 минут

надежные результаты могут быть получены только для частот, превышающих примерно 0,01 Гц.

Для участия в эксперименте были набраны 10 здоровых добровольцев (6 мужчин и 4 женщины, возраст 21-40 лет). Всего было записано более 30 видеокапилляроскопических данных различной длины. Полученные результаты были достоверно повторены в различных сериях экспериментов с разными добровольцами. Исследование было одобрено этическим комитетом ОГУ имени И.С. Тургенева (протокол заседания № 10 от 16.11.2017) и проводилось в соответствии с принципами, изложенными в Хельсинкской декларации 2013 года Всемирной медицинской ассоциации. Протокол исследования и его цель были подробно разъяснены каждому добровольцу, от каждого было получено информированное согласие. В исследование не включались добровольцы с сопутствующими заболеваниями сердечно-сосудистой, бронхолегочной и нейроэндокринной систем, с заболеваниями желудочно-кишечного тракта, печени, почек, крови, а также с любыми другими серьезными хроническими заболеваниями, которые могли бы повлиять на результаты.

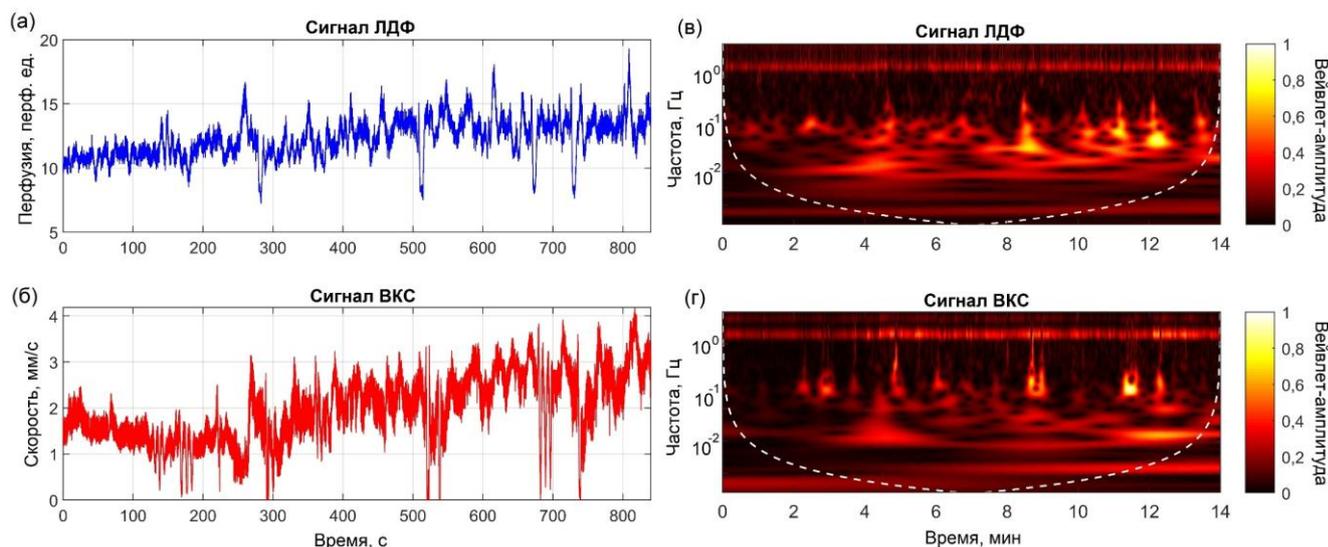


Рисунок 5.3 – Экспериментальные записи (а) сигнала ЛДФ, (б) скорости эритроцитов и (в, г) их непрерывное вейвлет-преобразование. Белая штриховая линия показывает конус влияния, в котором краевые эффекты становятся значительными на разных частотах

Сигнал ЛДФ и изменения скорости эритроцитов показаны на рисунках 5.3а,б, соответственно. Рисунки 5.3в,г соответствуют непрерывному вейвлет-преобразованию, где градиентная цветная карта описывает распределение вейвлет-амплитуды сигнала в частотно-временной области.

Как видно из рисунка 5.3, временные изменения исходных сигналов, оцененных двумя методами, имеют сходство, так же как и их непрерывное вейвлет-преобразование. Расчет когерентности вейвлет-преобразования в соответствии с уравнением (5.9) подтверждает сходство сигналов и позволяет выявить их взаимосвязь и представить в числовом виде.

На рисунках 5.4а,б показана область значительной когерентности на протяжении всего периода сбора данных в районе 1-2 Гц. Это видно по сердечным ритмам, содержащимся в двух сигналах. Кроме того, наблюдаются области значительной когерентности в районе 0,01-0,07 Гц.

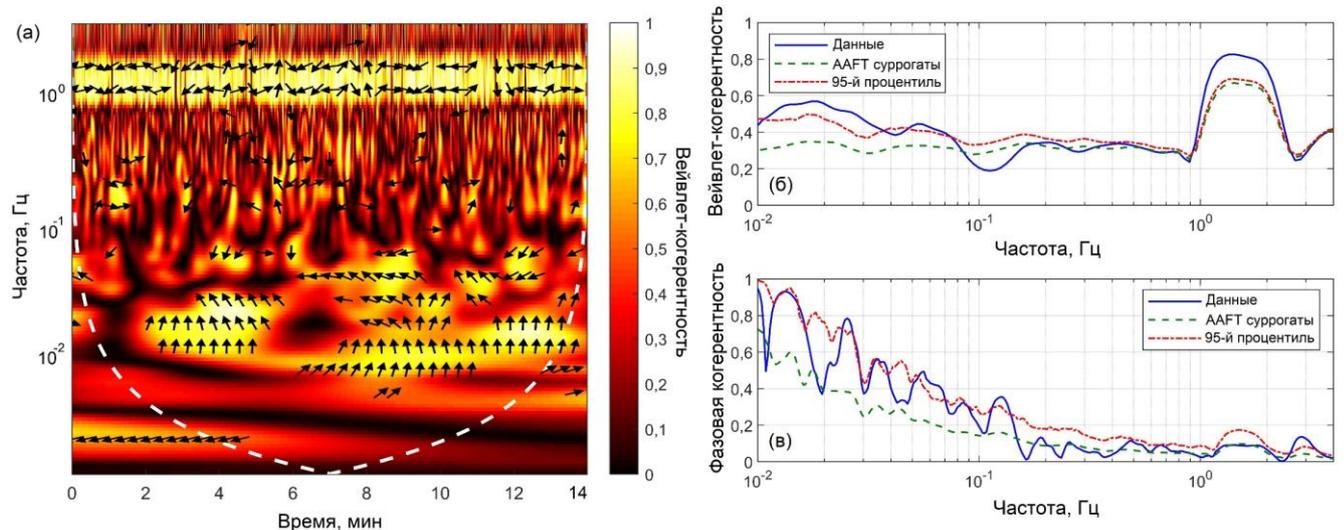


Рисунок 5.4 – (а) Когерентность вейвлет-преобразования между сигналом ЛДФ и скоростью эритроцитов; (б) усредненные по времени спектры вейвлет-когерентности и (в) фазовая вейвлет-когерентность в сравнении с уровнями значимости представленных типов суррогатов, рассчитанными как 95-й процентиль из 100 суррогатов. Стрелками показано отставание фазы сигнала ЛДФ от скорости эритроцитов

В других частотных диапазонах, например, в диапазоне дыхательных, когерентность незначительна. Это происходит из-за малой амплитуды пульсаций в этих полосах и связи дыхательных колебаний с венозной частью кровотока. Для сравнения на рисунке 5.3б приведены среднее значение когерентности и 95-й процентиль, рассчитанные для 100 суррогатов. Стоит отметить, что области высокой когерентности, появляющиеся за пределами конуса влияния или перекрывающие его, следует интерпретировать с осторожностью.

Учитывая тот факт, что сигнал ЛДФ представляет собой суперпозицию скоростей кровотока из разных участков микрососудов с фазовой задержкой относительно друг друга, разумно предположить отсутствие фазовой когерентности со скоростью кровотока в одном капилляре. Это предположение было подтверждено путем расчета фазового запаздывания и фазовой когерентности. На рисунке 5.4а стрелками показано фазовое запаздывание одного сигнала относительно другого. Направление стрелок соответствует фазовому сдвигу на единичной окружности. Вертикальная стрелка указывает на $\pi/2$ или четвертьциклового фазовый сдвиг. Стрелки, направленные вправо или влево, показывают два синфазных или противофазных сигнала, соответственно. Рисунки 5.4а,в демонстрируют отсутствие значительной фазовой когерентности практически во всем диапазоне частот.

Можно предположить, что сердечные колебания в ЛДФ-сигнале регистрируются от более крупных микрососудов, т.е. артериол. Также считалось, что в нормальных условиях амплитуда пульсовых колебаний в капиллярах должна быть низкой и гемодинамически незначимой, а наличие капиллярного пульса может быть индикатором наличия микрососудистой патологии [8,436]. В представленном же исследовании на здоровых добровольцах мы показали, что сердечные колебания в капиллярах могут всё же вносить существенный вклад в общие колебания кровотока.

В целом, предложенный подход продемонстрировал существенное сходство колебаний спектра в изолированном капилляре и интегральной оценки перфузии

методом ЛДФ. Этот результат демонстрирует глубокую связь ЛДФ-сигнала с объективными физическими характеристиками микроциркуляции крови в коже.

В то же время метод ЛДФ часто ассоциируется с выполнением различных функциональных проб (задержка дыхания, окклюзионная, фармакологическая и т.д.). В следующем разделе представлены сравнительные результаты наблюдаемой перфузии и скорости движения эритроцитов в отдельном капилляре при проведении теста с окклюзией артерии.

5.2.2 Взаимосвязь скорости движения эритроцитов и перфузии при артериальной окклюзии

Для изучения поведения этих двух сигналов в условиях, отличных от нормальных, также использовался тест с артериальной окклюзией (рисунок 5.5). Эксперименты включали следующие этапы: регистрация фонового уровня (базального состояния) перфузии и скорости эритроцитов (30 с), окклюзионный тест (90 с) и пост-окклюзионная гиперемия (10 с). Окклюзионный тест проводился по общепринятой методике с наложением окклюзионной манжеты на плечевую артерию с давлением 200-220 мм рт. ст.

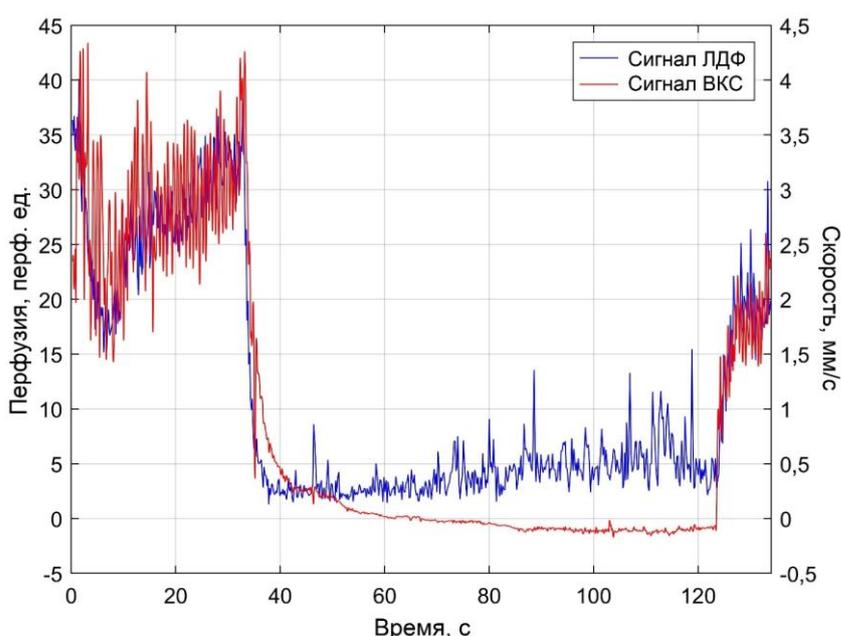


Рисунок 5.5 – Экспериментальная запись сигнала ЛДФ и скорости эритроцитов с эффектом обратного кровотока

В данном исследовании впервые метод ВКС позволил зарегистрировать и количественно оценить такую особенность, как «обратный» кровоток во время окклюзионного теста. Этот эффект проявляется в том, что окклюзия приводит к одновременному снижению кровотока в одном капилляре примерно с 4 мм/с до небольших отрицательных значений, а перфузия в дистальной фаланге пальца изменяется от 30 до 2 перф. ед. Последующее постепенное увеличение до 5 перф. ед. при продолжении окклюзии обусловлено выявляемым обратным кровотоком в капиллярах.

Абсолютная скорость кровотока в капиллярах постепенно увеличивается от 0 до 0,2 мм/с во время регистрации эффекта обратного кровотока (от 65 с до 120 с в течение эксперимента). Завершение окклюзии характеризуется резким увеличением как скорости перфузии, так и скорости эритроцитов. Кривые отражают высокую степень соответствия между локальными изменениями перфузии крови и скорости эритроцитов до и после окклюзии. Однако в период окклюзии прямой корреляции не наблюдается. Это можно объяснить отсутствием влияния сердечной деятельности на микроциркуляцию крови во время окклюзии и перераспределением давления между микрососудами.

Известная проблема биологического нуля изучается для случаев, когда кровоток блокируется (например, при окклюзионных тестах), но сигнал все равно обнаруживается [391,437]. Такая проблема рассматривается при применении метода ЛДФ или других методов, основанных на регистрации динамического светорассеяния (в методах ЛДВ, ЛСКВ). Во многих публикациях считается, что за наличие сигнала отвечает тепловое броуновское движение частиц (эритроцитов) [438]. Однако некоторые авторы в своих исследованиях показали неброуновский характер движения эритроцитов после окклюзии артерии. Меглинский с соавт. [439] показали, что наличие направленного кровотока после полного прекращения сердечной деятельности можно объяснить частично сохранившимся базальным тонусом сосудов и выравниванием статического давления по сосудистому руслу. В других исследованиях [440] отмечается неброуновский характер кровотока даже после часовой окклюзии артерии уха мыши. Увеличение сигнала при окклюзии

артерии наблюдалось и в наших исследованиях, но оно коррелировало со скоростью обнаруженного обратного кровотока. Эти факты указывают на то, что эффект биологического нуля должен описываться не только броуновским движением.

5.2.3 Динамика кровотока в артериальной и венозной частях капилляра

Также дополнительно было проведено сравнение скоростей кровотока в разных частях капилляра, а также частотно-временной анализ динамики сигналов скорости с расчетом фазовой когерентности (формулы 5.7-5.10).

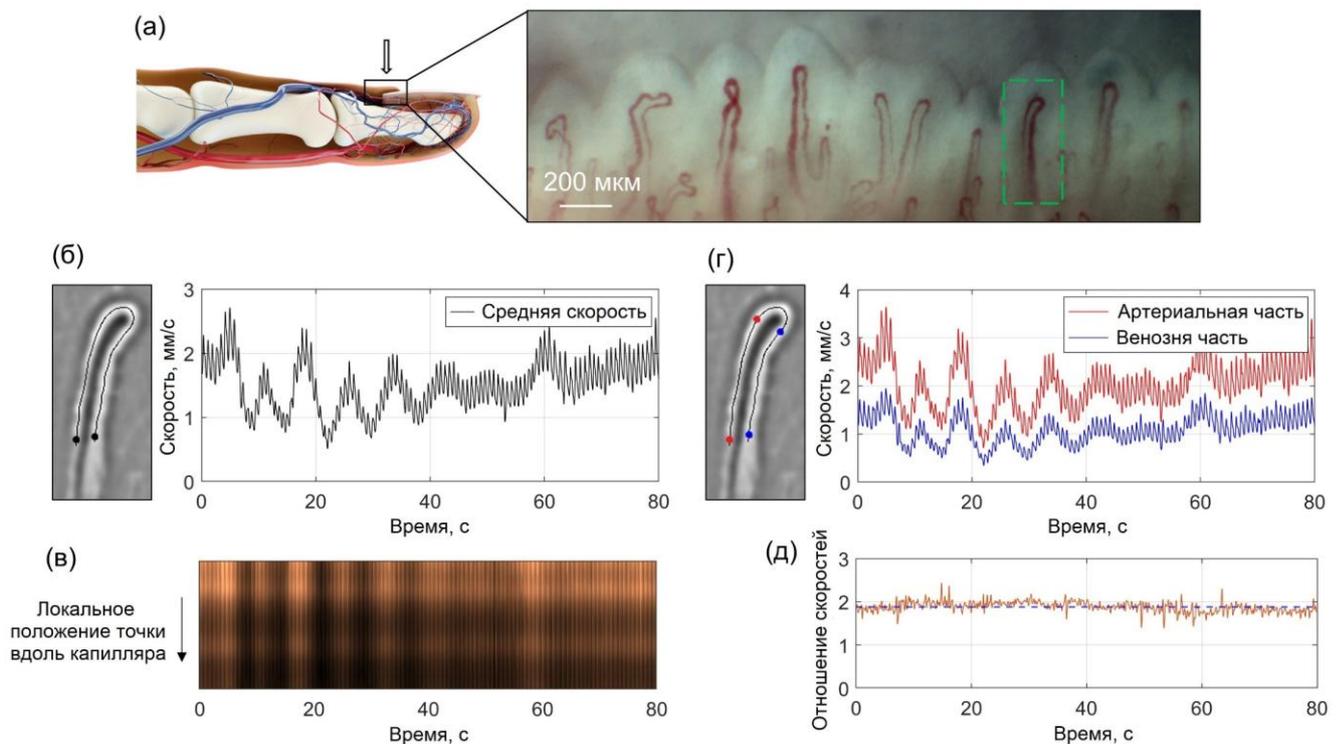


Рисунок 5.6. – (а) Панорамное изображение капилляров. Анализируемый капилляр выделен зеленым пунктирным прямоугольником. (б) Измерение скорости кровотока во всем капилляре и (в) карта, соответствующая скорости, усредненной по всем точкам вдоль капилляра. (г) Измерение скорости кровотока в артериальной и венозной частях капилляра и (д) соотношение скоростей

На рисунке 5.6а представлена панорамная картина капилляров ногтевого ложа, полученная при частоте съемки 50 кадров/с. Локальная скорость

капиллярного кровотока при частоте съемки 150 кадров/с показана на рисунке 5.6б. Карта локальных скоростей в каждый момент времени представлена на рисунке 5.6в. Здесь скорость отображена в оранжевой шкале в зависимости от времени (горизонтальная ось), а вертикальное положение соответствует различным точкам вдоль центральной линии капилляра. Видно, что в течение 80 секунд скорость варьируется в диапазоне 0,6-2,6 мм/с. По графику также можно определить частоту сердечных сокращений: в первые 60 секунд она составила 77 уд./мин. Однако эти значения отражают среднюю скорость в капиллярной петле.

На рисунке 5.6г сравниваются скорости в артериальной и венозной частях капилляра. Видно, что скорость в артериальной части в два раза выше, но временные изменения схожи, а соотношение скоростей остается стабильным независимо от локальной скорости в каждый момент времени (рисунок 5.6д).

На рисунке 5.7 представлен анализ с использованием НВП. На рисунке 5.7а,б показаны скалограммы НВП, отображающие распределение мощности сигнала в частотно-временной области. Усредненные по времени нормированные спектры показаны на рисунке 5.7в.

Сходство временной динамики кровотока в двух частях капилляра отражается в схожести их вейвлет-спектров. Расчет вейвлет-когерентности и фазовой когерентности подтверждает сходство сигналов и позволяет количественно оценить их взаимосвязь. На рисунке 5.7г стрелки указывают на фазовый сдвиг одного сигнала относительно другого. В данном случае наблюдается синхронное поведение сигналов почти во всем исследуемом частотном диапазоне.

На рисунке 5.7г,д показаны области значимой когерентности на протяжении всего времени регистрации в широком частотном диапазоне от 0,1 до 2 Гц. Таким образом, наблюдается высокая когерентность сигналов в кардиальном, респираторном и миогенном диапазонах. Хотя записи не позволили достоверно проанализировать нейрогенные и эндотелиальные ритмы, можно предположить, что и для них когерентность будет высокой. Для подтверждения значимости результатов на рисунке 5.7д показана средняя когерентность и 95-й перцентиль,

рассчитанный для 100 сгенерированных суррогатных данных. Пример суррогатных данных приведен на рисунке 5.7е.

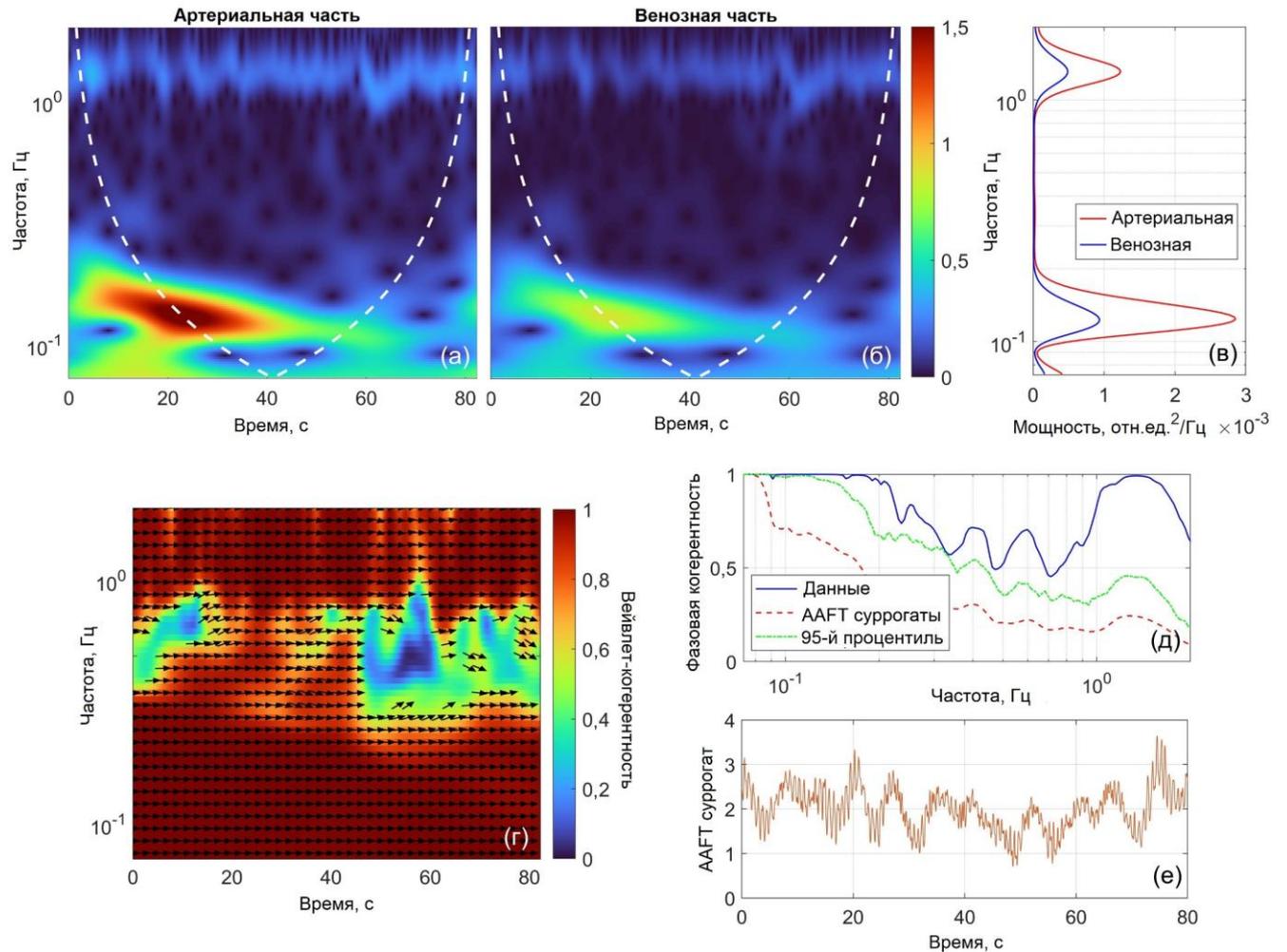


Рисунок 5.7 – (а, б) НВП скорости кровотока в артериальной и венозной частях капилляра соответственно. Белой пунктирной линией показан конус влияния, где краевые эффекты становятся значимыми на разных частотах. (в) Средние по времени нормализованные спектры. (г) Вейвлет-когерентность между скоростями в разных частях капилляра. Стрелки показывают фазовое отставание сигнала от артериальной части по отношению к венозной. (д) фазовая вейвлет-когерентность в сравнении с уровнями значимости представленных типов суррогатов, рассчитанными как 95-й процентиль из 100 суррогатов. (е) Пример ААФТ суррогата

Предложенный математический аппарат для частотно-временного анализа динамики кровотока и результаты исследования позволили получить важную информацию о физиологической регуляции капиллярного кровотока – разница скоростей обеспечивает эффективный обмен кислорода и питательных веществ в артериальной части и удаление продуктов метаболизма в венозной. Учитывая, что исследование проводилось на здоровом добровольце, можно предположить, что такая согласованность отражает нормальную регуляцию кровотока и может служить диагностическим критерием. Нарушения фазовой когерентности могут указывать на патологические изменения.

Кроме того, стабильность соотношения скоростей между артериальной и венозной частями, независимо от абсолютной локальной скорости, может быть маркером здоровья микроциркуляторного русла. Отклонения от этого соотношения могут сигнализировать о таких изменениях, как утолщение капилляров или стаз, которые часто связаны с заболеваниями (например, диабетом, гипертонией). Анализ паттернов кровотока и фазовой когерентности может помочь в ранней диагностике, но требует дополнительных клинических исследований.

Соотношение скоростей также может характеризовать соотношение диаметров венозной и артериальной частей капилляра. Используя закон сохранения массы, можно оценить это соотношение по измеренным скоростям. В данном эксперименте оно составило 1,41, а прямое измерение по изображениям дало значение 1,49. Разница может быть связана с эффектом Фахреуса, который влияет на распределение эритроцитов в потоке.

Предложенный подход с применением вейвлет-когерентности для поиска локализованного во времени когерентного колебательного поведения продемонстрировал существенное сходство спектральных колебаний в изолированном капилляре и интегральной оценки перфузии методом ЛДФ. Данное исследование экспериментально подтверждает сходство между скоростью движения эритроцитов в капиллярах и перфузией крови в коже человека, оцениваемой методом ЛДФ, и демонстрирует глубокую связь происхождения

сигнала ЛДФ с объективными физическими характеристиками микроциркуляции крови в коже. В следующем разделе будет продемонстрирована связь метода ЛДФ с ЛСКВ и предоставлены доказательства возможности использования вейвлет-математического аппарата для анализа данных ЛСКВ.

5.3 Частотно-временной анализ динамики сигналов лазерной спекл-контрастной визуализации

Как было показано выше, высокая пропускная способность метода ЛДФ ограничивает измерения лишь несколькими точками в пространстве, что исключает возможность быстрой визуализации с существенным пространственным и временным разрешением. На основе метода ЛДФ была разработана лазерная доплеровская перфузионная визуализация, позволяющая визуализировать перфузию крови с пространственным разрешением и глубиной диагностики, достаточной для визуализации кожи [441,442]. Однако процесс сканирования, реализованный в таких системах, значительно ухудшает временное разрешение метода, ограничивая частоту кадров несколькими кадрами в минуту, что исключает возможность частотно-временного анализа. Другой подход предполагает использование высокоскоростных камер [443,444]. Эта новая технология по-прежнему связана с такими проблемами, как высокая стоимость оборудования, низкое пространственное разрешение и повышенный шум детекторов из-за компромисса между временем экспозиции кадра и максимально допустимым лазерным излучением на поверхности кожи, которое приводит к низкому соотношению сигнал/шум реконструированной карты кровотока.

При этом ЛСКВ – простой и эффективный подход к визуализации кровотока, позволяющий получить информацию о структурах, участвующих в формировании сигнала кровотока. ЛСКВ может отображать временную вариацию спекла на частоте в несколько десятков Гц. Таким образом, можно получить информацию одновременно со всех пикселей с достаточным пространственным и временным разрешением.

В ряде исследований было показано, что перфузию крови можно эффективно оценивать как по ЛДФ, так и по ЛСКВ [445–447]. Предполагая только однократное смещение с определенной скоростью эритроцитов и основываясь на модели многослойной ткани кожи с определенными геометрическими и оптическими свойствами, концентрацией крови и распределением скорости, приведенными в теоретическом обзоре [448], было показано, что спектр мощности ЛДФ и контраст ЛСКВ могут быть рассчитаны из оптического доплеровского спектра, содержащего различные степени доплеровского смещения света. В работах [449–451] проведен сравнительный анализ методов ЛДФ и ЛСКВ для оценки кожного и мозгового кровотока. Величины относительных изменений перфузии, измеренные с помощью ЛСКВ и ЛДФ, демонстрируют сильную корреляцию [392].

Однако сравнение колебательных компонент сигналов этих двух методов проведено не было, при этом линейный и нелинейный анализ основных механизмов регуляции микрососудов, разработанный для метода ЛДФ, также может принести большую пользу при изучении сигналов ЛСКВ. Такой подход может предоставить врачам новый инструмент визуализации для извлечения ценной физиологической информации о колебаниях кожного кровотока и ее физиологической интерпретации, основанной на опыте использования измерений ЛДФ [452].

Таким образом, в данной части работы сравнивались два метода, ЛСКВ и ЛДФ, для анализа поведения осциллирующих компонентов кожного кровотока. ЛДФ используется в качестве эталонного метода, учитывая результаты предыдущего раздела, а ЛСКВ – как инструмент для исследования динамики спекл-паттернов [453].

Схема проведения измерений представлена на рисунке 5.8. Исследуемый объект освещался лазерным источником мощностью 10 мВт, работающим на длине волны 635 нм (Edmund Optics Inc., США). Для регистрации необработанных спекл-изображений использовалась КМОП-камера DCC3260M (Thorlabs, Inc., США) с разрешением 1936×1216 пикселей и размером пикселя 5,86 мкм, объектив MVL25M23 (Thorlabs, Inc., США) и поляризатор, ось поляризации которого была

перпендикулярна поляризации лазера, что позволило исключить зеркальную компоненту отражения. Расстояние между объективом камеры и областью интереса составляло 25 см.

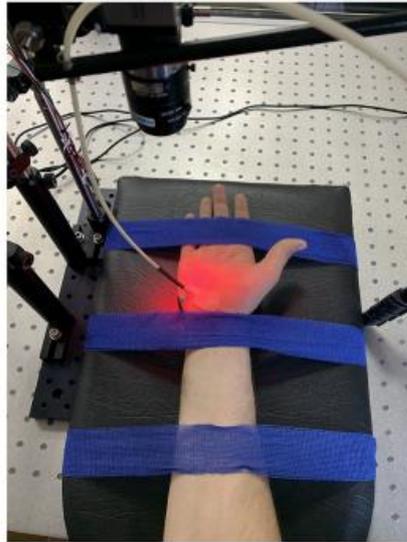


Рисунок 5.8 – Схема проведения измерений с помощью ЛСКВ и ЛДФ

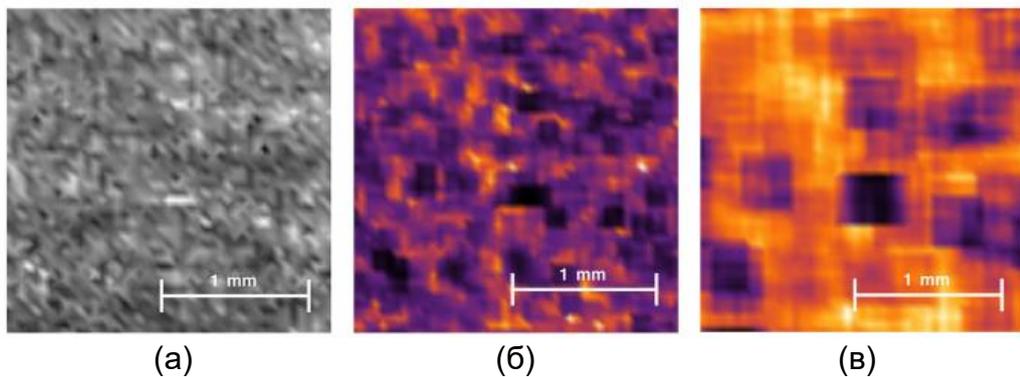


Рисунок 5.9 – (а) Необработанное спекл-изображение, спекл-контрастные изображения для (б) $N=3$ и (в) $N=7$. Темные точки соответствуют минимальным значениям

Типичная необработанная карта спеклов представлена на рисунке 5.9а. Для максимизации соотношения сигнал/шум минимальный размер спеклов должен превышать значение критерия Найквиста [454]. Таким образом, размер спеклов на камере регулировался путем изменения диаметра зрачка объектива камеры для достижения размера спеклов не менее чем в 2 раза больше размера пикселя. Размер спеклов оценивался следующим образом [454]:

$$S = 2,44\lambda(1 + M)f / \#, \quad (5.11)$$

где λ – длина волны подсветки;

M – увеличение системы визуализации;

$f/\#$ – апертура объектива камеры.

Средний спекл-контраст и спекл-перфузия рассчитывались по соотношениям (5.1) и (5.2) соответственно, с использованием пространственного алгоритма расчета. Примеры изображений со спекл-контрастом представлены на рисунке 5.9б,в для $N=3$ и $N=7$ соответственно. Перфузию также измеряли с помощью экспериментальной системы «ЛАКК-02» (ООО «НПП «ЛАЗМА», Россия). В качестве источника излучения использовали одномодовый лазер с длиной волны 1064 нм. Для доставки излучения к поверхности кожи и сбора обратно рассеянного света использовались оптические волокна.

Был рассмотрен усредненный спекл-контраст по всей области исследования. Для сравнения средних значений двух сигналов использовалась корреляция Спирмена. Из-за нелинейной связи между признаками, отсутствия данных о распределении и небольшого количества наблюдений был выбран непараметрический метод. Далее был проведен спектральный анализ двух сигналов, нормированных на квадрат стандартного отклонения (SD). Также было проведено сравнение с использованием вейвлет кросс-корреляционного анализа.

Использовалось вейвлет-преобразование, определяемое формулами (5.7) и (5.8). Интегральные вейвлет-спектры рассчитывались путем интегрирования квадратичного абсолютного значения вейвлет-коэффициентов по периоду T :

$$M(s) = \frac{1}{T} \int_0^T |W(s, \tau)|^2 d\tau. \quad (5.12)$$

Поскольку экспериментальные сигналы измеряются в произвольных единицах, а величина ЛДФ и ЛСКВ зависит от физиологических свойств кожи, суммарная мощность колебаний была отнормирована на квадрат стандартного отклонения SD :

$$E(s) = M(s) / SD^2. \quad (5.13)$$

Вейвлет кросс-корреляция двух сигналов $x(t)$ и $y(t)$ определяется в терминах их вейвлет-преобразований следующим образом:

$$C_{xy}(s) = \frac{\int_0^T W_x(s, \tau) W_y^*(s, \tau) d\tau}{\sqrt{\int_0^T |W_x(s, \tau)|^2 d\tau \int_0^T |W_y(s, \tau)|^2 d\tau}}. \quad (5.14)$$

Абсолютное значение $C_{xy}(s)$ принадлежит интервалу $[0, 1]$ и характеризует степень корреляции колебаний на заданной частоте. Фазовый сдвиг между колебаниями в паре сигналов определялся как:

$$\varphi_{xy} = \arctan \frac{\Im(C_{xy})}{\Re(C_{xy})}. \quad (5.15)$$

Измерения проводились при температуре 20-24 °С после предварительной адаптации к комнатным условиям. Во время экспериментов испытуемые находились сидя. Для каждого испытуемого проводились измерения спекл-контраста и ЛДФ на передней стороне ладони в средней части гипотенарной выемки (см. рисунок 5.8). Оба метода работали в области, свободной от крупных сосудов, ROI для спекл-контрастной визуализации выбирали на расстоянии 2-3 мм от ЛДФ.

Экспериментальная установка ЛСКВ располагалась на расстоянии 25 см от поверхности кожи с последующей настройкой зума, фокуса и поляризатора для минимизации зеркального отражения. Рука дополнительно фиксировалась мягкими эластичными бинтами «Reha-haft» (Hartmann, Германия) к стойке для предотвращения произвольных движений. Продолжительность каждого измерения составляла 10 минут. Данные получали при частоте дискретизации 80 Гц и времени экспозиции 9 мс для ЛСКВ и 20 Гц для ЛДФ. В итоге выходные

данные, полученные в результате одной одновременной записи, содержали 12000 точек данных ЛДФ и 48000 спекл-изображений.

В исследовании приняли участие 14 здоровых людей (8 мужчин и 6 женщин). Их средний возраст составил 27 лет и находился в диапазоне от 20 до 42 лет. Испытуемые не употребляли кофеин и лекарственные препараты. В исследование не включались добровольцы с заболеваниями бронхолегочной, сердечно-сосудистой, нейроэндокринной систем, желудочно-кишечного тракта, печени, почек, крови и любыми другими серьезными хроническими заболеваниями, которые могли бы повлиять на результаты исследования. Также исключались добровольцы с алкоголизмом, наркоманией и токсикоманией в анамнезе. Все участники дали информированное согласие. Исследование было одобрено этическим комитетом Орловского государственного университета (Орел, Россия).

На рисунке 5.10 представлены типичные примеры временной эволюции, наблюдаемой для рассматриваемых сигналов перфузии крови.

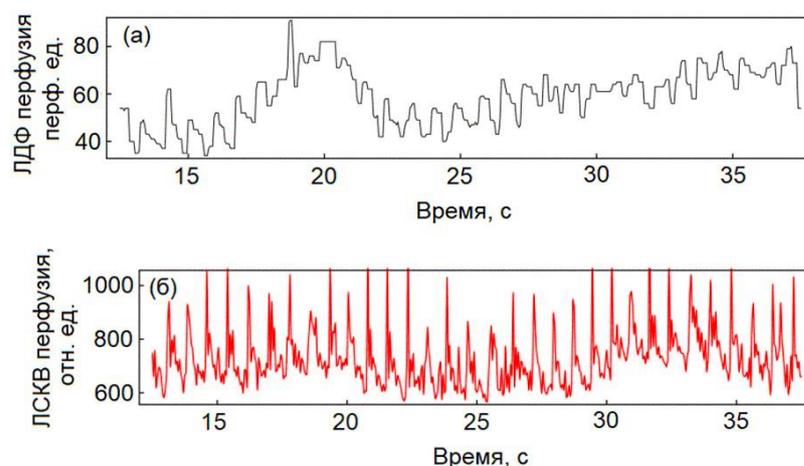


Рисунок 5.10 – Типичная временная эволюция сигналов, связанных с перфузией:

(а) сигнал ЛДФ, (б) спекл-перфузия $1/K^2$ ($N=7$)

Сигнал ЛДФ демонстрирует ярко выраженные колебания. Для спекл-перфузии $1/K^2$ наблюдается почти такая же временная эволюция с квазипериодическим поведением. Наряду с крупномасштабными колебаниями, период которых близок к 10 с, сигнал может иметь высокочастотную периодичность (период близок к 1 с).

Из рисунка 5.11а видно, что существует связь между сигналами перфузии крови, измеренными с помощью ЛДФ и ЛСКВ. Для группы набранных здоровых добровольцев корреляция Спирмена между двумя параметрами составляет 0,60 ($p=0,02$). Это значение корреляции указывает на то, что связь между этими двумя показателями является монотонной.

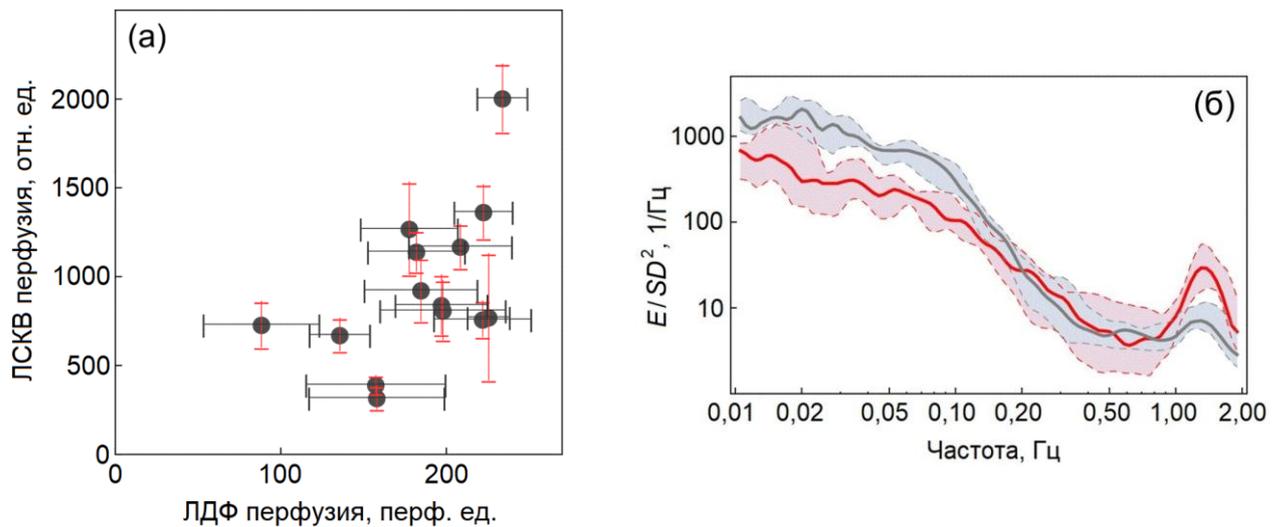


Рисунок 5.11 – (а) Соотношение средних значений перфузии, измеренных с помощью ЛДФ и ЛСКВ (усреднены по всей ROI) для группы из 14 здоровых добровольцев. Черные столбики ошибок указывают на стандартное отклонение ЛДФ перфузии, красные – на стандартное отклонение ЛСКВ перфузии. (б)

Нормализованные спектры перфузии, измеренные в группе здоровых добровольцев с помощью ЛДФ (серый) и ЛСКВ (красный). Сплошные линии обозначают медианные значения, пунктирные – первый и третий квартили.

При сравнении спектров ЛДФ и ЛСКВ спектральная энергия была нормирована на квадрат стандартного отклонения. Усредненные спектры перфузии, полученной двумя методами представлены на рисунок 5.11б. Прежде всего, следует отметить, что оба спектра имеют общую форму. Вблизи 1 Гц наблюдается пик, связанный с сердечной деятельностью. Также обнаруживаются низкочастотные перфузионные колебания перфузии.

Почастотный корреляционный анализ, проведенный с использованием вейвлетной кросс-корреляции, показал достаточно высокую корреляцию

низкочастотных колебаний (см. рисунок 5.12а). В диапазоне частот 0,01-0,1 Гц среднее значение кросс-корреляции составляет около 0,7-0,8, и эта корреляция оказывается значимой.

Фазовый сдвиг между сигналами ЛДФ и ЛСКВ на частотах около 0,4-2 Гц близок к нулю (рисунок 5.12б). Частотный диапазон в районе 1 Гц связан с сердечной деятельностью, поэтому было обнаружено, что фазовый сдвиг пульсовой волны, зарегистрированной двумя методами, равен нулю. Колебания с частотами 0,4-0,8 Гц имеют очень низкую энергию и слабую корреляцию, что приводит к большой дивергенции фазового сдвига, поэтому среднее значение также близко к нулю. В то же время был получен значительный фазовый сдвиг в полосе частот 0,02-0,1 Гц, который изменяется от -0,4 до -0,6 рад. Такой фазовый сдвиг дает временную задержку около 4 с для 0,02 Гц и около 0,6 с для 0,1 Гц. Это означает, что временные колебания с частотой 0,2-0,1 Гц в спекл-контрасте следуют за теми же колебаниями в ЛДФ.

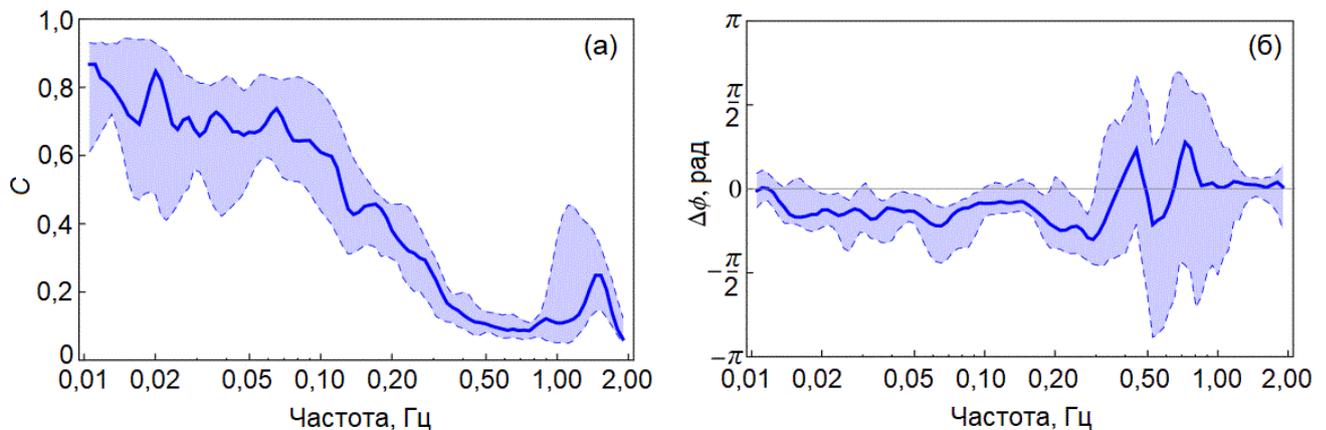


Рисунок 5.12 – (а) Абсолютное значение и (б) фазовый сдвиг вейвлетной кросс-корреляции между сигналами ЛДФ и ЛСКВ, измеренные в группе здоровых добровольцев. Сплошными линиями обозначены медианные значения, пунктирными – первый и третий квантили

Основной целью данных исследования было ответить на вопрос, возможно ли идентифицировать колебания перфузии крови с помощью ЛСКВ. Вейвлетный кросс корреляционный анализ выявил значительную когерентность, что подтверждает гипотезу о наличии общих источников генерации осцилляций.

Пульсовая волна, измеренная обоими методами, находится в фазе. В то же время осцилляции, оцененные с помощью ЛСКВ в низкочастотном диапазоне 0,02-0,1 Гц, отстают от осцилляций ЛДФ со сдвигом фаз, близким к 0,5 рад. Предполагается, что это отставание связано с разной глубиной проникновения света от источников, используемых в методах ЛСКВ и ЛДФ. ЛСКВ имеет более малую диагностическую глубину, чем ЛДФ, поскольку лазерный источник в ЛСКВ находится на значительном расстоянии от объекта, и плотность мощности лазерного луча на коже уменьшается [455]. В работе [456] было показано, что оцениваемая глубина для ЛДФ может быть в три раза выше, чем для ЛСКВ.

Впервые продемонстрировано, что спектральная энергия колебаний в диапазоне частот 0,01-2 Гц временных записей спекл-контраста несет ту же информацию, что и обычные записи ЛДФ, и может быть связана с теми же физиологическими механизмами. Обобщая полученные результаты, можно прийти к выводу, что методология спектрального анализа ЛДФ может быть распространена на ЛСКВ.

5.4 Картирование ритмов кровотока на основе частотно-временного анализа сигналов лазерной спекл-контрастной визуализации

В данной части диссертационной работы представлены результаты картирования осцилляций кровотока биологических тканей на основе обработки сигналов лазерной спекл-контрастной визуализации (ЛСКВ).

Как было сказано выше, в целях мониторинга микроциркуляции крови с помощью метода ЛСКВ регистрируется набор данных, содержащий множество изображений (перфузионных карт), представляющих временную эволюцию кровотока в исследуемой области. Визуализация позволяет определять расположение микрососудов в исследуемой биоткани, а также регистрировать наличие активного кровотока. При этом получаемые перфузионные карты обеспечивают возможность проведения частотного анализа полученного сигнала в интересующих областях.

Ниже описаны результаты частотно-временного анализа транскраниальной записи лазерного спекл-контраста на мозге лабораторной крысы.

Исследования проводились с использованием специально разработанной экспериментальной установки, представленной на рисунке 5.13. Принцип построения системы ЛСКВ соответствует описанному в разделе 5.1. Лазерный источник излучения LDM785 (Thorlabs, США) с длиной волны 785 нм равномерно освещал область исследования через набор диффузоров. Обратно рассеянный свет регистрировался с помощью монохромной КМОП камеры высокого разрешения UI-3360CP-NIRGL (IDS, Германия). Для устранения зеркально отраженного излучения перед объективом был установлен линейный поляризатор для ближнего инфракрасного диапазона излучения. Экспериментальные данные были получены при частоте записи 90 кадров в секунду и времени экспозиции 11 мс для всех экспериментов.

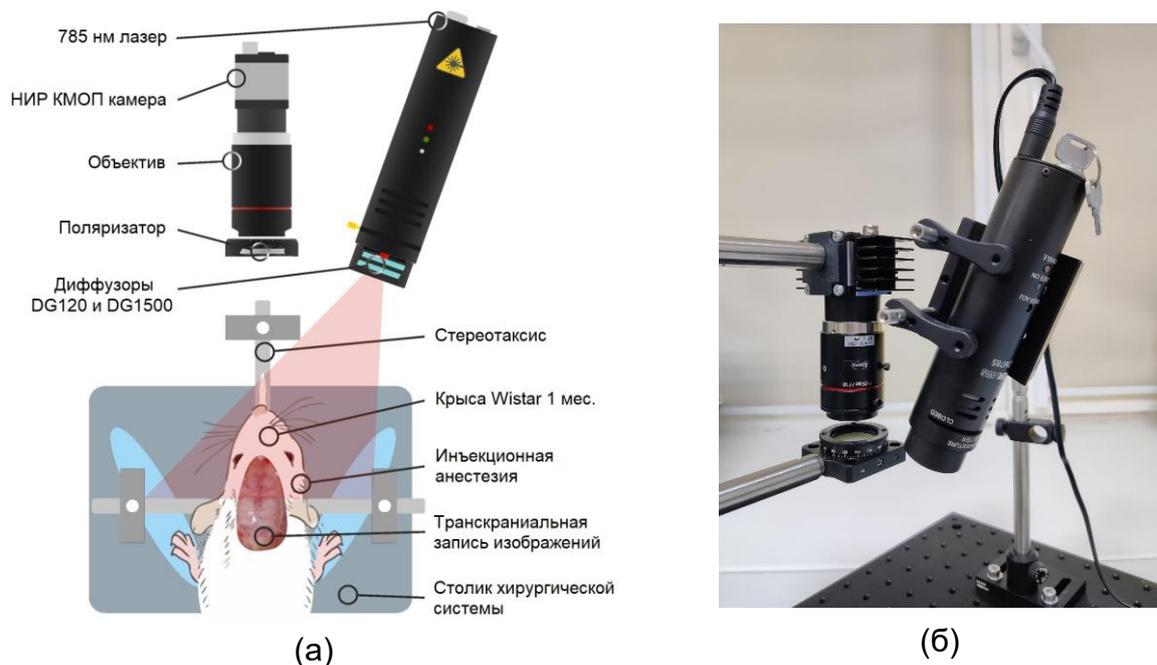


Рисунок 5.13 – (а) Схема экспериментальной установки при исследовании лабораторных животных и (б) внешний вид системы ЛСКВ

Для анализа отдельных областей интереса (ROI), а также для полного (попиксельного) анализа изображения (для построения карт осцилляций кровотока) использовались два различных пути обработки. Алгоритм обработки представлен на рисунке 5.14 и описан ниже.



Рисунок 5.14 – Блок-схема обработки данных ЛСКВ, объясняющая шаги алгоритма анализа выбранных ROI (1), а также анализа полного изображения (2)

Чтобы визуализировать сосуды мозга в лучшем качестве, исходные монохромные изображения обрабатывались с количеством кадров для временного усреднения, равным 90. Таким образом, данные усреднялись за одну секунду записи. После временного усреднения дополнительно применялся пространственный алгоритм с окном усреднения, равным 7×7 пикселей.

Для получения данных с целью последующего частотного анализа было использовано усреднение по 4 кадрам во времени и усреднение окном 7×7 пикселей в пространстве. Так, исходная частота кадров (90 кадров в секунду) была снижена до 22,5 кадров в секунду. Поиск оптимальных параметров был особенно важен, поскольку необходимо было поддерживать достаточную частоту дискретизации сигнала для надежного частотного анализа. В данной работе значения ЛСКВ перфузии также рассчитывались по соотношению $1/K^2$.

Частотно-временной анализ полученного значения ЛСКВ перфузии проводился с помощью непрерывного вейвлет-преобразования, описанного ранее. Полученный спектр содержал 9 октав, что позволило наблюдать все пять частотных диапазонов регуляции микроциркуляции крови, присутствующих у животных [457,458].

Для осуществления анализа полного изображения после реконструкции временной динамики ЛСКВ перфузии в каждом пикселе изображения проводился вейвлет-анализ сигналов в соответствии с вышеописанными принципами. Далее определялись амплитуды колебаний в интересующих частотных диапазонах,

характеризующих сердечную, дыхательную и миогенную активность в микроциркуляторной системе животного, и строились карты осцилляций церебрального кровотока.

Объектом исследования была выбрана лабораторная крыса линии Wistar возрастом 1 месяц и массой тела около 100 грамм. Экспериментальные исследования проводились в соответствии с принципами GLP. Работа была одобрена Этическим комитетом Орловского государственного университета.

Протокол исследования включал анестезию животного путем внутримышечного введения лекарственной композиции Золетил/Ксила в стандартных пропорциях и дозах. После анестезии животное помещалось на столик хирургической системы для грызунов (Rodent Surgical Monitor+, Indus Instruments, США) с целью поддержания стабильной температуры тела, а также для контроля частоты сердцебиения и дыхания во время исследования. Использование этой системы позволило позже подтвердить частотное положение пиков сердечных и дыхательных осцилляций, полученных при вейвлет-анализе сигнала ЛСКВ перфузии.

Перед началом эксперимента голова животного фиксировалась в стереотаксисе, чтобы избежать артефактов движения. Для доступа к головному мозгу кожа на голове животного разрезалась и удалялась, при этом кости черепа не повреждались, таким образом, проводилась транскраниальная визуализация церебральной микроциркуляции крови. Регистрация изображений осуществлялась на протяжении 5 мин.

Для изучения динамики мозгового кровотока в различных отделах мозга были выбраны три региона исследования: верхний сагиттальный синус, его притоки и участки мозга, в которых нет четко визуализированных сосудов. В каждом из регионов исследования было выбрано пять ROI (12×12 пикселей) для получения статистических данных. Кроме того, для детального изучения пространственного распределения частот использовался попиксельный вейвлет-анализ, что позволило построить карты осцилляций.

На рисунке 5.15 представлено изображение мозга крысы, полученные в исходном монохромном режиме, а также обработанное спекл-контрастное изображение.

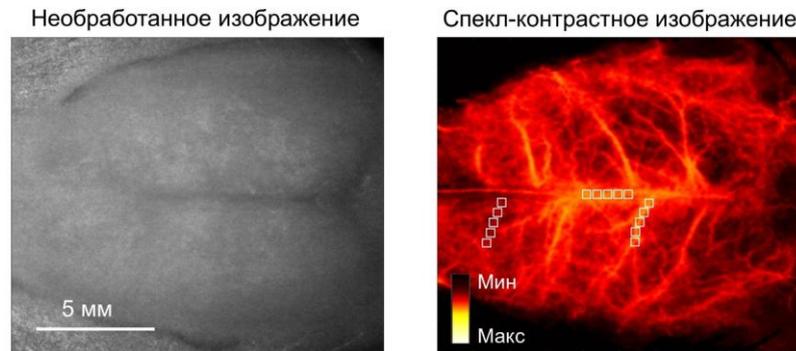


Рисунок 5.15 – Монохромное изображение и спекл-контрастное изображения мозга крысы после проведения обработки. Белые квадраты обозначают ROI, выбранные для проведения вейвлет-анализа

Регионы с повышенным кровотоком, такие как крупные сосуды, имеют более низкие значения спекл-контраста и на изображениях выглядят желтыми. На рисунке 5.16 показаны результаты вейвлет-анализа сигналов полученной ЛСКВ перфузии в каждом регионе исследования.

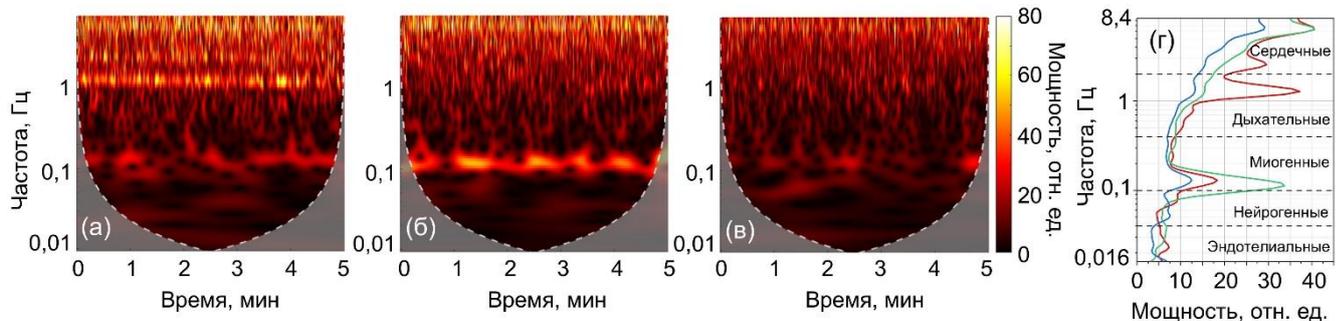


Рисунок 5.16 – Вейвлет-анализ полученных значений ЛСКВ перфузии: (а) пример скалограммы амплитуды вейвлет-преобразования для верхнего сагиттального синуса (красная линия в г), (б) для притока (зеленая линия в г) и (в) для ткани мозга, не имеющей четко визуализированных сосудов (синяя линия в г); (г) соответствующие усредненные по времени спектры

Во всех регионах исследования наблюдались заметные амплитуды колебаний, вызванных вазомоциями (0,11-0,13 Гц), дыхательной активностью (1,3

Гц) и сердечными сокращениями (6,3-6,7 Гц). Значения амплитуды вазомоций варьируются от 12,5 до 33,7 отн.ед.; дыхательных – от 13,3 до 37,2 отн.ед.; сердечных – от 29,2 до 40,6 отн.ед. (величина в значительной степени зависит от анализируемого региона исследования). Согласно данным, полученным благодаря системе мониторинга, у животного в среднем было 386 сердечных ударов в минуту (примерно 6,44 Гц) и 73 дыхательных актов в минуту (примерно 1,22 Гц), что соответствует частотным координатам максимальных пиков, обнаруженных при вейвлет-преобразовании.

Рисунок 5.16 также иллюстрирует тот факт, что разработанная технология ЛСКВ чувствительна к кровотоку не только в видимых поверхностных сосудах, но и в участках ткани с сосудами, которые не видны на конкретном спекл-контрастном изображении. Наличие осцилляций в таких областях позволяет предположить, что динамические характеристики спекл-контраста содержат информацию о кровотоке в нижележащих микрососудах.

На рисунке 5.17 представлены усредненные во времени спектры и стандартные отклонения для пяти ROI в каждом из трех регионов исследования, показанных на рисунок 5.15. Это было сделано для получения статистики о повторяемости формы вейвлет-спектра в разных ROI в одном и том же регионе исследования.

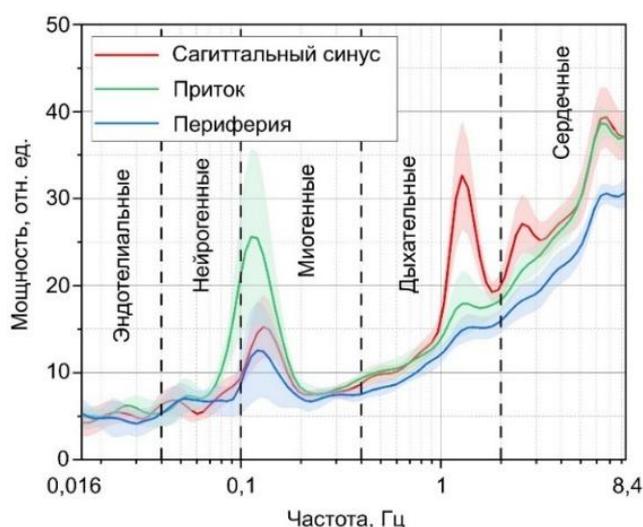


Рисунок 5.17 – Усредненные во времени спектры (сплошные линии) и стандартные отклонения (полупрозрачные области) для пяти ROI в каждом из трех регионов исследования

По результатам расчетов, наименьший разброс значений был обнаружен в области без четко визуализированных сосудов для сердечных осцилляций. Интересно, что приток центрального сагиттального синуса оказался регионом с наибольшим разбросом значений для миогенных осцилляций. Далее был проведен попиксельный вейвлет-анализ ЛСКВ перфузии и получены карты распределения осцилляций для трех доминирующих компонентов регуляции кровотока, представленные на рисунке 5.18.

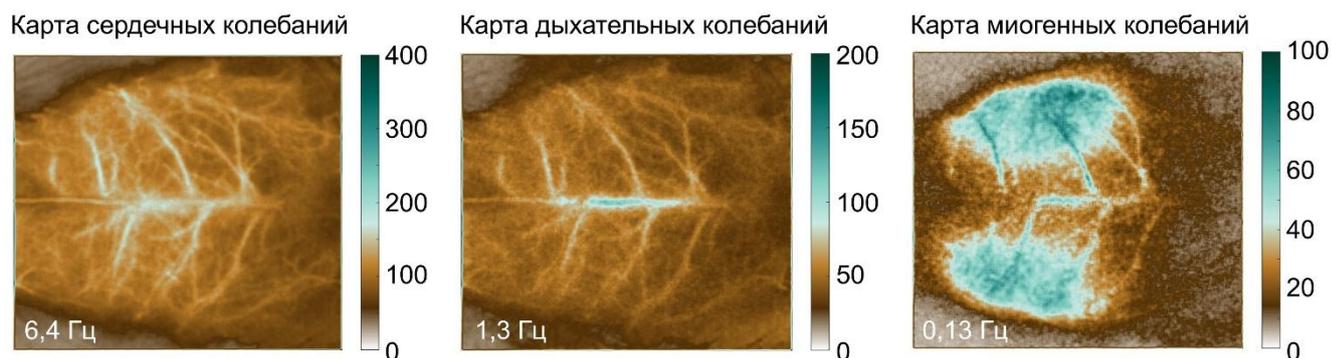


Рисунок 5.18 – Пространственные вариации сердечных (6,4 Гц), дыхательных (1,3 Гц) и миогенных (0,13 Гц) осцилляций церебрального кровотока

Как и ожидалось, согласно рассчитанным выше усредненным по времени спектрам, высокая амплитуда сердечных осцилляций наблюдается достаточно равномерно в крупных сосудах по всей поверхности мозга крысы. Дыхательные осцилляции имеют высокую амплитуду только в центральном сосуде, а миогенные осцилляции наиболее выражены в периферических сосудах малого диаметра.

Вейвлет-декомпозиция данных позволила провести анализ возникающих в сосудах головного мозга вазомоций различной природы. Осцилляции церебральной микроциркуляции крови представляют большой интерес, поскольку предполагается, что они связаны с местной регуляцией кровотока и могут быть использованы в различных клинических и фундаментальных медицинских приложениях. Диапазон вазомоторной активности может быть дополнительно разделен на более короткие интервалы в зависимости от происхождения. Данные Т. Mastantuono и др. показывают, что в мозге крыс осцилляторные паттерны

характеризуют пилальный кровоток, и в свою очередь пилальное кровообращение у крыс регулируется теми же механизмами, что и микроциркуляция кожи человека [459]. Было обнаружено, что сердечные осцилляции (6,3-6,7 Гц) присутствуют в спектрах всех ROI и имеют довольно высокую амплитуду даже в регионах мозга, где сосуды визуализируются нечетко. Дыхательные осцилляции наиболее четко наблюдаются в центральном сосуде, тогда как появление пика, частота которого в два раза превышает частоту дыхания, требует дополнительного изучения и объяснения. На данном этапе исследования можно предположить, что появление дополнительного пика может быть связано с физиологическим движением костей и тканей животного. Спектр-структура формирующегося сигнала зависит от многих факторов, которые могут вызывать вторичные частоты, отличные от основной частоты, включая те, которые связаны с движением костей черепа и мозговой ткани во время дыхания. Эти вторичные частоты могут привести к некоторому неправильному определению реальной частоты колебаний и проявляются как вторая гармоника основной частоты [460].

В целом регуляция сердечной и дыхательной деятельности является общей для всей микроциркуляторной системы организма, включая сосудистую систему мозга, поэтому, как и ожидалось, эти осцилляции были обнаружены во всех исследованных ROI. В диапазоне миогенных осцилляций также наблюдалась повторяемость пиков по частотному расположению и амплитуде. В отличие от вышеуказанных диапазонов, спектры колебаний нейрогенного и эндотелиального происхождения не повторяли друг друга по форме, что говорит о пространственной неоднородности этих колебаний.

Также интересным наблюдением стала зарегистрированная высокая интенсивность миогенных колебаний в периферическом сосуде мозга (притоке центрального сагиттального синуса). Результаты экспериментальных исследований показывают, что существует продольный градиент миогенной реактивности в артериолярной системе [461]. При этом относительная миогенная реактивность увеличивается с уменьшением диаметра сосуда, что, скорее всего, и наблюдалось в результатах данных экспериментов. Однако физиологическое

значение миогенного диапазона в регуляции мозгового кровообращения до сих пор является предметом обсуждений. Происхождение таких сигналов в церебральной микроциркуляции окончательно не выяснено, а отделение влияния колебаний артериального давления от вазомоторной динамики на церебральную гемодинамику является нерешенной проблемой [462].

Полученные карты колебаний в трех частотных диапазонах позволили представить результаты, содержащиеся в построенных ранее вейвлет-спектрах, в более наглядном и информативном виде. Сердечные колебания проявляются практически во всех сосудах, как крупных, так и периферических. Предположение о большей выраженности миогенных колебаний в сосудах малого диаметра подтверждается и картой миогенных колебаний, где более высокие значения амплитуд наблюдаются на периферии.

Предложенный новый метод обработки и представления данных ЛСКВ может сыграть большую роль как в фундаментальной медицине для уточнения физиологических механизмов регуляции кровообращения, так и в клинической практике для разработки новых диагностических параметров, применимых в диагностике и лечении заболеваний микроциркуляторной системы. Разработанный подход может быть полезен для изучения изменений периферического кровотока в ряде различных приложений, включая изучение влияния физиологически активных веществ, физических факторов (нагрева, лазерного излучения) или патологических состояний организма (например, такого социально значимого заболевания как СД) на механизмы сосудистого кровотока.

5.5 Выводы по главе 5

В данной главе проведено комплексное исследование методов анализа микроциркуляции крови, включая ЛСКВ, ЛДФ и высокоскоростную ВКС. Проведенные экспериментальные исследования и разработанные подходы позволили предложить новые алгоритмы для анализа динамики кровотока. Результаты главы вносят значительный вклад в развитие методов неинвазивной

диагностики микроциркуляции и метаболизма и открывают новые направления для дальнейших исследований.

Основные результаты главы можно сформулировать следующим образом:

1. Установлено сходство спектральных колебаний в изолированном капилляре и интегральной оценки перфузии методом ЛДФ. Подтверждена возможность использования вейвлет-анализа для изучения осцилляций кровотока, что демонстрирует глубокую связь ЛДФ-сигнала с физическими характеристиками микроциркуляции.

2. Впервые зарегистрирован эффект обратного кровотока в капиллярах во время окклюзии, что указывает на неброуновскую компоненту движения эритроцитов. Показано, что сигнал ЛДФ в условиях окклюзии может отражать не только тепловое движение частиц, но и перераспределение давления в микрососудах.

3. Обнаружена значительная корреляция между сигналами ЛСКВ и ЛДФ, что подтверждает возможность использования ЛСКВ для анализа осцилляций кровотока. Выявлен фазовый сдвиг в низкочастотном диапазоне (0,02-0,1 Гц), связанный с разной глубиной проникновения света в ткань для методов ЛСКВ и ЛДФ.

4. Разработан метод попиксельного вейвлет-анализа данных ЛСКВ, позволяющий строить карты осцилляций кровотока в различных частотных диапазонах. Показано, что ЛСКВ чувствительна не только к кровотоку в видимых сосудах, но и в нижележащих микрососудах, что расширяет её диагностические возможности.

5. Предложенные методы могут быть использованы для изучения регуляции кровотока в норме и при патологиях, а также для разработки новых диагностических подходов в клинической практике.

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА ТЕСТ-ОБЪЕКТОВ, ИМИТИРУЮЩИХ ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ, ДЛЯ ЗАДАЧ КАЛИБРОВКИ И КОНТРОЛЯ ТЕХНИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ СИСТЕМ ОПТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ

Разработка, калибровочные измерения, верификация и стандартизация методов оптической визуализации требуют наличия тест-объектов (фантомов) с известными и количественно подтверждёнными опто-механическими свойствами, включая структурные геометрические особенности и форму. Использование подобных тест-объектов позволяет с высокой точностью калибровать системы измерения, настраивать метод измерения на получение полезного сигнала/изображения с определённой глубины, локализовать измеряемый объём, а также стандартизировать результаты измерений, получаемых в различных лабораториях и приборами различных производителей. Следует отметить, что качество стандартизации существенно зависит от использования материалов с контролируемыми оптическими свойствами, удовлетворяющих условию стационарности. В силу того, что оптические свойства биотканей являются весьма переменными в зависимости от условий и времени хранения, тест-объекты оказываются высоко востребованными как на стадии разработки, так и калибровочных измерений при дальнейшей эксплуатации приборов.

В последние 15-20 лет были предложены различные фантомы, имитирующие оптические свойства различных биотканей [463], применительно для различных диагностических методов, например, поляриметрии [464], ОКТ [465], доплеровской ОКТ [466], терагерцовой спектроскопии [467], флуоресцентной спектроскопии [468], лазерной спекл-контрастной визуализации [469], микроскопии [470] и др. Для воспроизведения параметров флуоресценции наиболее простые фантомы используют водные коллоидные растворы (например, интралипид), с добавлением поглощающих красителей, а также веществ, имеющих ярко выраженную собственную флуоресценцию при возбуждении в требуемом диапазоне длин волн [471–475]. Такие фантомы позволяют использовать в качестве

матричного материала буферные растворы с необходимым значением pH для обеспечения среды, совместимой с естественной структурой органических молекул, моделирующих те или иные свойства живого организма [476,477]. При разработке фантомов, имитирующих капиллярное сосудистое русло, используются различные пористые структуры. Это позволяет достичь наибольшего сходства структурных и геометрических особенностей разрабатываемого тест-объекта для верификации оптических измерений. Наряду с гибридной структурой для имитации мягких тканей известно использование гель-восковых фантомов на основе минерально-масляного материала [478]. Также ранее описано создание фантома с применением диметилформамида в качестве растворителя и протопорфирина IX в качестве флуорофора, имитирующих параметры флуоресценции опухолевых тканей [472].

Для создания тест-объектов с требуемыми размерами, геометрической формой, и наличием неоднородности, актуальным является использование пластичных слоев с заданными поглощающими, рассеивающими, а также флуоресцентными свойствами. При изготовлении таких структур применяются следующие материалы: каррагинан, полисахарид, агар, агароза, поливиниловый спирт, полиуретан, силикон, а также эластомерные (резиноподобные) субстанции [478,479]. Полученные тест-объекты удовлетворяют условию стационарности и позволяют воссоздавать многослойную структуру ткани с заданными свойствами каждого отдельного слоя [480]. Применение пластичных материалов позволяет разрабатывать формы с полыми областями и твердыми включениями, например, для имитации кровеносных сосудов и других макро-неоднородностей встречающихся в биотканях. Использование силиконовой основы при смешивании с глицерином дает возможность создавать модельные образцы биотканей, обладающие собственным рассеянием, что существенно улучшает стабильность получаемых свойств [481]. Также, с помощью пластичной матричной основы возможно изготавливать композитные фантомы с жидкими фрагментами, например, из спирторастворимого нигрозина и бычьего гемина [482].

В данном разделе диссертации предложен ряд тест-объектов и технологий их изготовления для калибровки измерений диффузного отражения, флуоресценции и динамического рассеяния света.

6.1 Тест-объекты, имитирующие поглощающие и рассеивающие свойства

6.1.1 Калибровочные измерения системы гиперспектральной визуализации

Твердый фантом биоткани с заданными оптическими свойствами, равными свойствам бескровной дермы человека, использовался для проверки возможностей системы гиперспектральной визуализации для измерения оксигенации тканей.

Для проверки возможностей предложенного подхода к измерению насыщения крови кислородом в сосудах был использован твердый фантом биологической ткани с заданными оптическими свойствами, соответствующими свойствам бескровной дермы человека. Конструкция и размеры разработанного фантома показаны на рисунке 6.1а,б. Фантом содержит два наклонных плоских полых канала (сечение $0,25 \times 1 \text{ мм}^2$), расположенных под разными углами внутри фантома. Глубина залегания линейно увеличивается от 0,3 до 2 мм для поверхностного канала и от 0,3 до 4 мм для глубокого. Матрица на основе поливинилхлорида (ПВХ) использовалась в качестве прозрачной основы для наночастиц ZnO, обеспечивающих рассеяние. Необходимое количество добавленных рассеивающих частиц было рассчитано на основе теории Ми с учетом их распределения по размерам. Средний диаметр частиц составил 0,34 мкм. Для контроля коэффициента поглощения фантома был добавлен черный пластиковый краситель на основе CI Pigment Black 7. Два стеклянных капилляра были установлены под разными углами, как описано выше, внутри формы фантома до его затвердевания. После затвердевания капилляры были аккуратно удалены, образуя полые каналы. Каналы были подключены через микропипеточные наконечники и пластиковые трубки к шприцевому насосу. Толщина фантомов контролировалась с помощью системы оптической когерентной томографии (Hyperion, Thorlabs Ltd., США).

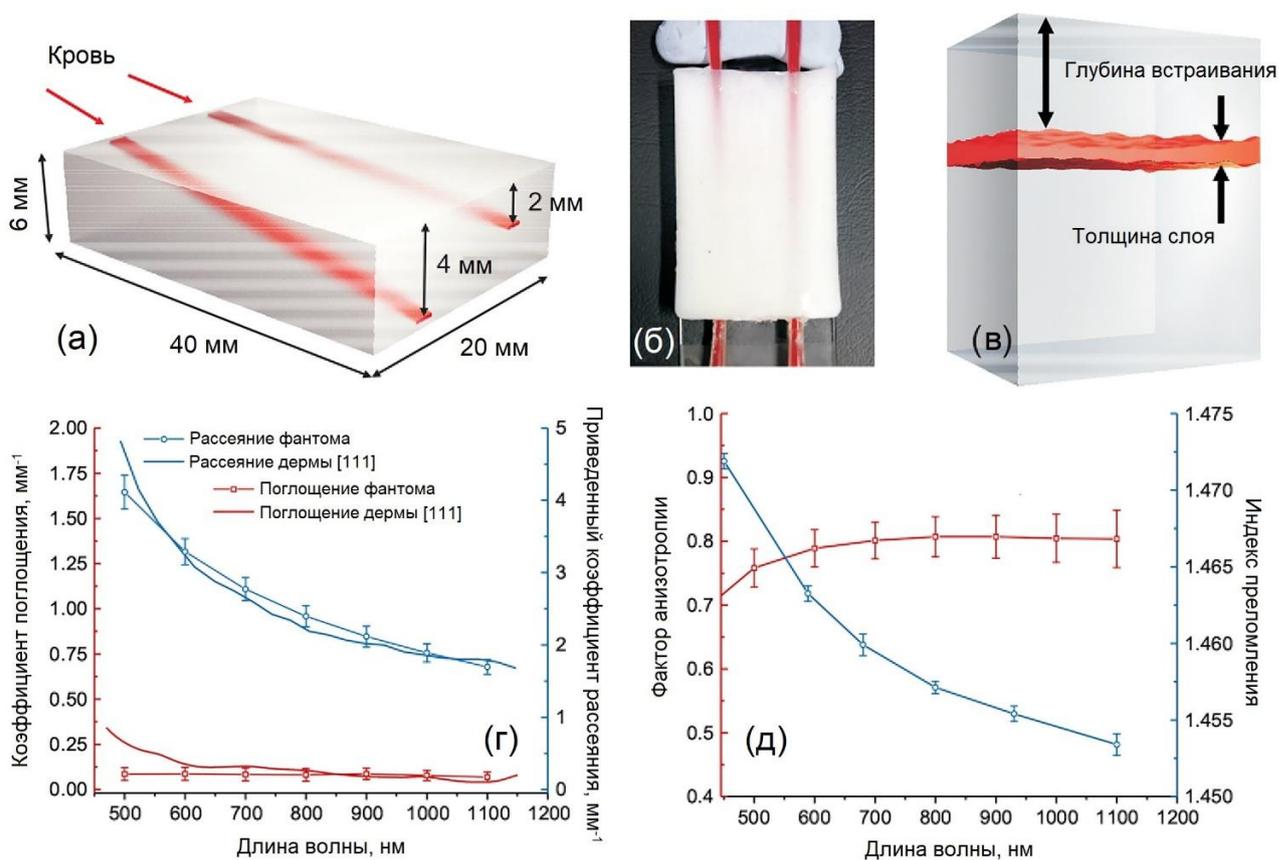


Рисунок 6.1 – (а) 3D изображение фантома биоткани со встроенными кровеносными сосудами; (б) фотография (вид сверху) изготовленного фантома с каналами, заполненными полностью насыщенной кислородом кровью; (в) трехслойная модель фантома, используемая для расчета спектров диффузного отражения; (г,д) измерены оптические свойства фантома

Суспензия отмытых эритроцитов человека (45% об./об.), полученная от здорового донора, прокачивалась через каналы со скоростью 10 мл/ч для предотвращения осаждения. Использованная суспензия эритроцитов была подготовлена следующим образом. Сначала цельная кровь (гематокрит 45%) от здорового донора была взята путем венепункции и помещена в пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) для предотвращения свертывания. Затем, чтобы предотвратить неконтролируемую агрегацию, эритроциты были отмыты в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7,4). Для этого цельная кровь центрифугировалась при 3000 g в течение 10 минут, и плазменный супернатант заменялся на PBS. Эта процедура повторялась три раза для удаления остаточной

плазмы, содержащей белки, вызывающие неконтролируемую агрегацию. Наконец, отмытая масса эритроцитов была суспендирована в PBS до исходного значения гематокрита. Все измерения проводились при комнатной температуре 20°C.

Оптические свойства изготовленного фантома, включая коэффициенты поглощения и рассеяния, а также фактор анизотропии в видимой и ближней инфракрасной областях спектра, были определены на основе метода обратного сложения-удвоения по данным диффузного отражения, диффузного пропускания и коллимированного пропускания, измеренных с помощью спектрофотометра (Gooch & Housego, США), оснащенного интегрирующими сферами [483,484]. Дополнительно показатель преломления фантома был измерен с помощью многочастотного рефрактометра Аббе (Atago, Япония). Результаты характеристик оптических свойств фантома представлены на рисунке 6.1г,д. На рисунке 6.1г также показано сравнение полученных коэффициентов поглощения и приведенного рассеяния созданного фантома с данными, измеренными для *ex vivo* дермы человека. Данные для дермы человека взяты из [212]. Измерения для приведенного рассеяния хорошо согласуются во всем спектральном диапазоне 500-1100 нм. Для коэффициента поглощения хорошее соответствие наблюдается в спектральном диапазоне ~650-1100 нм. Измеренный фактор анизотропии рассеяния (рисунок 6.1д) составляет около 0,8 для рассматриваемого диапазона, что также типично для биологических тканей, включая кожу. Таким образом, разработанный фантом можно считать релевантной моделью бескровной дермы/кожи человека для красного и инфракрасного спектрального диапазона.

Перед измерениями подготовленная суспензия эритроцитов тщательно перемешивалась на воздухе для увеличения насыщения кислородом до 100%. Для подтверждения уровня кислорода 0,5 мл суспензии помещались в герметичную плоскую стеклянную кювету толщиной 1 мм, и оптические свойства суспензии для спектрального диапазона 600-1000 нм оценивались на основе спектрофотометрических измерений и процедуры обратного сложения-удвоения, аналогично описанной выше. Хорошее соответствие полученного спектра

поглощения с поглощением оксигенированной крови (гематокрит 45%) подтверждает predetermined уровень насыщения кислородом.

Смоделированные спектры диффузного отражения, представленные в главе 1, были использованы для обучения ИНС с целью восстановления уровня кислорода в капиллярах внутри фантома. Обученная ИНС была применена для обработки гиперспектральных измерений диффузного отражения фантома. Для оценки насыщения крови кислородом был выбран спектральный диапазон 550-800 нм, так как именно в этой области наблюдаются наиболее выраженные изменения отражения (см. рисунок 6.2а,б).

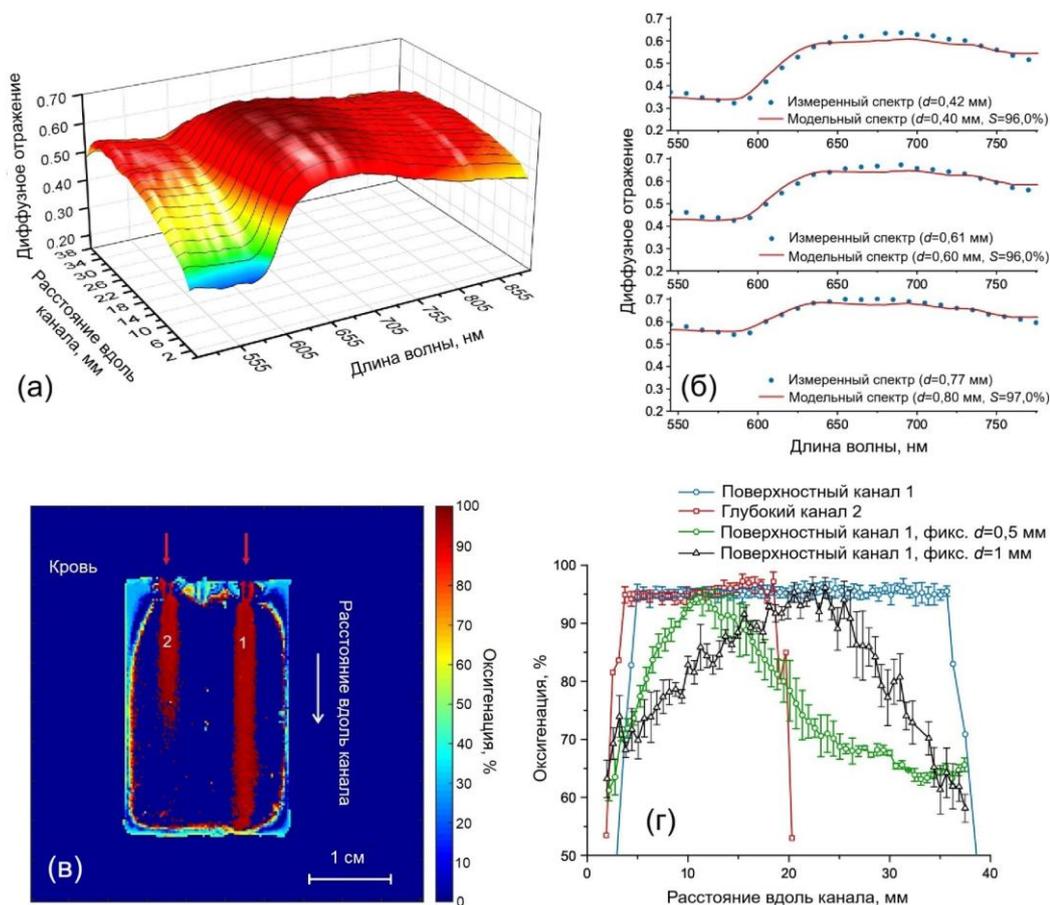


Рисунок 6.2 – (а) Спектральная зависимость коэффициента диффузного отражения, измеренного вдоль углубляющегося поверхностного канала; (б) соответствие измеренного коэффициента отражения со спектром, выбранным обученной ИНС; (в) 2D-карта оксигенации в фантоме биоткани; (г) восстановленные значения оксигенации в углубляющихся поверхностном и глубоком каналах фантома

На рисунке 6.2а показано измеренное диффузное отражение вдоль поверхностного капилляра. Расстояние вдоль капилляра линейно соответствует глубине его залегания. Таким образом, увеличение глубины залегания капилляра приводит к значительному росту отражения в диапазоне 500-600 нм, что согласуется с результатами моделирования.

На рисунке 6.2б представлено сравнение измеренных спектров отражения (точки) со смоделированными (линии), выбранными обученной ИНС в качестве наилучшего соответствия для трех значений глубины залегания капилляра. Во всех случаях восстановленное насыщение крови кислородом отличается от фактического значения менее чем на 4%. Карта восстановленного насыщения крови кислородом для всего фантома представлена на рисунке 6.2в. Соответствующие значения для поверхностного и глубокого каналов показаны на рисунке 6.2г. Видно, что корректное значение насыщения крови кислородом может быть восстановлено до глубины около 2 мм, что примерно соответствует середине второго канала. Дальнейшее увеличение глубины залегания приводит к быстрой потере сигнала.

Приведенные выше результаты были получены с использованием двухпараметрической аппроксимации, учитывающей зависимость смоделированных спектров от глубины залегания канала d и насыщения крови кислородом S . Исследования на фантоме также позволили оценить влияние выбранной модели ткани на точность восстановления уровня кислорода. На рисунке 6г (зеленая и черная линии) показано восстановленное насыщение кислородом в углубляющемся поверхностном канале фантома с использованием модели биологической ткани с фиксированной глубиной залегания кровеносного слоя ($d=0,5$ и 1 мм соответственно). Видно, что применение модели с фиксированной глубиной залегания кровеносного слоя может привести к значительному (до 40%) занижению восстановленного насыщения крови кислородом. В этом случае наилучшее соответствие, найденное ИНС, соответствует спектру отражения с более низким насыщением кислородом, что приводит к занижению восстановленного уровня. Корректное значение получается

только для глубины залегания, соответствующей параметрам модели биологической ткани.

6.1.2 Калибровочные измерения системы поляризационной визуализации

Для верификации регистрируемых показателей и оценки возможностей системы поляризационной визуализации был исследован вклад рассеяния в фазовую задержку циркулярно поляризованного света, с использованием специально разработанных оптических фантомов с различным коэффициентом рассеяния ($\mu_s = 2, 3, 4$ и 5 мм^{-1}). Методология изготовления идентична представленной в разделе 6.1.1. Фантомы имели толщину 1 мм , коэффициент поглощения $\mu_a = 0,05 \text{ мм}^{-1}$ и коэффициент анизотропии $g = 0,8$.

Измерения на фантомах проводились в одной пространственной точке в течение 30 с . Зарегистрированные данные усреднялись по времени. На рисунке 6.3а показаны зарегистрированные векторы Стокса, отображенные на сфере Пуанкаре. Радиусы внешней (серой) и внутренней (фиолетовой) сфер соответствуют 100% и 20% DOP соответственно. Каждая точка на сфере представляет собой уникальное состояние поляризации.

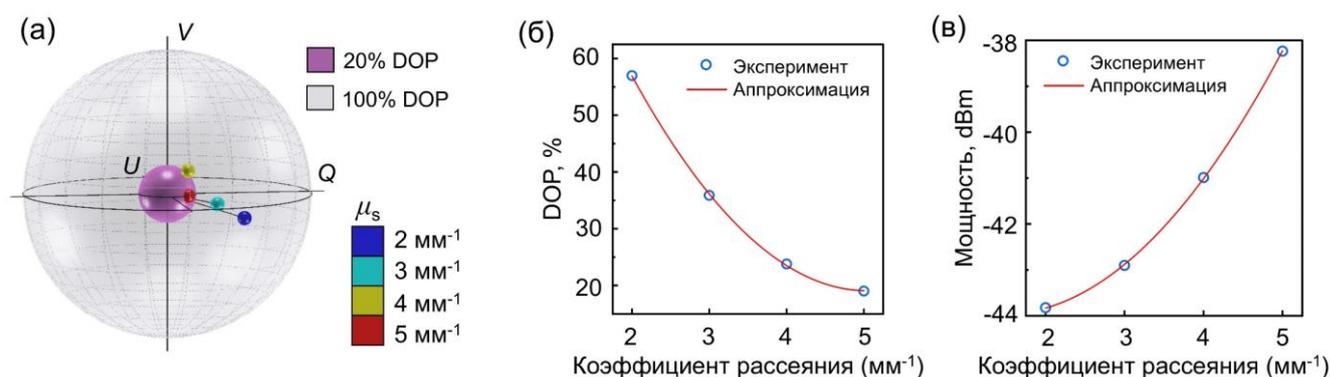


Рисунок 6.3 – (а) Распределение параметров Стокса на сфере Пуанкаре в зависимости от μ_s фантомов. Северный полюс соответствует правой круговой поляризации, экватор – линейной поляризации, южный полюс – левой круговой поляризации. Промежуточные состояния – эллиптически поляризованный свет.

Зависимость (б) степени поляризации и (в) мощности от μ_s фантомов

На рисунке 6.3б,в показаны степень поляризации и мощность, соответственно, как функции от μ_s фантомов.

Вектор Стокса и значения степени поляризации различны для разных оптических свойств фантомов. Из-за меньшего рассеяния результаты для фантомов с меньшим μ_s показывают более высокие значения степени поляризации, чем для фантомов с большим μ_s . Для $\mu_s = 4$ и 5 мм^{-1} спиральность обнаруженного света является правозакрученной. Это означает, что большинство обнаруженных фотонов подверглись прямому рассеянию и сохранили свою спиральность. Для $\mu_s = 2$ и 3 мм^{-1} спиральность обнаруженного света была левозакрученной. Левозакрученная спиральность является индикатором того, что большинство обнаруженных фотонов при взаимодействии с фантомами претерпели переворот спиральности. Это типичный признак рэлеевского режима, в котором свет рассеивается в основном частицами, которые малы по сравнению с длиной волны. Это логичный вывод, с учетом используемых наночастиц ZnO размером ~ 5 нм обеспечивающих рассеивающие свойства фантома.

6.2 Тест-объекты, имитирующие флуоресцентные свойства

Однако поливинилхлоридные фантомы имеют существенные ограничения при использовании для моделирования флуоресцентных свойств биотканей. Условия, при которых протекают процессы полимеризации (повышенная температура, использование химически активных полимеризующих веществ), приводят к разрушению, либо существенному изменению свойств флуоресцентных красителей. В особенности это касается свойств таких эндогенных флуоресцентных веществ как НАДН и ФАД.

В диссертационной работе, на основе полимеризуемого полиакриламида (ПАА), коллагена и водного раствора ФАД, впервые представлены методика изготовления и основные оптические показатели нового типа фантомов кожи человека. ПАА представляет собой оптически прозрачный, эластичный материал, обладающий хорошей временной фотостабильностью и активно применяемый в

биомедицинской практике. Для моделирования базового уровня флуоресценции соединительной ткани кожи использовался коллаген, содержащийся в желатине. Твердые желатиновые фантомы были использованы для имитации нормальных и дисплазийных состояний биоткани при диагностике флуоресцентными методами [485,486]. Разработанному подходу характерно применение щадящих режимов полимеризации, не влияющих на флуоресценцию ФАД. Для создания более плотной эластичной структуры, не подвергаемой процессам плесневения, в качестве связующего материала со стабильными термическими и химическими характеристиками, был применён полиакриламидный гель [487].

Важной особенностью для задач создания флуоресцентного фантома, является отсутствие собственной сколько-либо значимой флуоресценции ПАА в УФ свете, а также во всем видимом диапазоне. В качестве флуорофора использовался водный раствор ФАД, являющийся одним из основных флуорофоров биологических тканей и отвечающих за их метаболизм. В организме ФАД выполняет ключевую роль в процессах клеточного дыхания, клеточной смерти, а также непрерывной утилизации эндогенных катехоламинов (таких как дофамин, адреналин, норадреналин и др.), являясь ко-фактором двух известных разновидностей ФАД-зависимых моноамин оксидаз, главным образом отвечающих за процессы дезаминирования в большинстве клеток организма. Изменения параметров флуоресценции ФАД (интенсивности, формы спектра, а также времени жизни), является существенным диагностическим признаком при развитии патологий [256]. Так, например, ранее проведенные клинические исследования показывают, что изменения флуоресценции ФАД коррелируют с онкологическими процессами [353,488].

Соответственно, целью данных исследований была разработка эластичного фантома для калибровочных измерений и верификации систем регистрации эндогенной флуоресценции, имитирующего флуоресценцию ФАД [489].

Предварительная подготовка матричной основы эластичного фантома производилась путем перемешивания и гомогенизации порошкового желатина (0,2 г), 6 г акриламида (АА) и 0,16 г бисакриламида (Бис) с 20 мл дистиллированной

воды до получения однородной структуры при нагреве в 40 °С, в течение 15 мин. Для воспроизведения рассеивающих свойств в изготовленную полимерную структуру было добавлено 0,03 г ZnO. Последующая полимеризация в течение 30 мин до получения эластичной светорассеивающей структуры производилась добавлением персульфат аммония $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ и тетраметилэтилендиамина (ТЕМЕД).

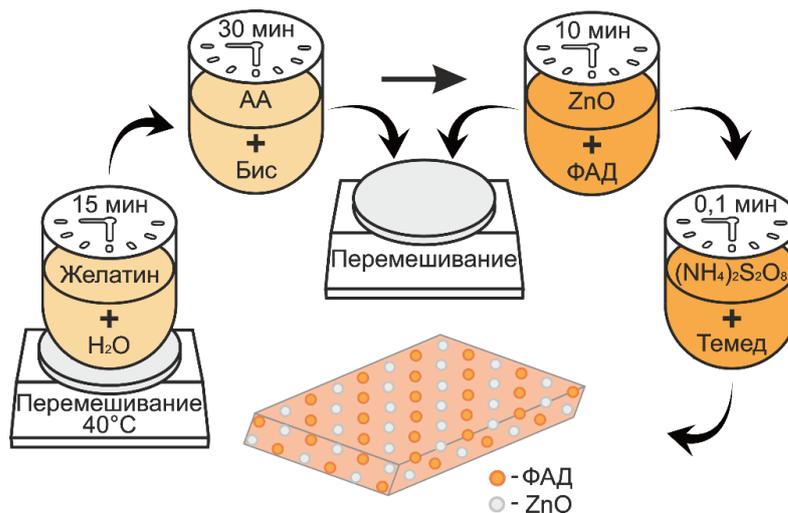


Рисунок 6.4 – Схематическое представление последовательности основных этапов изготовления фантома кожи человека на основе коллагена, ПАА геля, оксида цинка и водного раствора ФАД

Диффузное отражение, диффузное и коллимированное пропускание изготовленной пластичной композитной основы, а также основы с добавлением 15 мкМ ФАД были измерены с помощью спектрофотометра с интегрирующей сферой (Gooch & Housego, США). С помощью инверсного метода «добавления-удвоения» были рассчитаны коэффициент поглощения (μ_a) и приведенный коэффициент рассеяния (μ'_s) в диапазоне 400-1000 нм (рисунок 6.5).

В спектрах поглощения отчетливо видны полосы поглощения воды (760 и 975 нм) и полоса поглощения ФАД (450 нм). Так как основной целью данной работы являлось моделирование флуоресценции, при изготовлении образцов в связующую матрицу на основе ПАА не добавлялись компоненты, обеспечивающие дополнительное поглощение эквивалентное поглощению тканей кожи. С помощью

многоволнового рефрактометра Аббе (Atago, Япония) были измерены показатели преломления (n) фантома для различных длин волн, включая: 450 нм – 1,358, 589 нм – 1,350, 632 нм – 1,348, 930 нм – 1,343.

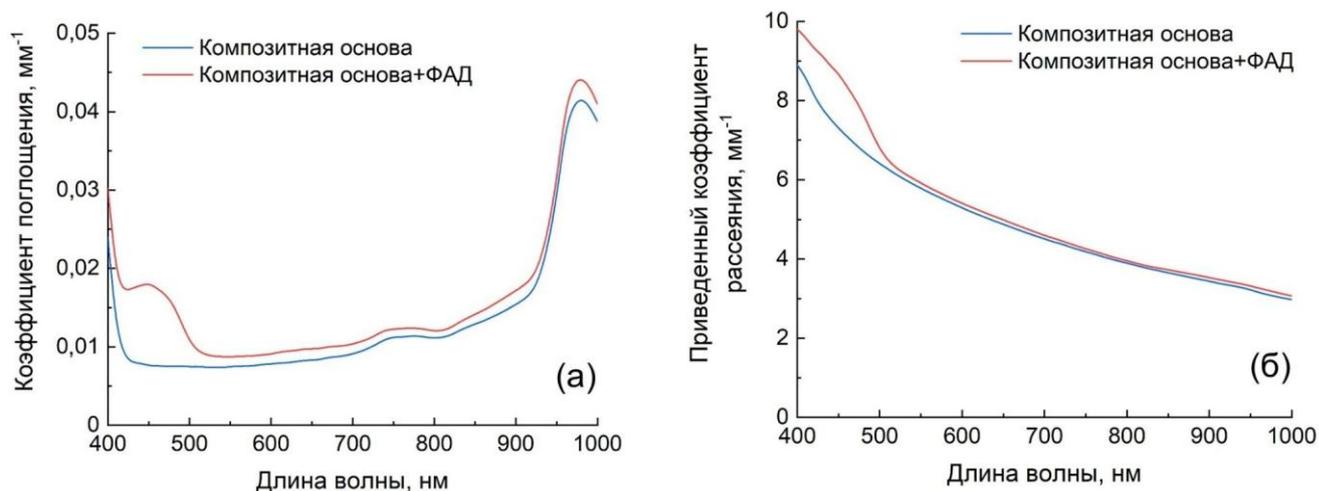


Рисунок 6.5 – (а) Коэффициент поглощения и (б) приведенный коэффициент рассеяния изготовленной композитной основы без добавления ФАД и с добавлением 15 мкМ ФАД соответственно

Для воспроизведения флуоресцентных свойств к полученной смеси добавляли ФАД, концентрация которого в норме в организме человека варьируется в пределах от нескольких единиц до нескольких десятков мкМ на 100 г ткани [490] и перемешивали в течение 10 мин. Были изготовлены пять вариантов МО кожи с различной концентрацией ФАД: 0, 5, 15, 20 и 25 мкМ на 100 г материала.

Параметры флуоресценции измерялись с помощью экспериментальной системы, сочетающей комбинированное использование гиперспектральной камеры и ПЗС спектрометра, представленной на рисунке 6.6.

В данной установке излучение светодиодного источника с длиной волны излучения 450 нм M450LP1 (Thorlabs, США) проходит через полосовой фильтр MF445-45 (Thorlabs, США). Выделенная полоса излучения попадает на дихроичный фильтр MD416 (Thorlabs, США) и направляется на МО кожи, возбуждая флуоресценцию ФАД. Обратное отражённое излучение источника удаляется из светового потока дихроичным фильтром и светофильтром с длиной

волны отсечения 500 нм FELH0500 (Thorlabs, США). Оставшееся излучение флуоресценции образца регистрируется гиперспектральной камерой Specim (Spectral Imaging Ltd., Финляндия) в спектральном диапазоне 400-1000 нм. В канале флуоресцентной спектроскопии спектры регистрируются с помощью оптического волокна ПЗС-спектрометром FLAME-T-VIS-NIR-ES (Ocean Optics, США) в спектральном диапазоне 350-820 нм.

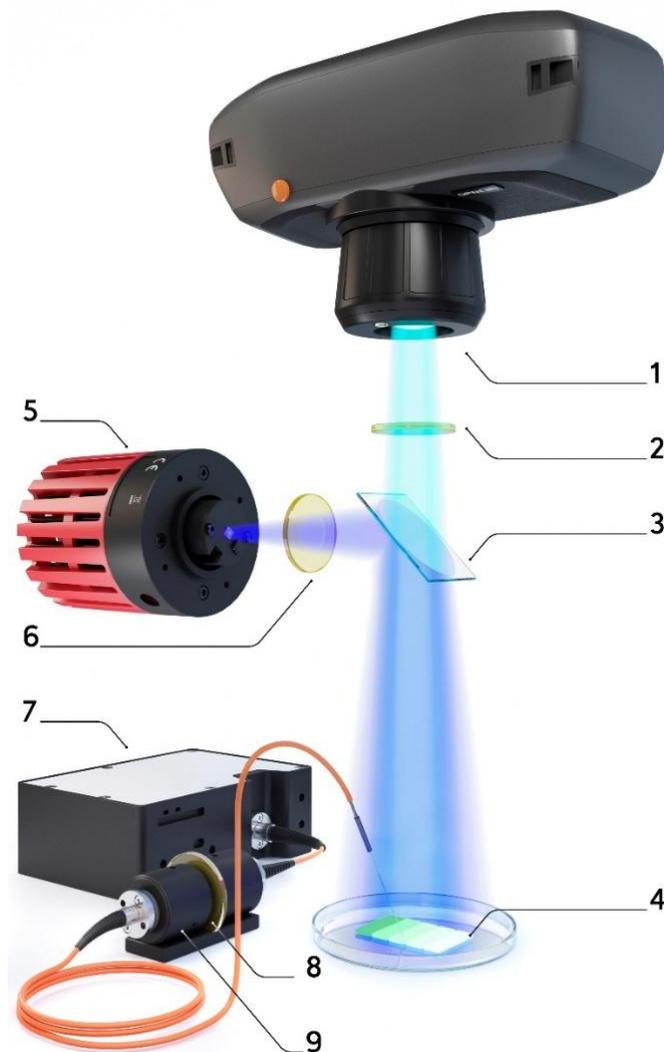


Рисунок 6.6 – Установка для флуоресцентной гиперспектральной визуализации и флуоресцентной спектроскопии: 1 – гиперспектральная камера; 2 – длинноволновый эмиссионный фильтр; 3 – дихроичный фильтр; 4 – характеризующие образцы; 5 – светодиодный источник; 6 – полосовой фильтр; 7 – ПЗС-спектрометр; 8 – держатель фильтров; 9 – длинноволновый эмиссионный фильтр

Были получены гиперспектральные флуоресцентные изображения пяти изготовленных фантомов с различной концентрацией ФАД (представлены на рисунке 6.7а). Изображения регистрировались при выдержке камеры 500 мс, со средней освещенностью 0,5 мВт/см². При дальнейшем анализе значения интенсивности флуоресценции усреднялись в границах области интереса, аналогичной выделенной на рисунке 6.7а. Для сравнения флуоресцентных свойств эластичного фантома с реальным биологическим объектом были получены флуоресцентные изображения кожи пальца руки и области предплечья условно здорового добровольца, представленные на рисунках 6.7б и 6.7в соответственно. Выделенные области интереса соответствуют пространственному усреднению для построения и анализа спектров интенсивности флуоресценции.

Данные о максимальных значениях интенсивности, зарегистрированные с помощью ПЗС-спектрометра, были усреднены по 3 спектрам для каждого фантома с целью сравнения с данными, полученными с помощью гиперспектральной камеры.

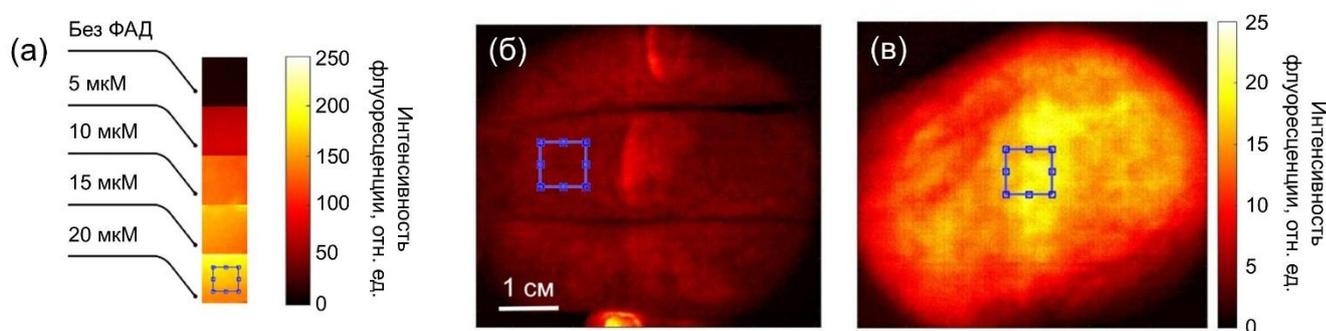


Рисунок 6.7 – Флуоресцентные изображения фантома (а), кожи пальцев руки *in vivo* (б) и предплечья *in vivo* (в), полученные с помощью гиперспектральной камеры на длине волны 530 нм

На рисунках 6.8а-в представлены нормированные спектры флуоресценции и кривые зависимости максимума интенсивности флуоресценции фантома кожи от различной концентрации ФАД для измерений с помощью гиперспектральной визуализации и ПЗС-спектроскопии, соответственно.

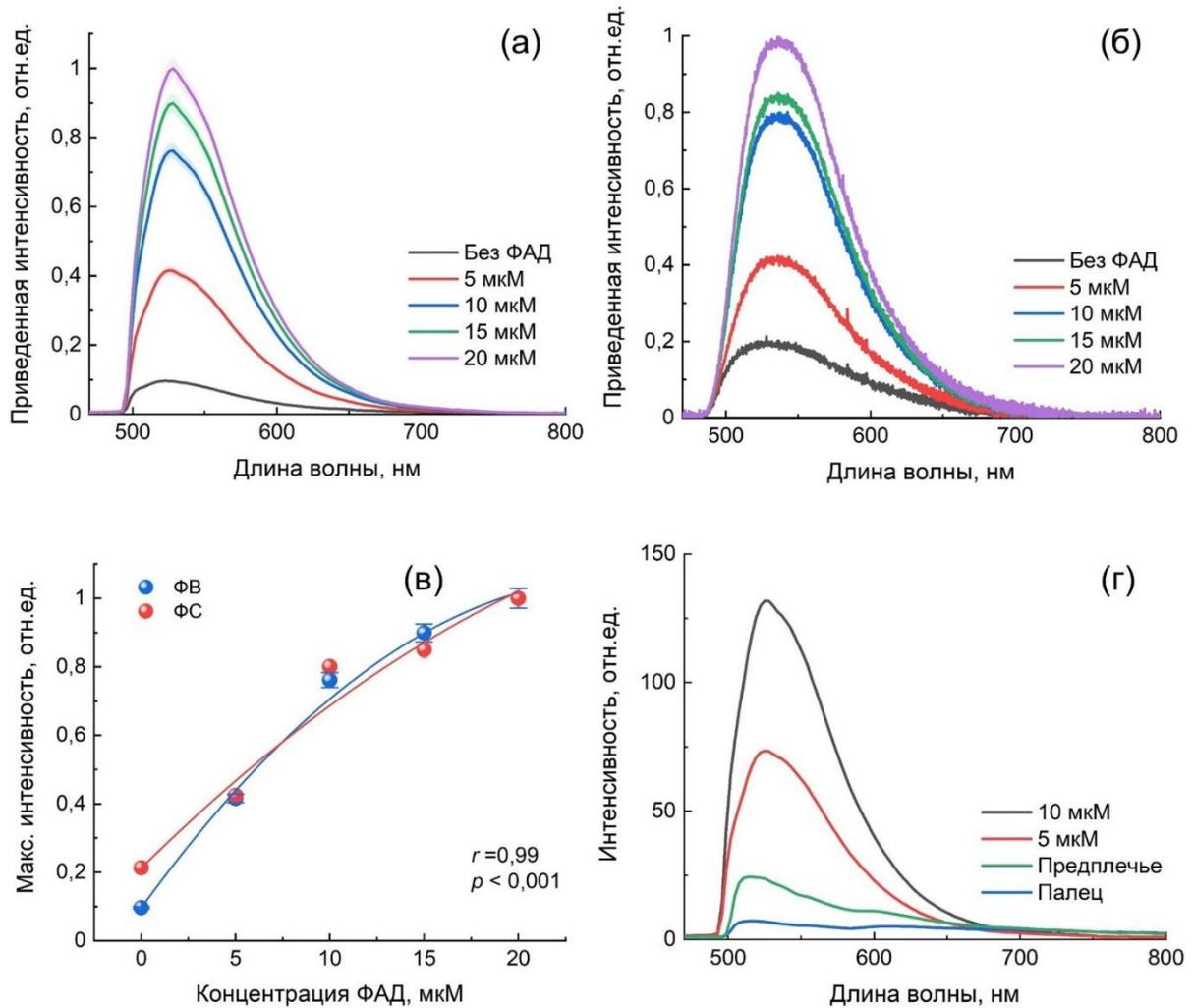


Рисунок 6.8 – Приведенные спектры флуоресценции фантома кожи, полученные с помощью (а) гиперспектральной камеры и (б) ПЗС-спектрометра. (в) Зависимости максимальной флуоресценции от концентрации ФАД (ФВ – флуоресцентная визуализация, ФС – флуоресцентная спектроскопия; коэффициент корреляции Пирсона между измерениями двумя методами $r = 0,99$, $p < 0,001$). (г) Сравнение абсолютных значений флуоресценции фантома и кожи пальца и предплечья, полученные с помощью гиперспектральной камеры

Спектры флуоресценции фантома и кожи были отнормированы на максимальное значение флуоресценции для концентрации 25 мкМ и интенсивность флуоресценции предплечья соответственно. Интенсивность флуоресценции ФАД, зарегистрированная в канале флуоресцентной визуализации гиперспектральной камерой, изменяется пропорционально изменению концентрации флуорофора, что также было подтверждено измерениями ПЗС-спектрометром. При этом

наибольшее изменение в отношении интенсивность флуоресценции/концентрация флуорофора наблюдается в области 5-10 мкМ на 100 г ткани, что представляет наибольший интерес при моделировании свойств здоровой ткани. Полученные значения интенсивности флуоресценции оптических фантомов имеют высокую корреляционную взаимосвязь со значениями концентраций ФАД ($r = 0,99$, $p < 0,001$). Изменение отношения интенсивности сигнала флуоресценции к концентрации флуорофора является нелинейной функцией вследствие поглощения возбуждающего излучения флуорофором и изменения полезного объема фантома/ткани, из которого регистрируется сигнал. В общем случае определение данной зависимости является нетривиальной задачей, на конечное решение которой влияют концентрация флуорофора, поглощающие и рассеивающие свойства образца, а также параметры регистрирующей системы. Спектры изготовленных фантомов и спектры кожи человека имеют схожие пики флуоресценции, соответствующие ФАД (~530-540 нм) при возбуждении синим светом (450 нм). Однако форма спектров кожи, а также общий уровень интенсивности флуоресценции имеют различие с фантомом, что объясняется влиянием крови на поглощение сигнала флуоресценции кожи. Представленные фантомы могут быть модифицированы для учета поглощающих свойств биотканей без существенных затрат.

Более высокий начальный уровень флуоресценции, полученный при измерениях с оптоволоконным ПЗС-спектрометром, при концентрации в 0 мкМ объясняется наличием вклада в измеряемый сигнал с большей глубины и объема зондирования фантома. Существенное различие в интенсивности флуоресценции для пальца и предплечья (рисунок 6.8г) объясняется присутствием достаточно большого числа капилляров и артериоло-венулярных анастомозов в коже ладони руки, что существенным образом влияет на поглощение сигнала флуоресценции.

В данной работе представлена методика изготовления нового типа фантомов кожи человека на основе ПАА, коллагена, оксида цинка и водного раствора ФАД. Основным преимуществом разработанных фантомов, является то, что условия полимеризации ПАА, не влияют на свойства флуоресценции ФАД в конечных тест-

образцах. При этом изготавливаемые полимерные фантомы с подтверждёнными рассеивающими и флуоресцентными свойствами позволяют воспроизводить спектры флуоресценции кожи в указанном диапазоне длин волн с достаточно высокой точностью. Получаемая эластичная матрица МО удовлетворяет условию стационарности, что является необходимым требованием для калибровочных измерений. При этом хранение изготовленных форм требует соблюдение температуры $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ при поддержании влажности воздуха на уровне 90-95%. Применение разработанной технологии изготовления фантомов позволит тестировать, стандартизировать и калибровать системы для флуоресцентной визуализации, а также приборы флуоресцентной спектроскопии, сопряженные с волоконно-оптическим зондом. В качестве совершенствования и дальнейшего развития представленной в работе методики возможно создание фантомов включающих флуорофоры, являющимися эндогенными маркерами опухолевых изменений ткани, таких как НАДН и протопорфирин IX.

Дополнительно был предложен простой способ изготовления жидкостного фантома флуоресценции протопорфирина IX (PPIX). Известно, что селективное накопление PPIX в опухолях путем связывания с липопротеинами и коллагеном и, как было показано в разделе 4.2.2 их флуоресцентный анализ может выступать в качестве маркеров злокачественных новообразований.

Для получения жидкого фантома с добавлением PPIX была разработана технология его выделения из темной яичной скорлупы (рисунок 6.9). Известно, что PPIX является основным пигментом, ответственным за коричневый цвет яичной скорлупы. Таким образом, первым шагом для выделения PPIX было использование тщательно вымытой, высушенной и измельченной яичной скорлупы, которую смешивали с 1М HCl. Реакционную смесь инкубировали до тех пор, пока не переставал выделяться углекислый газ, после чего ее пропускали через бумажный фильтр. К фильтрату добавляли этилацетат и встряхивали для переноса протопорфирина в органический слой. Полученную эмульсию центрифугировали для полного разделения слоёв. Верхний слой, содержащий PPIX, переносили во флакон и добавляли 10 г прокалённого сульфата натрия. Раствор PPIX отделяли

декантацией, выпаривали на водяной бане до удаления растворителя и растворяли осадок в 5 мл диметилсульфоксида (DMCO), получив раствор с концентрацией 0,3 мкМ/г.

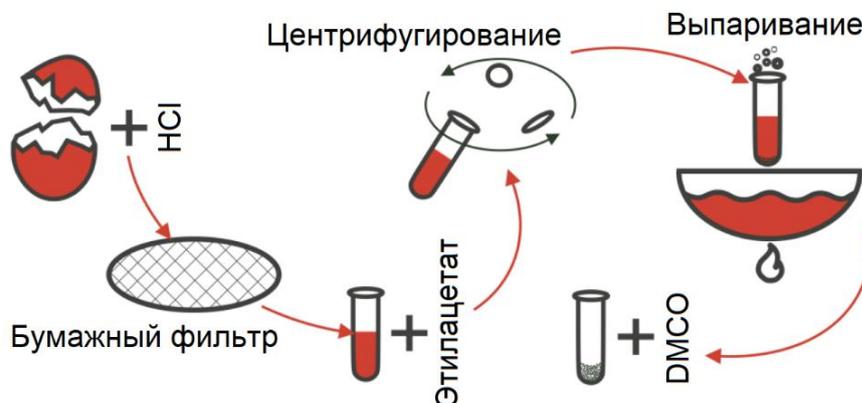


Рисунок 6.9 – Схематическое изображение основных этапов изготовления фантома, содержащего PPIX

Для подтверждения оптических характеристик приготовленного раствора, содержащего PPIX, было измерено его диффузное пропускание (рисунок 6.10) с помощью спектрофотометра с интегрирующей сферой (UV-2600, Shimadzu Corporation, Япония). Можно видеть характерные пики поглощения PPIX в приготовленном растворе на 510, 530, 580 и 630 нм.

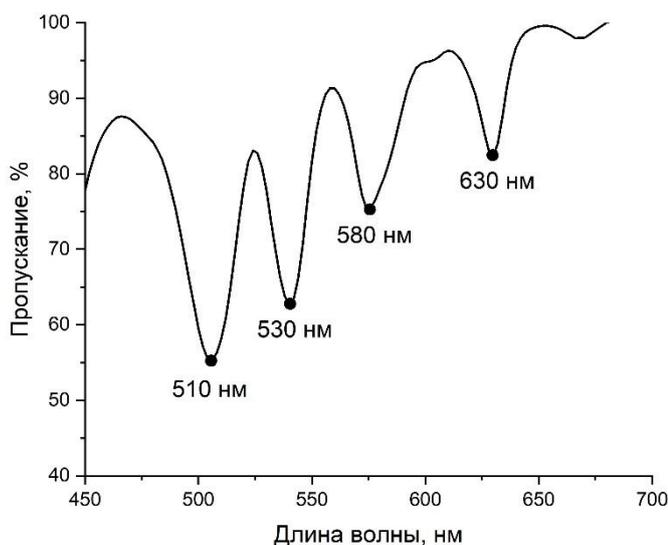


Рисунок 6.10 – Спектры пропускания жидкого фантома, содержащего PPIX

Для исследования флуоресцентных свойств изготовленного фантома были проведены измерения с использованием гиперспектральной системы, показанной на рисунке 6.6. Для проведения измерений приготовленный раствор с PPIX наносился на покровное стекло. Изображения записывались при времени экспозиции камеры 500 мс и средней освещенности $0,5 \text{ мВт/см}^2$. При анализе изображений значения интенсивности флуоресценции усреднялись в зоне интереса (по всей площади фантома).

В результате были получены спектры флуоресценции изготовленного фантома, содержащего PPIX, представленные на рисунке 6.11.

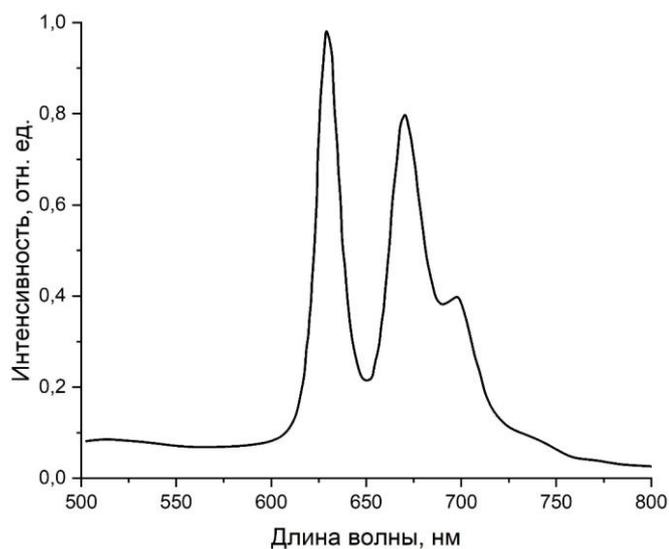


Рисунок 6.11 – Нормированные спектры флуоресценции оптического фантома, полученные с помощью гиперспектральной камеры

Спектры флуоресценции изготовленного фантома были нормированы на максимальное значение флуоресценции PPIX. Результаты показывают характерные пики флуоресценции PPIX при длинах волн 635, 675 и 715 нм.

Таким образом, представлена методика изготовления оптического фантома, имитирующего флуоресценцию PPIX. Применение разработанного оптического фантома позволяет проводить тестирование, стандартизацию и калибровку систем для флуоресцентной визуализации, а также приборов флуоресцентной спектроскопии, сопряженных с волоконно-оптическим зондом.

Следующей задачей при создании оптического фантома было объединить твёрдую основу, моделирующую фоновую флуоресценцию коллагена, и жидкую часть, воспроизводящую разные концентрации флуоресценции ФАД и порфиринов, характерные для биологических тканей.

Для имитации флуоресценции коллагена использовался желатин – гидролизованная форма этого белка. Была создана многослойная модель, состоящая из желатиновых пластин толщиной около 1 мм и массой 5 г. Оптимальное число пластин подбиралось экспериментально, сравнивая уровни флуоресценции желатина и кожного коллагена.

Для моделирования спектра флуоресценции ФАД применялся 1 % раствор (26,6 мкМ/г) рибофлавин-моноклеотида. Это вещество относится к группе флавинов и имеет спектр, близкий к ФАД, при более высоком квантовом выходе; кроме того, в диапазоне рН 4-8 квантовый выход рибофлавина не зависит от кислотности [491]. Известно, что концентрация ФАД в организме человека обычно колеблется в пределах 0,1-1 мкМ/г [490]. Соответственно было приготовлено четыре близкие к физиологическим концентрации рибофлавина, разбавив исходный раствор дистиллированной водой в соотношениях 1:32, 1:64, 1:128 и 1:256. Твёрдую основу фантома составили две желатиновые пластины, а жидкую часть – капли рибофлавина в указанных концентрациях (0,84; 0,42; 0,21; 0,10 мкМ/г), распределённые по четырём зонам фантома.

В качестве РРІХ применили образцы, процесс получения которых описан выше. РРХІ наносили на двухслойную желатиновую модель аналогично рибофлавины.

Методика исследований включала последовательную регистрацию флуоресцентных изображений ПЗС-камерой и спектров спектрометром (см. систему на рисунке 4.8). На желатиновые пластины пипетировали капли объёмом 20 мкл различных концентраций рибофлавина или РРІХ. Готовые фантомы размещали на нефлуоресцирующей и неотражающей подложке. Съёмку проводили в следующем порядке: перед камерой устанавливали фильтр 495 нм и трижды регистрировали флуоресцентные изображения. Снимали изображение фантомов в

белом свете без фильтра. На втором этапе трижды регистрировали флуоресцентные спектры каждого фантома.

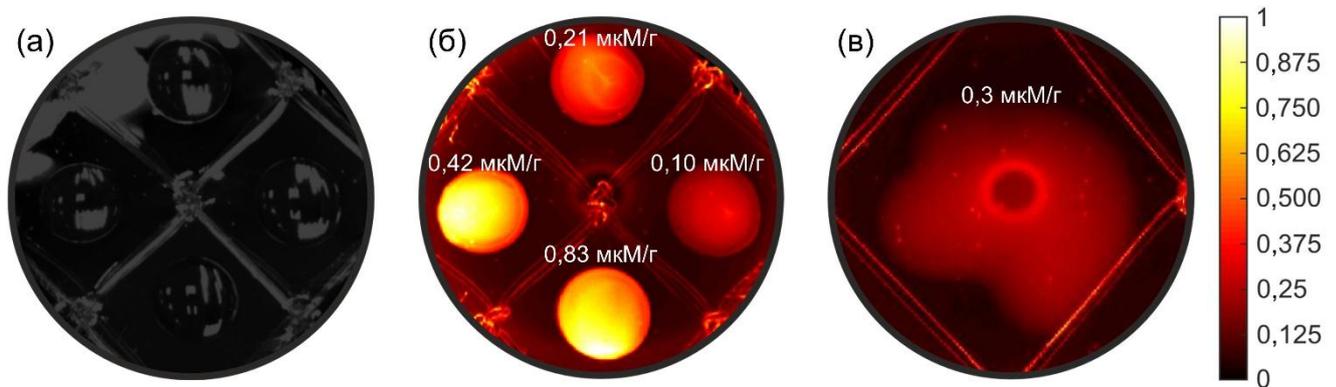


Рисунок 6.12 – Полученные изображения оптического фантома: (а) исходное фото фантома с рибофлавином в белом свете; (б) флуоресцентное изображение фантома с рибофлавином; (в) флуоресцентное изображение фантома с РРІХ

На рисунке 6.12а-в приведены зарегистрированные изображения созданного оптического фантома при освещении галогенной лампой и светодиодом после предварительной обработки. Снимки в белом свете (рисунок 6.12а) выполнялись с экспозицией 20 мс, флуоресцентные изображения (рисунок 6.12б,в) – с экспозицией 400 мс. Затем интенсивности были нормированы на максимальное значение, чтобы представить данные в диапазоне [0; 1]. Также было получено флуоресцентное изображение РРІХ-раствора на поверхности желатинового фантома (рисунок 6.12в).

Значения интенсивности флуоресценции рибофлавина и РРІХ усредняли в одинаковых областях каждой капли. Максимальные интенсивности, полученные методом флуоресцентной спектроскопии, усредняли и сравнивали с результатами флуоресцентной визуализации. После этого все значения нормировали на максимальное измеренное значение (принятое за 1). Итоги измерений интенсивности флуоресценции для каждой концентрации рибофлавина и РРІХ представлены на рисунке 6.13.

Для трёх наименьших концентраций рибофлавина было отмечено, что зарегистрированная методом флуоресцентной визуализации интенсивность уменьшается пропорционально снижению концентрации. Однако для самой высокой концентрации такая закономерность не наблюдалась, что может быть связано с известным эффектом концентрационного гашения [492].

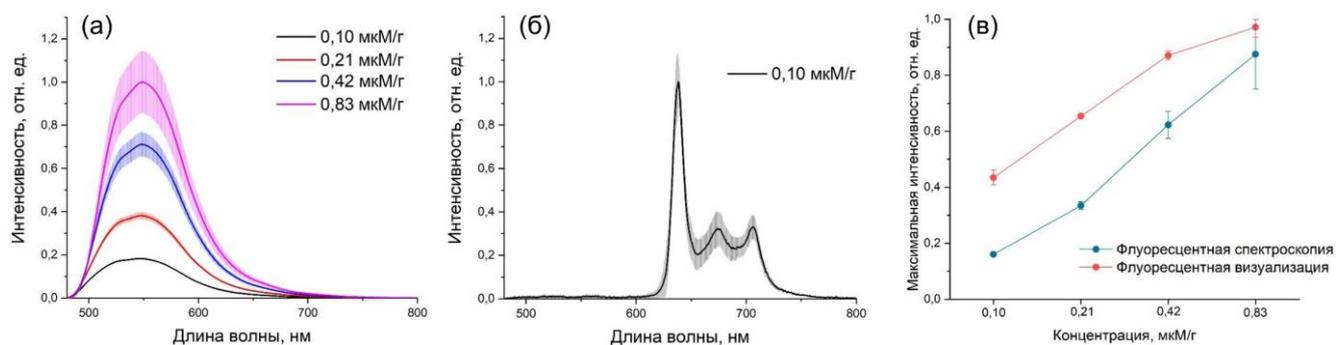


Рисунок 6.13 – Средние нормированные спектры флуоресценции фантомов с (а) рибофлавином и (б) РРІХ; (в) зависимость максимальной интенсивности флуоресценции от концентрации рибофлавина, полученные по данным флуоресцентной спектроскопии и визуализации

6.3 Тест-объект динамического рассеяния света

Для проверки способности системы ЛСКВ определять разницу между различными скоростями потока рассеивающих частиц, а также тестирования предложенных алгоритмов частотно-временного анализа был предложен фантом динамического рассеяния света. В качестве фантома использовалась капиллярная трубка с внутренним диаметром 1,6 мм и электрический инфузионный насос. Вид фантома-капилляра представлен на рисунке 6.14. Через капилляр с помощью электрического насоса прокачивался 8 % по объему раствор Интралипида 20 % (Фрезениус Каби, США). Выбранная концентрация 8 % Интралипида приблизительно соответствует оптическим свойствам рассеяния крови при длине волны 785 нм ($\mu_s = 72 \text{ мм}^{-1}$) [216,493].

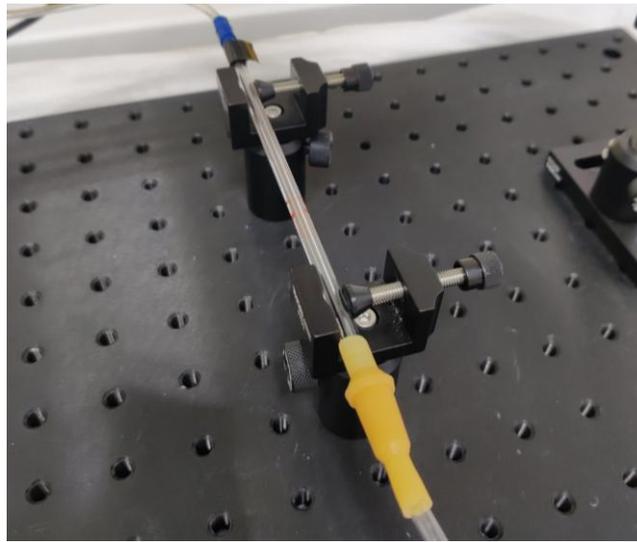


Рисунок 6.14 – Внешний вид фантома-капилляра

Раствор Интралипида прокачивался через капиллярную трубку с линейными скоростями 1 мм/с и 2 мм/с, что соответствует диапазону скоростей крови *in vivo*. Результаты ЛСКВ измерений капилляра показаны на рисунке 6.15.

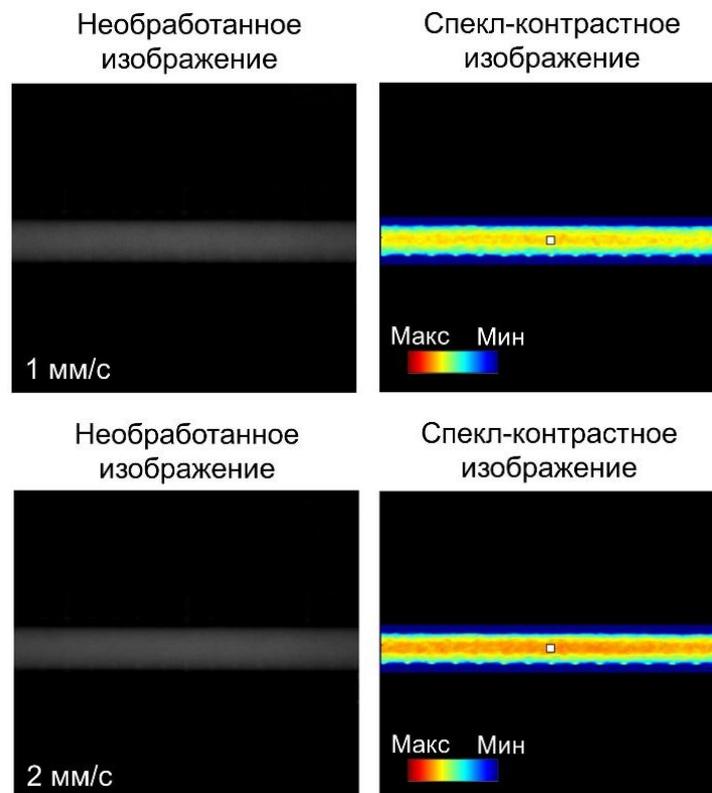


Рисунок 6.15 – Исходные монохромные и спекл-контрастные изображения движения жидкости в капилляре при различных скоростях потока. Белый квадрат в центре капилляра – анализируемая область исследования

Рассчитанный спекл-контраст был преобразован в псевдоцвета, где высокая скорость потока рассеивающих частиц соответствовала красному цвету, а низкая скорость – синему. Этот эксперимент показывает, что собранная установка способна обнаружить изменения в скорости потока рассеивающих частиц.

Результаты вейвлет-анализа для данных капиллярного фантома показаны на рисунке 6.16. В качестве первого шага было проведено получение сигнала ЛСКВ перфузии для каждой из двух скоростей в соответствии с формулой $1/K^2$. Затем было использовано вейвлет-преобразование, что позволило получить амплитудные скалограммы и усредненные вейвлет-спектры для различных скоростей потока.

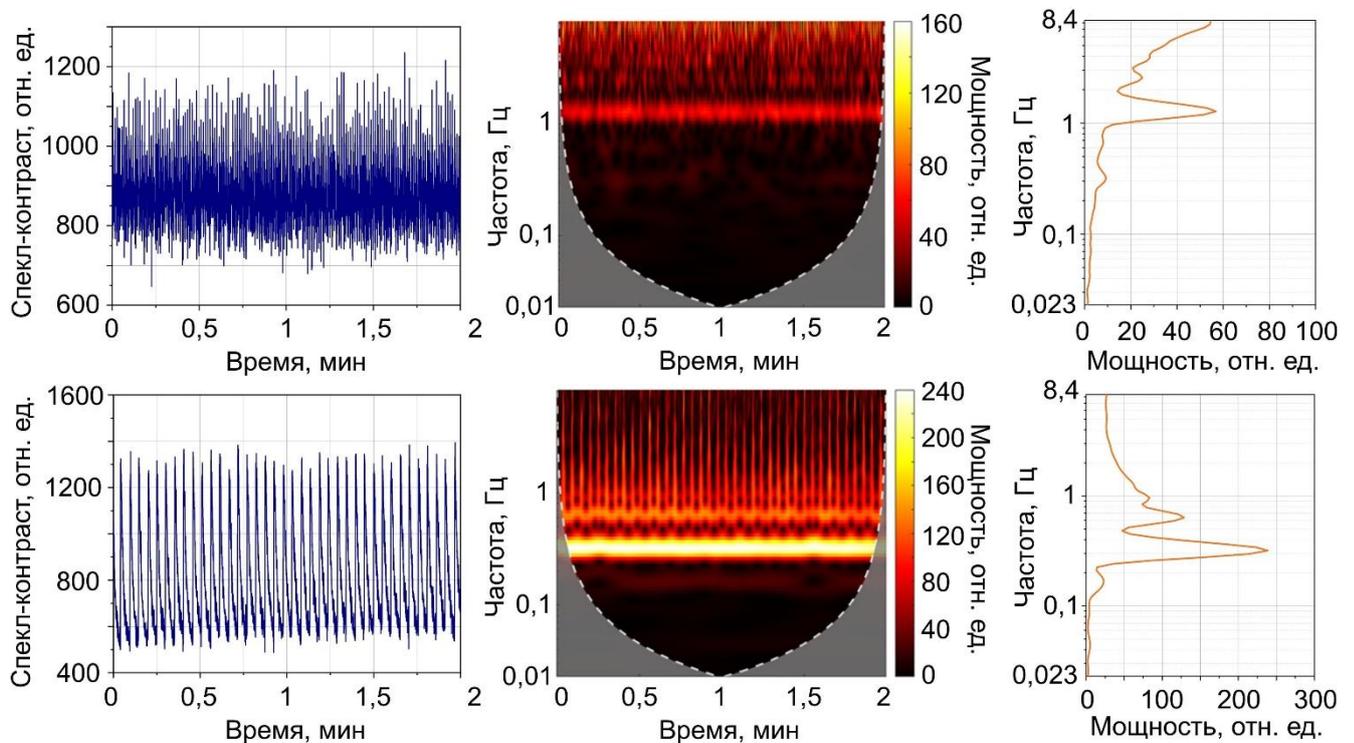


Рисунок 6.16 – Вейвлет-анализ сигналов лазерного спекл-контраста, полученных для капиллярного фантома. Первый ряд: сигнал лазерного спекл-контраста из выбранной ROI, скалограмма амплитуды вейвлет-преобразования и усредненный по времени вейвлет-спектр для скорости потока 1 мм/с; второй ряд показывает те же типы данных для скорости потока 2 мм/с

Полученные результаты показывают, что для различных скоростей потока раствора существуют различные распределения частот. Для скоростей 1 мм/с и 2

мм/с в вейвлет-спектрах наблюдается несколько пиков, что указывает на то, что необходимая скорость введения достигается насосом за счет пульсаций нескольких частот. При скорости потока Интралипида в капилляре равной 1 мм/с были обнаружены колебания с частотой приблизительно 1,28 Гц. При более высокой скорости потока жидкости (2 мм/с) высокочастотные колебания 0,64 Гц модулировались низкой частотой около 0,32 Гц.

6.4 Выводы по главе 6

В данной главе диссертации представлены результаты разработки и применения тест-объектов (фантомов), имитирующих оптические свойства биологических тканей. Эти фантомы предназначены для калибровки, верификации и стандартизации систем оптической визуализации, что является критически важным для повышения точности диагностических методов. Разработанные модели воспроизводят ключевые характеристики биотканей, включая поглощение, рассеяние, флуоресценцию и динамическое рассеяние света, обеспечивая надежную основу для научных и клинических исследований. Дальнейшие исследования могут быть направлены на оптимизацию состава фантомов, расширение их функциональности и адаптацию для конкретных клинических задач.

1. Создан фантом на основе поливинилхлорида (ПВХ) с добавлением наночастиц ZnO и красителя, точно имитирующий оптические свойства бескровной дермы человека. Фантом включает искусственные кровеносные сосуды, что позволяет моделировать процессы кровенаполнения и оксигенации и оценивать возможности систем гиперспектральной визуализации.

2. Использование суспензии эритроцитов человека подтвердило возможность точного измерения насыщения крови кислородом в искусственных сосудах. Применение ИНС позволило восстановить уровень оксигенации с погрешностью менее 4%.

3. Показано, что корректное восстановление уровня кислорода возможно до глубины 2 мм, после чего сигнал быстро ослабевает. Использование модели с фиксированной глубиной залегания сосудов может привести к значительным ошибкам (до 40%).

4. Разработаны фантомы с различными коэффициентами рассеяния ($\mu_s = 2-5 \text{ мм}^{-1}$) для оценки влияния рассеяния на поляризационные характеристики света. Установлено, как степень поляризации и спиральность света зависят от коэффициента рассеяния, что важно для калибровки поляризационных систем.

5. Предложена методика изготовления фантомов из полиакриламида (ПАА), коллагена и ФАД, сохраняющих флуоресцентные свойства в условиях щадящей полимеризации. Фантомы демонстрируют спектры флуоресценции, схожие с кожей человека, что подтверждено сравнительными измерениями.

6. Создан капиллярный фантом с раствором Интралипида, имитирующий кровоток. Эксперименты подтвердили возможность системы ЛСКВ различать скорости потока частиц. Вейвлет-анализ позволил выявить частотные характеристики сигналов, связанные с различными скоростями потока.

7. Универсальность фантомов подчеркивается возможностью расширения диапазона имитируемых свойств, включая патологические состояния (например, опухолевые изменения) и внедрения дополнительных флуорофоров (НАДН, протопорфирин IX) для моделирования сложных биологических процессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация посвящена разработке и применению методов оптической визуализации тканевого метаболизма для биомедицинской диагностики. Работа охватывает широкий спектр технологий – от численного моделирования и разработки методов анализа изображений до создания экспериментальных оптических систем и физических тест-объектов. Предложены и апробированы инновационные подходы к диагностике социально значимых заболеваний, таких как онкология и СД, с использованием гиперспектральной, поляризационной, флуоресцентной и спекл-визуализации.

1. Выполнен анализ современных проблем методов и технических средств оптической визуализации, выявлены их ограничения, недостатки и пути совершенствования, обеспечивающие приемлемую эффективность для клинического использования.

2. Разработан и экспериментально апробирован метод поляризационно-чувствительной ГСВ, реализующий спектрально-поляриметрическую регистрацию отраженного излучения в диапазоне 510-900 нм с использованием Фабри-Перо интерферометра и кольцевого волоконного осветителя. Для анализа данных применены алгоритмы машинного обучения, включая нейросетевые модели, обученные на 82 005 синтетических спектрах, полученных с помощью модели семислойной кожи. Метод позволил количественно определять такие параметры как толщина эпидермиса, содержание меланина, оксигенация и кровенаполнение кожи, а также предложить индекс поляризации, демонстрирующий высокую корреляцию с возрастными и диабетическими изменениями. В клинических условиях достигнуты значения чувствительности 95% и специфичности 85% при выявлении пациентов с диабетическими осложнениями.

3. Разработаны универсальные численные модели взаимодействия оптического излучения с биологическими тканями, основанные на стохастическом моделировании методом Монте-Карло. Модели учитывают сложную внутреннюю структуру биотканей, а также физико-технические параметры измерительных

систем (длину волны, степень когерентности, поляризацию, апертуру, взаимное расположение источника и детектора). Полученные решения позволяют не только обосновать специализированные медико-технические требования к системам оптической визуализации при их проектировании, но и создавать обширные синтетические выборки для обучения нейросетевых алгоритмов реконструкции биофизических параметров.

4. Разработана система Стокс-поляризационной визуализации, позволившая изучить поляриметрические характеристики парафиновых блоков рака молочной железы и *ex vivo* образцов рака толстой кишки. С использованием параметров полного вектора Стокса был разработан метод кластеризации на основе метода *k*-средних, предоставивший возможность проводить гистологический анализ парафиновых блоков раковых образцов без окрашивания. Дополнительное определение матриц Мюллера, а также симметричное разложение и расчет параметров поляризации и деполяризации позволило разработать классификатор *ex vivo* раковых образцов на основе метода случайного леса с метриками классификации чувствительности и специфичности 1,0 и 0,93 соответственно. Результаты исследований коррелируют с данными гистологического анализа.

5. Разработан метод визуализации эндогенной флуоресценции, основанный на возбуждении при 455 нм и регистрации эмиссии флуорофоров тканей (ФАД, коллаген, порфирин) в режиме реального времени. Метод продемонстрировал высокую чувствительность к границам опухолевой ткани на *in vivo* модели рака печени у лабораторных мышей, а также подтвердил возможность его клинического применения в задачах интраоперационной навигации без введения экзогенных контрастных веществ.

6. Разработан метод визуализации времени жизни флуоресценции в частотной области, дополняющий диагностические возможности разработанной системы Стокс-поляризационной визуализации и позволяющий расширить возможности гистологического анализа образцов опухоли, а также продемонстрировавший возможность получать высокоразрешенные пространственные карты метаболической активности мозга, изучать региональную

специфику времени жизни флуоресценции биологических тканей и исследовать фармакологические эффекты нейромодуляторов.

7. Разработан метод частотно-временного анализа данных лазерной спекл-контрастной визуализации, позволяющий выделять пять осцилляционных компонент кровотока, включая эндотелиальную, нейрогенную и миогенную активности. Впервые получены карты распределения миогенных вазомоций на частоте 0,1 Гц в сосудах мозга крысы. Метод обеспечивает высокое пространственно-временное разрешение и применим для мониторинга регуляции церебрального и периферического кровотока, включая состояния, связанные с нарушением микроциркуляции крови.

8. Созданы и экспериментально протестированы оптические фантомы, имитирующие поглощение, рассеяние и флуоресценцию биотканей. Разработана методология синтеза эластичных фантомов на полиакриламида, что позволило обеспечить стабильность оптических характеристик и применять их для регулярной калибровки диагностических систем. Предложенные фантомы обеспечивают воспроизводимость измерений и стандартизацию технических процедур при разработке и тестировании (контроле технического состояния) оптических биомедицинских устройств.

Полученные результаты открывают перспективы для внедрения представленных методов в клиническую практику, особенно в области ранней диагностики диабетических осложнений и онкологических заболеваний.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АДФ – аденозиндифосфат;
АМФ – аденозинмонофосфат;
АТФ – аденозинтрифосфат;
АФК – активные формы кислорода;
БИК – ближний инфракрасный;
БИКС – спектроскопия в ближней инфракрасной области;
ВКМ – внеклеточный коллагеновый матрикс;
ВКС – видеокапилляроскопия;
ГСВ – гиперспектральная визуализация;
ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома;
ДЗЗ – дистанционное зондирование Земли;
ИК – инфракрасный;
ИНС – искусственные нейронные сети;
КПП – конечные продукты гликирования;
КТ – компьютерная томография;
ЛДА – линейный дискриминантный анализ;
ЛДФ – лазерная доплеровская флоуметрия;
ЛСКВ – лазерная спекл-контрастная визуализация;
МАО – моноаминоксидаза;
МК – Монте-Карло;
МО – машинное обучение;
МРТ – магнитно-резонансная томография;
НАД⁺ – окисленная форма никотинадениндинуклеотида;
НАДН – восстановленная форма никотинадениндинуклеотида;
НАДФН – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата;
НАД(Ф)Н – восстановленные формы никотинадениндинуклеотида и
никотинамидадениндинуклеотидфосфата;
НВП – непрерывное вейвлет-преобразование;

ОД – оптическая диагностика;

ПВХ – поливинилхлорид;

ПАА – полиакриламид;

ПЗС – прибор с зарядовой связью;

СД – сахарный диабет;

СДО – спектроскопия диффузного отражения;

УЗИ – ультразвуковое исследование;

ФАД – окисленная форма флавинадениндинуклеотида;

ФАДН₂ – восстановленная форма флавинадениндинуклеотида;

ФС – флуоресцентная спектроскопия;

ЭТЦ – электронно-транспортная цепь;

AUC – площадь под кривой ошибок (площадь под ROC-кривой);

BVF (blood volume fraction) – кровенаполнение;

DCIS – протоковая карцинома *in situ*;

DOP – степень остаточной поляризации;

DOCP – степень остаточной циркулярной поляризации

DOLP – степень остаточной линейной поляризации;

FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded) – фиксированных в формалине парафинизированные образцы;

IDC – инвазивная протоковая карцинома;

GPU (graphics processing unit) – графический процессор;

LR (logistic regression) – логистическая регрессия;

PI (polarization index) – индекс поляризации;

PPIX – протопорфирин IX;

RF (random forest) – метод случайного леса;

S (saturation) – насыщение крови кислородом (оксигенация);

Se (sensitivity) – чувствительность;

Sp (specificity) – специфичность;

SVM (support vector machine) – метод опорных векторов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation [Text] / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell*. – 2011. – Vol. 144. – № 5. – P. 646-674.
2. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications [Text] / M. Brownlee // *Nature*. – 2001. – Vol. 414. – № 6865. – P. 813-820.
3. Luo, T.T. The involvement of glucose and lipid metabolism alteration in rheumatoid arthritis and its clinical implication [Text] / T.T. Luo // *Journal of Inflammation Research*. – 2023. – Vol. 16. – P. 1837-1852.
4. Nolfi-Donagan, D. Mitochondrial electron transport chain: oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement [Text] / D. Nolfi-Donagan, A. Braganza, S. Shiva // *Redox Biology*. – 2020. – Vol. 37. – P. 101674.
5. Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine [Text] / G.L. Semenza // *Cell*. – 2012. – Vol. 148. – № 3. – P. 399-408.
6. Carmeliet, P. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis [Text] / P. Carmeliet, R.K. Jain // *Nature*. – 2011. – Vol. 473. – № 7347. – P. 298-307.
7. Giacco, F. Oxidative stress and diabetic complications [Text] / F. Giacco, M. Brownlee // *Circulation Research*. – 2010. – Vol. 107. – № 9. – P. 1058-1070.
8. Guyton, A.C. Textbook of medical physiology [Text] / A.C. Guyton, J.E. Hall // Elsevier Saunders. – 2006.
9. Tissue Metabolism [Text] // *Nature*. – 1921. – Vol. 108. – № 2715. – P. 353-354.
10. Schmolze, D.B. Advances in microscopy techniques [Text] / D.B Schmolze, C. Standley, K.E. Fogarty, A.H. Fischer // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. – 2011. – Vol. 135. – № 2. – P. 255-263.
11. Georgakoudi, I. Label-free optical metabolic imaging in cells and tissues [Text] / I. Georgakoudi, K.P. Quinn // *Annual Review of Biomedical Engineering*. – 2023. – Vol. 25. – P. 413-443.

12. Mayevsky, A. Oxidation-reduction states of NADH *in vivo*: from animals to clinical use [Text] / A. Mayevsky, B. Chance // *Mitochondrion*. – 2007. – Vol. 7. – № 5. – P. 330-339.
13. Mayevsky, A. Mitochondrial function *in vivo* evaluated by NADH fluorescence [Text] / A. Mayevsky. – New York: Springer International Publishing, 2015. – 276 p.
14. Mayevsky, A. Mitochondrial function *in vivo* evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies [Text] / A. Mayevsky, G.G. Rogatsky // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 2007. – Vol. 292. – № 2. – P. 615-640.
15. Дунаев, А.В. Мультимодальная оптическая диагностика микроциркуляторно-тканевых систем организма человека [Текст] / А.В. Дунаев. – Орёл: Тонкие наукоемкие технологии, 2022. – 440 с.
16. Дунаев, А.В. Метод и устройство оценки функционального состояния микроциркуляторно-тканевых систем организма человека на основе мультипараметрической оптической диагностики [Текст] / А.В. Дунаев // *Известия высших учебных заведений России. Радиоэлектроника*. – 2020. – Т. 23. – № 4. – С. 77-91.
17. Дунаев, А.В. Принципы построения технических средств мультипараметрической оптической диагностики для оценки функционального состояния микроциркуляторно-тканевых систем [Текст] / А.В. Дунаев // *Фундаментальные и прикладные проблемы техники и технологии*. – 2020. – Т. 344. – № 6. – С. 131-140.
18. Potapova, E. Multimodal optical diagnostic in minimally invasive surgery [Text] / E. Potapova, V. Dremin, E. Zhrebtssov, A. Mamoshin, A. Dunaev // *Multimodal Optical Diagnostics of Cancer*. – 2020. – P. 597.
19. Zhrebtssova, A. Multimodal optical diagnostics of the microhaemodynamics in upper and lower limbs [Text] / A. Zhrebtssova, V. Dremin, I. Makovik, E. Zhrebtssov, A. Dunaev, A. Goltsov, S. Sokolovski, E. Rafailov // *Frontiers in Physiology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1-15.

20. Dremin, V.V. Multimodal optical measurement for study of lower limb tissue viability in patients with diabetes mellitus [Text] / V.V. Dremin, E.A. Zherebtsov, V.V. Sidorov, A.I. Krupatkin, I.N. Makovik, A.I. Zherebtsova, E.V. Zharkikh, E.V. Potapova, A.V. Dunaev, A.A. Doronin, A.V. Bykov, I.E. Rafailov, K.S. Litvinova, S.G. Sokolovski, E.U. Rafailov // *Journal of Biomedical Optics*. – 2017. – Vol. 22. – № 8. – P. 1-10.
21. Dremin, V. Monitoring oxidative metabolism while modeling pancreatic ischemia in mice using a multimodal spectroscopy technique [Text] / V. Dremin, E. Potapova, A. Mamoshin, A. Dunaev, E. Rafailov // *Laser Physics Letters*. – 2020. – Vol. 17. – № 11. – P. 115601.
22. De Berardinis, R.J. Fundamentals of cancer metabolism [Text] / R.J. De Berardinis, N.S. Chandel // *Science Advances*. – 2016. – Vol. 2. – № 5. – P. e1600200.
23. Pavlova, N.N. The emerging hallmarks of cancer metabolism [Text] / N.N. Pavlova, C.B. Thompson // *Cell Metabolism*. – 2016. – Vol. 23. – № 1. – P. 27-47.
24. Eelen, G. Endothelial cell metabolism [Text] / G. Eelen, P. Zeeuw, L. Treps, U. Harjes, B.W. Wong, P. Carmeliet // *Physiological Reviews*. – 2018. – Vol. 98. – № 1. – P. 3-58.
25. Heinonen, I. Myocardial blood flow and its transit time, oxygen utilization, and efficiency of highly endurance-trained human heart [Text] / I. Heinonen, N. Kudomi, J. Kemppainen, A. Kiviniemi, T. Noponen, M. Luotolahti, P. Luoto, V. Oikonen, H.T. Sipilä, J. Kopra, I. Mononen, D.J. Duncker, J. Knuuti, K.K. Kalliokoski // *Basic Research in Cardiology*. – 2014. – Vol. 109. – № 4. – P. 1-13.
26. Jensen, T.E. Regulation of glucose and glycogen metabolism during and after exercise [Text] / T.E. Jensen, E.A. Richter // *Journal of Physiology*. – 2012. – Vol. 590. – № 5. – P. 1069-1076.
27. Semenza, G.L. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology [Text] / G.L. Semenza // *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. – 2014. – Vol. 9. – P. 47-71.

28. Vander Heiden, M.G. Understanding the intersections between metabolism and cancer biology [Text] / M.G. Vander Heiden, R.J. DeBerardinis // Cell. – 2017. – Vol. 168. – № 4. – P. 657-669.
29. Alberts, B. Molecular biology of the cell [Text] / B. Alberts, R. Heald, A. Johnson, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, J. Wilson // Molecular Biology of the Cell. – 2022. – 1404 p.
30. Nelson, D.L. Principles of biochemistry [Text] / D.L. Nelson, M. Cox. // New York: W.H. Freeman, 2021. – 1300 p.
31. Patel, M.S. Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex [Text] / M.S. Patel, L.G. Korotchkina // Biochemical Society Transactions. – 2006. – Vol. 34. – № 2. – P. 217-222.
32. Krebs, H.A. The history of the tricarboxylic acid cycle [Text] / H.A. Krebs // Perspectives in Biology and Medicine. – 1970. – Vol. 14. – № 1. – P. 154-172.
33. Lodish, H. Molecular cell biology [Text] / H. Lodish, A. Berk, C.A. Kaiser, M. Krieger, A. Bretscher, H. Ploegh, A. Amon, K.C. Martin // W.H. Freeman. – 2020. – 1248 p.
34. Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism [Text] / P. Mitchell // Nature. – 1961. – Vol. 191. – № 4784. – P. 144-148.
35. Rui, L. Energy metabolism in the liver [Text] / L. Rui // Comprehensive Physiology. – 2014. – Vol. 4. – № 1. – P. 177-197.
36. Pilkis, S.J. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis [Text] / S.J. Pilkis, D.K. Granner // Annual Review of Physiology. – 1992. – Vol. 54. – P. 885-909.
37. Schapira, A.H.V. Mitochondrial diseases [Text] / A.H.V. Schapira // Lancet. – 2012. – Vol. 379. – № 9828. – P. 1825-1834.
38. Wallace, D.C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine [Text] / D.C. Wallace // Annual Review of Genetics. – 2005. – Vol. 39. – P. 359-407.

39. Saltiel, A.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism [Text] / A.R. Saltiel, C.R. Kahn // *Nature*. – 2001. – Vol. 414. – № 6865. – P. 799-806.
40. Petersen, M.C. Mechanisms of insulin action and insulin resistance [Text] / M.C. Petersen, G.I. Shulman // *Physiological Reviews*. – 2018. – Vol. 98. – № 4. – P. 2133-2223.
41. Mullur, R. Thyroid hormone regulation of metabolism [Text] / R. Mullur, Y.Y. Liu, G.A. Brent // *Physiological Reviews*. – 2014. – Vol. 94. – № 2. – P. 355-382.
42. Bartness, T.J. Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue [Text] / T.J. Bartness, C.K. Song // *Journal of Lipid Research*. – 2007. – Vol. 48. – № 8. – P. 1655-1672.
43. Kushmerick, M.J. Energy balance in muscle activity: simulations of ATPase coupled to oxidative phosphorylation and to creatine kinase [Text] / M.J. Kushmerick // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. – 1998. – Vol. 120. – № 1. – P. 109-123.
44. Hardie, D.G. AMP-activated protein kinase — an energy sensor that regulates all aspects of cell function [Text] / D.G. Hardie // *Genes Dev*. – 2011. – Vol. 25. – № 18. – P. 1895-1908.
45. Jensen, J. Regulation of muscle glycogen synthase phosphorylation and kinetic properties by insulin, exercise, adrenaline and role in insulin resistance [Text] / J. Jensen, Y.C. Lai // *Archives of Physiology and Biochemistry*. – 2009. – Vol. 115. – № 1. – P. 13-21.
46. Towle, H.C. Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate [Text] / H.C. Towle, E.N. Kaytor, H.M. Shih // *Annual Review of Nutrition*. – 1997. – Vol. 17. – P. 405-433.
47. Laffel, L. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes [Text] / L. Laffel // *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. – 1999. – Vol. 15. – № 6. – P. 412-426.

48. Kahn, S.E. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes [Text] / S.E. Kahn, R.L. Hull, K.M. Utzschneider // *Nature*. – 2006. – Vol. 444. – № 7121. – P. 840-846.
49. Gallagher, E.J. Obesity and diabetes: the increased risk of cancer and cancer-related mortality [Text] / E.J. Gallagher, D. LeRoith // *Physiological Reviews*. – 2015. – Vol. 95. – № 3. – P. 727-748.
50. Cunnane, S.C. Brain energy rescue: an emerging therapeutic concept for neurodegenerative disorders of ageing [Text] / S.C. Cunnane, R.J. Nugent, M. Roy, A. Courchesne-Loyer, E. Croteau, V. Tremblay, T. Castellano, K. Pifferi, J. Bocti, G. Paquet, D. Morin, F. Turcotte, E. Begin, F. Begdouri, M. Bentourkia, A. Lecomte, J. Barberger-Gateau, R. Fulop, D. Rapoport // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2020. – Vol. 19. – № 9. – P. 609-633.
51. Nunnari, J. Mitochondria: in sickness and in health [Text] / J. Nunnari, A. Suomalainen // *Cell*. – 2012. – Vol. 148. – № 6. – P. 1145-1159.
52. Subramaniam, S.R. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease [Text] / S.R. Subramaniam, M.F. Chesselet // *Progress in Neurobiology*. – 2013. – Vol. 106–107. – P. 17-32.
53. Reddy, P.H. Mutant huntingtin, abnormal mitochondrial dynamics, defective axonal transport of mitochondria, and selective synaptic degeneration in Huntington's disease [Text] / P.H. Reddy, U.P. Shirendeb // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. – 2012. – Vol. 1822. – № 2. – P. 101-110.
54. Lin, M.T. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases [Text] / M.T. Lin, M.F. Beal // *Nature*. – 2006. – Vol. 443. – № 7113. – P. 787-795.
55. Warburg, O. On the origin of cancer cells [Text] / O. Warburg // *Science*. – 1956. – Vol. 123. – № 3191. – P. 309-314.
56. Vander Heiden, M.G. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation [Text] / M.G. Vander Heiden, L.C. Cantley, C.B. Thompson // *Science*. – 2009. – Vol. 324. – № 5930. – P. 1029-1033.

57. Webb, B.A. Dysregulated pH: A perfect storm for cancer progression [Text] / B.B.A. Webb, M. Chimenti, M.P. Jacobson, D.L. Barber // *Nature Reviews Cancer*. – 2011. – Vol. 11. – № 9. – P. 671-677.
58. López-Otín, C. The hallmarks of aging [Text] / C. López-Otín, M.A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, G. Kroemer // *Cell*. – 2013. – Vol. 153. – № 6. – P. 1194-1217.
59. Eltzschig, H.K. Ischemia and reperfusion — from mechanism to translation [Text] / H.K. Eltzschig, T. Eckle // *Nature Medicine*. – 2011. – Vol. 17. – № 11. – P. 1391-1401.
60. Dirnagl, U. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view [Text] / U. Dirnagl, C. Iadecola, M.A. Moskowitz // *Trends in Neurosciences*. – 1999. – Vol. 22. – № 9. – P. 391-397.
61. Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine [Text] / G.L. Semenza // *Cell*. – 2012. – Vol. 148. – № 3. – P. 399-408.
62. Ince, C. The endothelium in sepsis [Text] / C. Ince, P.R.M. Mayeux, T. Nguyen, H. Gomez, J.A. Kellum, G. Ospina-Tascón, G. Hernandez, P. Murray, D. De Backer // *Shock*. – 2016. – Vol. 45. – № 3. – P. 259-270.
63. Carmeliet, P. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases [Text] / P. Carmeliet, R.K. Jain // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2011. – Vol. 10. – № 6. – P. 417-427.
64. Bottomley, P.A. Human *in vivo* NMR spectroscopy in diagnostic medicine: clinical tool or research probe? [Text] / P.A. Bottomley // *Radiology*. – 1989. – Vol. 170. – № 1. – P. 1-15.
65. Govindaraju, V. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites [Text] / V. Govindaraju, K. Young, A.A. Maudsley // *NMR in Biomedicine*. – 2000. – Vol. 13. – № 3. – P. 129-153.
66. Ardenkjær-Larsen, J.H. Increase in signal-to-noise ratio of >10,000 times in liquid-state NMR [Text] / J.H. Ardenkjær-Larsen, B. Fridlund, A. Gram, G. Hansson, L. Hansson, M.H. Lerche, R. Servin, M. Thaning, K. Golman // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – Vol. 100. – № 18. – P. 10158-10163.

67. Gallamini, A. Positron emission tomography (PET) in oncology [Text] / A. Gallamini, C. Zwarthoed, A. Borra // *Cancers*. – 2014. – Vol. 6. – № 4. – P. 1821-1889.
68. Catana, C. PET/MRI for neurologic applications [Text] / C. Catana, D. Procissi, Y. Wu, M.S. Judenhofer, J. Qi, B.J. Pichler, R.E. Jacobs, S.R. Cherry // *Journal of Nuclear Medicine* – 2012. – Vol. 53. – № 12. – P. 1916-1925.
69. Patti, G.J. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy [Text] / G.J. Patti, O. Yanes, G. Siuzdak // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2012. – Vol. 13. – № 4. – P. 263-269.
70. Norris, J.L. Analysis of tissue specimens by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry in biological and clinical research [Text] / J.L. Norris, R.M. Caprioli // *Chemical Reviews*. – 2013. – Vol. 113. – № 4. – P. 2309-2342.
71. Heller, A. Electrochemical glucose sensors and their applications in diabetes management [Text] / A. Heller, B. Feldman // *Chemical Reviews*. – 2008. – Vol. 108. – № 7. – P. 2482-2505.
72. Anderson, R.R. The optics of human skin [Text] / R.R. Anderson, J.A. Parrish // *Journal of Investigative Dermatology*. – 1981. – Vol. 77. – № 1. – P. 13-19.
73. Wang, L. V. Photoacoustic tomography: *In vivo* imaging from organelles to organs [Text] / L.V. Wang, S. Hu // *Science*. – 2012. – Vol. 335. – № 6075. – P. 1458-1462.
74. Krafft, C. Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues [Text] / C. Krafft, V. Sergo // *Journal of Spectroscopy*. – 2006. – Vol. 20. – № 5-6. – P. 195-218.
75. Arridge, S.R. Optical tomography in medical imaging [Text] / S.R. Arridge // *Inverse Problems*. – 1999. – Vol. 15. – № 2. – P. R41.
76. Zonios, G. Modeling diffuse reflectance from semi-infinite turbid media: application to the study of skin optical properties [Text] / G. Zonios, A. Dimou // *Optics Express*. – 2006. – Vol. 14. – № 19. – P. 8661-8674.
77. Dremin, V. Optical percutaneous needle biopsy of the liver: a pilot animal and clinical study [Text] / V. Dremin, E. Zhrebtssov, A. Popov, A. Doronin, D. Kurakina,

M. Kirillin, I. Meglinski, A. Bykov // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 14200.

78. Vakoc, B.J. Cancer imaging by optical coherence tomography: preclinical progress and clinical potential [Text] / B.J. Vakoc, R.M. Lanning, J.A. Tyrrell, T.P. Padera, L.A. Bartlett, T. Stylianopoulos, L.L. Munn, G.J. Tearney, D. Fukumura, R.K. Jain, M.G. Bawendi // *Nature Reviews Cancer*. – 2012. – Vol. 12. – № 5. – P. 363-368.

79. Huang, D. Optical coherence tomography [Text] / D. Huang, E.A. Swanson, C.P. Lin, J.S. Schuman, W.G. Stinson, W. Chang, M.R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C.A. Puliafito, J.G. Fujimoto // *Science*. – 1991. – Vol. 254. – № 5035. – P. 1178-1181.

80. Perry, S.W. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: A practical usage guide [Text] / S.W. Perry, J.P. Norman, J. Barbieri, E.B. Brown, H.A. Gelbard // *Biotechniques*. – 2011. – Vol. 50. – № 2. – P. 98-115.

81. Yamada, K. A real-time method of imaging glucose uptake in single, living mammalian cells [Text] / K. Yamada, M. Nakata, N. Horimoto, M. Saito, H. Matsuoka, N. Inagaki // *Nature Protocols*. – 2007. – Vol. 2. – № 3. – P. 753-762.

82. Eruslanov, E. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry [Text] / E. Eruslanov, S. Kusmartsev // *Methods in Molecular Biology*. – 2010. – Vol. 594. – P. 57-72.

83. Mukhopadhyay, P. Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy [Text] / P. Mukhopadhyay, M. Rajesh, S. Batkai, Y. Kashiwaya, G. Hasko, L. Liaudet, V.K. Srivastava, D. Paloczi, P. Pacher // *Nature Protocols*. – 2007. – Vol. 2. – № 9. – P. 2295-2301.

84. Robinson, K.M. Selective fluorescent imaging of superoxide *in vivo* using ethidium-based probes [Text] / K.M. Robinson, M.S. Janes, M. Pehar, J.S. Monette, M.F. Ross, T.M. Hagen, M.P. Murphy, J.S. Beckman // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 103. – № 41. – P. 15038-15043.

85. Zhao, Y. Genetically encoded fluorescent sensors for intracellular NADH detection [Text] / Y. Zhao Y, J. Jin, Q. Hu, H.M. Zhou, J. Yi, X. Yu, L. Xu, X. Wang, Y. Yang Y, J. Loscalzo // *Cell Metabolism*. – 2011. – Vol. 14. – № 4. – P. 555-566.

86. Cannon, M.B. Redox-sensitive green fluorescent protein: Probes for dynamic intracellular redox responses. A review [Text] / M.B. Cannon, S. James Remington // *Methods in Molecular Biology*. – 2008. – Vol. 476. – P. 50-64.
87. Dooley, C.T. Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators [Text] / C.T. Dooley, T.M. Dore, G.T. Hanson, W.C. Jackson, S.J. Remington, R.Y. Tsien // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – № 21. – P. 22284-22293.
88. Denk, W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy [Text] / W. Denk, J.H. Strickler, W.W. Webb // *Science*. – 1990. – Vol. 248. – № 4951. – P. 73-76.
89. Helmchen, F. Deep tissue two-photon microscopy [Text] / F. Helmchen, W. Denk // *Nature Methods*. – 2005. – Vol. 2. – № 12. – P. 932-940.
90. Denk, W. On the fundamental imaging-depth limit in two-photon microscopy [Text] / W. Denk, P. Theer // *Journal of the Optical Society of America A*. – 2006. – Vol. 23. – № 12. – P. 3139-3149.
91. Freudiger, C.W. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated raman scattering microscopy [Text] / C.W. Freudiger, W. Min, B.G. Saar, S. Lu, G.R. Holtom, C. He, J.C. Tsai, J.X. Kang, X.S. Xie // *Science*. – 2008. – Vol. 322. – № 5909. – P. 1857-1861.
92. Schie, I.W. Applications of coherent Raman scattering microscopies to clinical and biological studies [Text] / I.W. Schie, C. Krafft, J. Popp // *Analyst*. – 2015. – Vol. 140. – № 12. – P. 3897-3909.
93. Cheng, J.X. Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: Instrumentation, theory, and applications [Text] / J.X. Cheng, X.S. Xie // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2004. – Vol. 108. – № 3. – P. 827-840.
94. Klar, T.A. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission [Text] / T.A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, S.W. Hell // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2000. – Vol. 97. – № 15. – P. 8206-8210.
95. Hell, S.W. Far-field optical nanoscopy [Text] / S.W. Hell // *Science*. – 2007. – Vol. 316. – № 5828. – P. 1153-1158.

96. Betzig, E. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [Text] / E. Betzig, G.H. Patterson, R. Sougrat, O.W. Lindwasser, S. Olenych, J.S. Bonifacino, M.W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H.F. Hess // *Science*. – 2006. – Vol. 313. – № 5793. – P. 1642-1645.
97. Rust, M.J. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [Text] / M.J. Rust, M. Bates, X. Zhuang // *Nature Methods*. – 2006. – Vol. 3. – № 10. – P. 793-795.
98. Chance, B. Localization and kinetics of reduced pyridine nucleotide in living cells by microfluorometry [Text] / B. Chance, B. Thorell // *Journal of Biological Chemistry*. – 1959. – Vol. 234. – № 11. – P. 3044-3050.
99. Chance, B. Intracellular oxidation-reduction states *in vivo* [Text] / B. Chance, P. Cohen, F. Jobsis, B. Schoener // *Science*. – 1962. – Vol. 137. – № 3529. – P. 499-508.
100. Chance, B. The respiratory chain and oxidative phosphorylation [Text] / B. Chance, G.R. Williams // *In Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. – 1956.
101. 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. 1369-1377.
102. 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 USA*. – 2007. – Vol. 104. – № 49. – P. 19494-19499.
103. Shih, A.Y. Two-photon microscopy as a tool to study blood flow and neurovascular coupling in the rodent brain [Text] / A.Y. Shih, J.D. Driscoll, P.J. Drew, N. Nishimura, C.B. Schaffer, D. Kleinfeld // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2012. – Vol. 32. – № 7. – P. 1277-1309.
104. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas* [Text]. 7th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2015.

105. Дедов, И.И. Сахарный диабет 2 типа у взрослых [Текст] / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, А.Ю. Майоров, М.Ш. Шамхалова, О.Ю. Сухарева, Г.Р. Галстян, А.Ю. Токмакова, Т.В. Никонова, Е.В. Суркова, И.В. Кононенко, Д.Н. Егорова, Л.И. Ибрагимова, Е.А. Шестакова, И.И. Клефтортова, И.А. Скляник, И.Я. Ярек-Мартынова, А.С. Северина, С.А. Мартынов, О.К. Викулова, В.Ю. Калашников, И.З. Бондаренко, И.С. Гомова, Е.Г. Старостина, А.С. Аметов, М.Б. Анциферов, Т.П. Бардымова, И.А. Бондарь, Ф.В. Валеева, Т.Ю. Демидова, А.М. Мкртумян, Н.А. Петунина, Л.А. Руюткина, Л.А. Суплотова, О.В. Ушакова, Ю.Ш. Халимов // Сахарный диабет. – 2020. – Т. 23. – № 2S. – С. 4-102.

106. Дедов, И.И. Сахарный диабет 1 типа у взрослых [Текст] / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, А.Ю. Майоров, М.Ш. Шамхалова, Т.В. Никонова, О.Ю. Сухарева, Е.В. Пекарева, Л.И. Ибрагимова, М.С. Михина, Г.Р. Галстян, А.Ю. Токмакова, Е.В. Суркова, Д.Н. Лаптев, И.В. Кононенко, Д.Н. Егорова, И.И. Клефтортова, И.А. Скляник, И.Я. Ярек-Мартынова, А.С. Северина, С.А. Мартынов, О.К. Викулова, В.Ю. Калашников, И.С. Гомова, Д.В. Липатов, Е.Г. Старостина, А.С. Аметов, М.Б. Анциферов, Т.П. Бардымова, И.А. Бондарь, Ф.В. Валеева, Т.Ю. Демидова, В.В. Климонтов, А.М. Мкртумян, Н.А. Петунина, Л.А. Суплотова, О.В. Ушакова, Ю.Ш. Халимов, Л.А. Руюткина // Сахарный диабет. – 2020. – Т. 23. – № 1S. – С. 42-114.

107. Lindström, J. Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study [Text] / J. Lindström et al. // The Lancet. – 2006. – Vol. 368. – № 9548. – P. 1673-1679.

108. Luo, S. Real-world effectiveness of early insulin therapy on the incidence of cardiovascular events in newly diagnosed type 2 diabetes [Text] / S. Luo et al. // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2024. – Vol. 9. – № 1. – P. 154.

109. An, X. Early effective intervention can significantly reduce all-cause mortality in prediabetic patients: a systematic review and meta-analysis based on high-quality clinical studies [Text] / X. An, Y. Zhang, W. Sun, X. Kang, H. Ji, Y. Sun, L. Jiang, X. Zhao, Q. Gao, F. Lian, X. Tong // Frontiers in Endocrinology. – 2024. – Vol. 15. – P. 1294819.

110. Zhang, P. Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis dagger [Text] / P. Zhang et al. // *Annals of Medicine*. – 2017. – Vol. 49. – № 2. – P. 106-116.
111. Strain, W.D. Diabetes, cardiovascular disease and the microcirculation [Text] / W.D. Strain, P.M. Paldánus // *Cardiovascular Diabetology*. – 2018. – Vol. 17. – № 1. – P. 1-10.
112. De Los Santos, C. FRAP, FLIM, and FRET: detection and analysis of cellular dynamics on a molecular scale using fluorescence microscopy [Text] / C. De Los Santos, C. Chang, M. Mycek, R.A. Cardullo // *Molecular Reproduction and Development*. – 2015. – Vol. 82. – № 7–8. – P. 587-604.
113. Sun, Y. Photoplethysmography revisited: from contact to noncontact, from point to imaging [Text] / Y. Sun, N. Thakor // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. – 2016. – Vol. 63. – № 3. – P. 463-477.
114. Volkov, M.V. Video capillaroscopy clarifies mechanism of the photoplethysmographic waveform appearance [Text] / M.V. Volkov, N.B. Margaryants, A.V. Potemkin, M.A. Volynsky, I.P. Gurov, O.V. Mamontov, A.A. Kamshilin // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 13298.
115. Kamshilin, A.A. A new look at the essence of the imaging photoplethysmography [Text] / A.A. Kamshilin, E. Nippolainen, I.S. Sidorov, P.V. Vasilev, N.P. Erofeev, N.P. Podolian, R.V. Romashko // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – № 1. – P. 10494.
116. Dunn, C.E. Comparison of speckleplethysmographic (SPG) and photoplethysmographic (PPG) imaging by Monte Carlo simulations and *in vivo* measurements [Text] / C.E. Dunn, C. Lertsakdadet, A. Crouzet, J. De Montigny, J. Qu, I. Meglinski, S. Gioux // *Biomedical Optics Express*. – 2018. – Vol. 9. – № 9. – P. 4306-4316.
117. Fujimoto, J.G. The ecosystem that powered the translation of OCT from fundamental research to clinical and commercial impact [Text] / J.G. Fujimoto, E.A. Swanson // *Biomedical Optics Express*. – 2017. – Vol. 8. – № 3. – P. 1638-1664.

118. Kim, S. Design and implementation of a low-cost, portable OCT system [Text] / S. Kim, M. Crose, W.J. Eldridge, B. Cox, W.J. Brown, A. Wax // *Biomedical Optics Express*. – 2018. – Vol. 9. – № 3. – P. 1232-1243.

119. Bonesi, M. Doppler optical coherence tomography in cardiovascular applications [Text] / M. Bonesi, S. Matcher, I. Meglinski // *Laser Physics*. – 2010. – Vol. 20. – № 6. – P. 1491-1499.

120. Hu, Z. First-in-human liver-tumour surgery guided by multispectral fluorescence imaging in the visible and near-infrared-I/II windows [Text] / Z. Hu, C. Fang, B. Li, Z. Zhang, C. Cao, M. Cai, S. Su, X. Sun, X. Shi, C. Li, T. Zhou, Y. Zhang, C. Chi, P. He, X. Xia, Y. Chen, S.S. Gambhir, Z. Cheng, J. Tian // *Nature Biomedical Engineering*. – 2020. – Vol. 4. – № 3. – P. 259-271.

121. Zarrinpar, A. Intraoperative laparoscopic near-infrared fluorescence cholangiography to facilitate anatomical identification: when to give indocyanine green and how much [Text] / A. Zarrinpar, E.P. Dutson, C. Mobley, R.W. Busuttil, C.E. Lewis, A. Tillou, A. Cheaito, O.J. Hines, V.G. Agopian, D.T. Hiyama // *Surgical Innovation*. – 2016. – Vol. 23. – № 4. – P. 360-365.

122. Saito, H. Bedside assessment of regional cerebral perfusion using near-infrared spectroscopy and indocyanine green in patients with atherosclerotic occlusive disease [Text] / H. Saito, T. Ishikawa, J. Tanabe, S. Kobayashi, J. Moroi // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 1242.

123. Ishimaru, A. Wave propagation and scattering in random media [Text] / A. Ishimaru // *New York: Academic Press*. – 1978. – Vol. 2. – P. 272.

124. Jacques, S.L. Optical properties of biological tissues: a review [Text] / S.L. Jacques // *Physics in Medicine and Biology*. – 2013. – Vol. 58. – № 11. – P. R37.

125. Baltussen, E.J.M. Diffuse reflectance spectroscopy as a tool for real-time tissue assessment during colorectal cancer surgery [Text] / E.J.M. Baltussen, P. Snaebjornsson, S.G.B. de Koning, H.J.C.M. Sterenberg, A.G.J. Aalbers, N. Kok, G.L. Beets, B.H.W. Hendriks, K.F.D. Kuhlmann, T.J.M. Ruers // *Journal of Biomedical Optics*. – 2017. – Vol. 22. – № 10. – P. 106014.

126. Potapova, E.V. Evaluation of microcirculatory disturbances in patients with rheumatic diseases by the method of diffuse reflectance spectroscopy [Text] / E.V. Potapova, V.V. Dremin, E.A. Zherebtsov, I.N. Makovik, A.I. Zherebtsova, A.V. Dunaev, K.V. Podmasteryev, V.V. Sidorov, A.I. Krupatkin, L.S. Khakhicheva, V.F. Muradyan // *Human Physiology*. – 2017. – Vol. 43. – № 2. – P. 222-228.
127. Zonios, G. Modeling diffuse reflectance from semi-infinite turbid media: application to the study of skin optical properties [Text] / G. Zonios, A. Dimou // *Optics Express*. – 2006. – Vol. 14. – № 19. – P. 8661-8674.
128. Wu, J. Diffuse reflectance from turbid media: an analytical model of photon migration [Text] / J. Wu, C. Rolfe, S.L. Jacques // *Applied Optics*. – 1993. – Vol. 32. – № 7. – P. 1115-1121.
129. Sundberg, M. Diffuse reflectance spectroscopy of the human tympanic membrane in otitis media [Text] / M. Sundberg, M. Peebo, P.A. Öberg, H. Swartz // *Physiological Measurement*. – 2004. – Vol. 25. – № 6. – P. 1473-1483.
130. Stratonnikov, A.A. Evaluation of blood oxygen saturation *in vivo* from diffuse reflectance spectra [Text] / A.A. Stratonnikov, V.B. Loschenov // *Journal of Biomedical Optics*. – 2001. – Vol. 6. – № 4. – P. 457-468.
131. Zakharov, P. A wearable diffuse reflectance sensor for continuous monitoring of cutaneous blood content [Text] / P. Zakharov, M.S. Talary, A. Caduff // *Physics in Medicine and Biology*. – 2009. – Vol. 54. – № 17. – P. 5301-5320.
132. McCully, K.K. Exercise-induced changes in oxygen saturation in the calf muscles of elderly subjects with peripheral vascular disease [Text] / K.K. McCully, C. Halber, J.D. Posner // *Journal of Gerontology*. – 1994. – Vol. 49. – № 3. – P. B128-B134.
133. Rydén, L. ESC guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD – summary [Text] / L. Rydén, P.J. Grant, S.D. Anker, C. Berne, F. Cosentino, N. Danchin, C. Deaton, J. Escaned, H.P. Hammes, H. Huikuri, M. Marre, N. Marx, L. Mellbin, J. Ostergren, C. Patrono, P. Seferovic, M.S. Uva, M.R. Taskinen, J.L. Zamorano // *Diabetes & Vascular Disease Research*. – 2014. – Vol. 11. – № 3. – P. 133-173.

134. Pichler, G. Reduced forearm blood flow in children and adolescents with type 1 diabetes (measured by near-infrared spectroscopy) [Text] / G. Pichler, B. Urlesberger, P. Jirak, H. Zotter, E. Reiterer, W. Müller, M. Borkenstein // *Diabetes Care*. – 2004. – Vol. 27. – № 8. – P. 1942-1946.

135. Mohler, E.R. Impaired exercise-induced blood volume in type 2 diabetes with or without peripheral arterial disease measured by continuous-wave near-infrared spectroscopy [Text] / E.R. Mohler 3rd, G. Lech, G.E. Supple, H. Wang, B. Chance // *Diabetes Care*. – 2006. – Vol. 29. – № 8. – P. 1856-1859.

136. Sujatha, N. Assessment of microcirculatory hemoglobin levels in normal and diabetic subjects using diffuse reflectance spectroscopy in the visible region — a pilot study [Text] / N. Sujatha, B.S.S. Anand, K. Bala Nivetha, V.B. Narayanamurthy, V. Seshadri, R. Poddar // *Journal of Applied Spectroscopy*. – 2015. – Vol. 82. – № 3. – P. 432-437.

137. Mallya, M. Absorption spectroscopy for the estimation of glycated hemoglobin (HbA1c) for the diagnosis and management of diabetes mellitus: a pilot study [Text] / M. Mallya, R. Shenoy, G. Kodyalamoole, M. Biswas, J. Karumathil, S. Kamath // *Photomedicine and Laser Surgery*. – 2013. – Vol. 31. – № 5. – P. 219-224.

138. Anand, S. Diffuse reflectance spectroscopy for monitoring diabetic foot ulcer – a pilot study [Text] / S. Anand, N. Sujatha, V.B. Narayanamurthy, V. Seshadri, R. Poddar // *Optics and Lasers in Engineering*. – 2014. – Vol. 53. – P. 1-5.

139. Potapova, E.V. A complex approach to noninvasive estimation of microcirculatory tissue impairments in feet of patients with diabetes mellitus using spectroscopy [Text] / E.V. Potapova, V.V. Dremin, E.A. Zhrebtsov, A.V. Dunaev, I.N. Makovik, A.I. Zhrebtsova, I.E. Rafailov, A.V. Doronin, I.V. Sidorov, M. Mamoshin, I. Meglinski // *Optics and Spectroscopy*. – 2017. – Vol. 123. – № 6. – P. 955-964.

140. Jöbsis, F.F. Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters [Text] / F.F. Jöbsis // *Science*. – 1977. – Vol. 198. – № 4323. – P. 1264-1267.

141. Wolf, T. Noninvasive near infrared spectroscopy monitoring of regional cerebral blood oxygenation changes during peri-infarct depolarizations in focal cerebral

ischemia in the rat [Text] / T. Wolf, U. Lindauer, U. Reuter, T. Back, A. Villringer, K. Einhüpl, U. Dirnagl // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 1997. – Vol. 17. – № 9. – P. 950-954.

142. Petrova, A. Near-infrared spectroscopy in the detection of regional tissue oxygenation during hypoxic events in preterm infants undergoing critical care [Text] / A. Petrova, R. Mehta // *Pediatric Critical Care Medicine*. – 2006. – Vol. 7. – № 5. – P. 449-454.

143. Lin, B.-S. Evaluation of traumatic brain injury by optical technique [Text] / B.-S. Lin et al. // *BMC Neurology*. – 2015. – Vol. 15. – № 1. – P. 202.

144. Weingarten, M.S. Diffuse near-infrared spectroscopy prediction of healing in diabetic foot ulcers: a human study and cost analysis [Text] / M.S. Weingarten, R.D. Pettitt, C.S. Hooker, J.L. van Griethuysen // *Wound Repair and Regeneration*. – 2012. – Vol. 20. – № 6. – P. 911-917.

145. Godavarty, A. Diabetic wound imaging using a noncontact near-infrared scanner: a pilot study [Text] / A. Godavarty, D.G. Rinehart, J.L. Duggan, D.M. Berke, K.J. Peterson // *Journal of Diabetes Science and Technology*. – 2015. – Vol. 9. – № 5. – P. 1158-1159.

146. Lin, B.-S. Using wireless near-infrared spectroscopy to predict wound prognosis in diabetic foot ulcers [Text] / B.-S. Lin, C.-C. Chang, Y.-H. Tseng, J.-R. Li, Y.-S. Peng, Y.-K. Huang // *Advances in Skin & Wound Care*. – 2020. – Vol. 33. – № 1. – P. 1-12.

147. Goetz, A.F.H. Geologic remote sensing [Text] / A.F.H. Goetz, L.C. Rowan // *Science*. – 1981. – Vol. 211. – № 4484. – P. 781-791.

148. Goetz, A.F.H. Imaging spectrometry for Earth remote sensing [Text] / A.F.H. Goetz, G. Vane, J.E. Solomon, B.N. Rock // *Science*. – 1985. – Vol. 228. – № 4704. – P. 1147-1153.

149. Bhargava, A. Hyperspectral imaging and its applications: a review [Text] / A. Bhargava, S. McKechnie, R. Connor, L. Smith // *Heliyon*. – 2024. – Vol. 10. – № 12. – P. e33208.

150. Yoon, J. A clinically translatable hyperspectral endoscopy (HySE) system for imaging the gastrointestinal tract [Text] / J. Yoon, N. Khan, C. Priest, R. Venkatesh, N. Bhattacharya, M. Upchurch, K. Gillenwater, S. Pantanowitz // Nature Communications. – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 1-13.

151. Lu, G. Medical hyperspectral imaging: A review [Text] / G. Lu, B. Fei // Journal of Biomedical Optics. – 2014. – Vol. 19. – № 1. – P. 010901.

152. Ross, C.G. Hyperspectral imaging of bruises [Text] / C.G. Ross, C. Chwal, J.A. Beckstead, R.W. Byard, N.E.I. Langlois // Pathology. – 2014. – Vol. 46. – № Suppl. 1. – P. S88.

153. Hadoux, X. Non-invasive *in vivo* hyperspectral imaging of the retina for potential biomarker use in Alzheimer's disease [Text] / X. Hadoux, F. Hui, J.K.H. Lim, C.L. Masters, A. Pébay, S. Chevalier, J. Ha, S. Loi, C.J. Fowler, C. Rowe, V.L. Villemagne, E.N. Taylor, C. Fluke, J.P. Soucy, F. Lesage, J.P. Sylvestre, P. Rosa-Neto, S. Mathotaarachchi, S. Gauthier, Z.S. Nasreddine, J.D. Arbour, M.-A. Rhéaume, S. Beaulieu, M. Dirani, C.T.O. Nguyen, B.V. Bui, R. Williamson, J.G. Crowston, P. van Wijngaarden // Nature Communications. – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 1-12.

154. Denstedt, M. Hyperspectral imaging as a diagnostic tool for chronic skin ulcers [Text] / M. Denstedt, A.F. Volchkova, S. Wang, G. Sun, P. Joly, E. Gammond, Y. Dong // Proceedings of SPIE. – 2013. – Vol. 8565. – P. 85650N.

155. Zharkikh, E. Biophotonics methods for functional monitoring of complications of diabetes mellitus [Text] / E. Zharkikh, A. Kuznetsov, N. Ivanova, D. Petrova, V. Anisimov // Journal of Biophotonics. – 2020. – Vol. 13. – № 10. – P. 202000203.

156. Paul, D.W. Noninvasive imaging technologies for cutaneous wound assessment: a review [Text] / D.W. Paul, L.K. Gao, J.L. Gurtner, G.C. Banga // Wound Repair and Regeneration. – 2015. – Vol. 23. – № 2. – P. 149-162.

157. Yudovsky, D. Assessing diabetic foot ulcer development risk with hyperspectral tissue oximetry [Text] / D. Yudovsky, C.G. Ross, N.E.I. Langlois // Journal of Biomedical Optics. – 2011. – Vol. 16. – № 2. – P. 026009.

158. Khaodhiar, L. The use of medical hyperspectral technology to evaluate microcirculatory changes in diabetic foot ulcers and to predict clinical outcomes [Text] / L. Khaodhiar, T. Dinh, K.T. Schomacker, S.V. Panasyuk, J.E. Freeman, R. Lew, T. Vo, A.A. Panasyuk, C. Lima, J.M. Giurini, T.E. Lyons, A. Veves // *Diabetes Care*. – 2007. – Vol. 30. – № 4. – P. 903-910.

159. Nouvong, A. Evaluation of diabetic foot ulcer healing with hyperspectral imaging of oxyhemoglobin and deoxyhemoglobin [Text] / A. Nouvong, B. Hoogwerf, E. Mohler, B. Davis, A. Tajaddini, E. Medenilla // *Diabetes Care*. – 2009. – Vol. 32. – № 11. – P. 2056-2061.

160. Gkogkolou, P. Advanced glycation end products: key players in skin aging? [Text] / P. Gkogkolou, M. Böhm // *Dermato-Endocrinology*. – 2012. – Vol. 4. – № 3. – P. 259-270.

161. Tu, Y. Oxidative stress and human skin connective tissue aging [Text] / Y. Tu, T. Quan // *Cosmetics*. – 2016. – Vol. 3. – № 3. – P. 28.

162. Yan, S.F. Mechanisms of disease: Advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications [Text] / S.F. Yan, R. Ramasamy, A.M. Schmidt // *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism*. – 2008. – Vol. 4. – № 5. – P. 285-293.

163. Goh, S.Y. The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes [Text] / S.Y. Goh, M.E. Cooper // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2008. – Vol. 93. – № 4. – P. 1143-1152.

164. Bansode, S. Glycation changes molecular organization and charge distribution in type I collagen fibrils [Text] / S. Bansode, U. Bashtanova, R. Li, J. Clark, K.H. Müller, A. Puzkarska, I. Goldberga, H.H. Chetwood, D.G. Reid, L.J. Colwell, J.N. Skepper, C.M. Shanahan, G. Schitter, P. Mesquida, M.J. Duer // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 3397.

165. Argyropoulos, A.J. Alterations of dermal connective tissue collagen in diabetes: Molecular basis of aged-appearing skin [Text] / A.J. Argyropoulos, P. Robichaud, R.M. Balimunkwe, G.J. Fisher, C. Hammerberg, Y. Yan, T. Quan // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11. – № 4. – P. e0153806.

166. Puxkandl, R. Viscoelastic properties of collagen: Synchrotron radiation investigations and structural model [Text] / R. Puxkandl, I. Zizak, O. Paris, J. Keckes, W. Tesch, S. Bernstorff, P. Purslow, P. Fratzl // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2002. – Vol. 357. – № 1418. – P. 191-197.

167. Shuster, S. The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density [Text] / S. Shuster, M.M. Black, E. McVitie // *British Journal of Dermatology*. – 1975. – Vol. 93. – № 6. – P. 639-643.

168. Tuchin, V.V. Polarized light interaction with tissues [Text] / V.V. Tuchin // *J Biomed Opt.* – 2016. – Vol. 21. – № 7. – P. 071114.

169. Matcher, S.J. A review of some recent developments in polarization-sensitive optical imaging techniques for the study of articular cartilage [Text] / S.J. Matcher // *J Appl Phys.* – 2009. – Vol. 105. – № 10. – P. 102041.

170. Jonasson, H. *In vivo* characterization of light scattering properties of human skin in the 475- to 850-nm wavelength range in a Swedish cohort [Text] / H. Jonasson, I. Fredriksson, S. Bergstrand, C.J. Östgren, M. Larsson, T. Strömberg // *Journal of Biomedical Optics*. – 2018. – Vol. 23. – № 12. – P. 1-6.

171. Kono, T. *In vivo* measurement of optical properties of human skin for 450–800 nm and 950–1600 nm wavelengths [Text] / T. Kono, J. Yamada // *International Journal of Thermophysics*. – 2019. – Vol. 40. – № 5. – P. 51.

172. Wang, X. Polarized light propagation through scattering media: time-resolved Monte Carlo simulations and experiments [Text] / X. Wang, A. Jacques, L. Weffer, H. Lloyd // *Journal of Biomedical Optics*. – 2003. – Vol. 8. – № 4. – P. 608-617.

173. Jacques, S.L. Imaging skin pathology with polarized light [Text] / S.L. Jacques, J.C. Ramella-Roman, D.K.L.M. Silva // *Journal of Biomedical Optics*. – 2002. – Vol. 7. – № 3. – P. 329-340.

174. Feng, X. Wavelength optimized cross-polarized wide-field imaging for noninvasive and rapid evaluation of dermal structures [Text] / X. Feng, R. Patel, A.N. Yaroslavsky // *Journal of Biophotonics*. – 2015. – Vol. 8. – № 4. – P. 324-331.

175. Feng, X. Polarization enhanced wide-field imaging for evaluating dermal changes caused by non-ablative fractional laser treatment [Text] / X. Feng, R. Patel, B.L.

Stetson, A.N. Yaroslavsky // *Lasers in Surgery and Medicine*. – 2016. – Vol. 48. – № 2. – P. 150-156.

176. Patel, R. Polarization-sensitive multimodal imaging for detecting breast cancer [Text] / R. Patel, A. Khan, R. Quinlan, A.N. Yaroslavsky // *Cancer Research*. – 2014. – Vol. 74. – № 17. – P. 4685-4693.

177. Korotkov, K. A new total body scanning system for automatic change detection in multiple pigmented skin lesions [Text] / K. Korotkov, J. Quintana, S. Puig, J. Malvehy, R. García // *IEEE Transactions on Medical Imaging*. – 2015. – Vol. 34. – № 1. – P. 317-338.

178. Woessner, A.E. Characterizing differences in the collagen fiber organization of skin wounds using quantitative polarized light imaging [Text] / A.E. Woessner, J.D. McGee, J.D. Jones, K.P. Quinn // *Wound Repair and Regeneration*. – 2019. – Vol. 27. – № 6. – P. 711-714.

179. Goertz, O. Orthogonal polarization spectral imaging: a tool for assessing burn depths? [Text] / O. Goertz, H. Sogni, C.C. Koehler, H.N. Clough, M. Datzmann, A. Ertel // *Annals of Plastic Surgery*. – 2010. – Vol. 64. – № 2. – P. 217-221.

180. Kim, K.H. *In vivo* imaging of human burn injuries with polarization-sensitive optical coherence tomography [Text] / K.H. Kim, M.C. Pierce, G.N. Maguluri, B.H. Park, S.J. Yoon, M. Lydon, R.L. Sheridan, J.F. de Boer // *Journal of Biomedical Optics*. – 2012. – Vol. 17. – № 6. – P. 066012.

181. Baumann, B. Visualization of neuritic plaques in Alzheimer's disease by polarization-sensitive optical coherence microscopy [Text] / B. Baumann, A. Woehrer, G. Ricken, M. Augustin, C. Mitter, M. Pircher, U. Schmidt-Erfurth, C.K. Hitzenberger // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – P. 43477.

182. Camacho, R. 2D polarization imaging as a low-cost fluorescence method to detect α -synuclein aggregation *ex vivo* in models of Parkinson's disease [Text] / R. Camacho, D. Täuber, C. Hansen, I.G. Scheblykin // *Communications Biology*. – 2018. – Vol. 1. – № 1. – P. 1-10.

183. Pierangelo, A. *Ex-vivo* characterization of human colon cancer by Mueller polarimetric imaging [Text] / A. Pierangelo, A. Benali, M. Antonelli, T. Novikova, P.

Validire, B. Gayet, A. Martino // *Optics Express*. – 2011. – Vol. 19. – № 2. – P. 1582-1593.

184. Dremin, V. Influence of blood pulsation on diagnostic volume in pulse oximetry and photoplethysmography measurements [Text] / V. Dremin, E. Zherebtsov, A. Bykov, A. Popov, A. Doronin, I. Meglinski // *Applied Optics*. – 2019. – Vol. 58. – № 34. – P. 9398-9405.

185. Rafailov, I.E. How the melanin concentration in the skin affects the fluorescence-spectroscopy signal formation [Text] / I.E. Rafailov, A.V. Dunaev, V.V. Dremin, K.S. Litvinova, S.G. Sokolovski, E.U. Rafailov // *Journal of Optical Technology*. – 2016. – Vol. 83. – № 1. – P. 43-48.

186. 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.

187. Zharkikh, V. Sampling volume assessment for wearable multimodal optical diagnostic device [Text] / V. Zharkikh, V. Dremin, A. Dunaev // *Journal of Biophotonics*. – 2023. – Vol. 16. – № 9. – P. e202300139.

188. Jacques, S.L. Monte Carlo modeling of light transport in tissues [Text] / S.L. Jacques // In: *Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissues*. New York: Plenum Press. – 1995. – P. 73-100.

189. Zhu, C. Review of Monte Carlo modeling of light transport in tissues [Text] / C. Zhu, Q. Liu // *Journal of Biomedical Optics*. – 2013. – Vol. 18. – № 5. – P. 050902.

190. Metropolis, N. The Monte Carlo method [Text] / N. Metropolis, S. Ulam // *Journal of the American Statistical Association*. – 1949. – Vol. 44. – № 247. – P. 335-341.

191. Witt, A.N. Multiple scattering in reflection nebulae. I – A Monte Carlo approach [Text] / A.N. Witt // *Astrophysical Journal Supplement Series*. – 1977. – Vol. 35. – P. 1-6.

192. Wilson, B.C. A Monte Carlo model for the absorption and flux distributions of light in tissue [Text] / B.C. Wilson, G. Adam // *Medical Physics*. – 1983. – Vol. 10. – № 6. – P. 824-830.

193. Doronin, A. Online object oriented Monte Carlo computational tool for the needs of biomedical optics [Text] / A. Doronin, I. Meglinski // *Biomedical Optics Express*. – 2011. – Vol. 2. – № 9. – P. 2461-2469.

194. Meglinski, I. Monte Carlo modeling of photon migration for the needs of biomedical optics and biophotonics [Text] / I. Meglinski, A. Doronin // In: *Advanced Biophotonics*. – Taylor & Francis, 2013. – P. 1-72.

195. Meglinski, I.V. Analysis of the spatial distribution of detector sensitivity in a multilayer randomly inhomogeneous medium with strong light scattering and absorption by the Monte Carlo method [Text] / I.V. Meglinski, S.D. Matcher // *Optics and Spectroscopy*. – 2001. – Vol. 91. – № 4. – P. 654-659.

196. Meglinski, I.V. Computer simulation of the skin reflectance spectra [Text] / I.V. Meglinski, S.J. Matcher // *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. – 2003. – Vol. 70. – № 2. – P. 179-186.

197. Doronin, A. Propagation of coherent polarized light in turbid highly scattering medium [Text] / A. Doronin, C. Macdonald, I. Meglinski // *Journal of Biomedical Optics*. – 2014. – Vol. 19. – № 2. – P. 025005.

198. Meglinski, I.V. Quantitative assessment of skin layers absorption and skin reflectance spectra simulation in the visible and near-infrared spectral regions [Text] / I.V. Meglinski, S.J. Matcher // *Physiological Measurement*. – 2002. – Vol. 23. – № 4. – P. 741-753.

199. Churmakov, D.Y. Amending of fluorescence sensor signal localization in human skin by matching of the refractive index [Text] / D.Y. Churmakov, I.V. Meglinski, D.A. Greenhalgh // *Journal of Biomedical Optics*. – 2004. – Vol. 9. – № 2. – P. 339-346.

200. Дрёмин, В.В. Математическое моделирование взаимодействия поляризованного света с биологическими тканями [Текст] / В.В. Дрёмин, Е.В. Жарких // *Фундаментальные и прикладные проблемы техники и технологии*. – 2020. – Т. 340. – № 2. – С. 136-147.

201. Churmakov, D.Y. Analysis of skin tissues spatial fluorescence distribution by the Monte Carlo simulation [Text] / D.Y. Churmakov, I.V. Meglinski, S.A. Piletsky, D.A. Greenhalgh // *Journal of Physics D: Applied Physics*. – 2003. – Vol. 36. – № 14. – P. 1722.

202. 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. 511-523.

203. 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.

204. Yudovsky, D. Simple and accurate expressions for diffuse reflectance of semi-infinite and two-layer absorbing and scattering media [Text] / D. Yudovsky, L. Pilon // *Applied optics*. – 2009. – Vol. 48. – № 35. – P. 6670-6683.

205. Kubelka, P. Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche [Text] / P. Kubelka, F. Munk // *Zeitschrift für Technische Physik*. – 1931. – Vol. 15. – № 12. – P. 593-601.

206. Kokhanovsky, A.A. Physical interpretation and accuracy of the Kubelka–Munk theory [Text] / A.A. Kokhanovsky // *Journal of Physics D: Applied Physics*. – 2007. – Vol. 40. – № 7. – P. 2210.

207. Kienle, A. Noninvasive determination of the optical properties of two-layered turbid media [Text] / A. Kienle, M.S. Patterson, N. Dögnitz, R. Bays, G. Wagnieres, H. van Den Bergh, // *Applied Optics*. – 1998. – Vol. 37. – № 4. – P. 779-791.

208. Liemert, A. Light diffusion in N-layered turbid media: steady-state domain [Text] / A. Liemert, A. Kienle // *Journal of Biomedical Optics*. – 2010. – Vol. 15. – № 2. – P. 025003.

209. Bjorgan, A. Estimation of skin optical parameters for real-time hyperspectral imaging applications [Text] / A. Bjorgan, M. Milanic, L.L. Randeberg // *Journal of Biomedical Optics*. – 2014. – Vol. 19. – № 6. – P. 066003.

210. Venugopalan, V. Radiative transport in the diffusion approximation: An extension for highly absorbing media and small source-detector separations [Text] / V.

Venugopalan, J.S. You, B.J. Tromberg // *Physical Review E*. – 1998. – Vol. 58. – № 2. – P. 2395-2407.

211. Saidi, I.S. Mie and Rayleigh modeling of visible-light scattering in neonatal skin [Text] / I.S. Saidi, S.L. Jacques, F.K. Tittel // *Applied Optics*. – 1995. – Vol. 34. – № 31. – P. 7410-7418.

212. Salomatina, E. Optical properties of normal and cancerous human skin in the visible and near-infrared spectral range [Text] / E. Salomatina, B. Jiang, J. Novak, A.N. Yaroslavsky // *Journal of Biomedical Optics*. – 2006. – Vol. 11. – № 6. – P. 064026.

213. Bashkatov, A.N. Optical properties of skin, subcutaneous, and muscle tissues: A Review [Text] / A.N. Bashkatov, E.A. Genina, V.V. Tuchin // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. – 2011. – Vol. 4. – № 1. – P. 9-38.

214. Tseng, S.-H. *In vivo* determination of skin near-infrared optical properties using diffuse optical spectroscopy [Text] / S.-H. Tseng, A. Grant, A.J. Durkin // *Journal of Biomedical Optics*. – 2008. – Vol. 13. – № 1. – P. 014016.

215. Van Gemert, M.J.C. Skin optics [Text] / M.J.C. Van Gemert, S.L. Jacques, H.J.C.M. Sterenberg, W.M. Star // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. – 1989. – Vol. 36. – № 12. – P. 1146-1154.

216. Bosschaart, N. A literature review and novel theoretical approach on the optical properties of whole blood [Text] / N. Bosschaart, G.J. Edelman, M.C. Aalders, T.G. van Leeuwen, D.J. Faber // *Lasers in Medical Science*. – 2014. – Vol. 29. – № 2. – P. 453-479.

217. Duck, F. Physical properties of tissues: A comprehensive reference book [Text] / F. Duck. – San Diego: Academic Press, 1990. – 346 p.

218. Ding, H. Refractive indices of human skin tissues at eight wavelengths and estimated dispersion relations between 300 and 1600 nm [Text] / H. Ding, J.Q. Lu, W.A. Wooden, P.J. Kragel, X.H. Hu // *Physics in Medicine & Biology*. – 2006. – Vol. 51. – № 6. – P. 1479-1489.

219. Müller, G.J. Laser-induced interstitial thermotherapy [Text] / G.J. Müller, A. Roggan. – SPIE Optical Engineering Press, 1995. – 549 p.

220. Zharebtsov, E. Hyperspectral imaging of human skin aided by artificial neural networks [Text] / E. Zharebtsov, V. Dremin, A. Popov, A. Doronin, D. Kurakina, M. Kirillin, I. Meglinski, A. Bykov // *Biomedical Optics Express*. – 2019. – Vol. 39. – № 1. – P. 3545-3559.

221. Meglinsky, I.V. Modelling the sampling volume for skin blood oxygenation measurements [Text] / I.V. Meglinsky, S.J. Matcher // *Medical and Biological Engineering and Computing*. – 2001. – Vol. 39. – № 1. – P. 44-50.

222. Dremin, V. Skin complications of diabetes mellitus revealed by polarized hyperspectral imaging and machine learning [Text] / V. Dremin, Z. Marcinkevics, E. Zharebtsov, A. Popov, A. Grabovskis, H. Kronberga, K. Geldnere, A. Doronin, I. Meglinski, A. Bykov // *IEEE Transactions on Medical Imaging*. – 2021. – Vol. 40. – № 4. – P. 1207-1216.

223. Fitzpatrick, T.B. Soleil et peau [Text] / T.B. Fitzpatrick // *Journal de Médecine Esthétique*. – 1975. – Vol. 2. – P. 33-34.

224. Gupta, V. Skin typing: Fitzpatrick grading and others [Text] / V. Gupta, V.K. Sharma // *Clinics in Dermatology*. – 2019. – Vol. 37. – № 5. – P. 430-436.

225. Крупаткин, А.И. Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови: руководство для врачей [Текст] / А.И. Крупаткин, В.В. Сидоров. – М.: ОАО «Издательство Медицина», 2005. – 125 с.

226. Ramella-Roman, J.C. Three Monte Carlo programs of polarized light transport into scattering media: part I [Text] / J.C. Ramella-Roman, S.A. Prahl, S.L. Jacques // *Optics Express*. – 2005. – Vol. 13. – № 12. – P. 4420-4438.

227. Ramella-Roman, J.C. Three Monte Carlo programs of polarized light transport into scattering media: part II [Text] / J.C. Ramella-Roman, S.A. Prahl, S.L. Jacques // *Optics Express*. – 2005. – Vol. 13. – № 25. – P. 10392-10405.

228. Sawicki, J. Electric field Monte Carlo simulation of coherent backscattering of polarized light by a turbid medium containing Mie scatterers [Text] / J. Sawicki, N. Kastor, M. Xu // *Optics Express*. – 2008. – Vol. 16. – № 8. – P. 5728-5738.

229. Doronin, A. Two electric field Monte Carlo models of coherent backscattering of polarized light [Text] / A. Doronin, A.J. Radosevich, V. Backman, I.

Meglinski // *Journal of the Optical Society of America A*. – 2014. – Vol. 31. – № 11. – P. 2394-2400.

230. Côté, D. Robust concentration determination of optically active molecules in turbid media with validated three-dimensional polarization sensitive Monte Carlo calculations [Text] / D. Côté, I.A. Vitkin // *Optics Express*. – 2005. – Vol. 13. – № 1. – P. 148-163.

231. Kattawar, G.W. Degree and direction of polarization of multiple scattered light 1: Homogeneous cloud layers [Text] / G.W. Kattawar, G.N. Plass // *Applied Optics*. – 1972. – Vol. 11. – № 12. – P. 2851-2865.

232. Kattawar, G.W. Radiance and polarization of multiple scattered light from haze and clouds [Text] / G.W. Kattawar, G.N. Plass // *Applied Optics*. – 1968. – Vol. 7. – № 8. – P. 1519-1527.

233. Kattawar, G.W. Stokes vector calculations of the submarine light field in an atmosphere–ocean with scattering according to a Rayleigh phase matrix: Effect of interface refractive index on radiance and polarization [Text] / G.W. Kattawar, C.N. Adams // *Limnology and Oceanography*. – 1989. – Vol. 34. – № 28. – P. 1453-1472.

234. Brusaglioni, P. Transmission of a pulsed polarized light beam through thick turbid media: numerical results [Text] / P. Brusaglioni, G. Zaccanti, Q. Wei // *Applied Optics*. – 1993. – Vol. 32. – № 30. – P. 6142-6150.

235. Bianchi, S. Monte Carlo simulations of dusty spiral galaxies: Extinction and Polarization Properties [Text] / S. Bianchi, A. Ferrara, C. Giovanardi // *Astrophysical Journal*. – 1996. – Vol. 425. – P. 127.

236. Ambirajan, A. A backward Monte Carlo study of the multiple scattering of a polarized laser beam [Text] / A. Ambirajan, D.C. Look // *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*. – 1997. – Vol. 58. – № 2. – P. 171-192.

237. Martinez, A.S. Faraday effect and multiple scattering of light [Text] / A.S. Martinez, R. Maynard // *Physical Review B*. – 1994. – Vol. 50. – № 6. – P. 3714.

238. Bartel, S. Monte Carlo simulations of the diffuse backscattering Mueller matrix for highly scattering media [Text] / S. Bartel, A.H. Hielscher // *Applied Optics*. – 2000. – Vol. 39. – № 10. – P. 1580-1588.

239. Raković, M.J. Light backscattering polarization patterns from turbid media: theory and experiment [Text] / M.J. Raković, G.W. Kattawar, M. Mehrúbeoğlu, B.D. Cameron, L.V. Wang, S. Rastegar, G.L. Coté // *Applied Optics*. – 1999. – Vol. 38. – № 15. – P. 3399-3408.
240. Otsuki, S. Multiple scattering of polarized light in turbid infinite planes: Monte Carlo simulations [Text] / S. Otsuki // *Journal of the Optical Society of America A*. – 2016. – Vol. 33. – № 5. – P. 988-996.
241. Tynes, H.H. Monte Carlo and multicomponent approximation methods for vector radiative transfer by use of effective Mueller matrix calculations [Text] / H.H. Tynes, G.W. Kattawar, E.P. Zege, I.L. Katsev, A.S. Prikhach, L.I. Chaikovskaya // *Applied Optics*. – 2001. – Vol. 40. – № 3. – P. 400-412.
242. Kaplan, B. Mueller matrix of dense polystyrene latex sphere suspensions: measurements and Monte Carlo simulation [Text] / B. Kaplan, G. Ledanois, B. Drévillon // *Applied Optics*. – 2001. – Vol. 40. – № 16. – P. 2769-2777.
243. Xu, M. Electric field Monte Carlo simulation of polarized light propagation in turbid media [Text] / M. Xu // *Optics Express*. – 2004. – Vol. 12. – № 26. – P. 6530-6539.
244. Dremin, V. Incremental residual polarization caused by aging in human skin [Text] / V., Dremin, E. Zharkikh, I. Lopushenko, Z. Marcinkevics, A. Bykov, I. Meglinski // *Journal of Biomedical Optics*. – 2023. – Vol. 29. – № 5. – P. 052912.
245. Tuchin, V.V. Decay of light polarization in random multiple scattering media [Text] / V.V. Tuchin, L.V. Wang, D.A. Zimnyakov. – Berlin, Heidelberg: Springer, 2006. – P. 111-138.
246. Fejfarová, V. The relationship between chronic venous insufficiency and diabetes mellitus [Text] / V. Fejfarová, K. Roztočil, A. Svědínková, H. Čermáková, M. Dubský, R. Bém, A. Jirkovská, V. Wosková, A. Němcová, J. Skibová // *International Angiology*. – 2017. – Vol. 36. – № 1. – P. 90-91.
247. Xi, L. Role of Tissue and systemic hypoxia in obesity and type 2 diabetes [Text] / L. Xi, C.-M. Chow, X. Kong // *Journal of Diabetes Research*. – 2016. – Vol. 2016. – № 1. – P. 1527852.

248. Ditzel, J. The problem of tissue oxygenation in diabetes mellitus [Text] / J. Ditzel, E. Standl // *Acta Medica Scandinavica. Supplementum.* – 1975. – Vol. 578. – P. 49-58.
249. Greenman, R.L. Early changes in the skin microcirculation and muscle metabolism of the diabetic foot [Text] / R.L. Greenman, S. Panasyuk, X. Wang, T.E. Lyons, T. Dinh, L. Longoria, J.M. Giurini, J. Freeman, L. Khaodhiar, A. Veves // *The Lancet.* – 2005. – Vol. 366. – № 9498. – P. 1711-1717.
250. Nyengaard, J.R. Interactions between hyperglycemia and hypoxia: Implications for diabetic retinopathy [Text] / J.R. Nyengaard, Y. Ido, C. Kilo, J.R. Williamson // *Diabetes.* – 2004. – Vol. 53. – № 11. – P. 2931-2938.
251. Sada, K. Hyperglycemia induces cellular hypoxia through production of mitochondrial ROS followed by suppression of aquaporin-1 [Text] / K. Sada, T. Nishikawa, D. Kukidome, T. Yoshinaga, N. Kajihara, K. Sonoda, T. Senokuchi, H. Motoshima, T. Matsumura, E. Araki // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11. – № 7. – e0158619.
252. Tuchin, V.V. Optical polarization in biomedical applications [Text] / V.V. Tuchin, L.V. Wang, D.A. Zimnyakov. – Berlin, Heidelberg: Springer, 2006. – 281 p.
253. Fisher, R.A. The use of multiple measurements in taxonomic problems [Text] / R.A. Fisher // *Annals of Eugenics.* – 1936. – Vol. 7. – № 2. – P. 179-188.
254. Hastie, T. *The Elements of Statistical Learning* [Text] / T. Hastie, R. Tibshirani, J. Friedman. – New York: Springer, 2009. – 745 p.
255. Айвазян, С.А. Прикладная статистика: классификация и снижение размерности [Текст] / С.А. Айвазян, В.М. Бухштабер, И.С. Енюков, Л.Д. Мешалкин, – Москва: Финансы и статистика, 1989. – 608 с.
256. 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.
257. Dremin, V.V. Hyperspectral imaging of diabetes mellitus skin complications [Text] / V.V. Dremin, E.A. Zhrebtsov, A.P. Popov, I.V. Meglinski, A.V. Bykov // *Biomedical Photonics for Diabetes Research.* – Boca Raton: CRC Press, 2022. – P. 177-195.

258. Dremin, V. Assessment of age-related skin changes using hyperspectral polarization imaging [Text] / V. Dremin, A. Bykov, Z. Marcinkevics, A. Grabovskis, E. Zhrebtsov, A. Popov, I. Meglinski // Proceedings of SPIE. – 2019. – Vol. 11079. – P. 110790G.

259. Boscolo, E. Vasculogenesis in infantile hemangioma [Text] / E. Boscolo, J. Bischoff // Angiogenesis. – 2009. – Vol. 12. – № 2. – P. 197-207.

260. Kilcline, C. Infantile hemangiomas: How common are they? A systematic review of the medical literature [Text] / C. Kilcline, I.J. Frieden // Pediatric Dermatology. – 2008. – Vol. 25. – № 2. – P. 168-173.

261. Baselga Torres, E. Spanish consensus on infantile haemangioma [Text] / E. Baselga Torres, J. Bernabéu Wittel, D.L. van Esso Arbolave, M.I. Febrer Bosch, Á. Carrasco Sanz, R. de Lucas Laguna, J. Del Pozo Losada, Á. Hernández Martín, L. Jiménez Montañés, J.C. López Gutiérrez, A. Martín-Santiago, P. Redondo Bellón, J. Ruíz-Canela Cáceres, A. Torrelo Fernández, Á. Vera Casaño, M.A. Vicente Villa, // Anales de Pediatría (English Edition). – 2016. – Vol. 85. – № 5. – P. 256-265.

262. Akons, K. Measuring blood oxygen saturation along a capillary vessel in human [Text] / K. Akons, E.J. Dann, D. Yelin // Biomedical Optics Express. – 2017. – Vol. 8. – № 11. – P. 5342-5352.

263. Chaturvedi, A. Ultrasound with Doppler evaluation of congenital hepatic vascular shunts [Text] / A. Chaturvedi, N.B. Klionsky, D. Saul // Pediatric Radiology. – 2018. – Vol. 48. – № 11. – P. 1658-1673.

264. Адаменков, Н.А. Интраоперационная оценка жизнеспособности кишечной стенки [Текст] / Н.А. Адаменков, А.В. Мамошин, В.В. Дрёмин, Е.В. Потапова, В.В. Шуплецов, Ю.В. Иванов, Д.Н. Панченков, А.В. Дунаев // Клиническая практика. – 2024. – Т. 15. – № 4. – С. 46-58.

265. Adamenkov, N.A. Assessment of intestinal wall perfusion under ischemic conditions using hyperspectral imaging [Text] / N.A. Adamenkov, A.V. Mamoshin, V.V. Dremin, E.V. Potapova, V.V. Shupletsov, I.A. Goryunov, A.A. Palalov, A.V. Dunaev // Russian Journal of Operative Surgery and Clinical Anatomy. – 2024. – Vol. 8. – № 1. – P. 5-13.

266. Spott, T. Application of optical diffusion theory to transcutaneous bilirubinometry [Text] / T. Spott, L.O. Svaasand, R.E. Anderson, P.F. Schmedling // Proceedings of SPIE. – 1998. – Vol. 3195. – P. 234-245.

267. Randeberg, L.L. A novel approach to age determination of traumatic injuries by reflectance spectroscopy [Text] / L.L. Randeberg, O.A. Haugen, R. Haaverstad, L.O. Svaasand // Lasers in Surgery and Medicine. – 2006. – Vol. 38. – № 4. – P. 277-289.

268. Randeberg, L.L. *In vivo* spectroscopy of jaundiced newborn skin reveals more than a bilirubin index [Text] / L.L. Randeberg, E.B. Roll, L.T. Nilsen, T. Christensen, L.O. Svaasand // Acta Paediatrica. – 2005. – Vol. 94. – № 1. – P. 65-71.

269. Abramov, A.Y. Targeted polyphosphatase expression alters mitochondrial metabolism and inhibits calcium-dependent cell death [Text] / A.Y. Abramov, C. Fraley, C.T. Diao, R. Winkfein, M.A. Colicos, M.R. Duchon, R.J. French, E. Pavlov // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2007. – Vol. 104. – № 46. – P. 18091-18096.

270. Holmström, K.M. Signalling properties of inorganic polyphosphate in the mammalian brain [Text] / K.M. Holmström, N. Marina, A.Y. Baev, N.W. Wood, A.V. Gourine, A.Y. Abramov, // Nature Communications. – 2013. – Vol. 4. – P. 1-8.

271. Angelova, P.R. Role of inorganic polyphosphate in mammalian cells: From signal transduction and mitochondrial metabolism to cell death [Text] / P.R. Angelova, A.Y. Baev, A.V. Berezhnov, A.Y. Abramov // Biochemical Society Transactions. – 2016. – Vol. 44. – № 1. – P. 40-45.

272. Baev, A.Y. Inorganic Polyphosphate and F₀ F₁-ATP synthase of mammalian mitochondria [Text] / A.Y. Baev, A.Y. Abramov // Progress in Molecular and Subcellular Biology. – 2022. – Vol. 61. – P. 1-13.

273. Rustamov, K.R. The molecular mechanism of P2Y₁ receptor activation by inorganic polyphosphates [Text] / K.R. Rustamov, A.R. Makhmudov, F.R. Ikromova, E.A. Vetrova, A.Y. Vinokurov, J.I. Razzokov, A.Y. Abramov, A.Y. Baev // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2025. – Vol. 772. – P. 110555.

274. He, C. Polarisation optics for biomedical and clinical applications: a review [Text] / C. He, H. He, J. Chang, B. Chen, H. Ma, M.J. Booth, // *Light: Science and Applications*. – 2021. – Vol. 10. – № 1. – P. 194.

275. Novikova, T. Polarimetric imaging for cancer diagnosis and staging [Text] / T. Novikova, A. Pierangelo, A. De Martino, A. Benali, P. Validire // *Optics and Photonics News*. – 2012. – Vol. 23. – № 10. – P. 26-33.

276. Borovkova, M. Evaluating β -amyloidosis progression in Alzheimer's disease with Mueller polarimetry [Text] / M. Borovkova, A. Bykov, A. Popov, A. Pierangelo, T. Novikova, J. Pahnke, I. Meglinski // *Biomedical Optics Express*. – 2020. – Vol. 11. – № 8. – P. 4509-4519.

277. Borovkova, M. Screening of Alzheimer's disease with multiwavelength Stokes polarimetry in a mouse model [Text] / M. Borovkova, O. Sieryi, I. Lopushenko, N. Kartashkina, J. Pahnke, A. Bykov, I. Meglinski // *IEEE Transactions on Medical Imaging*. – 2022. – Vol. 41. – № 4. – P. 977-982.

278. Ross, M.H. Histology: A text and atlas with correlated cell and molecular biology [Text] / M.H. Ross, W. Pawlina. – 7th ed. – Philadelphia: Wolters Kluwer, 2016. – 984 p.

279. Young, B. Wheater's functional histology: A text and colour atlas [Text] / B. Young, G. O'Dowd, P. Woodford. – Chicago: Churchill Livingstone Print, 2013. – P. 299-301.

280. Born, M. Principles of optics: Electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light [Text] / M. Born, E. Wolf. – 7th (expanded) ed. – Cambridge: Cambridge University Press, 1999. – 952 p.

281. Goldstein, D.H. Polarized light [Text] / D.H. Goldstein. – 3rd ed. – Boca Raton: CRC Press, 2011. – 808 p.

282. Kunnen, B. Application of circularly polarized light for non-invasive diagnosis of cancerous tissues and turbid tissue-like scattering media [Text] / B. Kunnen, C. Macdonald, A. Doronin, S. Jacques, M. Eccles, I. Meglinski // *Journal of Biophotonics*. – 2015. – Vol. 8. – № 4. – P. 317-323.

283. Macdonald, C. Backscattering of circular polarized light from a disperse random medium influenced by optical clearing [Text] / C. Macdonald, I. Meglinski // *Laser Physics Letters*. – 2011. – Vol. 8. – № 4. – P. 324.

284. Dremin, V. Imaging of early stage breast cancer with circularly polarized light [Text] / V. Dremin, D. Anin, O. Sieryi, M. Borovkova, J. Näpänkangas, I. Meglinski, A. Bykov // *Proceedings of SPIE*. – 2020. – Vol. 11363. – P. 1136304.

285. Dremin, V. Histological imaging of unstained cancer tissue samples by circularly polarized light [Text] / V. Dremin, V. Dremin, O. Sieryi, M. Borovkova, J. Näpänkangas, I. Meglinski, A. Bykov // *Proceedings of SPIE*. – 2021. – Vol. 11919. – P. 119190F.

286. International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory: Cancer Today [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://gco.iarc.fr/today/en> (дата обращения: 02.06.2025).

287. van der Laan, J.D. Evolution of circular and linear polarization in scattering environments [Text] / J.D. van der Laan, J.B. Wright, D.A. Scrymgeour, S.A. Kemme, E.L. Dereniak // *Optics Express*. – 2015. – Vol. 23. – № 25. – P. 31874.

288. Lee, H.R. Digital histology with Mueller microscopy: how to mitigate an impact of tissue cut thickness fluctuations [Text] / H.R. Lee, P. Li, T.S.H. Yoo, C. Lotz, F.K. Groeber-Becker, S. Dembski, E. Garcia-Caurel, R. Ossikovski, H. Ma, T. Novikova // *Journal of Biomedical Optics*. – 2019. – Vol. 24. – № 7. – P. 076004.

289. Suryadevara, V. Infrared spectral microscopy as a tool to monitor lung fibrosis development in a model system [Text] / V. Suryadevara, S.S. Nazeer, H. Sreedhar, O. Adelaja, A. Kajdacsy-Balla, V. Natarajan, M.J. Walsh // *Biomedical Optics Express*. – 2020. – Vol. 11. – № 7. – P. 3996-4007.

290. Cheng, Y. K-Means Clustering algorithm-based functional magnetic resonance for evaluation of regular hemodialysis on brain function of patients with end-stage renal disease [Text] / Y. Cheng, Y. Yu // *Computational and Mathematical Methods in Medicine*. – 2022. – Vol. 2022. – № 1. – P. 1181030.

291. Srinivasan, A. Utility of the k-means clustering algorithm in differentiating apparent diffusion coefficient values of benign and malignant neck pathologies [Text] /

A. Srinivasan, C.J. Galbán, T.D. Johnson, T.L. Chenevert, B.D. Ross, S.K. Mukherji // American Journal of Neuroradiology. – 2010. – Vol. 31. – № 4. – P. 736-740.

292. MacQueen, J. Some methods for classification and analysis of multivariate observations [Text] / J. MacQueen // Proceedings of the Fifth Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability. – 1967. – P. 281-297.

293. Xu, M. Circular polarization memory of light [Text] / M. Xu, R.R. Alfano // Physical Review Letters. – 2005. – Vol. 72. – № 6. – P. 065601.

294. MacKintosh, F.C. Polarization memory of multiply scattered light [Text] / F.C. MacKintosh, J.X. Zhu, D.J. Pine, D.A. Weitz // Physical Review Letters. – 1989. – Vol. 40. – № 13. – P. 9342-9345.

295. Kuzmin, V.L. Anomalous polarization effects during light scattering in random media [Text] / V.L. Kuzmin, I.V. Meglinskiĭ // Physical Review Letters. – 2010. – Vol. 110. – № 5. – P. 742-753.

296. Kuzmin, V. Helicity flip of the backscattered circular polarized light [Text] / V. Kuzmin, I. Meglinski // Proceedings of SPIE. – 2010. – Vol. 7573. – P. 75730Z.

297. Wang, W. Roles of linear and circular polarization properties and effect of wavelength choice on differentiation between *ex vivo* normal and cancerous gastric samples [Text] / W. Wang, L.G. Lim, S. Srivastava, J.S. Yan, A. Shabbir, Q. Liu // Journal of Biomedical Optics. – 2014. – Vol. 19. – № 4. – P. 046020.

298. Macdonald, C. Diffusing-wave polarimetry for tissue diagnostics [Text] / C. Macdonald, A. Doronin, A.F. Peña, M. Eccles, I. Meglinski // Proceedings of SPIE. – 2014. – Vol. 8940. – P. 894007.

299. Ivanov, D. Colon cancer detection by using Poincaré sphere and 2D polarimetric mapping of *ex vivo* colon samples [Text] / D. Ivanov, V. Dremin, A. Bykov, E. Borisova, T. Genova, A. Popov, R. Ossikovski, T. Novikova, I. Meglinski // Journal of Biophotonics. – 2020. – Vol. 13. – № 8. – P. e202000082.

300. Sridhar, S. Enhanced contrast and depth resolution in polarization imaging using elliptically polarized light [Text] / S. Sridhar, A. Da Silva // Journal of Biomedical Optics. – 2016. – Vol. 21. – № 7. – P. 071107.

301. Wang, J. Integrated Mueller-matrix near-infrared imaging and point-wise spectroscopy improves colonic cancer detection [Text] / J. Wang, W. Zheng, K. Lin, Z. Huang // *Biomedical Optics Express*. – 2016. – Vol. 7. – № 4. – P. 1116-1126.
302. Zaffar, M. Mapping of retardance, diattenuation and polarizance vector on Poincaré sphere for diagnosis and classification of cervical precancer [Text] / M. Zaffar, A. Pradhan // *Journal of Biophotonics*. – 2020. – Vol. 13. – № 4. – P. e201960139.
303. Gil Pérez, J.J. Polarized light and the Mueller matrix approach [Text] / J.J. Gil Pérez, R. Ossikovski. – CRC Press, 2016. – 375 p.
304. Van Eeckhout, A. Synthesis and characterization of depolarizing samples based on the indices of polarimetric purity [Text] / A. Van Eeckhout, E. Garcia-Caurel, R. Ossikovski, J.J. Gil // *Optics Letters*. – 2017. – Vol. 42. – № 20. – P. 4155-4158.
305. Van Eeckhout, A. Depolarization metric spaces for biological tissues classification [Text] / A. Van Eeckhout, E. Garcia-Caurel, R. Ossikovski, A. Lizana, C. Rodriguez, E. Gonzalez-Anay, J. Campos // *Journal of Biophotonics*. – 2020. – Vol. 13. – № 8. – P. e202000083.
306. Ossikovski, R. Eigenvalue-based depolarization metric spaces for Mueller matrices [Text] / R. Ossikovski, J. Vizet // *Journal of the Optical Society of America A*. – 2019. – Vol. 36. – № 7. – P. 1173-1186.
307. Rodríguez, C. Indices of polarimetric purity: application in biological tissues [Text] / C. Rodríguez, A.V. Eechout, E. Garcia-Caurel, J.J. Gil, E. Gonzales-arnay, J.C. Esalera, I. Moreno, J. Campos, A. Lizana, T. Garnatje, J. Vidal // *Proceedings of SPIE*. – 2021. – Vol. 11646. – P. 116460P.
308. Van Eeckhout, A. Retrieving physical information of depolarizing systems [Text] / A. Van Eeckhout, E. Garcia-Caurel, T. Garnatje, J.C. Esalera, M.M. Durfort, J. Vidal, J.J. Gil, J. Garcia-Romero, R. Ossikovski, I. Moreno, J. Campos, A. Lizana // *Proceedings of SPIE*. – 2021. – Vol. 11646. – P. 116460K.
309. Gil, J.J. Depolarization and polarization indices of an optical system [Text] / J.J. Gil, E. Bernabeu // *Optica Acta: International Journal of Optics*. – 1986. – Vol. 33. – № 2. – P. 185-189.

310. Ivanov, D. Polarization and depolarization metrics as optical markers in support to histopathology of *ex vivo* colon tissue [Text] / D. Ivanov, V. Dremin, E. Borisova, T. Novikova, A. Bykov, I. Meglinski, R. Ossikovski // *Biomedical Optics Express*. – 2021. – Vol. 12. – № 7. – P. 4560-4572.

311. Ivanov, D. Polarization-based histopathology classification of *ex vivo* colon samples supported by machine learning [Text] / D D. Ivanov, V. Dremin, T. Genova, A. Bykov, T. Novikova, R. Ossikovski, I. Meglinski // *Frontiers in Physics*. – 2021. – Vol. 9. – P. 814787.

312. Valeur, B. *Molecular fluorescence: Principles and applications* [Text] / B. Valeur. – Weinheim; New York: Wiley-VCH, 2001. – 569 p.

313. Turro, N.J. *Modern molecular photochemistry* [Text] / N.J. Turro. – Sausalito, CA: University Science Books, 1991. – 628 p.

314. Lakowicz, J.R. *Principles of fluorescence spectroscopy* [Text] / J.R. Lakowicz. – New York: Springer, 2006. – 954 p.

315. Demas, J.N. *Excited state lifetime measurements* [Text] / J.N. Demas. – New York: Academic Press, 1983. – 273 p.

316. Clegg, R.M. The history of FRET theory [Text] / R.M. Clegg // *In: Reviews in Fluorescence 2006*. – Springer, 2006. – P. 1-45.

317. 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. 1369-1377.

318. 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.

319. Richards-Kortum, R. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis [Text] / R. Richards-Kortum, E. Sevick-Muraca // *Annual Review of Physical Chemistry*. – 1996. – Vol. 47. – P. 555-606.

320. Tuchin, V.V. *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics. Vol. 1: Light-Tissue Interaction* [Text] / V.V. Tuchin. – Bellingham, WA: SPIE Press, 2016. – 928 p.

321. Sepehr, R. Optical studies of tissue mitochondrial redox in isolated perfused rat lungs [Text] / R. Sepehr, K. Staniszewski, E. R. Jacobs, S. H. Audi, M. Ranji // Proceedings of SPIE. – 2012. – Vol. 8207. – P. 82073Q.

322. Liu, Q. Compact point-detection fluorescence spectroscopy system for quantifying intrinsic fluorescence redox ratio in brain cancer diagnostics [Text] / Q. Liu, Li. J. G. Grant, Y. Zhang, F. Hu, S. Li, C. Wilson, K. Chen, D. Bigner, T. Vo-Dinh // Journal of Biomedical Optics. – 2011. – Vol. 16. – № 3. – P. 037004.

323. Жеребцов, Е.А. Флуоресцентная диагностика митохондриальной функции в эпителиальных тканях *in vivo*: монография [Текст] / Е.А. Жеребцов, В.В. Дрёмин, А.И. Жеребцова, Е.В. Потапова, А.В. Дунаев. – Орёл: ФГБОУ ВО «ОГУ имени И. С. Тургенева», 2018. – 107 с.

324. 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.

325. Koenig, K. High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution [Text] / K. Koenig, I. Riemann // Journal of Biomedical Optics. – 2003. – Vol. 8. – № 3. – P. 432-439.

326. 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. Schlüsche, K.-H. Gericke // ChemPhysChem. – 2004. – Vol. 5. – № 8. – P. 1141-1149.

327. Cheng, Y. Spectrally and time-resolved study of NAD(P)H autofluorescence in cardiac myocytes from human biopsies [Text] / Y. Cheng, D. Chorvat Jr., N. Poirier, J. Miró, N. Dahdah, A. Chorvatova // Proceedings of SPIE. – 2007. – Vol. 6771. – P. 677104.

328. 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.

329. 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.

330. 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.

331. 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.

332. 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 USA*. – 2007. – Vol. 104. – № 49. – P. 19494-19499.

333. 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, J.G. White, N. Ramanujam // *Journal of Biomedical Optics*. – 2007. – Vol. 12. – № 2. – P. 024014.

334. 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.

335. 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.A. Herman // *Journal of Biomedical Optics*. – 2005. – Vol. 10. – № 5. – P. 051407.

336. 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.

337. 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*. – 2006. – Vol. 36. – № 1. – P. 73-83.

338. Provenzano, P.P. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression [Text] / P.P. Provenzano, D.R. Inman, K.W. Eliceiri, J.G. Knitte, L. Yan, C.T. Rueden, J.G. White, P.J. Keely // *BMC Medicine*. – 2008. – Vol. 6. – P. 11.

339. 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 // *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. – 2008. – Vol. 246. – № 7. – P. 979-988.

340. 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.

341. 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.

342. 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.

343. Glanzmann, T.M. Tissue characterization by time-resolved fluorescence spectroscopy of endogenous and exogenous fluorochromes: apparatus design and preliminary results [Text] / T.M. Glanzmann, J.P. Ballini, P. Jichlinski, H. van den Bergh, G.A. Wagnieres // *Proceedings of SPIE*. – 1996. – Vol. 2926. – P. 41-50.

344. Kress, M. Time-resolved microspectrofluorometry and fluorescence lifetime imaging of photosensitizers using picosecond pulsed diode lasers in laser scanning

microscopes [Text] / M. Kress, H. Schneckenburger, T. Meier, R. Steiner, F. Dolp, R. Erdmann, U. Ortmann, A. Rück // *Journal of Biomedical Optics*. – 2003. – Vol. 8. – № 1. – P. 26-32.

345. Potapova, E.V. Evaluation of microcirculatory disturbances in patients with rheumatic diseases by the method of diffuse reflectance spectroscopy [Text] / E.V. Potapova, V.V. Dremin, E.A. Zherebtsov, I.N. Makovik, A.I. Zherebtsova, A.V. Dunaev, K.V. Podmasteryev, V.V. Sidorov, A.I. Krupatkin, L.S. Khakhicheva, V.F. Muradyan // *Human Physiology*. – 2017. – Vol. 43. – № 2. – P. 222-228.

346. 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.

347. Wengrowski, A.M. NADH changes during hypoxia, ischemia, and increased work differ between isolated heart preparations [Text] / A.M. Wengrowski, S. Kuzmiak-Glancy, R. Jaimes III, M.W. Kay // *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 2014. – Vol. 306. – № 4. – P. H529-H537.

348. Dremin, V.V. Assessment of tissue ischemia of nail fold precapillary zones using a fluorescence capillaroscopy [Text] / V.V. Dremin, N.B. Margaryants, M.V. Volkov, E.V. Zhukova, E.A. Zherebtsov, A.V. Dunaev, E.U. Rafailov // *Proceedings of SPIE*. – 2017. – Vol. 10412. – P. 104120W.

349. Koenig, K., Schneckenburger, H. Laser-induced autofluorescence for medical diagnosis [Text] / K. Koenig, H. Schneckenburger // *Journal of Fluorescence*. – 1994. – Vol. 4. – № 1. – P. 17-40.

350. Currie, E. Cellular fatty acid metabolism and cancer [Text] / E. Currie, A. Schulze, R. Zechner, T.C. Walther, R.V. Farese Jr. // *Cell Metabolism*. – 2013. – Vol. 18. – № 2. – P. 153-161.

351. Georgakoudi, I. Optical imaging using endogenous contrast to assess metabolic state [Text] / I. Georgakoudi, K.P. Quinn // *Annual Review of Biomedical Engineering*. – 2012. – Vol. 14. – P. 351-367.

352. Chang, S.K. Model-based analysis of clinical fluorescence spectroscopy for *in vivo* detection of cervical intraepithelial dysplasia [Text] / S.K. Chang, N. Marín, M. Follen, R.R. Richards-Kortum // *Journal of Biomedical Optics*. – 2006. – Vol. 11. – № 2. – P. 024008.

353. 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.

354. Croce, A.C. Naturally-occurring porphyrins in a spontaneous-tumour bearing mouse model [Text] / A.C. Croce, G. Santamaria, U. De Simone, F. Lucchini, I. Freitas, G. Bottiroli // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2011. – Vol. 10. – № 7. – P. 1189-1195.

355. Moesta, K.T. Protoporphyrin IX occurs naturally in colorectal cancers and their metastases [Text] / K.T. Moesta, B. Ebert, T. Handke, D. Nolte, C. Nowak, W.E. Haensch, R.K. Pandey, T.J. Dougherty, H. Rinneberg, P.M. Schlag // *Cancer Research*. – 2001. – Vol. 61. – № 3. – P. 991-999.

356. Lualdi, M. Early detection of colorectal adenocarcinoma: a clinical decision support tool based on plasma porphyrin accumulation and risk factors [Text] / M. Lualdi, A. Cavalleri, L. Battaglia, A. Colombo, G. Garrone, D. Morelli, E. Pignoli, E. Sottotetti, E. Leo // *BMC Cancer*. – 2018. – Vol. 18. – № 1. – P. 841.

357. Kemmner, W. Silencing of human ferrochelatase causes abundant protoporphyrin-IX accumulation in colon cancer [Text] / W. Kemmner, K. Wan, S. Rüttinger, B. Ebert, R. Macdonald, U. Klamm, K.T. Moesta // *The FASEB Journal*. – 2008. – Vol. 22. – № 2. – P. 500-509.

358. Sachar, M. Protoporphyrin IX: the Good, the Bad, and the Ugly [Text] / M. Sachar, K.E. Anderson, X. Ma // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2016. – Vol. 356. – № 2. – P. 267-275.

359. Warburg, O. Über den Stoffwechsel von Tumoren im Körper [Text] / O. Warburg, F. Wind, E. Negelein // Klinische Wochenschrift. – 1926. – Vol. 5. – № 19. – P. 829-832.

360. Cairns, R.A. Regulation of cancer cell metabolism [Text] / R.A. Cairns, I.S. Harris, T.W. Mak // Nature Reviews Cancer. – 2011. – Vol. 11. – № 2. – P. 85-95.

361. Woitek, R. The use of hyperpolarised ^{13}C -MRI in clinical body imaging to probe cancer metabolism [Text] / R. Woitek, F.A. Gallagher // British Journal of Cancer. – 2021. – Vol. 124. – № 7. – P. 1187-1198.

362. Gupta, S. Metabolic cooperation and competition in the tumor microenvironment: Implications for therapy [Text] / S. Gupta, A. Roy, B.S. Dwarakanath // Frontiers in Oncology. – 2017. – Vol. 7. – P. 90.

363. Blacker, T.S. Separating NADH and NADPH fluorescence in live cells and tissues using FLIM [Text] / T.S. Blacker, Z.F. Mann, J.E. Gale, M. Ziegler, A.J. Bain, G. Szabadkai, M.R. Duchon // Nature Communications. – 2014. – Vol. 5. – № 1. – P. 3936.

364. Blacker, T.S. Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence [Text] / T.S. Blacker, M.R. Duchon // Free Radical Biology and Medicine. – 2016. – Vol. 100. – P. 53-65.

365. Potapova, E.V. Detection of NADH and NADPH levels *in vivo* identifies shift of glucose metabolism in cancer to energy production [Text] / E.V. Potapova, E.A. Zhrebtsov, V.V. Shupletsov, V.V. Dremin, K.Y. Kandurova, A.V. Mamoshin, A.Y. Abramov, A.V. Dunaev // The FEBS Journal. – 2024. – Vol. 291. – № 12. – P. 2674-2682.

366. Suzuki, M. Glutathione reductase activity and flavin concentration in guinea-pig tissues [Text] / M. Suzuki, H. Muraoka, M. Kurata, N.S. Agar // Experimental Animals. – 1999. – Vol. 48. – № 3. – P. 199-202.

367. Xu, H.N. Quantitative redox imaging biomarkers for studying tissue metabolic state and its heterogeneity [Text] / H.N. Xu, L.Z. Li // Journal of Innovative Optical Health Sciences. – 2013. – Vol. 7. – № 2. – P. 1430002.

368. Gallucci, F. Indications and results of videocapillaroscopy in clinical practice [Text] / F. Gallucci, C. Russo, A. Buono, P. Acampora, M. Madrid, A. Uomo // *Advances in Medical Sciences*. – 2008. – Vol. 53. – № 2. – P. 149-157.

369. Dremin, V.V. Dynamic evaluation of blood flow microcirculation by combined use of the laser Doppler flowmetry and high-speed videocapillaroscopy methods [Text] / V.V. Dremin, I.O. Kozlov, M.V. Volkov, N.B. Margaryants, A.V. Potemkin, E.A. Zherebtsov, A.V. Dunaev, I.P. Gurov // *Journal of Biophotonics*. – 2019. – Vol. 12. – № 6. – P. e 201800317.

370. Cheung, A.T.W. Microvascular abnormalities in the bulbar conjunctiva of contact lens users [Text] / A.T.W. Cheung, B.S. Hu, S.A. Wong, J. Chow, M.S. Chan, W.J. To, J. Li, S. Ramanujam, P.C.Y. Chen // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. – 2012. – Vol. 51. – № 1. – P. 77-86.

371. Cinotti, E. Quantification of capillary blood cell flow using reflectance confocal microscopy [Text] / E. Cinotti, L. Gergelé, J.L. Perrot, A. Dominé, B. Labeille, P. Borelli, F. Cambazard // *Skin Research and Technology*. – 2014. – Vol. 20. – № 3. – P. 373-378.

372. Ihler, F. Two-photon microscopy allows imaging and characterization of cochlear microvasculature *in vivo* [Text] / F. Ihler, M. Bertlich, B. Weiss, S. Dietzel, M. Canis // *BioMed Research International*. – 2015. – Vol. 2015. – № 1. – P. 154272.

373. Huang, J.Y. *In vivo* two-photon fluorescence microscopy reveals disturbed cerebral capillary blood flow and increased susceptibility to ischemic insults in diabetic mice [Text] / J.Y. Huang, L.T. Li, H. Wang, S.S. Liu, Y.M. Lu, M.H. Liao, R.R. Tao, L.J. Hong, K. Fukunaga, Z. Chen, C.S. Wilcox, E.Y. Lai, F. Han // *CNS Neuroscience & Therapeutics*. – 2014. – Vol. 20. – № 9. – P. 816–822.

374. Černý, V. Orthogonal polarization spectral imaging [Text] / V. Černý, Z. Turek, R. Pařízková // *Physiological Research*. – 2007. – Vol. 56. – № 2. – P. 141-147.

375. van Zijderveld, R. Orthogonal polarization spectral imaging of conjunctival microcirculation [Text] / R. van Zijderveld, C. Ince, R.O. Schlingemann // *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. – 2014. – Vol. 252. – № 5. – P. 773-779.

376. Goedhart, P.T. Sidestream Dark Field (SDF) imaging: A novel stroboscopic LED ring-based imaging modality for clinical assessment of the microcirculation [Text] / P.T. Goedhart, M. Khalilzada, R. Bezemer, J. Merza, C. Ince // *Optics Express*. – 2007. – Vol. 15. – № 23. – P. 15101-15114.

377. Sha, M. Sidestream Dark Field (SDF) imaging of oral microcirculation in the assessment of systemic sclerosis [Text] / M. Sha, M. Griffin, C.P. Denton, P.E. Butler // *Microvascular Research*. – 2019. – Vol. 126. – P. 103890.

378. Gao, W. Quantitative depth-resolved microcirculation imaging with optical coherence tomography angiography (Part I): blood flow velocity imaging [Text] / W. Gao // *Microcirculation*. – 2018. – Vol. 25. – № 6. – P. e12375.

379. Kirillin, M. Optical coherence tomography in gynecology: a narrative review [Text] / M. Kirillin, T. Motovilova, N. Shakhova // *Journal of Biomedical Optics*. – 2017. – Vol. 22. – № 12. – P. 1-9.

380. Cracowski, J.L. Current methods to assess human cutaneous blood flow: an updated focus on laser-based-techniques [Text] / J.L. Cracowski, M. Roustit // *Microcirculation*. – 2016. – Vol. 23. – № 5. – P. 337-344.

381. Sdobnov, A. Advances in dynamic light scattering imaging of blood flow [Text] / A. Sdobnov, G. Piavchenko, A. Bykov, I. Meglinski // *Laser & Photonics Reviews*. – 2024. – Vol. 18. – № 2. – P. 2300494.

382. Mizeva, I. Spectral analysis of the blood flow in the foot microvascular bed during thermal testing in patients with diabetes mellitus [Text] / I. Mizeva, E. Zharkikh, V. Dremin, E. Zherebtsov, I. Makovik, E. Potapova, A. Dunaev // *Microvascular Research*. – 2018. – Vol. 120. – P. 13-20.

383. Kalchenko, V. A robust method for adjustment of laser speckle contrast imaging during transcranial mouse brain visualization [Text] / V. Kalchenko, A. Sdobnov, I. Meglinski, Y. Kuznetsov, G. Molodij, A. Harmelin // *Photonics*. – 2019. – Vol. 6. – № 3. – P. 80.

384. Gnyawali, S.C. Retooling laser speckle contrast analysis algorithm to enhance non-invasive high resolution laser speckle functional imaging of cutaneous

microcirculation [Text] / S.C. Gnyawali, K. Blum, D. Pal, S. Ghatak, S. Khanna, S. Roy, C.K. Sen // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 41048.

385. Parthasarathy, A.B. Laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow in humans during neurosurgery: a pilot clinical study [Text] / A.B. Parthasarathy, E.L. Weber, L.M. Richards, D.J. Fox, A.K. Dunn // *Journal of Biomedical Optics*. – 2010. – Vol. 15. – № 6. – P. 066030.

386. Kazmi, S.M.S. Expanding applications, accuracy, and interpretation of laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow [Text] / S.M.S. Kazmi, L.M. Richards C.J. Schrandt, M.A. Davis, A.K. Dunn // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2015. – Vol. 35. – № 7. – P. 1076-1084.

387. Forrester, K.R. A laser speckle imaging technique for measuring tissue perfusion [Text] / K.R. Forrester, J. Tulip, C. Leonard, C. Stewart, R.C. Bray // *IEEE transactions on biomedical engineering*. – 2004. – Vol. 51. – № 11. – P. 2074-2084.

388. Briers, J.D. Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging [Text] / J.D. Briers // *Physiological Measurement*. – 2001. – Vol. 22. – № 4. – P. R35-R66.

389. Boas, D.A. Laser speckle contrast imaging in biomedical optics [Text] / D.A. Boas, A.K. Dunn // *Journal of Biomedical Optics*. – 2010. – Vol. 15. – № 1. – P. 011109.

390. Goodman, J.W. Statistical properties of laser speckle patterns [Text] / J.W. Goodman // In: *Handbook of coherent-domain optical methods: biomedical diagnosis, environmental monitoring, and materials science*. – Berlin, Heidelberg: Springer, 1975. – P. 9-75.

391. Humeau-Heurtier, A. Linguistic analysis of laser speckle contrast images recorded at rest and during biological zero: comparison with laser Doppler flowmetry data [Text] / A. Humeau-Heurtier, P. Abraham, G. Mahe // *IEEE Transactions on Medical Imaging*. – 2013. – Vol. 32. – № 12. – P. 2311-2321.

392. Dunn, A.K. Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle [Text] / A.K. Dunn, H. Bolay, M.A. Moskowitz, D.A. Boas // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2001. – Vol. 21. – № 3. – P. 195-201.

393. Briers, D. Laser speckle contrast imaging: theoretical and practical limitations [Text] / D. Briers, D.D. Duncan, E. Hirst, S.J. Kirkpatrick, M. Larsson, W. Steenbergen, T. Stromberg, O.B. Thompson // *Journal of Biomedical Optics*. – 2013. – Vol. 18. – № 6. – P. 066018.
394. Cheng, H. Modified laser speckle imaging method with improved spatial resolution [Text] / H. Cheng, Q. Luo, S. Zeng, S. Chen, J. Cen, H. Gong // *Journal of Biomedical Optics*. – 2003. – Vol. 8. – № 3. – P. 559-564.
395. Fercher, A.F. Flow visualization by means of single-exposure speckle photography [Text] / A.F. Fercher, J.D. Briers // *Optics Communications*. – 1981. – Vol. 37. – № 5. – P. 326-330.
396. Thompson, O. Correction for spatial averaging in laser speckle contrast analysis [Text] / O. Thompson, M. Andrews, E. Hirst // *Biomedical Optics Express*. – 2011. – Vol. 2. – № 4. – P. 1021-1029.
397. Duncan, D.D. Can laser speckle flowmetry be made a quantitative tool? [Text] / D.D. Duncan, S.J. Kirkpatrick // *Journal of the Optical Society of America A*. – 2008. – Vol. 25. – № 8. – P. 2088-2094.
398. Tuchin, V.V. Handbook of coherent-domain optical methods: biomedical diagnosis, environmental monitoring, and materials science [Text] / V.V. Tuchin. – Springer, 2013. – 1332 p.
399. Rajan, V. Review of methodological developments in laser Doppler flowmetry [Text] / V. Rajan, B. Varghese, T.G. van Leeuwen, W. Steenbergen // *Lasers in Medical Science*. – 2009. – Vol. 24. – № 2. – P. 269-283.
400. Allen, J. Microvascular imaging: techniques and opportunities for clinical physiological measurements [Text] / J. Allen, K. Howell // *Physiological Measurement*. – 2014. – Vol. 35. – № 7. – P. R91-R141.
401. Daly, S.M. “Go with the flow”: A review of methods and advancements in blood flow imaging [Text] / S.M. Daly, M.J. Leahy // *Journal of Biophotonics*. – 2013. – Vol. 6. – № 3. – P. 217-255.

402. Fahimi, Z. Diffusing-wave spectroscopy in a standard dynamic light scattering setup [Text] / Z. Fahimi, F.J. Aangenendt, P. Voudouris, J. Mattsson, H.M. Wyss // *Physical Review E*. – 2017. – Vol. 96. – № 6. – P. 62611.

403. Ninck, M. Diffusing-wave spectroscopy with dynamic contrast variation: disentangling the effects of blood flow and extravascular tissue shearing on signals from deep tissue [Text] / M. Ninck, M. Untenberger, T. Gisler // *Biomedical Optics Express*. – 2010. – Vol. 1. – № 5. – P. 1502-1513.

404. Lancaster, G. Dynamic markers based on blood perfusion fluctuations for selecting skin melanocytic lesions for biopsy [Text] / G. Lancaster, A. Stefanovska, M. Pesce, G. Marco Vezzoni, B. Loggini, R. Pingitore, F. Ghiara, P. Barachini, G. Cervadoro, M. Romanelli, M. Rossi // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – P. 12825.

405. Kvernmo, H.D. Oscillations in the human cutaneous blood perfusion signal modified by endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators [Text] / H.D. Kvernmo, A. Stefanovska, K.A. Kirkebøen, K. Kvernebo // *Microvascular Research*. – 1999. – Vol. 57. – № 3. – P. 298-309.

406. Kvandal, P. Low-frequency oscillations of the laser Doppler perfusion signal in human skin [Text] / P. Kvandal, S.A. Landsverk, A. Bernjak, A. Stefanovska, H.D. Kvernmo, K.A. Kirkebøen // *Microvascular Research*. – 2006. – Vol. 72. – № 3. – P. 120-127.

407. Bračić, M. Wavelet-based analysis of human blood-flow dynamics [Text] / M. Bračić, A. Stefanovska // *Bulletin of Mathematical Biology*. – 1998. – Vol. 60. – № 5. – P. 919-935.

408. Stefanovska, A. Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser Doppler technique [Text] / A. Stefanovska, M. Bracic, H.D. Kvernmo // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. – 1999. – Vol. 46. – № 10. – P. 1230-1239.

409. Söderström, T. Involvement of sympathetic nerve activity in skin blood flow oscillations in humans [Text] / T. Söderström, A. Stefanovska, M. Veber, H. Svensson // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. – 2003. – Vol. 284. – № 5. – P. H1638-H1646.

410. Kvernmo, H.D. Spectral analysis of the laser Doppler perfusion signal in human skin before and after exercise [Text] / H.D. Kvernmo, A. Stefanovska, M. Bracic, K.A. Kirkeboen, K. Kvernebo // *Microvascular Research*. – 1998. – Vol. 56. – № 3. – P. 173-182.

411. Kvandal, P. Regulation of human cutaneous circulation evaluated by laser Doppler flowmetry, iontophoresis, and spectral analysis: Importance of nitric oxide and prostaglandines [Text] / P. Kvandal, A. Stefanovska, M. Veber, H.D. Kvermmo, K.A. Kirkeboen // *Microvascular Research*. – 2003. – Vol. 65. – № 3. – P. 160-171.

412. Tankanag, A. Application of the adaptive wavelet transform for analysis of blood flow oscillations in the human skin [Text] / A. Tankanag, N. Chemeris // *Physics in Medicine & Biology*. – 2008. – Vol. 53. – № 21. – P. 5967-5976.

413. Tikhonova, I.V. Time-amplitude analysis of skin blood flow oscillations during the post-occlusive reactive hyperemia in human [Text] / I.V. Tikhonova, A.V. Tankanag, N.K. Chemeris // *Microvascular Research*. – 2010. – Vol. 80. – № 1. – P. 58-64.

414. Крупаткин, А.И. Пульсовые и дыхательные осцилляции кровотока в микроциркуляторном русле кожи человека [Текст] / А.И. Крупаткин // *Физиология человека*. – 2008. – Т. 34. – № 3. – С. 70-76.

415. Новикова, И.Н. Возможности применения вейвлет-анализа осцилляций параметров микроциркуляторно-тканевых систем при проведении холодной прессорной пробы на пальцах рук [Текст] / И.Н. Новикова, В.В. Дрёмин, А.В. Дунаев, А.И. Крупаткин, В.В. Сидоров // *Биотехносфера*. – 2015. – Т. 42. – № 6. – С. 26-30.

416. Крупаткин, А.И. Влияние сенсорной пептидергической иннервации на осцилляции кровотока кожи человека в диапазоне 0.047-0.069 Гц [Текст] / А.И. Крупаткин // *Физиология человека*. – 2007. – Т. 33. – № 3. – С. 48-54.

417. Крупаткин, А.И. Динамический колебательный контур регуляции капиллярной гемодинамики [Текст] / А.И. Крупаткин // *Физиология человека*. – 2007. – Т. 33. – № 5. – С. 93-101.

418. Крупаткин, А.И. Колебания кровотока частотой около 0.1 Гц в микрососудах кожи не отражают симпатическую регуляцию их тонуса [Текст] / А.И. Крупаткин // Физиология человека. – 2009. – Т. 35. – № 2. – С. 60-69.

419. Крупаткин, А.И. Значение колебательных процессов в диагностике состояния микроциркуляторно-тканевых систем [Текст] / А.И. Крупаткин // Физиология человека. 2018. – Т. 44. – № 5. – С. 103-114.

420. Крупаткин, А.И. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем: колебания, информация, нелинейность: руководство для врачей [Текст] / А.И. Крупаткин, В.В. Сидоров. – М.: Либроком, 2013. – 496 с.

421. Mizeva, I.A. Diagnostics of functional abnormalities in the microcirculation system using laser Doppler flowmetry [Text] / I.A. Mizeva, E.V. Potapova, E.V. Zharkikh // in Biomedical Photonics for Diabetes Research. – CRC Press, 2022. – P. 81–105.

422. Mizeva, I. Analysis of skin blood microflow oscillations in patients with rheumatic diseases [Text] / I. Mizeva, I. Makovik, A. Dunaev, A. Krupatkin, I. Meglinski // Journal of Biomedical Optics. – 2017. – Vol. 22. – № 7. – P. 70501.

423. Gurov, I. High-speed video capillaroscopy method for imaging and evaluation of moving red blood cells [Text] / I. Gurov, M. Volkov, N. Margaryants, A. Pimenov, A. Potemkin // Optics and Lasers in Engineering. – 2018. – Vol. 104. – P. 244-251.

424. Yakimov, B.P. Pericapillary edema assessment by means of the nailfold capillaroscopy and laser scanning microscopy [Text] / B.P. Yakimov, Y.I. Gurfinkel, D.A. Davydov, A.S. Allenova, G.S. Budylin, V.Y. Vasiliev, V.Y. Soldatova, A.A. Kamalov, S.T. Matskeplishvili, A.V. Priezzhev, E.A. Shirshin // Diagnostics. – 2020. – Vol. 10. – № 12. – P. 1107.

425. Lim, M.W. Nailfold video-capillaroscopy in the study of cardiovascular disease: a systematic review [Text] / M.W. Lim, D. Setjiadi, S.J. Dobbin, N.N. Lang, C. Delles, P.J. Connelly // Blood Pressure Monitoring. – 2023. – Vol. 28. – № 1. – P. 24-32.

426. Dremin, V. Influence of melanin content on laser Doppler flowmetry and tissue reflectance oximetry signal formation [Text] / V. Dremin, N. Golubova, E.

Potapova, A. Dunaev // *Journal of Biomedical Photonics and Engineering*. – 2021. – Vol. 7. – № 4. – P. 040306.

427. Karimov, K.A. The phase correlation algorithm for stabilization of capillary blood flow video frames [Text] / K.A. Karimov, M.V. Volkov // *Proceedings of SPIE*. – 2015. – Vol. 9528. – P. 952810.

428. Volkov, M.V. Video capillaroscopy clarifies mechanism of the photoplethysmographic waveform appearance [Text] / M.V. Volkov, N.B. Margaryants, A.V. Potemkin, M.A. Volynsky, I.P. Gurov, O.V. Mamontov, A.A. Kamshilin // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 13298.

429. Volkov, M.V. Evaluation of blood microcirculation parameters by combined use of laser Doppler flowmetry and videocapillaroscopy methods [Text] / M.V. Volkov, D.A. Kostrova, N.B. Margaryants, I.P. Gurov, N.P. Erofeev, V.V. Dremin, E.V. Zharkikh, E.A. Zherebtsov, I.O. Kozlov, A.V. Dunaev // *Proceedings of SPIE*. – 2017. – Vol. 10336. – P. 1033607.

430. Grinsted, A. Application of the cross wavelet transform and wavelet coherence to geophysical time series [Text] / A. Grinsted, J.C. Moore, S. Jevrejeva // *Nonlinear Processes in Geophysics*. – 2004. – Vol. 11. – № 5/6. – P. 561-566.

431. Chang, C. Time-frequency dynamics of resting-state brain connectivity measured with fMRI [Text] / C. Chang, G.H. Glover // *Neuroimage*. – 2010. – Vol. 50. – № 1. – P. 81-98.

432. Cui, X. NIRS-based hyperscanning reveals increased interpersonal coherence in superior frontal cortex during cooperation [Text] / X. Cui, D.M. Bryant, A.L. Reiss // *Neuroimage*. – 2012. – Vol. 59. – № 3. – P. 2430-2437.

433. Torrence, C. A Practical guide to wavelet analysis [Text] / C. Torrence, G.P. Compo // *Bulletin of the American Meteorological Society*. – 1998. – Vol. 79. – № 1. – P. 61-78.

434. Bandrivskyy, A. Wavelet phase coherence analysis: Application to skin temperature and blood flow [Text] / A. Bandrivskyy, A. Bernjak, P. McClintock, A. Stefanovska // *Cardiovascular Engineering: An International Journal*. – 2004. – Vol. 4. – № 1. – P. 89-93.

435. Lancaster, G. Surrogate data for hypothesis testing of physical systems [Text] / G. Lancaster, D. Iatsenko, A. Pidde, V. Ticcinelli, A. Stefanovska // *Physics Reports*. – 2018. – Vol. 748. – P. 1-60.
436. Caro, C.G. The mechanics of the circulation, second edition [Text] / C.G. Caro. – Cambridge University Press. – 2011. – 524 p.
437. Millet, C. Comparison between laser speckle contrast imaging and laser Doppler imaging to assess skin blood flow in humans [Text] / C. Millet, M. Roustit, S. Blaise, J.L. Cracowski // *Microvascular Research*. – 2011. – Vol. 82. – № 2. – P. 147-151.
438. Binzoni, T. Translational and brownian motion in laser-Doppler flowmetry of large tissue volumes [Text] / T. Binzoni, T.S. Leung, M.L. Seghier, D.T. Delpy // *Physics in Medicine & Biology*. – 2004. – Vol. 49. – № 24. – P. 5445-5458.
439. Meglinski, I.V. Towards the nature of biological zero in the dynamic light scattering diagnostic modalities [Text] / I.V. Meglinski, V.V. Kal'chenko, Y.L. Kuznetsov, B.I. Kuznik, V.V. Tuchin // *Doklady Physics*. – 2013. – Vol. 58. – № 8. – P. 323-326.
440. Kalchenko, V. *In vivo* dynamic light scattering imaging of blood coagulation [Text] / V. Kalchenko, A.G. Brill, M. Bayewitch, I. Fine, V.P. Zharov, E.I. Galanzha, V.V. Tuchin, A. Harmelin // *Journal of Biomedical Optics*. – 2007. – Vol. 12. – № 5. – P. 052002.
441. Wardell, K. Laser Doppler perfusion imaging by dynamic light scattering [Text] / K. Wardell, A. Jakobsson, G.E. Nilsson // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. – 1993. – Vol. 40. – № 4. – P. 309-316.
442. Niazi, Z.B. New laser Doppler scanner, a valuable adjunct in burn depth assessment [Text] / Z.B. Niazi, T.J. Essex, R. Papini, D. Scott, N.R. McLean, M.J. Black // *Burns*. – 1993. – Vol. 19. – № 6. – P. 485-489.
443. Leutenegger, M. Real-time full field laser Doppler imaging [Text] / M. Leutenegger, E. Martin-Williams, P. Harbi, T. Thacher, W. Raffoul, M. André, A. Lopez, P. Lasser, T. Lasser // *Biomedical Optics Express*. – 2011. – Vol. 2. – № 6. – P. 1470-1477.

444. Serov, A. High-speed laser Doppler perfusion imaging using an integrating CMOS image sensor [Text] / A. Serov, T. Lasser // *Optics Express*. – 2005. – Vol. 13. – № 17. – P. 6416-6428.
445. Furukawa, H. Dynamic light scattering from static and dynamic fluctuations in inhomogeneous media [Text] / H. Furukawa, S. Hirotsu // *Journal of the Physical Society of Japan*. – 2002. – Vol. 71. – № 12. – P. 2873-2880.
446. Thompson, O.B. Tissue perfusion measurements: multiple-exposure laser speckle analysis generates laser Doppler-like spectra [Text] / O.B. Thompson, M.K. Andrews // *Journal of Biomedical Optics*. – 2010. – Vol. 15. – № 2. – P. 027015.
447. Draijer, M.J. Relation between the contrast in time integrated dynamic speckle patterns and the power spectral density of their temporal intensity fluctuations [Text] / M.J. Draijer, E. Hondebrink, M. Larsson, T.G. van Leeuwen, W. Steenbergen // *Optics Express*. – 2010. – Vol. 18. – № 21. – P. 21883-21891.
448. Fredriksson, I. On the equivalence and differences between laser Doppler flowmetry and laser speckle contrast analysis [Text] / I. Fredriksson, M. Larsson // *Journal of Biomedical Optics*. – 2016. – Vol. 21. – № 12. – P. 126018.
449. Zötterman, J. Monitoring of partial and full venous outflow obstruction in a porcine flap model using laser speckle contrast imaging [Text] / J. Zötterman, M. Bergkvist, F. Iredahl, E. Tesselaar, S. Farnebo // *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. – 2016. – Vol. 69. – № 7. – P. 936-943.
450. Binzoni, T. Blood perfusion values of laser speckle contrast imaging and laser Doppler flowmetry: Is a direct comparison possible? [Text] / T. Binzoni, A. Humeau-Heurtier, P. Abraham, G. Mahé // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. – 2013. – Vol. 60. – № 5. – P. 1259-1265.
451. Royl, G. Functional imaging with laser speckle contrast analysis: Vascular compartment analysis and correlation with Laser Doppler Flowmetry and somatosensory evoked potentials [Text] / G. Royl, C. Leithner, H. Sellien, J.P. Müller, D. Megow, N. Offenhauser, J. Steinbrink, M. Kohl-Bareis, U. Dirnagl, U. Lindauer // *Brain Research*. – 2006. – Vol. 1121. – № 1. – P. 95-103.

452. Humeau-Heurtier, A. Laser speckle contrast imaging of the skin: interest in processing the perfusion data [Text] / A. Humeau-Heurtier, B. Buard, G. Mahe, P. Abraham // *Medical & biological engineering & computing*. – 2012. – Vol. 50. – № 2. – P. 103-105.
453. Mizeva, I. Wavelet analysis of the temporal dynamics of the laser speckle contrast in human skin [Text] / I. Mizeva, V. Dremin, E. Potapova, E. Zhrebtssov, I. Kozlov, A. Dunaev // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. – 2020. – Vol. 67. – № 7. – P. 1882-1889.
454. Kirkpatrick, S.J. Detrimental effects of speckle-pixel size matching in laser speckle contrast imaging [Text] / S.J. Kirkpatrick, D.D. Duncan, E.M. Wells-Gray // *Optics Letters*. – 2008. – Vol. 33. – № 24. – P. 2886-2888.
455. O'Doherty, J. Comparison of instruments for investigation of microcirculatory blood flow and red blood cell concentration [Text] / J. O'Doherty, P. McNamara, N.T. Clancy, J.G. Enfield, M.J. Leahy // *Journal of Biomedical Optics*. – 2009. – Vol. 14. – № 3. – P. 034025.
456. Vaz, P.G. Laser speckle imaging to monitor microvascular blood flow: A review [Text] / P.G. Vaz, A. Humeau-Heurtier, E. Figueiras, C. Correia, J. Cardoso // *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*. – 2016. – Vol. 9. – P. 106-120.
457. Aleksandrin, V.V. Application of wavelet analysis to detect dysfunction in cerebral blood flow autoregulation during experimental hyperhomocysteinaemia [Text] / V.V. Aleksandrin, A.V. Ivanov, E.D. Virus, P.O. Bulgakova, A.A. Kubatiev // *Lasers in Medical Science*. – 2018. – Vol. 33. – № 6. – P. 1327-1333.
458. Li, Z. Effects of prolonged surface pressure on the skin blood flow motions in anaesthetized rats – an assessment by spectral analysis of laser Doppler flowmetry signals [Text] / Z. Li, E.W. Tam, M.P. Kwan, A.F. Mak, S.C. Lo, M.C. Leung // *Physics in Medicine and Biology*. – 2006. – Vol. 51. – № 10. – P. 2681.
459. Mastantuono, T. Laser speckle imaging of rat pial microvasculature during hypoperfusion-reperfusion damage [Text] / T. Mastantuono, N. Starita, L. Battiloro, M. Di Maro, M. Chiurazzi, G. Nasti, E. Muscariello, M. Cesarelli, L. Iuppriello, G.

D'Addio, A. Gorbach, A. Colantuoni, D. Lapi // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2017. – Vol. 11. – P. 298.

460. Vaz, P. Which wavelength is the best for arterial pulse waveform extraction using laser speckle imaging? [Text] / P. Vaz, T. Pereira, E. Figueiras, C. Correia, A. Humeau-Heurtier, J. Cardoso // *Biomedical Signal Processing and Control*. – 2016. – Vol. 25. – P. 188-195.

461. Davis, M.J. Myogenic response gradient in an arteriolar network [Text] / M.J. Davis // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. – 1993. – Vol. 264. – № 6. – P. H2168-H2179.

462. Whittaker, J.R. Cerebral autoregulation evidenced by synchronized low frequency oscillations in blood pressure and resting-state fMRI [Text] / J.R. Whittaker, I.D. Driver, M. Venzi, M.G. Bright, K. Murphy // *Frontiers in Neuroscience*. – 2019. – Vol. 13. – P. 433.

463. Pogue, B.W. Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry [Text] / B.W. Pogue, M.S. Patterson // *Journal of Biomedical Optics*. – 2006. – Vol. 11. – № 4. – P. 041102.

464. Chue-Sang, J. Optical phantoms for biomedical polarimetry: a review [Text] / J. Chue-Sang, M. Gonzalez, A. Pierre, M. Laughrey, I. Saytashev, T. Novikova, J.C. Ramella-Roman // *Journal of Biomedical Optics*. – 2019. – Vol. 24. – № 3. – P. 030901.

465. Lamouche, G. Review of tissue simulating phantoms with controllable optical, mechanical and structural properties for use in optical coherence tomography [Text] / G. Lamouche, B.F. Kennedy, K.M. Kennedy, C.-E. Bisailon, A. Curatolo, G. Campbell, V. Pazos, D.D. Sampson // *Biomedical Optics Express*. – 2012. – Vol. 3. – № 6. – P. 1381-1398.

466. Bonesi, M. Study of flow dynamics in complex vessels using Doppler optical coherence tomography [Text] / M. Bonesi, D. Churmakov, I. Meglinski // *Measurement Science and Technology*. – 2007. – Vol. 18. – № 11. – P. 3279.

467. Zhang, T. Development of oral cancer tissue-mimicking phantom based on polyvinyl chloride plastisol and graphite for terahertz frequencies [Text] / T. Zhang, R. Nazarov, A.P. Popov, P.S. Demchenko, A.V. Bykov, R.O. Grigorev, A.V. Kuzikova,

V.Y. Soboleva, D.V. Zykov, I.V. Meglinski, M.K. Khodzitskiy // *Journal of Biomedical Optics*. – 2020. – Vol. 25. – № 12. – P. 123002.

468. Leh, B. Optical phantoms with variable properties and geometries for diffuse and fluorescence optical spectroscopy [Text] / B. Leh, R. Siebert, H. Hamzeh, L. Menard, M.A. Duval, Y. Charon, D. Abi Haidar // *Journal of Biomedical Optics*. – 2012. – Vol. 17. – № 10. – P. 108001.

469. Sdobnov, A. Speckle dynamics under ergodicity breaking [Text] / A. Sdobnov, A. Bykov, G. Molodij, V. Kalchenko, T. Jarvinen, A. Popov, K. Kordas, I. Meglinski // *Journal of Physics D: Applied Physics*. – 2018. – Vol. 51. – № 15. – P. 155401.

470. Wang, D. A liquid optical phantom with tissue-like heterogeneities for confocal microscopy [Text] / D. Wang, Y. Chen, J.T.C. Liu // *Biomedical Optics Express*. – 2012. – Vol. 3. – № 12. – P. 3153-3160.

471. Loginova, D.A. Liquid optical phantoms mimicking spectral characteristics of laboratory mouse biotissues [Text] / D.A. Loginova, E.A. Sergeeva, A.D. Krainov, P.D. Agrba, M.Y. Kirillin // *Quantum Electronics*. – 2016. – Vol. 46. – № 6. – P. 528.

472. Lu, H. Fluorescence spectroscopy study of protoporphyrin IX in optical tissue simulating liquid phantoms [Text] / H. Lu, F. Floris, M. Rensing, S. Andersson-Engels // *Materials*. – 2020. – Vol. 13. – № 9. – P. 2105.

473. Luthjens, L.H. A Polymer-gel eye-phantom for 3D fluorescent imaging of millimetre radiation beams [Text] / L.H. Luthjens, T. Yao, J.M. Warman // *Polymers*. – 2018. – Vol. 10. – № 11. – P. 1195.

474. Потапова, Е.В. Разработка жидкого оптического фантома для флуоресцентных спектроскопических исследований [Текст] / Е.В. Потапова, В.В. Дрёмин, Е.А. Жеребцов, К.В. Подмастерьев, А.В. Дунаев // *Фундаментальные и прикладные проблемы техники и технологии*. – 2018. – Т. 332. – № 6. – С. 105-114.

475. Сафонова, Л.П. Изготовление и исследование оптических характеристик фантомов биологических тканей на основе водных гелей [Текст] / Л.П. Сафонова, А.Б. Селиверстов // *Медицинская техника*. – 2013. – № 1. – С. 1-6.

476. Fajardo, C. Optical properties of a simple model of soft biological tissue [Text] / C. Fajardo, E. Solarte // Journal of Physics: Conference Series. – 2020. – Vol. 1547. – № 1. – P. 012026.

477. Beaulieu, E. Wide-field optical spectroscopy system integrating reflectance and spatial frequency domain imaging to measure attenuation-corrected intrinsic tissue fluorescence in radical prostatectomy specimens [Text] / E. Beaulieu, A. Laurence, M. Birlea, G. Sheehy, L. Angulo-Rodriguez, M. Latour, R. Albadine, F. Saad, D. Trudel, F. Leblond // Biomedical Optics Express. – 2020. – Vol. 11. – № 4. – P. 2052-2072.

478. Anastasopoulou, M. Multiparameter solid phantom for fluorescence imaging standardization [Text] / M. Anastasopoulou, D. Gorpas, M. Koch, P.B. Garcia-Allende, U. Klemm, A. Karlas, V. Ntziachristos // Proceedings of SPIE. – 2017. – Vol. 10411. – P. 104110J.

479. Ahmad, M. Chemical characteristics, motivation and strategies in choice of materials used as liver phantom: A literature review [Text] / M.S. Ahmad, N. Suardi, A. Shukri, H. Mohammad, A.A. Oglat, A. Alarab, O. Makhamrah // Journal of Medical Ultrasound. – 2020. – Vol. 28. – № 1. – P. 7.

480. Wróbel, M.S. Multi-layered tissue head phantoms for noninvasive optical diagnostics [Text] / M.S. Wróbel, A.P. Popov, A.V. Bykov, M. Kinnunen, M. Jędrzejewska-Szczerska, V.V. Tuchin // Journal of Innovative Optical Health Sciences. – 2014. – Vol. 8. – № 03. – P. 1541005.

481. Wróbel, M.S. Nanoparticle-free tissue-mimicking phantoms with intrinsic scattering [Text] / M.S. Wróbel, A.P. Popov, A.V. Bykov, V.V. Tuchin, M. Jędrzejewska-Szczerska // Biomedical Optics Express. – 2016. – Vol. 7. – № 6. – P. 2088-2094.

482. Gorpas, D. Multi-parametric standardization of fluorescence imaging systems based on a composite phantom [Text] / D. Gorpas, M. Koch, M. Anastasopoulou, D. Bozhko, U. Klemm, M. Nieberler, V. Ntziachristos // IEEE Transactions on Biomedical Engineering. – 2020. – Vol. 67. – № 1. – P. 185-192.

483. Wróbel, M.S. Measurements of fundamental properties of homogeneous tissue phantoms [Text] / M.S. Wróbel, A.P. Popov, A.V. Bykov, M. Kinnunen, M.

Jędrzejewska-Szczerska, V.V. Tuchin // *Journal of Biomedical Optics*. – 2015. – Vol. 20. – № 4. – P. 045004.

484. Moffitt, T.P. Preparation and characterization of polyurethane optical phantoms [Text] / T.P. Moffitt, Y.-C. Chen, S.A. Prahl // *Journal of Biomedical Optics*. – 2006. – Vol. 11. – № 4. – P. 041103.

485. Shupletsov, V. Fluorescence imaging system for biological tissues diagnosis: phantom and animal studies [Text] / V. Shupletsov, K. Kandurova, V. Dremin, E. Potapova, M. Apanaykin, U. Legchenko, A. Dunaev // *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. – 2020. – Vol. 6. – № 1. – P. 010303.

486. Shupletsov, V. Tissue mimicking phantoms for fluorescence imaging [Text] / V. Shupletsov, K. Kandurova, D. Stavtsev, A. Stolbov, E. Potapova, D. Dremin, A. Vinokurov, K. Podmasteryev, A. Dunaev // *Proceedings of SPIE*. – 2020. – Vol. 11457. – P. 1145708.

487. Anugrah, M.A. Composite gelatin/Rhizophora SPP particleboards/PVA for soft tissue phantom applications [Text] / M.A. Anugrah, S. Suryani, S. Ilyas, I. Mutmainna, A.N. Fahri, D. Tahir // *Radiation Physics and Chemistry*. – 2020. – Vol. 173. – P. 108878.

488. Wu, Y. Depth-resolved fluorescence spectroscopy of normal and dysplastic cervical tissue [Text] / Y. Wu, P. Xi, J.Y. Qu, T.H. Cheung, M.Y. Yu // *Optics Express*. – 2005. – Vol. 13. – № 2. – P. 382-388.

489. Shupletsov, V.V. Polyacrylamide-based phantoms of human skin for hyperspectral fluorescence imaging and spectroscopy [Text] / V. Shupletsov, E. Zhrebtsov, V. Dremin, A. Popov, A. Bykov, E. Potapova, A. Dunaev, I. Meglinski // *Quantum Electronics*. – 2021. – Vol. 51. – № 2. – P. 118-123.

490. Aliverti, A. Identifying and quantitating FAD and FMN in simple and in iron-sulfur-containing flavoproteins [Text] / A. Aliverti, B. Curti, M.A. Vanoni // *Flavoprotein Protocols*. – Totowa, NJ: Humana Press. – 1999. – P. 9-23.

491. Drössler, P. pH dependence of the absorption and emission behaviour of riboflavin in aqueous solution [Text] / P. Drössler, W. Holzer, A. Penzkofer, P.J.C.P. Hegemann // *Chemical Physics*. – 2002. – Vol. 282. – № 3. – P. 429-439.

492. Bojarski, C. Theory of the influence of concentration on the luminescence of solid solutions [Text] / C. Bojarski, J. Domsta // *Acta Physica Academiae Scientiarum Hungaricae*. – 1971. – Vol. 30. – № 2. – P. 145-166.

493. Aernouts, B. Dependent scattering in Intralipid® phantoms in the 600-1850 nm range [Text] / B. Aernouts, R. Van Beers, R. Watté, J. Lammertyn, W. Saeys // *Optics Express*. – 2014. – Vol. 22. – № 5. – P. 6086-6098.