

07

Оптические исследования биотканей: определение показателей поглощения и рассеяния

© К.М. Гираев, Н.А. Ашурбеков, О.В. Кобзев

Дагестанский государственный университет, Махачкала

E-mail: nashurb@phys.dgu.ru

Поступило в Редакцию 29 апреля 2003 г.

Измерены диффузионное отражение, полное и коллимированное пропускание ткани слизистой оболочки желудка в норме методами интегрирующих сфер и однократного рассеяния в интервале длин волн 350–750 nm. Определены оптические показатели биоткани путем решения обратной задачи рассеяния по трехпоточковой модели Кубелки–Мунка и диффузионным методом. Дан сравнительный анализ полученных результатов.

Определение оптических показателей биоткани (коэффициента поглощения (μ_a), коэффициента рассеяния (μ_s) и фактора анизотропии (g)) является весьма трудоемкой задачей вследствие сложной структуры самой ткани и процессов взаимодействия фотонов с нею (биоткани относятся к сложным неоднородным поглощающим и многократно рассеивающим средам [1,2]). Современные методы определения оптических параметров биотканей предполагают решение обратной задачи рассеяния для различных теоретических моделей распространения света в биосредах (метод Монте-Карло [2,3], диффузионное приближение [4–6], метод потоковых моделей Кубелки–Мунка [2,7–9]).

Данная работа посвящена определению оптических параметров (μ_a , μ_s , g) биотканей методом трехпоточковой модели Кубелки–Мунка. С этой целью были определены спектры коллимированного пропускания ($T_C = F_C(z)/F_{C0}$), полного пропускания ($T_d = F_+(z)/F_{C0}$) и диффузного отражения от передней ($R_{d1} = F_{0-}/F_{C0}$) и задней границы ($R_{d2} = F_-(z)/F_{C0}$) ткани слизистой оболочки антрального отдела желудка. Здесь F_{C0} — падающий световой поток; $F_C(z)$ и $F_+(z)$ — соответственно прошедший коллимированный и диффузный потоки;

F_{0-} и $F_-(z)$ — диффузные потоки, отраженные соответственно от передней и задней границы биоткани; z — толщина биоткани. Данные расчетов T_d , R_{d2} и T_C также использовались для расчета оптических коэффициентов методом диффузионного приближения, описанным в [5].

В качестве исследуемых объектов использовались нативные тканевые срезы слизистой оболочки антрального отдела желудка в норме размером $\sim 1 \text{ cm}^2$, толщиной $\sim 600 \mu\text{m}$ и $\sim 75 \mu\text{m}$, полученные при помощи криостатного микротона. Образцы помещались на предметные стекла и покрывались покровным стеклом с добавлением капли физиологического раствора. Края промежутка между стеклами заливали клеем для предотвращения высыхания ткани.

Оптические измерения проводились с использованием галогенной лампы КГМ-100, совмещенной с решетчатым монохроматором с обратной дисперсией 3.2 nm/mm , позволяющим линейно сканировать спектр в интервале длин волн $300\text{--}800 \text{ nm}$. Падающий свет модулировался с частотой $\sim 150 \text{ Hz}$ и, пройдя коллиматор и диафрагму, попадал на образец. Диаметр светового пятна на образце составлял $\sim 2 \text{ mm}$. Для измерения T_d , $R_{d1,2}$ использовалась интегрирующая сфера диаметром 10 cm и размерами портов $\sim 1.5 \text{ cm}^2$. Сигнал регистрировался при помощи ФЭУ и подавался на компьютер. При измерениях T_C сферу заменяли двумя диафрагмами: первая — сразу же после образца и вторая — перед ФЭУ. Погрешность измерения составила $\sim 10\%$.

Экспериментальные данные (T_d , $R_{d1,2}$, T_C) корректировались с учетом зеркального отражения на границе раздела воздух–стекло–биоткань по методике, описанной в [6]:

$$J_{Corr} = \frac{\left[\left(\frac{(1-r)^2}{r^2 J} \right)^2 + \frac{4}{r^2} \right]^{1/2} - \frac{(1-r)^2}{r^2 J}}{2},$$

где J , J_{Corr} — соответственно экспериментальные данные и скорректированные величины, соответствующие (T_d , $R_{d1,2}$, T_C); $r = \frac{r_g + r_t - 2r_g r_t}{1 - r_g r_t}$, $r \approx 0.0501$, коэффициент зеркального отражения на границе воздух–стекло–биоткань, r_g и r_t — коэффициенты зеркального отражения на границе воздух–стекло и стекло–биоткань, соответственно равные ~ 0.0465 и ~ 0.004 [6]. Конечные данные диффузных измерений

рассчитывались, используя следующие соотношения [5,6]:

$$R_{d1,2} = \frac{R_{S1,2} - R_0}{R_{100} - R_0} \quad \text{и} \quad T_d = \frac{T_S - T_0}{T_{100} - T_0},$$

где $R_{S1,2}, T_S$ — данные диффузного отражения и пропускания, полученные с исследуемых образцов; R_{100}, T_{100} — данные диффузного отражения и пропускания, измеренные с предметного и покровного стекол. R_0, T_0 — сигналы полученные с интегрирующей сферы с открытыми портами (R_0) и с закрытым сходным портом (T_0).

Методика определения оптических свойств биоткани при помощи трехпотевой модели Кубелки–Мунка достаточно подробно изложено в работе [7], в которой распределение света в среде представлено в виде дифференциально-разностных уравнений для трех потоков:

$$\begin{aligned} \frac{dF_C}{dz} &= -(\mu_a + \mu_s)F_C(z); \\ \frac{dF_+}{dz} &= -\left(2\mu_a + \frac{3}{4}(\mu_a + \mu_s(1-g))\right)F_+(z) \\ &\quad + \frac{3}{4}(\mu_a + \mu_s(1-g))F_-(z) + \frac{\mu_s}{4}(2+3g)F_C(z); \\ \frac{dF_-}{dz} &= -\left(2\mu_a + \frac{3}{4}(\mu_a + \mu_s(1-g))\right)F_-(z) \\ &\quad + \frac{3}{4}(\mu_a + \mu_s(1-g))F_+(z) + \frac{\mu_s}{4}(2-3g)F_C(z). \end{aligned} \quad (1)$$

Граничные условия для системы уравнений (1) определяются как

$$\begin{aligned} F_C(0) &= (1 - r_{sp,c})F_{C0}; \quad F_+(0) = (1 - r_{sp,c})R_{C0} + r_{id}F_{0-}; \\ F_+(d) &= (1 - r_{sp,c})F_{d+} + r_{id}F_+(d), \end{aligned} \quad (2)$$

где F_{d+} — диффузный поток у нижней границы биоткани; $r_{sp,c}$ — коэффициент френелевского отражения, равный ~ 0.004 [6]; $r_{id} \approx 0.25$, коэффициент внутреннего отражения от обеих границ биоткани, определенный как $r_{id} \approx -1.44n^{-2} + 0.71n^{-1} + 0.668 + 0.0636n$ [4], $n \approx 1.135$, показатель преломления на границе раздела биоткань–стекло [6].

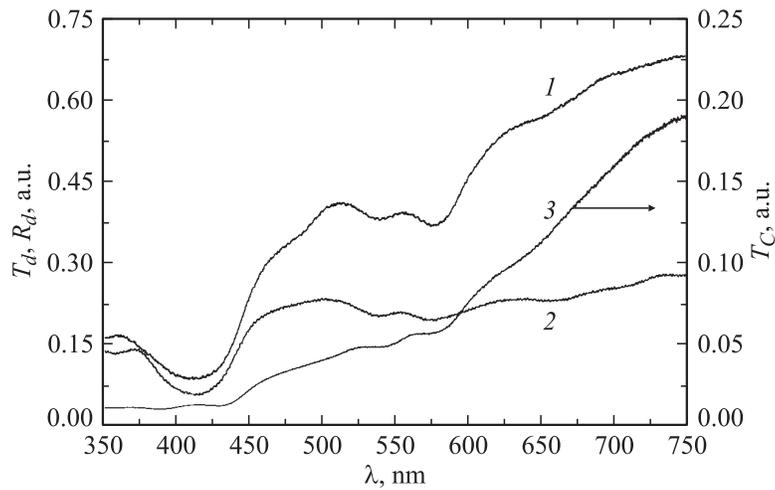


Рис. 1. Оптические спектры ткани слизистой оболочки антрального отдела желудка в норме: 1 — полное пропускание T_d , 2 — диффузное отражение R_d , 3 — коллимированное пропускание T_c .

В результате получаем три выражения, связывающие потоки в среде у передней и задней границ объекта, в которых искомые величины (μ_a, μ_s, g) являются функциями этих потоков. Конечное решение может быть получено путем численного решения обратной задачи системы уравнений (1) и (2), для чего в данной работе был использован метод Ньютона [10].

Характерные спектры полного пропускания, диффузного отражения и коллимированного пропускания, измеренные в диапазоне 350–750 nm, для ткани слизистой оболочки антрального отдела желудка представлены на рис. 1. Как видно из рисунка, для всех трех величин характерны провалы в области длин волн 400–425, ~ 550 и ~ 580 nm и увеличение вклада в красноволновой области спектра. Результат расчета оптических коэффициентов биоткани μ_a, μ_s и g методом трехпоточковой модели Кубелки–Мунка представлен на рис. 2. Анализ кривых показывает, что с ростом длины волны наблюдается существенное уменьшение μ_s , в то время как g меняется незначительно. Подобный факт свидетельствует об увеличении вклада рассеяния μ

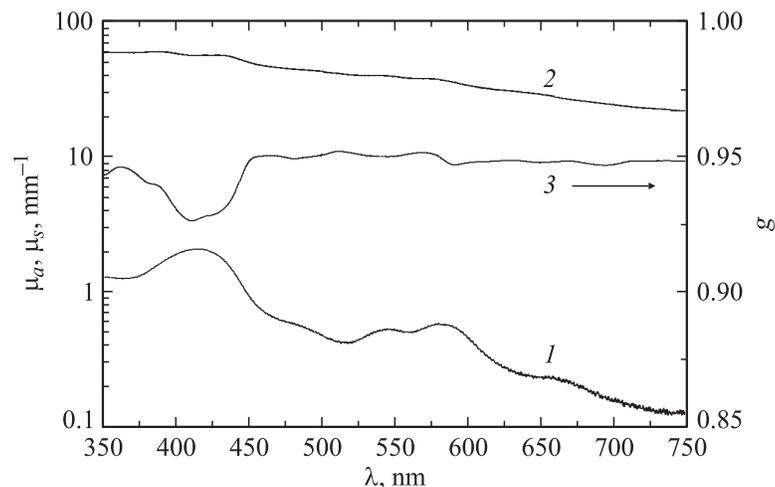


Рис. 2. Спектры оптических показателей ткани слизистой оболочки антрального отдела желудка, рассчитанные методом трехпоточковой модели Кубелки–Мунка: 1 — коэффициент поглощения μ_a , 2 — коэффициент рассеяния μ_s , 3 — фактор анизотропии g .

в суммарный коэффициент рассеяния и уменьшения рэлеевского рассеяния от клеточных элементов (митохондрии, лизосомы, аппарат Гольджи, ядра и т.д.) и субмолекулярных агрегатов [1,2,5]. Форма спектрального контура μ_a во многом определяется полосами поглощения смеси окси- и деоксигемоглобина ($\sim 350, 422, 545$ и 577 nm) [11], а также поглощением флуорохромов флавиновой и порфириновой групп ($\sim 390\text{--}420$ nm) [12].

Используя данные T_d, R_{d2} и T_C в работе, также рассчитывались μ_a, μ_s и g этой же ткани при помощи диффузионной модели расчета оптических показателей. Сравнение данных, полученные при помощи двух методик, приводится в таблице. В частности, на некоторых длинах волн ($350\text{--}550$ nm) величина μ_a , полученная диффузионным методом, имеет несколько завышенные значения по сравнению с результатами трехпоточковой модели, что может быть объяснено различием используемых моделей распространения света в биотканях. Определение оптических свойств по трехпоточковой модели предполагает знание

Значения коэффициентов μ_a , μ_s и g , рассчитанные трехпоточковым методом и диффузионным методом (значения в скобках) на различных длинах волн

| Длина волны λ , nm | Коэффициент поглощения μ_a , mm^{-1} | Коэффициент рассеяния μ_s , mm^{-1} | Фактор анизотропии g |
|----------------------------|---|--|------------------------|
| 350 | 1.27 (1.48) | 58.38 (58.16) | 0.94 (0.93) |
| 400 | 1.9 (2.55) | 57.11 (56.46) | 0.93 (0.93) |
| 450 | 0.94 (1.28) | 49.39 (49.1) | 0.95 (0.94) |
| 500 | 0.47 (0.64) | 42.16 (42.0) | 0.96 (0.95) |
| 550 | 0.525 (0.59) | 38.98 (38.91) | 0.95 (0.95) |
| 600 | 0.48 (0.51) | 33.95 (33.92) | 0.95 (0.96) |
| 650 | 0.23 (0.25) | 28.83 (28.81) | 0.95 (0.96) |
| 700 | 0.16 (0.17) | 24.3 (24.29) | 0.945 (0.96) |
| 750 | 0.13 (0.14) | 21.91 (21.89) | 0.95 (0.95) |

коллимированного и диффузного пропускания, а также диффузного отражения от задней и передней стенок объекта, тогда как в диффузионной модели используются первые три коэффициента.

Таким образом, приведенные в работе результаты показывают, что оптические свойства биотканей, определенные методом трехпоточковой модели Кубелка–Мунка, представляют достаточно адекватную информацию и могут быть с успехом использованы в биомедицине или в спектроскопии, например, для определения степени искажения аутофлуоресценции.

Список литературы

- [1] Тучин В.В. // УФН. 1997. Т. 167. № 5. С. 517–539.
- [2] Tuchin V.V., Utz S.R., Yaroslavskii I.V. // Opt. Eng. 1994. V. 33. P. 3178–3176.
- [3] Qu J., MacAulay C., Lam S. et al. // Opt. Eng. 1995. V. 34. N 11. P. 3334–3343.
- [4] Groenhuis R.A.J., Ferwerda H.A., Ten Bosch J.J. // Appl. Optics. 1983. V. 22. N 16. P. 2456–2462.
- [5] Karagiannes J.L., Zhang Z., Grossweiner B. et al. // Appl. Optics. 1989. V. 28. N 12. P. 2311–2317.
- [6] Maitland D.J., Walsh J.T., Prystowsky J.B. // Appl. Optics. 1993. V. 32. N 4. P. 586–591.

- [7] *Van Gemert M.J.C., Schets G.A.C., Bishop M.S. et al. // Laser Life Sci. 1988. V. 1. N 2. P. 1–18.*
- [8] *Yoon G., Welch A.J., Motamedi M. et al. // IEEE J. Quantum Electron. 1987. V. QE-23. N 10. P. 1721–1733.*
- [9] *Van Gemert M.J.C., Jacques S.L., Sterenborg H.J.C.M et al. // IEEE J. Biomed. Eng. 1989. V. 36. N 12. P. 1146–1154.*
- [10] *Корн Г., Корн Т. Справочник по математике для научных работников и инженеров. М.: Наука, 1984. 832 с.*
- [11] *Wolfbeiss O.S., Leiner M.J. et al. // Anal. Chim. Acta. 1985. V. 167. N 3. P. 203–215.*
- [12] *Юденфренд С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. Пер. с англ. М.: Мир, 1965. 468 с.*