

На правах рукописи

Гираев Камал Магомедович

**СТАЦИОНАРНАЯ ОПТИЧЕСКАЯ И ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ
СПЕКТРОСКОПИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ
ЖЕЛУДКА С ПАТОЛОГИЕЙ**

Специальность 01.04.05 - оптика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Ульяновск – 2010г.

Работа выполнена в ГОУ ВПО Дагестанский государственный университет на кафедре физической электроники и НИЛ физики плазмы и спектроскопии.

Научный руководитель: доктор физико-математических наук, профессор Ашурбеков Назир Ашурбекович

Научный консультант: кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии Расулов Магомед Тагибович

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук, профессор Горелик Владимир Семенович

кандидат физико-математических наук, Шалин Александр Сергеевич

Ведущая организация: ГОУ ВПО Оренбургский государственный университет

Защита состоится « 17 » июня 2010 года в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.278.01 при Ульяновском государственном университете по адресу: Университетская набережная, д. 1, ауд. 309.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Ульяновского государственного университета, с авторефератом – на сайте вуза <http://www.uni.ulsu.ru>

Отзывы на автореферат просим присылать по адресу: 432000, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, д. 42, Ульяновский государственный университет, Управление научных исследований.

Автореферат разослан «___» мая 2010 года

Ученый секретарь
диссертационного Совета
к. ф.-м. н.

Вострцова Л.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. Возросший в последние годы интерес к различным методам лазерной спектроскопии биообъектов и их патологических состояний, в значительной мере связан со стремительным развитием лучевых методов медицины, а именно лазерной хирургии, терапии и диагностики. В частности, среди множества экспериментальных методов диагностики, к числу которых можно отнести все виды оптической томографии, широкое распространение получили методы, основанные на измерении спектрального распределения и интенсивности диффузных характеристик рассеянного назад света (см., например, [1-3]).

С точки зрения информативности, простоты реализации, отсутствия сложного оборудования и анализа полученных результатов не меньший интерес представляют методы стационарной оптической и флуоресцентной спектроскопии. Данный подход основан на последовательном измерении и комплексном анализе спектров диффузного отражения и лазерно-индуцированной флуоресценции, что позволяет проводить неинвазивные исследования живых систем совместно с лапороскопическими операциями и диагностическими процедурами [1-3]. Известны работы (см., например, [1-4]), в которых спектрально-флуоресцентные исследования использовались для обнаружения различных заболеваний кожи, внутренних органов, сосудов и пр. Однако результаты подобных исследований часто являются неоднозначными, носят качественный характер и не позволяют достоверно дифференцировать степень и промежуточные стадии патологических процессов. К числу причин неоднозначности результатов могут быть отнесены низкий уровень квантового выхода флуоресценции и значительные искажения спектров, вносимые поглощением и объемным светорассеянием самой биоткани. Учесть факторы, искажающие спектры флуоресценции биосред и повысить информативность полученных результатов можно, рассматривая данные флуоресцентных исследований биообъектов в совокупности с их диффузно-оптическими характеристиками. Кроме того, знание оптических параметров биообъектов дает дополнительную информацию об анатомическом строении биоткани, а также их физиологических, морфологических и биохимических параметрах [1-3].

В связи с вышеизложенным, представляется актуальным комплексное исследование излучательных характеристик патологических состояний биотканей как *in vivo*, так и *in vitro* с использованием методов стационарной оптической и флуоресцентной спектроскопии, в сочетании с светооптической и флуоресцентной микроскопией.

Целью настоящей работы является исследование спектральных характеристик, а также выявление механизмов и закономерностей формирования стационарных диффузно-оптических и спектрально-флуоресцентных свойств биотканей *in vivo* в зависимости от вида и степени патологического поражения.

В рамках цели работы решались следующие задачи:

1. Проведение экспериментальных исследований спектров флуоресценции F_{λ} и диффузного отражения R_d биотканей в норме и при различных формах и степени патологического процесса.
2. Проведение спектрофотометрических исследований коэффициентов полного пропускания, полного отражения и коллимированного пропускания биотканей в норме и с патологией в диапазоне длин волн 300-800 нм.
3. Исследование спектров оптических показателей поглощения – μ_a , рассеяния – μ_s и фактора анизотропии – g в диапазоне длин волн 300-800 нм, а также некоторых физиологических и морфологических параметров, характеризующих степень функционального состояния исследуемых биотканей.
4. Исследование квантового выхода и степени искажения спектров аутофлуоресценции, а также проведение спектрального разложения данных флуоресцентных исследований для соответствующих биообъектов с целью количественного восстановления вкладов эндогенных флуорофоров в суммарные спектры свечения.
5. Выполнение гистоморфологических и микрофлуоресцентных исследований с целью изучения динамики структурной организации и пространственного распределения эндогенных флуорофоров в биотканях в процессе развития патологического поражения.

Научная новизна:

1. Характер изменений в экспериментальных спектрах флуоресценции и диффузного отражения биотканей обусловлен, как вкладами эндогенных флуорофоров, так и количественным содержанием в крови, степенью оксигенации и микроструктурой исследуемой среды. По мере развития патологии (от нормы до крайней степени поражения) происходит снижение интенсивности флуоресценции в 5-6 раз, а диффузного отражения до 3 раз во всем исследуемом спектральном интервале.
2. Механизмы и закономерности формирования спектров аутофлуоресценции исследуемых биотканей при различных формах патологического поражения во многом определяются уровнем эффектов их светорассеяния и оптического поглощения, приводящие, как к искажению формы спектрального контура, вследствие изменения вкладов эндогенных флуорофоров, так и к перераспределению интенсивности (до 13 раз) и глубины испускания (в 1.5 раза) спектров аутофлуоресценции.
3. Характер формирования спектральной зависимости аутофлуоресценции и квантового выхода идентичны. Типичное значение квантового выхода для нормальных биотканей составляет примерно 8.5×10^{-4} и уменьшается до 4 раз для высоких стадий поражения, а для крайней стадии – незначительно растет. Рост безызлучательной дезактивации флуоресценции происходит вследствие процессов тушения в патологически измененных биотканях.
4. Спектральный контур аутофлуоресценции исследуемых биотканей образован эмиссией семи групп флуорофоров, из которых основными

являются молекулы NAD(P)·H, структурные белки, а также производные флавиновых и порфириновых групп. По мере развития крайних форм поражения наблюдается снижение вклада флуоресценции флавинов и увеличение вклада NAD(P)·H, а также 4-х кратное возгорание коллагеновых и порфириновых групп в результирующем спектре аутофлуоресценции.

5. Оптические спектры поглощения μ_a , рассеяния μ_s и фактора анизотропии g биотканей *in vivo* при исследуемых формах патологического поражения во многом определяются физиологическим и структурно-морфологическим состоянием последних. Относительно нормы по мере развития средней и высокой стадии поражения наблюдается уменьшение μ_a до 3 раз, снижение кровенаполнения и кислородного насыщения, а так же увеличение плотности оптических неоднородностей до 45%. При развитии крайних форм поражения происходит увеличение μ_a до значений, близких к здоровым биотканям, а μ_s – приблизительно до 2 раз выше нормы, а также увеличение кровенаполнения и размеров рассеивателей, и уменьшение кислородного насыщения и плотности неоднородностей до 5 раз.

Практическая значимость работы:

1. Предложенный в работе научно-методический подход, основанный на комплексном анализе результатов спектрально-флуоресцентных и диффузно-оптических исследований, позволяет в широком интервале длин волн (300-800 нм) с заданной точностью определить спектры оптических показателей, аутофлуоресценцию и степень ее искажения, а также квантовый выход флуоресценции для биотканей *in vivo*. Полученные результаты могут быть использованы в качестве метода диагностики и мониторинга патологических состояний различных биообъектов в режиме реального времени.

2. Результаты комплексных исследований с использованием диффузно-оптической и флуоресцентной спектроскопии и микроскопии, позволяют существенно повысить качество и уровень диагностируемого процесса различных стадий развития патологических состояний биотканей.

3. Спектры оптических показателей поглощения, рассеяния и фактора анизотропии, рассчитанные с использованием предложенного в работе методического подхода, могут быть использованы в медицине в дозиметрических целях при планировании лазерно-терапевтических и диагностических процедур.

Положения, выносимые на защиту:

1. Особенности спектров флуоресценции биотканей желудка с патологией обусловлены как вкладом эндогенных флуорофоров, так и количественным содержанием крови, степенью оксигенации и микроструктурой исследуемых сред.

2. Спектральный контур аутофлуоресценции исследуемых биотканей образован эмиссией семи групп флуорофоров, из которых основными являются молекулы NAD(P)·H, структурные белки, а также производные флавиновых и порфириновых групп. Формирование спектров аутофлуоресценции определяются уровнем эффектов их светорассеяния и

оптического поглощения, приводящих к искажению формы спектрального контура, вследствие изменения вкладов эндогенных флуорофоров.

3. Патологические изменения в биотканях приводят к росту безызлучательной дезактивации эмиссии аутофлуоресценции, что обуславливает снижение эффективности излучательных процессов.

4. По мере развития патологических процессов наблюдается снижение кровенаполнения и кислородного насыщения, а так же увеличение плотности оптических неоднородностей до 45%, что находит изменение в спектрах диффузного отражения и других оптических характеристиках исследуемых биообъектов.

5. Экспериментальная корреляционная зависимость между спектрально-флуоресцентными и диффузно-оптическими характеристиками биотканей *in vivo* и степенью их поражения, в том числе процессы малигнизации позволяет ускорить и упростить проведение инвазивных анализов на выявление патологических образований желудка.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на следующих конференциях: «Falk Symposium». Basel, 1999; Съезд VIII Международная конференция студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-2001». Москва; VII Всероссийской конференции «ВНКСФ-7». С.-Петербург, 2001; II Всероссийской конференции «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины». Москва, 2001; II, III, IV, V Всероссийские конференции «Физическая электроника». Махачкала; Второй Международный конгресс студентов, молодых ученых и специалистов «Молодежь и наука – третье тысячелетие»/YSTM'02. Москва; XI; Международная конференция «Фазовые переходы, критические и нелинейные явления в конденсированных средах». Махачкала, 2007.

Достоверность полученных результатов проведением исследований по апробированным методикам, на аттестованных исследовательских установках, а также согласием полученных результатов с результатами независимых клинических исследований и экспериментами, которые опубликованы в отечественной и зарубежной научной литературе.

Личный вклад. Все экспериментальные результаты их обработка и анализ выполнен лично автором. Обсуждение моделей наблюдаемых процессов проводилось совместно с научным руководителем, проф. Ашурбековым Н.А. и консультантом Расуловым М.Т.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 22 работы, в том числе в зарубежных журналах – 3 статьи и в журналах, рекомендованных ВАК – 4 статьи, в других журналах – 3 статьи; тезисов докладов в материалах конференций – 12.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, 4 глав и заключения. Общий объем диссертации 161 страниц (39 рисунков и 5 таблиц). Список цитируемой литературы содержит 138 наименований.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении дано обоснование выбора темы диссертации, определены цель и задачи работы, сформулированы актуальность решаемых проблем и основные положения, выносимые на защиту, а также показана научная новизна полученных результатов.

Первая глава диссертации посвящена аналитическому обзору работ в области оптической и флуоресцентной спектроскопии и микроскопии биотканей. Дано обоснование выбора методов исследования. Показаны возможности их применения с целью проведения дифференцированной диагностики патологических состояний тканей внутренних органов.

Первый параграф обзора содержит литературные данные, посвященные спектрально-флуоресцентным исследованиям различных биотканей. Рассмотрены флуоресцентные свойства и приведены спектральные характеристики основных флуорофоров, участвующих в механизме образования флуоресценции нормальных и патологических биотканей. Отдельно рассмотрены факторы, оказывающие влияние на спектры аутофлуоресценции биотканей, а именно процессы рассеяния фотонов флуоресценции на центрах неоднородностей и их реабсорбции эндогенными хромофорами биотканей.

Во втором параграфе рассматриваются основные положения и методики теоретического описания распространения оптического излучения в биотканях, включающие решение прямой и обратной задачи для уравнения переноса излучения. Обсуждаются пределы применимости теоретических методик. Проведен критический анализ данных по экспериментальным исследованиям оптических свойств различных биотканей в норме и на различных стадиях патологического процесса.

В третьем параграфе обсуждаются принципы и практическое применение существующих методов и техники светооптической и флуоресцентной микроскопии, а также приводится краткое описание результатов современного исследования гистоморфологических и микрофлуоресцентных свойств различных биоструктур и клеток.

Во второй главе диссертации приведены сведения об объектах исследования и методике их приготовления, а также описаны экспериментальные установки и методики исследования оптических и флуоресцентных свойств биотканей.

Первый параграф главы посвящен описанию исследуемых материалов и методики их приготовления. Изучение спектрально-флуоресцентных и диффузно-оптических свойств биотканей в норме и в зависимости степени патологического процесса проводилось на биотканях различными случаями очаговых поражений (*язвенные дефекты, полип, рак*). При этом исследовались непосредственно сам очаг поражения или его край, участки переходной зоны, находящаяся на расстоянии 4-5 см от видимой границы очага и область, удаленная на расстояние 9-10 см от видимого края очага поражения. Гистоморфологический анализ образцов биотканей с этих

участков показал, что в 80% случаев язвенных дефектов и полипоза (*высокая стадия поражения*) и в 20-25% злокачественных новообразований (*крайняя стадия поражений*) для переходной зоны характерны *дефекты хронического атрофического гастрита (средняя стадия поражений)*. В тоже время для участков биотканей, максимально отстоящих от зоны поражения наблюдались различные поверхностные дефекты (*поверхностный гастрит*) и *функциональные расстройства (норма)*. Таким образом, из общего числа объектов были отобраны 85 случаев хронического атрофического гастрита, 57 случаев язвенных дефектов, 16 случаев полипа и 83 случая раковой опухоли желудка. Контрольную группу составили 74 образца желудка с наименьшими морфологическими изменениями.

Общая для всех биообъектов схема проведения эксперимента и получения материалов исследования заключалась в последовательной реализации следующих этапов. На первом этапе исследования проводились измерения спектров флуоресценции F_{λ} и диффузного отражения R_d биотканей *in vivo* во время плановых операций, непосредственно перед их удалением. Далее с участков *in vivo* исследований производилось отсечение кусочков биотканей размером 1-1.5 см². Сразу же после этого, полученный материал ополаскивали в 0.9% физиологическом растворе для удаления остатков крови и затем при помощи криостатного микротона получали гистологические срезы. Для гистоморфологических исследований использовались поперечные срезы толщиной 10 мкм, для исследований по флуоресцентной микроскопии – 100 мкм, для спектрофотометрических измерений коэффициентов пропускания и отражения – 0.5-1 мм.

Во втором параграфе главы содержится описание экспериментальной установки для проведения измерений по стационарной флуориметрии, рефлектометрии, спектрофотометрии интегрирующих сфер, а так же светооптической и флуоресцентной микроскопии.

Экспериментальная установка для спектрально-флуоресцентных исследований нормальных и патологических биотканей представляет собой автоматизированный лазерно-спектроскопический комплекс на базе монохроматора/спектрографа MS3504i сопряженного с CCD-камерой HS-102H-2048/14 (*Hamamatsu, Япония*) и волоконно-оптической системой доставки и сбора фотосигналов с одинаковой геометрией возбуждения и регистрации сигналов флуоресценции и диффузного отражения. Возбуждение спектров F_{λ} осуществлялось с использованием азотного лазера марки ЛГИ-505 на длине волны 337.1 нм, а спектров R_d при помощи ксеноновой лампы ДКсШ-150 в интервале 300-800 нм. Измерение спектральных коэффициентов полного пропускания T_{λ} и R_{λ} полного отражения биотканей проводилось по стандартной схеме с одной интегрирующей сферой Avasphere-100 (*Avantes, Нидерланды*).

Исследование гистоморфологических свойств биотканей проводилось с использованием комплекса аппаратно-программного определения морфометрических параметров биоматериалов «Мекос-Ц2» (ЗАО «Медицинские компьютерные системы», г. Москва). Для проведения

исследований по флуоресцентной микроскопии использовался отечественный люминесцентного микроскопа ЛЮМАМ-И2 (ЛОМО, г. Санкт-Петербург) сопряженный с встроенной зеркальной CCD-камерой EOS 450D (Canon, Япония). Возбуждение флуоресценции осуществлялось на длине волны 365 ± 10 нм при общем увеличении изображения до $250 \times$. Анализ флуоресцентных снимков проводился при разложении их в формате RGB.

Третий параграф главы посвящен описанию методик обработки экспериментальных данных – определению спектров оптических показателей поглощения μ_a , рассеяния μ_s и фактора анизотропии g для исследуемых биотканей на основе результатов измерений коэффициентов T_i , R_i и T_c . В данной работе определение показателей μ_a , μ_s и g было выполнено на основе решения обратной задачи рассеяния в рамках 3-х потоковой модели переноса излучения [5,6]. В заключение главы приводятся основные источники систематических и случайных погрешностей, методики их устранения и анализ погрешности оптических измерений.

Третья глава посвящена описанию результатов экспериментальных исследований спектральных характеристик стационарных оптических, флуоресцентных и микроскопических свойств биотканей при различных стадиях патологического процесса.

Первый параграф главы посвящен исследованиям спектров лазерно-индуцированной флуоресценции и диффузного отражения нормальных и пораженных биотканей *in vivo*. Дан качественный анализ полученным результатам и на его основе выдвинут ряд предположений о формировании спектров флуоресценции и диффузного отражения, а так же происходящих в них изменениях по мере развития степени поражения.

Характерные спектры стационарной флуоресценции F_d и диффузного отражения R_d , усредненные по сериям измерений и видам заболевания, для нормальных и патологически измененных биотканей показаны, соответственно, на рис.1(a)-1(d). Как показывает амплитудный анализ флуоресцентных данных, спектры F_d и R_d для всех исследуемых патологических состояний характеризуются наличием общих свойств и закономерностей. Так, например, стационарная флуоресценция здоровых биотканей при возбуждении азотным лазером образует спектральный контур с максимумом вблизи 475 ± 10 нм и тремя плечами в области длин волн 405 ± 10 , 550 ± 10 и 610 ± 10 нм. По мере развития патологических процессов происходит снижение интенсивности флуоресценции до 2 раз для средней стадии, в 3-4 раза для высоких стадий и в 5-6 раз при крайней стадии поражения, а так же сдвиг главного максимума в коротковолновую область спектра с изменяющимся вкладом спектральных компонент. В сравнении с этим, спектральный контур коэффициента диффузного отражения биотканей в норме характеризуется наличием локальных минимумов на длинах волн 350, 420, 550 и 580 нм, (полосы поглощения Сорэ и смеси окси- и деозксигемоглобина, а так же интенсивным длинноволновым крылом. При этом развитие патологии (от нормы до крайней степени поражения) приводит

к снижению коэффициента диффузного отражения до 3 раз вдоль всего спектрального интервала.

Во втором параграфе главы приводятся результаты расчетов спектрального распределения оптических показателей поглощения, рассеяния и фактора анизотропии для исследуемых биотканей *in vitro*. Выявлены закономерности и характерные особенности спектральной зависимости оптических параметров от степени патологии. Обнаружено, что для всех исследуемых форм патологии с ростом длины волны наблюдается уменьшение показателя рассеяния до 2 раз и рост фактора анизотропии. В то же время, спектр показателя поглощения достигает максимума в области длин волн 300-400 нм и монотонно снижается в сторону длинноволновой области спектра с минимумом на участке 700-750 нм, где интенсивность поглощения может быть до 100 раз меньше своего максимального значения. Кроме того, обнаружено, что зависимость оптических свойств биотканей от степени их патологического поражения имеет сложный и многообразный характер. Так, например, относительно нормы при хроническом атрофическом гастрите и язвенном дефекте (средняя и высокая форма поражения) на фоне общего незначительного роста показателей рассеяния и фактора анизотропии обнаружено уменьшение показателя поглощения до 3 раз. В то же время, по мере развития полиповидных и злокачественных новообразований (высокая и крайняя стадия поражения) происходит увеличение μ_a до значений близких к здоровым биотканям, а μ_s – приблизительно до 2 раз выше нормы.

В третьем параграфе главы приведены результаты гистоморфологических и микрофлуоресцентных исследований ткани слизистой оболочки в норме и при различных стадиях поражения. В частности, обнаружено, что относительно нормы развитие патологических процессов средней и высокой формы на фоне общего роста концентрации клеточных структур приводит к уменьшению их геометрических размеров в 1.5-2 раза и инфильтрации воспалительными клетками, еще меньшего размера, а так же активному разрастанию соединительной ткани, в виде спирально-скрученных коллагеновых волокон. Однако по мере развития крайних форм поражения происходит увеличение размеров клеток и клеточных ядер до 2 раз при снижении ядерно-цитоплазматического индекса в 1.5 раза, что полностью объясняет характер поведения спектральной зависимости оптических показателей биотканей при исследуемых формах патологии. Сопоставление результатов микрофлуориметрии и гистоморфологии показывают, что исследуемые биоткани могут рассматриваться как однослойные полубесконечные мутные среды, поскольку эпителий, покрывающий слизистую основу не вносит изменений в общую картину флуоресценции, а толщина биоткани при всех формах патологии достаточна, для того чтобы при дальнейших исследованиях не учитывать влияние эффектов отражения и преломления, возникающих на границе раздела более глубоких слоев.

Анализ спектрального *rgb*-разложения флуоресцентных изображений исследуемых биотканей, показал, что наибольшая концентрация эндогенных флуорофоров – структурных белков (коллаген) и NAD(P)H, а так же флавопротеидов и порфиринов, представленные, соответственно, «синей», «зеленой» и «красной» компонентами разложения наблюдается в толще биосред и вокруг желез на участках скопления атипичных клеток и фиброзной ткани. По мере развития патологических процессов наблюдается снижение индекса степени энергетического обмена до 2 раз и увеличение индекса накопления порфиринов до 4 раз относительно нормы, что свидетельствует об угнетении флуоресценции флавиновых групп и возгорании NAD(P)H и группы производных порфиринов.

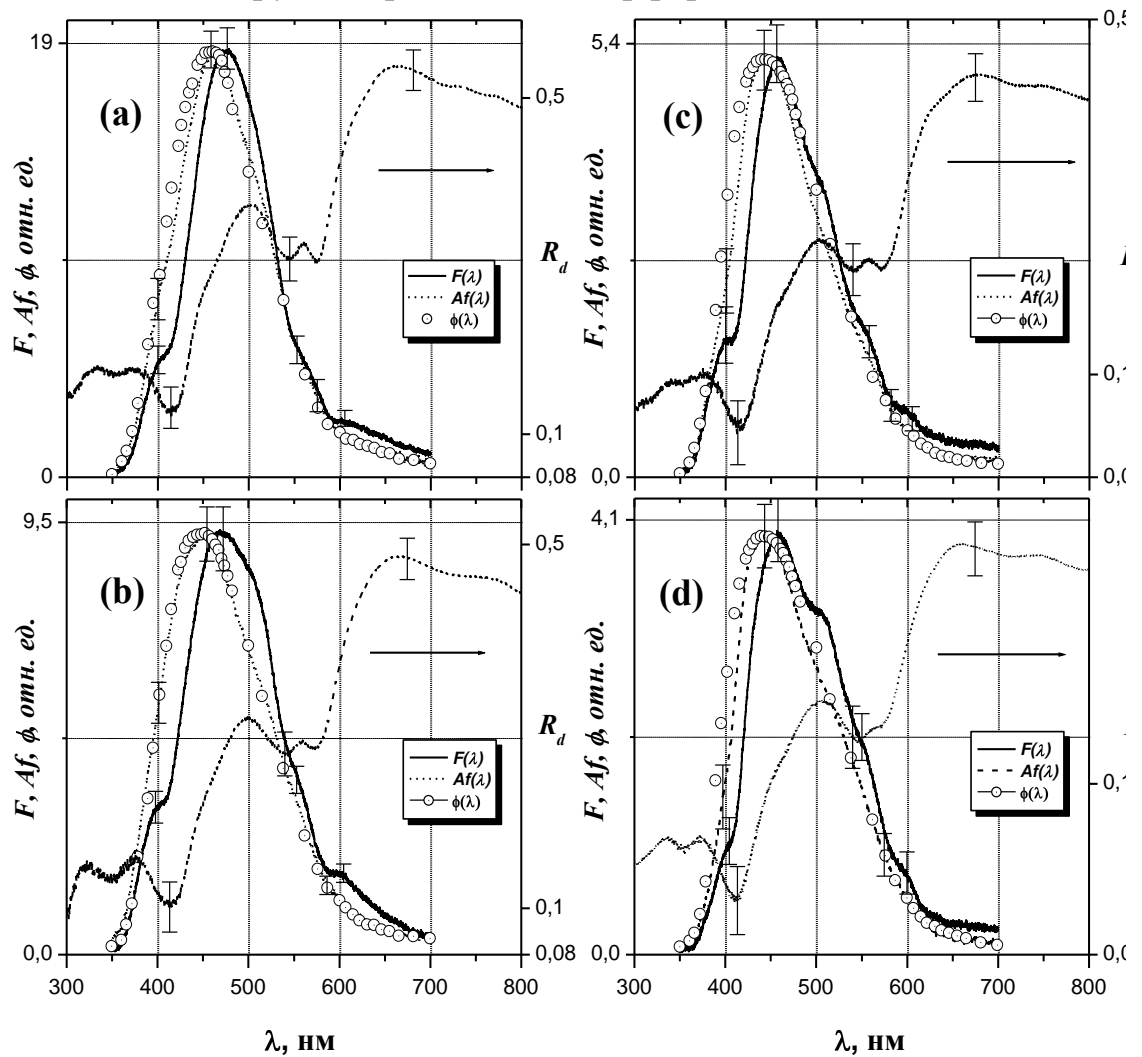


Рис. 1. Усредненные спектры флуоресценции F_{em} , диффузного отражения R_d , аутофлуоресценции Af_{em} и квантового выхода ϕ_{em} для биотканей. (a) – норма, (b) – средняя стадия поражения, (c) – высокая стадия поражения, (d) – крайняя стадия поражения. Спектры Af_{em} и ϕ_{em} нормированы к максимуму спектра флуоресценции F_{em} .

Четвертая глава диссертации посвящена анализу результатов экспериментального исследования оптических и флуоресцентных свойств нормальных и патологических биотканей.

Первый параграф главы посвящен анализу диффузно-оптических свойств исследуемых биотканей с использованием спектральных данных коэффициентов диффузного отражения и оптических показателей для биотканей *in vitro* путем внесения поправок на оптические свойства крови.

Анализ полученных результатов показывает, что наряду с общими характеристиками, спектрам оптических показателей исследуемых форм патологий присуще ярко выраженные индивидуальные особенности. Более наглядно эти различия заметны из таблицы №1. В частности, внесение поправок в спектры оптических показателей *in vitro* образцов биоткани показывает, что даже незначительное увеличение содержания крови в биотканях приводит к существенному росту показателя поглощения μ_a , преимущественно, вблизи длин волн 350, 420, 545 и 580 нм, что соответствует полосам фундаментального поглощения окси- и дезоксигемоглобина. В сравнении с этим, увеличение содержания крови в биотканях до 15% не оказывает значимого влияния на величину показателя транспортного рассеяния μ'_s , а его спектральная зависимость представляет собой кривую, снижающуюся с ростом длины волны и, по-видимому, полностью определяется, концентрацией и размерами оптических неоднородностей. В то же время, исследование влияния патологических процессов на оптические свойства биотканей *in vivo* позволило определить физиологические и структурно-морфологические параметры. В частности, установлено, что по сравнению с нормальными биотканями, развитие средней и высокой стадии поражения приводит к снижению уровня кровенаполнения ρ и кислородного насыщения α до 15%, тогда как при крайних формах поражения (полиповидные и злокачественные новообразования) наблюдается увеличение параметра ρ и уменьшение α . Обнаружено и подтверждено гистоморфологическими исследованиями, что для нормальных биотканей усредненная плотность рассеивающих центров составляет 3.3×10^5 , а их размер близок к рассеивателям Ми и по мере развития средней и высокой стадии поражения наблюдается увеличение плотности рассеивателей, соответственно, на 20% и 45%, и незначительное уменьшение размеров рассеивающих частиц. В то же время, развитие опухолевых дефектов приводит к увеличению размеров оптических неоднородностей и к уменьшению их концентрации в 1.6 раз для полипа и до 5 раз для аденокарциномы.

Таблица №1. Значения оптических показателей и параметров физиологических и структурно-морфологических свойств биотканей в норме и при различных патологических состояниях.

λ , нм	μ_a , мм ⁻¹	μ_s , мм ⁻¹	g	μ'_s , мм ⁻¹	ρ , %	α , %	a	b
<i>Нормальная биоткань</i>								
300	1.78±0.29	31.5±2.3	0.77	7.15±0.36	8.2±0.4	87.5±2.0	3.29×10 ⁵	1.85
400	2.1±0.3	29.5±2.2	0.79	5.82±0.36				
500	0.34±0.13	27.1±2.2	0.87	3.27±0.31				
600	0.14±0.02	24.9±2.0	0.9	2.5±0.3				
700	0.05±7e-3	23.3±2.0	0.92	1.87±0.21				
800	0.065±7e-3	22.1±2.0	0.92	1.77±0.20				
<i>Средняя стадия поражения биоткани</i>								
300	1.58±0.27	31.9±2.8	0.8	6.4±0.3	7.6±0.3	81.3±3.0	4.1×10 ⁵	1.92
400	1.5±0.3	30.7±2.5	0.84	4.8±0.3				
500	0.2±0.05	27.2±2.1	0.9	2.7±0.3				
600	0.076±0.011	25.8±2.0	0.92	2.0±0.2				
700	0.03±4e-3	24.0±2.0	0.94	1.5±0.1				
800	0.035±4e-3	22.2±2.0	0.94	1.35±0.17				
<i>Высокая стадия поражения (язвенный дефект)</i>								
300	1.32±0.31	33.7±3.0	0.82	6.1±0.3	6.5±0.4	72.4±4.0	4.82×10 ⁵	1.96
400	1.22±0.25	32.8±3.0	0.85	4.9±0.3				
500	0.17±0.02	30.9±3.0	0.91	2.75±0.31				
600	0.05±7e-3	26.4±2.1	0.92	2.1±0.2				
700	0.017±3e-3	25.2±2.1	0.94	1.5±0.1				
800	0.021±3e-3	23.5±2.0	0.94	1.4±0.1				
<i>Высокая стадия поражения (полип)</i>								
300	1.58±0.29	39.3±3.2	0.85	5.9±0.3	8.0±0.5	82.0±3.0	1.97×10 ⁵	1.81
400	1.6±0.3	38.9±3.3	0.89	4.5±0.3				
500	0.22±0.03	36.5±3.0	0.93	2.56±0.3				
600	0.1±0.02	32.8±3.0	0.94	1.95±0.22				
700	0.042±5e-3	29.3±2.4	0.95	1.45±0.1				
800	0.045±5e-3	28.6±2.0	0.96	1.2±0.1				
<i>Крайняя стадия поражения биоткани</i>								
300	1.8±0.3	44.6±3.3	0.88	5.35±0.34	9.1±0.3	77.9±5.0	6.28×10 ⁴	1.66
400	1.95±0.32	43.3±3.3	0.91	3.9±0.3				
500	0.26±0.04	41.7±3.1	0.95	2.1±0.2				
600	0.15±0.025	37.9±3.0	0.95	1.7±0.2				
700	0.06±7e-3	35.7±3.0	0.96	1.4±0.2				
800	0.07±7e-3	33.5±2.9	0.97	1.0±0.1				

Во втором параграфе главы приводится описание методики, используемой для выявления степени искажения измеренных спектров флуоресценции, а так же анализ результатов определения спектров аутофлуоресценции и квантового выхода для биотканей по мере развития патологических процессов. Согласно используемой методики [7,8],

проведение спектральных измерений $F_{\lambda_{em}}$ и $R_d_{\lambda_{em}}$ в едином спектральном интервале возбуждения λ_{ex} и эмиссии λ_{em} флуоресценции и при одинаковой геометрии возбуждения и регистрации фотосигналов позволило воспользоваться простой аналитической моделью для определения спектра аутофлуоресценции $Af_{\lambda_{em}}$ биоткани как:

$$Af_{\lambda_{em}} = F_{\lambda_{em}} R_d_{\lambda_{em}} \eta_{\lambda_{em}} \quad (1)$$

где $\eta_{\lambda_{em}} = \delta_{fl_{\lambda_{em}}} / \delta_{r_{\lambda_{em}}}$ – коэффициент пропорциональности, определяющий длину пробега рассеянных и не рассеянных фотонов, формирующих сигнал флуоресценции и диффузного отражения; $\delta_{fl_{\lambda_{em}}}$ и $\delta_{r_{\lambda_{em}}}$ – средняя глубина проникновения для фотонов флуоресценции и диффузного отражения; $\delta_{\lambda_{em}} = 1/\mu_{eff}$.

В тоже время, выражение для спектральной зависимости квантового выхода флуоресценции $\varphi_{\lambda_{em}}$ биостред может быть рассчитано в рамках диффузионного приближения теории переноса излучения как [9]:

$$\varphi_{\lambda_{em}} = F_{\lambda_{em}} \left\{ \mu_a_{\lambda_{ex}} A_{\lambda_{em}} \left[\frac{4\pi B_{\lambda_{ex}} + F_0}{\mu_t_{\lambda_{ex}} + \mu_{eff_{\lambda_{em}}}} + \frac{4\pi C_{\lambda_{ex}}}{\mu_{eff_{\lambda_{ex}}} + \mu_{eff_{\lambda_{em}}}} \right] \right\}^{-1} \quad (2)$$

где F_0 – интенсивность падающего света; μ_{eff} , μ_t и μ_a – оптические показатели; A , B и C – общее и частное решение уравнения диффузионного приближения [10].

Характерные спектры аутофлуоресценции $Af_{\lambda_{em}}$ и квантового выхода $\varphi_{\lambda_{em}}$ для нормальных и патологически измененных биотканей желудка показаны также, на рис. 1(a)-1(d). В ходе проведенных исследований было обнаружено, что влияние оптических эффектов приводит, как к искажению формы, так и к перераспределению интенсивности флуоресценции в биотканях по мере развития патологических процессов. В частности, относительно спектров флуоресценции $F_{\lambda_{em}}$ спектральные контуры аутофлуоресценции $Af_{\lambda_{em}}$ и квантового выхода $\varphi_{\lambda_{ex}, \lambda_{em}}$ всех исследуемых биотканей характеризуются наличием единственного максимума, сдвинутого в коротковолновую область примерно на 20 нм относительно главного максимума спектров $F_{\lambda_{em}}$, а так же отсутствием заметных впадин на длинах волн поглощения крови. Кроме того, показано, что для нормальных биотканей интенсивность $F_{\lambda_{em}}$ может до 13 раз превышать интенсивность $Af_{\lambda_{em}}$ и по мере развития крайних форм поражения наблюдается сокращение различия между $F_{\lambda_{em}}$ и $Af_{\lambda_{em}}$ до 4.6 ± 0.2 раз. В результате наименьшая интенсивность $Af_{\lambda_{em}}$ соответствует биотканям с язвенными дефектами, что до 2.6 раз ниже нормы, тогда как для биотканей при средней и крайней стадии поражения интенсивность $Af_{\lambda_{em}}$ заметно выше, что примерно в 1.68 раз меньше нормального значения. Развитие средней и высокой стадии поражения в биотканях приводит к увеличению степени искажения аутофлуоресценции $\eta_{\lambda_{em}}$ и, как следствие, к росту глубины ее

испускания I_{fl} до 1.5 раз, тогда как для крайней стадии наблюдается обратный эффект: уровень η и I_{fl} спадает до значений близких к норме. Обнаруженная зависимость аутофлуоресценции от степени патологического процесса хорошо согласуется с результатами оптических исследований биотканей и подтверждается данными квантового выхода флуоресценции. При этом типичное значение φ_{em} для нормальных биотканей составляет примерно 8.5×10^{-4} и уменьшается до 4 раз для высоких стадий поражения, а для крайней стадии – несколько растет.

В третьем параграфе приводятся результаты по спектральному разложению измеренной и скорректированной флуоресценции на вклады потенциальных групп флуорофоров для нормальных и патологических биотканей и дается анализ полученных результатов. Для проведения количественного анализа и получения информации о влиянии эффектов светорассеяния и поглощения на вклады эндогенных флуорофоров было проведено контурное разложение спектров F_{em} и Af_{em} методом Гауссовых-Лоренцевых кривых, заключающимся в итерационном моделировании теоретической кривой F_{gl} по среднеквадратичному ее отклонению от спектров F_{em} и Af_{em} как:

$$F_{gl} = rF_g + (1-r)F_l \quad (3)$$

где F_{gl} – фактор Гаусса-Лоренца, характеризующий относительный вклад в форму линий Гауссовой (F_l , для $r=1$) и Лоренцевой (F_g , для $r=0$) составляющих. Качество сходимости кривых определялось методом наименьших квадратов и проверялось по величине подгонки с погрешностью не более 5%.

В ходе проведения анализа, установлено наличие как минимум 7 групп эндогенных флуорофоров с изменяющимися вкладами в суммарные спектры свечения, из которых наибольший интерес вызывают группы спектрального разложения, соответствующие свечению NAD(P)·H и производные флавинов (FAD и FMN), поскольку они функционируют как коферменты дегидрогеназ в окислительно-восстановительных реакциях, выступая акцептором электронов субстрата. Так, например, восстанавливаясь, хромофор NAD(P) накапливает положительно заряженные ионы водорода H^+ и приобретает яркую флуоресценцию с небольшим сдвигом в коротковолновую область спектра, одновременно катализируя восстановление флавинового кофермента своей восстановленной формой [1,11]. В силу этого, любые изменения в клеточном метаболизме биотканей могут быть выявлены в динамике соотношений спектральных компонентов этих веществ. Основываясь на методе количественной оценки степени дыхательной активности митохондрий [10], в работе рассматривалось отношение площадей под кривыми 5 – S_{525nm}^5 и 4 – S_{460nm}^4 групп как отношение интенсивности флуоресценции флавинов – $F_{flavins}$ и NAD(P)·H – $F_{NAD(P)H}$ для

каждого патологического состояния: $\kappa_1 = \frac{S_{525\text{нм}}^5}{S_{460\text{нм}}^4} = \frac{F_{\text{flavins}}}{F_{\text{NAD(P)·H}}}$. По антологии с

этим, в работе были введены индексы, характеризующие степень фиброзной активности – κ_2 и накопления порфиринов – κ_3 определяемые нормировкой интенсивности свечения коллагеновой и порфириновой группы к интенсивности флуоресценции NAD(P)·H как отношение площадей под

кривыми 2, 7 и 4 группы: $\kappa_2 = \frac{S_{400\text{нм}}^2}{S_{460\text{нм}}^4} = \frac{F_{\text{collagen}}}{F_{\text{NAD(P)·H}}}$ и $\kappa_3 = \frac{S_{610\text{нм}}^7}{S_{460\text{нм}}^4} = \frac{F_{\text{porphirin}}}{F_{\text{NAD(P)·H}}}$.

Динамика индексов κ_1 , κ_2 , κ_3 определенных из результатов разложения спектров флуоресценции F_{em} и аутофлуоресценции Af_{em} по мере развития процессов малигнизации в исследуемых биотканей приведены в таблице №2. Как видно из таблицы, по мере воздействия патологического поражения происходит снижение вклада флуоресценции флавинов и увеличение вклада NAD(P)·H в суммарный спектр свечения, что свидетельствует об угнетении клеточного дыхания и развитии процесса истощения терминального окисления [10]. Вместе с этим, для крайних форм поражения наблюдается 4-х кратное возгорание спектральных групп, соответствующих коллагену и производным эндогенных порфиринов. В то же время вследствие наложения полос поглощения крови и эндогенных хромофоров, а так же высокого уровня объемного светорассеяния вклады спектральных компонентов, соответствующих флуоресценции коллагена и эластина могут быть ослаблены до 3 раз, а роль флавиновых и порфириновых групп завышена, соответственно, в 1.5 и 3 раза. Однако общая динамика соотношений этих флуорофоров в зависимости от стадии поражения биотканей, как для F_{em} , так и для Af_{em} остается неизменной.

Таблица №2. Индексы степени энергетического обмена, фиброзной активности, накопления порфиринов для биотканей при исследуемых формах патологии. Данные, помеченные значком * – соответствуют результатам разложения спектров аутофлуоресценции Af_{em} .

Стадии поражения	κ_1, κ_1^*	κ_2, κ_2^*	κ_3, κ_3^*
<i>Норма</i>	0.6±0.06	0.1±0.01	0.16±0.03
	0.4±0.04*	0.19±0.02*	0.08±0.01*
<i>Средняя стадия</i>	0.53±0.06	0.14±0.02	0.22±0.03*
	0.35±0.04*	0.26±0.03*	0.1±0.01*
<i>Высокая стадия (язвенный дефект)</i>	0.45±0.05	0.15±0.02	0.25±0.03*
	0.32±0.03*	0.32±0.04*	0.12±0.02*
<i>Высокая стадия (полп)</i>	0.4±0.04	0.11±0.02	0.24±0.02
	0.27±0.03*	0.29±0.02*	0.12±0.01*
<i>Крайняя стадия</i>	0.48±0.05	0.08±0.01	0.31±0.02
	0.33±0.03*	0.3±0.03*	0.16±0.05*

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИИ

1. Разработана экспериментальная установка и методики комплексного исследования спектрально-флуоресцентных и диффузно-оптических свойств биотканей в норме и при различных формах патологического процесса на основе спектров лазерно-индуцированной флуоресценции, диффузного отражения, оптических показателей поглощения, рассеяния и фактора анизотропии, а так же данных светооптической и флуоресцентной микроскопии.

2. Экспериментально обнаружена корреляционная зависимость между спектрально-флуоресцентными и диффузно-оптическими характеристиками биотканей *in vivo* и степенью их поражения, включая процессы малигнизации. Показано, что по мере развития патологических процессов происходит снижение интенсивности флуоресценции до 2 раз для средней стадии, в 3-4 раза для высоких стадий и в 5-6 раз при крайней стадии поражения.

3. Определены механизмы и закономерности формирования спектров аутофлуоресценции биотканей в процессе развития патологического поражения и установлено, что влияние эффектов множественного светорассеяния и оптического поглощения приводит, как к искажению формы, так и к перераспределению интенсивности аутофлуоресценции. В частности, развитие средней и высокой стадии поражения сопровождается увеличением степени искажения аутофлуоресценции $\eta_{\text{фл}}$ и, как следствие, ростом глубины ее испускания $l_{\text{фл}}$ до 1.5 раз, тогда как для крайней стадии наблюдается обратный эффект: уровень $\eta_{\text{фл}}$ и $l_{\text{фл}}$ спадает до значений близких к норме. В результате интенсивность флуоресценции может до 13 раз превышать интенсивность аутофлуоресценции.

4. Обнаружено, что спектральные распределения аутофлуоресценции и квантового выхода для исследуемых биотканей совпадают с заданной точностью и характеризуются наличием единственного максимума, сдвинутого в коротковолновую область примерно на 20 нм относительно главного максимума спектров флуоресценции. При этом типичное значение квантового выхода для нормальных биотканей составляет примерно 8.5×10^{-4} и уменьшается до 4 раз для высоких стадий поражения, а для крайней стадии – незначительно растет, что достоверно указывает на рост безизлучательной дезактивации флуоресценции вследствие процессов тушения и миграции энергии в патологически измененных биотканях.

5. На основе систематических исследований установлено, что суммарные спектры флуоресценции и аутофлуоресценции определяются, как минимум, излучением 7 групп флуорофоров, из которых основной вклад в суммарные спектры вносят группы NAD(P)·H, структурных белков, а так же производные флавинов и эндогенных порфиринов. Показано, что по мере развития крайних форм поражения наблюдается снижение вклада флуоресценции флавинов и

увеличение вклада $\text{NAD(P)}\cdot\text{H}$, а также 4-х кратное возгорание коллагеновых и порфириновых групп в результирующем спектре аутофлуоресценции.

6. При помощи решения обратной задачи уравнения переноса излучения определены спектры оптических показателей поглощения, рассеяния и фактора анизотропии для биотканей при исследуемых формах патологического поражения. Обнаружено, что по сравнению с нормой для средней и высокой стадии поражения наблюдается уменьшение показателя поглощения до 3 раз, тогда как развитие крайних форм поражения сопровождается увеличением μ_a до значений, близких к здоровым биотканям, а μ_s – приблизительно до 2 раз выше нормы.

7. Выполнен сравнительный анализ спектральной зависимости оптических свойств биотканей и результатов гистоморфологических исследований, что позволило достоверно определить динамику физиологических и структурно-морфологических параметров биотканей в зависимости от степени патологического состояния. В частности:

- Установлено, что относительно нормы развитие средней и высокой стадии поражения приводит к снижению уровня кровенаполнения p и кислородного насыщения α биотканей, тогда как при крайних формах поражения наблюдается увеличение параметра p и уменьшение α .
- Обнаружено, что для нормальных биотканей плотность рассеивающих центров составляет 3.3×10^5 , а их усредненный размер близок к рассеивателям Ми. При этом развития средней и высокой стадии поражения приводит к увеличению плотности рассеивателей, соответственно, на 20% и 45%., тогда как для крайней стадии поражения наблюдается увеличение размеров оптических неоднородностей и уменьшение их концентрации в 1.6 и 5 раз, соответственно, для полипа и злокачественных новообразований.

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

Статьи, опубликованные в журналах, включенных в Перечень ВАК:

1. Гираев К.М., Ашурбеков Н.А., Меджидов Р.Т. Стационарная спектроскопия биотканей *in vivo*: флуоресцентные исследования некоторых патологических состояний// Оптика и спектроскопия. 2003. Т.95. №5 С. 874-879.

2. Гираев К. М., Ашурбеков Н.А., Кобзев О.В. Оптические исследования биотканей: определение коэффициентов поглощения и рассеяния// Письма в ЖТФ. 2003. Т.29, №12 С. 48-54.

3. Гираев К.М., Ашурбеков Н.А. и др. Влияние многократного рассеяния на спектры аутофлуоресценции и квантовый выход патологических состояний живых объектов// Известие вузов. Сев.-Кав. регион. Естественные науки. 2007. № 3. С. 33-37.

4. Гираев К. М., Ашурбеков Н. А., Меджидов Р.Т. и др. Исследование влияния патологических процессов на диффузно-оптические свойства биообъектов// Известие вузов. Сев.-Кав. регион. Естественные науки. 2007. № 4. С. 26-29.

Статьи, опубликованные в зарубежных журналах:

1. Ashurbekov N.A., Giraev K.M., Medjidov R.T. The Device for Luminescent Laparoscopy// Endoscopic Surgery. 1999. V. 58, P. 258-259.

2. Giraev K.M., Ashurbekov N.A., Medjidov R.T. Fluorescent-spectroscopic research of in vivo tissues' pathological conditions// Int. J. Modern Phys. B. 2004. V.18. P. 899-910.

3. Giraev K.M., Ashurbekov N.A., Kobsev O.V. Optical spectra of some pathological conditions of stomach tissues// Int. J. Modern Phys. B. 2006. V. 20. P. 25-36.

Другие публикации:

1. Гираев К.М., Ашурбеков Н.А., Меджидов Р.Т. Исследование влияния патологических процессов на структурные и физиологические свойства ткани печени методом флуоресцентной микроскопии// Вестник ДГУ. Естественные науки. 2007. №3. С. 8-14.

2. Гираев К.М., Ашурбеков Н.А., Турциев Р.Г. Спектрально-флуоресцентные исследования биотканей с эрозивными поражениями// Вестник ДГУ. Естественные науки. 2007. №4. С. 15-20.

3. Гираев К.М. Флуоресцентная микроскопия как метод изучения аутофлуоресценции микроструктур биоткани// Вестник ДГУ. Естественно-технические науки. Выпуск I. 2001. С.25-29.

4. Giraev K.M., Medjidov R.T., Ashurbekov N.A. The Luminescent Laparoscopy in Hepatology. International Endoscopy of Hepatology// Falk Symposium №116. Basel. – 1999. P.29-32.

5. Гираев К.М, Ашурбеков Н.А. Аутофлуоресцентная спектроскопия воспалений стенок желчного пузыря// Материалы II Всероссийской конференции «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины». М. 2001. С.195-196.

6. Гираев К.М. Влияние воспалительного процесса на лазерно-индуцированную флуоресценцию ткани печени// Материалы ВНКСФ-7. С.-Петербург. 2001. С.107-109.

7. Гираев К.М., Ашурбеков Н.А., Омаров О.А. Флуоресцентная спектроскопия тканей толстого кишечника: количественный анализ и диагностика// Труды Международного форума по проблемам науки, техники и образования. М. 2002. Т.3 С.114-118.

8. Гираев К. М., Ашурбеков Н.А., Кобзев О.В. Определение оптических показателей случайно-неоднородных сред. // Материалы III всероссийской конференции «Физическая электроника». Махачкала. – 2003. С. 124-130.

9. Гираев К.М., Ашурбеков Н.А., Омаров О.А. Диффузионно-оптические исследования и количественный анализ патологических состояний

биообъектов// Материалы IV Всероссийской конференции «ФЭ-2006». Махачкала – 2006. С. 122-127.

10. Гираев К.М., Ашурбеков Н.А., Омаров О.А. Исследование квантового выхода и истинных спектров флуоресценции патологических состояний живых объектов// Материалы IV Всероссийской конференции «ФЭ-2006». Махачкала – 2006. С. 128-133.

11. Гираев К.М., Ашурбеков Н.А., Омаров О.А. Изучение патологических состояний биообъектов методом стационарной флуоресцентной спектроскопии// Международная конференция «Фазовые переходы, критические и нелинейные явления в конденсированных средах». Махачкала – 2007. С. 277-280.

12. Гираев К.М., Ашурбеков Н.А., Омаров О.А., Исследование влияния процессов малигнизации на оптические и физиологические параметры биообъектов// Международная конференция «Фазовые переходы, критические и нелинейные явления в конденсированных средах». Махачкала – 2007. С. 281-284.

13. Гираев К.М., Ашурбеков Н.А., Абуев Э.А. Спектрально-флуоресцентные исследования биотканей с предопухолевыми патологическими дефектами// Материалы V Всероссийской конференции «ФЭ-2008». Махачкала – 2008. С. 196-202.

14. Гираев К.М., Ашурбеков Н.А., Абуев Э.А. Исследование термокоагуляционного воздействия на спектральные и структурные параметры нормальных и опухолевых биотканей методом флуоресцентной микроскопии// Материалы V Всероссийской конференции «ФЭ-2008». Махачкала – 2008. С. 203-208.

15. Гираев К.М., Ашурбеков Н.А., Расулов М.Т. и др. Гистоморфологические исследования структурной термомодификации нормальных и опухолевых биотканей методом светооптической микроскопии// Материалы V Всероссийской конференции «ФЭ-2008». Махачкала – 2008. С. 209-214.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Оптическая биомедицинская диагностика. В 2 том. / Пер. с англ. Под ред. В.В. Тучина – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2007.

2. В.В. Тучин Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та. 1998. 348 с.

3. В.А. Лисовский, В.В. Щедрунов, И.Я. Барский. Люминесцентный анализ в гастроэнтерологии. Л.: Наука, 1984. 236 с.

4. N. Ramanujam. Fluorescence Spectroscopy In Vivo. Encyclopedia of Analytical Chemistry. R.A. Meyers (Ed.) John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000. P. 20-56.

5. Van Gemert M.J.C., Schets G.A.C., Bishop M.S. et al.// Laser Life Sci. 1988. V.1. P.1-18.

6. Burger T., Kuhn J., Caps R. et. al.// Appl. Spectrosc. 1997. V.51. P.309–317.

7. D.C.G. de Veld, M. Skurichina, M.J.H. Witjes et. al.// Lasers in Surgery and Medicine 2005. V.36, P.356-364.
8. S.K. Chang, D. Arifler, R. Drezek et.al. // JBO. 2004. V.9, PP. 511–522
9. А. Исимару. Распространение и рассеяние волн в случайно-неоднородных средах. М.: Мир, 1981. – 280 с.
10. В. Н. Карнаухов.// Цитология. 1976, Т.18, С. 408-412.
11. А. Ленинджер. Биохимия. М.: МИР, 1976. – 958 с.