

# Исследование возможности увеличения глубины зондирования методом отражательной конфокальной микроскопии при иммерсионном просветлении приповерхностных слоев кожи человека

И.В.Меглинский<sup>\*/\*\*</sup>, А.Н.Башкатов<sup>\*</sup>, Э.А.Генина<sup>\*</sup>, Д.Ю.Чурмаков<sup>\*\*</sup>, В.В.Тучин<sup>\*</sup>

*Рассмотрена возможность увеличения глубины зондирования кожи человека методом отражательной конфокальной микроскопии (ОКМ) при уменьшении амплитуды пространственных флуктуаций показателя преломления верхних слоев кожи. Изменение глубины зондирования оценивается на основе анализа пространственного распределения плотности вероятности эффективных оптических путей детектируемых фотонов, рассчитанной методом Монте-Карло. Результаты численного моделирования интерпретируются в рамках возможного применения ОКМ для исследования кожи человека при воздействии на нее биологически совместимой иммерсионной жидкостью. Диффузия иммерсионного агента в глубь кожи влечет за собой выравнивание показателей преломления структурных элементов ее приповерхностных слоев, что в свою очередь вызывает уменьшение рассеяния и частичное просветление верхних слоев ткани. Показано, что уменьшение рассеяния приповерхностных слоев кожи приводит к значительному увеличению глубины зондирования методом ОКМ.*

**Ключевые слова:** метод отражательной конфокальной микроскопии, оптические свойства кожи, иммерсионное просветление биотканей, плотность вероятности эффективных оптических путей, локализация оптического излучения, метод Монте-Карло.

## 1. Введение

Метод отражательной конфокальной микроскопии (ОКМ) широко применяется в последнее время в различных биомедицинских исследованиях для визуализации внутренней структуры биотканей [1, 2]. По сравнению с методами обычной микроскопии основное достоинство ОКМ заключается в том, что данный метод позволяет получить высококачественное (с микронным пространственным разрешением) изображение клеточных слоев. При этом не приходится прибегать к рутинной гистологической подготовке исследуемых образцов, что является немаловажным при исследованиях клеточной структуры биологических объектов *in vivo*.

Высокий контраст изображения и пространственное разрешение ОКМ достигаются за счет зондирования малого ( $10 - 100 \text{ мкм}^3$ ) объема среды, ограниченного размерами центрального фокального пятна, формируемого фокусирующей оптической системой. Локализация полезного сигнала в измеряемом объеме столь малых размеров оказывается возможной в результате оптического сопряжения источника лазерного излучения, измеряемого объема и фотодетектора. При этом поле зрения ис-

точника лазерного излучения и фотодетектора ограничено диафрагмами субмикронных размеров, установленными в плоскости предметов и изображений (рис.1). Если в исследуемой среде глубина погружения фокуса линзы  $z_f$  не превышает трех-четырех длин среднего свободного пробега фотона  $l_{ph}$  [3], то при таком диафрагмировании (см. рис.1) в детектируемом сигнале доминируют фотоны, отраженные строго назад от структурных элементов зондируемого микрообъема, – так называемые баллистические фотоны. Известно, что именно они являются носителями полезной информации, позволяющей восстановить изображение внутренней структуры исследуемой среды [4].

С увеличением  $z_f$ , т.е. при большем погружении фокуса в глубь рассеивающей среды, доля баллистических фотонов в детектируемом сигнале снижается, тогда как доля рассеянных в среде фотонов, наоборот, растет. В условиях типичных экспериментов с биотканями метод ОКМ позволяет различать баллистические фотоны на фоне общей массы рассеянных средней фотонов до тех пор, пока  $z_f$  не начинает превышать  $l_{ph}$  в 5–8 раз [5]. Другими словами, из-за сильного многократного рассеяния оптического излучения, характерного для большинства биотканей [6], метод ОКМ позволяет получать изображение клеточной структуры биотканей кожи, расположенных на глубине не более чем 300–400 мкм [2, 7].

Очевидно, что максимальной глубины сканирования методом ОКМ можно добиться, увеличивая  $l_{ph}$  или, что то же самое, уменьшая кратность рассеяния в верхних слоях зондируемой среды (в нашем случае – кожи человека). Подавить рассеяние в кожных тканях на непродолжительное время можно с помощью нанесения на по-

<sup>\*</sup>Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410026 Саратов, ул. Московская, 155; тел.: + 7-845-2-514693; факс: + 7-845-2-240446; e-mail: bash@optics.sgu.ru

<sup>\*\*</sup>Cranfield University, School of Engineering, Cranfield, MK43 0AL, UK; тел.: + 44-1234-754767; факс: + 44-1234-750425; e-mail: i.meglinski@cranfield.ac.uk

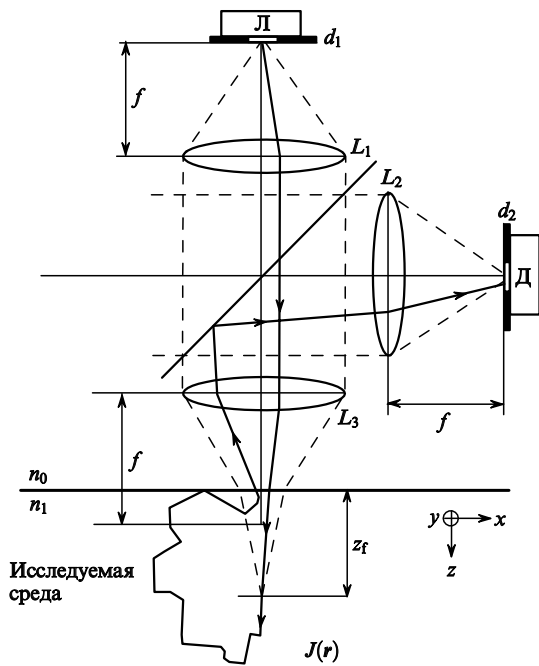


Рис.1. Схематическое представление метода конфокального зондирования:

$L_1, L_2, L_3$  – короткофокусные линзы ( $f = 8$  мм), попарно образующие узкопросветный коллиматор;  $d_1$  и  $d_2$  – ограничивающие диафрагмы диаметром 10 мкм;  $z_f$  – глубина погружения в среду точки фокуса; Л – лазерный источник; Д – приемник оптического излучения;  $n_0$  и  $n_1$  – коэффициенты преломления внешней и исследуемой сред.

верхность кожи или инъекции в дерму кожи растворов глюкозы, глицерина и некоторых других биологически совместимых иммерсионных жидкостей [8–12]. Показано, что применение в качестве иммерсионных жидкостей глицерина и пропиленгликоля позволяет значительно улучшить контраст изображения и глубину зондирования кожи методом низкокогерентной оптической томографии [13]. Аналогичные результаты получены для цельной крови [14, 15]. Однако, несмотря на многочисленные экспериментальные данные [10–15], объективно свидетельствующие о перспективности метода оптической иммерсии в приложении к биотканям, на сегодняшний день требуются надежные количественные данные о глубине зондирования кожи в условиях иммерсионного просветления.

Целью настоящего исследования является анализ возможности увеличения эффективной глубины зондирования методом ОКМ биотканей за счет снижения в них коэффициента рассеяния при их оптической иммерсии.

## 2. Функция плотности вероятности эффективных оптических путей

Вследствие многократного рассеяния излучение внутри биоткани оказывается распределенным в некоторой области  $G$  [6, 8]. Особенности пространственного распределения излучения в данной области определяются геометрическими и оптическими свойствами исследуемой среды, а также условиями ее освещенности (т. е. профилем падающего пучка, углом его наклона к поверхности среды и др.) [16, 17]. (Здесь и далее к оптическим параметрам среды мы относим  $\mu_s$  – коэффициент рассеяния,  $\mu_a$  – коэффициент поглощения,  $g$  – фактор анизотропии и

$n$  – показатель преломления. Геометрические свойства определяются внутренними структурными особенностями среды, т. е. границами слоев среды, их формой, глубиной залегания, степенью шероховатости поверхности.)

С практической точки зрения область  $G$  и особенности распределения излучения в ней интересны преимущественно для задач оптической дозиметрии [6]. В задачах оптической диагностики и томографии наибольший интерес представляет эффективная область измерений  $J$ , или так называемый измеряемый объем (рис.2). Это объясняется тем, что анализ эффективной области измерений  $J$  позволяет достоверно определить оптимальность конфигурации той или иной оптической схемы, предназначенной для зондирования контрольного объема, расположенного на заданной глубине исследуемой среды.

Прямые измерения области  $J$  для биотканей на сегодняшний день могут проводиться, по-видимому, только *in vitro* [17], да и то в случае, если  $J$  совпадает с областью распределения падающего излучения ( $J \equiv G$ ), другими словами, только тогда, когда приемником излучения является вся поверхность исследуемой среды. Практически это может быть реализовано, например, при детектировании диффузно отраженного назад излучения интегрирующей сферой, диаметр рабочего окна которой много больше размеров источника излучения (коллимированного лазерного пучка). Любое диафрагмирование поля зрения детектора, например волоконным световодом, существенно ограничивает измеряемый объем  $J$  (см. рис.2):  $J < G$ ,  $J \subset G$ . Определение контуров  $J$  в этом случае возможно только с помощью численных методов, например посредством анализа временной функции рассеяния точки, характеризующей среднее время пребывания регистрируемых детектором фотонов в том или ином элементарном объеме зондируемой среды.

Принимая во внимание тот факт, что используемое в ОКМ лазерное излучение является непрерывным, согласно [18] перейдем от рассмотрения временной функции рассеяния точки к рассмотрению распределения эффек-

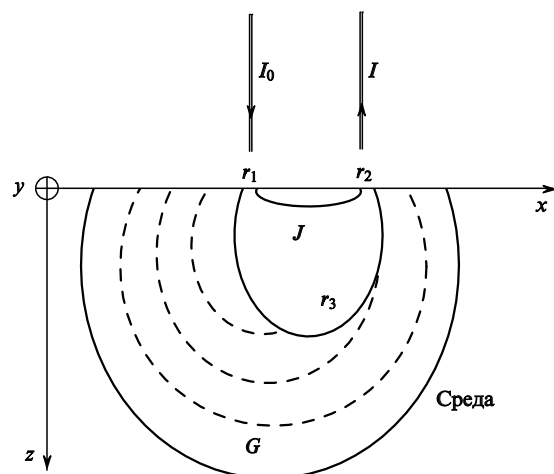


Рис.2. Схема области пространственного распределения падающего излучения  $G$  в случайно-неоднородной многослойной сильно рассеивающей свет среде при волоконно-оптическом зондировании последней:

$J$  ( $J \subset G$ ) – область пространственного распределения эффективных оптических путей фотонов, характеризующая область локализации детектируемого сигнала;  $r_1$  – координата входа пакета фотонов в среду;  $r_2$  – координата выхода пакета фотонов из среды;  $r_3$  – координата исследуемой среды.

тивных оптических путей  $L$  регистрируемых фотонов и к анализу функции плотности вероятности эффективных оптических путей  $J(r)$ . Здесь и далее под эффективным оптическим путем мы понимаем путь фотона, непосредственно пройденный им в среде от источника до детектора. Это позволяет определить длину пути и/или время пребывания фотона в каждом элементарном объеме среды, что в свою очередь определяет возможность перехода от временной функции рассеяния точки к рассмотрению  $J(r)$  [18]. Для методов, основанных на измерении интенсивности обратнорассеянного излучения, зададим, согласно [18–20],  $J(r)$  для однородной сильно рассеивающей среды следующим образом:

$$J(r_1, r_2, r_3) = \frac{\partial F(r_1, r_2)}{\partial \mu_a(r_3)}, \quad (1)$$

где  $\partial \mu_a(r_3)$  – изменение коэффициента поглощения среды в точке  $r_3$ ;  $r_1$  – точка, определяющая положение источника излучения на поверхности среды;  $\partial F(r_1, r_2)$  – изменение потока излучения, который регистрируется в точке  $r_2$  на поверхности среды и определяется как

$$F(r_1, r_2) = -\ln \left[ \frac{I(r_2)}{I_0(r_1)} \right]. \quad (2)$$

Здесь  $I_0(r_1)$  – интенсивность падающего излучения в точке  $r_1$ ;  $I(r_2)$  – интенсивность излучения в поле зрения детектора в точке  $r_2$ . Будем считать, что для непрерывного немодулированного падающего излучения величины  $I(r_2)$  и  $I_0(r_1)$  связаны между собой согласно закону Бугера – Ламберта – Бера:  $I(r_2) = I_0(r_1) \exp(-\mu_a L)$ . Подставляя (2) в (1), получаем, что

$$J(r_1, r_2, r_3) = -\frac{1}{I(r_2)} \frac{\partial I(r_2)}{\partial \mu_a(r_3)}. \quad (3)$$

Таким образом,  $J(r_1, r_2, r_3)$  определяет удельный поток излучения, который регистрируется детектором в границах расположенного в точке  $r_3$  элементарного объема ( $\Delta x \times \Delta y \times \Delta z$ ) среды ( $\forall r_3 \in G$ ). Функция  $J(r)$  характеризует полное пространственное распределение удельного потока регистрируемого излучения в среде и определяется распределением эффективных оптических путей (см. рис.2). В случае сложной неоднородной многослойной среды, оптические свойства которой могут меняться от слоя к слою, будем рассматривать парциальные составляющие эффективных оптических путей для каждого  $i$ -го слоя в отдельности:

$$J(r) = -\frac{1}{I} \frac{\partial I}{\partial \mu_{ai}}. \quad (4)$$

Следует отметить, что подобная задача в том или ином виде решалась ранее в приложении к ближней инфракрасной/оптической томографии биологических объектов [18–23]. Этим объясняется многообразие терминов, используемых для определения  $J(r)$ : функция плотности измеряемых фотонов [19, 20], область чувствительности [21], измеряемый фотонный объем [22], плотность фотонных попаданий [23], контур пространственной чувствительности [24] и др. Представляется, что термин «функция плотности вероятности эффективных оптических путей» является наиболее подходящим определением для  $J(r)$ .

### 3. Использование метода Монте-Карло для расчета $J(r)$ при конфокальном зондировании биотканей кожи

Сложность внутренней структуры кожи человека, представляющей собой случайно-неоднородную многослойную среду, сильно рассеивающую и поглощающую оптическое излучение, не позволяет использовать для расчета  $J(r)$  методы, основанные на диффузионном приближении [22–25]. По той же причине для решения данной задачи оказываются недостаточными методы простой и двойной локальных оценок [26, 27]. Геометрия конфокальной схемы зондирования (см. рис.1) в сочетании со сложной формой границ раздела слоев среды существенно сужает применимость метода конечных элементов [19, 20] и метода случайных блужданий фотонов [28], поскольку данные методы не позволяют адекватно учитывать сфокусированность зондирующего излучения и полное внутреннее отражение на границах раздела слоев при моделировании распространения сфокусированного излучения в многослойной среде. В этом случае наиболее оптимальным методом определения плотности вероятности эффективных оптических путей, на наш взгляд, является метод численного моделирования Монте-Карло (МК) [26, 29, 30].

В настоящей работе мы используем алгоритм поэтапного моделирования [29, 30], модифицированный для конфокальной схемы зондирования (см. рис.1). В рамках данного алгоритма поверхности границ раздела слоев представляются в виде случайно-периодических волнообразных поверхностей. Размеры пиков для каждой поверхности подобраны из расчета наибольшего их соответствия формам границ раздела слоев, присущим структурным геометрическим особенностям кожи человека [2, 31, 32]. Степень шероховатости поверхности выбрана в соответствии с характерными среднестатистическими размерами клеток и/или коллагеновых волокон, свойственных различным слоям кожи человека [2, 31, 32]. Показано, что учет шероховатости границ раздела слоев имеет существенное значение при моделировании зондирования многослойной среды сфокусированным узконаправленным лазерным пучком [33]. Показано также, что, несмотря на сильное многократное рассеяние слоев исследуемой среды, при заведомо малых расстояниях между источником и детектором геометрические особенности среды сказываются на формировании области пространственного распределения  $J(r)$  [17].

Кроме совершенствования геометрической модели кожи человека, другим принципиально важным отличительным признаком метода [29, 30] является отказ от процедуры «рулетки», используемой в популярной на сегодняшний день версии метода МК [16, 34–36]. Данная процедура предназначена для выравнивания баланса энергии падающего излучения и излучения, поглощенного средой и вышедшего за пределы границ рассматриваемой области вследствие рассеяния. Технически реализация процедуры «рулетки» заключается в периодическом увеличении статистического веса отдельных пакетов фотонов, выбираемых случайно, взамен суммарного веса группы «потерянных» в среде пакетов фотонов (т. е. фотонов, вышедших за пределы рассматриваемых границ или исключаемых из дальнейшего рассмотрения вследствие малости их статистического веса). Таким образом, увеличение статистического веса отдельно взято-

го фотона повышает его шансы на «выживание» (благополучный выход из среды в заданной точке). Однако при этом происходит необоснованное увеличение длины оптического пути фотона, что заведомо приводит к ошибочным результатам при расчете распределения эффективных оптических путей фотонов посредством процедуры «рулетки» [16, 34–36].

В контексте используемого нами алгоритма метода МК [29, 30] расчет эффективных оптических путей фотонов осуществляется на основе метода расчета истинных траекторий [37]. При этом моделирование траектории каждого отдельно взятого пакета фотонов описывается в терминах направляющих косинусов. Определение начальных условий ввода пакетов фотонов в среду и условия их детектирования для заданной конфокальной схемы зондирования основываются на подходе лучевой оптики [3, 38]. Траектория пакета фотонов прослеживается до тех пор, пока статистический вес пакета, уменьшающийся пропорционально френелевским коэффициентам отражения/преломления вследствие процессов отражения или преломления, происходящих на поверхности среды, не становится меньше 0.001. Это позволяет учесть полное внутреннее отражение на поверхности среды. Траектории всех пакетов фотонов, достигших области детектирования, фиксируются. В настоящей работе мы ограничиваемся детектированием  $5 \times 10^6$  фотонных пакетов.

Далее, исследуя траектории каждого отдельно взятого пакета, мы учитываем поглощение оптического излучения в среде – так же, как это делается в [29, 30], т.е. уменьшаем текущее значение веса пакета пропорционально  $\exp(-\mu_a l_{ph})$  на каждом шаге его пути. Такое сочетание метода расчета истинных траекторий с использованием статистических весов позволяет сравнительно легко рассчитать плотность вероятности эффективных оптических путей (4) для произвольной геометрии зондирования среды и набора оптических характеристик ее слоев.

#### 4. Результаты и обсуждение

На рис.3 представлены результаты численного моделирования  $J(r)$ , выполненного описанным выше методом для конфокальной схемы зондирования при погружении фокуса объектива в глубину однородной рассеивающей среды на 300 мкм. Используемые при расчетах параметры конфокальной схемы зондирования (см. рис.1) выбраны как один из возможных вариантов, соответствующий характеристикам объективов, применяемых в ОКМ [1, 2]. Выбор оптических свойств среды для случаев, представленных на рис.3, основан на экспериментальных данных [3], определяющих предельную глубину сканирования для ОКМ. Как и ожидалось, в случае, когда глубина погружения фокуса линзы  $z_f$  не превышает трех-четырех длин среднего свободного пробега фотона ( $\mu_s \leq 10 \text{ мм}^{-1}$  или, что то же самое,  $l_{ph} \geq 100 \text{ мкм}$ ), в пространственном распределении плотности эффективных оптических путей фотонов наблюдается ярко выраженное их фокусирование на глубине 300 мкм (см. рис.3,а).

Если  $z_f$  составляет 8–20 длин среднего свободного пробега фотона в среде ( $\mu_s = 26.6 - 40 \text{ мм}^{-1}$  и, соответственно,  $l_{ph} = 25 - 37.5 \text{ мкм}$ ), то тенденция фокусирования зондируемого излучения в среде сохраняется (рис.3,б). Однако область центрального фокального пятна оказывается значительно большей, чем в случае, представ-

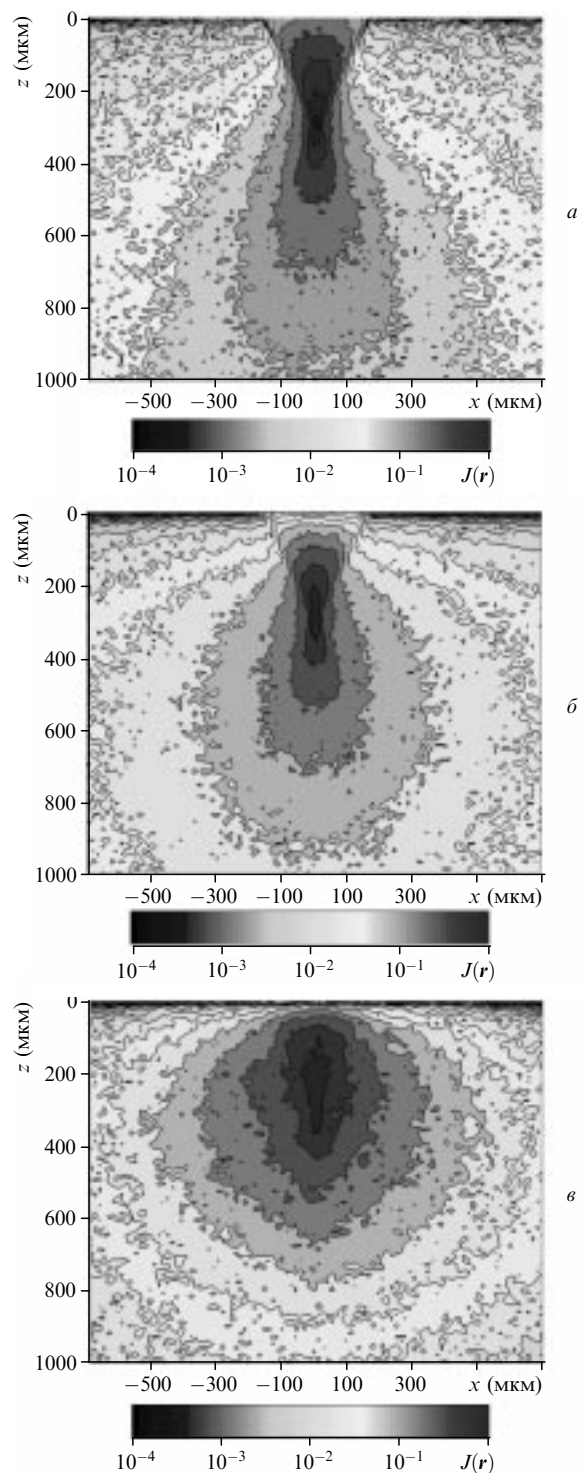


Рис.3. Пространственное распределение плотности вероятности эффективных оптических путей фотонов  $J(r)$ , рассчитанное для сильно рассеивающей ( $\mu_s = 10$  (а), 26.6 (б) и  $100 \text{ мм}^{-1}$  (в)) однородной ( $n = 1.4$ ) анизотропной ( $g = 0.9$ ) и поглощающей ( $\mu_a = 0.01 \text{ мм}^{-1}$ ) оптическое излучение среды. Глубина погружения точки фокуса  $z_f = 300 \text{ мкм}$ .

ном на рис.3,а, что отражается на качестве получаемого изображения. При дальнейшем увеличении коэффициента рассеяния среды ( $\mu_s \geq 100 \text{ мм}^{-1}$ ) и соответствующем сокращении длины среднего свободного пробега фотона ( $l_{ph} \leq 1 \text{ мкм}$ ) падающее излучение оказывается расфокусированным, хотя его узконаправленность по-прежнему сохраняется (см. рис.3,в).

Данные результаты (рис.3) служат наглядной иллюстрацией возможности локализации сфокусированного зондирующего лазерного излучения в однородной, многократно рассеивающей, анизотропной ( $g = 0.9$ ) и слабо поглощающей оптическое излучение ( $\mu_a = 0.01 \text{ мм}^{-1}$ ) среде при зондировании последней методом ОКМ и хорошо согласуются с экспериментальными данными и результатами, полученными независимыми методами моделирования [27, 38, 39].

В многослойной среде, такой, например, как кожа человека, существенное влияние на распределение эффективных оптических путей фотонов оказывает неоднородное распределение оптических характеристик среды по глубине. Приведенные ниже (рис.4) результаты расчетов  $J(r)$  наглядно демонстрируют, как и насколько быстро сильное рассеяние слоев среды, в сочетании с шероховатостью границ их раздела, разрушает узконаправленный сфокусированный ( $z_f = 300 \text{ мкм}$ ) лазерный пучок. Оптические свойства слоев среды (см. табл.1), используемые нами при моделировании, соответствуют тканям нормальной кожи человека кавказского типа в ближнем ИК спектральном диапазоне ( $\lambda = 600\text{--}700 \text{ нм}$ ) [6]. Кровенаполнение тканей, степень оксигенации кровотока, уровень гематокрита, содержание воды и меланина учитывались аналогично подходу [40], позволяющему модели-

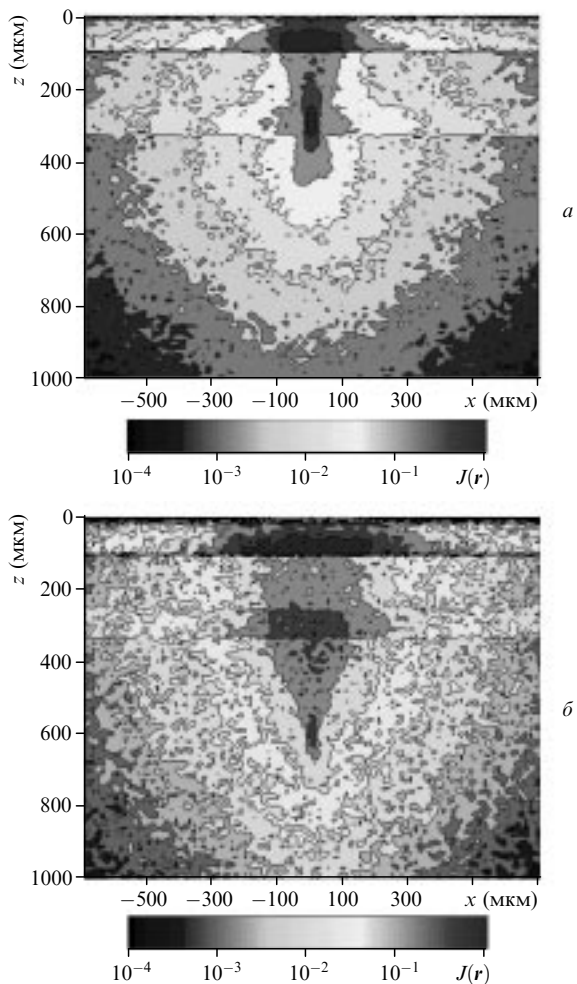


Рис.4. Пространственное распределение плотности вероятности эффективных оптических путей фотонов  $J(r)$  в многослойной среде, рассчитанное для  $z_f = 300$  (а) и  $600 \text{ мкм}$  (б). Оптические свойства слоев среды представлены в табл.1.

Табл.1. Оптические свойства слоев кожи, используемые при моделировании.

Слой	$\mu_s$ ( $\text{мм}^{-1}$ )	$\mu_a$ ( $\text{мм}^{-1}$ )	$g$	$n$	Толщина ( $\text{мкм}$ )
Роговой слой	100	0.1	0.8	1.5	20
Эпидермис	45	0.15	0.8	1.34	80
Дерма с капиллярными петлями	30	0.068	0.9	1.39	150
Дерма с поверхностным сплетением сосудов	25	0.095	0.95	1.4	80
Дерма	20	0.073	0.76	1.39	1500
Дерма с глубинным сплетением сосудов	30	0.118	0.95	1.4	100
Подкожный жир	15	0.068	0.8	1.44	5000

ровать фрагменты спектров отражения с достаточной степенью точности.

Из-за плотной клеточной структуры эпидермиса [41] скорость диффузии веществ через него на два-три порядка ниже, чем через дерму, имеющую фиброзную структуру [31, 32]. В настоящей работе для количественного описания изменения коэффициента рассеяния (концентрации иммерсионного агента в слоях кожи) использовалась модель, предполагающая постоянство коэффициента диффузии в данном слое кожи [42, 43]. Например, коэффициент диффузии водного 40 %-ного раствора глюкозы в дерме равен  $(2.56 \pm 0.13) \times 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$  [11]. Изменение показателя преломления внутриклеточной жидкости в кожных слоях рассчитывалось в соответствии с законом Гладстона–Даля [44]. Расчет коэффициентов рассеяния отдельных слоев кожи выполнялся на основе теории Ми [45]. Значения оптических параметров, представленные в табл.2 и используемые в рамках данного моделирования, отражают состояние кожных тканей через 20 и 40 мин после нанесения раствора глюкозы на поверхность кожи. Они хорошо согласуются с экспериментальными данными [10–13, 46]. Необходимо отметить, что поскольку коэффициенты диффузии низкомолекулярных соединений достаточно близки между собой, представленные данные отражают изменение рассеивающих характеристик различных слоев кожной ткани при использовании в качестве иммерсионного агента не только водного раствора глюкозы, но и других иммерсионных жидкостей, имеющих

Табл.2. Оптические свойства слоев кожи человека, используемые для численного моделирования, при иммерсионном просветлении ткани.

Слой	$\mu_s$ ( $\text{мм}^{-1}$ )		$\mu_a$ ( $\text{мм}^{-1}$ )	$g$	$n$	
	20 мин	40 мин			20 мин	40 мин
Роговой слой	70	50	0.10	0.8	1.47	1.45
Эпидермис	15	5	0.15	0.8	1.36	1.36
Дерма с капиллярными петлями	20	15	0.068	0.9	1.4	1.4
Дерма с поверхностным сплетением сосудов	20	15	0.095	0.05	1.4	1.4
Дерма	20	20	0.073	0.76	1.39	1.39
Дерма с глубинным сплетением сосудов	30	30	0.118	0.95	1.4	1.4
Подкожный жир	15	15	0.068	0.8	1.44	1.44

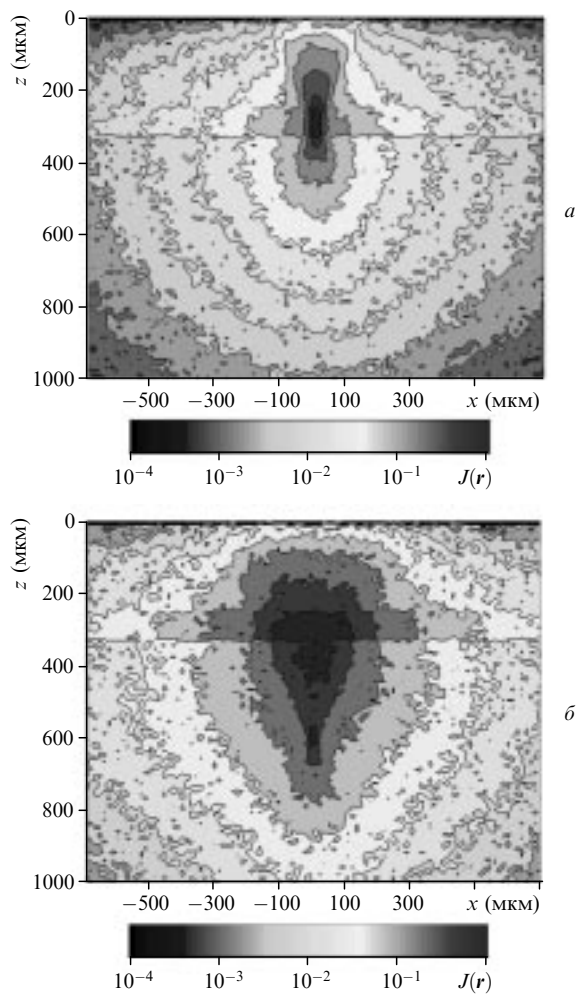


Рис.5. Пространственное распределение плотности вероятности эффективных оптических путей фотонов  $J(r)$  для случая двадцатиминутного иммерсионного просветления кожи при  $z_f = 300$  (а) и 600 мкм (б). Оптические свойства слоев среды представлены в табл.2.

показатель преломления примерно 1.39. В качестве иммерсионных агентов могут быть использованы водные растворы глицерина, пропиленгликоля и т. д.

Интересно отметить, что верхние слои среды, наиболее сильно рассеивающие и поглощающие оптическое излучение (см. табл.1), оказывают своего рода экранирующее действие на область фокусирования (см. рис.4.а). Хотя в данном случае плотность вероятности эффективных оптических путей во втором слое (эпидермисе) оказывается меньшей по абсолютному значению, она все же соизмерима с  $J$  в области центрального фокального пятна (см. рис.4.а). При увеличении глубины погружения точки фокуса в среду в 2 раза ( $z_f = 600$  мкм) значение  $J$  в области центрального фокального пятна сильно снижается и становится меньше, чем в экранирующей области (рис.4.б). При этом в распределении  $J(r)$  заметно увеличение доли сигнала из четвертого слоя среды, представляющего собой в рамках данной модели область дермы с поверхностным сплетением сосудов и характеризующегося более высокими коэффициентами рассеяния и поглощения по отношению к прилегающим слоям (см. табл.1).

С уменьшением коэффициентов рассеяния  $\mu_s$  двух верхних слоев среды глубина проникновения узконаправленного сфокусированного оптического излучения в

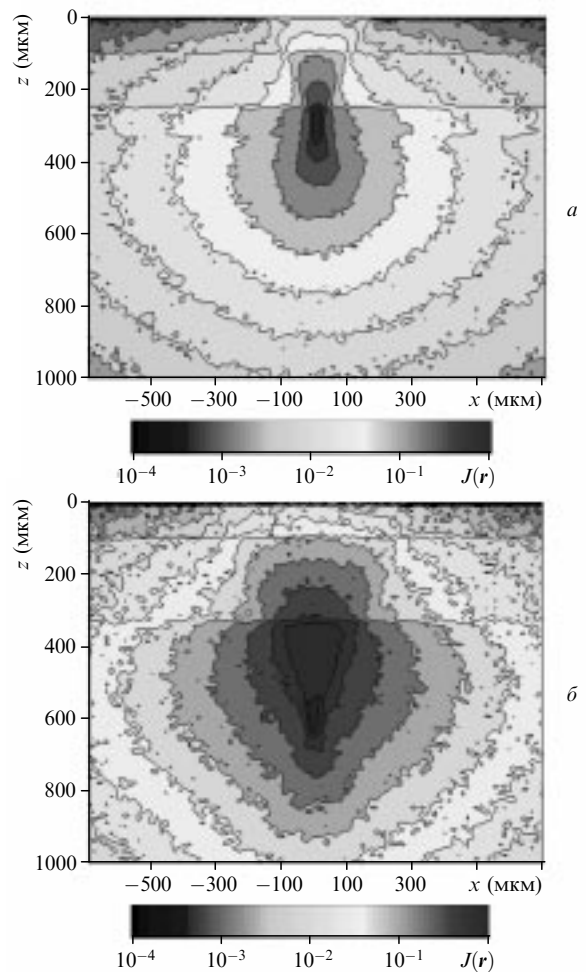


Рис.6. Пространственное распределение плотности вероятности эффективных оптических путей фотонов  $J(r)$  в многослойной среде, рассчитанное для случая сорокаминутного иммерсионного просветления кожи при  $z_f = 300$  (а) и 600 мкм (б). Оптические свойства слоев среды представлены в табл.2.

среду значительно увеличивается (рис.5). В случае фокусирования излучения на глубину 300 мкм экранирующий эффект верхних слоев исчезает (см. рис.5.а). При фокусировании излучения на глубину 600 мкм (см. рис.5.б), так же как и в случае, представленном на рис.4.б, максимальные значения  $J(r)$  в области слоя дермы с поверхностным сплетением сосудов и в точке центрального фокального пятна оказываются сравнимыми между собой.

Дальнейшее уменьшение коэффициентов рассеяния верхних слоев дермы до 20 и 15  $\text{мм}^{-1}$  (см. табл.2) существенно улучшает пространственное разрешение в области центрального фокального пятна при  $z_f$ , составляющем как 300 мкм, так и 600 мкм (рис.6). Более того, даже при фокусировании излучения на глубину 900–1100 мкм наблюдается ярко выраженная локализация эффективных оптических путей фотонов в области центрального фокального пятна (рис.7). Улучшение пространственного разрешения метода ОКМ, в частности снятие экранирующего эффекта верхних слоев кожи при иммерсионном просветлении, позволяет значительно повысить возможности оптической диагностики злокачественных образований кожной ткани.

Заметим, что в случае, когда требуется значительное снижение рассеивающих характеристик кожи, необходи-

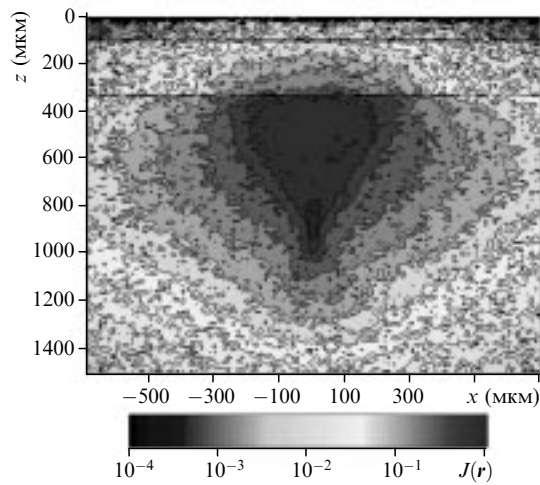


Рис.7. Пространственное распределение плотности вероятности эффективных оптических путей фотонов  $J(r)$  в многослойной среде, рассчитанное для  $z_f = 900$  мкм.

ма внутрикожная инъекция иммерсионного агента. На рис.8 представлена типичная временная зависимость изменения коэффициента отражения кожи человека на длине волны 700 нм под действием инъекции 40 %-ного раствора глюкозы. Существенное снижение со временем коэффициента отражения обусловлено диффузией глюкозы в биоткань и сопутствующим этому процессу уменьшением ее коэффициента рассеяния. При этом необходимо отметить, что столь значительное, примерно трехкратное, снижение коэффициента отражения связано с введением иммерсионного агента непосредственно в дерму кожи, поскольку дерма превышает по толщине остальные слои кожной ткани и спектр отражения кожи формируется в основном за счет рассеивающих характеристик дермы. Расчеты, выполненные на основе теории Ми, показывают, что полное замещение внутриклеточной жидкости кожи иммерсионной жидкостью с показателем преломления 1.39 приводит к примерно двукратному уменьшению коэффициента рассеяния кожи. Таким образом, несмотря на то что накожное введение иммерсионных агентов является более простым и предпочтительным с медицинской точки зрения, при внутрикожном введении иммерсионного агента существенно выше эффективность оптической иммерсии (глубина и каче-

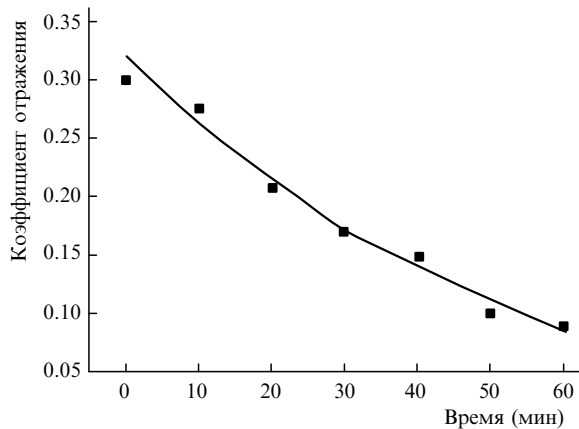


Рис.8. Временная динамика изменения коэффициента отражения кожи человека *in vivo* на длине волны 700 нм при внутрикожной инъекции 40 %-ного раствора глюкозы.

ство изображения), что является принципиальным при ранней диагностике рака кожи.

## 5. Заключение

Представлены результаты численного моделирования распределения плотности вероятности эффективных оптических путей в однородной и многослойной сильно рассеивающих и поглощающих свет средах при их конфокальном зондировании. Численное моделирование осуществлялось методом МК [16, 17, 40], модифицированным для конфокального зондирования. Оптические свойства слоев модельной среды ассоциируются с оптическими свойствами, присущими тканям нормальной кожи человека, в том числе и в случае их иммерсионного просветления. Полученные результаты наглядно демонстрируют, что при уменьшении рассеивающих свойств верхних слоев среды глубина зондирования ОКМ увеличивается в три-четыре раза. Эти результаты хорошо согласуются с экспериментальными данными [10–13, 41, 42], что дает возможность интерпретировать их в рамках применения ОКМ для исследований кожи человека при воздействии на поверхность последней растворами осмотически активных иммерсионных веществ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант «Ведущие научные школы» № 00-15-96667), U.S. Civilian Research & Development Foundation for the Independent States of the Former Soviet Union № REC-006 и частичной финансовой поддержке РФФИ (грант № 89433).

1. Wilson T. *Confocal microscopy* (San Diego: Academic Press, 1990, p. 426).
2. Pawley J.B. *Handbook of biological confocal microscopy* (New York: Plenum Press, 1995, p. 632).
3. Schmitt J.M., Knuettel A., Yadlowsky M. *J. Opt. Soc. Am. A*, **11**, 2226 (1994).
4. Любимов В.В. *Оптика и спектроскопия*, **76**, 814 (1994).
5. Izatt J.A., Hee M.R., Owen G.M., Swanson E.A., Fujimoto J.G. *Opt. Lett.*, **19**, 590 (1994).
6. Тучин В.В. *Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях* (Саратов: изд-во Саратовского ун-та, 1998, с.384).
7. Rajadhyaksha M., Zavislan J.M. *Clinical & Experimental Techniques*, **14**, 26 (1998).
8. Тучин В.В. *УФН*, **167**, 517 (1997).
9. Hatcher M. *Opto & Laser Europe*, **10**, 37 (2001).
10. Vargas G., Chan E.K., Barton J.K., Rylander III H.G., Welch A.J. *Laser in Surgery and Medicine*, **24**, 133 (1999).
11. Тучин В.В., Башкатов А.Н., Генина Э.А., Синичкин Ю.П., Лакодина Н.А. *Письма в ЖТФ*, **27**, 10 (2001).
12. Tuchin V.V., Maksimova I.L., Zimnyakov D.A., Kon I.L., Mavlutov A.H., Mishin A.A. *J. Biomed. Opt.*, **2**, 401 (1997).
13. Wang R.K., Xu X., Tuchin V.V., Elder J.B. *J. Opt. Soc. Am. B*, **18**, 948 (2001).
14. Brezinski M., Saunders K., Jessor C., Li X.D., Fujimoto J. *Circulation*, **103**, 1999 (2001).
15. Tuchin V.V., Xu X., Wang R.K. *Appl. Opt.*, **41**, 258 (2002).
16. Tuchin V.V., Utz S.R., Yaroslavsky I.V. *Opt. Eng.*, **33**, 3178 (1994).
17. Tsai C.-L., Yang Y.-F., Han C.-C., Hsieh J.-H., Chang M. *Appl. Opt.*, **40**, 5770 (2001).
18. Hiraoka M., Firbank M., Essenpreis M., Cope M., Arridge S.R., van der Zee P., Delpy D.T. *Phys. Med. Biol.*, **38**, 1859 (1993).
19. Arridge S. *Appl. Opt.*, **34**, 7395 (1995); Arridge S., Schweiger M. *Appl. Opt.*, **34**, 8026 (1995).
20. Firbank M., Okada E., Delpy D.T. *Neuroimage*, **8**, 69 (1998).
21. Maier J. S., Gratton E. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **1888**, 440 (1993).
22. Sevick E.M., Burch C.L., Frisoli J.K., Lakowicz J.R. *Appl. Opt.*, **33**, 3562 (1994).

23. Schotland J.C., Haselgrove J.C., Leigh J.S. *Appl. Opt.*, **32**, 448 (1993).
24. Okada E., Firkbank M., Delpy D.T. *Phys. Med. Biol.*, **40**, 2093 (1995).
25. Kumar G., Schmitt J.M. *Appl. Opt.*, **36**, 2286 (1997).
26. Ермаков С.М., Михайлов Г.А. *Статистическое моделирование* (М.: Наука, 1982).
27. Marchuk G.I., Mikhailov G.A., Nazaraliev M.A., Darbinjan R.A., Kargin B.A., Elepov B.S. *The Monte Carlo methods in atmospheric optics* (Berlin: Springer, 1980).
28. Bonner R.F., Nossal R., Havlin S., Weiss G.H. *J. Opt. Soc. Am. A*, **4**, 423 (1987).
29. Меглинский И.В., Матчер С.Д. *Оптика и спектроскопия*, **91**, 692 (2001).
30. Meglinsky I.V., Matcher S.J. *Med. Biol. & Eng. Comput.*, **39**, 44 (2001).
31. Odland G.F. In: *Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin*. Ed. by L.A.Goldsmith (Oxford: Oxford Univ. Press, 1991, v. 1, p. 3 – 62).
32. Чернух А.М., Фролов Е.П. *Кожа (строение, функция, общая патология, терапия)* (М.: Медицина, 1982, с. 336).
33. Lu J.Q., Hu X.-H., Dong K. *Appl. Opt.*, **39**, 5890 (2000).
34. Ярославский И.В., Тучин В.В. *Оптика и спектроскопия*, **72**, 934 (1992).
35. Keijzer M., Jaques S.L., Prahl S.A., Welch A.J. *Laser Surg. Med.*, **9**, 148 (1989).
36. Wang L., Jacques S.L., Zheng L. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, **47**, 131 (1995).
37. Соболев И.М. *Метод Монте-Карло* (М.: Наука, 1985, с. 80).
38. Schmitt J.M., Ben-Letaief K. *J. Opt. Soc. Am. A*, **13**, 952 (1996).
39. Dunn A.K., Smithpeter C., Welch A.J., Richards-Kortum R. *Appl. Opt.*, **35**, 3441 (1996).
40. Меглинский И.В. *Квантовая электроника*, **12**, 1101 (2001).
41. Blank I.H., Moloney J., Emslie A.G., Simon I., Apt C. *J. Investigative Dermatology*, **82**, 188 (1984).
42. Tuchin V.V., Bashkatov A.N., Genina E.A., Kochubey V.I., Lakodina N.A., Simonenko G.V., Sinichkin Y.P., Proshina Y.M., Razumikhina N.A. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **3863**, 10 (1999).
43. Genina E.A., Bashkatov A.N., Sinichkin Y.P., Lakodina N.A., Korovina I.V., Simonenko G.V., Tuchin V.V. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **4432**, 97 (2001).
44. Иоффе Б.В. *Рефрактометрические методы химии* (Л.: Химия, 1974, с. 400).
45. Борен К., Хафмен Д. *Поглощение и рассеяние света малыми частицами* (М.: Мир, 1986, с. 656).
46. Lankenau E., Welzel J., Birngruber R., Engelhardt R. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **2981**, 78 (1997).