

КОНФЕРЕНЦИИ И СИМПОЗИУМЫ

Методы оптической биомедицинской визуализации: от субклеточных структур до тканей и органов

И.В. Турчин

Оптические методы визуализации биообъектов характеризуются большим разнообразием приложений в медико-биологических исследованиях, наиболее яркие из которых: изучение субклеточных структур с разрешением отдельных молекул, исследование молекулярных процессов на уровне целого организма лабораторных животных, структурная и функциональная клиническая диагностика тканевых слоёв и органов. Описаны физические основы, области применения и достижения последних лет флуоресцентной микро- и макроскопии, оптической когерентной томографии, оптоакустической томографии, светодиодной диффузионной спектроскопии и томографии.

Ключевые слова: оптика биотканей, биофотоника, оптическая когерентная томография, флуоресцентная микроскопия, наноскопия, оптоакустика, оптическая диффузионная томография, флуоресцентные агенты, флуоресцирующие белки, апконвертирующие флуорофоры, STED, STORM

PACS numbers: 42.25.Dd, 42.62.Be, 43.35.Sx, **87.64.**–t, 87.64.Cc

DOI: 10.3367/UFNr.2015.12.037734

Содержание

1. Введение (550).
2. Флуоресцентная микроскопия (552).
 - 2.1. Многофотонная микроскопия. 2.2. Наноскопия. 2.3. Оптическая проекционная томография и светоплоскостная микроскопия.
3. Оптическая когерентная томография (555).
 - 3.1. Клинические приложения оптической когерентной томографии. 3.2. Высокоскоростная оптическая когерентная томография и анализ спекл-структуры. 3.3. Спектроскопическая оптическая когерентная томография. 3.4. Оптическая когерентная микроскопия. 3.5. Оптическое контрастирование в оптической когерентной томографии. 3.6. Автоматизированное распознавание патологий с помощью обработки изображений оптической когерентной томографии.
4. Оптоакустика (558).
 - 4.1. Глубина визуализации в оптоакустике. 4.2. Пространственное разрешение в оптоакустике. 4.3. Разделение хромофоров в оптоакустике. 4.4. Оптоакустические микроскопия и томография. 4.5. Биомедицинские приложения оптоакустики.
5. Оптические диффузионные спектроскопия и томография (560).
 - 5.1. Общие сведения об оптической диффузионной спектроскопии. 5.2. Непрерывный, импульсный и модуляционный подходы в оптической диффузионной спектроскопии. 5.3. Общие сведения об оптической диффузионной томографии. 5.4. Граничные усло-

- вия в оптической диффузионной томографии. 5.5. Решение обратной задачи оптической диффузионной томографии. 5.6. Другие светодиодные методы исследования биотканей.
 6. Флуоресцентные макроскопические методы визуализации (562).
 - 6.1. Поверхностные флуоресцентные методы исследования биотканей. 6.2. Флуоресцентная томография. 6.3. Флуоресцентные проекционные методы исследования биотканей. 6.4. Спектральное и времязрешённое разделение флуорофоров. 6.5. Флуоресцентные маркеры. 6.6. Флуоресцентная визуализация в ближнем инфракрасном диапазоне.
 7. Заключение (565).
- Список литературы (565).

1. Введение

Распространение светового пучка в биологических тканях определяется рассеянием фотонов на микронеоднородностях диэлектрической проницаемости и поглощением эндогенными и экзогенными хромофорами [1]. В результате поглощения фотонов хромофорами тканей могут происходить различные физические явления, например выделение тепла, приводящее к локальному термоупругому расширению биоткани, ответственному за генерацию оптоакустической волны. Кроме того, существуют биологические структуры, обладающие собственной флуоресценцией, при поглощении света излучающие фотоны с большей длиной волны (стоксов сдвиг). При высокой интенсивности излучения может происходить многофотонная флуоресценция, при которой когерентное поглощение сразу нескольких фотонов приводит к излучению одного фотона с длиной волны, меньшей, чем у возбуждающего излучения. Изменение длины волны зондирующего излучения может возникать и вследствие неупругого (комбинационного) рассеяния

И.В. Турчин. Институт прикладной физики РАН,
ул. Ульянова 46, 603950 Нижний Новгород, Российская Федерация
Тел. 7 (831) 436-80-10
E-mail: ilya@ufp.appl.sci-nnov.ru

Статья поступила 22 января 2016 г.

Таблица. Оптические методы исследования биотканей и соответствующие им значения предельной глубины визуализации и пространственного разрешения

Метод	Контраст	Глубина визуализации	Разрешение*
Микроскопия	Яркость флуоресценции	1 мкм	10 нм
		200 мкм	3(0,3) мкм
		1 мм	6 мкм
Оптическая когерентная томография	Показатель обратного рассеяния, степень деполаризации	0,4 мм	1 мкм
		2 мм	10 мкм
Оптоакустическая визуализация	Показатель поглощения	3 мм	15(45) мкм
		5 см	700 мкм
Светодиффузионные методы	Показатель поглощения и транспортный показатель рассеяния	10 см	1 см
Макроскопические флуоресцентные методы	Яркость флуоресценции	10 см	1 см

* Без скобок указано продольное разрешение, в скобках — поперечное.

света. Упругое рассеяние приводит к таким эффектам, как размытие пучка подсветки, обратное рассеяние, а также к поляризационным эффектам.

Каждое из перечисленных выше физических явлений может быть использовано в качестве оптического контраста для формирования изображения внутренней структуры биоткани. В таблице представлены оптические методы исследования биотканей, соответствующие им предельные глубины визуализации, пространственное разрешение и оптический контраст, на котором формируется их изображение. Каждый из методов основан на зондировании биоткани пучком подсветки и регистрации рассеянного света, флуоресценции или акустической волны.

Эффектами, ограничивающими глубину визуализации и пространственное разрешение, являются соответственно эффекты поглощения и рассеяния, причём если показатель рассеяния биотканей плавно зависит от длины волны, то показатель поглощения имеет сложную характеристику, представленную на рис. 1 [2]. В диапазоне длин волн 600–1300 нм, называемом терапевтическим окном прозрачности, поглощение биоткани относительно невелико, однако наименьший показатель поглощения находится в ещё более узком диапазоне — 700–900 нм. Именно в этом диапазоне проводятся исследования на максимальной глубине — до 10 см. При приближении к коротковолновой части оптического спектра (фиолетовому и ультрафиолетовому диапазонам) глубина проникновения света в ткани ограничивается сильным поглощением меланина и крови. В области длинноволновой части спектра основным хромофором, ограничивающим применение оптики для глубинной визуализации, является вода.

Пространственное разрешение оптических методов ухудшается с увеличением глубины вследствие сильного светорассеяния, приводящего к размытию пучка под-

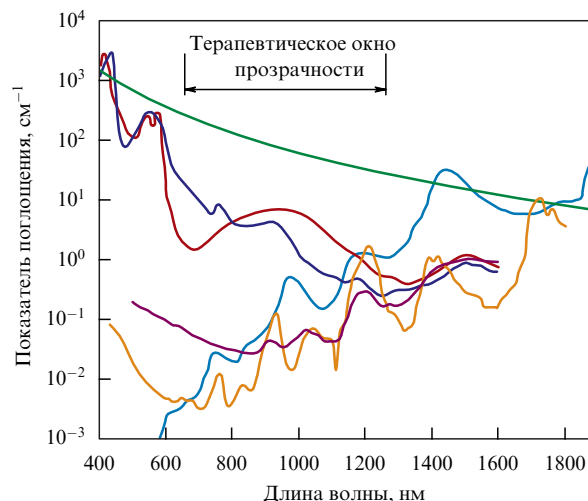


Рис. 1. (В цвете онлайн.) Спектры показателей поглощения эндогенных хромофоров. Красным и синим цветом показаны соответственно окси- и дезоксигемоглобин в концентрации 150 г л^{-1} [3]; голубым — вода, коричневым — липиды, зелёным — меланин [4], фиолетовым — коллаген [5, 6].

светки. На различных глубинах реализуются различные режимы распространения света.

На глубинах менее 1–2 длин свободного пробега фотона зондирующий пучок распространяется, не испытывая рассеяния, что позволяет достичь предельного оптического разрешения, равного дифракционному пределу. В этом узком поверхностном слое (около 100–200 мкм) реализуются методы оптической микроскопии. В разделе 2 рассмотрены также методы наноскопии, пространственное разрешение которых превышает дифракционный предел, однако эти методы работают в ещё более узком слое, толщиной порядка 1 мкм).

На больших глубинах пучок подсветки уширяется из-за эффектов рассеяния, но вследствие специфики индикатрисы рассеяния малоугловое рассеяние преобладает над рассеянием на большие углы, и на глубинах до 1–2 транспортных длин пробега фотона (около 1–2 мм) пучок подсветки ещё сохраняет свою структуру. В этом диапазоне глубин хорошо зарекомендовали себя так называемые когерентные методы исследования биотканей, в частности описанная в разделе 3 оптическая когерентная томография (ОКТ), в которой фотоны, обратно рассеянные биотканью, регистрируются с разрешением по времени.

На глубинах в несколько транспортных длин пробега фотона свет становится диффузным, т.е. фотоны полностью "забывают" о своём первоначальном направлении распространения. Очевидно, что на таких глубинах достичь приемлемого пространственного разрешения чисто оптическими методами крайне сложно.

Задача оптической диффузионной томографии (ОДТ) является некорректной, и для её решения требуются учёт формы объекта исследования, наличие большого числа проекций, полученных с высоким отношением сигнал/шум, применение сложных итерационных алгоритмов, существенно отличающихся от методов, используемых в рентгеновской томографии и т.д. Высокое пространственное разрешение на больших (более 1–2 транспортных длин пробега фотона) глубинах может быть достигнуто только при сочетании оптических и каких-либо

других методов (ультразвуковых, магнитно-резонансных, рентгеновских), в которых рассеяние почти не сказывается при получении изображений. Так, например, большого успеха в последние годы достигли оптоакустические (ОА) методы визуализации, в которых локация светопоглощающих хромофоров осуществляется с помощью ультразвука.

Для установления физических ограничений оптических методов визуализации, их проектирования и построения алгоритмов реконструкции внутренней структуры биотканей крайне важным является описание процессов распространения света в этих средах. В большинстве случаев распространение света в биотканях хорошо описывается уравнением переноса излучения (УПИ) [7], за исключением проявления когерентных эффектов [1]. В общем случае УПИ является интегро-дифференциальным уравнением, не имеющим аналитического решения, поэтому в задачах оптической визуализации биотканей используются различные его приближения (закон Бугера–Ламберта–Бера, малоугловое и диффузионное приближения), которые были развиты ранее в теории подводного и атмосферного видения. Сегодня одним из наиболее эффективных численных способов решения УПИ является моделирование с помощью метода Монте-Карло (МК) — метод статистического моделирования траекторий фотонов в рассеивающей и поглощающей среде. В последнее время разработчикам МК-кодов удалось значительно сократить время расчёта оптического поля благодаря не столько увеличению тактовой частоты процессора (которая в последние несколько лет практически не изменялась), сколько применению многопроцессорных вычислителей, в частности графических процессоров (Graphic Process Unit — GPU), имеющих порядка 1000 ядер [8].

Оптическое изображение может формироваться на вариациях показателей рассеяния, поглощения и яркости флуоресценции биоткани, характеризующих её функциональное и структурное состояния. Именно высокий контраст этих величин является отличительной особенностью оптических методов визуализации по сравнению с ультразвуковыми и рентгеновскими методами. Так, например, злокачественные новообразования характеризуются повышенным показателем рассеяния вследствие увеличенного ядерно-цитоплазматического соотношения. Основные хромофоры ткани (окси- и дезоксигемоглобин, вода, жир, меланин, коллаген), являющиеся показателями функционального состояния биоткани, имеют различные спектры поглощения, что позволяет реконструировать компонентный состав методами оптической спектроскопии.

Следует отметить, что для определения показателя поглощения биоткани в терапевтическом окне прозрачности свет должен пройти достаточно большое расстояние, поскольку в этом диапазоне показатель поглощения много меньше показателя рассеяния. Это означает, что свет должен испытать многократное рассеяние, чтобы в проходящем пучке появилась информация о поглощённых фотонах, поэтому спектроскопия биотканей реализуется светодиффузионными методами, описанными в разделе 5.

В микроскопии, где глубина исследования не превышает 1–2 длин свободного пробега фотона, восстановление компонентного состава возможно с применением рамановской спектроскопии [9] или флуоресцентной

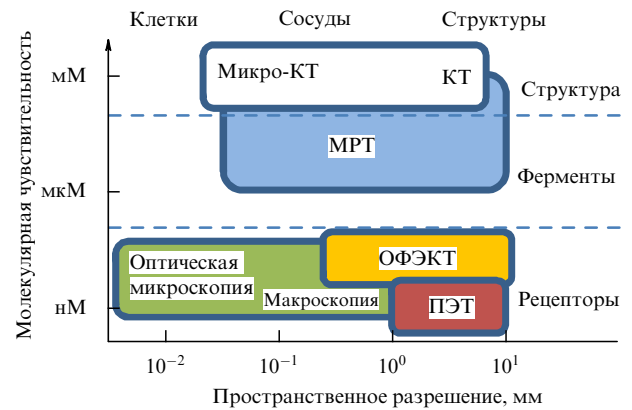


Рис. 2. Сравнение молекулярной чувствительности различных методов визуализации: КТ — компьютерная томография, МРТ — магнитно-резонансная томография, ОФЭКТ — однофотонная эмиссионная компьютерная томография [10]. Клеточное и субклеточное разрешение в оптической микроскопии возможно лишь на небольших глубинах.

визуализации, т.е. при изменении длины волны регистрируемого излучения относительно длины волны зондирующего.

Наибольший контраст при визуализации структуры биоткани может быть достигнут при использовании флуоресцентных методов, поскольку спектральные полосы зондирующего и регистрируемого излучений легко разделяются с помощью светофильтров. Кроме эндогенных флуоресцентных контрастов существует множество экзогенных маркеров высокой яркости (флуоресцентные белки (ФБ), органические красители, искусственно синтезированные наноагенты), которые могут быть специфически присоединены к определённым биологическим структурам. Такое специфическое окрашивание позволяет говорить о молекулярном имиджинге, который по чувствительности на данный момент может сравниться лишь с методами позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) (рис. 2).

Оптические методы визуализации биотканей применяются для самых различных медико-биологических задач, решаемых на самых разных масштабах: субклеточном, клеточном, масштабах тканевых слоёв, а также на уровне целого организма (мелких лабораторных животных) и органов человека (молочная железа, мышцы и головной мозг). Соответствующие этим масштабам оптические методы, их физические основы, преимущества и недостатки описаны в разделах 2–6. Флуоресцентные методы визуализации биотканей подразделяются на микроскопические (см. раздел 2) и макроскопические (см. раздел 6) по максимальной глубине исследования — не превышающей 1–2 длин свободного пробега фотона в микроскопии и большей в макроскопических методах.

2. Флуоресцентная микроскопия

Как отмечалось в разделе 1, оптические методы визуализации, работающие в узком слое, толщиной в 1–2 длины свободного пробега фотона, не позволяют получать информацию о рассеивающих и поглощающих свойствах объекта. Фазово-контрастная микроскопия, использующая в качестве контраста скачок показателя преломления, позволяет получать лишь контуры био-

объектов, что даёт весьма ограниченную информацию об объекте исследования. Поэтому в микроскопии преимущественно применяются методы, в которых зондирующее и регистрируемое излучение имеют различные длины волн, — рамановская и флуоресцентная микроскопии.

Основными направлениями развития современной микроскопии являются: применение многофотонных флуоресцентных методов (двухфотонная и трёхфотонная микроскопия, генерация второй гармоники); проведение исследований с пространственным разрешением, превышающим дифракционный предел (наноскопия), повышение информативности посредством дополнительных измерений, в частности времени релаксации флуорофоров, и привлечения рамановской спектроскопии; получение объёмных изображений на уровне органов и организмов; внедрение микроскопии в медицинскую диагностическую практику.

2.1. Многофотонная микроскопия

Эндогенные флуорофоры, такие как коллаген и эластин, эффективно возбуждаются в области длин волн 400–450 нм, где показатель поглощения ткани достаточно велик, что ограничивает возможности однофотонной микроскопии в приложениях *in vivo*. Двухфотонное возбуждение частично снимает это ограничение, так как на удвоенной длине волны (около 800 нм) поглощение света в биотканях гораздо меньше. Поскольку квантовый выход многофотонных процессов пропорционален интенсивности возбуждающего излучения, для эффективной генерации флуоресценции требуется огромная плотность мощности — на уровне от 1 МВт см⁻² до нескольких ГВт см⁻² [11], которой можно достичь, применяя остросфокусированные фемтосекундные лазерные импульсы [12]. Преимущество многофотонной микроскопии над однофотонной заключается также в улучшенной функции размытия точки (ФРТ), которая имеет структуру, практически лишённую боковых лепестков благодаря быстрому убыванию интенсивности флуоресценции при удалении от области фокуса.

Коммерчески доступный конфокальный лазерный сканирующий многофотонный микроскоп для исследований *in vivo* создан компанией JenLab (Германия). С помощью таких микроскопов проводятся, например, исследования *in vivo* на лабораторных животных миграции стволовых клеток в тканях [13] и клиническая диагностика кожных заболеваний [14, 15].

Многофотонная микроскопия биотканей обычно ограничивается двухфотонными процессами, однако три года назад впервые появились данные по применению трёхфотонной микроскопии живых объектов, позволившей получить изображения структуры нейронной сети мозга лабораторного животного, меченной красным флуоресцентным белком, на глубине до 1,2 мм с разрешением около 5 мкм при возбуждении на длине волны 1700 нм (рис. 3). Столь высокая глубина визуализации с микроскопическим разрешением стала возможной благодаря тому, что на данной длине волны показатель поглощения воды имеет локальный минимум, а показатель рассеяния примерно в три раза меньше, чем при возбуждении в диапазоне длин волн 800–900 нм, традиционно используемом в двухфотонной микроскопии. Таким образом, возбуждающее излучение на длине волны 1700 нм, хотя оно и затухает быстрее, сохраняет

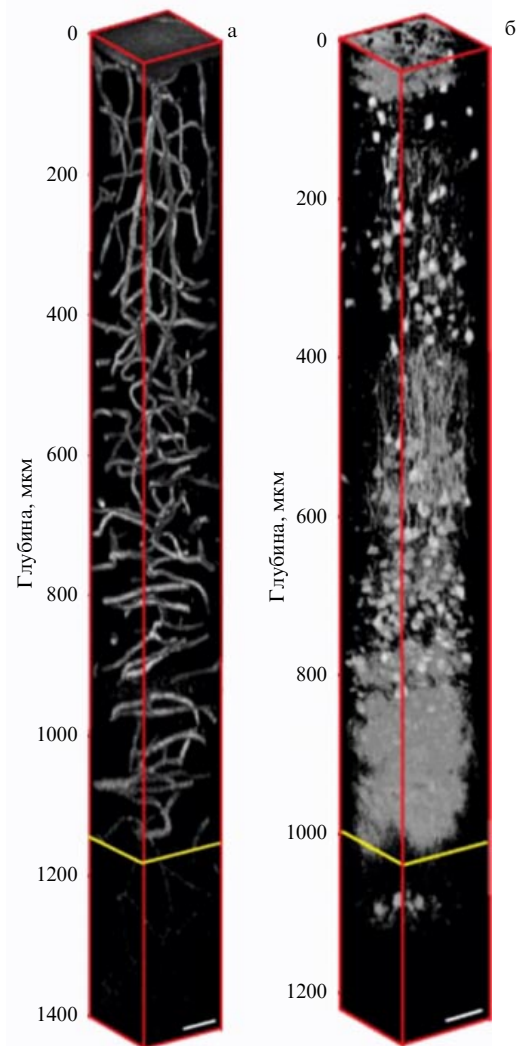


Рис. 3. Трёхфотонная микроскопия головного мозга мыши: (а) сосудистая система с распределённым по ней красителем Texas Red, (б) нейронная сеть, экспрессирующая красный флуоресцентный белок tdimer2 [16]. (Воспроизводится с разрешения Macmillan Publishers Ltd., © Nature Photonics, 2013 г.)

структуру пучка на гораздо больших глубинах, чем излучение на длинах волн 800–900 нм. Кроме того, спектр эмиссии красных флуоресцентных белков лежит в красном диапазоне, где показатель поглощения относительно мал, что обеспечивает эффективный приём флуоресценции.

2.2. Наноскопия

Пространственное разрешение, соответствующее дифракционному пределу, в микроскопии было достигнуто достаточно давно. Интерференционные методы (I²M- и 4Pi-микроскопия) позволили улучшить пространственное разрешение по сравнению с таковым в традиционной конфокальной микроскопии в 5–7 раз, что составляет около 100 нм [17]. Однако из-за сложностей при визуализации изображений, связанных с вариацией показателя преломления в биообъектах, интерференционные методы не получили серьёзного развития.

Настоящий прорыв в этой области произошёл с созданием микроскопии на основе подавления спонтанного излучения (Stimulated Emission Depletion — STED)

[18]. Вслед за коротким импульсом, возбуждающим флуоресценцию в объекте исследования, приходит STED-импульс, длина волны которого находится в области спектра эмиссии флуорофора. Пространственное распределение этого импульса таково, что на оси распространения пучка его интенсивность равна нулю. В областях с высокой интенсивностью STED-импульса происходит вынужденное излучение флуорофора (т.е. в этой области вероятность флуоресцентных переходов очень низка). Чем выше энергия STED-импульса, тем меньше область флуоресценции в центре пучка, в которой не происходит вынужденного излучения, и, соответственно, выше пространственное разрешение. Таким способом получено пространственное разрешение 20 нм, которое в 25 раз превышает разрешение конфокальных методов.

Традиционная формула Аббе, описывающая разрешающую способность микроскопа Δr , соответствующую дифракционному пределу на длине волны λ и числовой апертуре объектива NA:

$$\Delta r = \frac{\lambda}{2NA}, \quad (1)$$

в STED-микроскопии переходит в соотношение

$$\Delta r_{\text{STED}} = \frac{\lambda}{2NA\sqrt{1 + I_{\text{STED}}/I_{\text{sat}}}}, \quad (2)$$

где $I_{\text{STED}}/I_{\text{sat}}$ — отношение максимальной интенсивности STED-импульса к интенсивности насыщения флуорофора.

Можно сказать, что субдифракционная визуализация стала возможной благодаря огромному отношению сигнал/шум (С/Ш), полученному в результате применения короткоимпульсного возбуждения и регистрации флуоресценции с чувствительностью единичных фотонов. Тушение флуоресценции вне оси возбуждающего пучка подсветки приводит к улучшению пространственного разрешения, но к уменьшению отношения С/Ш. Способы повышения пространственного разрешения при большом отношении С/Ш применяются, например, в методах дистанционного зондирования посредством специфической обработки сигналов, однако в случае STED-микроскопии преодоление дифракционного предела реализуется на аппаратном уровне.

Другое направление в наноскопии — (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy — STORM) — метод, появившийся благодаря созданию фотоактивируемых меток, флуоресценцию которых можно "включить" (переход в активное состояние) при облучении светом определённой длины волны, не лежащей в спектре возбуждения флуоресценции [19]. Интенсивность активирующего лазера подбирается такой, чтобы одновременно в активном состоянии находилось лишь небольшое число молекул. Поскольку переход в активное состояние является стохастическим некоррелированным процессом, вероятность того, что в радиусе дифракционного пятна вокруг флуоресцирующей молекулы есть другие активные молекулы, ничтожна. Благодаря этой априорной информации можно найти (при условии, что в регистрирующей камере количество пикселей, приходящихся на дифракционное пятно, достаточно велико) геометрический центр дифракционного пятна, который и принимается за положение флуоресцирующей молекулы.

Процесс нахождения этих центров является периодическим и происходит каждый раз после того, как все молекулы переведены в неактивное состояние, а затем под воздействием излучения активирующего лазера часть их стохастическим образом переходит в активное состояние. Такой процесс набора данных о центрах флуоресцирующих молекул носит статистический характер и требует много времени, чтобы построить их распределение. В процессе сбора данных возможен дрейф флуоресцирующих молекул, который приводит к искажению изображения. Группой под руководством Г.В. Геликонова (Институт прикладной физики (ИПФ) РАН) разработан новый метод компенсации этого дрейфа, заключающийся в специфической обработке получаемых данных и не требующий применения специальных флуоресцентных маркеров на изображениях (рис. 4).

Авторы наноскопии С. Хелл (Германия), Э. Бетциг и У. Мёрнер (США) удостоены Нобелевской премии по химии 2014 года "за развитие сверхразрешающей флуоресцентной микроскопии".

Другой способ преодоления дифракционного предела по пространственному разрешению основан на структурированном освещении объекта исследования (паттернами с определённой структурой) с последующей регистрацией изображений широкопольной микроскопией (Structured-Illumination Microscopy — SIM). Структура поля подсветки (паттернов) обычно периодическая, с чередующимися тёмными и светлыми интерференционными полосами. Исходное изображение, полученное с использованием равномерной засветки, занимает в \mathbf{k} -пространстве (плоскости пространственных частот) окружность, радиус k_0 которой соответствует дифракционному пределу. Каждое изображение, полученное с помощью паттерна, занимает в этом пространстве область, сдвинутую относительно начала координат на вектор \mathbf{k}_1 , определяющий пространственную частоту паттерна. Поворачивая паттерны, можно добиться заполнения окружности с радиусом $k_0 + |\mathbf{k}_1|$. При сложении изображений, полученных при различных паттернах, в \mathbf{k} -пространстве получается изображение с субдифракционным разрешением. При $|\mathbf{k}_1| = k_0$ разрешение в нём будет соответствовать превышению дифракционного предела в два раза. В работе [21] утверждается, что при нелинейном возбуждении флуоресценции можно добиться повышения разрешения в четыре и более раз.

Каждый из перечисленных методов наноскопии для изучения биологических структур имеет свои преимущества и недостатки, подробно описанные в работе [22].

2.3. Оптическая проекционная томография и светоплоскостная микроскопия

Существует ряд медико-биологических задач, требующих изучения структурной и функциональной организации относительно небольших (беспозвоночные, рыбы) или крупных (образцы биотканей, эмбрионы) оптически просветлённых биообъектов в масштабах, сопоставимых с размерами этих объектов. Оптические методы, позволяющие производить подобную визуализацию с клеточным разрешением, стали появляться относительно недавно. Разработка этих методов ведётся по двум основным направлениям: оптическая проекционная томография (ОПТ) [23] и светоплоскостная флуоресцентная микроскопия (light-sheet fluorescence microscopy) (СПФМ) [24]. СПФМ активно развивается в основном в

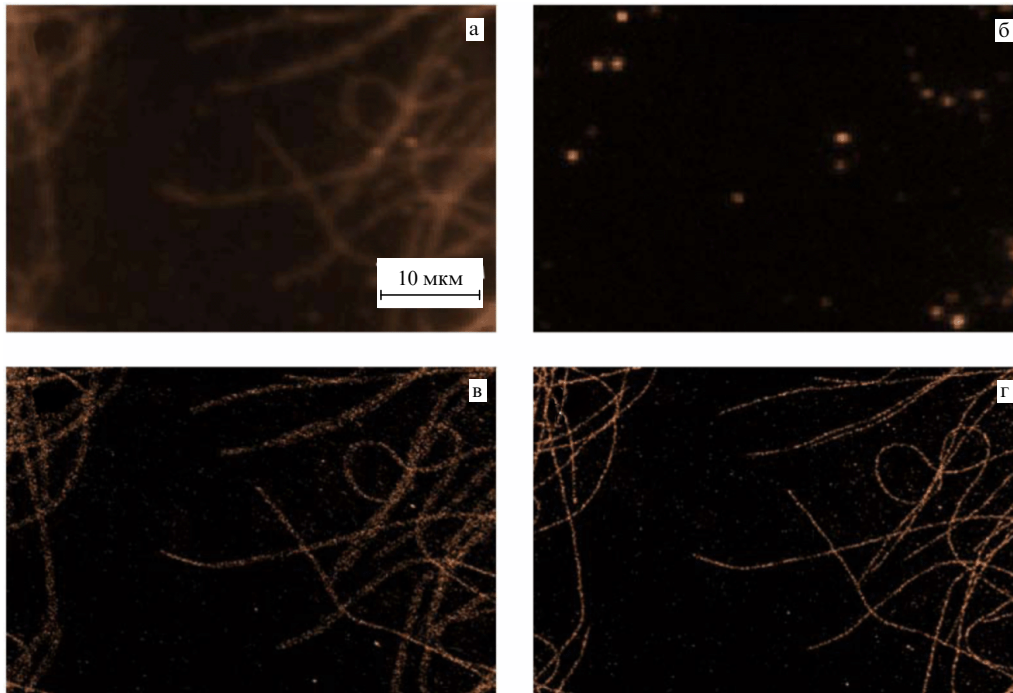


Рис. 4. Применение компенсации дрейфа в STORM-микроскопии. (а) Изображение тубулина, окрашенного Alexa 647, полученное методом флуоресцентной широкопольной микроскопии. (б) Тот же объект при добавлении STORM-буфера. Обособленные флуоресцирующие области соответствуют отдельным молекулам флуорофора. (в) Изображение исходного объекта, полученного методом STORM, описанным в работах [19, 20]. Видно размытие изображения из-за дрейфа частиц во время съёма данных. (г) Результат компенсации дрейфа. Точность локализации молекул составила около 25 нм при исходном разрешении широкопольной микроскопии 220 нм.

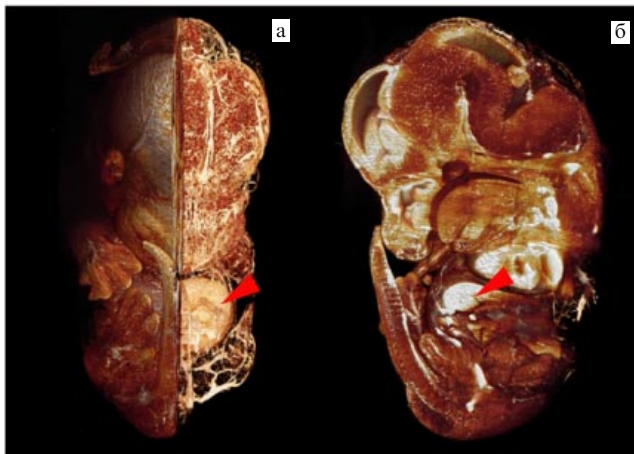


Рис. 5. (В цвете онлайн.) Трёхмерная визуализация строения 14-дневного мышинного эмбриона в различных проекциях (возбуждение на длине волны 488 нм, регистрация автофлуоресценции). Красной стрелкой обозначена область печени [27].

двух модификациях: микроскопия с освещением в выбранной плоскости (*selective plane illumination microscopy*) [25] и ультрамикроскопия [26]. Принципиальным отличием СПФМ от традиционной конфокальной лазерной сканирующей или широкопольной микроскопии является то, что возбуждение флуоресценции происходит лишь в узком слое биоткани благодаря использованию специальных систем подсветки, а регистрация флуоресценции — в направлении, перпендикулярном плоскости подсветки. Это позволяет избежать попадания в приёмный тракт системы прямого лазерного

излучения и паразитного фона засветки вне области исследования и получить трёхмерные изображения крупных оптически просветлённых биообъектов (рис. 5).

3. Оптическая когерентная томография

Оптическая когерентная томография основана на низкокогерентной рефлектометрии: исследуемая среда зондируется широкополосным источником излучения, а прошедший с различных глубин обратно рассеянный свет, соответственно, имеющий различные временные задержки относительно падающего излучения, разрешается по времени с помощью интерферометра [28]. Как и во многих задачах дистанционного зондирования, например радиолокационных или ультразвуковых, продольное разрешение в ОКТ обратно пропорционально ширине полосы источника излучения, а поперечное определяется диаграммой направленности приёмно-передающей антенны. Фемтокоррелированные источники излучения, такие как фемтосекундные лазеры, суперлюминесцентные диоды и лазеры с генерацией суперконтинуума, позволили создать ОКТ-приборы с продольным разрешением на уровне 1–10 мкм, что в несколько раз превышает разрешающую способность современных высокочастотных аппаратов ультразвукового исследования (УЗИ). Поскольку такой масштаб разрешения соответствует размеру клетки, ОКТ не позволяет визуализировать субклеточную структуру (за исключением очень крупных клеток, таких как клетки растений), но позволяет хорошо различать тканевые слои. Это особенно важно для целого ряда клинических задач, в которых необходимо получить прижизненную информацию о внутренней структуре сложной биоткани,

например ткани глазного яблока, кожи, слизистых и серозных оболочек внутренних органов. Так, ОКТ-исследование сетчатки глаза позволяет диагностировать ранние изменения органа зрения и является во всём мире стандартом обследования в офтальмологии [29–31].

В настоящее время ОКТ широко внедряется в клиническую практику для диагностики злокачественных новообразований [32] и неопухоловой патологии [33, 34], становится методом выбора различных видов лечения [35, 36].

Губина визуализации в ОКТ обычно составляет около 1–2 мм, что соответствует перепаду сигнала примерно на 40–50 дБ, составляющему динамический диапазон прибора. Наиболее точные аналитические выражения, описывающие ослабление ОКТ-сигнала (А-скана) с увеличением глубины, были получены в малоугловом приближении УПИ [37, 38]. Полученные соотношения показывают, что ослабление пучка подсветки на глубине 1–2 мм происходит гораздо медленнее, чем в законе Бугера–Ламберта–Бера (БЛБ)

$$I \sim \exp [- (\mu_a + \mu_s) r], \quad (3)$$

согласно которому фотон в результате однократного рассеяния покидает пучок подсветки, но быстрее, чем в диффузионном приближении УПИ

$$I \sim \frac{\mu'_s}{r} \exp [- \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)} r], \quad (4)$$

в котором изотропизировавшийся пучок ослабляется в результате поглощения. В соотношениях (3) и (4) μ_a и μ_s — показатели поглощения и рассеяния, μ'_s — транспортный (или уменьшенный) показатель рассеяния, r — расстояние от источника. Отметим, что закон БЛБ тоже может реализовываться в ОКТ (в случае оптически тонкого пучка [39]), но только на небольших глубинах. Сам ОКТ-сигнал формируется на фотонах, обратного рассеяния биотканью. Поскольку вероятность обратного рассеяния мала, на глубинах исследования 1–2 мм обратное рассеяние можно считать однократным.

3.1. Клинические приложения оптической когерентной томографии

Одним из несомненных преимуществ ОКТ является возможность построения полностью волоконных приборов, а также миниатюрных ОКТ-зондов для исследования труднодоступных органов и тканей. В частности, научной группой под руководством В.М. Геликонова (ИПФ РАН) были разработаны совместимые с биопсийным каналом стандартных эндоскопов ОКТ-зонды диаметром 2 мм, позволившие исследовать слизистые

оболочки органов дыхания, пищеварения, урогенитальной зоны [40]. В результате многочисленных клинических исследований показано, что при переходе от неизменённой слизистой к злокачественному новообразованию нарушается слоистая организация ткани, т.е. нарушается чёткая граница между эпителием и стромой (что согласуется с результатами гистологических исследований), и ОКТ-изображение становится бесструктурным (рис. 6) [41, 42].

Таким образом, с помощью метода ОКТ врач может достаточно точно определить границу опухоли, не прибегая к стандартной времязатратной и дорогостоящей биопсии. Это особенно важно для планирования объёма операции и интраоперационного контроля области резекции опухоли при органосохраняющих операциях [43, 44]. Тем не менее ОКТ не может полностью заменить "золотой стандарт" (биопсию), поскольку не позволяет проводить более тонкую дифференциацию патологий. Так, например, воспаление и злокачественное новообразование дифференцируются методом ОКТ с недостаточной точностью, поэтому разработчики метода стремятся получить дополнительную информацию об объекте исследования посредством совершенствования метода [45].

Одним из направлений, позволивших повысить диагностическую ценность метода, является создание поляризационно-чувствительной ОКТ (ПЧ ОКТ), что стало возможным благодаря поляризационно-сохраняющим волокнам. Известно, что различные биологические структуры способны не только рассеивать оптическое излучение, но и деполаризовывать его и даже осуществлять поворот плоскости поляризации. В частности, поляризационные эффекты хорошо наблюдаются в коллагеновых волокнах и хрящах. Нарушение коллагеновой структуры ткани, характерное для злокачественных новообразований, приводит к уменьшению степени её деполаризации, что может быть определено методами ПЧ ОКТ [46].

3.2. Высокоскоростная оптическая когерентная томография и анализ спекл-структуры

Благодаря переходу от традиционной временной ОКТ к фурье-ОКТ и спектральной ОКТ стало возможным существенное повышение скорости сканирования. Скоростные методы позволили не только выйти на видеорежим получения информации, но и, превысив этот порог, наблюдать за динамикой спекл-структуры (спекл — от англ. speckle — пятнышко, крапинка). Это направление актуально для визуализации кровеносного русла в глубине ткани, которое не визуализируется на статическом ОКТ-изображении. Движение кровяных телец по руслу изменяет спекл-структуру в данной области ОКТ-изоб-

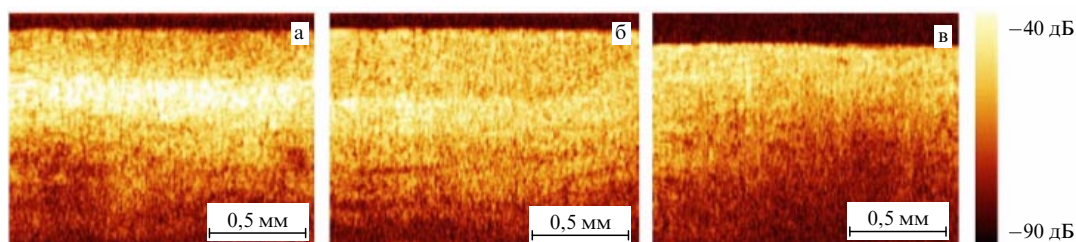


Рис. 6. ОКТ-изображения шейки матки: переход от области нормальной ткани (а) к центру злокачественной опухоли (б, в).

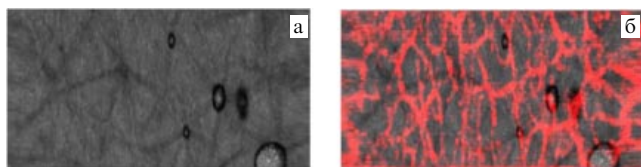


Рис. 7. (В цвете онлайн.) (а) С-скан кожи молочной железы, полученный методом ОКТ *in vivo*. (б) Наложение на этот скан сосудистого рисунка (отмечено красным цветом), полученного в результате анализа динамики спекл-структуры методом, описанным в работе [47]. Размеры ОКТ-изображения $3,3 \times 1,0$ мм.

ражения. Соответственно, анализируя динамику спекл-структуры во времени, можно выделить кровеносные сосуды (рис. 7). Для корректного анализа ОКТ-изображений скорость их получения должна быть настолько высокой, чтобы в тканях, окружающих сосудистое русло, за время съёма данных не происходило заметного изменения спекл-структуры. Изменение спекл-структуры в этих областях обусловлено произвольными движениями тканей, которые всегда присутствуют в живых объектах.

Следует отметить, что задачей спекл-коррелометрии для изучения микроциркуляции крови занимаются уже достаточно давно [48], однако до недавнего времени удалось получить лишь двумерные поверхностные изображения [49]. Получение трёхмерной (3D) информации стало возможным лишь относительно недавно в связи с развитием скоростной ОКТ.

3.3. Спектроскопическая оптическая когерентная томография

Поскольку продольное пространственное разрешение в ОКТ пропорционально длительности когерентности зондирующего излучения, необходимо использовать источники с широкой спектральной полосой, причём не имеет значения, является ли этот источник импульсным (как фемтосекундные лазеры) или квазинепрерывным (суперлюминесцентные диоды, дуговые лампы и лампы накаливания). Однако в большинстве случаев нецелесообразно использовать сверхширокополосные источники, ширина полосы которых сравнима с центральной частотой. Даже незначительная дисперсия показателя преломления среды, не компенсированная в интерферометре, приводит к тому, что набег фазы сильно разнесённых по частоте гармоник, пришедших с одной глубины, будут различными, в результате чего произойдёт размытие корреляционной функции зондирующего и принимаемого сигналов.

Тем не менее использование сверхширокополосных источников, таких как лазеры с генерацией суперконтинуума и фемтосекундные лазеры с перестройкой частоты, позволяет реализовать спектроскопическую ОКТ, которая даёт дополнительную информацию об объекте исследования. Используя относительно узкие (10 нм) полосы для получения ОКТ-изображений в соседних спектральных диапазонах, можно получить информацию о спектре коэффициента экстинкции, зависящего от показателей рассеяния и поглощения биоткани, которые несут в себе информацию об объекте исследования [50]. Однако, насколько известно автору настоящей статьи, данный метод пока не нашёл широкого практического применения.

3.4. Оптическая когерентная микроскопия

Если продольное разрешение ОКТ определяется шириной полосы источника излучения, то поперечное разрешение зависит от геометрии пучка подсветки. Высокая числовая апертура выходной линзы, как и в конфокальной микроскопии, позволяет достичь минимального размера дифракционного пятна, однако при столь острой фокусировке глубина рэлеевской перетяжки будет довольно мала, что не позволит наблюдать структуры биоткани вне области фокуса с высоким поперечным разрешением. Таким образом, для каждой глубины исследования существует оптимальная фокусировка излучающей системы. Для получения высокого поперечного разрешения на всех глубинах до 1–2 мм необходимо использовать динамическую фокусировку, т.е. совмещать метод ОКТ с конфокальной микроскопией — так называемая оптическая когерентная микроскопия (ОКМ).

Изображения биотканей методом ОКМ получены несколькими исследовательскими группами [51–53], однако этот метод пока не применяется в эндоскопии, поскольку динамическая фокусировка приводит к увеличению размеров сканера из-за механизма перемещения линзы, а также к значительному увеличению времени сканирования.

3.5. Оптическое контрастирование в оптической когерентной томографии

Следует отметить направления развития ОКТ в области повышения контраста и глубины визуализации. Научной группой под руководством В.В. Тучина (Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского) исследовалось явление оптического просветления. Показано, что аппликация таких соединений, как глицерин, пропиленгликоль, концентрированные растворы глюкозы, позволяет увеличить глубину ОКТ-зондирования и контраст изображений. Это основано на способности гиперосмолярных соединений обеспечивать избирательное согласование показателей преломления фоновых структур и рассеивающих объектов, что приводит к уменьшению рассеивающих свойств компонентов ткани [54, 55].

Другое направление — применение контрастных агентов, в частности наночастиц золота и диоксида титана, обладающих высоким сечением рассеяния, позволяет контрастировать структурные элементы биоткани при их селективном распределении после поверхностного нанесения [56, 57].

3.6. Автоматизированное распознавание патологий с помощью обработки изображений оптической когерентной томографии

Большой клинический материал, набранный с помощью ОКТ и подтверждённый гистологически, позволяет развивать автоматизированные методы оценки патологического состояния биоткани для заданной локализации. Одни методы основываются на оценке показателей полного и обратного рассеяния для слоистых тканевых структур [39, 58] с использованием различных аналитических приближений УПИ, другие — на вычислении характеристик текстуры ОКТ-изображений. Автоматизированный анализ текстуры ОКТ-изображений позволил повысить диагностическую точность метода от 88 % до 96 % при идентификации патологий маточных труб [59].

4. Оптоакустика

Пространственное разрешение чисто оптических методов визуализации ограничивается эффектами рассеяния для глубин более 1 мм. Это ограничение привело к развитию гибридных оптических методов, т.е. сочетающих оптический и какой-либо другой принципы получения изображений. Наибольших успехов в этой области достигли оптикоакустические методы визуализации биотканей. ОА-визуализация основана на регистрации ультразвуковых импульсов, возбуждаемых в исследуемой среде при поглощении импульсного лазерного излучения хромофорами биоткани [60]. Возбуждаемые в среде ОА-импульсы характеризуются относительно малой амплитудой, до 10 кПа, и широкой полосой — несколько десятков МГц. Регистрацию ОА-импульсов осуществляют на поверхности исследуемой среды с помощью ультразвуковых антенн с механическим или электронным сканированием, как при стандартном УЗИ.

4.1. Глубина визуализации в оптикоакустике

Глубина ОА-исследования определяется параметрами оптического и акустического затухания биоткани, энергией лазерных импульсов, чувствительностью приёмной системы, а также показателем поглощения визуализируемых экзогенных или эндогенных хромофоров. Поскольку оптический показатель поглощения биоткани имеет сильную зависимость от длины волны, глубина ОА-визуализации также будет сильно зависеть от длины волны. Очевидно, что в терапевтическом окне прозрачности глубина визуализации будет гораздо выше, чем, например, в синем или зелёном спектральных диапазонах. С другой стороны, говоря об оптимальном оптическом спектральном диапазоне, следует также принимать во внимание показатель поглощения визуализируемого хромофора, поскольку ОА-сигнал прямо пропорционален этому показателю. Так, например, показатель поглощения одного из основных хромофоров ткани, гемоглобина, гораздо выше в зелёном спектральном диапазоне, чем в терапевтическом окне прозрачности, а значит, и амплитуда генерации ОА-сигналов при визуализации сосудистого рисунка в поверхностных слоях ткани (до 3–4 мм) будет выше в указанном диапазоне длин волн.

Для достижения наибольшей глубины ОА-визуализации, составляющей несколько сантиметров, необходимо выбирать диапазон длин волн 700–900 нм, в котором поглощение биоткани минимально, использовать максимально допустимую энергию в оптическом импульсе, а также обеспечить максимальную чувствительность приёмного тракта. Например, в работе [61] при облучении молочной железы излучением накачки на длине волны 800 нм была достигнута глубина визуализации *in vivo* свыше 4 см. Поскольку показатель поглощения гемоглобина в этом спектральном диапазоне относительно мал, увеличить ОА-сигнал, а значит, и глубину визуализации можно с помощью контрастных агентов, обладающих высоким показателем поглощения в данном диапазоне, таких как метиленовый синий, индоцианин зелёный, золотые наночастицы с плазмонным резонансом [62, 63].

4.2. Пространственное разрешение в оптикоакустике

Как и в УЗИ, в ОА разрешающая способность по глубине определяется шириной спектральной полосы регистрируемого акустического сигнала, а поперечная разрешаю-

щая способность зависит от апертуры акустической антенны и её фокусирующих свойств. Поскольку показатель акустического поглощения в биоткани обратно пропорционален длине волны, количество элементов ультразвукового (УЗ) разрешения в А-скане одинаково как для коротковолновых (высокочастотных), так и для длинноволновых (низкочастотных) акустических антенн. Дополнительными факторами, ухудшающими пространственное разрешение, могут также являться конечная длительность зондирующего импульса и ограниченность рабочей полосы частот приёмной антенны. Длительность зондирующего импульса в 20 нс ограничивает генерацию УЗ-импульса на частоте 50 МГц, что превышает возможности ОА-визуализации для глубин более 1 мм. Для исследований на меньших глубинах возможно использование более высокочастотных приёмников, что потребует применения более коротких световых импульсов. В то время как спектральная полоса классических акустических антенн не превышает центральной полосы, известны акустические датчики на основе оптических интерферометров, имеющие гораздо более широкую спектральную полосу [64]. Однако оптические резонаторы пока уступают по чувствительности традиционным акустическим антеннам.

4.3. Разделение хромофоров в оптикоакустике

Преимуществом ОА-визуализации перед УЗИ является не только повышенный контраст, но и возможность спектроскопических измерений для выделения отдельных хромофоров ткани, что стало возможным благодаря лазерам с перестройкой длины волны в широком диапазоне. Как и оптическая диффузионная спектроскопия (ОДС), ОА-спектроскопия позволяет, например, оценивать степень оксигенации крови, выделять экзогенные контрастные агенты с резонансным поглощением и т.д.

Для оценки концентраций различных хромофоров по спектроскопическим данным требуется количественное измерение показателя поглощения биоткани, а для этого необходимо корректно учитывать распределение облучённости внутри неё, поскольку амплитуда ОА-сигнала пропорциональна облучённости данной области среды, которая различна для разных длин волн. С данной проблемой столкнулось множество исследователей, однако до сих пор нет устойчивых алгоритмов для определения, например, степени оксигенации крови. Для определения облучённости в ткани предлагается совмещать ОА-спектроскопию с оптической диффузионной томографией (ОДТ), позволяющей оценивать показатели рассеяния и поглощения, которые определяют оптическое поле внутри среды. Однако такой подход требует дополнительных измерений, что усложняет конструкцию прибора и, главное, увеличиваются геометрические размеры сканирующей части. Оригинальное решение было представлено в работе [65], где обратно рассеянный биотканью свет регистрируется акустической антенной, используемой для приёма ультразвуковых импульсов. Тем не менее, чтобы воспользоваться этой информацией для расчёта оптического поля, нужно решать сложную задачу трёхмерной реконструкции ОДТ.

4.4. Оптикоакустические микроскопия и томография

Для ОА-визуализации биотканей существуют различные технические решения, которые можно условно разделить на томографические и микроскопические. В ОА-томо-

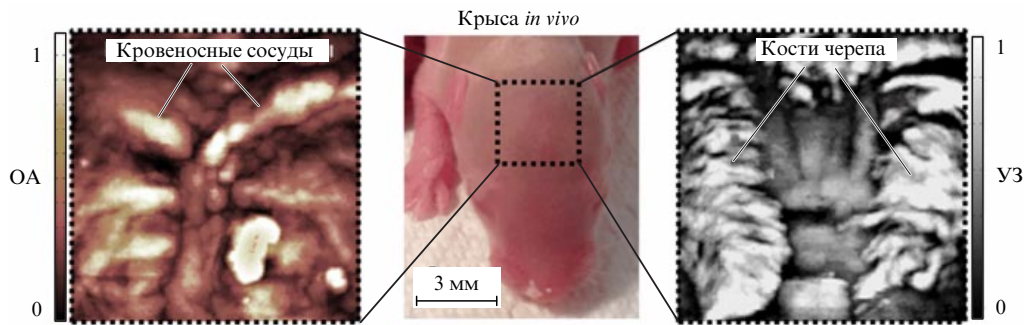


Рис. 8. (В цвете онлайн.) Оптоакустическое (ОА) и ультразвуковое (УЗ) изображения участка 3×3 мм головы трёхдневной лабораторной крысы *in vivo*. Шаг сканирования 30 мкм, время получения изображений 20 мин [78].

графии подразумевается регистрация УЗ-импульсов многоэлементной антенной или несколькими пространственно разнесёнными антеннами одновременно с последующей реконструкцией поглощающих неоднородностей биоткани [66, 67].

В ОА-микроскопии регистрация А-скана производится одним УЗ-датчиком, которым осуществляется одномерное или двумерное сканирование поверхности объекта.

Основное преимущество томографии — отсутствие механического сканирования датчиком, существенно увеличивающее скорость получения ОА-изображений по сравнению с таковой в микроскопии, что особенно важно для клинических исследований. Однако стоимость томографической системы гораздо выше вследствие применения сложной многоэлементной антенны, многоканального аналого-цифрового преобразователя (АЦП) и реконструктивных алгоритмов. ОА-томография может осуществляться с применением как линейки акустических антенн (аналогично тому, как это делается в стандартной УЗ-диагностике), так и с использованием двумерной многоэлементной антенны [68]. Такие системы являются наиболее универсальными, они могут использоваться для исследования практически любого открытого участка тела и не накладывают ограничений на толщину исследуемого объекта. При заданной геометрии объекта исследований можно построить томографическую систему с использованием нескольких УЗ-датчиков, фиксируемых на поверхности объекта. Такие системы были созданы для диагностики молочной железы [69, 70] и томографии мелких лабораторных животных [63, 71].

ОА-микроскопия представляет собой относительно недорогой вариант для ОА-визуализации, в рамках которого могут быть проведены следующие исследования: по оптимизации системы лазерной подсветки биоткани для создания однородного оптического поля по глубине или достижения более высокого пространственного разрешения [72]; по изучению возможности различных материалов и усилителей для акустических антенн; по изучению новых возможностей ОА-визуализации, в частности одновременному получению ОА- и УЗ-изображений [73–75] (рис. 8). Высокая стоимость томографических систем (около 700 тыс. евро) препятствует проведению широких клинических исследований и, соответственно, внедрению этого метода визуализации в клиническую практику. Поэтому менее дорогие высокоскоростные системы для ОА-микроскопии [76] могут

оказаться более востребованными на данном этапе развития метода. Существует также особый класс интраваскулярных систем ОА-визуализации, в которых из-за ограничения по габаритам не может быть размещена многоэлементная антенна, а применяется вращающийся УЗ-датчик, как при УЗ-диагностике сосудов [77].

4.5. Биомедицинские приложения оптоакустики

Сегодня возможности ОА-визуализации на лабораторных животных огромны. Уже созданы коммерческие системы, позволяющие в реальном времени осуществлять так называемый пятимерный (5D) мониторинг различных процессов — получение объёмного распределения различных хромофоров, разрешённого по времени и спектру. Эти возможности ОА-систем незаменимы в экспериментальной онкологии, биологии развития, исследовании фармакокинетики и фармакодинамики лекарственных препаратов и т.д. Мелкие лабораторные животные наиболее удобны с точки зрения применения ОА, поскольку их толщина как раз соответствует максимальной глубине визуализации метода и, соответственно, они могут быть исследованы целиком (whole-body imaging), как и традиционными методами компьютерной или магнитно-резонансной томографии.

Однако клинические приложения ОА развиваются не столь стремительно, что связано, по-видимому, с недостатком клинического материала, подтверждающего диагностическую эффективность метода в той или иной области.

Перспективные клинические приложения оптико-акустического имиджинга [79] включают в себя:

- диагностику онкологических заболеваний молочной железы по повышенной васкуляризации (обеспечивается возможностью оптико-акустической визуализации сосудов в опухоли) [80];

- мониторинг развития новообразований и реакции опухоли на лечебные воздействия (обеспечивается возможностью ОА-измерений уровней оксигенации сосудов, окружающих опухолевые ткани) [81];

- направленную биопсию сигнальных лимфоузлов опухоли (обеспечивается возможностью ОА-визуализации сигнальных лимфоузлов опухоли с помощью экзогенных светопоглощающих маркеров) [82];

- диагностику меланинсодержащих новообразований, облегчающую подготовку и проведение хирургических операций по их удалению (обеспечивается возможностью одновременной ОА-визуализации кровеносных сосудов кожи и меланомных опухолей) [83];

— исследование гемодинамических реакций мозга на внешние стимулы, выявление эпилептических проявлений (обеспечивается возможностью ОА-визуализации кровеносных сосудов мозга с одновременным измерением их кислородного статуса) [84];

— диагностику атеросклеротических изменений в крупных кровеносных сосудах (обеспечивается возможностью ОА-визуализации холестериновых и кальциевых отложений) [85];

— выявление возрастных или диабетических патологий в офтальмологии (обеспечивается возможностью ОА-имиджинга кровеносных сосудов сетчатки глаза с определением их кислородного статуса) [86].

5. Оптические диффузионные спектроскопия и томография

5.1. Общие сведения

об оптической диффузионной спектроскопии

Светодиффузионные методы основаны на регистрации многократно рассеянной, диффузной компоненты света, прошедшей сквозь слой биологической ткани, и решении обратной задачи — восстановления показателей рассеяния и поглощения ткани на основе результатов этих измерений [87]. Как видно из таблицы, среди оптических методов исследования биотканей светодиффузионные обладают наибольшей глубиной исследования — примерно до 10 см. Это возможно благодаря тому, что диффузный режим распространения света в ткани имеет наименьший инкремент затухания облучённости оптического поля (4), в который входит произведение показателей транспортного рассеяния и поглощения (в терапевтическом окне прозрачности $\mu_a \ll \mu_s'$). Отсюда следует, что плотность диффузного потока, прошедшего сквозь биоткань, одинаково чувствительна к изменениям обоих оптических показателей. В зависимости от длины волны показатель рассеяния слабо изменяется в биоткани, убывая, как правило, по степенному закону λ^{-b} , где b лежит в диапазоне 0,5–1,5 [88].

Спектр показателя поглощения зависит от соотношения концентраций различных хромофоров биоткани (окси- и дезоксигемоглобин, вода, жир, коллаген) (см. рис. 1). Измерив спектр показателя поглощения, можно оценить концентрации этих хромофоров, парциальные спектры которых хорошо известны. Как правило, оценивается содержание окси- и дезоксигемоглобина, соотношение между концентрациями которых характеризует степень оксигенации крови. Более точные спектроскопические измерения позволяют оценить содержание воды, жира, гемоглобина и коллагена. Используя спектроскопические измерения в области длин волн 935–998 нм, можно оценить также концентрацию связанной воды [89]. Все эти показатели, включая показатель рассеяния, являются диагностическими параметрами, позволяющими оценить наличие злокачественной опухоли: концентрации воды n_{H_2O} и крови $n_{ТНб}$ (total hemoglobin mass) возрастают, в то время как концентрация жира n_{lipid} и степень оксигенации StO_2 убывают.

Установлено, что по одному параметру достаточно сложно судить о наличии или отсутствии опухоли, поскольку его вариации в здоровых и патологических тканях слишком высоки. Поэтому был разработан так называемый оптический индекс ткани TOI (Tissue Optical

Index), в который входят измеренные показатели [90]:

$$TOI = \frac{n_{ТНб} n_{H_2O}}{n_{lipid} StO_2}, \quad (5)$$

имеющий гораздо больший контраст при наличии патологических изменений.

5.2. Непрерывный, импульсный и модуляционный подходы в оптической диффузионной спектроскопии

Как отмечено в разделе 5.1, для корректного восстановления компонентного состава биоткани требуется достаточно точно установить спектр показателя рассеяния. Несмотря на то что вариации поглощения, использование табличных значений показателя рассеяния для различных типов биотканей не позволяет в большинстве случаев восстановить компонентный состав. Поэтому показатель рассеяния необходимо оценивать, используя дополнительные измерения.

Наиболее устойчивое раздельное определение показателей рассеяния и поглощения осуществляется с использованием модуляционного или импульсного подходов [91]. Поскольку в ОДС регистрируется компонента света, испытывающая многократное рассеяние, её временная задержка относительно зондирующего импульса гораздо больше, чем у баллистической компоненты, распространяющейся непосредственно от источника к детектору. Измерить эту задержку можно по набегу фазы в модуляционном методе или полному распределению по времени зарегистрированных фотонов в импульсной локации. Используя эти измерения, а также показатель ослабления оптического излучения в биоткани, можно раздельно оценить показатели рассеяния и поглощения [92].

Каждый из методов имеет свои преимущества и недостатки [93]. Модуляционный метод реализуется посредством высокочастотной (порядка 100–500 МГц) модуляции интенсивности зондирующего излучения с последующим синхронным приёмом диффузных фотонов. Это относительно недорогой метод, но для устойчивого приёма сигнала и выделения фазы с точностью до нескольких десятых или даже сотых долей градуса требуются качественная высокочастотная электроника и большая глубина модуляции лазерного источника. Импульсный метод реализуется гораздо проще, однако его компоненты — импульсные пико- или наносекундные лазеры и времякоррелированные счётчики одиночных фотонов — весьма дороги. Импульсная локация традиционно предоставляет гораздо больше информации об объекте исследования: зарегистрированный импульс, разложенный в ряд Фурье, представляет собой набор амплитуд и фаз, которые могут быть получены модуляционным способом при различных частотах модуляции.

Раздельное определение показателей рассеяния и поглощения возможно также с использованием непрерывного источника излучения, но при этом измерения должны проводиться в нескольких точках, по-разному удалённых от источника. Точность раздельного определения показателей рассеяния и поглощения в таких системах значительно уступает таковой модуляционной и импульсной локации. Большим преимуществом непрерывного широкополосного излучения, генерируемого галогеновыми или дуговыми лампами, является возмож-

ность одновременной регистрации оптического спектра с помощью обычного спектрометра.

Исследовательская группа Тромберга разработала оригинальную систему, сочетающую в себе преимущества модуляционного и спектрального подходов [94]. Учитывая то, что показатель рассеяния хорошо аппроксимируется степенной зависимостью от длины волны, его можно определить модуляционным методом, проведя измерения всего в нескольких точках спектра, т.е. используя небольшое число лазерных источников. По данным о показателе рассеяния, полученным с помощью модулированных источников, и данным о показателе ослабления света во всём спектральном диапазоне, полученным с помощью широкополосного непрерывного источника, можно оценить спектр поглощения биоткани во всём измеряемом диапазоне, что позволяет реконструировать концентрацию всех основных хромофоров биоткани.

5.3. Общие сведения

об оптической диффузионной томографии

ОДС применяется исходя из предположения об однородности оптических показателей в исследуемой среде, что ограничивает точность реконструкции концентраций хромофоров ткани и не позволяет оценивать их пространственное распределение. В отличие от ОДС, оптическая диффузионная томография (ОДТ) позволяет восстанавливать пространственное распределение показателей рассеяния и поглощения [95]. ОДТ основана на получении проекций — информации о прошедшем сквозь ткань оптическом излучении при различных положениях источника и детектора — с последующим применением реконструктивных алгоритмов [96–98].

В основе реконструктивных алгоритмов лежит предположение, что биоткань имеет некие средние значения оптических показателей, а отклонения от этих значений в разных областях исследуемой среды относительно малы, что позволяет разложить решение УПИ в диффузионном приближении в ряд Тейлора, ограничиваясь линейными поправками относительно показателей рассеяния и поглощения. Этот переход сводит задачу о нахождении пространственного распределения оптических показателей к системе линейных уравнений с размерностью матрицы чувствительности $M \times N$, где M — число строк (проекций), N — число вокселей, в которых оцениваются поправки к оптическим показателям.

Алгоритмы реконструкции в ОДТ постоянно совершенствуются и имеют множество модификаций относительно решений как прямой, так и обратной задач. Сложность этих алгоритмов связана с необходимостью учёта геометрии среды, некорректностью задачи ОДТ, а также в ряде случаев с ограниченностью применения диффузионного приближения УПИ. В разделе 5.4, 5.5 более подробно описаны эти вопросы и способы их решения.

5.4. Граничные условия

в оптической диффузионной томографии

Решение УПИ очень чувствительно к граничным условиям, так как вблизи границы рассеивающей среды и воздуха из-за отражения фотонов от границы усиливается плотность диффузного потока. Для бесконечной однородно рассеивающей и поглощающей среды диффузионное приближение УПИ имеет простое аналитическое решение. Для полубесконечной среды или плоского

слоя это решение легко модифицируется с помощью метода отражений источников. Решение УПИ для полубесконечной среды используется как в ОДС, так и в ОДТ при исследованиях небольшого участка биоткани в конфигурации "на отражение", когда источники и приёмники расположены по одну сторону от объекта исследования (небольшие сканеры для молочной железы, исследование активности головного мозга на небольшом участке).

В случае произвольной границы приходится прибегать к более сложным численным методам решения УПИ, что существенно усложняет алгоритмы и увеличивает время расчёта матрицы чувствительности и, кроме того, требует дополнительных измерений формы поверхности. Поэтому в ОДТ с "просветной" геометрией, когда источники и приёмники излучения находятся по разные стороны от объекта, иногда используется согласующая жидкость (обычно смесь липофундина и туши) с показателями рассеяния и поглощения, близкими к таковым в биоткани. Согласующая жидкость заливается в прямоугольную кювету, а исследуемый объект помещается в эту среду. Такой способ хотя и упрощает решение обратной задачи, несёт в себе массу неудобств при работе с живыми объектами, поэтому его применение ограничивается в основном диагностикой молочной железы [99] и исследованиями на лабораторных животных [100]. Для ОДТ головного мозга необходимо использовать реконструктивные алгоритмы для случая произвольной поверхности.

5.5. Решение обратной задачи

оптической диффузионной томографии

В ОДТ исследователи сталкиваются с целым рядом проблем при обращении матрицы чувствительности (отсутствующих в других трансмиссионных задачах, например рентгеновской томографии) [101]: эта матрица в ОДТ является неразрежённой, плохо обусловленной и иногда недоопределённой. Неразрежённость связана с диффузным характером распространения света: даже если поглощающая или рассеивающая неоднородность находится вне оси проекции, соединяющей источник и детектор, она все равно будет влиять на регистрируемый сигнал. Плохая обусловленность тоже является следствием диффузного распространения света, при этом небольшие изменения в регистрируемом сигнале могут приводить к значительному изменению получаемого пространственного распределения оптических неоднородностей.

Указанные выше условия диктуют необходимость измерений с высокой степенью линейности и хорошим отношением сигнал/шум, а также получения как можно более полной информации об объекте исследования, в частности о его геометрии, использования более точных моделей распространения света вблизи границ (т.е. там, где диффузионное приближение неприменимо, но чувствительность к оптическим неоднородностям очень высока), применения модуляционной и импульсной локализации, получения большого числа проекций, измеренных с высокой точностью [102, 103]. Однако без дополнительной информации неустойчивость решения обратной задачи всё равно остаётся чересчур высокой, поэтому ОДТ предпочтительно совмещать с каким-нибудь другим методом, например магнитно-резонансной томографией (МРТ) или когерентной томографией (КТ),

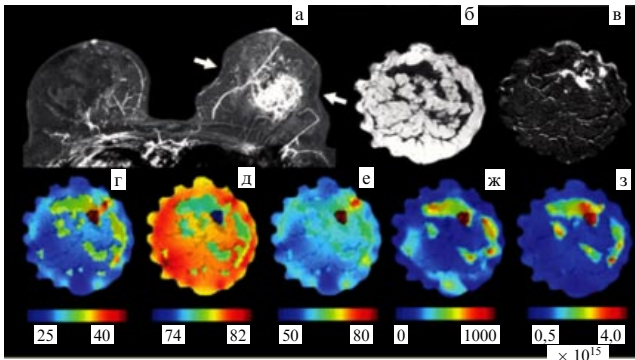


Рис. 9. (В цвете онлайн.) МРТ- и ОДТ-исследование молочных желез. (а) T1-взвешенные изображения молочных желез в аксиальной плоскости, полученные методом МРТ с динамическим контрастным усилением (стрелками показана плоскость получения ОДТ-изображений). (б) T1-взвешенное изображение молочной железы в корональной плоскости в проекции опухолевого узла до введения контрастного вещества. (в) Изображение, построенное в результате вычитания из данных, полученных после введения контрастирующего вещества, данных, полученных до его введения. Реконструированные ОДТ-изображения с применением МРТ-сегментирования: (г) концентрация гемоглобина (мкмоль $л^{-1}$), (д) уровень насыщения крови кислородом (%), (е) концентрация воды (%), (ж) размер рассеивающих частиц (нм), (з) концентрация рассеивающих частиц [105]. (Воспроизводится с разрешения OSA Publishing.)

который позволяет определить структуру биоткани с хорошим пространственным разрешением. После определения таким способом структуры объекта (а также геометрии его поверхности) проводится его сегментирование, причём в каждом сегменте оптические показатели принимаются постоянными. Это позволяет значительно уменьшить количество неизвестных в обратной задаче, а следовательно, повысить точность и устойчивость реконструкции. Такой подход используется для исследования функциональной активности мозга [104] и диагностики молочной железы (рис. 9) [105]. Фактически это означает, что на больших глубинах (начиная с нескольких миллиметров) чисто оптические методы не дают структурной информации, однако при наличии такой информации, полученной другими методами, позволяют извлечь данные о функциональном состоянии биоткани.

5.6. Другие светодиффузионные методы исследования биотканей

Потребность в получении оптических изображений, с одной стороны, и сложность решения томографической задачи, с другой, обуславливают развитие методов ОДС, позволяющих получать двумерные изображения поглощающих и рассеивающих неоднородностей биоткани. Например, кроме ручных сканеров для диагностики молочной железы [106] существуют также проекционные ОДС-системы с просветной конфигурацией (источники и детекторы располагаются по разные стороны от объекта исследования) с использованием импульсного [107] или модуляционного [108] подходов. Этот метод, называемый оптической маммографией, при каждом пространственном положении источника и детектора даёт, как и рентгеновская маммография, интегральную по глубине информацию о характеристиках биоткани (рис. 10).

Другой подход основан на структурированном освещении биоткани [109]: использование пространственных

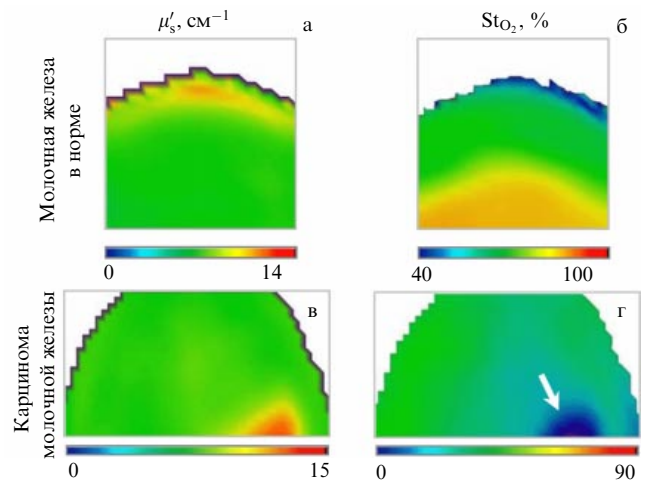


Рис. 10. (В цвете онлайн.) Оптическая маммография: определение показателей рассеяния и степени насыщения крови кислородом в молочной железе методом ОДС в просветной конфигурации. (а, б) Молочная железа в норме (размер изображений 50×50 мм). (в, г) Карцинома молочной железы, обозначена стрелкой (размер изображений 90×50 мм).

частот позволяет заменить временную модуляцию. Данный подход применяется для поверхностных (менее 1 см) исследований биоткани, но, в отличие от методов, описанных выше, не требует механического сканирования по поверхности объекта, что значительно сокращает время получения изображений.

6. Флуоресцентные макроскопические методы визуализации

Флуоресцентные методы визуализации, как микроскопические, так и макроскопические, позволяют получать двумерное или трёхмерное распределение флуорофоров в биотканях. Проведя различие между микроскопическими и макроскопическими методами по глубине исследования (1–2 длины свободного пробега фотона), можно сказать, что в макроскопических методах возбуждение флуорофора и/или регистрация его флуоресценции осуществляются рассеянной компонентой света.

Как отмечалось ранее, в качестве контраста могут выступать как эндогенные, так и экзогенные флуорофоры. Эндогенные флуорофоры эффективно возбуждаются только в ультрафиолетовой–синей областях спектра, т.е. там, где показатель поглощения света достаточно велик, и глубина их исследования ограничивается глубиной исследования многофотонной микроскопии. Поэтому флуоресцентные макроскопические методы работают преимущественно с экзогенными маркерами, возбуждаемыми в красном–ближнем инфракрасном спектральных диапазонах либо в синем–зелёном, но обладающими высокой яркостью: органическими красителями, флуоресцентными белками, синтезированными наноагентами и т.д. Эти методы можно разделить на поверхностные, проекционные и томографические [110].

6.1. Поверхностные флуоресцентные методы исследования биотканей

Наиболее распространённые поверхностные методы основаны на возбуждении флуоресценции в исследуе-

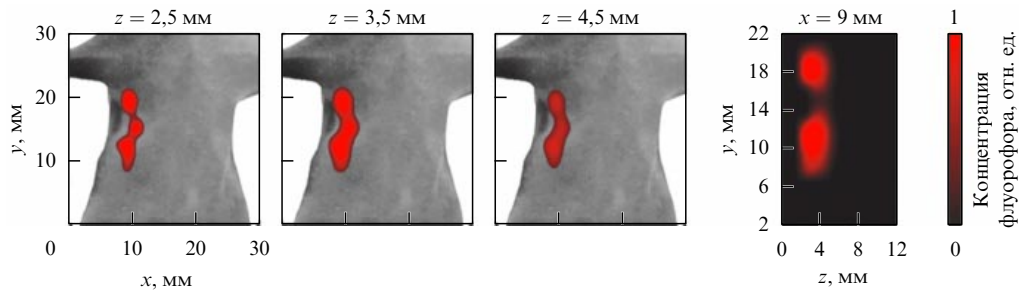


Рис. 11. (В цвете онлайн.) Результат 3D-восстановления геометрических размеров опухоли, экспрессирующей флуоресцентный белок *Katushka*, в лабораторной мыши линии *Nude* (лишённой волосяного покрова) методом спектральной ДФТ: x , y — поперечные координаты, z — глубина. Поверхность лабораторной мыши отображается в серой палитре, восстановленная концентрация флуорофора — в красной.

мом участке биоткани широким световым пучком и регистрации флуоресценции цифровой камерой с оптическим фильтром, пропускающим только спектр флуоресценции и задерживающим возбуждающее излучение. Существует также модификация этого метода — растровое сканирование, принцип действия которого подобен таковому лазерной сканирующей микроскопии: использование поточечного сканирования узким световым пучком с одновременным приёмом флуоресценции из данной области.

Растровое сканирование позволяет уменьшить в каждой точке измерения влияние рассеянной компоненты, пришедшей из соседних областей [111]. Благодаря высокому флуоресцентному контрасту поверхностные методы позволяют получать качественную картину распределения флуорофора в ткани. Эти методы широко применяются в экспериментальной онкологии для исследования роста опухоли, меченой флуоресцентным белком (ФБ), тестирования фармакокинетики и фармакодинамики новых флуоресцентных агентов и т.д. [112].

Среди клинических приложений — интраоперационный контроль удаляемой опухоли [113, 114], мониторинг процесса фотодинамической терапии (ФДТ), использующий для визуализации флуоресценцию фотосенсибилизатора (ФС), вводимого в организм человека [115, 116]. При низкой интенсивности облучения ФС не возникает фотодинамической реакции, но может быть зарегистрирована флуоресценция ФС в опухоли и окружающих тканях. В процессе ФДТ происходит фотобликинг (фото-выгорание) — уменьшение интенсивности флуоресценции ФС, количественное значение которого может быть использовано как предиктор эффективности ФДТ [117].

6.2. Флуоресцентная томография

Флуоресцентные томографические методы основаны на получении множества проекций исследуемого объекта при облучении источником, возбуждающим флуоресценцию, и регистрации эмиссии с последующей реконструкцией распределения флуорофора в ткани. В диффузионной флуоресцентной томографии (ДФТ) регистрируются многократно рассеянные фотоны, поэтому задача ДФТ обладает теми же сложностями, что и задача ОДТ: высокой чувствительностью к граничным условиям, некорректностью обратной задачи, ограниченностью применения диффузионного приближения УПИ.

Однако, в отличие от задачи восстановления пространственного распределения показателей рассеяния и поглощения, задача о восстановлении концентрации

флуорофора решается более эффективно даже при отсутствии дополнительных данных о структуре объекта.

Во-первых, было доказано, что число обусловленности обрабатываемой в ДФТ матрицы выше, чем в ОДТ, благодаря неотрицательности восстанавливаемой концентрации флуорофора [118].

Во-вторых, в ДФТ есть возможность регистрации не только флуоресцентного, но и возбуждающего излучения, а используя дополнительный источник, можно получить данные о прохождении через биоткань излучения в спектре эмиссии флуорофора. Эти данные позволяют нормировать сигнал флуоресценции, что уменьшает влияние граничных условий и вариаций показателей рассеяния и поглощения биотканей на получаемое решение, — так называемая борновская нормировка [119]. Кроме того, при регистрации флуоресценции спектрометром можно повысить точность реконструкции методом спектральной ДФТ, заключающимся в использовании дисперсии показателя поглощения биоткани [120] (рис. 11).

В-третьих, в ДФТ восстанавливается, как правило, не концентрация флуорофора, а его пространственное распределение (наличие или отсутствие) для определения геометрических размеров и локализации опухоли, меченой генетически кодируемым маркером. Эта задача решается гораздо легче, если имеется априорная информация о том, что восстанавливаемый объект (опухоль) является односвязной областью. Задача ДФТ успешно применяется для исследований на лабораторных животных с различными флуоресцентными агентами [121] и диагностики молочной железы [122, 123] с использованием индоцианина зелёного (ICG).

Для корректной реконструкции концентрации флуорофора уровень сигнала в ДФТ должен быть достаточно высок, что возможно лишь при использовании маркеров, спектры возбуждения и эмиссии которых лежат в терапевтическом окне прозрачности. Это ограничивает применение ДФТ для зелёных, жёлтых и красных флуоресцентных белков. Дальнекрасные ФБ (такие как *Katushka*, *mCherry*, *mRasberry* и т.д.), хотя они и флуоресцируют в окне прозрачности биоткани, возбуждаются в жёлтом спектре, в котором показатель поглощения биоткани всё ещё достаточно высок [124]. Чем выше показатель поглощения ткани, тем больше уровень автофлуоресцентного фона (собственной флуоресценции тканей), вносящего добавку в принимаемый сигнал и, соответственно, ухудшающего качество восстановления [125]. Вычистить эту добавку можно с использованием мульти-спектральных измерений — применяется от трёх до шести различных длин волн возбуждения экзогенного

маркера с хорошо известными спектральными характеристиками [126]. Такая процедура может занимать длительное время — от 20 мин до 1 ч, что не всегда приемлемо в экспериментах *in vivo*. Так же как и в ОДТ, в ДФТ для повышения точности реконструкции строятся гибридные системы ФДТ–КТ, сочетающие флуоресцентную томографию с рентгеновской [127]. Исследования по совместной регистрации ПЭТ–КТ и ДФТ–КТ радиоактивного фармакологического препарата, связанного с флуоресцентной меткой, в лабораторных животных показали, что распределения препарата, полученные обоими методами, близки друг к другу с высокой степенью корреляции [128].

6.3. Флуоресцентные проекционные методы исследования биотканей

Поскольку поверхностные методы не позволяют исследовать глубинную флуоресценцию (начиная с расстояний в несколько миллиметров), а томографические слишком сложны и времязатратны, в ряде случаев целесообразно использовать промежуточный метод — метод проекций, реализуемый при поточечном сканировании объекта исследования источником и приёмником в конфигурации "на просвет" (аналог проекционной ОДС). Такой метод позволяет получать двумерное распределение флуорофора, а применение борновской нормировки даёт возможность практически исключить влияние границ и неоднородностей оптических показателей объекта.

Метод проекций хорошо зарекомендовал себя для исследования глубоко расположенных опухолей, меченых дальнекрасными белками [129].

6.4. Спектральное и времяразрешённое разделение флуорофоров

Упомянутое в разделе 6.2 разделение автофлуоресценции и флуоресценции одного или нескольких экзогенных маркеров может осуществляться как спектральным, так и временным методами с использованием различия соответственно в спектральных (спектры возбуждения и эмиссии) и временных (время релаксации) характеристиках флуорофоров.

Спектроскопические измерения осуществляются перестройкой длины волны возбуждения источника и (или) фильтров эмиссии на детекторе. Поскольку спектры возбуждения и флуоресценции обычно являются достаточно широкими (несколько десятков нанометров), разрешить таким способом флуорофоры с близкорасположенными спектральными характеристиками очень сложно. Измерение времени релаксации позволяет разделять флуорофоры с перекрывающимися спектрами, и оно может быть использовано для исследования флуоресцентного резонансного переноса энергии (Fluorescence Resonance Energy Transfer — FRET) флуоресцентных белков *in vivo*, позволяющего изучать молекулярные процессы в клетках [130, 131].

Временные измерения стали возможными благодаря короткоимпульсным (субнаносекундным) лазерным источникам и регистраторам на основе времякоррелированного счёта одиночных фотонов или камер с усилителем изображения на основе фотокатода на микроканальных пластинах [132–134], позволяющим разрешать время прилёта фотона до 1 или 200 пс соответственно.

Другой способ определения времени релаксации флуорофора основан на определении сдвига фазы между зондирующим излучением, модулированным по интенсивности с высокой частотой (около 50 МГц), и принимаемым флуоресцентным сигналом (по аналогии с модуляционным методом в ОДС).

6.5. Флуоресцентные маркеры

В настоящее время активно ведутся работы по созданию новых ярких флуоресцентных маркеров, возбуждаемых в ближнем инфракрасном диапазоне длин волн, пригодных для глубинной флуоресцентной визуализации. Среди генетически кодируемых маркеров — флуоресцентных белков — можно выделить упомянутые выше дальнекрасные ФБ и флуоресцентный белок iRFP (near-infra-red fluorescent protein) [135], яркость которого не очень высока, но спектр его возбуждения лежит в красном диапазоне. Квантовые точки, несмотря на высокую яркость и возможность получения узких эмиссионных пиков в ближнем инфракрасном (ИК) диапазоне, пока не рассматриваются как возможные маркеры для исследований *in vivo*, поскольку вопрос о их токсичности ещё до конца не изучен [136]. Среди клинически разрешённых к применению флуорофоров (Food and Drug Administration — FDA) на данный момент исследователи располагают только индоцианином зелёным, хотя разрешённая к применению максимальная концентрация очень невелика — всего 2 мг/кг (согласно инструкции по применению).

Следует также отметить активно развиваемые в настоящее время маркеры с антистоксовой флуоресценцией [137] — так называемые апконвертирующие нанофосфоры, спектр эмиссии которых является более высокочастотным по сравнению со спектром возбуждения. Спектральные свойства этих частиц позволяют полностью исключить автофлуоресценцию биотканей, ограничивающую чувствительность флуоресцентных методов при применении флуорофоров со стоксовым сдвигом. Апконвертирующие нанофосфоры обладают нелинейным возбуждением: при относительно небольшой плотности мощности (менее 1 Вт см⁻²) квантовый выход пропорционален её величине, как при классической двухфотонной флуоресценции, однако само значение квантового выхода при указанной плотности мощности может достигать нескольких процентов, что делает возможным применение наночастиц для глубинной визуализации [138–140]. При более высоких значениях плотности мощности квантовый выход зависит от неё слабее, т.е. наблюдается эффект насыщения.

Таким образом, антистоксова флуоресценция позволяет исключить влияние автофлуоресценции на принимаемый сигнал, ограничивающей глубину исследования для флуоресцентных агентов с обычным стоксовым сдвигом. Кроме того, нелинейное возбуждение апконвертирующих нанофосфоров может быть использовано в реконструктивных алгоритмах ДФТ для более точной локализации этих частиц [141]. В работе [142] показано, что апконвертирующие наночастицы могут быть соединены с миниантителами scFv4D5 для специфического связывания с рецепторами HER2/neu, экспрессируемыми клетками аденокарциномы человека SK-BR-3, а глубина визуализации этих комплексов в молочной железе может достигать 4 мм.

6.6. Флуоресцентная визуализация в ближнем инфракрасном диапазоне

В флуоресцентной макроскопии, так же как и в микроскопии, в последние три года происходит активное освоение новых спектральных диапазонов длин волн 1200–1700 нм, в которых показатель поглощения воды имеет локальный минимум, а показатель рассеяния в несколько раз меньше, чем в традиционно используемом для глубинной флуоресцентной визуализации диапазоне 700–900 нм.

Так, например, методом поверхностного флуоресцентного имиджинга была получена структура кровеносной системы мозга лабораторного животного *in vivo* сквозь череп на глубине до 3 мм с разрешением до 10 мкм в диапазоне NIR-2а (1300–1400 нм) с использованием одностеночных углеродных нанотрубок, вводимых внутривенно [143].

7. Заключение

Как показано в настоящей статье, оптические методы активно развиваются для визуализации биологических объектов на самых разных масштабах: от масштабов наноскопии, разрешающей отдельные молекулы, до уровня целого организма мелких лабораторных животных и органов человека. В зависимости от применяемого метода для построения изображений используются вариации показателей рассеяния и поглощения биотканей, яркость эндогенных и экзогенных флуорофоров.

Применение флуоресцентных и поглощающих маркеров делает оптические методы привлекательными для изучения молекулярных процессов, однако ограниченная глубина оптической визуализации не позволяет им конкурировать с традиционными ПЭТ и МРТ на больших масштабах объектов исследований. В связи с этим большое внимание уделяется вопросам синтеза новых ярких флуоресцентных агентов, спектры поглощения и эмиссии которых находятся в окне прозрачности биотканей. В частности, получен флуоресцентный белок iRFP, который может служить генетическим маркером не только во флуоресцентных, но и в оптоакустических методах исследования благодаря большому сечению поглощения и небольшому квантовому выходу [144]. Другим направлением является синтез апконвертирующих наночастиц, спектр флуоресценции которых сдвинут в коротковолновую область относительно спектра возбуждения. Использование апконвертирующих наночастиц позволяет практически исключить влияние autofluorescentного фона при регистрации эмиссии, ограничивающего чувствительность флуоресцентных методов.

Ещё одним актуальным направлением является освоение новых спектральных диапазонов, в частности, в области 1300–1700 нм, где спектр поглощения воды имеет локальные минимумы, а рассеяние существенно меньше, чем в диапазоне 700–900 нм, что позволяет получать изображения биотканей с высоким пространственным разрешением на большую глубину.

Следует отметить, что совершенствование элементной базы оптических методов (создание компактных лазерных систем, высокочувствительных приёмников, применение волоконной оптики), накопление предклинического и клинического материала позволяет им всё больше проникать в клиническую диагностику, несмот-

ря на огромную конкуренцию со стороны традиционных ультразвуковых, рентгеновских и магнитно-резонансных методов исследования.

Исследуя рынок коммерчески доступных приборов для оптической биомедицинской визуализации, можно отметить, что скорость их внедрения убывает с увеличением масштаба исследуемого объекта. Так, например, в микроскопии практически каждое новое направление (STORM, STED, микроскопия с селективным облучением плоскости (Selective Plane Illumination Microscopy — SPIM), ультрамикроскопия и т.д.) очень быстро внедряется в производство крупными компаниями, такими как Olympus, Zeiss, Nikon, Leica. Коммерчески доступных приборов для исследований на лабораторных животных (флуоресцентная и оптоакустическая визуализация) гораздо меньше, что, по всей видимости, объясняется небольшим объёмом рынка.

Что касается приборов для медицинской диагностики (ОКТ, ОА, флуоресцентная микро- и макроскопия), то они внедряются крайне редко. Скорее всего, это связано не только со сложностью получения разрешающих документов (медицинская сертификация, получение FDA в США), но и с недостаточной осведомлённостью практических врачей в вопросах применения новых технологий.

Работа выполнена при поддержке Российским фондом фундаментальных исследований (грант 13-04-40306-Н).

Автор выражает глубокую признательность своим коллегам: Н.М. Шаховой, П.В. Субочеву, А.Г. Орловой, М.Ю. Кириллину — за ценные замечания и обсуждения при написании статьи, а также Г.В. Геликонову за предоставленные STORM- и ОКТ-изображения биобъектов.

Список литературы

1. Тучин В В (Ред.) *Оптическая биомедицинская диагностика* (М.: Физматлит, 2007); Tuchin V V (Ed.) *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics* (Washington, DC: SPIE Press, 2002)
2. Beard P *Interface Focus* **1** 602 (2011)
3. Nachabé R et al. *Biomed. Opt. Express* **2** 600 (2011)
4. Jacques S "Optical absorption of melanin" (дата обращения: 12.01.2016), <http://omlc.org/spectra/melanin/pheomelanin.html>
5. Taroni P et al. *J. Biomed. Opt.* **12** 014021 (2007)
6. Nachabé R et al. *J. Biomed. Opt.* **16** 087010 (2011)
7. Исимару А *Распространение и рассеяние волн в случайно-неоднородных средах* (М.: Мир, 1981); Ishimaru A *Wave Propagation and Scattering in Random Media* (New York: Academic Press, 1978)
8. Gorshkov A V, Kirillin M Yu *J. Biomed. Opt.* **20** 085002 (2015)
9. Krafft C et al. *J. Biomed. Opt.* **17** 040801 (2012)
10. Tichauer K M et al. *Phys. Med. Biol.* **60** R239 (2015)
11. König K *J. Microsc.* **200** 83 (2000)
12. Иванов А А, Алфимов М В, Желтиков А М *УФН* **174** 743 (2004); Ivanov A A, Alfimov M V, Zheltikov A M *Phys. Usp.* **47** 687 (2004)
13. Uchugonova A et al. *Cell Cycle* **10** 2017 (2011)
14. Balu M et al. *JAMA Dermatology* **151** 1068 (2015)
15. Dimitrow E et al. *J. Invest. Dermatol.* **129** 1752 (2009)
16. Horton N G et al. *Nature Photon.* **7** 205 (2013)
17. Hell S, Stelzer E H K *Opt. Commun.* **93** 277 (1992)
18. Westphal V, Hell S W *Phys. Rev. Lett.* **94** 143903 (2005)
19. Rust M J, Bates M, Zhuang X *Nature Meth.* **3** 793 (2006)
20. van de Linde S et al. *Nature Protoc.* **6** 991 (2011)
21. Gustafsson M G L *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** 13081 (2005)
22. Yamanaka M, Smith N I, Fujita K *Microscopy* **63** 177 (2014)
23. Sharpe J et al. *Science* **296** 541 (2002)
24. Huisken J, Stainier D Y R *Development* **136** 1963 (2009)
25. Huisken J et al. *Science* **305** 1007 (2004)

26. Dodt H-U et al. *Nature Meth.* **4** 331 (2007)
27. Морозов А Н и др. *Квантовая электроника* **40** 842 (2010); Morozov A N et al. *Quantum Electron.* **40** 842 (2010)
28. Huang D et al. *Science* **254** 1178 (1991)
29. Sull A C et al. *Retina* **30** 235 (2010)
30. Regatieri C V et al. *Retina* **32** 563 (2012)
31. Mowatt G et al. *Health Technol. Assess.* **18** 1 (2014)
32. Vakoc B J et al. *Nature Rev. Cancer* **12** 363 (2012)
33. Mahmood U et al. *Am. J. Rhinol.* **20** 155 (2006)
34. Пантелеева О Г и др. *Вестн. рентгенологии и радиологии* (4) 50 (2012)
35. Davoudi B et al. *J. Biomed. Opt.* **18** 076008 (2013)
36. Gudmundsdottir I et al. *Open Heart* **2** e000225 (2015)
37. Dolin L S et al., in *Coherent-Domain Optical Methods. Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science* (Ed. V V Tuchin) (New York: Kluwer Acad. Publ., 2004) p. 211
38. Долин Л С *УФН* **179** 553 (2009); Dolin L S *Phys. Usp.* **52** 519 (2009)
39. Turchin I V et al. *J. Biomed. Opt.* **10** 064024 (2005)
40. Feldchtein F I et al. *Optics Express* **3** 257 (1998)
41. Sergeev A M et al. *Opt. Express* **1** 432 (1997)
42. Fujimoto J G et al. *Neoplasia* **2** 9 (2000)
43. Voppart S A et al. *Radiology* **208** 81 (1998)
44. Shakhov A V et al. *J. Surg. Oncol.* **77** 253 (2001)
45. Shakhova N M et al. *Laser Phys.* **12** 617 (2002)
46. De Boer J F et al. *IEEE J. Sel. Topics Quantum Electron.* **5** 1200 (1999)
47. Matveev L A et al. *Opt. Lett.* **40** 1472 (2015)
48. Briers J D, Webster S J. *Biomed. Opt.* **1** 174 (1996)
49. Виленский М А и др. *Квантовая электроника* **42** 489 (2012); Vilenskii M A et al. *Quantum Electron.* **42** 489 (2012)
50. Robles F E et al. *Nature Photon.* **5** 744 (2011)
51. Izatt J A et al. *IEEE J. Sel. Topics Quantum Electron.* **2** 1017 (1996)
52. Геликонов В М и др. *Изв. вузов. Радиофизика* **46** 610 (2003); Gelikonov V M et al. *Radiophys. Quantum Electron.* **46** 550 (2003)
53. Dubois A, Moreau J, Voccaro C *Opt. Express* **16** 17082 (2008)
54. Wang R K et al. *J. Opt. Soc. Am. B* **18** 948 (2001)
55. Genina E A, Bashkatov A N, Tuchin V V *Expert Rev. Med. Devices* **7** 825 (2010)
56. Sirotkina M A et al. *J. Nanopart. Res.* **13** 283 (2011)
57. Kirillin M Yu et al. *J. Biomed. Opt.* **14** 021017 (2009)
58. Thrane L et al. *Opt. Lett.* **29** 1641 (2004)
59. Kirillin M et al. *J. Biomed. Opt.* **17** 081413 (2012)
60. Esenaliev R O, Karabutov A A, Oraevsky A A *IEEE J. Sel. Topics Quantum Electron.* **5** 981 (1999)
61. Kruger R A et al. *Med. Phys.* **37** 6096 (2010)
62. Kim C, Favazza C, Wang L V *Chem. Rev.* **110** 2756 (2010)
63. Razansky D, Buehler A, Ntziachristos V *Nature Protoc.* **6** 1121 (2011)
64. Jathoul A P et al. *Nature Photon.* **9** 239 (2015)
65. Subochev P et al. *Laser Phys. Lett.* **13** 025605 (2016)
66. Rosenthal A, Ntziachristos V, Razansky D *Curr. Med. Imaging Rev.* **9** 318 (2013)
67. Перекатова В В, Фикс И И, Субочев П В *Изв. вузов. Радиофизика* **57** 75 (2014); Perekatova V V, Fiks I I, Subochev P V *Radiophys. Quantum Electron.* **57** 67 (2014)
68. Neuschmelting V et al. *Photoacoustics* **4** 1 (2015)
69. Oraevsky A A, in *Biomedical Photonics Handbook* (Ed. T Vo-Dinh) (Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group, 2015) p. 715
70. Heijblom M et al. *Opt. Express* **20** 11582 (2012)
71. Taruttis A et al. *PLoS One* **7** e30491 (2012)
72. Yao J, Wang L V *Photoacoustics* **2** 87 (2014)
73. Subochev P et al. *Opt. Lett.* **37** 4606 (2012)
74. Subochev P et al. *Biomed. Opt. Express* **6** 631 (2015)
75. Wurzinger G et al. *Biomed. Opt. Express* **4** 1380 (2013)
76. Subochev P *Opt. Lett.* **41** 1006 (2016)
77. Yang J-M et al. *Nature Med.* **18** 1297 (2012)
78. Субочев П В и др. *Докл. РАН* **454** 396 (2014); Subochev P V et al. *Dokl. Phys.* **59** 59 (2014)
79. Taruttis A, Ntziachristos V *Nature Photon.* **9** 219 (2015)
80. Menke J *Eur. Radiol.* **25** 2205 (2015)
81. Mallidi S et al. *Theranostics* **5** 289 (2015)
82. Zackrisson S, van de Ven S M, Gambhir S S *Cancer Res.* **74** 979 (2014)
83. Zhou Y et al. *J. Biophoton.* **8** 961 (2015)
84. Yao J, Wang L V *Neurophotonics* **1** 1877516 (2014)
85. Allen T J et al. *J. Biomed. Opt.* **17** 061209 (2012)
86. Hu Z et al. *Int. J. Ophthalmol. Eye Res.* **03** 126 (2015)
87. Тучин В В *УФН* **167** 517 (1997); Tuchin V V *Phys. Usp.* **40** 495 (1997)
88. Jacques S L *Phys. Med. Biol.* **58** R37 (2013)
89. Chung S H et al. *Phys. Med. Biol.* **53** 6713 (2008)
90. Shah N et al. *Disease Markers* **19** 95 (2004)
91. Tromberg B J et al. *Neoplasia* **2** 26 (2000)
92. Patterson M S, Chance B, Wilson B C *Appl. Opt.* **28** 2331 (1989)
93. Yodh A G, Boas D A, in *Biomedical Photonics Handbook* (Ed. T Vo-Dinh) (Boca Raton: CRC Press, 2003) Ch. 21
94. Bevilacqua F et al. *Appl. Opt.* **39** 6498 (2000)
95. Зимняков Д А, Тучин В В *Квантовая электрон.* **32** 849 (2002); Zimnyakov D A, Tuchin V V *Quantum Electron.* **32** 849 (2002)
96. Arridge S R *Inverse Probl.* **15** R41 (1999)
97. Коновалов А Б и др. *Квантовая электрон.* **36** 1048 (2006); Kononov A et al. *Quantum Electron.* **36** 1048 (2006)
98. Третьяков Е В, Шувалов В В, Шутов И В *Квантовая электрон.* **32** 941 (2002); Tret'yakov E V, Shuvalov V V, Shutov I V *Quantum Electron.* **32** 941 (2002); Третьяков Е В, Шувалов В В, Шутов И В *Квантовая электрон.* **31** 1095 (2001); Tret'yakov E V, Shuvalov V V, Shutov I V *Quantum Electron.* **31** 1095 (2001)
99. Choe R et al. *J. Biomed. Opt.* **14** 024020 (2009)
100. Maslennikova A V et al. *J. Biophoton.* **3** 743 (2010)
101. Boas D A et al. *IEEE Signal Process. Mag.* **18** 57 (2001)
102. Gibson A P, Hebden J C, Arridge S R *Phys. Med. Biol.* **50** R1 (2005)
103. Durduran T et al. *Rep. Prog. Phys.* **73** 076701 (2010)
104. Eggebrecht A T et al. *NeuroImage* **61** 1120 (2012)
105. Carpenter C M et al. *Opt. Lett.* **32** 933 (2007)
106. Godavarty A et al. *Breast Cancer Targets Therapy* **7** 193 (2015)
107. Taroni P et al. *Phys. Med. Biol.* **50** 2469 (2005)
108. Orlova A G et al. *Laser Phys. Lett.* **5** 321 (2008)
109. Thomas D et al. *J. Biomed. Opt.* **17** 071311 (2012)
110. Ntziachristos V et al. *Nature Biotechnol.* **23** 313 (2005)
111. Pogue B W et al. *Technol. Cancer Res. Treat.* **3** 15 (2004)
112. Leblond F et al. *J. Photochem. Photobiol. B* **98** 77 (2010)
113. Themelis G et al. *J. Biomed. Opt.* **14** 064012 (2009)
114. Горяйнов С А и др. *Вопросы нейрохирургии* **78** 22 (2014); Goriainov S A et al. *J. Neurosurgery* **78** (2) 21 (2014)
115. Celli J P et al. *Chem. Rev.* **110** 2795 (2010)
116. Kleshnin M S et al. *Laser Phys. Lett.* **12** 115602 (2015)
117. Sheng C et al. *Photochem. Photobiol.* **83** 738 (2007)
118. Fiks I *Int. J. Comput. Meth.* **11** 1350071 (2014)
119. Ntziachristos V, Weissleder R *Opt. Lett.* **26** 893 (2001)
120. Kleshnin M S, Turchin I V *Laser Phys. Lett.* **10** 075601 (2013)
121. Stuker F, Ripoll J, Rudin M *Pharmaceutics* **3** 229 (2011)
122. Corlu A et al. *Opt. Express* **15** 6696 (2007)
123. Godavarty A et al. *Phys. Med. Biol.* **48** 1701 (2003)
124. Deliolanis N C et al. *J. Biomed. Opt.* **13** 044008 (2008)
125. Darne C, Lu Y, Sevick-Muraca E M *Phys. Med. Biol.* **59** R1 (2014)
126. Chaudhari A J et al. *Med. Biol.* **54** 4687 (2009)
127. Freyer M et al. *J. Biomed. Opt.* **15** 036006 (2010)
128. Nahrendorf M et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107** 7910 (2010)
129. Kleshnin M et al. *Photon. Lasers Med.* **4** 85 (2015)
130. Sun Y, Day R N, Periasamy A *Nature Protoc.* **6** 1324 (2011)
131. Shcherbo D et al. *BMC Biotechnol.* **9** 24 (2009)
132. Nothdurft R E et al. *J. Biomed. Opt.* **14** 024004 (2009)
133. Rusanov A L et al. *J. Biophoton.* **3** 774 (2010)
134. McGinty J et al. *Biomed. Opt. Express* **2** 1907 (2011)
135. Filonov G S et al. *Nature Biotechnol.* **29** 757 (2011)
136. Tsoi K M et al. *Accounts Chem. Res.* **46** 662 (2013)
137. Xu C T et al. *Laser Photon. Rev.* **7** 663 (2013)
138. Khaydukov E V et al. *Biomed. Opt. Express* **5** 1952 (2014)

139. Nyk M et al. *Nano Lett.* **8** 3834 (2008)
140. Vinegoni C et al. *Opt. Lett.* **34** 2566 (2009)
141. Xu C T, Axelsson J, Andersson-Engels S *Appl. Phys. Lett.* **94** 251107 (2009)
142. Grebenik E A et al. *J. Biomed. Opt.* **18** 076004 (2013)
143. Hong G et al. *Nature Photon.* **8** 723 (2014)
144. Deliolanis N C et al. *Mol. Imag. Biol.* **16** 652 (2014)

Methods of biomedical optical imaging: from subcellular structures to tissues and organs

I.V. Turchin

*Institute of Applied Physics, Russian Academy of Sciences,
ul. Ul'yanova 46, 603950 Nizhny Novgorod, Russian Federation
Tel. +7 (831) 436 80 10
E-mail: ilya@ufp.appl.sci-nnov.ru*

Optical bioimaging methods have a wide range of applications in life science, most notably including: the molecular resolution study of subcellular structures, the small animal molecular imaging, and the structural and functional clinical diagnostics of tissue layers and organs. In this paper, fluorescent microscopy, fluorescent macroscopy, optical coherence tomography, optoacoustic tomography and optical diffuse spectroscopy and tomography are reviewed from the standpoint of physical fundamentals, applications and progress.

Keywords: optical bioimaging, biophotonics, optical coherence tomography, fluorescent microscopy, optical nanoscopy, optoacoustics, optical diffusion tomography, fluorescent agents, fluorescent proteins, upconversion nanoparticles, STED, STORM

PACS numbers: 42.25.Dd, 42.62.Be, 43.35.Sx, **87.64.–t**, 87.64.Cc

DOI: 10.3367/UFNr.2015.12.037734

Bibliography — 144 references

Received 22 January 2016

Uspekhi Fizicheskikh Nauk **186** (5) 550–567 (2016)

Physics – Uspekhi **59** (5) (2016)