

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Давыдов Денис Андреевич

**Анализ содержания и пространственной локализации
воды и липидов в коже методом спектроскопии диффузного
отражения с пространственным разрешением**

Специальность:

1.3.6. Оптика

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Научные руководители:

д.ф.-м.н., профессор Фадеев Виктор Владимирович
д.ф.-м.н. Ширшин Евгений Александрович

Москва – 2025

Оглавление

Список сокращений	6
Введение.....	7
Глава 1. Современное состояние исследований по теме диссертации.....	20
1.1. Строение кожи человека	20
1.2. Определение физиологических параметров кожи в задачах биомедицинской диагностики	21
1.3. Клинические методы определения концентрации воды и липидов в коже	22
1.4. Методы спектроскопии для определения содержания воды и липидов в ткани	26
1.5. Спектроскопия диффузного отражения	30
1.6. Теория переноса излучения в рассеивающих средах	32
1.7. Оптические характеристики биотканей.....	36
1.8. Оптические свойства кожи	36
1.9. Оценка коэффициента отражения: диффузное приближение	38
1.10. Обзор экспериментальных методов определения содержания воды и липидов с помощью СДО.....	39
1.11. Методы решения обратной задачи для многослойной среды	43
1.12. Оценка возможности определение содержания белков, липидов и воды в БИК спектральном диапазоне	46
1.13. Обоснование трехслойной модели биоткани.....	49
1.14. Выводы.....	51
Глава 2. Сравнительный анализ методов количественного определения содержания воды в коже по данным СДО	53
2.1. Объекты и методы исследования	54
2.1.1. Тестирование алгоритмов определения содержания воды по спектрам диффузного отражения	54
2.1.2. Численное моделирование спектров диффузного отражения	54
2.1.3. Приготовление оптических фантомов кожи	55
2.1.4. Схема измерений спектров диффузного отражения	56
2.2. Результаты	56
2.2.1. Анализ базы данных НИСТ	56
2.2.2. Моделирование спектров диффузного отражения с помощью метода Монте-Карло.....	59

2.2.3. Измерения спектров диффузного отражения на оптических фантомах кожи	62
2.3. Влияние неоднородного распределения концентрации воды в коже на спектры СДО	65
2.4. Сравнительный анализ методов количественного определения содержания воды в коже по данным спектроскопии диффузного отражения	66
2.5. Объекты и методы исследования	66
2.5.1. Модели отека кожи: нанесение гистамина и венозная окклюзия....	66
2.5.2. Измерения спектров диффузного отражения	67
2.5.3. Спектроскопия комбинационного рассеяния	69
2.5.4. Мультиспектральная визуализация	69
2.5.5. Моделирование распространения света в коже методом Монте-Карло	70
2.6. Определение содержания воды с помощью СДО, спектроскопии КР и мультиспектральной визуализации.....	73
2.6.1. Оценка глубины зондирования с помощью метода Монте-Карло..	73
2.6.2. Оценка содержания воды при отеке с помощью спектроскопии диффузного отражения.....	76
2.6.3. Оценка содержания воды при отеке с помощью мультиспектральной визуализации.....	79
2.6.4. Учет фона флуоресценции в измерениях спектроскопии КР	80
2.6.5. Измерение воды с помощью спектроскопии КР: гистаминовый отек и венозная окклюзия.....	83
2.7. Сравнительный анализ метода СДО, спектроскопии КР и мультиспектральной визуализации для измерения содержания воды при отеке.....	85
2.8. Выводы.....	87
Глава 3. Определение параметров структуры кожи с помощью спектроскопии диффузного отражения с пространственным разрешением.	89
3.1. Объекты и методы исследования	89
3.1.1. Измерение спектров диффузного отражения с пространственным разрешением	89
3.1.2. Обработка спектров	90
3.1.3. Ультразвуковое исследование кожи	91
3.1.4. Моделирование спектров диффузного отражения методом Монте-Карло	92
3.1.5. Конфигурации моделирования и аппроксимации.....	94

3.1.6. Обработка экспериментальных данных СДО с пространственным разрешением	95
3.2. Изменение структуры кожи при возникновении отека кожи	96
3.2.1 Оценка содержания воды в коже при отеке с помощью СДО с пространственным разрешением.....	96
3.2.2. Моделирование спектров диффузного отражения для различных структур кожи.....	98
3.2.3. Ультразвуковое исследование структуры кожи при отеке: корреляция с СДО с пространственным разрешением	105
3.2.4. Определение структуры кожи с помощью СДО с пространственным разрешением: толщина дермы и гиподермы.....	106
3.4. Выводы.....	109
Глава 4. Биомедицинские применения пространственно-разрешенной СДО для оценки гидратации и состава тела человека.....	111
4.1. Исследования взаимосвязи уровня гидратации кожи с общим уровнем гидратации организма человека	111
4.2. Объекты и методы исследования	112
4.2.1. Протокол взвешивания.....	112
4.2.2. Тепловые нагрузки.....	113
4.2.3. Физические нагрузки.....	113
4.2.4. Диуретическая терапия	114
4.2.5. Обработка спектров диффузного отражения.....	114
4.3. Результаты	116
4.3.1. Дегидратация под воздействием тепловых нагрузок.....	116
4.3.2. Дегидратация во время физических нагрузок	117
4.3.3. Дегидратация во время диуретической терапии у пациентов с отёчным синдромом.....	119
4.4. Взаимосвязь между гидратацией кожи и общим уровнем гидратации организма человека	121
4.5. Определение состава тела человека с помощью спектроскопии диффузного отражения с пространственным разрешением	123
4.6. Объекты и методы исследования.	123
4.6.1. Описание выборки	123
4.6.2. Мультиспектральный биоимпедансный анализ	124
4.6.3. Измерение спектров диффузного отражения	124
4.6.4. Описание построения модели и ее валидация	125
4.7. Определение процентного содержания жировой и безжировой массы тела.....	127

4.8. Выводы.....	129
Заключение	131
Благодарности.....	134
Публикации автора по теме диссертации.....	135
Список литературы	137

Список сокращений

БИК – ближний инфракрасный диапазон

СДО – спектроскопия диффузного отражения

КР – комбинационное рассеяние

МВ – мультиспектральная визуализация

ОКТ – оптическая когерентная томография

УЗИ – ультразвуковое исследование

МРТ - магнитно-резонансная томография

КТ – компьютерная томография

МБА – мультиспектральный биоимпедансный анализ

Введение

Диссертационная работа посвящена разработке метода определения содержания воды и липидов в коже человека, а также толщин слоев кожи, основанного на спектроскопии диффузного отражения (СДО) с пространственным разрешением. В работе изучается оптический отклик кожи в ближнем инфракрасном (БИК) спектральном диапазоне. Проведен сравнительный анализ методов, основанных на СДО, спектроскопии комбинационного рассеяния (КР), и мультиспектральной визуализации для оценки содержания воды в коже при отечном синдроме. На основе экспериментальных данных СДО с пространственным разрешением, а также данных моделирования распространения света в коже, полученных с помощью метода Монте-Карло, была разработана модель биоткани и решена обратная задача по определению концентрации воды в коже и толщин слоев кожи по спектрам диффузного отражения. Кроме того, по данным СДО кожи была построена модель по оценке общего уровня содержания липидов и безжировой массы тела.

Актуальность

Основным объектом исследования данной диссертационной работы является кожа человека. Кожа представляет собой гетерогенную среду, в которой содержание крови, пигментов и других компонентов распределены по глубине неоднородно. Тем не менее, можно определить области кожи, где изменения параметров светорассеяния и концентрации хромофоров, в частности, содержания крови, малы. Это позволяет разделить кожу на слои с точки зрения ее физиологических свойств и оптических свойств структур, из она состоит [1]. Можно выделить три основных слоя: эпидермис (толщиной 100-150 мкм), дерма (толщиной 1-2 мм) и гиподерма (толщиной от 1 мм до 10 мм в зависимости от участка тела) [2]. Определение содержания молекулярных компонент в коже, таких как вода и липиды, а также структурных параметров кожи – толщин ее слоев – является важной

диагностической задачей в различных областях медицины. Так, мониторинг общего уровня гидратации помогает в диагностике обезвоживания и отечного синдрома. Например, при сердечной недостаточности для оценки отечного синдрома используются визуальная оценка скорости восстановления «ямки» в области отека после надавливания пальцем. Однако эти методы субъективны и неточны [3]. В спортивной медицине низкая гидратация организма может оказывать существенное влияние на состояние спортсмена. В более тяжелых случаях уменьшение содержания воды в организме может привести к обезвоживанию, что может иметь пагубные последствия. Таким образом, изучение механизмов восстановления гидратации после различных воздействий имеет большое значение [4].

Анализ состава тела имеет решающее значение для лечения и прогнозирования состояния пациентов с метаболическими нарушениями и ожирением, а разработка неинвазивных методов анализа состава тела и их совершенствование имеют большое прикладное значение. При этом высокая стоимость и относительно низкая доступность таких методов, как магнитно-резонансная томография (МРТ), рентгеновская компьютерная томография (КТ) и ультразвуковое исследование (УЗИ) затрудняет их широкое использование в персонализированной диагностике. Таким образом, необходимость оценки содержания молекулярных компонент в коже и определения структуры кожи для диагностики процесса дегидратации и оценки состава тела стимулирует разработку неинвазивных экспрессных методов, в том числе, основанных на оптической спектроскопии, позволяющих проводить измерения с высокой точностью и молекулярной специфичностью.

Степень разработанности темы исследования

В мире достаточно большое количество работ направлено на измерение содержания воды и липидов в биотканях оптическими методами, которые могут обеспечить молекулярную специфичность и высокую чувствительность

детектирования. Данные методы включают в себя оптическую когерентную томографию [5], мультиспектральную визуализацию [3,6], фотоакустическую томографию (ФТ) [7], спектроскопию диффузного отражения (СДО) [8–10], спектроскопию комбинационного рассеяния (КР) света [11–14] и терагерцовую спектроскопию [15]. Кожа, гиподерма и слой мышц имеют сложную и неоднородную с точки зрения оптических свойств структуру. Как было указано ранее, характерная толщина дермы составляет 1-2 мм, а толщина гиподермы варьируется от 1 до 10 мм. Поэтому СДО и ФТ в БИК области спектра являются наиболее перспективными методами для решения приведенных выше задач в связи с возможностью сканирования объекта на глубине до 1 см. При этом взаимодействие света с обертонами внутримолекулярных колебаний С-Н линий липидов и белков (~930 нм) и О-Н линий воды в БИК диапазоне (~970, 1190, 1400 нм) позволяет определять содержание данных веществ в коже с высокой специфичностью. Использование спектроскопии диффузного отражения имеет большой потенциал в разработке носимого устройства при использовании в качестве источников излучения светодиодов, а в качестве детекторов – фотодиодов. При этом актуальной задачей является определение оптимальных параметров светосбора и спектрального диапазона для получения наибольшей точности измерения.

Распространение света в рассеивающей и поглощающей среде описывается интегро-дифференциальным уравнением переноса излучения. Аналитическое решение обратной задачи, т.е. определение оптических свойств среды по спектрам диффузного отражения, работает только для простых систем в случае однородно рассеивающей и поглощающей среды [16,17]. Кожа является оптически неоднородным объектом, в котором концентрация молекулярных компонент распределена неоднородно по глубине. Поэтому в литературе для решения данной задачи, т.е. для анализа молекулярных компонентов кожи и ее структуры по спектрам диффузного отражения, разрабатываются подходы, основанные на методах численного

моделирования прямой задачи распространения света методом Монте-Карло и методах машинного обучения [18–20]. Данные подходы уже доказали свою эффективность в задаче количественного определения содержания гемоглобина и меланина в коже [18]. СДО также применялась для определения толщины слоев ткани в образцах *ex vivo* и на оптических фантомах [21–23]. При этом для решения обратной задачи *in vivo* требуется разработка моделей, описывающих оптические свойства кожи и подкожных слоев.

Цель работы

Целью диссертационной работы является разработка метода определения содержания воды и липидов и анализа распределения их по глубине в коже на основе СДО с пространственным разрешением.

Для достижения указанной цели в рамках настоящей работы были поставлены и решены следующие задачи:

1. С помощью СДО экспериментально исследовать оптический отклик оптических фантомов кожи *ex vivo* и кожи *in vivo* для различных конфигураций схемы детектирования сигнала диффузного отражения в БИК области спектра.
2. С помощью моделирования распространения света в коже методом Монте-Карло исследовать оптический отклик для различных реализаций метода СДО, а также изучить влияние распределения хромофоров в коже на ее оптический отклик.
3. Провести измерения кинетики содержания воды в коже *in vivo* при отечном синдроме с помощью СДО и сравнить результаты с данными, получаемыми с помощью спектроскопии КР и мультиспектральной визуализации.
4. Исследовать возможность определения пространственного распределения хромофоров в коже, а также определения толщин слоев кожи *in vivo* с помощью СДО с пространственным разрешением.

Сопоставить полученные результаты с данными ультразвукового зондирования как референсного метода.

5. Построить предиктивную модель для оценки общего уровня содержания липидов и воды в организме по спектрам диффузного отражения кожи, используя в качестве референсного метода мультиспектральный биоимпедансный анализ.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования являются молекулярные компоненты кожи (в первую очередь вода и липиды), а также ее структурные характеристики (толщины слоев кожи).

Предметом исследования являются методы определения концентрации воды и липидов и анализа их распределения по глубине в коже основанные на СДО с пространственным разрешением в БИК.

Методология и методы исследования

Для оценки точности различных способов расчета содержания воды в коже была использована открытая база данных спектров отражения кожи [24]. Для экспериментального исследования оптического отклика для различных конфигураций методов измерения СДО в БИК диапазоне на оптических фантомах кожи *ex vivo* были использованы образцы свиной кожи.

Для того, чтобы исследовать динамику содержания воды при отечном синдроме, были собраны экспериментальные установки для измерения спектров СДО в БИК диапазоне (800-1400 нм), измерения спектров КР в диапазоне 2800-3600 см^{-1} , мультиспектральной визуализации на длинах волн 850 и 970 нм.

Для построения моделей по определению концентрации воды в дерме, толщины дермы и толщины гиподермы был проведен расчет спектров диффузного отражения с помощью метода Монте-Карло [25].

Для исследования возможности определения пространственного распределения хромофоров в коже, а также толщин слоев кожи *in vivo*, была разработана установка, реализующая СДО с пространственным разрешением. Калибровка метода была проведена с помощью ультразвукового исследования (УЗИ) кожи. Для построения моделей по определению толщины дермы и гиподермы были использованы методы машинного обучения.

Для оценки состава тела в качестве референсного метода использовался мультиспектральный биоимпедансный анализатор InBody 770. Данный прибор позволяет определить жировую массу тела и безжировую массу тела по измеренному импедансу тела на различных частотах переменного электрического тока. Различные типы биотканей, такие как жир, мышцы, кости обладают разной способностью проводить электрический ток, что позволяет оценивать состав тела с помощью данного метода.

Обработка и анализ данных производились с помощью языка программирования Python.

Научная новизна работы состоит в следующем:

- 1) Было обнаружено, что оценки содержания воды в коже, для которых используются параметры полос поглощения, связанного с колебаниями О-Н связей на длинах волн 1450 и 1920 нм, слабо коррелируют с оценкой содержания воды, сделанной по параметрам полосы поглощения с локальным максимумом в области 970 нм, что связано с различной глубиной проникновения света на указанных длинах волн и неоднородным распределением концентрации воды в различных слоях кожи. Установлено, что количественная оценка содержания воды по амплитуде поглощения на 970 нм подвержена влиянию изменения концентрации оксигемоглобина из-за наложения спектров поглощения оксигемоглобина и воды в диапазоне 800–1000 нм. Несмотря на это, локальный максимум поглощения воды на 970 нм может быть использован для определения

содержания воды в глубоких слоях кожи, что экспериментально подтверждено на оптических фантомах, моделирующих кожу человека.

- 2) На основе данных моделирования распространения света в коже методом Монте-Карло разработаны подходы к определению содержания воды в дерме, а также толщины гиподермы и дермы. Показано, что минимальная относительная погрешность определения концентрации воды в коже составляет 9% и достигается путем анализа спектров, измеренных при расстоянии между источником и детектором, равном 1 мм. Наименьшая погрешность определения толщины гиподермы была достигнута на расстоянии между источником и детектором, равном 10 мм, и составила 13%. Использование СДО с пространственным разрешением позволяет уменьшить ошибку определения толщины дермы до 5%, а толщины гиподермы до 6%.
- 3) Построены предиктивные модели на основе линейной регрессии для определения толщины дермы и гиподермы нормальной кожи *in vivo* на основе данных спектроскопии диффузного отражения с пространственным разрешением, при использовании УЗИ в качестве референсного метода. Относительная ошибка моделей составила 8% и 23% для определения толщины дермы и гиподермы, соответственно.
- 4) Экспериментально было установлено, что при дегидратации в ходе термических нагрузок потеря 1% массы тела соответствует снижению гидратации кожи на 10%, измеренному с помощью СДО. Поскольку общая масса кожи составляет ~15% от общей массы тела человека. Полученные оценки свидетельствуют о том, что основной механизм терморегуляции заключается в выделении воды через кожу, то есть, вся теряется в ходе термических нагрузок масса определяется дегидратацией кожи, преимущественно, дермы.
- 5) Была разработана предиктивная модель, основанная на линейной регрессии, которая по данным спектроскопии диффузного отражения с пространственным разрешением, при использовании

мультиспектрального биоимпедансного анализа в качестве референсного метода, определяет содержание жировой и безжировой массы со средней ошибкой 3.5% и 3.3%, соответственно.

- 6) Была определена оптимальная оптическая конфигурация источник-детектор в методе СДО для портативного устройства по определению содержания воды и липидов в коже: количество источников, количество детекторов, расстояния между источниками и детекторами.

Фундаментальная значимость полученных результатов состоит в развитии методов решения обратной задачи по определению содержания молекулярных компонент в коже, представляющей собой рассеивающую и поглощающую среду, в которой хромофоры распределены неравномерно по глубине.

Практическая значимость полученных результатов состоит в разработке неинвазивного метода определения содержания воды и липидов в коже. На основе результатов работы создано портативное устройство для мониторинга и диагностики отечного синдрома. Разработанное устройство позволяет удаленно корректировать диуретическую терапию, снижая нагрузку на стационарное отделение медицинских учреждений.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Амплитуда полосы поглощения молекул липидов в ближней ИК области спектра (930 нм) в среднем в 4 раза превышает амплитуду полосы поглощения белков (910 нм) при их одинаковой массовой концентрации в связи с большим числом С-Н связей на молекулу в случае липидов, в результате чего детектирование амплитуды поглощения белков в коже методом спектроскопии диффузного отражения возможно только при расстоянии между источником и детектором, на порядок превышающим толщину слоя гиподермы.

2. Спектроскопия диффузного отражения в ближнем ИК с пространственным разрешением по величинам локальных максимумов поглощения воды 970 нм

и липидов 930 нм, измеренных на расстояниях между источником и детектором в диапазоне от 0 до 10 мм, позволяет определять толщины слоев кожи – дермы и гиподермы – *in vivo* с погрешностями 0.1 мм и 0.6 мм, соответственно, при изменении толщины дермы от 0.8 до 1.6 мм и гиподермы от 0.5 до 4.0 мм.

3. Изменение амплитуды полосы поглощения воды на 970 нм на 10% при расстоянии между источником и детектором, равным 5 мм, соответствует изменению содержания воды в организме на ~1% от массы тела, что доказывает возможность использования спектроскопии диффузного отражения для количественной оценки степени дегидратации организма.

4. Модель на основе линейной регрессии, использующая в качестве входных параметров амплитуды локальных максимумов поглощения воды (970 нм) и липидов (930 нм), измеренных на расстояниях между источником и детектором в диапазоне от 0 до 15 мм, позволяет определять массовое содержание липидов и безжировой массы организма человека со среднеквадратической погрешностью 3.5% и 3.3%, соответственно.

Достоверность обусловлена повторяемостью и воспроизводимостью представленных экспериментальных результатов, полученных с использованием современного лабораторного оборудования, и описанных с использованием современных методов обработки данных. Доклады по теме диссертационной работы прошли апробацию на всероссийских и международных конференциях, публикации по теме диссертационной работы опубликованы в рецензируемых научных журналах.

Апробация результатов и публикации

Основные результаты диссертационной работы были представлены соискателем на научных семинарах кафедры квантовой электроники физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, а также на российских и международных научных конференциях.

Результаты диссертационной работы были представлены в 6 докладах на российских и международных конференциях: Saratov Fall Meeting 2019: VII Symposium on Optics & Biophotonics (Саратов, Россия), Towards Optical and Multimodality Translational Imaging 2020 (Саратов, Россия), VII Sechenov International Biomedical Summit (SIBS2023) (Москва, Россия), Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» 2023 г.

Публикации

Основные результаты по теме диссертации изложены в 5 печатных изданиях, в том числе в 5 статьях в рецензируемых научных журналах, удовлетворяющих Положению о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова. Список работ автора приведен в конце авторефера.

Личный вклад автора

Все теоретические и экспериментальные результаты, представленные в диссертационной работе, получены автором лично либо при его определяющем участии. Основная часть результатов была получена в лаборатории лазерной биофотоники кафедры квантовой электроники Физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Публикации по теме диссертационной работы были написаны при определяющем участии автора.

Структура диссертационной работы

Диссертационная работа состоит из введения, четырёх глав, заключения и списка цитированной литературы. Работа содержит 145 страниц, 33 иллюстрации, 5 таблиц и 94 библиографические ссылки.

Краткое содержание диссертационной работы

Во Введении описывается актуальность и степень разработанности темы диссертационного исследования, формулируются цели и задачи работы, её научная новизна, теоретическая и практическая значимость, обоснованность и

достоверность полученных результатов, формулируются положения, выносимые на защиту, приводятся сведения о публикациях, апробации результатов и структуре диссертации.

В Главе 1 диссертации представлен обзор литературы, посвященный определению физиологических параметров кожи в задачах биомедицинской диагностики. Рассматриваются основные медицинские задачи, где необходимо измерение содержания воды и липидов в коже. Данные задачи включают диагностику отека, оценку гидратации организма, диагностику ожирения и уменьшения мышечной массы (саркопении). Золотым стандартом в медицине для измерения содержания воды и липидов являются МРТ и УЗИ, однако высокая стоимость оборудования ограничивает их применение в персонализированной диагностике. Поэтому требуется разработка быстрых и точных методов определения содержания воды и липидов в коже. Методы оптической спектроскопии, такие как спектроскопия КР, СДО, ФТ, мультиспектральная визуализация, терагерцевая и Фурье-инфракрасная спектроскопия, обладают молекулярным контрастом и обеспечивают высокую чувствительность детектирования хромофоров в биотканях. При этом СДО с пространственным разрешением в БИК диапазоне является наиболее подходящим методом для определения содержания воды и липидов в коже благодаря достаточной глубине сканирования. Поэтому в рамках диссертационной работы данный метод был выбран в качестве основного.

В Главе 2 исследуется возможность определения содержания воды в коже на основе анализа спектров диффузного отражения вблизи полос поглощения молекул воды в БИК области спектра. Рассматривается вопрос о том, можно ли с использованием различных локальных максимумов поглощения воды в области 970, 1190, 1450 и 1920 нм получить дополнительную информацию о распределении воды в коже. Для этого было проведено численное моделирование распространения света в коже, а также экспериментально по спектрам диффузного отражения от фантомов кожи

человека было оценено содержание воды в ней. Также был проведен анализ данных из открытой базы спектров диффузного отражения кожи человека и исследовано влияние изменения коэффициента рассеяния и концентрации оксигемоглобина на оценку содержания воды по спектрам диффузного отражения. Было обнаружено, что оценки концентрации воды, для которых используются интенсивные полосы поглощения воды на длинах волн 1450 и 1920 нм, слабо коррелируют с оценкой содержания воды, сделанной по локальному максимуму поглощения на длинах волн 970 нм, что связано с различной глубиной проникновения света на указанных длинах волн и, тем самым, влиянием толщины дермы на отраженный сигнал в данном спектральном диапазоне.

В Главе 3 был разработан метод на основе СДО с пространственным разрешением, который позволяет одновременно оценивать содержание воды в дерме, толщину дермы и толщину гиподермы. В рамках данной главы проведено экспериментальное исследование динамики отечного синдрома, вызванного гистамином, с помощью СДО с пространственным разрешением под контролем УЗИ. Была обнаружена корреляция между толщиной дермы, измеренной с помощью УЗИ, и амплитудой поглощения воды, полученной с помощью СДО при отеке кожи. Были построены модели машинного обучения для определения толщины дермы и гиподермы нормальной кожи *in vivo* с использованием данных СДО с пространственным разрешением.

В Главе 4 диссертации рассматриваются биомедицинские приложения разрабатываемого метода. Была исследована динамика изменения спектров диффузного отражения кожи при физических и тепловых нагрузках, а также на пациентах с отечным синдромом, принимающих диуретическую терапию. Также в главе 4 была исследована задача по оценке состава тела человека, т.е. определения общего уровня содержания липидов и безжировой массы с помощью спектроскопии диффузного отражения с пространственным разрешением. В качестве референсного метода использовался

мультиспектральный биоимпедансный анализ тела, который по измеренному электрическому импедансу тканей на различных частотах переменного электрического тока позволяет оценить состав тела. Была разработана модель, которая по данным спектроскопии диффузного отражения определяет общее содержание липидов и безжировой массы организма человека.

В заключении сформулированы основные результаты и выводы, полученные в данной работе.

Глава 1. Современное состояние исследований по теме диссертации

1.1. Строение кожи человека

Основной объект исследования данной работы — кожа человека (Рисунок 1). Кожа представляет собой сложную гетерогенную систему, в которой содержание крови и пигментов распределено по глубине неоднородно. Тем не менее, можно разделить кожу на слои с точки зрения физиологической природы и оптических свойств клеток, из которых этот слой состоит. В основном выделяют три слоя кожи: эпидермис, дерма и гиподерма.

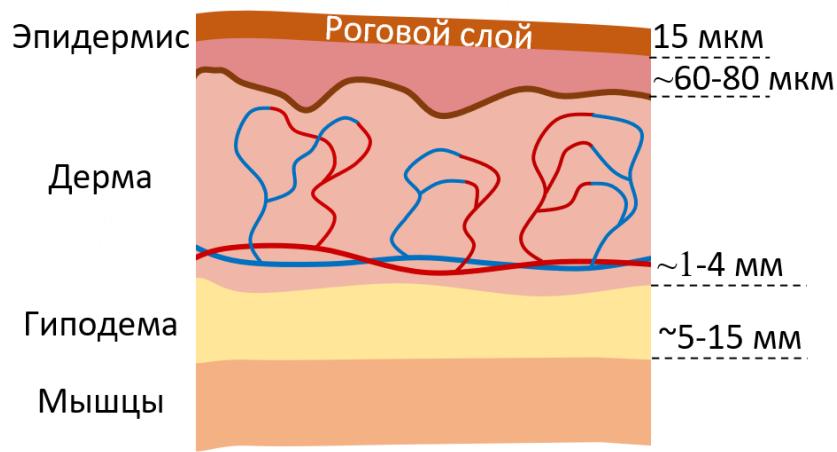


Рисунок 1 — Строение кожи человека.

Эпидермис может быть разделён на два подслоя: неживой и живой эпидермис. Неживой эпидермис или роговой слой (приблизительно 20 мкм) состоит из мёртвых плоскоклеточных клеток, которые состоят на 20% из липидов, 60% из белка и 20% из воды. Живой эпидермис (около 100 мкм) обладает большим содержанием воды (порядка 50%), имеет менее плотноупакованное строение клеток, а также содержит меланин, который вырабатывается в меланоцитах, встречающихся в базальном слое, и обнаруживается в частицах, называемых меланосомами. Объемная доля эпидермиса, занимаемая меланосомами, варьируется от 1.3% (слегка пигментированная кожа) до 43% (темная кожа) [2].

Базальная мембрана отделяет эпидермис от дермы. Дерма представляет собой слой, в котором неоднородно располагаются вены и капилляры. Дерма

состоит из двух структурно различных слоев, папиллярного и ретикулярного, которые отличаются главным образом размером волокон коллагена и содержанием крови. Объемная доля крови в коже варьируется от 0.2 % до 4 % [26]. Объемная доля воды в дерме, в среднем, составляет 70.2 ± 5.2 % [27].

Гиподерма образуется путем агрегации жировых клеток (адипоцитов), содержащих накопленный жир (липиды) в виде множества мелких капель в зависимости от веса человека. Диаметр адипоцитов колеблется в пределах от 15 мкм до 250 мкм, а их средний диаметр колеблется от 50 мкм до 120 мкм [2].

1.2. Определение физиологических параметров кожи в задачах биомедицинской диагностики

Определение содержания молекулярных компонентов в коже, таких как вода и липиды, а также структурных параметров кожи — толщин слоев дермы и гиподермы — является важной диагностической задачей в различных областях медицины.

Так, мониторинг гидратации помогает в диагностике обезвоживания и отечного синдрома. Например, при сердечной недостаточности для оценки отечного синдрома используется визуальная оценка скорости восстановления «ямки» на коже в области отека после надавливания пальцем. Также применяют ежедневное взвешивание пациента, чтобы оценить эффективность диуретической терапии. Однако данные методы не являются достаточно точными [3]. В спортивной медицине низкий уровень гидратации организма может оказывать существенное влияние на состояние спортсмена. В более тяжелых случаях снижение содержания воды в организме может привести к обезвоживанию, что может иметь пагубные последствия. Таким образом, изучение механизмов восстановления гидратации (т.е. регидратации) после различных воздействий является важной задачей [4]. Также необходимо отметить, что при онкологических заболеваниях для области вблизи опухоли характерно высокое содержание воды. Поэтому измерение содержания воды позволяет определить её границы [28].

Кроме того, недавние исследования выявили роль жировой ткани в развитии метаболических нарушений [29,30]. Как висцеральный жир (жир во внутренних органах), так и гиподерма подвержены различным патофизиологическим процессам, таким как воспаление [30,31], нарушение регуляции оксигенации тканей [32,33] и нарушение работы эндокринной системы [34,35]. В связи с этим требуется разработка быстрых и точных методов определения содержания воды и липидов в коже.

1.3. Клинические методы определения концентрации воды и липидов в коже

В мире существует большое число методов, позволяющих оценить уровень содержания воды и липидов и их пространственное распределение в коже с различной степенью точности и сложностью выполнения анализа. Развитие методов медицинской визуализации — КТ и МРТ — позволило провести количественный анализ распределения жировой ткани в организме человека. Данные методы визуализации биотканей считаются золотым стандартом для анализа состава тела в клинике, однако сложность, стоимость и наличие ионизирующего излучения в случае КТ ограничивают их рутинное применение при оценке динамики изменения состава тела. Кроме того, высокая стоимость оборудования затрудняет её широкое использование в клинике. Для измерения морфологии кожи и толщин её слоев наиболее популярным клиническим методом является УЗИ. С помощью данного метода с высокой точностью можно определить толщину дермы, но при этом концентрацию воды в дерме определить невозможно. Также в некоторых случаях толщину гиподермы определить не представляется возможным в силу слабой эхогенности данного слоя кожи [36].

Уменьшение или увеличение массы тела за короткие промежутки времени, обычно в пределах одного дня, часто связано с изменениями в количестве жидкости в организме. Это изменение массы жидкости можно измерить с помощью простого взвешивания. Однако, несмотря на его простоту

и точность, данный метод не позволяет определить количественный уровень гидратации организма. С другой стороны, существует метод гидроденситометрии, который основан на подводном взвешивании для определения плотности человеческого тела. Предполагается, что тело состоит из жировой и безжировой компоненты. Этот подход позволяет неинвазивно оценить общее количество воды и липидов в организме. Однако двухкомпонентная модель является упрощённой и не позволяет точно измерить распределение липидов и воды в коже.

Колориметрический метод и измерение относительной плотности биожидкостей представляют собой простые способы оценки уровня воды в организме. Они основаны на анализе мочи и обладают схожими недостатками, а именно, отсутствием стандартизированной цветовой шкалы и необходимостью индивидуальной калибровки. Более того, изменения в цвете и плотности мочи могут быть вызваны различными факторами, включая прием нутриентов [37]. В то же время инвазивный анализ гематокрита и плотности плазмы крови является более надежным методом определения уровня воды в организме, хотя изменения в этих показателях могут не отражать краткосрочные изменения в гидратации. Так, исследование показало, что уровень плотности плазмы у пациентов, потерявшими 3% массы тела из-за потоотделения, статистически значимо не изменился [38].

В изотопном методе используются радиоактивные изотопы стабильных атомов, такие как дейтерий, кислород-18, калий-40. Зная сигнал от исходно введённого количества изотопов, можно получить распределение воды в отдельных тканях и органах. Данный метод является наиболее точным и позволяет определить содержание воды в отдельных органах и тканях, а также, например, в межклеточном пространстве (это достигается использованием различных меток). При этом среднее время распределения изотопного контраста по организму составляет 3–4 часа, а измерение проводится с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), что требует дорогостоящего оборудования.

Сравнительно недавно большую популярность приобрели методы, позволяющие определять содержание воды с помощью диэлектрических свойств биологических тканей. Данный метод называется биоимпедансным анализом. Так, в одночастотном биоимпедансном анализе измеряется диэлектрическая проницаемость части тела на определённой частоте (обычно 50 кГц). Затем, оценив форму и размеры этой части тела, можно определить содержание воды и липидов в организме. При этом использование зависимости диэлектрической проницаемости от частоты позволяет разделять вклады от жидкостей, находящихся внутри клеток и в межклеточном пространстве – данная особенность реализована в методе мультиспектрального биоимпедансного анализа (МБА). Данный метод является неинвазивным, существуют коммерчески доступные приборы [39] и носимые устройства [40]. При этом данный метод не позволяет определить пространственное распределение содержания воды. Биоимпедансный анализ также используется для оценки общего уровня содержания липидов организма человека.

Определение толщины гиподермы механическим неинвазивным методом можно провести с помощью калипера – специальной линейки, прикладываемой к складке кожи. Однако точность измерений калипера зависит от силы нажатия на кожу. При измерении также не учитываются толщина верхних слоев кожи, а именно эпидермиса и дермы.

Липиды, как и вода, сосредоточены не только в гиподерме, но и в дерме и эпидермисе. Так, липиды, расположенные в роговом слое, играют роль защитного барьера, который, с одной стороны, ограничивает потерю влаги организмом, а с другой – не даёт проникнуть патогенам внутрь организма через кожный покров. Измерение содержания липидов в роговом слое производится с помощью термоэлектрического датчика, который определяет их наличие не напрямую, а через потерю воды через участок кожи, на котором производят измерения (то есть определяют так называемый параметр

трансэпидермальной потери воды, TEWL, transepidermal water loss). Данные измерения позволяют лишь косвенно судить о концентрации липидов в коже.

Таблица 1. Клинические методы определения содержания воды и липидов.

Метод	Измеряемый параметр	Недостатки
МРТ	Содержание воды, толщина дермы, гиподермы.	Высокая стоимость оборудования
УЗИ	Морфология кожи: толщина дермы, гиподермы.	Высокая стоимость оборудования; не измеряет содержание воды в коже
КТ	Пространственное распределение воды и липидов.	Ионизирующее излучение, высокая стоимость оборудования.
Анализ биожидкостей	Относительный уровень гидратации организма	Отсутствие единой цветовой шкалы; требует индивидуальной калибровки
Анализ крови	Гематокрит, плотность плазмы крови	Инвазивный анализ
ПЭТ	Содержание воды и липидов	Требует введения токсичных веществ в организм, высокая стоимость оборудования
Взвешивание	Изменение массы тела	Невозможно измерить пространственное распределение воды и липидов
Биоимпедансный анализ	Процент жировой массы тела и массы воды	Невозможно измерить пространственное распределение воды и липидов

Калипер	Толщина гиподермы	Не учитывает толщину дермы, зависит от места измерения и степени нажатия
Термоэлектрический датчик	Трансэпидермальная потеря воды	Косвенный метод оценки содержания липидов в коже по теплопроводности кожи

В таблице 1 приведён общий список рассмотренных методов и их недостатков. Как видно, перечисленные методы, хотя и позволяют определять содержание воды и липидов в коже, обладают рядом существенных недостатков. Поэтому для решения задач, связанных с неинвазивным определением физиологических параметров кожи, наиболее подходящими являются методы оптической спектроскопии.

1.4. Методы спектроскопии для определения содержания воды и липидов в ткани

Методы спектроскопии основаны на взаимодействии света с молекулярными колебательными и вращательными уровнями молекул воды и липидов. Данные методы включают в себя мультиспектральную визуализацию [41], СДО [9,10], спектроскопию КР [14,42,43], терагерцовую спектроскопию [44], фотоакустическую томографию [45,46].

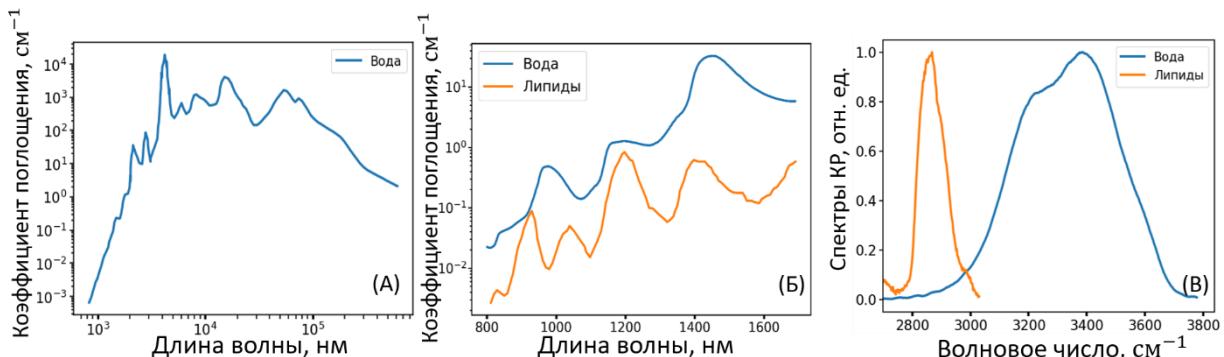


Рисунок 2 — А) Спектр поглощения воды в ИК спектральном диапазоне. Б) Спектры поглощения воды и липидов в БИК спектральном диапазоне. В) Спектры КР воды и липидов.

Отек в первую очередь возникает из-за изменения проницаемости сосудов, расположенных в дерме. Следовательно, наиболее существенные изменения концентрации воды следует ожидать в данном слое кожи, тогда как в эпидермисе и гиподерме увеличение концентрации воды, по-видимому, не столь значительно из-за меньшей толщины первого и гидрофобности последнего. Таким образом, задача определения содержания воды при отеке обычно требует глубины зондирования приблизительно от 0.5 до 1.0 мм, что ограничивает возможности применения некоторых оптических методов.

Из-за высокого значения коэффициента поглощения воды в ИК спектральном диапазоне (рисунок 2(А)) методы инфракрасной Фурье-спектроскопии [47] и терагерцовой спектроскопии [44] не позволяют определять содержания воды в глубоких слоях кожи. Метод КР спектроскопии, основанный на неупругом рассеянии света, позволяет определить содержание воды и липидов, т.к. колебательные спектры данных молекул отличаются значительно (рисунок 2(В)). Но данный метод также ограничивается глубиной зондирования в 100 мкм из-за высокого значения флуоресцентного фона при измерении данного сигнала от кожи.

Для оценки структурных характеристик верхнего слоя кожи - эпидермиса в литературе используют методы ОКТ [48] и различные методы микроскопии [49,50]. Данные методы позволяют оценить характерную толщину слоя эпидермиса и диаметры сосудов с высоким пространственным разрешением. При этом зондирование глубоких слоев кожи ограничивается рассеянием света в коже в видимом диапазоне и БИК-диапазоне излучения.

Измерение содержания воды и липидов с помощью методов СДО, мультиспектральной визуализации и фотоакустической томографии основаны измерении спектров поглощения в БИК-спектральном диапазоне. В данном диапазоне локальные максимумы поглощения воды и липидов связаны обертонами внутримолекулярных колебаний данных молекул (рисунок 2(Б)). Это максимумы с центром на длинах волн 970, 1190, 1450 нм. Данные линии

поглощения обусловлены обертонами симметричных и асимметричных колебаний сжатия и так называемых ножничных колебаний молекул воды. Для липидов локальные максимумы поглощения при 930, 1040, 1210, 1730 и 1760 нм связаны с обертонами колебательной моды растяжения связей С-Н. Максимум поглощения около 1430 нм можно отнести к первому обертону растяжения связи О-Н [51]. Среди оптических методов СДО, мультиспектральная визуализация и фотоакустическая томография имеют подходящую глубину зондирования и основаны на измерении молекулярно-специфичных параметров. При этом фотоакустическая томография требует перестраиваемого по длине волны излучения импульсного лазера для того, чтобы измерить спектры оптоакустического отклика, что затрудняет широкое применение данного метода в клинике. Сравнение оптических методов оценки содержания воды в коже *in vivo* представлено в таблице 2.

Для измерения содержания воды в биотканях достаточно широко используются СДО и спектроскопия КР. Например, полосы поглощения воды при 1450 и 1920 нм использовались в работах [52,53] для визуализации гидратации поверхности кожи. Измерения концентрации воды в эпидермисе, полученные с помощью спектроскопии КР, показали изменения в профиле концентрации воды при обработке кожи увлажняющими средствами [54–56].

Однако сравнительных исследований эффективности различных методов оптической спектроскопии по измерению содержания воды и липидов в тканях ни для оптических фантомов, ни для кожи человека *in vivo* не проводилось. Таким образом, вопрос о сходстве результатов спектроскопии СДО и КР остается открытым. Более того, как будет показано далее в главе 2, даже использование разных полос поглощения воды в СДО дает разные результаты из-за различий в глубине зондирования для разных областей спектра. Поэтому данные вопросы будут исследованы в рамках диссертационной работы.

Таблица 2. Методы оптической спектроскопии, применяемые для оценки содержания воды в коже. В таблице указаны измеряемые параметры и значения характерной глубины сканирования для каждого метода. Таблица адаптирована из работы [A2].

Метод	Измеряемый параметр	Характерная глубина сканирования	Источники
Спектроскопия КР	Интенсивность О-Н (3200 см^{-1}) и С-Н (2900 см^{-1}) линий	100 мкм	[47,57]
СДО	Оптическая плотность около 970 нм и 1200 нм	3 мм	[58],[A1]
	Оптическая плотность около 1500нм и 1900 нм	130 мкм	[59–61]
Оптоакустическая томография	Оптическая плотность 970 нм и 1200 нм	10 мм	[46,62]
Мультиспектральная визуализация	Оптическая плотность около 970 нм и 1200 нм	1 мм	[3,41]
Капилляроскопия	Толщина периваскулярной зоны	100 мкм	[49,50]
ОКТ	Показатель преломления слоев кожи $n(x,y,z)$	1 мм	[48]

Фурье спектроскопия	ИК	Поглощение О-Н (3300 см^{-1}) линии	1 мкм	[47]
Терагерцевая спектроскопия		Поглощение в диапазоне 0.2–1.5 ТГц	10-100 мкм	[44]

СДО в БИК-диапазоне представляется подходящим методом для определения содержания воды и липидов в коже благодаря высокой глубине проникновения света в данном спектральном диапазоне. Метод СДО является основным в рамках данной работы, поэтому ниже приведено подробное описание его физических принципов, математических основ происходящих явлений, методов обработки данных СДО, а также применение СДО для определения содержания воды и липидов в коже.

1.5. Спектроскопия диффузного отражения

Сущность метода СДО состоит в следующем. Излучение от источника света с помощью оптического волокна подается на изучаемый объект. Обычно образец представляет собой систему, в которой часть излучения рассеивается на молекулах и неоднородностях образца (клетках, сосудах), а часть поглощается молекулами образца (хромофорами). Некоторая часть диагностирующего излучения рассеивается таким образом, что выходит из поверхности образца (т.е. происходит «отражение») и детектируется приёмником. Термин «диффузная» означает, что траектории лучей излучения источника являются случайными, так как испытывают многократное рассеяние и, в предельном случае, описываются уравнением диффузии. Наконец, сечение поглощения и рассеяния фотонов с различными длинами волн определяется молекулярными свойствами хромофоров и геометрическими свойствами рассеивателей — эти различия и позволяют определять содержание хромофоров в исследуемом образце. Далее отражённый свет детектируется с помощью оптического волокна или

интегрирующей сферы и подаётся на спектрометр. Простейшая схема измерения кожи с использованием метода СДО приведена на рисунке 3.

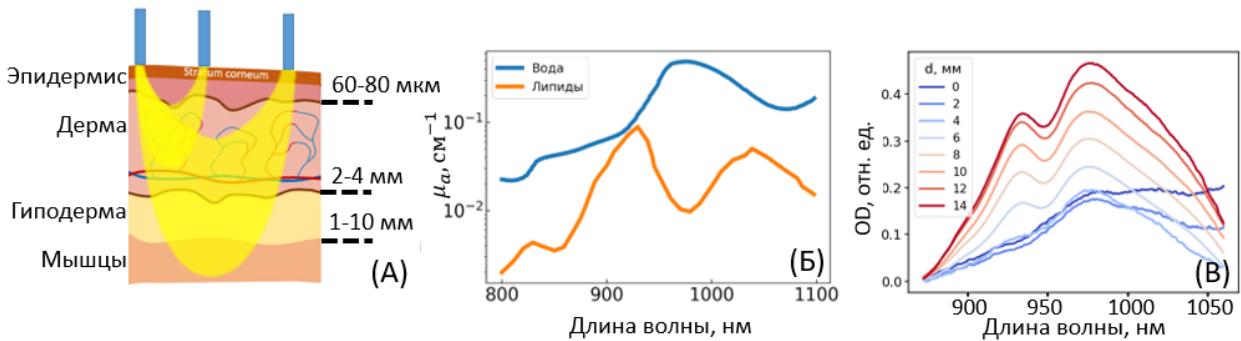


Рисунок 3 — А) Принципиальная схема метода спектроскопии диффузного отражения с пространственным разрешением. На рисунке показаны два положения оптических волокон источника и детектора. Схема иллюстрирует процесс сканирования по глубине, позволяющий получать информацию о распределении светорассеяния на различных глубинах в коже. Б) Спектры поглощения воды и липидов в БИК диапазоне [26]. В) Пример спектров СДО, измеренных от кожи при различных расстояниях между источником и детектором. Цветом от синего к красному обозначено увеличение расстояния между волокнами источника и детектора.

Для того чтобы разделить вклады поглощения и рассеяния в сигнал диффузного отражения, измерения спектров проводят в двух или более конфигурациях системы светосбора, например, при различных расстояниях между источником света и детектором рассеянного излучения. Такое разделение возможно из-за различной зависимости интенсивности прошедшего света от расстояния между источником и детектором для процессов рассеяния и поглощения. Для определения концентраций отдельных компонентов в спектре существует ряд подходов, которые будут описаны в разделах 1.10-1.11. Кроме того, в оригинальной части данной работы разработана двухслойная модель кожи, на основе которой были построены методы определения концентрации воды в дерме и толщины дермы, а также толщины гиподермы (см. Главу 3).

1.6. Теория переноса излучения в рассеивающих средах

Математическое описание процесса распространения непрерывного излучения (немодулированного по интенсивности света) в рассеивающей среде может быть реализовано с помощью стационарной теории переноса излучения (ТПИ) [1,63]. Основное стационарное уравнение ТПИ для монохроматического света имеет вид:

$$\frac{\partial I(r,s)}{\partial s} = -\mu_t I(r,s) + \frac{\mu_s}{4\pi} \int I(r,s') p(s,s') d\Omega', \quad (1.1)$$

где $I(r,s)$ – [Вт/(см²стер)] лучевая интенсивность излучения, распространяющегося в направлении единичного вектора s в точке, определяемой радиус-вектором r ; $d\Omega'$ – телесный угол, который имеет единичный вектор s' в качестве внешней нормали, $p(s,s')$ – фазовая функция рассеяния; $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ – коэффициент ослабления; μ_a – коэффициент поглощения и μ_s – коэффициент рассеяния.

Коэффициент поглощения μ_a определяет долю светового потока F , поглощенного в единицу длины оптического пути dL : $\mu_a = -\frac{dF}{FdL}$. Коэффициент рассеяния μ_s определяет долю коллимированного светового потока F , рассеянного в единицу длины оптического пути dL : $\mu_s = -\frac{dF}{FdL}$.

Фазовая функция $p(s,s')$ характеризует собой часть света, рассеянного от направления s в направлении s' и нормируется таким образом, чтобы при интегрировании по всем направлениям она равнялась единице, т.е. $\int p(s,s') d\omega' = 1$, $d\omega' = \sin\theta d\theta d\varphi$, φ – азимутальный угол в полярной системе координат, связанной с элементарным объемом рассеивающей среды. При многократном рассеянии направление распространения излучения меняется на случайный угол, имеющий определенное распределение вероятности, определяемое фазовой функцией. Таким образом, фазовая функция определяет вероятность того, что луч, распространяющийся в направлении s , после рассеяния будет иметь направление s' .

Для целого ряда биотканей было показано, что достаточно хорошее согласование между экспериментальными и расчетными данными может быть получено при использовании фазовой функции Хенни-Гринштейна (Henyey-Greenstein), которая имеет вид:

$$p_{HG}(s, s') = \frac{1}{4\pi} \left(\beta + (1 - \beta) \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g \cos \theta)^{\frac{3}{2}}} \right), \quad (1.2)$$

где β характеризует долю излучения, рассеянного изотропно, θ – угол между направлениями распространения, падающего и рассеянного фотонов, $\cos(\theta)$ представляет собой скалярное произведение единичных векторов s и s' , g – средний косинус угла рассеяния, или, иначе говоря, фактор анизотропии рассеяния, фактически определяющий степень анизотропии фазовой функции:

$$g = \frac{\int \cos \theta p(s, s') d\omega'}{\int p(s, s') d\omega'}. \quad (1.3)$$

Другими словами, фактор анизотропии рассеяния определяет число актов рассеяния, после которых теряется информация о первоначальном направлении движения фотона в рассеивающей среде.

Рассмотрение функции $p(s, s')$ уместно при обсуждении только небольшого количества актов рассеяния, например, для микроскопии тонких срезов ткани на просвет и конфокальной микроскопии на отражение. В более толстых тканях, где происходит многократное рассеяние и рассеивающие структуры в ткани ориентированы случайным образом, зависимость функции рассеяния от ϕ усредняется и, следовательно, игнорируется, а многократное рассеяние усредняется по углу θ так, что параметр $g = \langle \cos \cos(\theta) \rangle$ характеризует рассеяние ткани с точки зрения относительного направления рассеяния вперед по сравнению с обратным.

Интегро-дифференциальное уравнение (1.1) является сложным для анализа распространения света в рассеивающих средах, поэтому оно упрощается путем представления решения в виде сферических гармоник. Такое упрощение приводит к системе из $(N + 1)^2$ связанных дифференциальных уравнений в частных производных, известной как P_N -

приближение. Например, для $N = 1$ необходимы четыре связанных дифференциальных уравнения, которые сводятся к единственному уравнению диффузационного типа [63] и имеет следующий вид:

$$(\nabla^2 - \mu_{\text{eff}}^2)U(r) = -Q(r), \quad (1.4)$$

где

$$U(r) = \int I(r, s)d\Omega - \text{полная освещенность в точке,} \\ \mu_{\text{eff}} = \{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)\}^{0.5} \quad (1.5)$$

μ_{eff} - эффективный коэффициент ослабления;

$$Q(r) = D^{-1}S_d(r), \quad (1.6)$$

$S_d(r)$ -функция источника диффузного излучения, т.е. число фотонов, инжектируемых в единицу объема, величина D – коэффициент диффузии фотонов, определяемый выражением

$$D = c[3(\mu_a + \mu'_s)]^{-1}, \quad (1.7)$$

μ'_s - приведенный коэффициент рассеяния, определяемый как

$$\mu'_s = (1 - g)\mu_s, \quad (1.8)$$

c – скорость света в среде.

Диффузное приближение оказывается хорошей моделью, когда коэффициент поглощения сильно меньше коэффициента рассеяния среды ($\mu_a \ll \mu'_s$), и когда линейный размер источника и детектора мал по сравнению расстоянием между источником и детектором.

Важным является вопрос о влиянии поглощения на транспортные свойства рассеивающей среды. В диффузационной теории коэффициент диффузии излучения вводится в формуле (1.7). Вместе с тем было показано (см. [1]), что лучшее соответствие между экспериментом и диффузационной теорией достигается в случае, если D принимается равным $D = c/(3(1 - g)\mu_s)$, т. е. не зависящим от коэффициента поглощения среды. Это позволяет проанализировать статистику траектории лучей при многократном рассеянии в рассеивающей и поглощающей среде путем вычисления плотности вероятности обнаружения фотона $\rho(\mu_s, g, l)$ для непоглощающей среды с

заданными значениями μ_s и g , где l – оптический путь. Затем поглощение можно учесть путем введения множителя $\exp(-\mu_a l)$ в выражении для $\rho(\mu_s, g, l)$.

Интенсивность светового сигнала в принимающем волокне или в интегрирующей сфере определяется свойствами поглощения и рассеяния ткани, а также конфигурацией измерения, и может быть выражена через плотность вероятности обнаружения фотона посредством следующего отношения:

$$\frac{I}{I_0} = \int_0^{\infty} \rho(\mu_s, g, l) dl = \int_0^{\infty} P(\mu_s, g, l) \exp(-\mu_a l) dl \quad (1.9)$$

Как упомянуто выше, функция плотности вероятности обнаружения фотона сильно зависит от пространственной конфигурации волоконного зонда, поскольку его геометрия определяет траектории лучей, которые прошли через ткань и достигли детектора. Обычно обсуждаются два случая геометрических конфигураций.

Первым является расположение интегрирующей сферы. Практически это может быть реализовано с использованием интегрирующей сферы для сбора всего отражённого света. Глубина детектирования для этой конфигурации определяется главным образом величиной эффективного коэффициента ослабления μ_{eff} . Во втором предельном случае приёмное и передающее волокна (или источник света и детектор) располагаются на расстоянии r_{sd} , которое намного больше диаметра волокна (размер излучателя и детектора). В этом случае траектории лучей в образце образуют «банановидную» (в английской литературе — «banana-shaped») форму с концами в местах расположения волокон источника и детектора. Глубина детектирования для этой конфигурации пропорциональна $(\sqrt{2}r_{sd})/4$ в пределе слабого поглощения ($r_{sd} \ll (\mu_{\text{eff}})^{-1}$) и $\sqrt{d/2\mu_{\text{eff}}}$ в пределе сильного поглощения ($r_{sd} \gg (\mu_{\text{eff}})^{-1}$) [64]. Таким образом, увеличение расстояния между волокнами позволяет увеличить глубину детектирования. Аналитические решения, касающиеся оптических свойств ткани и

интенсивности диффузного отражённого сигнала, были получены только для этих предельных случаев интегрирующей сферы и разделённых в пространстве волокон для полубесконечной среды с заданными коэффициентами рассеяния μ_s и поглощения μ_a . Как будет показано далее, для кожи аналитическое решение невозможно применить, если рассматривать задачи определения концентраций хромофоров в различных слоях кожи — в дерме и гиподерме. В рамках данной работы была разработана модель кожи и подходы для расчёта спектров отражения от неё света. Для обоснования данной модели далее приведено описание строения кожи и оптических свойств её слоёв.

1.7. Оптические характеристики биотканей

Основываясь на теории переноса излучения в поглощающих и рассеивающих средах (см. раздел 1.4 Теория переноса излучения в рассеивающих средах), оптические свойства ткани описываются коэффициентом поглощения μ_a (см^{-1}), коэффициентом рассеяния μ_s (см^{-1}), фазовой функцией рассеяния $p(s, s')$, и показателем преломления ткани n .

Для оценки спектральных зависимостей коэффициентов поглощения и рассеяния удобно рассмотреть эффективную оптическую плотность $OD(\lambda)$, определяемую следующим выражением:

$$OD(\lambda) = -\log_{10}(R(\lambda)) \quad (1.10)$$

$$R(\lambda) = \frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)} \quad (1.11)$$

где $I_0(\lambda)$ и $I(\lambda)$ — спектры падающего и отражённого света соответственно, $R(\lambda)$ — спектр отраженного света, λ — длина волны излучения.

1.8. Оптические свойства кожи

Основными хромоформами кожи в видимом диапазоне являются оксигемоглобин, дезоксигемоглобин, содержащиеся в крови, и меланин, содержащийся в эпидермисе. Что касается БИК-диапазона, то в данном диапазоне основными поглотителями являются вода и липиды (рисунок 4). Коэффициент поглощения белков в БИК-диапазоне на порядок меньше, чем у

воды [65], поэтому их поглощение не учитывалось в данных оценках. В диффузном приближении глубину проникновения света можно оценить как $d_{\text{eff}} = 1/\mu_{\text{eff}}$. Расчёты по данной формуле показывают, что в диапазоне от 800–1100 нм глубина проникновения света может составлять около 3 мм, что позволяет регистрировать сигнал с глубоких слоёв кожи — дермы и гиподермы. В данном диапазоне существуют локальные максимумы около 970 нм и 930 нм, связанные с поглощением воды и липидов соответственно, что даёт потенциальную возможность определения содержания данных веществ в глубоких слоях кожи. Кроме того, глубина детектирования сигнала зависит от конкретной геометрии измерения, т. е. от относительного расположения источника и детектора, тем самым становится возможным сканирование слоёв, расположенных на разной глубине.

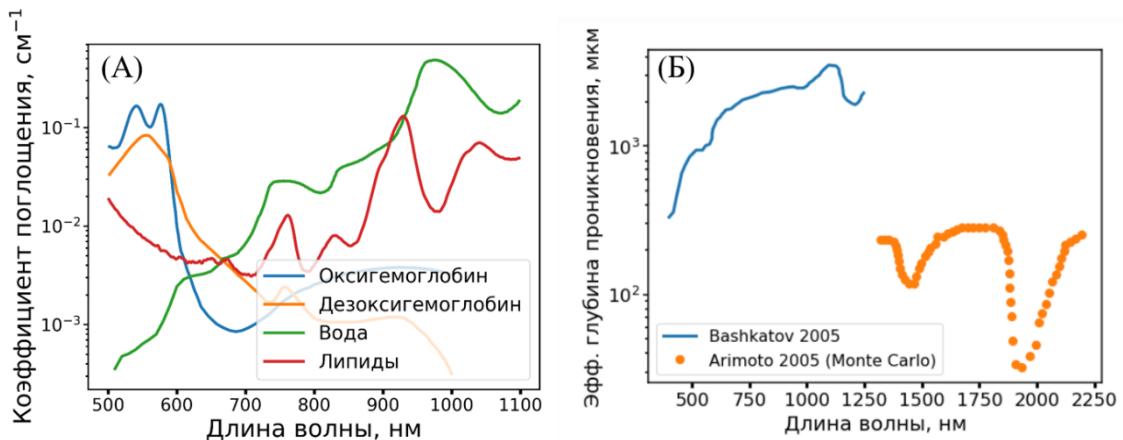


Рисунок 4 — А) Коэффициенты поглощения оксигенированного иdeoоксигенированного гемоглобина, воды и липидов в видимой и БИК области спектра. Для оксигемоглобина, дезоксигемоглобина и воды были использованы концентрации характерные для дермы [61]. Для липидов спектр поглощения рассчитан для 100% массовой концентрации. Б) Зависимости эффективной глубины проникновения света в коже от длины волны, полученные в работах [61,66].

Для того чтобы из спектров диффузного отражения среды получить информацию о содержании веществ-хромофоров в ней, существует ряд моделей, с помощью которых возможно определить коэффициенты рассеяния

и поглощения среды. Далее будет приведено описание существующих моделей, а также их ограничения. Помимо этого, в оригинальной части работы проведён сравнительный анализ методов определения содержания воды в коже по спектрам диффузного отражения в различных спектральных диапазонах, а также предложена двухслойная модель кожи, с помощью которой возможно определить содержание воды, толщину дермы и гиподермы.

1.9. Оценка коэффициента отражения: диффузное приближение

Измерение коэффициентов поглощения и рассеяния тканей можно проводить с использованием детектирования сигнала с временным разрешением. Аналитическое выражение для коэффициента диффузного отражения в конфигурации с оптоволокнами, показанной на рисунке 3, была получена в диффузном приближении [67]:

$$R(r_{sd}, \mu_a, \mu_s, t) = \frac{z_0}{(4\pi D)^{3/2}} t^{-5/2} \exp\left(-\frac{r_{sd} + z_0}{2Dt}\right) \exp(-\mu_a c t) \quad (1.12)$$

где $z_0 = 1/\mu'_s$, r_{sd} – расстояние между источником и детектором, t – время, c – скорость света в среде. Аппроксимируя кинетику отраженного сигнала функцией (1.12), можно получить значения μ_a, μ_s . С помощью данного подхода недавно были оценены содержание воды и липидов в коже. Данный метод, однако, требует сложной техники (коррелированного по времени счета одиночных фотонов, TCSPC, time correlated single photon counting) для его реализации.

Стационарные экспериментальные методы легче применять на практике. В диффузном приближении формула, связывающая интенсивность измеряемого сигнала с оптическими свойствами ткани и расстоянием между волокнами, может быть получена непосредственно из уравнения (1.12). Коэффициент диффузного отражения для стационарного случая в диффузионном приближении имеет вид:

$$R(r_{sd}, \mu_a, \mu_s) = \frac{1}{2\pi\mu'_s} \left(\mu_{eff} + \frac{1}{r_{sd}} \right) \frac{1}{r_{sd}^2} \exp(-\mu_{eff} r_{sd}) \quad (1.13)$$

Из измерений отраженного сигнала на разных расстояниях r_{sd} между волокнами и аппроксимации спектров отражения, используя (1.13), можно получить значения μ_a , μ_s . В работе [68] этот метод был применен для оценки насыщения крови кислородом путем аппроксимации полученной зависимости коэффициента поглощения ткани в БИК диапазоне от длины волны комбинацией спектров поглощения оксигенированного и деоксигенированного гемоглобина и других хромофоров.

Существенный недостаток приведенных выше аналитических решений в диффузном приближении является то, что в данном случае предполагается, что среда имеет однородные рассеивающие и поглощающие свойства. Данное предположение для кожи в общем случае не верно, так как она состоит из нескольких слоев с индивидуальными рассеивающими и поглощающими свойствами. Тем не менее, существует ряд полуколичественных подходов определения содержания воды и липидов по данным СДО вблизи локальных максимумов в БИК диапазоне излучения.

1.10. Обзор экспериментальных методов определения содержания воды и липидов с помощью СДО

Для идентификации поглощения воды в спектрах диффузного отражения кожи могут быть использованы локальные максимумы поглощения, находящиеся в БИК-диапазоне. В литературе наиболее часто встречается следующий подход для определения содержания воды и липидов в коже по данным СДО. Оценка осуществляется на основе коэффициента отражения (или эффективной оптической плотности) на двух–трёх длинах волн относительно значения оптической плотности на заданной длине волны, так называемой базовой линии. Данный подход позволяет также проводить молекулярный имиджинг (визуализацию) хромофоров с помощью мультиспектральных камер.

В работах [69,70] с помощью СДО, измеряемого с помощью приемопередающего волоконного зонда, производилась оценка содержания воды рогового слоя по линии поглощения воды вблизи 1450 нм. В [69] оценка

производилась на основе величины $\Delta OD(1450,1300) = OD(1450 \text{ нм}) - OD(1300 \text{ нм})$, где величина OD рассчитана по формуле (1.10) для каждой длины волны соответственно. А в работе [70] – из спектра оптической плотности с использованием линейной экстраполяции базовой линии на длинах волн 1280 – 1650 нм.

В работе [71] производились измерения мультиспектральной камерой в БИК-диапазоне. Для оценки содержания воды в коже использовалась разность эффективных оптических плотностей на длинах волн $1950 \pm 56 \text{ нм}$ и $1300 \pm 40 \text{ нм}$, также оценивалась концентрация жиров в коже по разности эффективных оптических плотностей света на длинах волн $1775 \pm 50 \text{ нм}$ и $1300 \pm 40 \text{ нм}$. Авторы отмечают, что оценка содержания воды в коже по оптической плотности в диапазоне от 1400 до 1500 нм не является репрезентативной, поскольку в этом же диапазоне находятся интенсивные линии поглощения С-Н липидов. В работе [72] аналогичным образом было произведено измерение распределения увлажненности кожи лица, был исследован вопрос сезонной увлажненности кожи и зависимость уровня увлажненности от влажности среды. В работе [52] увлажненность кожи оценивалась по разности оптической плотности на длинах волн 1450 ± 30 и $1060 \pm 30 \text{ нм}$.

В работе [41] измерение содержания воды в отеке, вызванном нанесением гистамина, производилось с помощью мультиспектральной камеры, и рассчитывался параметр $\Delta OD(970,850) = OD(970 \text{ нм}) - OD(850 \text{ нм})$. Эффективная оптическая плотность при 970 нм соответствует локальному максимуму поглощения воды, а длина волны 850 нм была выбрана, поскольку, как предполагалось, поглощение меланина, гемоглобина и воды на данной длине волны пренебрежимо мало. Но в рамках данной диссертационной работы было выяснено, что на оценку $\Delta OD(970,850)$ влияет изменения концентрации меланина и гемоглобина, а также изменения толщины дермы, что снижает точность измерения содержания воды при использовании данной формулы.

В работе [73] спектры поглощения восстанавливались на основе диффузного приближения, а затем аппроксимировались с учетом спектров поглощения гемоглобина, воды и липидов в диапазоне от 600 до 1050 нм. После чего определялось соотношение между липидами и водой, а также насыщенность кислородом тканей.

В работе [61] измерение воды проводилось с помощью двухволоконной схемы с различным расстоянием между волокнами в БИК диапазоне. Расстояние между ближайшими краями волокон (диаметры волокон составляли 133 и 300 мкм) было выбрано равным 30 и 32 мкм, что, по оценкам авторов статьи, соответствует глубине проникновения порядка 40 мкм для длины волны 1920 нм. В данной работе был использован метод частичных наименьших квадратов (PLS, partial least squares) для построения линейной регрессии по спектрам диффузного отражения, чтобы определить увлажненность кожи. Биоимпедасный метод использовался как референсный метод.

В работе [74] содержание воды в коже определялось с помощью приемо-передающего волокна (диаметр передающих волокон был 0.4 мм, диаметр принимающего – 0.8 мм). В качестве модельного объекта исследования была выбрана свиная кожа *ex vivo*, т.к. ее оптические свойства слабо отличаются от кожи человека. Измерения спектров отражения кожи свиньи проводились в диапазоне от 1300 до 2600 нм. Для оценки содержания воды были использованы значения спектров оптической плотности на длинах волн 1933 и 1459 нм, а также значения вторых производных на 1901 и 1406 нм. По этим данным строилась линейная регрессия, в которой в качестве выходных параметров использовалось содержание воды, измеренное с помощью гравиметрического метода, коэффициент корреляции между данными методами составил $R_{Pearson} = 0.98$, а коэффициент корреляции результатами СДО и методом, использующим биоимпедас, составил $R_{Pearson} = 0.75$.

Сильное поглощение ($\mu_a \sim 50 \text{ см}^{-1}$) в диапазоне 1400 – 2000 нм имеет свои недостатки для определения содержания воды в тканях, один из них – малая

глубина проникновения света (~ 100 мкм) [66], из-за чего основной вклад в спектр диффузного отражения вносят верхние слои кожи (в основном роговой слой и более глубокие слои эпидермиса). Хотя количественное определение степени гидратации этих слоев важно для дерматологии и косметологии, определение содержания воды в более глубоких слоях кожи (дерме и гиподерме) также представляет интерес, например, для оценки степени выраженности отечного синдрома. Детектирование сигнала от более глубоких слоев кожи возможно с использованием менее интенсивной полосы поглощения воды с положением максимума на $\lambda = 970$ нм ($\mu_a \sim 0.5 \text{ см}^{-1}$) [26]. Однако до сих пор не был изучен вопрос о возможности использования нескольких линий поглощения для получения дополнительной информации о распределении концентрации воды в коже, что было сделано в рамках данной работы в главе 2. Кроме того, в рамках данной работы в главе 3 было показано, что подход с использованием $\Delta OD(970,850)$ может привести к некорректным интерпретациям определения содержания воды в коже, так как данная величина зависит не только от концентрации воды, но и от толщины дермы.

В работах [9,10] предложена аналитическая модель, основанная на диффузном приближении, для оценки содержания воды, липидов, окси- и дезоксигемоглобина в биоткани при измерении спектров диффузного отражения на двух расстояниях:

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{1}{2(r_L - r_s)} \log_{10} \left(\left(\frac{I_{11}I_{22}}{I_{12}I_{21}} \right) \left(\frac{E_{12}E_{21}}{E_{11}E_{22}} \right) \frac{r_s^2}{r_L^2} \right) \quad (1.14)$$

где μ_a и μ'_s - коэффициенты поглощения и приведенного рассеяния исследуемого объекта; r_L , r_s – расстояния между волокнами 4 мм и 2 мм соответственно; I_{ij} – зарегистрированные отраженные спектры, скорректированные на фон для каждой комбинации источник-детектор (индексы $i=1,2$ и $j=1,2$ соответственно номерам источника и детектора); и E_{ij} – соответствующие времена накопления для каждого измерения. Пара измерений I_{11} и I_{22} соответствует расстоянию 2 мм, а пара I_{12} и I_{21} – 4 мм.

Ввиду того, что вода и липиды распределены в коже неравномерно, данная модель не подходит для количественного анализа их содержания.

Более сложные методы решения обратной задачи, т.е. определение оптических свойств различных слоев кожи из спектров диффузного отражения, используют подходы, основанные на численном решении уравнения переноса. Наиболее мощным и широко используемым методом для решения данной задачи является метод Монте-Карло. Далее будут рассмотрены подходы решения обратной задачи с использованием метода Монте-Карло.

1.11. Методы решения обратной задачи для многослойной среды

Задача описания распространения света в коже не имеет аналитического решения, пригодного для использования при произвольных расстояниях между источником и детектором излучения. Решение прямой задачи в том или ином виде необходимо для того, чтобы решить обратную задачу, а именно для анализа наблюдаемых спектров диффузного отражения и получения сведений о параметрах среды, в которой происходит распространение света. Часто для решения прямой задачи применяют моделирование распространения света с помощью метода Монте-Карло. Алгоритм метода для данной задачи описан в работе [19]. В процессе моделирования генерируется большое число фотонных пакетов ($10^6 \div 10^8$), после чего распространение каждого пакета описывается в соответствии со следующим алгоритмом. Алгоритм моделирования распространения фотонного пакета выбирает случайную длину свободного пробега и угол рассеяния с учетом параметров среды, в которой происходит распространение, после каждого перемещения фотонного пакета его амплитуда уменьшается на величину, пропорциональную коэффициенту поглощения среды. Такие перемещения повторяются многократно до тех пор, пока амплитуда фотонного пакета не уменьшится до пренебрежимо малой величины, либо фотонный пакет не покинет объем ткани, где он может быть зарегистрирован детектором (Рисунок 6).

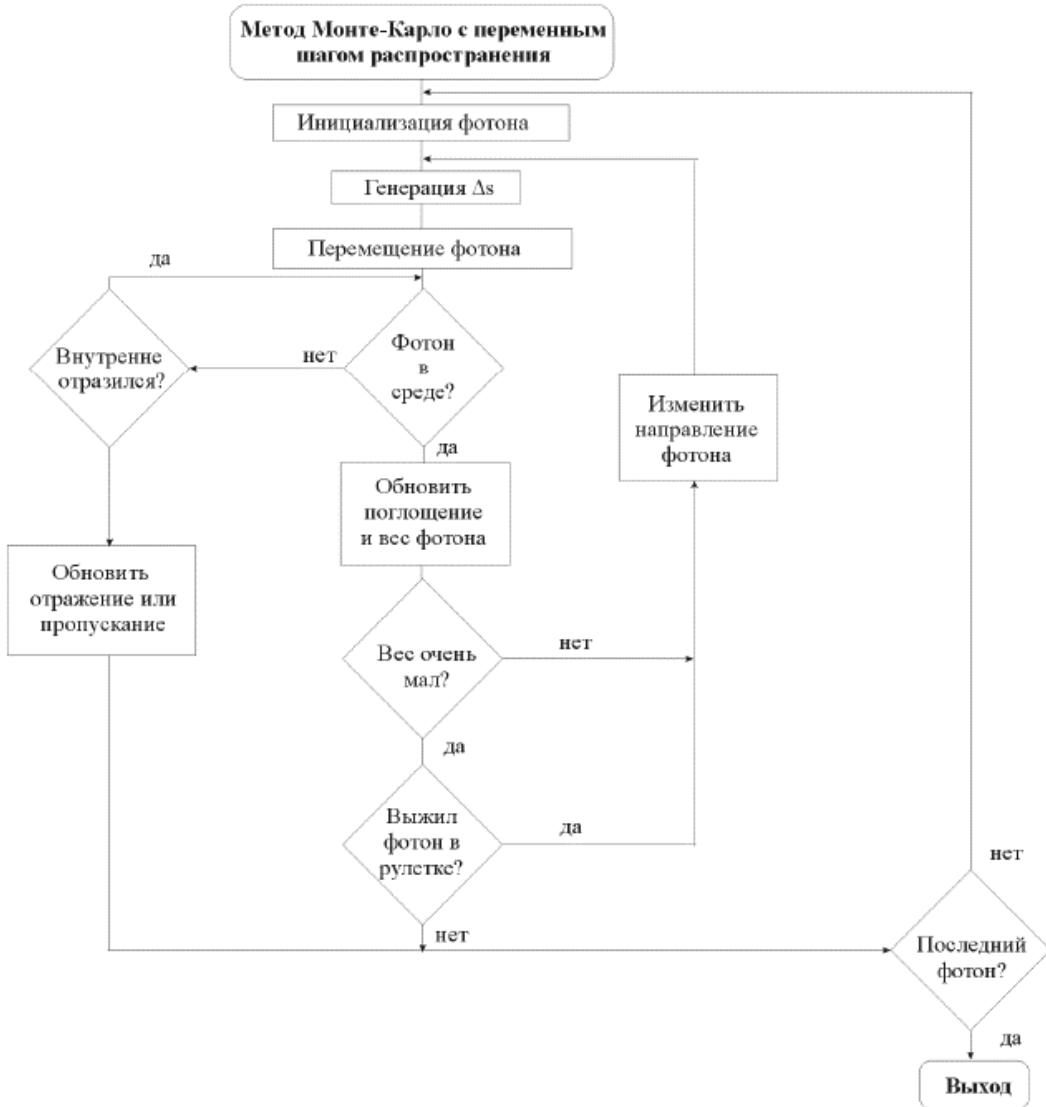


Рисунок 6 — Блок-схема статистического моделирования распространения фотонных пакетов методом Монте-Карло [63].

Для разработки метода решения обратной задачи требуется получить результаты моделирования прямой задачи распространения света для различных оптических параметров ткани. Основными параметрами модели рассеивающей среды являются коэффициенты рассеяния и поглощения – μ_s и μ_a , соответственно, а результатом вычисления являются коэффициенты отражения, полученные для разных расстояний между источником излучения и детектором r_{sd} .

В литературе известны несколько подходов решения обратной задачи, основанных на результатах моделирования Монте-Карло. Согласно [18],

определение показателей поглощения и рассеяния по спектрам диффузного отражения может быть проведено с помощью методов статистического (машинного) обучения с учителем (т.н. “Supervised learning”), т.е. функциональная зависимость между показателем поглощения и диффузного отражения ($\mu_a = g(R)$) восстанавливается из некоторого эмпирического набора данных.

Принципиальные шаги алгоритма нахождения коэффициентов поглощения с помощью статистического машинного обучения, следующие:

- 1) Производится измерение сигнала отражения от ткани при как минимум двух различных положениях детектора и источника (различном расстоянии между принимающим и передающим оптическими волокнами) для различных длин волн излучения.
- 2) Производится расчет коэффициентов диффузного отражения R для различных положений между детектором и источником (для различных расстояний между волокнами).
- 3) Величины диффузного отражения R “подаются на вход” статистической модели в качестве предикторов. Производится восстановление коэффициентов поглощения и рассеяния поглощения.
- 4) По известному сечению поглощения затем восстанавливается концентрация хромофора.

Другой подход определения концентрации хромофоров в коже в различных слоях кожи состоит в следующем.

- 1) Для некоторого диапазона концентраций хромофоров в коже рассчитываются спектры поглощения $\mu_a(\lambda; c_1, c_2, \dots, c_n)$ и рассеяния $\mu_s(\lambda; c_1, c_2, \dots, c_n)$, которые зависят от концентраций c_i соответствующих хромофоров в коже.
- 2) Для данного набора спектров поглощения и рассеяния с помощью метода Монте-Карло рассчитываются спектры диффузного отражения $\{R_{model}(\lambda; c_1, c_2, \dots, c_n)\}$.

3) Далее, используя набор данных моделирования, экспериментальные спектры диффузного отражения $R_{\text{exp}}(\lambda)$ аппроксимируются набором модельных спектров $\{R_{\text{model}}(\lambda; c_1, c_2, \dots, c_n)\}$ для определения концентраций хромофоров в коже c_1, c_2, \dots, c_n .

Данные подходы уже доказали свою способность определять содержание гемоглобина и меланина в тканях. Однако проблема определения воды *in vivo* с использованием этого метода ранее не рассматривалась. СДО также применялась для определения толщины слоев ткани в образцах *ex vivo* и оптических фантомах [75–77], что делает ее многообещающим методом определения свойств отдельных слоев кожи *in vivo*. Этот вопрос был рассмотрен в оригинальной части работы.

1.12. Оценка возможности определение содержания белков, липидов и воды в БИК спектральном диапазоне

Из литературных данных следует, что помимо высокого содержания воды в дерме (массовая концентрация 70% массовая) и липидов в гиподерме (массовая концентрация 90%) в коже содержится высокая концентрация белков в первую очередь в виде коллагена (40% в эпидермисе и 30% в дерме) [2]. Далее приведена оценена возможность определения содержания белков и липидов в коже по поглощению в БИК диапазоне.

Таблица 3. Структурные формулы молекул коллагена, липидов и других модельных систем, их рассчитанные молярные массы (M) и число связей C—H на молекулу N(C—H), максимум спектра поглощения в области полосы C—H, нормированный по массовой концентрации, а также максимум молярного спектра экстинкции в области полосы C—H, нормированный по числу связей C—H. Расчёты выполнены с использованием открытой базы данных [79].

Таблица адаптирована из работы [78].

Молекула	Структурная формула	M, г/моль	N(C-H)	ε_{max} , $10^{-5} \text{ см}^{-1}/(\text{г/л})$	ε'_{max} , $\text{см}^{-1}/(\text{моль/л})$
L-аланин	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$	89	4	2.2	0.005
Липиды	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$	870	100	6.1	0.004
Альбумин	$\text{C}_{123}\text{H}_{193}\text{N}_{35}\text{O}_{37}$	66 500	3 600	1.8	0.004
Коллаген	$\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_3\text{R}_2 \cdot (\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2\text{R})_n$	285 000	11 200	1.4	0.003

Для этого было проведено сравнение колебательных спектров модельных образцов белков, липидов и воды. На рисунке 7А изображены спектры КР молекул белков, липидов и воды. Обнаружено, что положение локального максимума C—H линии белков смещено относительно локального максимума C—H линии липидов на 63 см^{-1} . Это объясняет различную форму спектров поглощения данных молекул в БИК диапазоне. Таким образом для

коллагена характерный локальный максимум спектра поглощения в БИК, связанный с обертонами колебаний СН линии, расположен на длинах волн 910 нм, а для липидов на длине волны 930 нм (Рисунок 7Б).

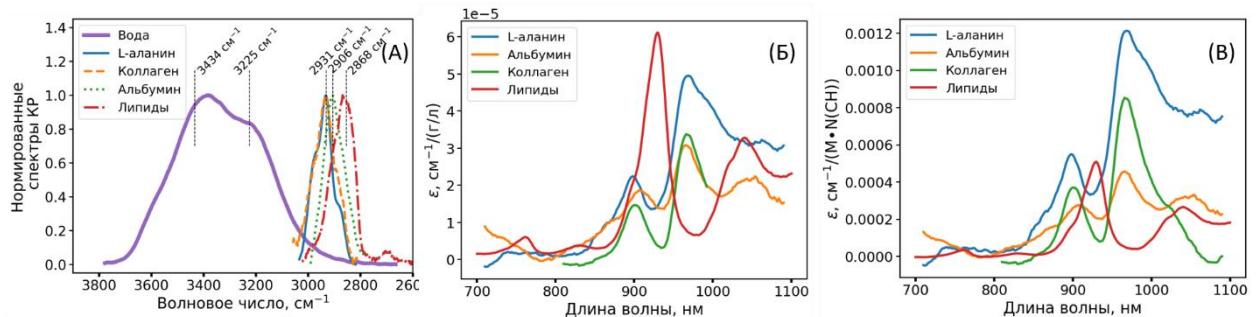


Рисунок 7 — А) Спектры КР l-аланина, альбумина, воды и липидов. В) Спектры поглощения l-аланина, альбумина, липидов и коллагена, нормированные на массовую концентрацию данных молекул. Г) Спектры молярной экстинкции l-аланина, альбумина, липидов и коллагена, нормированные на число связей С—Н данных молекул. Рисунок адаптирован из работы [78].

При этом амплитуда полосы поглощения С—Н линии для коллагена в 4 раза меньше по сравнению с липидами при одинаковой массовой концентрации данных молекул (Рисунок 7Б). В таблице 3 приведены молекулярные массы и оценки числа связей С—Н, а также коэффициентов молярной экстинкции для исследованных соединений на основании их структурных формул. Также по литературным данным проведена оценка количества СН связей на единицу молекулы для основных компонент кожи [79]. Спектры молярной экстинкции, нормированные на число связей С—Н, представлены на рисунке 7В. При этом удельные амплитуды полос

поглощения С-Н линий для коллагена и липидов, нормированные на количество связей С—Н, сопоставимы по величине. Таким образом значение амплитуды полосы поглощения СН линии для липидов, нормированная на массовую концентрацию, в 4 раза больше по сравнению амплитудой поглощения СН линии белков связано в первую очередь с тем, что количество СН связей в среднем для молекул липидов 4 раза больше, чем для молекул белков. Перекрытие спектров поглощения белков и липидов, а также высокое поглощение липидов в БИК по сравнению с белками затрудняет определение содержания белков в коже. Поэтому детектирование амплитуды поглощения белков в коже с учетом массовой концентрации данной молекулы в ней методом спектроскопии диффузного отражения возможно только при расстоянии между источником и детектором, на порядок превышающим толщину слоя гиподермы.

1.13. Обоснование трехслойной модели биоткани

По данным литературы можно выделить следующие слои кожи: эпидермис и дерма. Под дермой слой гиподермы и ниже – слой мышц. С точки зрения оптических свойств спектры поглощения и рассеяния для каждого слоя можно оценить по следующим формулам:

$$\mu_{a_i}(\lambda) = S_i B_i \mu_a^{\text{oxyHb}}(\lambda) + (1 - S_i) B_i \mu_a^{\text{deoxyHb}}(\lambda) + W_i \mu_a^{\text{water}}(\lambda) + M_i \mu_a^{\text{mel}}(\lambda) + F_i \mu_a^{\text{lipids}}(\lambda), \quad (1.15)$$

$$\mu'_{s_i}(\lambda) = \mu'_{s_i}(500 \text{ нм}) (f_i \left(\frac{\lambda[\text{нм}]}{500} \right)^{-4} + (1 - f_i) \left(\frac{\lambda[\text{нм}]}{500} \right)^{b_{Mie_i}}) \quad (1.16)$$

где индекс i определяет номер каждого слоя (эпидермис, дерма, гиподерма). Исходя из строения кожи и оптических свойств кожи и подкожных слоев [26]

можно рассчитать спектры поглощения и рассеяния для каждого слоя, а эффективную оптическую плотность каждого слоя оценить по формуле:

$$OD_{eff_i}(\lambda) = \mu_{eff_i} d_i, \quad (1.17)$$

Где μ_{eff_i} - рассчитаны по формулам (1.5), (1.15), (1.16) для каждого слоя, d_i - толщина каждого слоя.

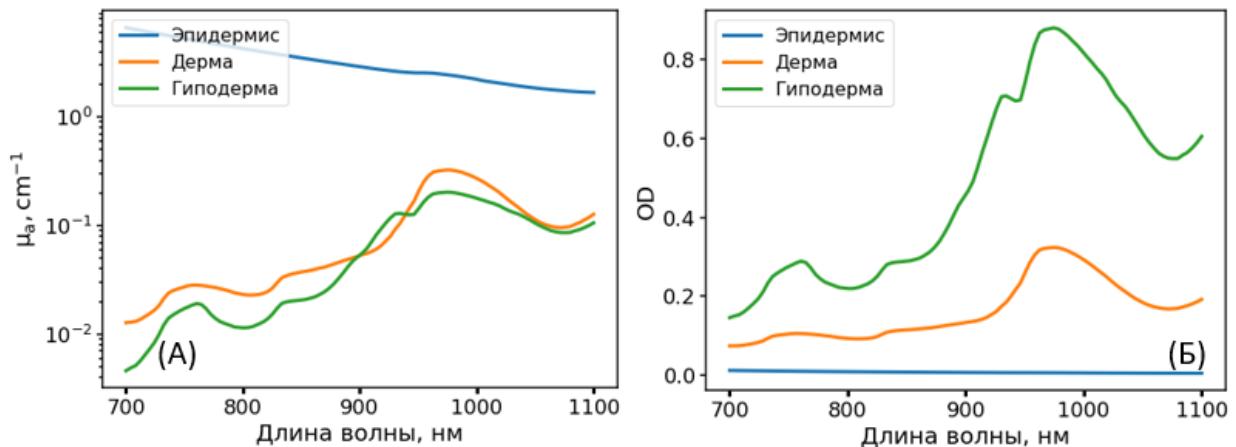


Рисунок 8 — А) Рассчитанные спектры поглощения эпидермиса, дермы и гиподермы. Б) Рассчитанные спектры оптической плотности для эпидермиса, дермы и гиподермы.

Результаты расчетов представлены на рисунке 8. Из данных расчетов видно, что эффективная оптическая плотность эпидермиса значительно меньше, чем у остальных слоев. Кроме того, в рамках данной работы освещение кожи источником света и измерение спектров диффузного отражения было проведено оптоволокнами с минимальным диаметром 550 мкм. При этом минимальное расстояние между центрами волокон источника и детектора составило 1.1 мм, что определяет минимальную глубину зондирования как ~ 0.5 мм.

Исходя из полученных оценок вклад, в отраженный сигнал верхнего слоя кожи (эпидермиса) в БИК пренебрежимо мал. Поэтому данный слой был исключен из рассмотрения при моделировании оптических свойств кожи. Так как одной из задач данной работы было определение толщины гиподермы

слоя, в рамках данной работы рассматривалась трехслойная модель биоткани: кожа, состоящая из дермы и гиподермы, и слой мышц.

1.14. Выводы

Определение параметров кожи, таких как концентрация воды и липидов, а также толщины различных слоев кожи, является важной диагностической задачей в различных областях медицины. Большое количество работ направлено на измерение содержания воды в коже оптическими методами, которые могут обеспечить молекулярный контраст и высокую чувствительность детектирования. СДО с пространственным разрешением в БИК диапазоне является подходящим методом для определения содержания воды и липидов в коже благодаря высокому значению глубины детектирования сигнала. СДО с пространственным основана на измерении спектров отражения на различных расстояниях от источника до детектора, что позволяет выполнять сканирование образца по глубине. Для решения обратной задачи, т.е. для определения параметров поглощения по данным спектров диффузного отражения, может быть использовано моделирование распространения света в многослойных системах методом Монте-Карло с последующей интерполяцией данных расчетов и методы машинного обучения. Данные подходы уже доказали свою способность определять содержание гемоглобина и меланина в тканях. Однако проблема определения воды *in vivo* с использованием этого метода ранее не рассматривалась. Кроме того, на сегодняшний день взаимосвязь между содержанием воды в коже и общим уровнем содержания воды в организме не изучена.

Целью диссертационной работы является разработка метода определения содержания воды и липидов и анализа распределения их по глубине в коже на основе СДО с пространственным разрешением.

Для достижения указанной цели в рамках настоящей работы были поставлены и решены следующие задачи:

1. С помощью СДО экспериментально исследовать оптический отклик оптических фантомов кожи *ex vivo* и кожи *in vivo* для различных конфигураций схемы детектирования сигнала диффузного отражения в БИК области спектра.
2. С помощью моделирования распространения света в коже методом Монте-Карло исследовать оптический отклик для различных реализаций метода СДО, а также изучить влияние распределения хромофоров в коже на ее оптический отклик.
3. Провести измерения кинетики содержания воды в коже *in vivo* при отечном синдроме с помощью СДО и сравнить результаты с данными, получаемыми с помощью спектроскопии КР и мультиспектральной визуализации.
4. Исследовать возможность определения пространственного распределения хромофоров в коже, а также определения толщин слоев кожи *in vivo* с помощью СДО с пространственным разрешением. Сопоставить полученные результаты с данными ультразвукового зондирования (УЗИ) как референсного метода.
5. Построить предиктивную модель для оценки общего уровня содержания липидов и воды в организме по спектрам диффузного отражения кожи, используя в качестве референсного метода мультиспектральный биоимпедансный анализ (МБА).

Глава 2. Сравнительный анализ методов количественного определения содержания воды в коже по данным СДО

В данной главе проводится анализ методов оценки содержания воды в коже, основанных на СДО в БИК диапазоне, а также их применение для исследования динамики содержания воды при отёке в коже. В главе используются материалы, опубликованные в статьях [A1, A2].

В первой части главы рассматриваются предиктивные свойства методов, оценивающих содержание воды в коже по спектральным характеристикам диффузного отражения вблизи линий поглощения молекул воды. На основе данных численного моделирования, измеренных данных СДО от фантомов кожи человека и данных из открытой базы спектров отражения кожи исследуется возможность использования различных локальных максимумов поглощения воды в БИК диапазоне для получения дополнительной информации о распределении концентрации воды в коже.

Во второй части главы проводится сравнительный анализ методов СДО, спектроскопии КР и мультиспектральной визуализации для определения содержания воды при отёке кожи, вызванном гистамином. Проводится измерение динамики содержания воды в коже в процессе увеличения отёка. Результаты показывают, что все используемые методы демонстрируют сходную динамику изменения содержания воды при гистамин-индуцированном отёке: наблюдается увеличение содержания воды, при этом максимальное содержание воды наблюдается через 1 час после нанесения гистамина на кожу, после чего происходит постепенное уменьшение. Однако наблюдаемое увеличение содержания воды, которое было измерено вышеперечисленными методами, отличаются между собой, что связано с особенностями детектирования оптического сигнала.

2.1. Объекты и методы исследования

2.1.1. Тестирование алгоритмов определения содержания воды по спектрам диффузного отражения

Для оценки точности различных способов расчета содержания воды по спектрам диффузного отражения в коже была использована открытая база данных спектров отражения кожи (Reference Data Set of Human Skin reflectance Национального института стандартов США, НИСТ). Эта база данных содержит 100 усредненных спектров диффузного отражения от кожи 100 добровольцев, измеренных в диапазоне 250 – 2500 нм в оптической конфигурации с использованием интегрирующей сферы. Коэффициент отражения в этом наборе данных представлен в процентах от интенсивности падающего света. Полное описание данных представлено в [24]. Отметим, что при анализе были обнаружены спектры с высоким содержанием меланина (большими значениями эффективной оптической плотности в диапазоне 600 – 700 нм). Эти данные (9 спектров) были исключены из рассмотрения при оценке погрешности различных способов расчета содержания воды в коже.

2.1.2. Численное моделирование спектров диффузного отражения

Для расчетов коэффициентов диффузного отражения кожи R было использовано моделирование распространения света в коже методом Монте-Карло. Для решения клинических задач по данным диффузного отражения кожи находят применение как модели с детальным представлением о структуре кожи [80], так и модели, не детализирующие структуру кожи [81]. В настоящей работе кожа моделировалась как однослойная полубесконечная среда с постоянными коэффициентами поглощения μ_a и рассеяния μ_s , а также с фиксированным значением фактора анизотропии рассеяния g . Выбор однородной модели, с одной стороны, огрубляет результаты для конкретного объекта, но при этом позволяет отступить от обсуждения морфологических особенностей кожи и получить общее качественное представление о более

широком классе объектов вне зависимости от деталей их структуры. Моделирование проводилось на сетке параметров μ_a и μ_s , коэффициент μ_a выбирался в интервале $0.1 - 20 \text{ см}^{-1}$ (100 значений на логарифмической сетке), коэффициент рассеяния μ_s , варьировался в диапазоне $100 - 2000 \text{ см}^{-1}$ (также 100 значений на логарифмической сетке), фактор анизотропии g не менялся, и его значение было выбрано равным 0.9. Моделирование методом Монте-Карло проводилось с использованием модифицированной версии программы GPU-MCML [25], адаптированной для расчетов на узлах GPU-кластеров на суперкомпьютере «Ломоносов» [82].

2.1.3. Приготовление оптических фантомов кожи

Оптические фантомы – объекты, имитирующие оптические свойства кожи. В качестве фантомов кожи человека использовались свежие участки кожи свиного уха площадью $2 \times 2 \text{ см}^2$. Данные участки кожи повторяют как морфологический, так и молекулярный состав кожи человека и, благодаря этому, имеют практически идентичные оптические свойства в используемом спектральном диапазоне [83]. Такие фантомы, например, часто применяются для тестирования косметологических средств, в том числе, с помощью оптических методов [84]. Образцы хранились при температуре $T = 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ для предотвращения естественного обезвоживания. Высушивание образцов проводилось при $T = 35 \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ и нормальном давлении. При таких условиях высушивания изменения массы образцов, соответствующие изменениям концентрации воды на 5%, наблюдались за время ~ 20 мин. Концентрация воды в образцах была рассчитана по формуле:

$$C = \frac{m(t) - m_{\text{dry}}}{m(t)} \cdot 100\%, \quad (2.1)$$

где $m(t)$ – масса образца в момент времени t ; m_{dry} – масса сухого образца, полученного после сушки в течение 40 ч.

2.1.4. Схема измерений спектров диффузного отражения

Для определения содержания воды в изготовленных фантомах применялась специально разработанная экспериментальная установка. В ней использовалась оптоволоконный зонд, состоящий из двух волокон из обезвоженного кварца с диаметром 600 мкм. При этом расстояние между ближайшими краями торцов составляло 1 мм. В одно из волокон заводился свет галогеновой лампы (с непрерывным спектром излучения в диапазоне 400 – 2500 нм), другое волокно было присоединено ко входу спектрометра (Maya 2000Pro, Ocean Optics, США). Референсным отражателем служило зеркало с серебряным покрытием. Спектры диффузного отражения $R(\lambda)$ был рассчитан по формуле:

$$R(\lambda) = \frac{I(\lambda) - I_{\text{dark}}(\lambda)}{I_{\text{ref}}(\lambda) - I_{\text{dark}}(\lambda)}, \quad (2.2)$$

где $I(\lambda)$ – спектр отраженного сигнала от образца, измеряемая спектрометром; $I_{\text{ref}}(\lambda)$ – спектр сигнала от референсного отражателя; $I_{\text{dark}}(\lambda)$ – интенсивность темнового шума спектрометра.

Спектры эффективной оптической плотности $OD(\lambda)$ рассчитывались по формуле (1.10).

2.2. Результаты

2.2.1. Анализ базы данных НИСТ

В первую очередь были проанализированы взаимные корреляции между содержанием воды, рассчитанным с использованием нескольких полос поглощения воды (на длинах волн λ_1 970, 1190, 1450 и 1920 нм) и референсных точек (на длинах волн λ_2 850, 1100 и 1300 нм). Расчет содержания воды проводился по формуле:

$$\Delta OD(\lambda_1, \lambda_2) = OD(\lambda_1) - OD(\lambda_2) \quad (2.3)$$

где λ_1 и λ_2 – длины волн полосы поглощения и базовой полосы, соответственно. Такой способ расчета был использован в работах [52, 71, 85]. Также использовался алгоритм с вычитанием прямой из спектров поглощения, которая пересекает спектр на длинах волн 1280 и 1650 нм, как это было сделано в работе [86]. Содержание воды было рассчитано для спектров эффективной оптической плотности, которые были рассчитаны по спектрам диффузного отражения базы данных НИСТ. Усредненный спектр по всей выборке, а также схемы, поясняющие методы расчетов величин $\Delta OD(\lambda_1, \lambda_2)$ содержания воды, представлены на рисунке 9Б. Было получено, что оценки содержания воды, рассчитанные с использованием полос поглощения на длинах волн $\lambda = 970$ и 1190 нм ($\Delta OD(970, 850)$ и $\Delta OD(1190, 1100)$) слабо коррелируют с оценками содержания воды, полученными с использованием $\Delta OD(1450, 1100)$ и $\Delta OD(1920, 1100)$. В то же время $\Delta OD(1450, 1100)$ и $\Delta OD(1920, 1100)$, а также величина $OD(1450)$, рассчитанная с учетом линейной экстраполяцией базовой полосы, имеют высокие ($R_{Pearson} > 0.9$) коэффициенты взаимной корреляции (Рисунок 9В–Д).

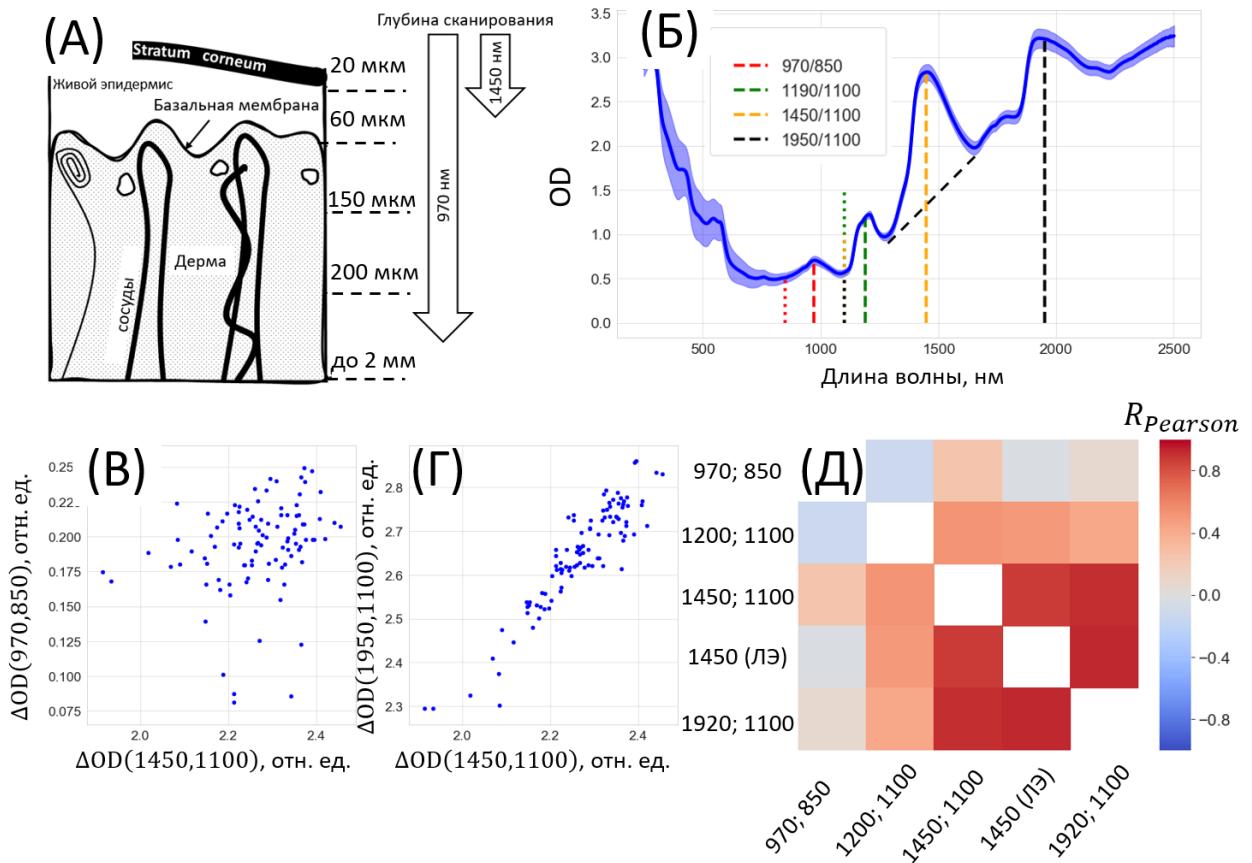


Рисунок 9 — А) Схематическое изображение слоев кожи: живой эпидермис, базальная мембрана и дерма. Б) Усредненный спектр и стандартное отклонение эффективной оптической плотности, рассчитанные с использованием базы данных спектров отражения кожи человека (вертикальные полосы указывают длины волн, использованные для расчетов содержания воды). В, Г) Зависимость значений амплитуд линий поглощения воды, рассчитанных по различным максимумам полос поглощения воды (каждая точка соответствует одному спектру отражения, измеренному *in vivo*). Д) Коэффициенты корреляции Пирсона $R_{Pearson}$ между значениями $\Delta OD(\lambda_1, \lambda_2)$, рассчитанными по различным полосам поглощения воды в БИК диапазоне спектра.

Отсутствие корреляций между амплитудами линий поглощения воды около длин волн 970 нм $\Delta OD(970,850)$ и 1450 нм $\Delta OD(1450,1100)$, может быть обусловлено двумя причинами. Во-первых, поскольку коэффициент поглощения воды на длине волны 970 нм на порядок меньше коэффициентов

поглощения других ИК полос, одинаковые изменения в коэффициентах рассеяния и концентрациях других хромофоров, которые также имеют поглощение в этом спектральном диапазоне, могут приводить к большей относительной погрешности при оценке содержания воды по полосе на длине волны 970 нм. Во-вторых, отсутствие корреляций может быть вызвано неоднородным распределением концентрации воды по различным слоям кожи, а также различной величиной толщины дермы для разных добровольцев. Действительно, известно, что содержание воды в верхних слоях кожи гораздо ниже (~20% по массе), чем в более глубоких слоях (~70% по массе). Поскольку глубина проникновения излучения на длинах волн 1450 и 1920 нм по порядку величины составляет ~100 мкм вместо ~3 мм для излучения на длине волны 970 нм, сигнал диффузного отражения детектируется от различных слоев кожи. Для проверки указанных гипотез были рассчитаны величины $\Delta OD(\lambda_1, \lambda_2)$ для спектров диффузного отражения, смоделированных методом Монте-Карло.

2.2.2. Моделирование спектров диффузного отражения с помощью метода Монте-Карло

Были сгенерированы два набора данных (100 спектров в каждом): в первом наборе варьировались концентрация воды и коэффициент рассеяния, во втором одновременно изменялись концентрации воды и оксигемоглобина, а также коэффициент рассеяния, в то время как концентрации других компонентов (дезоксигемоглобина и меланина) оставались постоянными. На рисунке 10А представлены спектры диффузного отражения, в которых изменяется коэффициент рассеяния, при этом концентрация воды и гемоглобина была зафиксирована. На рисунке 10Б представлены спектры диффузного отражения, в которых варьировалась концентрация гемоглобина, при этом концентрация воды и коэффициент рассеяния не изменялся. Спектральная зависимость коэффициента рассеяния для кожи была взята из [2], параметры рассеяния варьировались при отклонении до 10% от их средних

значений. Для расчета спектров была использована однослойная модель кожи с толщиной слоя, сильно превышающей среднюю глубину проникновения света, распределение хромофоров в слое предполагалось однородным. Для смоделированных спектров применялись способы расчета содержания воды, использованные для расчетов по базе данных НИСТ. Для рассчитанных спектров аналогично были вычислены значения содержания воды по формуле (2.3). Были построены зависимости данных величин от концентрации воды, заложенной в модель (Рисунок 10В). Для этих зависимостей рассчитывались коэффициенты корреляции. Из рисунка 10Г (синие столбцы) видно, что для первой серии спектров методы расчета содержания воды с использованием локальных максимумов поглощения при длинах волн 1450 и 970 нм имеют одинаковую точность (оцененную по коэффициенту детерминации R^2). Было получено также, что значения $\Delta OD(1450,1100)$ и $\Delta OD(970,850)$ хорошо коррелированы между собой, поскольку они коррелированы со значением концентрации воды, заложенным в модель.

Во втором сгенерированном наборе данных, где одновременно изменялось несколько параметров: концентрация воды, параметры рассеяния и концентрация оксигемоглобина, точность оценки содержания воды по величине $\Delta OD(970,850)$ снизилась, тогда как точность оценки содержания воды по $\Delta OD(1450,1100)$ осталась практически неизменной. Это связано с тем, что максимум полосы поглощения воды при 970 нм перекрывается с длинноволновым краем полосы поглощения оксигемоглобина. В результате значение $\Delta OD(970,850)$ может ошибочно коррелировать с концентрацией оксигемоглобина, хотя эта корреляция и менее значима, чем корреляция величины $\Delta OD(970,850)$ с концентрацией воды. Тем не менее, даже при вариации коэффициента рассеяния и концентрации гемоглобина, оцененная концентрация воды продолжает коррелировать с истинной концентрацией, установленной в модели.

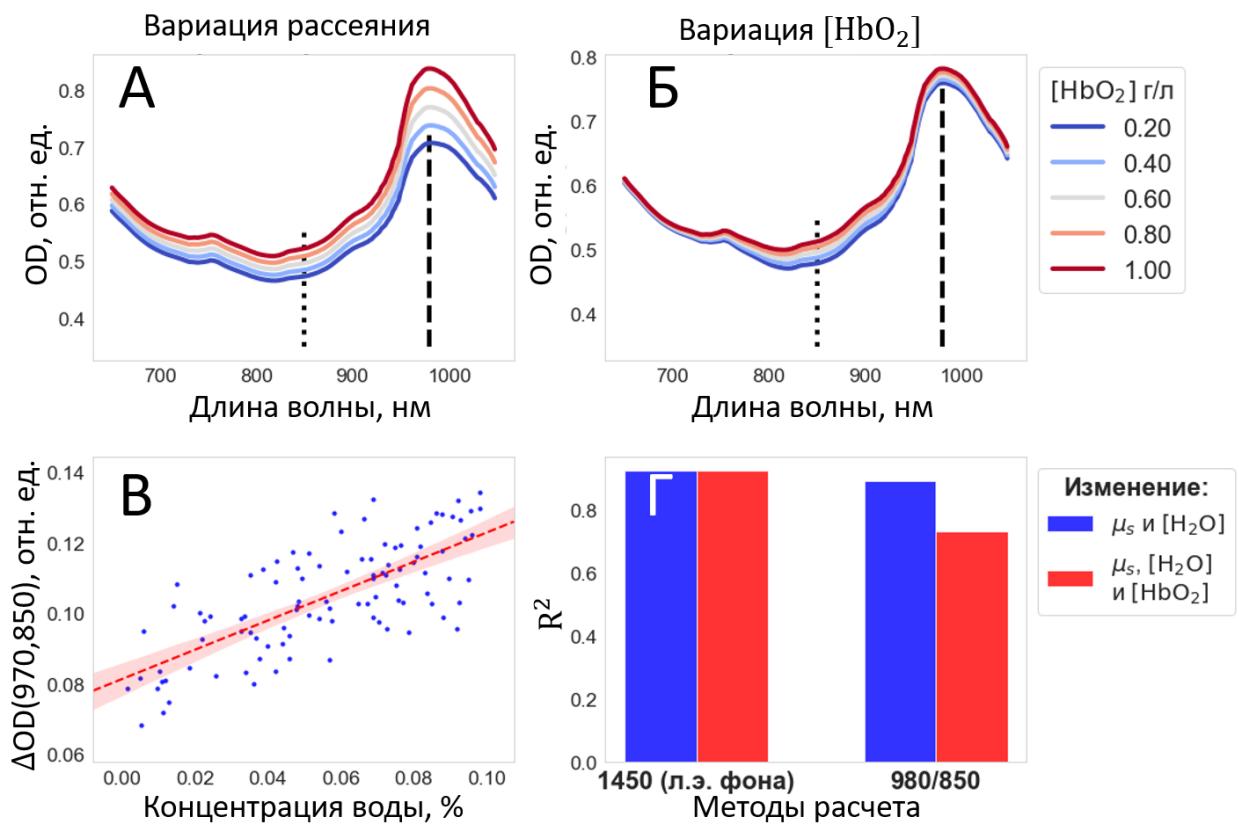


Рисунок 10 — А) Спектры диффузного отражения, рассчитанные методом Монте-Карло при различных коэффициентах рассеяния. Б) Спектры диффузного отражения, рассчитанные методом Монте-Карло при различных концентрациях оксигемоглобина HbO₂. В) Корреляция между значением $\Delta OD(970,850)$, и концентрацией воды, заданной при расчёте модельных спектров, при варьируемом коэффициенте рассеяния. Г) Значения квадрата коэффициента корреляции R^2 , вычисленные для пар значений концентрации воды, заложенной в модельный спектр и рассчитанной через оценку концентрации по величине $\Delta OD(970,850)$, для двух наборов данных: с одновременным изменением концентрации воды и коэффициента рассеяния (синие столбцы), а также с одновременным изменением концентрации воды, оксигемоглобина и коэффициента рассеяния (красные столбцы).

Таким образом, существует корреляция между значениями $\Delta OD(\lambda_1, \lambda_2)$, рассчитанными по спектрам отражения на длинах волн 1450 нм и 970 нм. Однако в экспериментально измеренных спектрах из базы данных НИСТ величины $\Delta OD(970,850)$ и $\Delta OD(1450,850)$ не коррелируют между собой. Это

позволяет заключить, что отсутствие данной корреляции на экспериментальных данных, объясняется неоднородным распределением воды в разных слоях кожи, что приводит к отсутствию корреляции между реальными значениями её концентрации. Моделирование показывает, что при постоянной концентрации оксигемоглобина оценить содержание воды в глубоких слоях кожи можно на основе простых расчетов величины $\Delta OD(970,850)$. Это предположение было подтверждено при анализе экспериментальных спектров из базы данных НИСТ.

Таким образом, неоднородность распределения воды в коже объясняет отсутствие корреляции между концентрациями воды, оцененными по длинам волн 970 нм и 1450 нм на основе экспериментальных данных.

2.2.3. Измерения спектров диффузного отражения на оптических фантомах кожи

Моделирование демонстрирует что, если концентрация оксигемоглобина остается постоянной, оценка концентрации воды в глубоких слоях кожи может быть осуществлена на основе простейших расчетов величины $\Delta OD(970,850)$. Это предположение было проверено экспериментально на фантомах кожи человека.

В качестве таких фантомов использовались участки свиной кожи *ex vivo*. Для изменения концентрации воды в образцах фантомы высушивались при температуре 40 °C и нормальном давлении. Спектры диффузного отражения были измерены с использованием двухволоконной схемы в диапазоне 500–1100 нм. На рисунках 11(А),(Б) представлены спектры диффузного отражения и эффективной оптической плотности, оцененной из спектров отражения по формуле (2.1) с использованием локального максимума поглощения воды около 970 нм, для фантомов с различной концентрацией воды. Из рисунка 10(А) видно, что спектры диффузного отражения в среднем сильно варьируются из-за изменений коэффициента рассеяния.

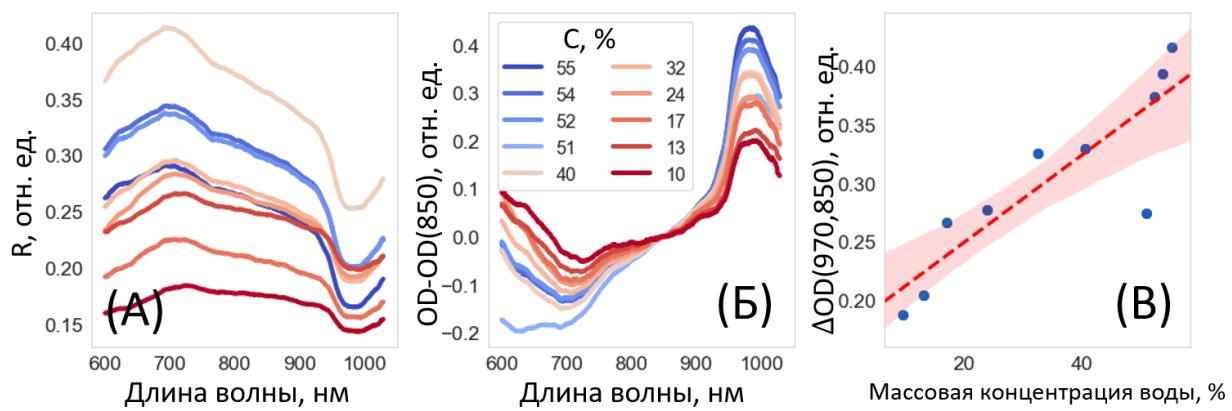


Рисунок 11 — А) Спектры диффузного отражения R фантомов кожи человека с различным содержанием воды. Б) Спектры оптической плотности фантомов кожи с различным содержанием воды, скорректированные по базовой полосе ($\lambda = 850$ нм). В) Зависимость индекса содержания воды $\Delta OD(970,850)$, рассчитанного по максимуму поглощения на длине волны 970 нм, от массовой концентрации воды C в фантомах. Коэффициент корреляции между $\Delta OD(970,850)$ и C составляет 0.76.

Тем не менее, даже при сильной вариации спектров отражения, отчетливо наблюдается уменьшение локального максимума поглощения воды на длине волны 970 нм (рисунок 11(Б)). На рисунке 11(В) четко прослеживается зависимость величины $\Delta OD(970,850)$ от массовой концентрации воды в фантомах кожи, вычисленной по формуле (2.1). Это подтверждает гипотезу о том, что полоса поглощения воды на длине волны 970 нм подходит для количественной оценки содержания воды. Отметим, что помимо оксигемоглобина на определение концентрации воды в коже с помощью величины $\Delta OD(970,850)$ также может влиять повышенное содержание меланина в коже. В рамках настоящей работы влияние меланина не учитывалось: при анализе базы данных НИСТ такие спектры исключались из выборки, а при моделировании концентрация меланина оставалась постоянной. Повышенное содержание меланина действительно может влиять на количественную оценку содержания воды. Тем не менее, при определении содержания воды можно ввести корректировку на содержание меланина в

коже с использованием информации о его вкладе в спектр диффузного отражения на длинах волн от 600 до 700 нм, как это, например, сделано для определения концентрации гемоглобина в коже в работе [87]. Для верификации практической применимости метода с помощью установки, используемой для измерения спектра фантомов кожи, были проведены эксперименты по измерению динамики изменения концентрации воды в коже по полосе поглощения воды на длине волны 970 нм (Рисунок 12). Измерения проводились на выборке добровольцев (10 человек в возрасте 19–25 лет) во время кардиотренировки длительностью 90 мин. В ходе эксперимента для каждого участника были измерены спектры диффузного отражения кожи внутренней стороны предплечья до, во время (спустя $t = 45$ мин после начала) и после (спустя 90 мин) тренировки, прием жидкости добровольцами при этом не возбранялся. Измерения выполнялись с помощью волоконного зонда, состоящего из двух оптоволокон. Расстояние между торцами волокон составляло 2 мм. Для каждого измерения проводилась запись трех-четырех спектров отражения для усреднения определяемых величин.

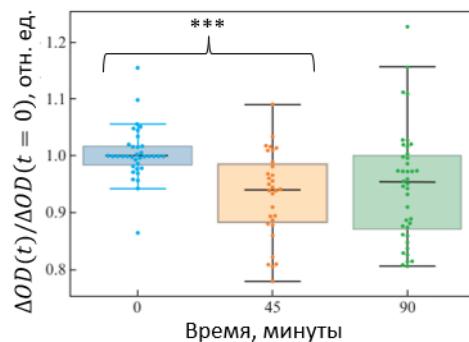


Рисунок 12 — Значения величин $\Delta OD(970,850)$ по группе добровольцев в ходе тренировки, нормированные на значение, измеренное до начала тренировки ($\Delta OD (t = 0)$). Центральные горизонтальные полосы соответствуют медианам распределений, горизонтальные стороны прямоугольников отвечают границам первого и третьего квартилей распределений, а горизонтальные верхние и нижние полосы – полуторному значению интерквартильного размаха. Точки – экспериментально измеренные значения ΔOD .

Значения $\Delta OD(970,850)$, определяемые в эксперименте, для разных добровольцев существенно различались, поэтому для сравнения динамики они нормировались на медианные значения $\Delta OD(970,850)$ для каждого добровольца до физических нагрузок ($\Delta OD(970,850)$ ($t = 0$)). Видно, что имеет место значимое ($p_{value} = 3 \cdot 10^{-6}$) уменьшение среднего относительного содержания воды в коже, связанное с дегидратацией организма в результате физических нагрузок.

2.3. Влияние неоднородного распределения концентрации воды в коже на спектры СДО

Было проведено сравнение простейших алгоритмов определения содержания воды в коже по данным спектроскопии диффузного отражения на основе открытой базы данных спектров диффузного отражения кожи человека НИСТ и численно рассчитанных спектров диффузного отражения однородной модели кожи. В результате проведенного анализа было выявлено, оценки содержания воды в коже, выполненные с использованием интенсивных полос поглощения воды на длинах волн 1450 ($\mu_a = 33 \text{ см}^{-1}$ [26]) и 1920 нм ($\mu_a = 132 \text{ см}^{-1}$ [26]), хорошо коррелирует между собой, и при этом слабо коррелируют с оценками, сделанными по локальному максимуму поглощения на длине волны 970 нм ($\mu_a = 0.5 \text{ см}^{-1}$ [26]), что связано с различной глубиной проникновения света на указанных длинах волн и неоднородным распределением концентрации воды в различных слоях кожи. Установлено также, что количественная оценка содержания воды по полосы поглощения на длине волны 970 нм подвержена влиянию изменений концентрации оксигемоглобина из-за наложения спектров поглощения оксигемоглобина и воды в диапазоне 800 – 1000 нм. Несмотря на это, локальный максимум поглощения воды на длине волны $\lambda = 970$ нм может быть использован для определения содержания воды в глубоких слоях кожи, что экспериментально подтверждено на фантомах кожи человека. Эксперимент с добровольцами при использовании описанного метода указывает на возможность его применения

для контроля содержания воды в тканях в ходе тренировки и при других интенсивных физических нагрузках с целью предотвращения обезвоживания организма. Далее был проведен сравнительный анализ методов СДО, спектроскопии КР и мультиспектральной визуализации для определения содержания воды при отёке кожи, вызванном гистамином.

2.4. Сравнительный анализ методов количественного определения содержания воды в коже по данным спектроскопии диффузного отражения

2.5. Объекты и методы исследования

2.5.1. Модели отека кожи: нанесение гистамина и венозная окклюзия

Чтобы сравнить эффективность методов оптической спектроскопии для оценки содержания воды при отеке кожи, использовались две модели, в которых значительно изменяется содержание воды. В первой модели использовался гистамин, что вызывало расширение капилляров и, как следствие, отек кожи. Данная модель ранее использовалась для тестовых измерений содержания воды оптическими методами, а именно мультиспектральной визуализацией [41], конфокальной микроскопией и капилляроскопией ногтевого ложа [49,50]. Нанесение гистамина позволяет визуально выявить участки кожи с повышенным содержанием воды. Поэтому данная модель хорошо подходит для сравнительных исследований различных методов спектроскопии. Для формирования отека водный раствор 5 мг/мл гистамина наносили на кожу предплечья руки площадью $2 \times 2 \text{ см}^2$ четырем здоровым добровольцам с помощью ионофореза. Измерения, проведенные на добровольцах, привели к аналогичным результатам. Поэтому, экспериментальные результаты только для одного из добровольцев обсуждаются более подробно. Процедура нанесения длилась 2 минуты, после чего излишки раствора гистамина удаляли с поверхности кожи путем промокания бумажной салфеткой. Измерения вышеперечисленными методами спектроскопии проводились каждые 30 минут в течение 300 минут

после нанесения гистамина. В каждой серии экспериментов измерения всеми тремя методами проводились последовательно на одном и том же участке кожи. Время начала каждой серии фиксировалось и учитывалось при обработке данных.

Второй моделью отека кожи, используемой в данной работе, была венозная окклюзия. Давление 100 мм рт. ст. нагнеталось вручную на предплечье добровольца с помощью манжеты манометра и выдерживалось в течение 10–15 минут. Венозная окклюзия вызывает избыточное давление в кровеносных сосудах и вызывает вытеснение жидкости из них, что приводит к локальному отеку кожи. Измерения методами спектроскопии проводились за 5 мин до начала окклюзии, во время окклюзии и через 5 мин после нее. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом Медицинского научно-образовательного института МГУ им. М.В. Ломоносова. Информированное согласие было получено от всех лиц, участвующих в исследовании.

2.5.2. Измерения спектров диффузного отражения

Измерения спектров диффузного отражения проводились в двух спектральных областях: от 400 до 1100 нм и от 1100 до 1400 нм. В качестве источника света в обоих случаях использовалась галогеновая лампа. Для спектрального диапазона от 400 до 1100 нм измерения проводилось оптоволоконным зондом, который состоял из двух оптоволокон диаметром 600 мкм. Расстояние между центрами оптоволокон составляло 2.6 мм. Одно из оптоволокон присоединялось к источнику света, второе использовалось для регистрации отраженного сигнала от кожи и присоединялось к спектрометру Maya2000Pro (OceanOptics, США). Для измерений в спектральном диапазоне 1100–1400 нм расстояние между центрами волокон было установлено равным 1.7 мм. Для регистрации отраженного сигнала использовался спектрометр TroSpec (Троицкий инженерный центр, Россия). Перед каждой серией экспериментов проводилось измерение сигнала от референсного отражателя

$I_{ref}(\lambda)$ и темнового шума спектрометра $I_{dark}(\lambda)$. Расчет спектров диффузного отражения $R(\lambda)$ был произведен по формуле (2.2). Спектры эффективной оптической плотности $OD(\lambda)$ рассчитывались по формуле (1.10) и были использованы для анализа.

Содержание воды рассчитывалось по спектрам эффективной оптической плотности с использованием локальных максимумов с центром при 970, 1190 и 1450 нм (рисунок 3). Следующие значения были рассчитаны для оценки содержания воды в коже с использованием полосы поглощения 970 нм:

- 1) Величина $\Delta OD(970,850)$, рассчитанная по формуле (2.3). Данная величина также использовалась в работе [6] для оценки содержания воды при отеке кожи с помощью мультиспектральной визуализации, а также в первой части главы данной работы.
- 2) Амплитуда полосы поглощения воды при 970 нм, полученная с помощью линейной интерполяции фона в областях спектра 700–720 и 1050–1070 нм (ΔOD^{LE}_{970}). Данная линейная интерполяция позволяет учитывать рассеяние и поглощение других хромофоров в данном спектральном диапазоне, таких как окси- и дезоксигемоглобина.
- 3) Амплитуда полосы поглощения воды, полученная из аппроксимации спектра эффективной оптической плотности линейной комбинацией спектров поглощения воды и липидов в диапазоне 850–1050 нм. Отек, вызванный гистамином, сопровождается эритемой, то есть повышением концентрации гемоглобина. Концентрацию окси- и дезоксигемоглобина можно оценить по их характерным пикам около 560 нм и вычесть их вклад в БИК области. В данной работе представлены результаты с вычтеною оценкой вклада гемоглобина.

Для спектров диффузного отражения, измеренных в диапазоне от 1100 до 1400 нм, оценку содержания воды проводилась с использованием

аппроксимации спектров эффективной оптической плотности линейной комбинацией спектров поглощения воды и липидов в данном спектральном диапазоне.

2.5.3. Спектроскопия комбинационного рассеяния

Лазер с длиной волны 690 нм (FC-690, Changchun New Industries Optoelectronics Tech. Co., КНР) использовался в качестве источника возбуждения при измерении спектров КР кожи. Лазерное излучение фокусировалось в волокно диаметром 900 мкм, которое прикладывалось к поверхности кожи. Оптический отклик образца регистрировался по тому же волокну и измерялся на спектрометре Ventana (Ocean Optics, США) в диапазоне 800–1000 нм. Мощность лазера на поверхности кожи составляла 30 мВт. Интенсивности колебательных полос С-Н (I_{CH}) и О-Н (I_{OH}) рассчитывались путем вычитания фона флуоресценции из необработанного спектра с использованием линейной интерполяции в диапазонах от 855 до 875 нм (для полосы С-Н липидов) и от 875 до 920 нм (для полосы О-Н воды). Спектры КР при отеке, вызванном гистамином, измерялись для четырех добровольцев. Каждое измерение выполнялось как сканирование области отека в течение 30–40 секунд, при этом время накопления при измерении каждого спектра составляло 500 мс. После сканирования спектры усреднялись, и рассчитывались интенсивности колебательных полос О-Н и С-Н, а также их отношение.

2.5.4. Мультиспектральная визуализация

Мультиспектральная визуализация проводилась в трех спектральных диапазонах: без фильтров, с полосовыми фильтрами 845–855 нм и 965–975 нм (Thorlabs, США). Освещение поверхности кожи осуществляли двумя галогеновыми лампами мощностью 50 Вт. Изображения регистрировались с помощью монохромной ПЗС-камеры DCC1545M (Thorlabs, США) и

объектива MVL35M23 (Thorlabs, США). Перед объективом устанавливали диэлектрические фильтры FB850-10, FB970-10 (Thorlabs, США).

2.5.5. Моделирование распространения света в коже методом Монте-Карло

Программное обеспечение, реализующая метод Монте-Карло (mcxyz.c) [88], использовалось для моделирования распространения света в трехмерных гетерогенных тканях и оценки глубины зондирования света описанных выше конфигураций и методов. Кожа моделировалась на трехмерной декартовой сетке, в которой находилось $N_x \times N_y \times N_z = 200 \times 200 \times 200$ вокселя с линейным размером вокселя, равным 30 мкм. В качестве модели использовалась кожа, состоящая из трех горизонтальных слоев: эпидермиса (толщина 60 мкм), дермы (толщина 2.5 мм) и гиподермы (занимала остальную часть куба 3.44 мм). Коэффициент поглощения каждого слоя μ_a для разных длин волн рассчитывался как линейная комбинация коэффициентов поглощения основных хромофоров кожи: оксигенированного и деоксигенированного гемоглобина, воды, меланина и гиподермы:

$$\mu_a = SB\mu_a^{\text{oxyHb}} + (1 - S)B\mu_a^{\text{deoxyHb}} + W\mu_a^{\text{water}} + M\mu_a^{\text{mel}} + F\mu_a^{\text{adipose}} \quad (2.4)$$

где B — объемная доля крови в данном слое, S — оксигенация крови, W — объемная доля воды, M — содержание меланина, оцениваемое как объемная доля меланосом, F — объемная доля липидов и $\mu_a^{\text{oxyHb}}, \mu_a^{\text{deoxyHb}}, \mu_a^{\text{water}}, \mu_a^{\text{mel}}, \mu_a^{\text{adipose}}$ — коэффициенты поглощения оксигенированного и деоксигенированного гемоглобина, воды, меланина и липидов, соответственно [26]. Приведенный коэффициент рассеяния μ'_s каждого слоя для соответствующей длины волны λ был рассчитан с использованием следующего приближения:

$$\mu'_s(\lambda) = \mu'_s(500 \text{ нм}) \left(f \left(\frac{\lambda[\text{нм}]}{500} \right)^{-4} + (1 - f) \left(\frac{\lambda[\text{нм}]}{500} \right)^{b_{\text{Mie}}} \right) \quad (2.5)$$

где $\mu'_s(500 \text{ нм})$ — приведенный коэффициент рассеяния на длине волны 500 нм, f — доля вклада рэлеевского рассеяния в общий спектр рассеяния, а b_{Mie} — показатель степени зависимости, описывающей рассеяние Ми в конкретном слое. Анизотропия рассеяния моделировалась с помощью функции Хени-Гринштейна с фактором анизотропии рассеяния равным $g = 0.9$. Для моделирования поглощающих и рассеивающих свойств эпидермиса использовались следующие параметры: $B = 0$, $W = 0.5$, $M = 0.025$, $F = 0$, $\mu'_s(500 \text{ нм}) = 66.7 \text{ см}^{-1}$, $f = 0.29$ и $b_{\text{Mie}} = 0.689$. Оптические свойства дермы моделировали, используя следующие параметры: $B = 0.002$, $S = 0.67$, $M = 0$, $F = 0$, $\mu'_s(500 \text{ нм}) = 48 \text{ см}^{-1}$, $f = 0.41$ и $b_{\text{Mie}} = 0.562$. А объемная доля W в дерме варьировалась в пределах от 0.5 до 0.9 с шагом 0.05. Для моделирования свойств гиподермы были выбраны следующие параметры: $B = 0$, $M = 0$, $W = 0.4$, $F = 0.6$, $\mu'_s(500 \text{ нм}) = 15.4 \text{ см}^{-1}$, $f = 0$ и $b_{\text{Mie}} = 0.68$. Выбор значений данных параметров основан на обзорах оптических свойств тканей [26]. Распространение света в тканях моделировалось для четырех различных конфигураций источника-детектора:

1) Конфигурация 1

Моделирование первой конфигурации источника и детектора было сделано для оценки отклика и глубины зондирования двухволоконного зонда, используемого для оценки содержания воды в коже по коэффициенту диффузного отражения в диапазоне от 800 до 1000 нм. Для моделирования такой конфигурации источник-детектор использовался радиальный пучок диаметром 600 мкм с интенсивностью, равномерно распределенной по площади источника, и начальными траекториями фотонных пакетов, направленными ортогонально поверхности кожи. Для оценки глубины зондирования регистрируемого излучения детектор моделировался как площадка диаметром, равным диаметру падающего луча (диаметр составлял 600 мкм), при этом расстояние между центрами областей источника и

детектора составляло 2.6 мм. Для этой конфигурации проведен расчет коэффициентов поглощения и рассеяния при длинах волн 850 и 970 нм.

2) Конфигурация 2

Во второй конфигурации “источник-детектор” моделировалось распространение света в коже с помощью двухволоконного зонда с расстоянием между волокнами 1.7 мм и диаметром волокон 600 мкм. Эта конфигурация использовалась для оценки содержания воды в спектральной области от 1100 до 1400 нм. В качестве источника и детектора использовался радиальный пучок диаметром 600 мкм, при этом расстояние между центрами областей источника и детектора составляло 1.7 мм. Для этой конфигурации были проведены расчеты для длин волн 1050 и 1200 нм.

3) Конфигурация 3

В третьей конфигурации моделировалось измерение КР сигнала от кожи. В данной конфигурации источник моделировался как радиальный пучок диаметром 900 мкм. При этом расположение детектора совпадало с расположением источника. Для этой конфигурации траектории фотонных пакетов возбуждающего излучения моделировались на длине волны 690 нм, а регистрируемые фотоны моделировались с параметрами, соответствующими длине волны 870 нм (сдвиг КР $\sim 3000 \text{ см}^{-1}$).

4) Конфигурация 4

Для оценки глубины зондирования тканей при мультиспектральной визуализации поверхность моделируемого объема кожи равномерно освещалась. Для этой конфигурации были проведены расчеты для длин волн 850 и 970 нм.

Функция плотности вероятности детектирования фотонов для всех конфигураций оценивалась как произведение плотности потока фотонов, приходящих из области источника, на плотность потока фотонов, приходящих

в область детектора. Каждое моделирование проводилось для 10^7 фотонных пакетов.

2.6. Определение содержания воды с помощью СДО, спектроскопии КР и мультиспектральной визуализации

2.6.1. Оценка глубины зондирования с помощью метода Монте-Карло

В данной работе количественная оценка содержания воды в коже проводилась с использованием нескольких экспериментальных установок, реализующих молекулярно-чувствительные методы определения содержания воды: СДО, КР спектроскопия и мультиспектральная визуализация. Важным шагом здесь была оценка глубины зондирования, с которой собирается сигнал, чтобы убедиться, что различные зонды регистрируют свет из одного и того же объема и одного и того же слоя кожи. Для этого было проведено моделирование распространения света в коже, используя подход Монте-Карло для упомянутых экспериментальных конфигураций источников и детекторов, и рассчитана пространственная плотность вероятности регистрации фотонных пакетов для данных конфигураций. Пунктирные полосы на рисунках 13(А-В) обозначают медианную глубину зондирования, то есть максимальную глубину, которую достигают 50% испускаемых источником фотонных пакетов, достигших детектора. Медианная глубина зондирования для двухволоконного зонда с расстоянием между волокнами 1.7 мм составила 0.6 мм (рисунок 13(А)). Этот зонд используется для оценки содержания воды по полосе поглощения воды с центром на длине волны 1190 нм. Медианная глубина зондирования, равная 0.3 мм, была получена для одноволоконного зонда, моделирующего измерения КР сигнала. Медианная глубина зондирования, равная 0.6 мм, наблюдалась для мультиспектральной схемы визуализации (рисунок 13(В)). Медианная глубина зондирования для двухволоконного зонда с расстоянием между волокнами 2.6 мм на длине волны 970 нм составила 0.9 мм. На рисунке 13(Г) показаны одномерные распределения фотонных пакетов для представленных выше конфигураций

“источник-детектор”, которые были усреднены вдоль координат x и y . Данное одномерное распределение позволяет оценить глубину зондирования кожи (вдоль координаты z). Видно, что большая часть траекторий фотонных пакетов в первую очередь концентрируется на глубинах, соответствующих дерме. Максимальную глубину зондирования можно оценить по одномерному распределению, рассчитав максимальную глубину, которую достигают 90% фотонных пакетов, вышедших из источника и достигших детектора. Данные оценки представлены на рисунке 13(Г) пунктирными линиями. Для двухволоконного зонда с расстоянием между волокнами 2.6 мм для длины волны 970 нм максимальная глубина зондирования составила 2.2 мм. Для двухволоконного зонда с расстоянием между волокнами 1.7 мм для длины волны 1200 нм максимальная глубина зондирования равна 1.45 мм. Для конфигурации одноволоконного зонда, моделирующего измерение спектров КР, для длины волны возбуждения 690 нм максимальная глубина зондирования составила 1.1 мм. Для мультиспектральной схемы визуализации для длины волны 970 нм глубина составила 1.75 мм. Таким образом, можно ожидать, что 90% сигнала детектируется от дермы, типичная толщина которой составляет от 1 до 2 мм [2]. Представленные результаты на рисунках 13(А)-(Г) были получены при 60% объемной концентрации воды в дерме.

Также было оценено, как изменяются оценки содержания воды, рассчитанные по спектрам диффузного отражения, при изменении объемной концентрацией воды в дерме. Для двухволоконной схемы, в которой расстояние между оптоволокнами 2.6 мм, и для схемы мультиспектральной визуализации был рассчитана величина $\Delta OD(970,850)$ для длин волн 970 и 850 нм (формула (2.3)), а для двухволоконного зонда при расстоянии между волокнами 1.7 мм рассчитывали эквивалентное значение для длин волн 1050 и 1200 нм ($\Delta OD(1200,1050)$, формула (2.3)) при изменении объемной концентрации воды в дерме от 50% до 90%. Хотя при естественном отеке могут наблюдаться более сложные изменения оптических свойств нескольких слоев кожи, можно ожидать, что такая оценка позволит оценить

чувствительность величин $\Delta OD(\lambda_1, \lambda_2)$, которые зависят от эффективной оптической плотности на двух длинах волн, к увеличению содержания воды. Было получено, что расчетные величины линейно увеличиваются с увеличением концентрации воды в дерме (коэффициент детерминации $R^2 = 0.97 \pm 0.03$). Таким образом, результаты моделирования показали, что выбранные спектральные диапазоны могут быть использованы для оценки содержания воды в коже. При этом сигнал детектируется из дермы, и оценка содержания воды может проводиться с использованием различных типов источников и конфигураций детектора. Данные наблюдения стимулировали серию измерений *in vivo*.

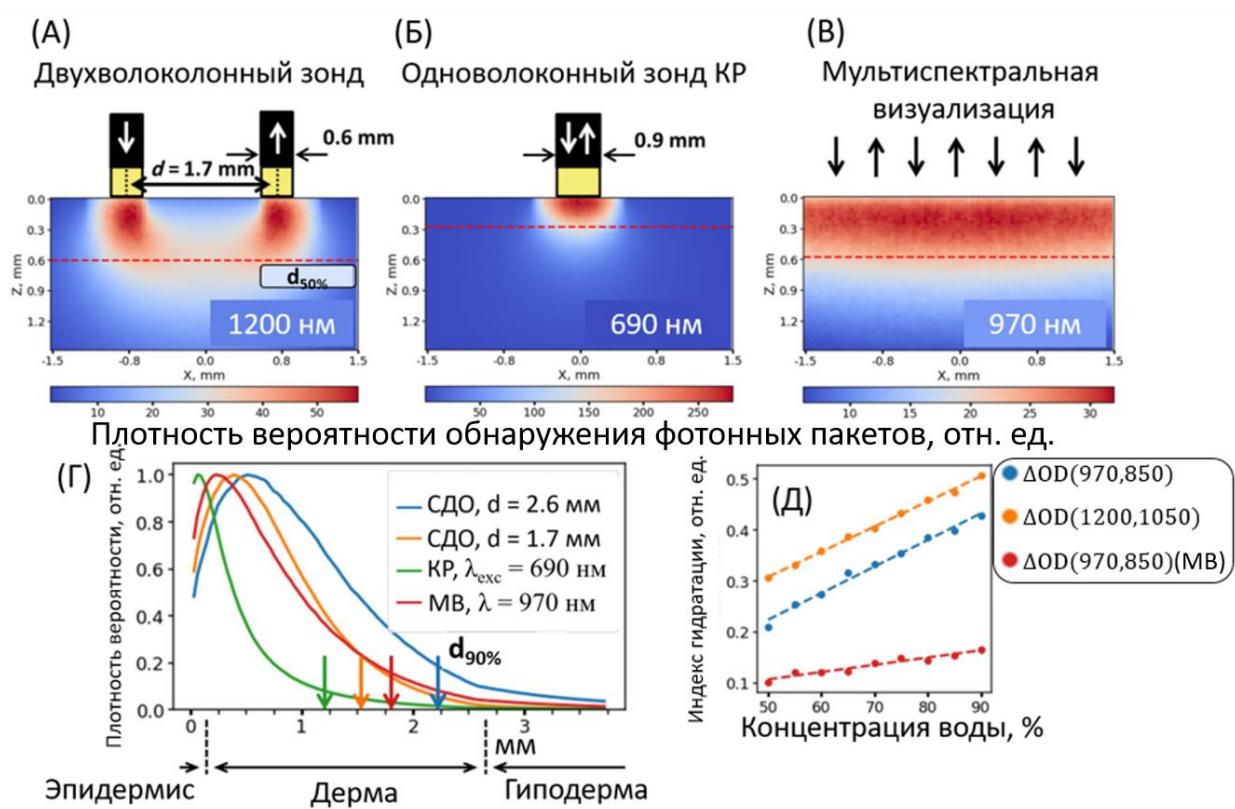


Рисунок 13 — Карта плотности вероятности обнаружения фотонов, испускаемых источником и попадающих на детектор, рассчитанная А) для двухволоконного зонда с диаметром волокна 600 мкм и расстоянием между источником и детекторным волокном 1.7 мм; длина волны 1200 нм, Б) для одноволоконного зонда с диаметром волокна 900 мкм, длина волны возбуждения 690 нм, и В) для схемы мультиспектральной визуализации

(равномерно распределенное излучение), длина волны 970 нм. Горизонтальные пунктирные красные полосы соответствуют медианной глубине зондирования, то есть глубине, достигнутой не менее чем 50% фотонов, попавших на детектор. Г) Одномерное распределение плотности фотонов по коже для различных конфигураций расположения источника-детектора в методе СДО. Вертикальные стрелки соответствуют глубине, ограничивающей 90% фотонов, достигающих детектора. Д) Зависимости оценок содержания воды $\Delta OD(970,850)$ и $\Delta OD(1200,1050)$ для двухволоконных зондов с расстоянием между волокнами 2.6 и 1.7 мм и для мультиспектральной детектирующей схемы от содержания воды в дерме, которая задавалась при моделировании.

2.6.2. Оценка содержания воды при отеке с помощью спектроскопии диффузного отражения

Изменения спектров диффузного отражения, измеренных на коже после обработки гистамином, показаны на рисунке 14(А). Для количественной оценки изменения содержания воды по спектрам диффузного отражения было проведено сравнение трех различных подходов: разность эффективной оптической плотности на длинах волн 970 и 850 нм ($\Delta OD(970,850)$), линейная экстраполяция фона в окрестности полосы 970 нм (ΔOD_{970}^{LE}) и разложение спектров диффузного отражения на сумму спектров поглощения воды и липидов в диапазоне длин волн 850–1050 нм. Данные методы обработки показаны на рисунке 14(Б), где линейная экстраполяция фона представлена в виде синей пунктирной полосы, а базовые спектры, используемые для разложения, показаны оранжевыми (липиды) и зелеными (вода) пунктирными линиями. Сравнение результатов данных трех методов в оценке содержания воды в коже показано на рисунке 14(В). Все три метода дали аналогичные результаты по оценке изменения содержания воды до и после обработки кожи гистамином. При этом наблюдалось увеличение содержания воды на 70%. Примечательно, что содержание воды, полученное с помощью

ΔOD_{970}^{LE} оказалось ниже, чем для других методов. Это может быть связано с завышением учета фона при выполнении линейной интерполяции полосы поглощения воды (синяя пунктирная линия на рисунке 14(Б)).

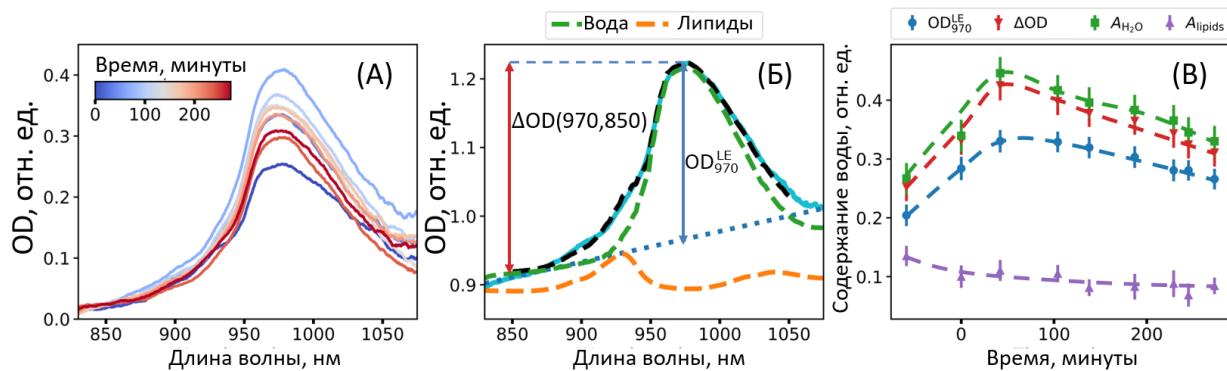


Рисунок 14 — А) Спектры оптической плотности поверхности кожи, обработанной гистамином. Цвета соответствуют различному времени после нанесения гистамина. Из всех спектров вычитали значение OD при 840 нм. Б) Схема процедур, использованных для оценки содержания воды по спектрам СДО: разность между OD при 970 и 850 нм (ΔOD_{970}), линейная аппроксимация фона в окрестности полосы 970 нм (ΔOD_{970}^{LE}) и разложение спектров эффективной оптической плотности на сумму спектров поглощения воды (зеленая пунктирная линия) и липидов (оранжевая пунктирная линия) в диапазоне 850–1050 нм. В) Динамика содержания воды в области кожи, обработанной гистамином, была получена из данных СДО с использованием трех методов. Фиолетовый цвет соответствует амплитуде полосы поглощения липидов при выполнении разложения спектра эффективной оптической плотности.

На рисунке 14(Б) также представлена кинетика величины A_{lipid} , полученная в результате разложения спектров эффективной оптической плотности на базовые спектры. Амплитуда полосы поглощения липидов уменьшается на 40% после обработки кожи гистамином. Этот факт можно объяснить увеличением толщины дермы, и, соответственно, уменьшением

вклада гиподермы в отраженный сигнал. Кинетика содержания воды в коже, обработанной гистамином, также была измерена по более длинноволновым полосам поглощения воды в диапазоне от 1100 до 1400 нм. Процедура обработки включала аппроксимацию спектров СДО как сумму спектров поглощения воды и липидов вблизи максимумов поглощения воды (1190 и 1450 нм) и липидов (1210 нм) (рисунок 15(А)). Полученные кинетики изменения содержания воды и липидов показаны на рисунке 15(Б). При появлении отека амплитуда полосы поглощения воды увеличивается на 27%. Она достигает плато через 40-50 минут, затем остается почти постоянной в течение 180 минут, а затем стремится к исходному значению для необработанной кожи. Амплитуда полосы поглощения липидов сначала уменьшается при возникновении отека, а затем, вслед за уменьшением отека кожи, стремится к исходному значению. Отношение концентрации воды к концентрации липидов характеризует изменение содержания воды относительно «сухой массы» кожи. Поэтому содержания воды рассчитывалось как отношение амплитуды полосы поглощения воды к амплитуде полосы поглощения липидов (Рисунок 15(Б)).

Кинетики содержания воды в коже, рассчитанные на основе локальных максимумов поглощения воды при 970 нм и 1190 нм, не совпадают между собой. Это расхождение может быть обусловлено несколькими факторами. Во-первых, оно может быть связано с разной глубиной детектирования сигнала, что было продемонстрировано с помощью моделирования. Во-вторых, это может быть связано с неравномерным распределением воды по глубине в области отека. Полученные результаты согласуются с результатами первой части главы 2, где был проведён анализ базы данных НИСТ. Данный анализ показал отсутствие корреляции между оценками содержания воды, полученными с использованием локальных максимумов при 970 нм и 1190 нм, по спектрам диффузного отражения кожи у 100 добровольцев.

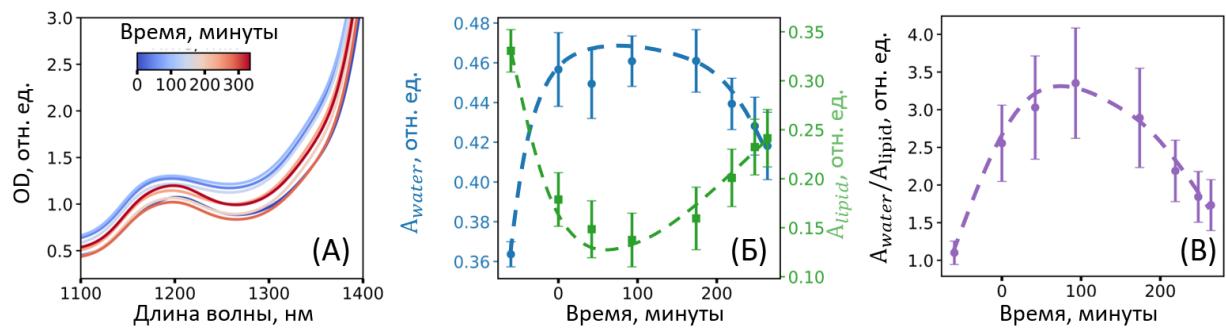


Рисунок 15 — А) Спектры эффективной оптической плотности поверхности кожи, обработанной гистамином, в диапазоне длин волн от 1100 до 1400 нм. Цвета соответствуют различному времени после нанесения гистамина. Б) Кинетика изменения амплитуд линий поглощения воды и липидов, полученных из аппроксимации спектров эффективной оптической плотности. В) Кинетика отношения амплитуд линий поглощения воды и липидов, полученная из разложения спектров эффективной оптической плотности в области кожи, обработанной гистамином.

2.6.3. Оценка содержания воды при отеке с помощью мультиспектральной визуализации

Также была измерена кинетика изменения содержания воды при отеке, вызванном гистамином, с помощью метода мультиспектральной визуализации. Изображения были получены с использованием полосовых фильтров с центром пропускания на 850 и 970 нм. Для каждого пикселя на изображении вычислялось значение $\Delta OD_{970} = -\log\left(\frac{R_{970}}{R_{850}}\right) = -\log\left(\frac{I_{970}}{I_{850}}\right) + c$, где R_{970} , R_{850} — рассчитанные коэффициенты отражения для длины волны 970 и 850 нм, I_{970} и I_{850} — интенсивности, измеренные в соответствующих спектральных каналах, c — константа, учитывающая разницу параметров регистрации и освещения для двух длин волн, измеренных с помощью эталона отражения, расположенного в том же положении, что и рука добровольца. Рассчитанная карта значений ΔOD_{970} , полученная для обработанного гистамином предплечья добровольца, показана на рисунке 16(А). Обработанный участок характеризуется повышенными значениями ΔOD_{970} ,

что свидетельствует о повышенном содержании воды и наличии отека. Изменение пространственных профилей ΔOD_{970} , рассчитанных по горизонтальным сечениям, представлено на рисунке 16(Б). Первоначально обработанный участок характеризуется наибольшей амплитудой ΔOD_{970} (т.е. содержанием воды) и наименьшей полушириной (ширина на полувысоте). Со временем амплитуда уменьшалась, а полуширина становилась больше, что свидетельствовало об уменьшении отека. Динамика максимального значения величины ΔOD_{970} , полученной с помощью мультиспектральной визуализации, показана на рисунке 16(Б).

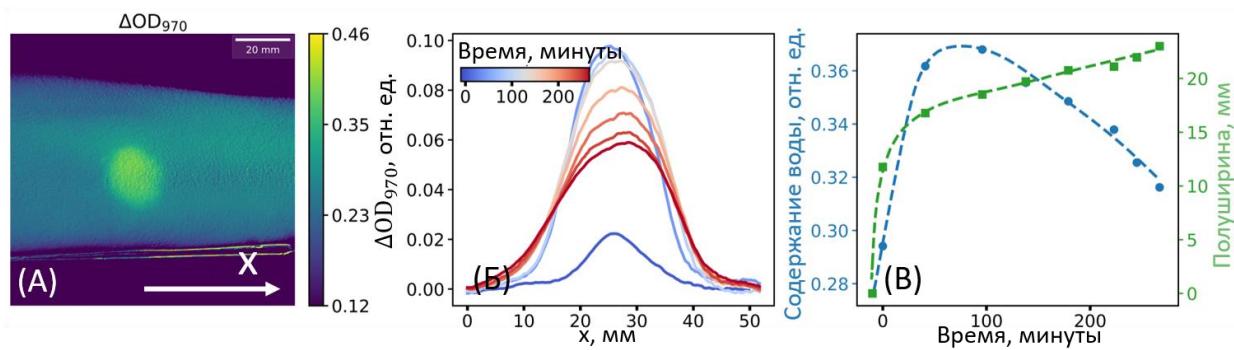


Рисунок 16 — А) Пространственное распределение $\Delta OD_{970} = -\log_{10} \left(\frac{I_{970}}{I_{850}} \right)$, рассчитанное по данным мультиспектральной визуализации. Область с повышенными значениями ΔOD_{970} соответствует обработанной гистамином коже. Б) Профили распределения ΔOD_{970} в области отека, цвета соответствуют различному времени после нанесения гистамина. В) Кинетика амплитуды ΔOD_{970} (синий цвет) и полуширина распределения ΔOD_{970} для вызванного гистамином отека.

2.6.4. Учет фона флуоресценции в измерениях спектроскопии КР

Несмотря на относительную простоту метода СДО для определения содержания воды в тканях, его недостатком является то, что полученные результаты носят полуколичественный характер и зависят от нескольких факторов, например, от расстояния между двумя волокнами.

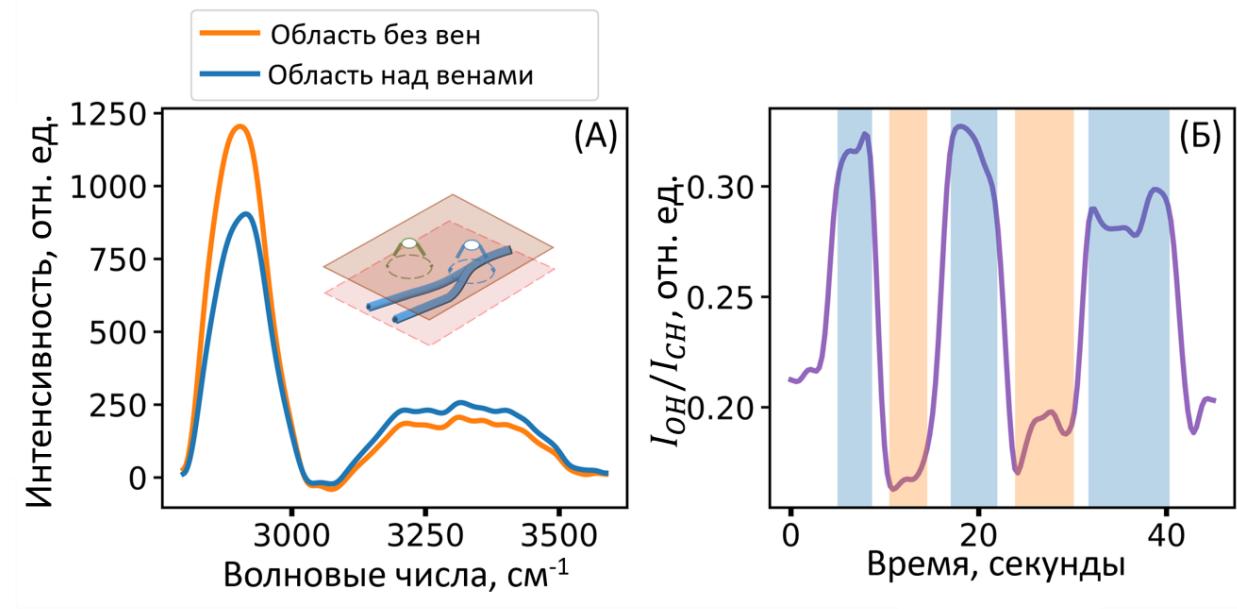


Рисунок 17 — Иллюстрация влияния неоднородностей кожи на спектры КР. А) Спектры КР, измеренные с помощью волоконного зонда, расположенного над веной (синий) и в области кожи без вен (оранжевый). Б) Кинетика соотношения интенсивностей полос О-Н и С-Н, полученная в результате последовательного сканирования вены. Вертикальные оранжевые полосы соответствуют положению волоконного датчика непосредственно над веной; вертикальные синие полосы соответствуют участкам кожи без вен.

Следовательно, для получения абсолютных концентраций хромофоров требуется специальная процедура калибровки и измерения с различными расстояниями между волокнами [18,61]. Альтернативным методом количественной оценки отека является спектроскопия КР, позволяющая оценить содержание воды как отношение интенсивности полосы О-Н около 3400 cm^{-1} I_{OH} (колебательные моды молекул воды) к интенсивности полосы С-Н I_{CH} около $2800\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ (колебательные моды групп С-Н белков и липидов). Данное значение было предложено в работах [55,89]. Однако применение КР спектроскопии для анализа биотканей осложняется двумя факторами, а именно, влиянием фона флуоресценции и неоднородностью образца. Эти два фактора будут рассмотрены ниже. Во-первых, было установлено, что при размещении волоконного зонда непосредственно над веной (синий цвет на

рисунке 16(А)) амплитуда полосы С-Н становится меньше по сравнению с участками кожи без вен (оранжевый цвет на рисунке 17(А)), в то время как амплитуда полосы О-Н увеличивается для области над веной. Следовательно, соотношение интенсивностей О-Н и С-Н варьируется при выполнении сканирования поперек вены - пример такого сканирования показан на рисунке 18(Б). Этот факт следует учитывать при оценке отека кожи с помощью КР спектроскопии. Поэтому в данной работе избегалось сканирования участков с видимыми глазом венами.

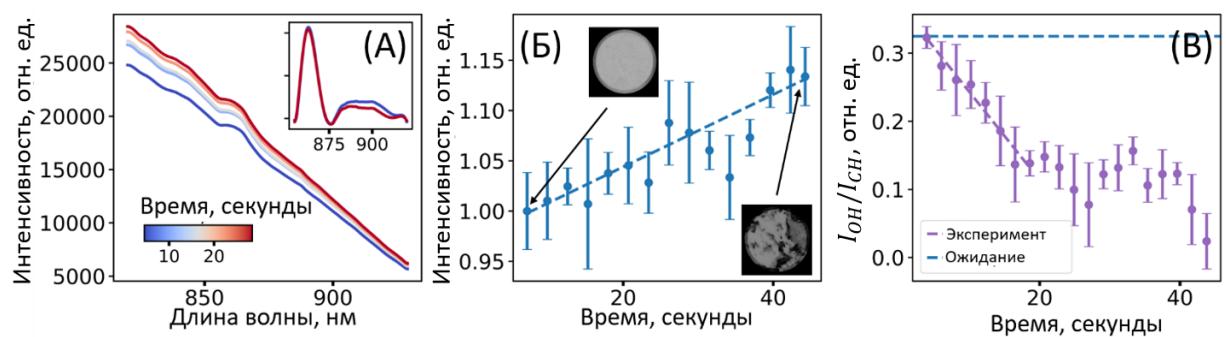


Рисунок 18 — А) Изменение сигнала фоновой флуоресценции и спектра КР света при сканировании кожи волоконным зондом. На вставке показаны полосы комбинационного рассеяния О-Н и С-Н после вычитания фона флуоресценции при времени сканирования 0 секунд (синяя линия) и 45 секунд (красная линия). Б) Кинетика интенсивности фона флуоресценции в спектре КР от времени сканирования. На вставках представлены изображения конца волокна, загрязняющегося при сканировании кожи. В) Зависимость отношения интенсивностей полос колебаний О-Н к С-Н от времени сканирования.

Второй факт, который необходимо учитывать, это влияние флуоресцентного фона на параметры полос спектра КР при обработке спектров, измеренных с поверхности кожи. В некоторых случаях было замечено, что при проведении сканирования флуоресцентный фон увеличивается со временем (Рисунок 18(Б)). Рисунок 18(А) демонстрирует изменение полученных спектров флуоресценции и КР. Правильность оценки

фона имеет решающее значение при обработке спектров КР [90]. На рисунке 18(Б) показаны изменения соотношения интенсивностей полос О-Н и С-Н, рассчитанные для спектров на рисунке 18(А) с использованием стандартной линейной интерполяции флуоресцентного фона, описанной выше. Наблюдаемое увеличение фона флуоресценции в нашем случае можно объяснить загрязнением конца оптического волокна при проведении сканирования кожи. На вставках к рисунку 18(Б) представлены изображения волоконного зонда, измеренные с помощью микроскопа, до и после сканирования кожи. На данных изображениях можно наблюдать, что после сканирования конец волокна покрыт веществом, предположительно, кожным салом, что увеличивает фон флуоресценции при возбуждении на длине волны 690 нм. Удаление этого загрязнения снижает фон до исходного уровня. Кроме того, отчистка поверхности кожи перед измерением снижает данный эффект при сканировании и приводит к стабильному фону флуоресценции во время процедуры сканирования.

2.6.5. Измерение воды с помощью спектроскопии КР: гистаминовый отек и венозная окклюзия

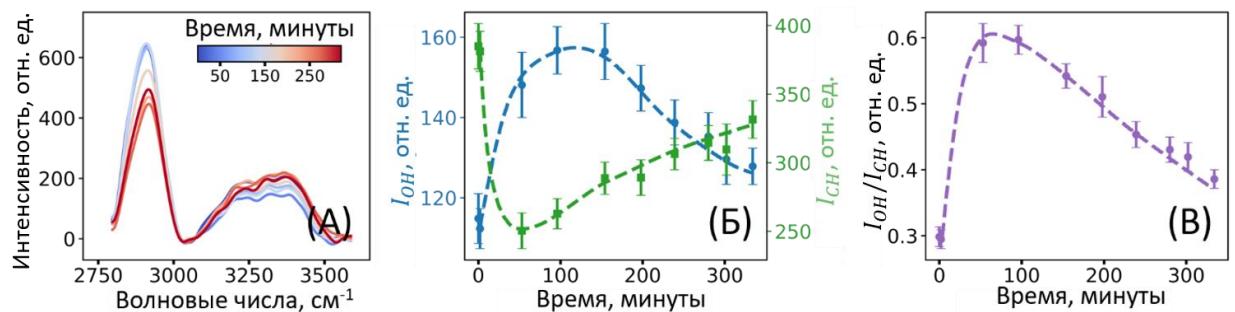


Рисунок 19 — А) Спектры КР кожи, обработанной гистамином, полученные при возбуждении на длине волны 690 нм. Цвет соответствует различному времени после нанесения гистамина и, следовательно, разной степени отека. Б) Кинетика интенсивности полос С-Н (2800-3000 см⁻¹) и О-Н (3100-3600 см⁻¹) после нанесения гистамина на кожу. В) Кинетика отношения $\frac{I_{\text{O-H}}}{I_{\text{C-H}}}$ для области отека кожи.

Спектры КР кожи до и после нанесения гистамина на поверхность кожи представлены на рисунке 19(А). Было установлено, что увеличение толщин слоев кожи приводит к уменьшению интенсивности полосы С-Н и увеличению интенсивности полосы О-Н (рисунок 19(Б)). Таким образом, отношение $\frac{I_{OH}}{I_{CH}}$, характеризующее содержание воды в тканях, ведет себя аналогично содержанию воды, оцененному по данным СДО (рисунок 19(В)). Интенсивность полосы О-Н демонстрирует увеличение на 37% по сравнению с контрольными измерениями. Зависимость интенсивности полосы С-Н от времени, полученная с помощью спектроскопии КР, имеет аналогичные тренды, которые были получены с помощью СДО в диапазоне от 1100 до 1400 нм для амплитуды полосы поглощения липидов. А именно наблюдается двухкратное уменьшение с последующим восстановлением до исходного значения.

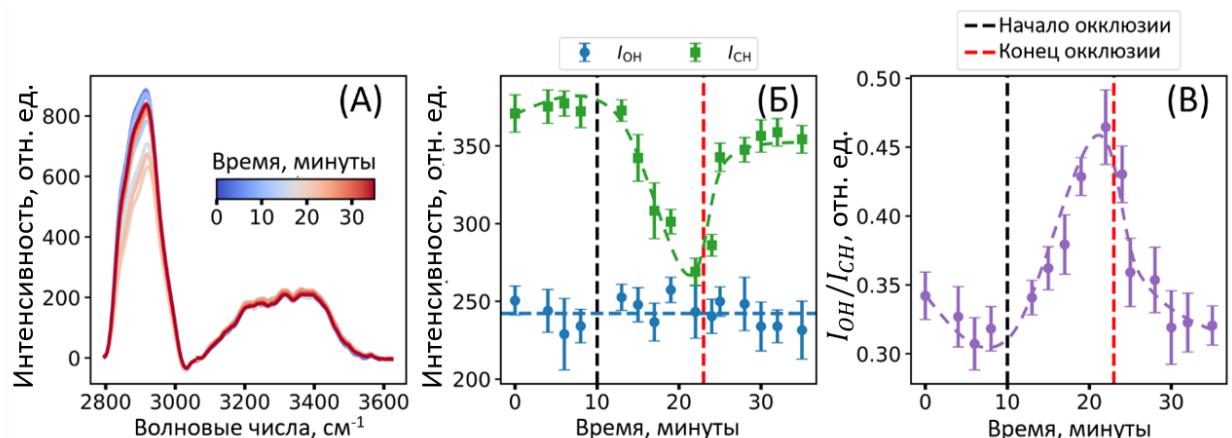


Рисунок 20 — А) Спектры КР кожи предплечья человека *in vivo*, измеренные во время венозной окклюзии. Б) Кинетика средней интенсивности полос О-Н и С-Н во время венозной окклюзии. В) Кинетика отношения I_{OH}/I_{CH} во время венозной окклюзии. Вертикальные черные и красные полосы соответствуют началу и окончанию окклюзии.

Второй моделью отека кожи была венозная окклюзия. После окклюзии было замечено, что интенсивность полосы С-Н при 2900 см⁻¹ заметно уменьшается, в то время как интенсивность полосы О-Н остается практически

неизменной (Рисунок 20(А),(Б)). Таким образом, отношение $\frac{I_{OH}}{I_{CH}}$, которое определяет содержание воды, увеличивается на 51% (Рисунок 20(В)). Поглощение гемоглобина не могло вызвать наблюдаемого изменения интенсивности полосы С-Н, так как и окси-, и дезоксигемоглобин характеризуются достаточно плоской формой полосы поглощения и очень близкими по коэффициенту молярной экстинкции в областях спектра, соответствующих полосам С-Н и О-Н колебаний. В то же время наблюдаемые спектральные изменения отличаются от наблюдаемых изменений при отеке, вызванным нанесением гистамина на кожу. Таким образом, можно сделать вывод, что изменения, наблюдаемые для данной модели отека, обусловлены другими механизмами.

2.7. Сравнительный анализ метода СДО, спектроскопии КР и мультиспектральной визуализации для измерения содержания воды при отеке

Чтобы оценить применимость и чувствительность оптических методов для оценки содержания воды в коже при отеке, было проведено сравнение рассмотренных методов спектроскопии: спектроскопии КР, СДО и мультиспектральной визуализации (Таблица 4).

Таблица 4. Основные результаты экспериментальных методов содержания воды при отеке, вызванного гистамином. Относительные изменения воды оценивались по формуле $\Delta W = (W_{edema} - W_{control})/W_{control}$), где $W_{edema}, W_{control}$ – соответствующая величина содержания воды при отеке и контрольных измерениях. Глубины сканирования, рассчитанные по отметкам в 50% и 90% фотонных пакетов, достигающих детектора, обозначены $d_{50\%}$ и $d_{90\%}$, соответственно.

Метод	Конфигурация	$d_{50\%}$, мм	$d_{90\%}$, мм	ΔW , %
СДО	Диаметр волокон 600 мкм (источник-детектор), расстояние между волокнами 2.6 мм, $\lambda = 970$ нм	0.9	2.2	70+-20
	Диаметр волокон 600 мкм (источник-детектор), расстояние между волокнами 1.7 мм, $\lambda = 1200$ нм	0.6	1.45	27+-5
Комбинационное рассеяния	Диаметр волокна 900 мкм, $\lambda_{возд} = 690$ нм	0.3	1.1	37+-9
Мультиспектральная визуализация	Равномерное освещение, $\lambda = 970$ нм	0.6	1.75	17

Из-за различной конфигурации измерения и длины волны зондирующего света данные методы имеют разную глубину сканирования в коже. Проведенное моделирование распространения света в коже показало, что медианная глубина зондирования в методе СДО составляет около 0.6 мм, а для одноволоконной спектроскопии КР — 0.3 мм. Таким образом, каждый из используемых методов позволяет выявить изменение содержания воды в

дерме. Однако следует отметить, что увеличение расстояния между волокнами позволит наблюдать содержание воды в более глубоких слоях кожи. По результатам экспериментов можно сделать вывод, что каждый из апробированных методов позволяет измерять динамику содержания воды при отеке и дает похожую кинетику гидратации. В кинетике гистаминового отека наблюдалось увеличение содержания воды в пределах от 17% до 70% в зависимости от метода измерения. Это сопровождалось уменьшением амплитуды полосы поглощения липидов, в случае СДО и уменьшением интенсивности полосы С-Н в случае КР спектроскопии. Также рассматривалась другая модель отека, основанная на венозной окклюзии. Было показано, что КР спектроскопия позволяет наблюдать увеличение отношения $\frac{I_{OH}}{I_{CH}}$ при венозной окклюзии. Амплитуда такого изменения примерно вдвое меньше, чем при гистаминовом отеке, и изменения происходят в основном за счет уменьшения интенсивности полосы С-Н. При измерениях с помощью КР спектроскопии были выявлены некоторые артефакты, которые могут затруднить наблюдение реальной картины гидратации. Один из них связан с неоднородностью тканей, например, наличием крупных сосудов в измеряемом объеме. Еще одной особенностью, усложняющей количественную оценку воды с помощью КР спектроскопии, является изменчивость флуоресцентного фона из-за присутствия кожного сала на поверхности кожи. Следует отметить, что в случае СДО локальный максимум около 970 нм, связанный поглощением воды, может быть легко оценен по спектру диффузного отражения. В то же время наличие флуоресцентного фона и формы полос О-Н и С-Н может значительно снизить точность измеряемых величин.

2.8. Выводы

Как было показано, изменение содержания воды при возникновении отека кожи по данным СДО составило более 50%. Из литературы известно, что концентрация воды в дерме составляет $\sim 70\%$ [27], поэтому полученные

изменения не соответствуют физиологическим изменениям концентрации воды в дерме. Полученные изменения по эффективной оптической плотности может быть результатом изменения не только изменениями концентрации воды, но и изменениями структуры кожи при отеке – увеличением толщины дермы. Данные изменения приводят к изменению оптического пути фотонов, проходящих от источника до детектора. Для того, чтобы проверить данное предположение и исследовать чувствительность спектров диффузного отражения к изменениям структуры кожи, т.е. к изменениям толщин ее верхних слоев, были проведены измерения спектров диффузного отражения с пространственным разрешением. Результаты данного исследования представлены в следующей главе данной работы.

Глава 3. Определение параметров структуры кожи с помощью спектроскопии диффузного отражения с пространственным разрешением.

В данной главе был разработан метод на основе СДО с пространственным разрешением, позволяющий одновременно оценивать содержание воды в дерме, толщину дермы и толщину гиподермы. С помощью СДО с пространственным разрешением проведена оценка изменения содержания воды и толщины дермы при отеке, вызванного гистамином. С помощью Монте-Карло моделирования распространения света в коже была разработана модель кожи, описывающая оптические свойства дермы, гиподермы и мышечного слоя. На основе данной модели экспериментально были разработаны методы по определению толщины дермы и гиподермы. Калибровка метода проводилась с помощью УЗИ. *В данной главе используются материалы, опубликованные в статье [A3].*

3.1. Объекты и методы исследования

3.1.1. Измерение спектров диффузного отражения с пространственным разрешением

Используемая в работе экспериментальная установка позволяет измерять спектры диффузного отражения в спектральном диапазоне от 400 до 1100 нм. Измерение спектров проводилось с помощью специального оптоволоконного зонда, состоящего из двух оптоволокон. Диаметр сердцевины каждого оптоволокна составлял 550 мкм. Фото экспериментальной установки представлено на рисунке 21(А), а фото и схема зонда — на рисунках 21(Б) и 21(В). Для того чтобы проводить измерение спектров диффузного отражения с пространственным разрешением, расстояние между волокнами источника и детектора варьировалось с помощью линейного транслятора с пьезодвигателем (ELL17 Stage, Thorlabs, США) в диапазоне от 0 до 10 мм с шагом 0.5 мм. Точность позиционирования оптоволокон составляла 50 мкм. В качестве детектора использовали

спектрометр Maya2000Pro (Ocean Optics, США), в качестве источника света использовали галогеновую лампу SLS201 (Thorlabs, США). Типичные спектры СДО, измеренные на разных расстояниях между волокнами источника и детектора, показаны на рисунке 21(Г). Оптические волокна во всех экспериментах располагались перпендикулярно поверхности кожи.

3.1.2. Обработка спектров

Спектры эффективной оптической плотности, которые были измерены с помощью данной экспериментальной установки, аппроксимировались линейной комбинацией спектров поглощения основных компонентов (воды и липидов) и базовой полосы, учитывающей вклад поглощения других хромофоров (оксигемоглобина, дезоксигемоглобина) и рассеяния [91] аналогично тому, как это было сделано в предыдущей главе:

$$OD(\lambda) = C_0 + C_1\lambda + A_{water}\varepsilon_{water}(\lambda) + A_{lipid}\varepsilon_{lipid}(\lambda) \quad (3.1)$$

где λ — длина волны, C_0, C_1 связаны со вкладами фонового поглощения и рассеяния, A_{water} и A_{lipid} — амплитуды линий поглощения воды и липидов, $\varepsilon_{water}(\lambda)$ и $\varepsilon_{lipid}(\lambda)$ — нормированные спектры поглощения воды и липидов. Коэффициенты $C_0, C_1, A_{water}, A_{lipid}$ для каждого измеренного спектра восстанавливались путем минимизации разницы между моделью аппроксимации (формула 3.1) и экспериментальным спектрами методом наименьших квадратов.

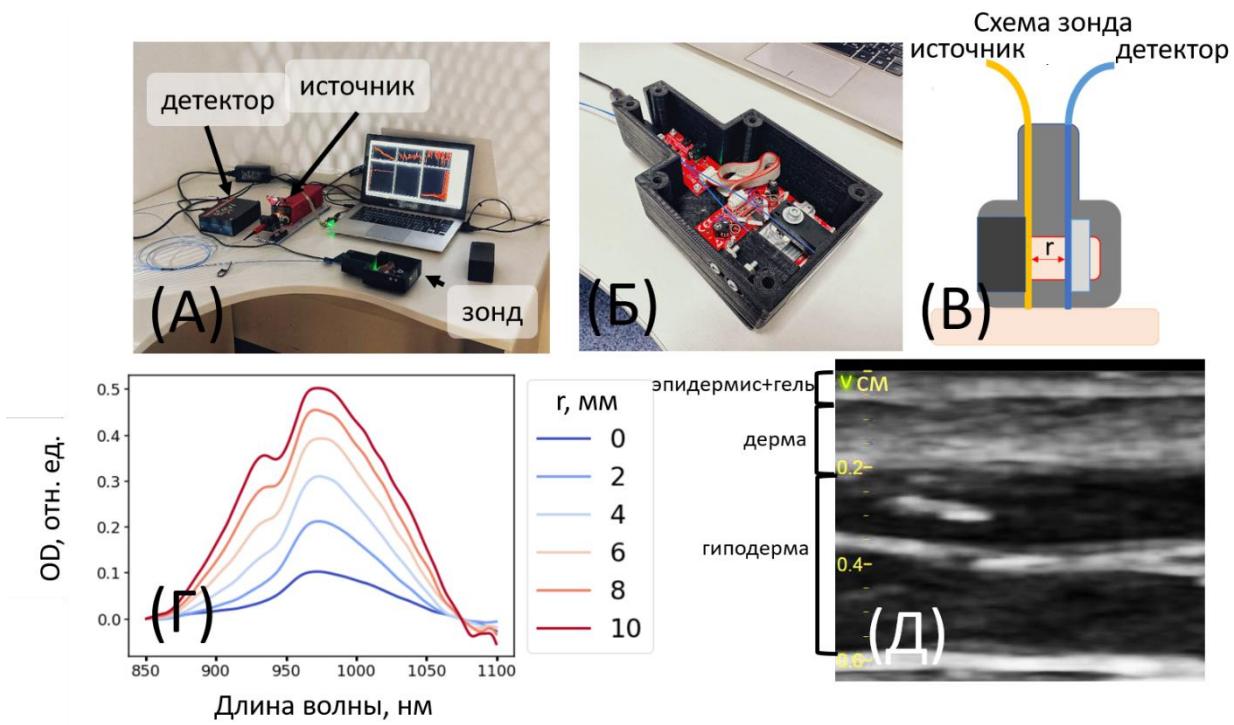


Рисунок 21 — А) Фотография экспериментальной установки, реализующая СДО с пространственным разрешением. Б) Фотография зонда, реализующий измерения спектров диффузного отражения с пространственным разрешением. В) Схема данного зонда. Г) Характерные спектры эффективной оптической плотности, измеренные для расстояний между источником и детектором в диапазоне от 0 до 10 мм и Д) УЗИ изображения кожи, полученные линейным датчиком 11L-D при частоте сканирования 12 МГц с использованием прибора Vivid E95.

3.1.3. Ультразвуковое исследование кожи

Измерение толщин слоев кожи при отеке исследовали на УЗИ-приборе Vivid E95 (GE Healthcare, США) с линейным датчиком 11L-D при частоте сканирования 12 МГц. Изображения кожи, полученные с помощью УЗИ, позволили определить толщину дермы и гиподермы (Рисунок 21(Д)). Чтобы оценить погрешность данного метода, измерения проводились как минимум для пяти вертикальных профилей для каждого изображения с использованием программного обеспечения ImageJ. [92].

3.1.4. Моделирование спектров диффузного отражения методом Монте-Карло

Распространение света в коже моделировалось с помощью метода Монте-Карло используя модуль программы из работы [25]. Кожа моделировалась как структура, состоящая из двух слоев с индивидуальными коэффициентами рассеяния и поглощения. Первый слой моделировал дерму, где вода является основным поглотителем. Второй слой моделировал гиподерму, где липиды были в качестве основного поглотителя. Для учета оптических свойств мышц был использован третий слой, где вода была в качестве основного поглотителя. По данным моделирования были построены модели для определения концентрации воды в дерме и толщины дермы, а также толщины гиподермы. Определение параметров мышечного слоя в рамках данной работы не проводилось.

Моделирование проводилось для структур, в которых варьировались значения толщины первого слоя (слоя дермы) d_{dermis} и второго слоя (слоя гиподермы) $d_{hypodermis}$ и коэффициентов поглощения всех слоев: μ_{a1} , μ_{a2} , μ_{a3} . Коэффициенты рассеяния всех слоев были фиксированными, чтобы сократить время моделирования. Коэффициент диффузного отражения R для каждого набора параметров рассчитывался как отношение числа фотонных пакетов, вышедших из среды в виде окружности с телесным углом 2π стерадианов, имитирующей оптическое волокно диаметром 550 мкм, к количеству фотонных пакетов, попадающих в среду. Расстояние между детектором и источником света варьировалось в пределах от 0.025 до 15 мм с шагом 0.05 мм. Для каждого слоя значение коэффициента поглощения μ_{ai} ($i = 1,2,3$) варьировалось в пределах от 0,001 до 10 см^{-1} на логарифмической сетке с 20 узлами. Предполагалось, что спектры рассеяния для всех слоев не зависят от длины волны в рассматриваемом диапазоне моделирования. Коэффициент рассеяния дермы составил 200 см^{-1} , гиподермы 100 см^{-1} , мышц 90 см^{-1} . Фактор анизотропии рассеяния g для каждого слоя был равен 0.9. Выбранные значения

соответствуют типичным значениям коэффициентов поглощения и рассеяния слоев кожи [26]. Толщина первого слоя, d_{dermis} , варьировалась от 1 до 2.5 мм с шагом 0.5 мм. Значения толщины второго слоя гиподермы $d_{\text{hypodermis}}$ составляли 0.5, 1, 2, 3, 4 и 5 мм. Толщина третьего слоя (мышечного) равнялась 5 мм. В результате было выполнено 240000 моделирований с количеством фотонных пакетов равным 10^7 .

Для промежуточных значений коэффициентов поглощения и рассеяния между узлами сетки, на которой проводилось моделирование, значения интерполировались методом К ближайших соседей (K-nearest neighbors). Для интерполяции коэффициентов поглощения и рассеяния была проведена следующая нормировка данных коэффициентов:

$$\mu_a^{\log} = \ln(\mu_a) \quad (3.2)$$

$$\mu_a^{\text{norm}} = (\mu_a^{\log} - \min(\mu_a^{\log})) / (\max(\mu_a^{\log}) - \min(\mu_a^{\log})) \quad (3.3)$$

Таким образом, каждое нормированное значение коэффициента поглощения и рассеяния распределялось равномерно и варьировалось от 0 до 1. В качестве входных данных для модели использовались коэффициенты поглощения μ_{a1}^{norm} , μ_{a2}^{norm} , μ_{a3}^{norm} , толщина дермы d_{dermis} , и толщина гиподермы $d_{\text{hypodermis}}$. Функция интерполяции определяла коэффициент отражения $R(r)$ для каждого расстояния r . Для этого полный набор данных был разделен на тренировочную (95%) и тестовую (5%) выборки. Оптимальные значения количества соседей оценивались с помощью кросс-валидации на тренировочной выборке, которая разделялась на три подвыборки случайным образом. Оптимальные значения количества соседей для каждого расстояния r определялись независимо. На тестовой выборке оценивалась точность интерполяции с найденным оптимальным числом соседей.

Описанный подход позволил рассчитать спектры диффузного отражения на различных расстояниях между источником и детектором для любого сочетания толщин слоев и концентраций поглотителей, используя

спектральные зависимости их коэффициентов поглощения. Далее были разработаны алгоритмы определения концентрации воды, а также толщины дермы и гиподермы.

3.1.5. Конфигурации моделирования и аппроксимации

Набор данных, содержащий рассчитанные спектры диффузного отражения трехслойных структур, был получен с использованием описанного алгоритма. Объемная доля воды W в верхнем слое варьировалась в пределах от 0.5 до 1, толщина верхнего слоя (дермы) $d_{hypodermis}$ варьировалась в пределах от 1 до 2.5 мм, толщина второго слоя (гиподермы) $d_{hypodermis}$ варьировалась в диапазоне от 0.5 до 5 мм, а объемную долю жира F во втором слое (гиподерме) фиксировалась на уровне 1. Объемная доля воды W_3 в третьем слое (мышцы) фиксировалась на уровне 0.8.

Рассчитанные спектры СДО для каждого расстояния между волокнами r были аппроксимированы по формуле (1). В результате были получены зависимости параметров $C_0, C_1, A_{water}, A_{lipid}$ от расстояния r для каждой конфигурации трехслойной структуры, моделирующих кожу. Были рассмотрены два варианта моделей определения концентрации воды, толщин слоев дермы и гиподермы: (1) линейная регрессия, которая в качестве входных данных принимает амплитуды линий поглощения воды A_{water} и липидов A_{lipid} отдельно для каждого расстояния r ; (2) линейная регрессия, которая в качестве входных данных использует зависимости $A_{water}(r)$ и $A_{lipid}(r)$, то есть одновременно весь набор значений A_{water} и A_{lipid} для всех расстояний r .

Для оценки погрешности определения модели (1) вычислялась средняя относительная ошибка. Например, для концентрации воды были проведены следующие расчеты. Для расстояния r была проведена линейная аппроксимация зависимости W от A_{water} для данного расстояния r .

Оценивалась W_{pred} , которая была определена из данной линейной аппроксимации. А ошибка содержания воды $\delta_W(r)$ была рассчитана как

$$\delta_W(A_{water}; r) = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^{N-1} \frac{|W_{pred}^{(i)}(r) - W^{(i)}|}{W^{(i)}} \quad (3.4)$$

где индекс i обозначает различные конфигурации входных параметров (d_{dermis} , $d_{hypodermis}$), N — количество этих конфигураций. Аналогичные расчеты были сделаны для толщины дермы d_{dermis} и толщины гиподермы $d_{hypodermis}$.

Как было указано выше, алгоритм (2) предполагает использование значения A_{water} для всех имеющихся расстояний (от 0 до 10 с шагом 1 мм) для определения следующих параметров: толщина дермы, толщина гиподермы. Поскольку значения A_{water} для ближайших расстояний скоррелированы между собой, определение целевых параметров (толщины дермы и толщины гиподермы) с помощью линейной регрессии может привести к ошибочным результатам. Поэтому была проведена L_2 -регуляризация. С помощью кросс-валидации на полном наборе данных были найдены оптимальные параметры регуляризации для каждой модели, которые определяли толщину дермы и гиподермы соответственно. Ошибка определения толщины дермы и гиподермы оценивалась на тестовом наборе, не пересекающемся с тренировочным набором данных, который был сгенерирован дополнительно.

3.1.6. Обработка экспериментальных данных СДО с пространственным разрешением

Для интерпретации экспериментальных спектров диффузного отражения был использован следующий подход. Измерения УЗИ позволило нам определить толщину дермы и гиподермы, в то время как концентрации молекулярных компонент в каждом слое оставались неизвестными. Таким образом, для анализа возможности экспериментального определения толщин слоев кожи по данным СДО была использована линейная регрессия. Модель определяла толщины дермы и гиподермы, которые были измерены с помощью

УЗИ, по зависимостям $A_{water}(r)$ и $A_{lipid}(r)$, которые были получены при аппроксимации спектров эффективной оптической плотности используя формулу (4.1).

В эксперименте проводились измерения на коже семи здоровых добровольцев (2 мужчин, 5 женщин). Средний возраст добровольцев составил 23 года, минимальный и максимальный возраст – 21 и 27 лет соответственно. Модель была построена на основе линейной регрессии с регуляризацией L_2 . Амплитуды A_{water} и A_{lipid} полученные для всех расстояний источник-детектор r , использовались в качестве входных параметров, по которым проводилось определение толщин дермы и гиподермы. Толщины дермы и гиподермы, измеренные с помощью УЗИ, использовались в качестве эталонных значений. Валидация алгоритма была проведена с помощью поэлементной кросс-валидации, в которой аппроксимация проводилась на всей выборке за исключением одного, а ошибка определения оценивалась на исключенном из выборке элементе.

3.2. Изменение структуры кожи при возникновении отека кожи

3.2.1 Оценка содержания воды в коже при отеке с помощью СДО с пространственным разрешением

СДО с пространственным разрешением был применен для оценки изменений физиологических параметров кожи при отеке, вызванного гистаминовым ионофорезом. Такая же модель отека рассматривалась в предыдущей главе данной работы. На спектрах эффективной оптической плотности кожи наблюдаются локальные максимумы поглощения липидов около 930 нм (в основном в гиподерме) и воды около 970 нм (Рисунок 20(А)). Возникновение отека на коже приводило к выраженному увеличению поглощения около 970 нм, а также к уменьшению поглощения около 930 нм (Рисунок 22(Б)).

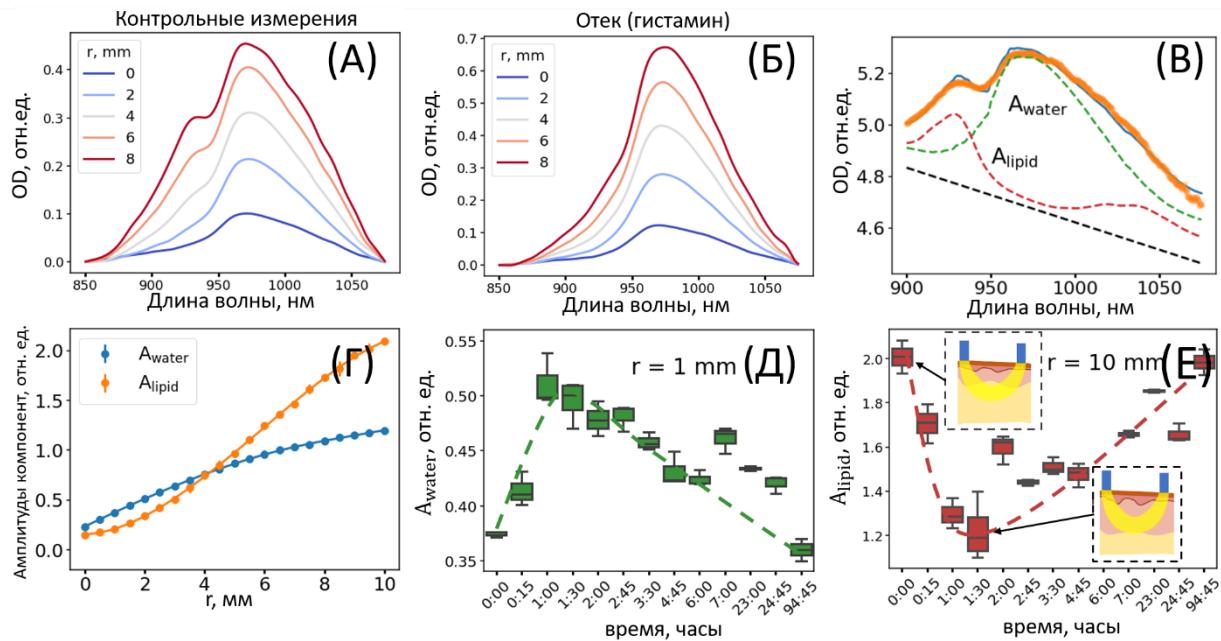


Рисунок 22 — Спектры эффективной оптической плотности кожи, измеренные на одном и том же участке кожи, до А) и после Б) нанесения гистамина на кожу. Параметр r обозначает расстояние между источником и детектором на панелях А) и Б). В) Пример аппроксимации измеренных спектров диффузного отражения по формуле (3.1). Оранжевая линия соответствует экспериментальным данным, синяя линия соответствует аппроксимации, а зелёная и красная пунктирные полосы соответствуют спектрам поглощения воды и липидов. Г) Репрезентативная зависимость амплитуд линий поглощения воды A_{water} и липидов A_{lipid} от расстояния между волокнами источника и детектора. Д) Кинетика амплитуды A_{water} полосы поглощения воды, полученной при аппроксимации спектров эффективной оптической плотности, измеренных при расстоянии между источником и детектором, равном 1 мм. Е) Кинетика амплитуды A_{lipid} полосы поглощения липидов, полученной при аппроксимации спектров эффективной оптической плотности, измеренных при расстоянии между источником и детектором, равном 10 мм.

Спектры оптической плотности были в диапазоне 900-1075 нм аппроксимированы по формуле (4.1) (Рисунок 22(В)). Таким образом, были получены зависимости амплитуды A_{water} и A_{lipid} от расстояния между

волокнами источника и детектора r (Рисунок 22(Г)). Для того чтобы охарактеризовать изменения содержания воды в дерме, анализировались спектры диффузного отражения, измеренные на малых расстояниях между волокнами. Эта конфигурация соответствует малой глубине сканирования, что снижает вклад гиподермы. Максимальный прирост A_{water} при отеке составил $33 \pm 3\%$ по отношению к контрольным измерениям. Однако на основании данных конфокальной спектроскопии КР [97] содержание воды в дерме можно оценить как $\sim 70\%$. Следовательно, увеличение на 33% означает, что содержание воды возрастает до $\sim 90\%$. Это значение является неадекватным с физиологической точки зрения и, как показано ниже, и связано с увеличением толщины дермы.

Кинетику амплитуды полосы поглощения липидов A_{lipid} в ходе развития отека оценивали по спектрам диффузного отражения, которые были измерены при расстоянии источник-детектор равным 10 мм, когда глубина детектирования больше, чем для 1 мм, и вклад в отраженный сигнал от гиподермы существенен. Было обнаружено уменьшение амплитуды A_{lipid} после возникновения отека (Рисунок 22(Д)), что можно объяснить увеличением толщины дермы и сопутствующим уменьшением вклада гиподермы в объеме детектируемой области. Для подтверждения этой гипотезы было выполнено моделирование распространения света методом Монте-Карло.

3.2.2. Моделирование спектров диффузного отражения для различных структур кожи

Используя рассчитанные спектры диффузного отражения трехслойной модели кожи с различными параметрами, были исследованы несколько подходов к решению обратной задачи: определение (1) содержания воды в дерме, (2) толщины дермы и (3) толщины гиподермы.

Для решения первой задачи были проведены следующие расчеты. Была рассмотрена выборка из данных, в которой объёмная доля воды была фиксирована и равна $W = 0.75$, а толщина дермы и гиподермы варьируется. Для сравнения были рассмотрены минимальное расстояние источник-детектор, которое использовалось в эксперименте, равное 1 мм, и максимальное, которое составляло 10 мм. Усредненный спектр по данной выборке, который обозначен как $OD(\lambda)$, и вклад в эффективную оптическую плотность поглощения воды, которая обозначена как $A_{water}\varepsilon_{water}(\lambda)$ и их стандартное отклонение, рассчитанные для данных выборок изображены на рисунках 23(А) и 23(Б). Можно наблюдать, что стандартное отклонение для спектров при большом расстоянии между источником и детектором значительно выше, чем на малом расстоянии.

Далее оценивалась погрешность определения содержания воды на расстоянии 1 мм между волокнами. Относительная ошибка определения содержания воды по спектрам диффузного отражения для 1 мм с помощью линейной регрессии составила 8.6%. Также стоит отметить, что данная величина увеличивалась с увеличением расстояния между источником и детектором. Можно предположить, что величина A_{water} при больших расстояниях между волокнами определяется как содержанием воды в дерме, так и толщиной дермы.

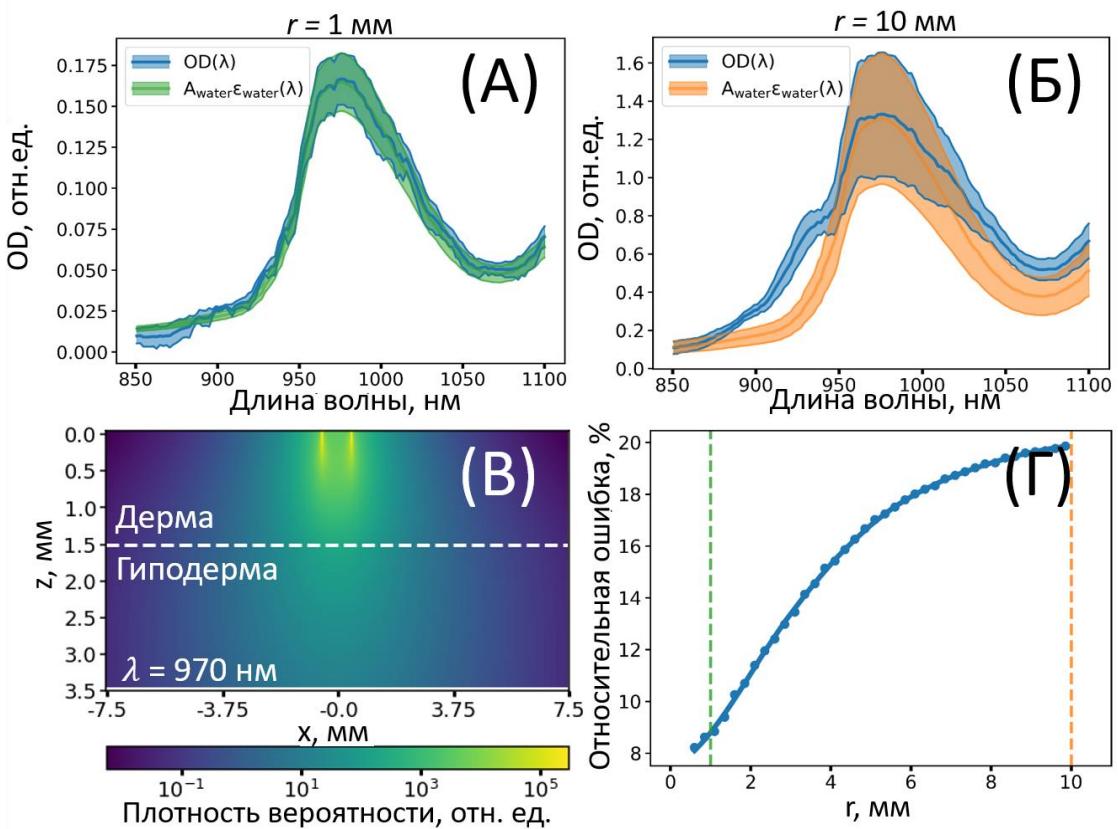


Рисунок 23 — Определение содержания воды из рассчитанных спектров СДО для различных значений d_{dermis} и $d_{\text{hypodermis}}$. Среднее значение спектра (синяя линия) и стандартное отклонение (синяя область) рассчитаны из наборов спектров оптической плотности для расстояния между волокнами 1 мм А) и 10 мм Б). Средний спектр и стандартное отклонение вклада воды в спектр, полученные путем аппроксимации спектров при расстоянии между волокнами 1 мм (панель а, зеленый) и 10 мм (панель б, оранжевый). В) Распределение плотности вероятности для обнаружения фотонных пакетов на расстоянии между источником и детектором 1 мм для модельной структуры кожи с концентрацией воды в дерме $W = 0.75$ при длине волны 970 нм и толщине дермы 1.5 мм. Белая пунктирная линия соответствует границе между дермой и гиподермой. Г) Зависимость ошибки определения концентрации воды в дерме W от расстояния между источником и детектором, при использовании амплитуды полосы поглощения воды A_{water} при соответствующем расстоянии.

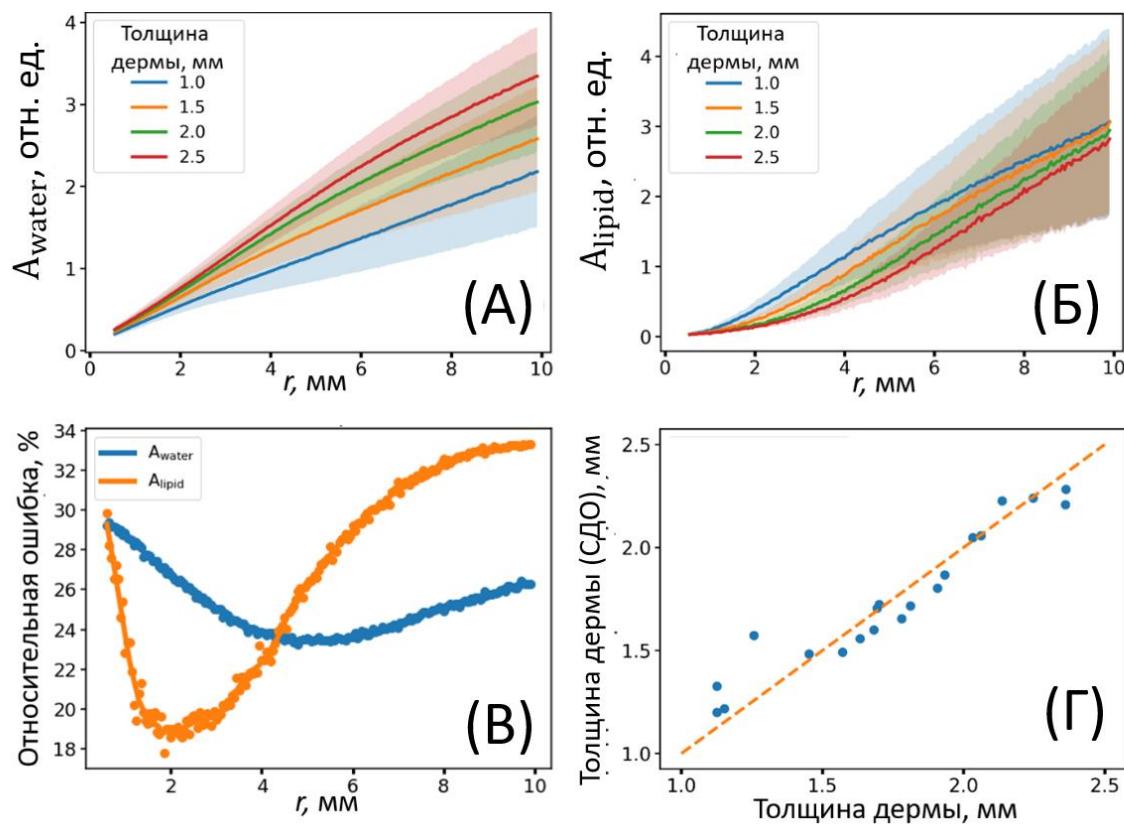


Рисунок 24 — А) Зависимости амплитуды полосы поглощения воды A_{water} от расстояния между источником и детектором, полученные из аппроксимации рассчитанных спектров эффективной оптической плотности для модельных структур, в которых толщина дермы варьируется от 1 до 2.5 мм. Б) Зависимости амплитуды полосы поглощения липидов A_{lipid} от расстояния между волокнами источника и детектора, полученные из аппроксимации рассчитанных спектров эффективной оптической плотности для модельных структур, в которых толщина дермы варьируется от 1 до 2.5 мм. В) Зависимости ошибки определения толщины дермы от расстояния между источником и детектором, при использовании амплитуды полосы поглощения воды A_{water} (синяя кривая) и амплитуды полосы поглощения липидов A_{lipid} (оранжевая кривая) при соответствующим расстоянии. Г) Диаграмма рассеяния на тестовом наборе данных для заданных в модельные структуры значений толщин дермы и рассчитанных значений толщины дермы по данным СДО с пространственным разрешением, полученных с помощью модели линейной регрессии с регуляризацией L_2 .

Это предположение согласуется с распределением плотности вероятности обнаружения фотонов (Рисунок 23(В)), что позволяет оценить долю регистрируемых фотонов с разных глубин. Расчеты показывают, что для типичных параметров системы ($W=0.7$, $d_{dermis} = 1.5$ мм) при расстоянии между источником и детектором 1 мм более 80% сигнала детектируется с верхних 1.1 мм кожи. Поскольку в этом слое формируется 80% отклика, более глубокие слои не вносят существенного вклада. Таким образом, при увеличении толщины дермы более 1.1 мм спектры существенно не изменятся. Наоборот, при изменении концентрации воды в слое дермы можно ожидать пропорциональное увеличение эффективной оптической плотности и амплитуды A_{water} . Отсюда можно сделать вывод, что амплитуда A_{water} на малых расстояниях в основном определяется содержанием воды в коже.

Вторым параметром, представляющим интерес, была толщина дермы, т. е. толщина первого слоя в моделировании Монте-Карло. Во-первых, оценивалась погрешность определения толщины дермы по спектрам эффективной оптической плотности на фиксированном расстоянии между источником и детектором. Как видно на рисунке 24(А), зависимости величины A_{water} от расстояния для различной толщины дермы существенно отличаются друг относительно друга при большом расстоянии между источником и детектором. Погрешность определения толщины дермы $\delta_{dermis}(A_{water}; r)$ в зависимости от расстояния рассчитана для этого класса моделей и представлена на рисунке 24(В). Как видно, наименьшая ошибка достигается на 5 мм и составляет $\sim 24\%$.

Наименьшая ошибка определения толщины дермы с использованием значения A_{lipid} , $\delta_{dermis}(A_{lipid}; r)$ составляет ошибку около 19%. Это было достигнуто при расстоянии между волокнами 2 мм (Рисунок 24(В)). Для повышения точности измерения толщины дермы была построена линейная регрессия с регуляризацией L_2 , учитывающая зависимости амплитуд как

A_{water} от расстояния между волокнами r , так и A_{lipid} от r . Использование данной модели дает ошибку определения толщины дермы 5% (Рисунок 24(Г)).

Аналогичная процедура была проведена для определения толщины гиподермы. Была оценена погрешность для моделей, учитывающих данные для фиксированного расстояния между источником и детектором. Как видно на рисунке 25(А), зависимости A_{water} от расстояния для различных толщин гиподермы существенно не различаются. Таким образом, использование амплитуды полосы поглощения воды A_{water} для определения толщины гиподермы приводит к высокой ошибке измерения ($>80\%$) (Рисунок 25(В)). Так как зависимости $A_{lipid}(r)$ явным образом отличаются при измерении толщины гиподермы для расстояний r больше, чем 5 мм (Рисунок 25(Б)). Поэтому определение толщины гиподермы по величине A_{lipid} приводит к меньшей ошибке. Таким образом, ошибка $\delta_{hypodermis}(A_{lipid}; r)$ в зависимости от расстояния достигает минимального значения равное 13.4%, что достигается при расстоянии 10 мм между волокном источника и детектора (Рисунок 25(В)). Для определения толщины гиподермы была построена линейная регрессия с регуляризацией L_2 , учитывающая весь набор расстояний зависимостей $A_{water}(r)$ и $A_{lipid}(r)$. На рисунке 25(Г) представлена зависимость между толщиной гиподермы из тестового набора и толщиной гиподермы, рассчитанной с использованием линейной регрессии. Модель линейной регрессии, которая использует зависимости $A_{water}(r)$ и $A_{lipid}(r)$ позволила снизить относительную погрешность определения толщины гиподермы до 6.3%.

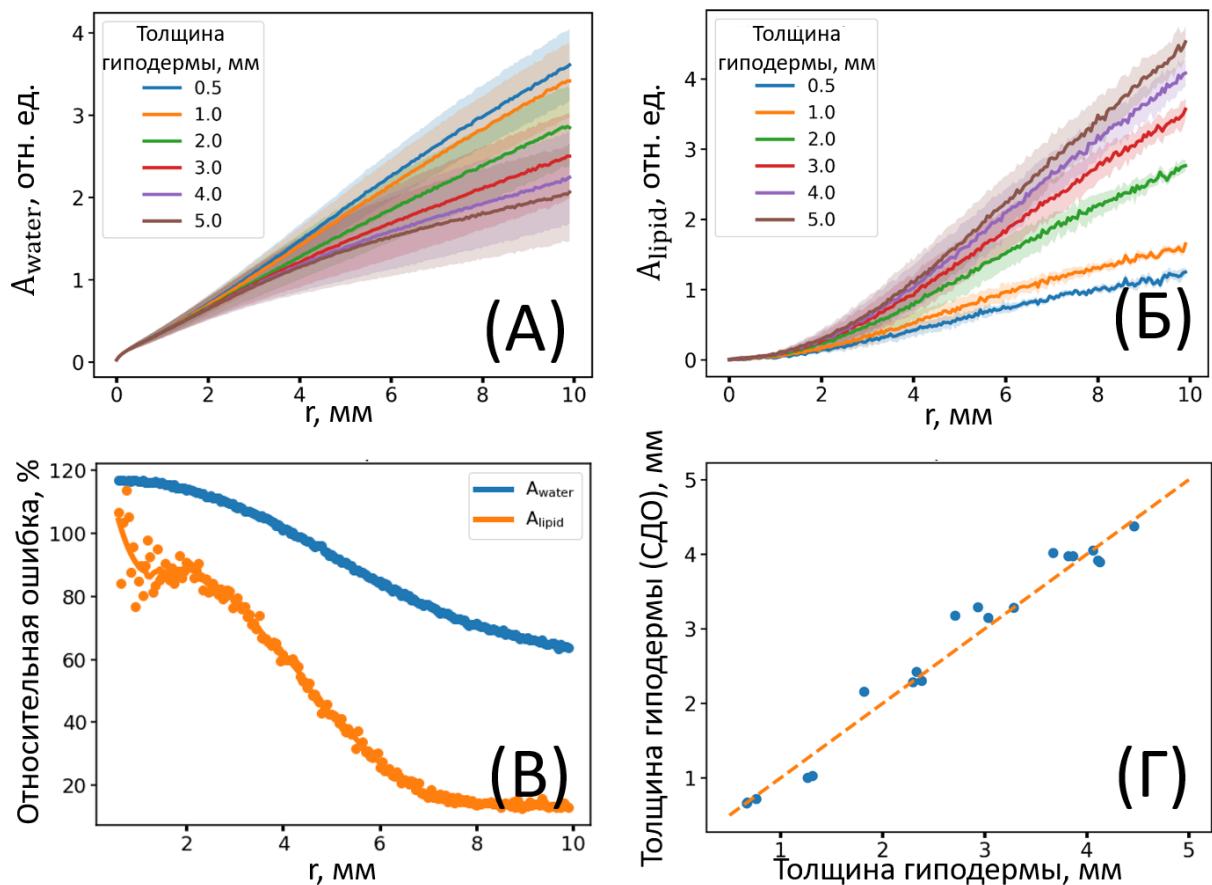


Рисунок 25 — А) Зависимость амплитуды полосы поглощения воды A_{water} от расстояния между волокном источника и детектора для модельных структур с разной толщиной гиподермы. Б) Зависимость амплитуда полосы поглощения липидов A_{lipid} от расстояния между волокном источника и детектора для модельных структур с разной толщиной гиподермы. В) Зависимости ошибки определения толщины гиподермы от расстояния между источником и детектором, при использовании амплитуды полосы поглощения воды A_{water} (синяя кривая) и амплитуды полосы поглощения липидов A_{lipid} (оранжевая кривая) при соответствующим расстоянии. Г) Диаграмма рассеяния на тестовом наборе данных для заданных в модельные структуры значений толщин гиподермы и рассчитанных значений толщины гиподермы по данным СДО с пространственным разрешением, полученных с помощью модели линейной регрессии с регуляризацией L_2 .

Результаты моделирования показывают, что использование спектров диффузного отражения, которые рассчитаны на разных расстояниях между источником и детектором, может значительно уменьшить ошибку определения толщины дермы и гиподермы. Данные соображения были в дальнейшем использованы для анализа экспериментальных данных.

3.2.3. Ультразвуковое исследование структуры кожи при отеке: корреляция с СДО с пространственным разрешением

В дополнение к измерениям СДО, представленным на рисунке 26, были выполнены измерения с помощью УЗИ кожи в месте локального отека. УЗИ-изображения слоев кожи для нормальной и кожи с отеком показаны на рисунке 26(А) и 26(Б) соответственно. Поскольку дерма и гиподерма имеют разные акустические свойства, их можно различить на УЗИ-изображениях [36].

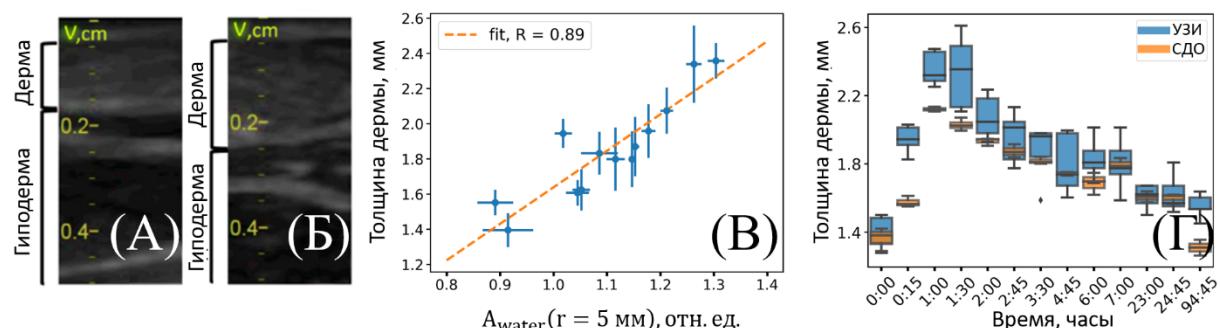


Рисунок 26 —УЗИ изображения структуры кожи до А) и после Б) появления отека. В) Зависимость измеренной с помощью УЗИ толщины дермы от амплитуды полосы поглощения воды A_{water} , полученной из аппроксимации спектров эффективной оптической плотности, измеренных на расстоянии между волокнами источника и детектора равным 5 мм. Г) Динамика толщины дермы во время отека, определенная с помощью ультразвука и СДО (ось времени не в масштабе).

По УЗИ-изображениям можно наблюдать, что толщина дермы при отеке увеличивалась с 1.4 до 2.2 мм. Поскольку для данных моделирования минимум $\delta_{dermis}(A_{water}; r)$ был получен при $r = 5$ мм (Рисунок 24(В)), этот

подход был применен к экспериментальным данным СДО. Было обнаружено, что коэффициент корреляции Пирсона между толщиной дермы, измеренной с помощью УЗИ и определенной по значению A_{water} , составил 0.89 (Рисунок 26В). Кинетика изменения толщины дермы при отеке, которая была измерена с помощью СДО при калибровке по данным УЗИ, показана на рисунке 26(Г).

Из данных моделирования следует, что погрешность определения концентрации воды по амплитуде A_{water} составляет 8% (Рисунок 23(Г)). Данная погрешность связана с изменчивостью других параметров, в первую очередь с увеличением толщины дермы. Учитывая тот факт, что толщина дермы увеличилась с 1.4 до 2.2 мм во время отека, вполне вероятно, что это изменение повлияет на значение A_{water} , полученное при минимальном (1 мм) расстоянии между оптоволокном источника и детектора. Из данных, представленных на рисунке 23(А) можно сделать вывод, что это увеличение составляет 15%. Таким образом, можно ожидать, что из 33-процентного увеличения амплитуды полосы поглощения воды, вызванного отеком (Рисунок 22(Г)), 15% приходится на увеличение толщины дермы, а остальные – на увеличение содержания воды с 70% до 81%. Следовательно, была продемонстрирована корреляция между изменениями спектров диффузного отражения с толщиной дермы (Рисунок 26(В) и 26(Г)). Наблюдаемая зависимость позволяет определить толщину дермы по экспериментальным данным спектров диффузного отражения. Одним из ограничений рассматриваемого эксперимента является то, что он проводился на одном испытуемом, поэтому в дальнейшем тестировали разработанный метод, при измерении толщины дермы и гиподермы для кожи здоровых добровольцев.

3.2.4. Определение структуры кожи с помощью СДО с пространственным разрешением: толщина дермы и гиподермы

Измерения УЗИ и СДО от кожи были выполнены для семи здоровых добровольцев. Измерения проводились на разных участках кожи предплечья: во внутренней поверхности запястья, где слой гиподермы тонкий, вблизи

локтевой ямки, где слой гиподермы более толстый, и в середине предплечья. Толщина гиподермы, определенная по данным УЗИ, у испытуемых варьировалась в пределах от 0.5 до 4 мм. Вариабельность толщины дермы у добровольцев была ниже, чем в случае, когда проводились измерения на отеке кожи. Однако толщина слоя гиподермы, наблюдаемая на изображениях УЗИ, значительно различалась.

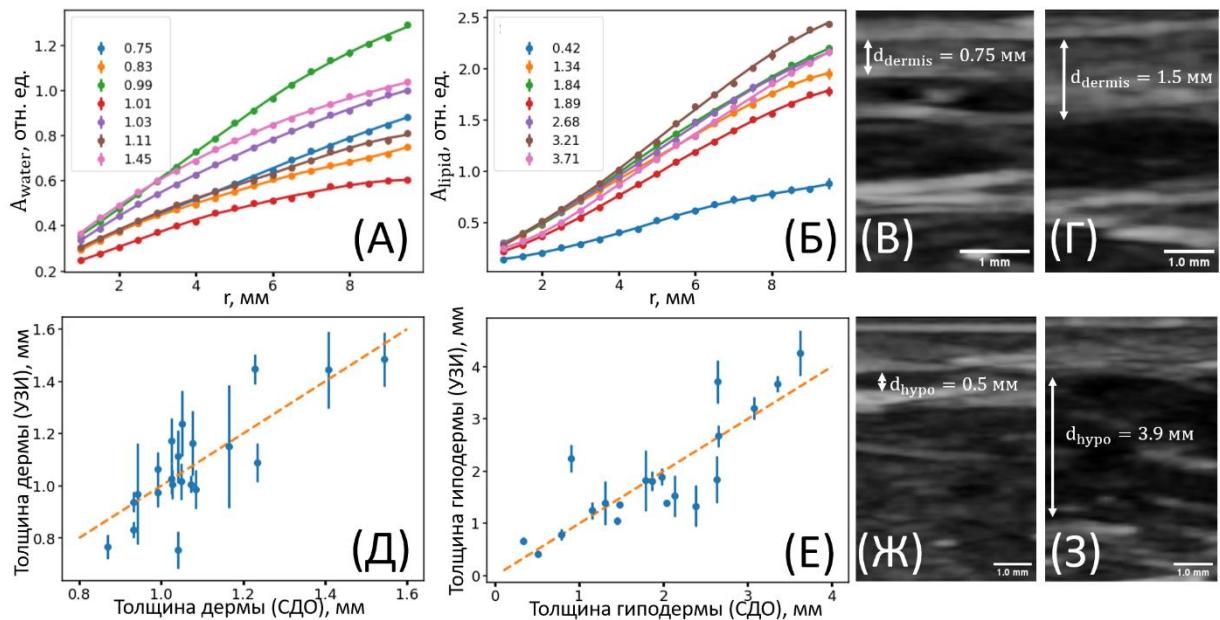


Рисунок 27 — А) Зависимости амплитуды полосы поглощения воды A_{water} от расстояния между источником и детектором, полученные из аппроксимации спектров эффективной оптической плотности, которые были измерены для каждого добровольца. В легенде указаны значения толщины дермы, которые были измерены с помощью УЗИ. Б) Зависимости амплитуды полосы поглощения липидов A_{lipid} от расстояния между источником и детектором, полученные из аппроксимации эффективной оптической плотности, которые были измерены для каждого добровольца. В легенде указаны значения толщины гиподермы, которые были измерены с помощью УЗИ В, Г) УЗИ-изображения, соответствующие минимальной и максимальной толщине дермы в выборке. Д) Зависимость толщины дермы, измеренной с помощью УЗИ, от толщины, рассчитанной с помощью линейной регрессии, которая в качестве входных данных использовала зависимости амплитуды полосы

поглощения воды A_{water} и липидов A_{lipid} от расстояния между волокнами. Е) Зависимость толщины гиподермы, измеренной с помощью УЗИ, от толщины, оцененной по данным СДО с помощью линейной регрессии. Ж, З) УЗИ-изображения, соответствующие минимальной и максимальной толщине гиподермы в выборке.

Для определения толщины дермы по данным СДО с пространственным разрешением была построена модель на основе линейной регрессии с регуляризацией L_2 . Амплитуды A_{water} и A_{lipid} , полученные для всех расстояний между источником и детектором, использовались в качестве входных данных (Рисунок 27(А) и 27(Б)). Зависимость толщины дермы, измеренной с помощью УЗИ, от значений, полученных по данным СДО, представлена на рисунке 26(Д). Истинным значением считали значение, полученное с помощью УЗИ. По формуле (3.4) вычислялась средняя относительная ошибка определения толщины дермы.

В результате средняя относительная ошибка определения толщины дермы составила 8.3%. Затем был проведен поиск спектральных дескрипторов, позволяющих определить толщину гиподермы по имеющимся данным. Для этого оценивалась амплитуда A_{lipid} на различных расстояниях между волокнами источника и детектора и рассчитывалась зависимость коэффициента корреляции Пирсона между толщиной гиподермы и величиной A_{lipid} . При расстояниях между волокнами более 2 мм была обнаружена высокое значения коэффициента корреляции ($>0,8$) между толщиной гиподермы и значениями A_{lipid} , достигающая максимума 0.87 при $r = 10$ мм. Этот результат качественно согласуется с результатом, полученным для определения толщины гиподермы на основе данных моделирования (рисунок 25(Б)). Таким образом, была построена модель для определения толщины гиподермы от экспериментальной амплитуды A_{lipid} , полученной на

расстоянии 10 мм. Полученная модель позволила определить толщину гиподермы со средней относительной ошибкой 23.4% и средней среднеквадратичной ошибкой 0.56 мм (рисунок 27(Е)).

3.4. Выводы

В данной главе с помощью метода СДО с пространственным разрешением была исследована возможность определения физиологических параметров кожи *in vivo* при отеке кожи и на коже здоровых добровольцев. Была исследована возможность определения концентрации воды в дерме, толщины дермы и толщины гиподермы по спектрам диффузного отражения.

Распространение света в коже моделировалось методом Монте-Карло. На основе данных моделирования были рассчитаны спектры диффузного отражения. На основе данных моделирования разработаны подходы к определению содержания воды в дерме и толщины гиподермы и дермы. Показано, что минимальная относительная погрешность определения концентрации воды 9.3 % достигается при расстоянии между источником и детектором равному 1 мм. Наименьшая погрешность определения толщины гиподермы была достигнута на расстоянии 10 мм и составила 13.4%.

Разработанный метод позволил получить коэффициент корреляции Пирсона 0.89 между толщиной дермы, измеренной при УЗИ, и амплитудой полосы поглощения воды, полученной с помощью СДО с пространственным разрешением при отеке. Также были построены модели линейной регрессии для определения толщины дермы и гиподермы для кожи здоровых добровольцев *in vivo* с использованием данных СДО с пространственным разрешением и УЗИ с относительной ошибкой 8.3% и 23.4% соответственно (таблица 5). Таким образом, разработанный метод позволяет проводить количественную неинвазивную относительную оценку молекулярных (вода и липиды) и морфологических (толщина дермы и гиподермы) параметров кожи. Исследование применимости разработанного метода для диагностики

отечного синдрома, а также оценки содержания воды при дегидратации в ходе различных физиологических воздействий, подробно рассмотрено в Главе 4.

Таблица 5. Метрики качества моделей, определяющих физиологические параметры кожи с использованием данных спектроскопии диффузного отражения, полученных при моделировании и экспериментальных измерениях. В таблице представлены среднеквадратическое отклонение (СКО) и относительная ошибка параметров, коэффициент корреляции Пирсона $R_{Pearson}$ и р-значение альтернативной гипотезы (Альтернативная гипотеза предполагает отсутствие корреляции между истинными и рассчитанными значениями параметров).

Результаты, полученные на данных моделирования				
Параметр	СКО	δ , %	$R_{Pearson}$	р-значение
C_{water}	0.08	9.3	0.89	$<<5 \cdot 10^{-2}$
d_{dermis}	0.1 мм	5.0	0.97	$<<5 \cdot 10^{-2}$
$d_{hypodermis}$	0.2 мм	6.3	0.99	$<<5 \cdot 10^{-2}$
Результаты, полученные на данных эксперимента				
Параметр	СКО	δ , %	$R_{Pearson}$	р-значение
d_{dermis}	0.11 мм	8.3	0.82	$<<5 \cdot 10^{-2}$
$d_{hypodermis}$	0.56 мм	23.4	0.84	$<<5 \cdot 10^{-2}$

Глава 4. Биомедицинские применения пространственно-разрешенной СДО для оценки гидратации и состава тела человека

Целью данной главы является исследование возможности применения разрабатываемого метода для определения общего уровня гидратации организма человека а также для диагностики отечного синдрома. Для этого были проведены эксперименты по дегидратации при различных физиологических воздействиях: тепловых нагрузках, физических упражнениях и диуретической терапии. Относительные изменения содержания воды в коже, т.е. относительные изменения уровня гидратации кожи, измерялись с помощью СДО с пространственным разрешением. Проведенный сравнительный анализ динамики дегидратации и регидратации при различных воздействиях позволил оценить эффективность и точность предлагаемого метода.

Помимо этого, разрабатываемый метод использовался для определения состава тела. В качестве референсного метода использовался мультиспектральный биоимпедансный анализ тела, который измеряет электрическое сопротивление тканей на различных частотах электрического тока для оценки состава тела.

Полученные результаты являются важным шагом в разработке портативного устройства для определения уровня гидратации организма человека, а также способствуют внедрению новых инструментов для изучения динамики гидратации и дегидратации в клинической практике и спортивной медицине. *В данной главе используются материалы, опубликованные в работах [A4] и [A5].*

4.1. Исследования взаимосвязи уровня гидратации кожи с общим уровнем гидратации организма человека

Целью данного исследования было измерение динамики дегидратации и регидратации кожи с помощью СДО в ответ на различные физиологические воздействия: тепловые нагрузки, физические нагрузки и диуретическую

терапию. Был проведен сравнительный анализ динамики дегидратации кожи для вышеперечисленных воздействий.

4.2. Объекты и методы исследования

Была проведена серия экспериментов по дегидратации, включающая в себя тепловые нагрузки, физические нагрузки и диуретическую терапию. Первые два эксперимента проводились с участием здоровых добровольцев. Изменение содержания воды при диуретической терапии исследовалась на пациентах с отечным синдромом кардиологического происхождения. Данные пациенты находились под наблюдением в стационарном отделении Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова. От всех участников было получено информированное согласие. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова.

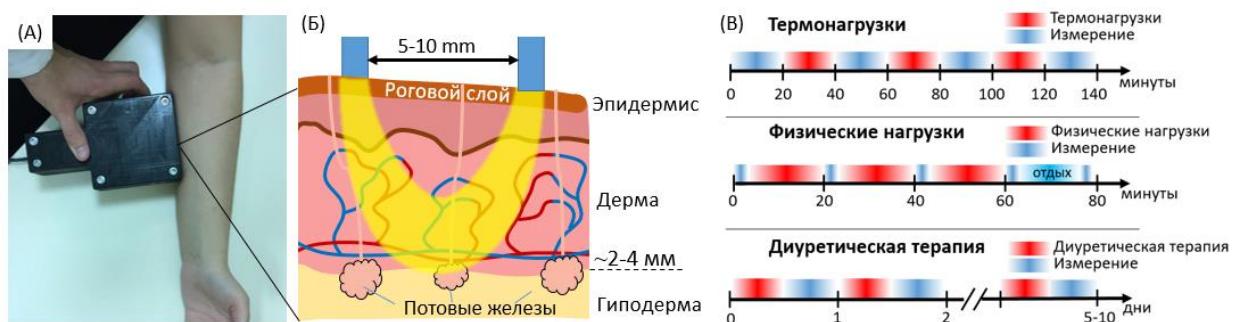


Рисунок 28 — А) Демонстрация измерения спектров диффузного отражения от кожи руки с использованием разработанного зонда в условиях тепловых и физических нагрузок. Б) Схема кожи с указанием предполагаемой глубины сканирования методом СДО. В) Временные диаграммы экспериментальных протоколов для тепловых нагрузок, физических нагрузок и диуретической терапии.

4.2.1. Протокол взвешивания

Взвешивание проводилось с использованием весов Smart Mi Scale 2 (Xiaomi, КНР). Измерения выполнялись без верхней одежды. Каждое измерение

проводилось не менее трёх раз, чтобы оценить погрешность данных измерений. Погрешность измерений для этих весов составляла 100 г.

4.2.2. Тепловые нагрузки

Тепловые нагрузки осуществлялись с помощью сауны при температуре воздуха 80 °С. Эксперимент по исследованию дегидратации под воздействием тепловых нагрузок проводился следующим образом. Сначала в течение 20 минут проводились контрольные измерения массы тела и измерения спектров диффузного отражения кожи добровольца *in vivo* для оценки вариабельности измеренных спектров. Затем испытуемый проводил 20 минут в сауне. После этого проводилось промежуточное взвешивание, за которым следовало повторное 20-минутное измерение спектров диффузного отражения. Протокол включал повторяющиеся циклы тепловых нагрузок и последующих измерений. Подробная последовательность действий по данному протоколу представлена на рисунке 28(В). Цель последующих длительных 20-минутных измерений заключалась в обнаружении возможного восстановления гидратации кожи после тепловых нагрузок. Измерение спектров диффузного отражения проводилось на предплечье (Рисунок 28(А)). В исследовании приняли участие 11 испытуемых в возрасте 19 лет.

4.2.3. Физические нагрузки

В данном эксперименте физические нагрузки проводились на эллиптическом тренажёре. Температура воздуха в помещении, где проводился эксперимент, составляла 22 ± 2 °С. Последовательность действий протокола эксперимента представлена на рисунке 28(В). Сначала проводились контрольные измерения массы тела и спектров диффузного отражения на предплечье (Рисунок 28(А)). Затем испытуемый выполнял упражнения на эллиптическом тренажёре в течение 60 минут, поддерживая средний темп 120 шагов в минуту. Промежуточное взвешивание и измерения спектров проводились каждые 20 минут в ходе физических нагрузок. Длительность промежуточных измерений составляла 1–2 минуты. После 60 минут

физических нагрузок испытуемый отдыхал и протирал кожу бумажным полотенцем до полного высыхания поверхности кожи, после чего проводилось финальное измерение спектров. Данное измерение было направлено на выявление возможного восстановления гидратации кожи после физических нагрузок. В исследовании приняли участие 11 испытуемых в возрасте 21 ± 1 год.

4.2.4. Диуретическая терапия

Данный эксперимент проводился на пациентах стационарного отделения Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова. Пациенты имели диагноз отечный синдром, развившегося вследствие хронической сердечной недостаточности (ХСН). Ежедневно, начиная с момента постановки диагноза, измерялась их масса тела и измерялись спектры диффузного отражения. Продолжительность терапии составляла 5-10 дней (Рисунок 28(В)).

Измерения спектров диффузного отражения проводились на участках кожи с наиболее выраженным отечным синдромом, главным образом на нижних конечностях. В ходе лечения пациенты ежедневно получали диуретическую терапию (фуросемид в дозировке 40–80 мг в сутки, в зависимости от состояния пациента). В исследовании приняли участие 5 пациентов в возрасте 63 ± 2 года.

4.2.5. Обработка спектров диффузного отражения

Спектры диффузного отражения кожи измерялись предплечья до и во время внешних воздействий. Оценка содержания воды в коже определялась по спектрам эффективной оптической плотности по величине $\Delta OD = OD(970,850)$ (формула (2.3)) аналогично тому, как это было сделано в главе 2. Значительного покраснения кожи при данных измерениях не наблюдалось. Данный подход, как было показано в главе 2, позволяет оценить содержание

воды в коже независимо от влияния поглощения гемоглобином в БИК спектральном диапазоне.

Относительные изменения содержания воды в коже вычислялись для каждого момента времени t по следующей формуле:

$$\Delta OD_{relative}(t) = \Delta OD(t) / \Delta OD_{mean}(t = 0) \quad (4.1)$$

где $\Delta OD(t)$ обозначает значение амплитуды полосы поглощения воды, рассчитанное по спектрам, измеренным в каждый момент времени t в ходе воздействий, а $\Delta OD_{mean}(t=0)$ — усредненное контрольное значение данной величины, которое было измерено до воздействий.

Амплитуда полосы поглощения липидов, вычислялась из спектров эффективной оптической плотности по следующему алгоритму. Из спектров вычиталась прямая линия, пересекающая спектр при длинах волн около 900 и 940 нм, которые соответствуют локальным минимумам вблизи максимума поглощения липидов около 930 нм. Затем вычислялось среднее значение в области около 930 нм, что соответствует максимуму поглощения липидов. Это значение представляет количественную характеристику вклада липидов, которые содержатся в гиподерме, в отраженный сигнал. Отрицательные значения соответствовали случаям, когда максимум вблизи 930 нм не наблюдался в измеренных спектрах.

Во всех экспериментах оптические волокна располагались перпендикулярно поверхности кожи. Оптический зонд прикладывался к коже с минимальным давлением. Чтобы избежать влияния гетерогенности оптических свойств кожи, место измерения выбиралось на участке с минимальным волосяным покровом. Место приложения зонда отмечалось маркером для обеспечения повторного прикладывания зонда точно к той же области.

4.3. Результаты

4.3.1. Дегидратация под воздействием тепловых нагрузок

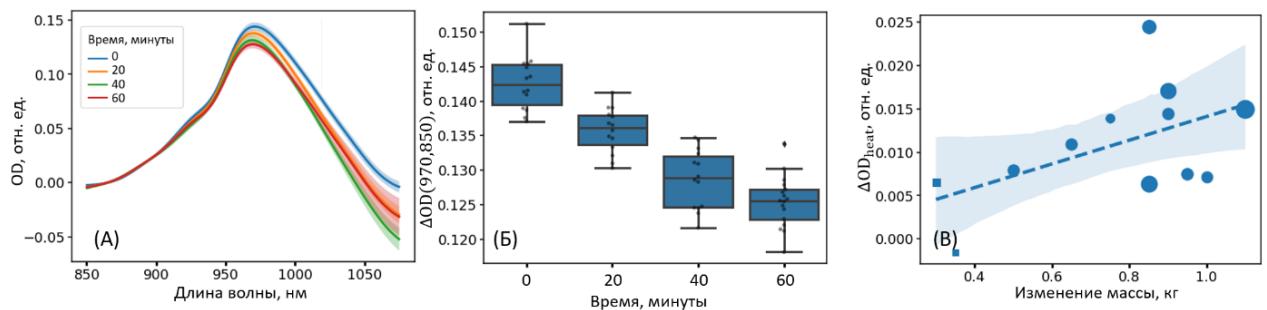


Рисунок 29 — А) Типичные спектры диффузного отражения, полученные во время контрольного измерения и после 20, 40, 60 минут воздействия тепловой нагрузки. Б) Типичная динамика амплитуды полосы поглощения воды во время контрольного измерения и после 20, 40, 60 минут теплового воздействия. В) Зависимость изменения амплитуды полосы поглощения воды от изменения массы тела во время тепловых нагрузок (ΔWI_{heat}), рассчитанная для каждого добровольца. Размер точек пропорционален массе при контрольных измерениях. Квадратами обозначены особи женского пола. Кружками обозначены особи мужского пола.

В данном исследовании были измерены относительные изменения содержания воды в коже до и после последовательных тепловых нагрузок. Значительных изменений не наблюдалось при расстояниях между источником излучения и детектором менее 5 мм. По мере увеличения расстояния отражённый сигнал экспоненциально уменьшается. Таким образом, оптимальное расстояние между источником и детектором было выбрано равным 5 мм. На рисунке 29(А) представлены спектры, измеренные до тепловой нагрузки и непосредственно после 20, 40 и 60 минут пребывания добровольца в сауне соответственно. По спектрам наблюдается уменьшение содержания воды в коже с увеличением продолжительности тепловых нагрузок ($R_{Pearson} = -0,86$, $p_{value} \ll 0.05$, Рисунок 29(А),(Б)) по сравнению с контрольными измерениями. Полученная дисперсия измеренных значений

связана с варьирующейся силой прижатия волоконно-оптического зонда к месту измерения и гетерогенностью кожи. Типичная погрешность при измерении амплитуды полосы поглощения воды с использованием описанного подхода составляла 0.005 (Рисунок 29(Б)).

Аналогичные результаты были получены для всех добровольцев. Была установлена корреляция ($R_{Pearson} = 0.53$, $p_{value} = 0.08$) между максимальными изменениями эффективной оптической плотности при тепловых нагрузках, рассчитанной как $\Delta OD_{heat} = OD(t = 0) - OD(t = 60 \text{ мин})$ изменениями массы тела во время тепловых нагрузок. Кроме того, наблюдается слабая корреляция ($R_{Pearson} = 0.48$, $p_{value} = 0.11$) между ΔOD_{heat} и начальной массой тела. Это объясняется тем, что чем больше начальная масса человека, тем более выражено уменьшение содержания воды в коже (Рисунок 29(В)). Высокая корреляция была отмечена между амплитудой полосы поглощения воды и потерянной массой для каждого добровольца. Средняя потеря массы за 60 минут тепловой нагрузки при 80°C составила 1%, тогда как снижение содержания воды в коже (т.е. уровня гидратации кожи) составило $\sim 10\%$.

Далее была исследована взаимосвязь между гидратацией кожи и уровнем гидратации организма во время физических упражнений.

4.3.2. Дегидратация во время физических нагрузок

В данном эксперименте были измерены относительные изменения содержания воды в коже во время физических нагрузок. Измерения проводились каждые 20 минут в течение часа до и во время физических нагрузок для всех добровольцев. Как и в предыдущем эксперименте, расстояние 5 мм между оптоволокном источника и детектора оказалось наиболее информативным при измерении спектров диффузного отражения. Спектры эффективной оптической плотности для одного из добровольцев представлены на рисунке 30(А). Динамика амплитуды полосы поглощения воды $\Delta OD(970,850)$ исследовалась во время физической нагрузки (Рисунок 30(Б)). Результаты показали, что после первых 20 минут бега наблюдалось

статистически значимое уменьшение ($p_{value} = 0.04$) данной величины. Однако было отмечено, что дальнейшего снижения во время физических нагрузок не происходило, и данная величина стремилась к контрольным значениям.

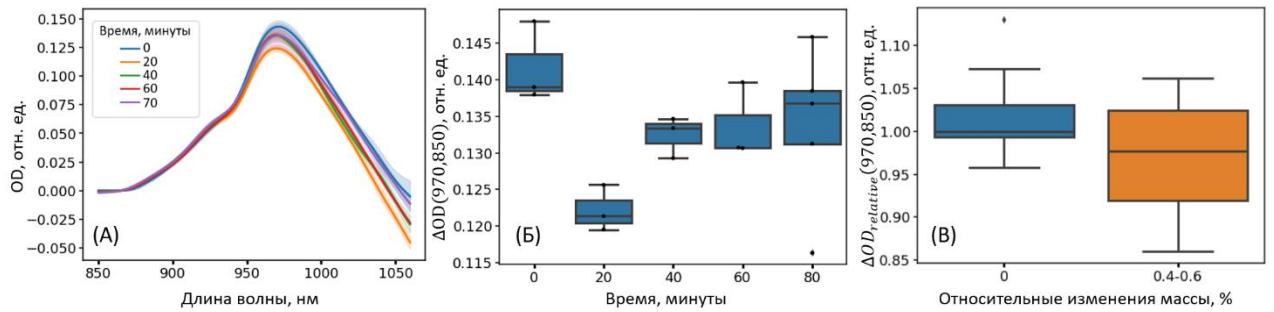


Рисунок 30 — (А) Репрезентативные спектры эффективной оптической плотности, измеренные до и во время физических нагрузок. (Б) Динамика изменения амплитуды полосы поглощения воды, измеренного с кожи, во время физических нагрузок. (В) Зависимость изменения относительного уровня содержания воды в коже от изменения массы тела для всех добровольцев в течение первых 20 минут физических нагрузок.

Аналогичные результаты были получены для всех добровольцев. На рисунке 30(В) показаны относительные изменения амплитуды полосы поглощения воды после 20 минут физических нагрузок по сравнению с контрольными значениями, усреднёнными по всем добровольцам.

Статистически значимое уменьшение наблюдалось для относительного содержания воды в коже после 20 минут физических нагрузок. После первых 20 минут бега содержание воды уменьшилось примерно на 0.5 % массы тела, а содержания воды в коже снизилось на ~5 % ($p_{value} = 0.03$, см. Рисунок 30(В)). У каждого добровольца наблюдалось восстановление относительного уровня содержания воды в коже до контрольных значений. Было оценено максимальное изменение амплитуды полосы поглощения воды в ходе физических нагрузок $\Delta OD_{physical} = \Delta OD(t = 0) - \Delta OD(t = 20 \text{ мин})$, рассчитанная как разница между контрольным значением амплитуды полосы поглощения воды и значением, измеренным после 20 минут физических

нагрузок. Была установлена корреляция ($R_{Pearson} = 0.64$, $p_{value} = 0.03$) между величиной $\Delta OD_{physical}$ и начальным значением $\Delta OD(t = 0)$.

Далее была изучена динамика относительных изменений содержания воды в коже у пациентов с отёчным синдромом, проходящих диуретическую терапию.

4.3.3. Дегидратация во время диуретической терапии у пациентов с отёчным синдромом

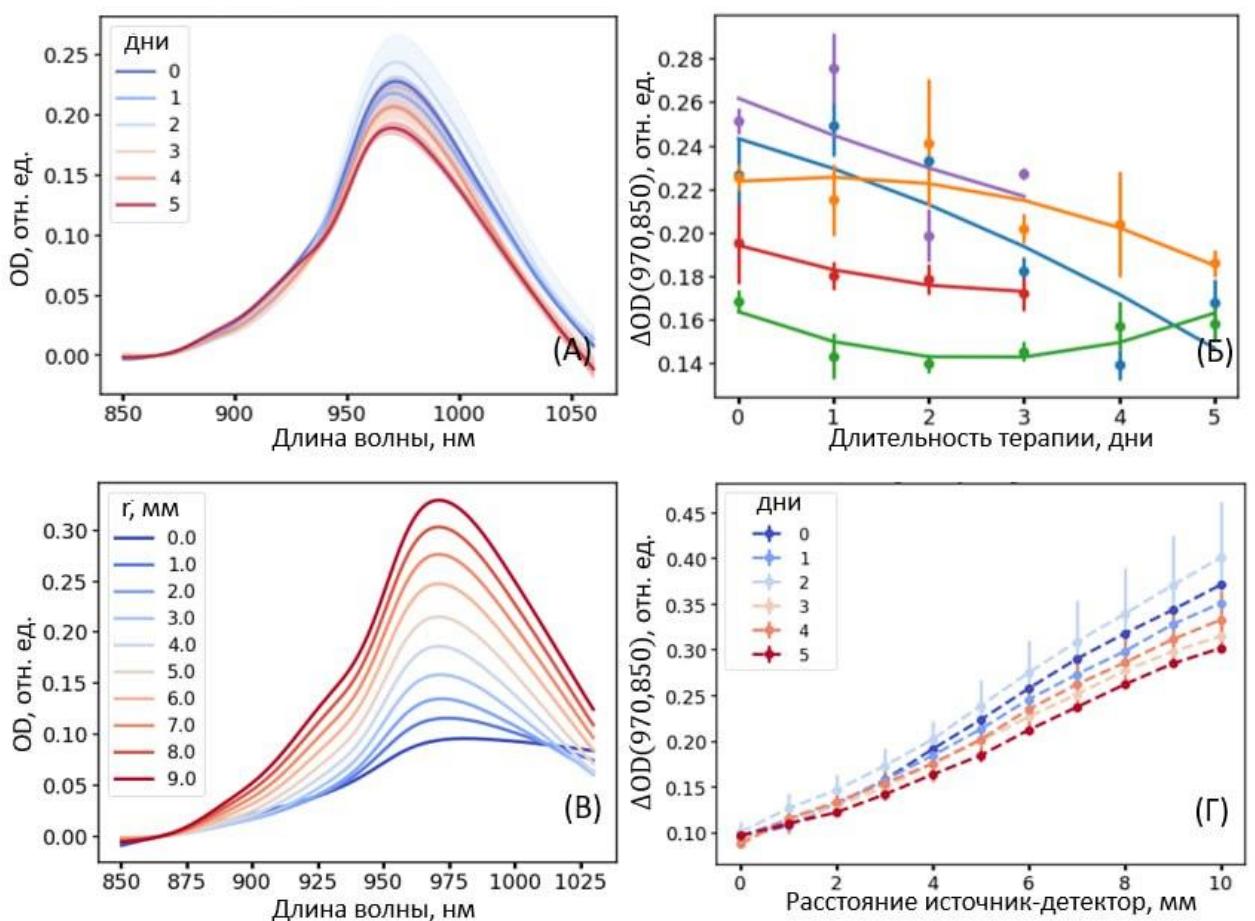


Рисунок 31 — А) Спектры диффузного отражения кожи пациента с наличием отечного синдрома, проходящего диуретическую терапию, которые измерялись ежедневно методом СДО с расстоянием источник-детектор равным 5 мм. Б) Зависимость амплитуды полосы поглощения воды, вычисленной по формуле (2.4) из измеренных спектров СДО, от продолжительности диуретической терапии для каждого пациента. В) Репрезентативные спектры эффективной оптической плотности,

рассчитанные из спектров СДО, измеренных при расстояниях от 0 до 9 мм между источником и детектором с шагом 1 мм. Г) Зависимость амплитуды полосы поглощения воды от расстояния между волокнами, которая измерялась ежедневно для кожи пациентов с отечным синдромом. Пунктирная линия показывает интерполяцию точек с помощью полиномиальной функции.

Спектры диффузного отражения от кожи были измерены во время диуретической терапии у пациентов с отёчным синдромом. Данные измерения проводились при различном расстоянии между волокном источника и детектора, которое изменялось в диапазоне от 0 до 10 мм с шагом 1 мм (Рисунок 31(В)). Представленные спектры демонстрируют локальные максимумы около 930 и 970 нм. Как было показано в предыдущей главе, данные локальные максимумы связаны с поглощением липидов, локализованных в гиподерме, и воды соответственно. Для каждого дня измерялась зависимость амплитуды полосы поглощения воды от расстояния между оптическими волокнами (Рисунок 31(А)). Уменьшение данной величины во время терапии наблюдалось на спектрах, которые были измерены при расстояниях между волокном источника и детектора больше, чем 5 мм.

Данные измерения были проведены для каждого участника исследования. На рисунке 31(Б) представлена зависимость амплитуды полосы поглощения воды $\Delta OD(970,850)$, рассчитанная по спектрам, которые были измерены при расстоянии между оптическими волокнами источника и детектора в 5 мм, от продолжительности диуретической терапии для каждого пациента. Во время ежедневной диуретической терапии наблюдалось статистически значимое уменьшение амплитуды полосы поглощения воды ($R_{Pearson} = -0.75$, $p_{value} < 0.05$ для $d = 5$ мм, Рисунок 31(Г)). Это свидетельствует об уменьшении отечного синдрома. Наряду с наблюдаемым уменьшением содержания воды в коже во время терапии, у некоторых пациентов отмечалось его увеличение данной величины (зелёная кривая на рисунке 30(Б)). Данные

изменения коррелировали с массой тела ($R_{Pearson} = 0.55$, $p_{value} = 0.003$) и соответствовали неэффективной диуретической терапии.

Снижение амплитуды полосы поглощения воды почти на 30% было обнаружено в спектрах диффузного отражения в ходе диуретической терапии на пациентах с отечным синдромом (Рисунки 31(А), 31(Б)). Также стоит отметить, что по мере уменьшения отечного синдрома вклад липидов, локализованных в гиподерме, в отражённый сигнал увеличивался (Рисунок 31(А)). Этот факт указывает на уменьшение толщины дермы вследствие уменьшения отека.

4.4. Взаимосвязь между гидратацией кожи и общим уровнем гидратации организма человека

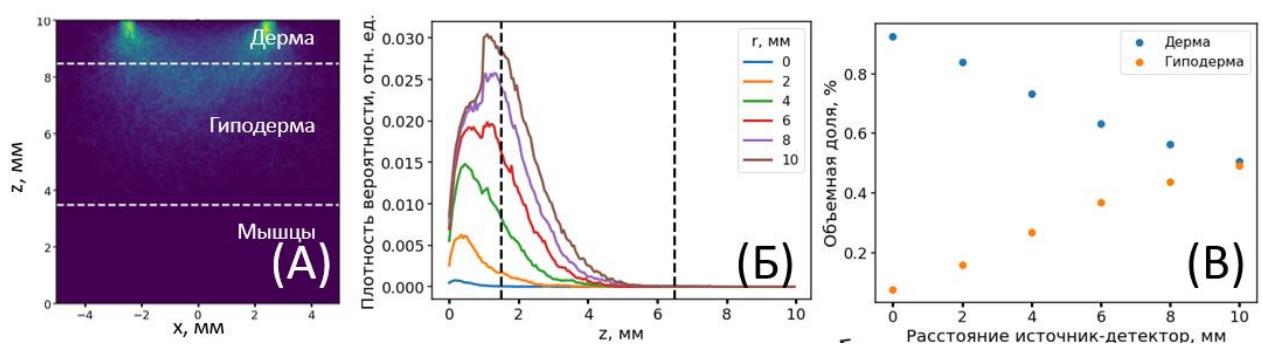


Рисунок 32 — А) Траектории фотонных пакетов, рассчитанные при расстоянии между источником и детектором, равном 5 мм. Б) Одномерная плотность вероятности обнаружения фотонных пакетов при расстояниях между источником и детектором от 0 до 10 мм с шагом 2 мм. В) Зависимости отношения интеграла плотности вероятности обнаружения фотонов, распространяющихся в дерме (синяя кривая) и гиподерме (оранжевая кривая), к общему числу фотонных пакетов, распространяющихся в среде.

Изменения в измеренных спектрах диффузного отражения во время физических и тепловых нагрузок наблюдались при расстояниях между оптоволокнами источника и детектора больше, чем 5 мм. Для меньших расстояний объем детектирования преимущественно расположен в дерме, где нет значительных изменений содержания воды, предположительно вследствие

равного притока и оттока воды при терморегуляции. Для расстояний более 5 мм объем детектирования соответствует гиподерме (Рисунок 32(В)), при этом эккриновые потовые железы расположены ближе к границе дермы и гиподермы [2]. По этим причинам данная конфигурация представляется более чувствительной для мониторинга секреции пота.

Усредненное по всем добровольцам значения уменьшения массы при тепловых нагрузках составило 1%. Более того, наблюдалось уменьшение относительного содержания воды в коже на 10%. Согласно литературным данным [93], средняя суммарная масса кожи составляет 15% от общей массы человека. При обезвоживании кожи на 10%, учитывая, что массовая концентрация воды в дерме составляет 70% [27], ожидаемое уменьшение общего уровня воды будет около 1%. Это соответствует полученным результатам. Была также обнаружена корреляция между максимальными изменениями содержания воды ΔOD_{heat} , полученными в ходе тепловых нагрузок, и изменениями массы во время тепловых нагрузок и начальной массой. Эти результаты объясняются тем, что скорость секреции пота пропорциональна общей массе тела человека.

Кроме того, была обнаружена отрицательная корреляция между начальным значением амплитуды полосы поглощения липидов и максимальными изменениями содержания воды $\Delta OD_{physical}$, полученными в ходе физических нагрузок. Ранее в главе 2 было обнаружено, что амплитуда полосы поглощения липидов около 930 нм коррелирует с толщиной дермы. Это означает, что чем ниже данная амплитуда, тем больше толщина дермы. Таким образом, с увеличением толщины дермы увеличиваются максимальные изменения содержания воды во время физических нагрузок. Когда организм активно теряет воду через потоотделение, более толстая дерма может поглощать и сохранять больше воды. Это приводит к увеличению максимальных изменений содержания воды в дерме.

Во время тепловых нагрузок, в отличие от физических нагрузок, восстановление содержания воды в коже не наблюдалось. Различные типы кинетики дегидратации при этих воздействиях, вероятно, связаны с различными механизмами потоотделения [94]. Обсуждение данных механизмов выходит за рамки данной работы. Во время диуретической терапии наблюдалось уменьшение амплитуды полосы поглощения воды на 30%. Как ранее показано в главе 3 эти изменения преимущественно обусловлены не только снижением концентрации воды в дерме, а и уменьшением толщины дермы вследствие потери воды. Полученные результаты полезны при разработке портативного устройства для определения уровня гидратации кожи, в первую очередь при выборе длин волн светодиодных источников и расстояний от них до детектирующих фотодиодов.

4.5. Определение состава тела человека с помощью спектроскопии диффузного отражения с пространственным разрешением

В рамках данной главы также была исследована задача по определению состава тела организма человека: общего уровня жировой и безжировой массы тела человека помощью СДО с пространственным разрешением. В качестве референсного метода использовался мультиспектральный биоимпедансный анализ (МБА) тела. Полученные результаты демонстрируют, что СДО с пространственным разрешением может использоваться в качестве независимого метода для анализа состава тела. При этом средняя абсолютная ошибка процентного содержания жира составила 3.5% а для определения безжировой массы 3.3%.

4.6. Объекты и методы исследования.

4.6.1. Описание выборки

В исследовании приняли участие 292 добровольца: 102 особей мужского пола и 190 особей женского пола. В данном исследовании для каждого добровольца проводилось измерение с помощью МБА. Также проводились

измерение с помощью СДО с пространственным разрешением от кожи для каждого добровольца. Среднее значение по выборке индекса массы тела (ИМТ) добровольцев составил 24 кг/м², при этом минимальное значение в выборке составило 17 кг/м² и максимальное 49.7 кг/м². Все участники добровольно прошли исследование и были информированы о его целях. Все измерения были неинвазивными и не требовали одобрения этическим комитетом.

4.6.2. Мультиспектральный биоимпедансный анализ

Для оценки состава тела в качестве референсного метода использовался мультиспектральный биоимпедансный анализатор InBody 770. Данный прибор позволяет определить жировую массу тела и безжировую массу тела по измеренному импедансу тела на различных частотах переменного электрического тока. Различные типы биотканей, такие как жир, мышцы, кости обладают разной способностью проводить электрический ток, что позволяет оценивать состав тела с помощью данного метода. Измерения проводились согласно рекомендациям производителя. Вес тела m измерялся с помощью данного устройства. Рост H и пол вводились в прибор в процессе измерения. ИМТ рассчитывался как $ИМТ = m/H^2$, где m – вес добровольца в кг, H – рост добровольца в м².

Для вычисления процентного содержания жира и процентного содержания безжировой массы тела абсолютные значения жира и безжировой массы, которые были измерены с помощью МБА, нормировались на вес добровольца и умножались на 100%.

4.6.3. Измерение спектров диффузного отражения

Экспериментальная установка, реализующая СДО с пространственным разрешением, подробно описана в главе 3. Основное отличие состояло в том, что в данном эксперименте спектры диффузного отражения измерялись при расстояниях между источником и детектором от 0 до 14 мм с шагом 1 мм

(Рисунок 33(А)). Для каждого добровольца измерения производились на внутренней части предплечья руки.

4.6.4. Описание построения модели и ее валидация

Для определения процентного содержания жировой и безжировой массы тела по данным СДО была построена модель линейной регрессии. Для этого в качестве входных данных были использованы значения эффективной оптической плотности, измеренные с помощью СДО и физиологические параметры добровольцев (пол, возраст, ИМТ). По спектрам эффективной оптической плотности по формуле (2.3) рассчитывались значения $\Delta OD(\lambda, 850)$ для каждой выбранной длины волны λ в нм. Были рассмотрены три набора данных, по которым были построены модели линейной регрессии:

1. В качестве базовой модели использовались значения величин $\Delta OD(\lambda, 850)$, рассчитанные по формуле (2.3) для длин волн $\lambda = 930$ и 970 нм по спектрам эффективной оптической плотности, измеренным при расстоянии между оптоволокном источника и детектора, равном 10 мм (Рисунок 33(Г)).
2. Во втором наборе признаков использовались значения величин $\Delta OD(\lambda, 850)$, рассчитанные по формуле (2.3) для длин волн $890, 930, 970, 1015$ и 1050 нм по спектрам эффективной оптической плотности, которые были измерены при расстояниях между оптоволокном источника и детектора в диапазоне от 2 мм до 14 мм с шагом 2 мм.
3. В третьем наборе использовались данные СДО и физиологические параметры добровольцев: ИМТ, пол, вес, возраст и значения величин $\Delta OD(\lambda, 850)$ при $\lambda = 930$ нм и 970 нм, рассчитанные по формуле (2.3) по спектрам эффективной оптической плотности, которые были измерены при расстояниях между оптоволокном источника и детектора равными 4 мм, 10 мм и 14 мм. ИМТ дополнительно был преобразован в обратную величину IMT^{-1} , а пол был закодирован методом one-hot encoding («женский» = 1 , «мужской» = 0).

На описанных выше наборах данных были построены модели линейной регрессии. Так как значения эффективной оптической плотности для близких по значению длин волн и расстояний скоррелированы между собой, определение целевых параметров по такому набору данных с помощью линейной регрессии может привести к большой ошибке. Поэтому для устранения проблемы мультиколлинеарности входных параметров, была применена регуляризация, в виде линейной комбинации L_1 и L_2 регуляризаций. Для каждой из моделей оптимизировались параметры регуляризации: общий вклад регуляризации в функцию потерь и параметр регуляризации, связанный с L_1 регуляризацией. Оптимальные значения параметров регуляризации были найдены с помощью кросс-валидации, при которой весь набор данных был разделен на 7 выборок случайным образом. Все входные параметры были предварительно нормализованы путем вычитания медианного значения параметра и деления на интерквартильный размах значений параметра в полном наборе данных. Построение моделей линейной регрессии по определению процентного содержания жировой и безжировой массы тела происходило независимо друг от друга.

Ошибка определения процентного содержания жировой массы и безжировой массы оценивалась по величине средней абсолютной ошибки, которая рассчитывалась на валидационных выборках, полученных с помощью случайной кросс-валидации. Дополнительно представлены коэффициенты корреляции Пирсона, рассчитанные между значениями процентного содержания жировой массы и безжировой массы, полученными с помощью линейной регрессии по данным СДО, и измеренными значениями с помощью МБА. Обработка данных и построение моделей осуществлялись с использованием пользовательских скриптов на Python 3 с применением библиотек Numpy, Pandas, Matplotlib, Scikit-learn [99].

4.7. Определение процентного содержания жировой и безжировой массы тела

Основной задачей исследования было определить параметры состава тела (уровень жировой массы и безжировой массы тела), которые были измерены методом МБА, на основе данных СДО с помощью линейной регрессии. Как было указано выше, в качестве базовой модели использовалась линейная регрессия, которая в качестве входных данных использует величины $\Delta OD(930,850)$ и $\Delta OD(970,850)$, рассчитанные из спектров эффективной оптической плотности, измеренных при расстоянии между оптоволокном источника и детектора, равном 10 мм. Было обнаружено, что средние абсолютные ошибки определения содержания жира и процентного содержания безжировой массы с использованием данной модели, оцененные с помощью кросс-валидации, составили 5.6% и 5.3% соответственно ($R_{Pearson} = 0.76$ для обеих моделей). При этом наблюдалось высокая ошибка определения для пациентов с ИМТ $> 30 \text{ кг}/\text{м}^2$.

В качестве следующего шага была рассмотрена возможность использования информации о пространственном распределении воды и липидов. Для этого был проведен расчет величин $\Delta OD(\lambda, 850)$ по формуле (2.3) для следующего набора длин волн λ : 890, 930, 970, 1015 и 1050 нм. Расчет данных параметров был проведен для спектров оптической плотности, которые были измерены при расстояниях между источником и детектором от 2 до 14 мм с шагом 2 мм (всего 35 параметров). Установлено, что модель линейной регрессии с регуляризацией, построенная таким образом, позволила определять содержание жира с абсолютной ошибкой определения равной 4.7% и $R_{Pearson} = 0.83$, а безжировую массу — 4.5% и $R_{Pearson} = 0.84$ (Рисунок 33(Б) и (В)), что статистически значимо лучше по сравнению с результатами, полученными с помощью базовой моделью ($p_{value} < 10^{-4}$).

В финальной модели линейной регрессии с регуляризацией качестве входных данных были использованы физиологические параметры (возраст,

пол и ИМТ), а также величины $\Delta OD(930,850)$ и $\Delta OD(970,850)$, которые были рассчитаны по спектрам эффективной оптической плотности для расстояний между волокнами источника и детектора 4, 10 и 14 мм. Это позволило существенно повысить точность определения целевых параметров: средняя абсолютная ошибка снизилась до 3.5% для содержания жира и до 3.3% для определения безжировой массы при коэффициенте корреляции $R_{Pearson} = 0.93$. Оценка ошибки определения для финальной модели, полученные в ходе кросс-валидации, представлены на рисунках 33(Д), 32(Е).

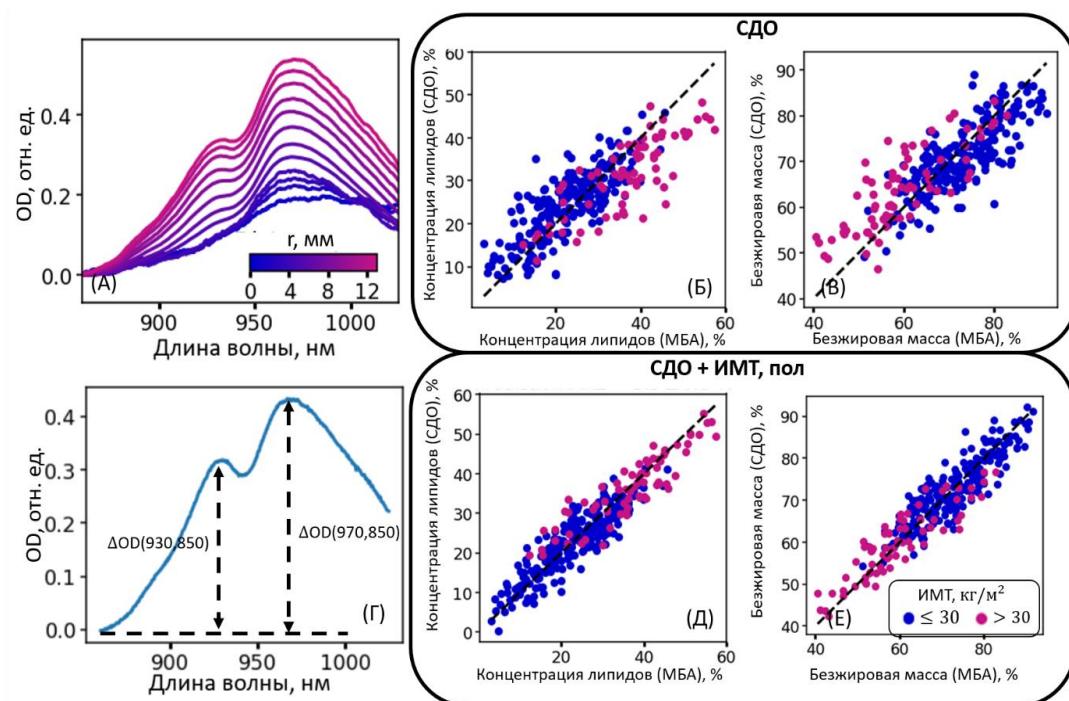


Рисунок 33 — А) Репрезентативные спектры эффективной оптической плотности, рассчитанные из спектров СДО, измеренных при расстояниях от 0 до 12 мм между волокном источника и детектором. Зависимость значений содержания жира Б) и безжировой массы В), полученных по данным СДО с помощью линейной регрессии, от значений, полученных с помощью МБА. Г) Схема расчета величин $\Delta OD(930,850)$ и $\Delta OD(970,850)$, определяющих амплитуду полосы поглощения липидов и воды в измеряемых спектрах. Зависимость значений содержания жира Д) и безжировой массы Е), полученных по данным СДО и метаданным (возраст, пол, ИМТ) с помощью линейной регрессии, от значений, полученных с помощью МБА.

Учитывая, что независимые исследования демонстрируют коэффициент корреляции $R_{Pearson} = 0.93$ при определении содержания жира с использованием мультиспектрального биоимпедансного анализа InBody 770 и рентгеновской остеоденситометрии [43,100], можно сделать вывод о том, что точность, достигаемая методом СДО с пространственным разрешением, близка к теоретическому максимуму, обусловленному погрешностью МБА. Важно отметить, что в разработанной модели ошибка определения не зависела от значения ИМТ: для пациентов с ожирением и здоровых пациентов она оставалась на одном уровне.

4.8. Выводы

В данной главе было проведено измерение динамики дегидратации и регидратации кожи в ответ на различные физиологические воздействия: тепловые нагрузки, физические нагрузки и диуретическую терапию. Изменения в спектрах СДО при физиологических воздействиях на организм наблюдаются при расстоянии между источником и детектором более 5 мм, что соответствует распространению света в гиподерме, где расположены потовые железы. Для обоих типов нагрузок характерная величина изменения массы тела составила 1%, а изменение амплитуды полосы поглощения воды — 10%. Согласно литературным данным, общая масса кожи составляет $\sim 15\%$ от общей массы человека, и при дегидратации кожи на 10% ожидаемое изменение общего уровня воды в организме составляет около 1%, что согласуется с полученными результатами. Таким образом, относительные изменения амплитуды полосы поглощения воды, определяемые методом СДО, свидетельствуют об уровне общей гидратации организма человека. Стоит отметить, что при тепловых нагрузках восстановление гидратации не наблюдалось в течение всего эксперимента длительностью 140 минут, в отличие от физических нагрузок, при которых восстановление гидратации происходило после 40 минут физических нагрузок. Различия в кинетике дегидратации при этих воздействиях связаны с различными механизмами потоотделения. При диуретической терапии отмечалось уменьшение

амплитуды полосы поглощения воды на 30%, что связано не только с уменьшением концентрации воды в дерме, но и с уменьшением толщины дермы при уменьшении отека.

Помимо этого, полученные результаты демонстрируют, что СДО с пространственным разрешением может использоваться в качестве независимого метода для анализа состава тела с точностью, близкой к биоимпеданскому анализу: для определения содержания жира средняя абсолютная ошибка составила 3.5% а для определения безжировой массы 3.3%. Коэффициент корреляции Пирсона между показателями, измеренные с помощью биоимпедансного анализа и показателями, полученными с помощью линейной регрессии по данным СДО, составил $R_{Pearson} = 0.93$. Учитывая более низкую стоимость и компактность оборудования, можно утверждать, что разработанный метод может быть полезным для анализа состава тела в условиях ограниченного доступа к эталонным клиническим методам, таким как КТ, МРТ, УЗИ. По результатам экспериментов был опубликован патент “Способ неинвазивного определения содержания воды в коже.”

Заключение

В ходе работы был разработан метод, основанный на спектроскопии диффузного отражения с пространственным разрешением, который позволяет определить содержание воды и липидов в коже, а также измерить толщины верхних слоёв кожи — дермы и гиподермы. Используя экспериментальные данные СДО и результаты моделирования распространения света в коже методом Монте-Карло, были разработаны модели для определения концентрации воды в дерме и толщин этих кожных слоёв.

В диссертационной работе были получены следующие основные результаты:

- Было проведено сравнение алгоритмов определения содержания воды в коже по данным спектроскопии диффузного отражения на основе открытой базы данных спектров диффузного отражения кожи человека НИСТ и численно смоделированных спектров диффузного отражения однородной модели кожи. Было обнаружено, что оценки концентрации воды, для которых используются интенсивные полосы поглощения воды на длинах волн 1450 и 1920 нм, слабо коррелируют с оценкой содержания воды, сделанной по локальному максимуму поглощения на длине волны 970 нм, что связано с различной глубиной проникновения света на указанных длинах волн и, тем самым, влиянием толщины дермы на отраженный сигнал.
- Установлено, что количественная оценка содержания воды по полосы поглощения на длине волны 970 нм подвержена влиянию изменений концентрации оксигемоглобина из-за наложения спектров поглощения оксигемоглобина и воды в диапазоне 800–1000 нм. Несмотря на это локальный максимум поглощения воды на длине волны 970 нм может быть использован для определения содержания воды в глубоких слоях кожи, что экспериментально подтверждено на фантомах кожи человека.

- Был проведен сравнительный анализ оптических методов для клинической оценки отека кожи, с помощью спектроскопии КР, СДО и мультиспектральную визуализации. В динамике гистаминового отека наблюдалось увеличение содержания воды в пределах от 17% до 70% в зависимости от метода измерения. Это сопровождалось уменьшением компоненты, связанной с липидами, в случае СДО и интенсивности полосы С-Н в случае КР спектроскопии. Также рассматривалась другая модель отека, основанная на венозной окклюзии. Показано, что рамановская спектроскопия позволяет наблюдать увеличение отношения О-Н/С-Н при венозной окклюзии. Амплитуда такого изменения примерно вдвое меньше, чем при гистаминовом отеке, и изменения происходят в основном за счет уменьшения амплитуды полосы С-Н. При измерениях с помощью КР спектроскопии были выявлены некоторые артефакты, которые могут затруднить наблюдение реальной картины динамики гидратации. Один из них связан с неоднородностью тканей, например, наличием крупных сосудов в зоне измерения. Еще одной особенностью, усложняющей количественную оценку воды с помощью рамановской спектроскопии, является изменчивость флуоресцентного фона из-за присутствия кожного сала на поверхности кожи. Было установлено, что полученные изменения с помощью СДО по эффективной оптической плотности являются результатом изменения не только концентрации воды, но и морфологическим изменениям кожи при отеке – увеличению толщины дермы.
- С помощью метода СДО с пространственным разрешением исследована возможность определения физиологических параметров кожи *in vivo* на модели кожного отека и на нормальной коже. Интересующие параметры включали (1) концентрацию воды в дерме, (2) толщину дермы и (3) толщину гиподермы. Разработанный метод позволил получить коэффициент корреляции Пирсона 0.89 между толщиной дермы,

измеренной при УЗИ, и амплитудой поглощения воды, полученной с помощью СДО при отеке кожи. Были построены модели машинного обучения для определения толщины дермы и гиподермы нормальной кожи *in vivo* с использованием данных СДО с пространственным разрешением при относительной ошибке 8.3% и 23.4% соответственно.

- Экспериментально было установлено, что при дегидратации в ходе термоагрегатов в 80 °С потеря 1% массы тела соответствует снижению увлажненности кожи на 10%.
- Была разработана модель, которая по данным спектроскопии диффузного отражения с пространственным разрешением, при использовании мультиспектрального биоимпедансного анализа в качестве референсного метода, определяет содержание жировой массы и безжировой массы со средней ошибкой определения 3.5% и 3.3% соответственно.
- Была определена оптимальная оптическая конфигурация источник-детектор: количество источников, количество детекторов, расстояния между источниками и детекторами для портативного устройства по определению содержания воды и липидов в коже.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность научным руководителям, Ширшину Евгению Александровичу и Фадееву Виктору Владимировичу, за неоценимый опыт, полученный в процессе подготовки данной диссертации. Ваш профессионализм и всесторонняя помощь на каждом этапе исследования способствовали формированию убедительного обоснования полученных результатов. Также автор выражает особую благодарность Будылину Глебу Сергеевичу и Якимову Борису Павловичу. Без вашего внимания и экспертной оценки достижение поставленных целей было бы невозможно. Отдельная благодарность адресуется коллективу лаборатории лазерной биофотоники кафедры квантовой электроники физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова за создание комфортной рабочей атмосферы, поддержку и содействие в научной деятельности. Особая признательность автор выражает семье и друзьям за понимание и заботу. Вы всегда были и остаетесь для меня надежной опорой на всем пути моей работы.

Публикации автора по теме диссертации

Публикации в рецензируемых научных журналах, удовлетворяющих

Положению о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова

- A1. Якимов Б.П., **Давыдов Д.А.**, Фадеев В.В., Будылин Г.С., Ширшин Е.А. *Сравнительный анализ методов количественного определения содержания воды в коже по данным спектроскопии диффузного отражения* // Квантовая электроника, 2020, Т. 50, № 1, С. 41–46. Импакт-фактор 1,041 (РИНЦ). EDN: YHAJCZ. Общий объем статьи = 0,625 п.л., личный вклад = 0,5 п.л.
- Переводная версия: Yakimov B.P., **Davydov D.A.**, Fadeev V.V., Budylin G.S., Shirshin E.A. *Comparative analysis of the methods for quantitative determination of water content in skin from diffuse reflectance spectroscopy data* // Quantum Electronics, 2020, Vol. 50, No. 1, P. 41–46. Импакт-фактор 1,194 (JIF). EDN: YSYLSE. Общий объем статьи = 0,625 п.л., личный вклад = 0,5 п.л.
- A2. Budylin G.S., **Davydov D.A.**, Zlobina N.V., Baev A.V., Artyushenko V.G., Yakimov B.P., Shirshin E.A. *In vivo sensing of cutaneous edema: A comparative study of diffuse reflectance, Raman spectroscopy and multispectral imaging* // Journal of Biophotonics, 2022, Vol. 15, No. 1, P. e202100268. Импакт-фактор 3,39 (JIF). EDN: BNTPIX. Общий объем статьи = 1,563 п.л., личный вклад = 1,4 п.л.
- A3. **Davydov D.A.**, Budylin G.S., Baev A.V., Vaypan D.V., Seredenina E.M., Matskeplishvili S.T., Evlashin S.A., Kamalov A.A, Shirshin E.A. *Monitoring the skin structure during edema in vivo with spatially resolved diffuse reflectance spectroscopy* // Journal of Biomedical Optics, 2023, Vol. 28, No. 5, P. 057002. Импакт-фактор 3,0 (JIF). EDN: OUXDUB. Общий объем статьи = 0,625 п.л., личный вклад = 0,5 п.л.
- A4. Shirshin E., Yakimov B., **Davydov D.**, Baev A., Budylin G., Fadeev N., Kopytina D., Urusova L., Pachuashvili N., Vasyukova O., Mokrysheva N. *Body composition analysis via spatially resolved NIR spectroscopy with multifrequency bioimpedance precision* // Analytical Methods, 2024, Vol. 16, No. 2, P. 175–178. Импакт-фактор 2,7 (JIF). EDN: RBYQBI. Общий объем статьи = 0,375 п.л., личный вклад = 0,3 п.л.¹

¹ Была исправлена опечатка: добавлен пропущенный соавтор Daria Kopytina.

A5. **Davydov D.A.**, Budylin G.S., Baev A.V., Vaipan D.V., Seredenina E.M., Kamalov A.A., Shirshin E.A. *Skin dehydration monitoring with optical spectroscopy allows assessment of water content in the organism: Thermal and physical loads, diuretic therapy* // Journal of Biophotonics, 2025, Vol. 18, No. 6, P. e202300509. Импакт-фактор 3,39 (JIF). EDN: DWRUYQ. Общий объем статьи = 1,0 п.л., личный вклад = 0,8 п.л.

Список литературы

1. Тучин В.В. Оптическая биомедицинская диагностика. В 2 т. Т. 1. Ай Пи Ар Медиа, 2021.
2. Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V. V. Optical properties of skin, subcutaneous, and muscle tissues: a review // J Innov Opt Health Sci. World Scientific Publishing Co., 2011. Vol. 04, № 01. P. 9–38.
3. Smith A.G. et al. Objective determination of peripheral edema in heart failure patients using short-wave infrared molecular chemical imaging // J Biomed Opt. SPIE, 2021. Vol. 26, № 10. P. 105002.
4. Baker L.B. et al. Normative data for regional sweat sodium concentration and whole-body sweating rate in athletes // J Sports Sci. Routledge, 2016. Vol. 34, № 4. P. 358–368.
5. Gurjarpadhye A.A. et al. Effect of localized mechanical indentation on skin water content evaluated using OCT // Journal of Biomedical Imaging. Hindawi Limited London, UK, United Kingdom, 2011. Vol. 2011. P. 1–8.
6. Stamatas G.N., Southall M., Kollias N. In vivo monitoring of cutaneous edema using spectral imaging in the visible and near infrared // Journal of Investigative Dermatology. Elsevier, 2006. Vol. 126, № 8. P. 1753–1760.
7. Perkov S.A., Gorin D.A., Esenaliev R.O. Optoacoustic monitoring of water content in tissue phantoms and human skin // J Biophotonics. John Wiley & Sons, Ltd, 2021. Vol. 14, № 3. P. e202000363.
8. Warren R. V et al. Diffuse optical spectroscopic method for tissue and body composition assessment // J Biomed Opt. 2022. Vol. 27, № 6. P. 065002.
9. Perekatova V. et al. VIS-NIR diffuse reflectance spectroscopy system with self-calibrating fiber-optic probe: study of perturbation resistance // Diagnostics. MDPI, 2023. Vol. 13, № 3. P. 457.
10. Turchin I. et al. Multimodal Optical Monitoring of Auto-and Allografts of Skin on a Burn Wound // Biomedicines. MDPI, 2023. Vol. 11, № 2. P. 351.
11. Choe C., Lademann J., Darvin M.E. Depth profiles of hydrogen bound water molecule types and their relation to lipid and protein interaction in the human stratum corneum: In vivo // Analyst. Royal Society of Chemistry, 2016. Vol. 141, № 22. P. 6329–6337.
12. Choe C. et al. A modification for the calculation of water depth profiles in oil-treated skin by in vivo confocal Raman microscopy // J Biophotonics. Wiley Online Library, 2020. Vol. 13, № 1. P. e201960106.

13. Sdobnov A.Y. et al. Hydrogen bound water profiles in the skin influenced by optical clearing molecular agents—Quantitative analysis using confocal Raman microscopy // *J Biophotonics*. Wiley Online Library, 2019. Vol. 12, № 5. P. e201800283.
14. Anderson R.R. et al. In vivo determination of dermal water content in chronological skin aging by confocal Raman spectroscopy // *J Biomed Opt.* 2015/11/30 / ed. Sumner A.E. Moscow, Russia: John Wiley & Sons, Ltd, 2019. Vol. 10, № 1. P. 1–9.
15. Smolyanskaya O.A. et al. Terahertz biophotonics as a tool for studies of dielectric and spectral properties of biological tissues and liquids // *Prog Quantum Electron.* 2018. Vol. 62. P. 1–77.
16. Hull E.L., Foster T.H. Noninvasive near-infrared hemoglobin spectroscopy for in vivo monitoring of tumor oxygenation and response to oxygen modifiers // *Proc.SPIE.* 1997. Vol. 2979. P. 355–364.
17. Wada H. et al. Water and lipid content of breast tissue measured by six-wavelength time-domain diffuse optical spectroscopy // *J Biomed Opt.* SPIE, 2022. Vol. 27, № 10. P. 105002.
18. Chen Y.-W., Tseng S.-H. Efficient construction of robust artificial neural networks for accurate determination of superficial sample optical properties // *Biomed Opt Express.* Optica Publishing Group, 2015. Vol. 6, № 3. P. 747–760.
19. Tsui S.-Y. et al. Modelling spatially-resolved diffuse reflectance spectra of a multi-layered skin model by artificial neural networks trained with Monte Carlo simulations // *Biomed Opt Express.* Optica Publishing Group, 2018. Vol. 9, № 4. P. 1531–1544.
20. Ivančič M. et al. Efficient estimation of subdiffusive optical parameters in real time from spatially resolved reflectance by artificial neural networks // *Opt Lett.* Optica Publishing Group, 2018. Vol. 43, № 12. P. 2901–2904.
21. Geldof F. et al. Layer thickness prediction and tissue classification in two-layered tissue structures using diffuse reflectance spectroscopy // *Sci Rep.* 2022. Vol. 12, № 1. P. 1698.
22. Rudraiah P.S., Duadi H., Fixler D. Bottom layer absorption coefficients extraction from two-layer phantoms based on crossover point in diffuse reflectance // *J Biomed Opt.* SPIE, 2021. Vol. 26, № 11. P. 117001.
23. Rudraiah P.S., Duadi H., Fixler D. Extraction of optical properties from a turbid medium using fiber probe for spectral and spatial diffuse reflectance

- measurement // OSA Contin. Optica Publishing Group, 2021. Vol. 4, № 2. P. 762–773.
24. Cooksey C.C., Tsai B.K., Allen D.W. A collection and statistical analysis of skin reflectance signatures for inherent variability over the 250 nm to 2500 nm spectral range // Proc.SPIE. 2014. Vol. 9082. P. 908206.
 25. Alerstam E. et al. Next-generation acceleration and code optimization for light transport in turbid media using GPUs // Biomed Opt Express. Optica Publishing Group, 2010. Vol. 1, № 2. P. 658–675.
 26. Jacques S.L. Optical properties of biological tissues: a review // Phys Med Biol. IOP Publishing, 2013. Vol. 58, № 11. P. R37.
 27. Téllez-Soto C.A. et al. In vivo determination of dermal water content in chronological skin aging by confocal Raman spectroscopy // Vib Spectrosc. 2021. Vol. 112. P. 103196.
 28. Aaboubout Y. et al. Intraoperative assessment of resection margins by Raman spectroscopy to guide oral cancer surgery // Analyst. The Royal Society of Chemistry, 2023. Vol. 148, № 17. P. 4116–4126.
 29. Bremer A.A. et al. Adipose Tissue Dysregulation in Patients with Metabolic Syndrome // J Clin Endocrinol Metab. 2011. Vol. 96, № 11. P. E1782–E1788.
 30. Bassaganya-Riera J. et al. PPAR γ is highly expressed in F4/80hi adipose tissue macrophages and dampens adipose-tissue inflammation // Cell Immunol. 2009. Vol. 258, № 2. P. 138–146.
 31. Lê K.-A. et al. Subcutaneous Adipose Tissue Macrophage Infiltration Is Associated With Hepatic and Visceral Fat Deposition, Hyperinsulinemia, and Stimulation of NF- κ B Stress Pathway // Diabetes. 2011. Vol. 60, № 11. P. 2802–2809.
 32. Lee Y.S. et al. Increased adipocyte O₂ consumption triggers HIF-1 α , causing inflammation and insulin resistance in obesity // Cell. Elsevier, 2014. Vol. 157, № 6. P. 1339–1352.
 33. Goossens G.H. et al. Increased Adipose Tissue Oxygen Tension in Obese Compared With Lean Men Is Accompanied by Insulin Resistance, Impaired Adipose Tissue Capillarization, and Inflammation // Circulation. American Heart Association, 2011. Vol. 124, № 1. P. 67–76.
 34. Samuvel D.J. et al. TLR4 Activation and IL-6-Mediated Cross Talk between Adipocytes and Mononuclear Cells Synergistically Stimulate MMP-1 Expression // Endocrinology. 2011. Vol. 152, № 12. P. 4662–4671.

35. Karolina D.S. et al. MicroRNA 144 Impairs Insulin Signaling by Inhibiting the Expression of Insulin Receptor Substrate 1 in Type 2 Diabetes Mellitus // PLoS One. Public Library of Science, 2011. Vol. 6, № 8. P. e22839--.
36. Wortsman X. Ultrasound of the Subcutaneous Tissue // Measuring the Skin / ed. Humbert P. et al. Cham: Springer International Publishing, 2016. P. 1–12.
37. Armstrong L.E. Hydration Assessment Techniques // Nutr Rev. 2005. Vol. 63, № suppl_1. P. S40–S54.
38. Francesconi R.P. et al. Urinary and hematologic indexes of hypohydration // J Appl Physiol. American Physiological Society, 1987. Vol. 62, № 3. P. 1271–1276.
39. Lahav Y., Goldstein N., Gepner Y. Comparison of body composition assessment across body mass index categories by two multifrequency bioelectrical impedance analysis devices and dual-energy X-ray absorptiometry in clinical settings // Eur J Clin Nutr. 2021. Vol. 75, № 8. P. 1275–1282.
40. Davydov D.M., Boev A., Gorbunov S. Making the choice between bioelectrical impedance measures for body hydration status assessment // Sci Rep. 2021. Vol. 11, № 1. P. 7685.
41. Stamatas G.N., Southall M., Kollias N. In vivo monitoring of cutaneous edema using spectral imaging in the visible and near infrared // Journal of investigative dermatology. Elsevier, 2006. Vol. 126, № 8. P. 1753–1760.
42. Choe C. et al. A modification for the calculation of water depth profiles in oil-treated skin by in vivo confocal Raman microscopy // J Biophotonics. Wiley Online Library, 2020. Vol. 13, № 1. P. e201960106.
43. Choe C., Lademann J., Darvin M.E. Depth profiles of hydrogen bound water molecule types and their relation to lipid and protein interaction in the human stratum corneum in vivo // Analyst. Royal Society of Chemistry, 2016. Vol. 141, № 22. P. 6329–6337.
44. Smolyanskaya O.A. et al. Terahertz biophotonics as a tool for studies of dielectric and spectral properties of biological tissues and liquids // Prog Quantum Electron. 2018. Vol. 62. P. 1–77.
45. Perkov S. et al. Optical Based Methods for Water Monitoring in Biological Tissue // J Biophotonics. John Wiley & Sons, Ltd, 2025. Vol. n/a, № n/a. P. e202400438.

46. Perkov S.A., Gorin D.A., Esenaliev R.O. Optoacoustic monitoring of water content in tissue phantoms and human skin // *J Biophotonics*. Wiley Online Library, 2021. Vol. 14, № 3. P. e202000363.
47. Eklouh-Molinier C. et al. Investigating the relationship between changes in collagen fiber orientation during skin aging and collagen/water interactions by polarized-FTIR microimaging // *Analyst*. Royal Society of Chemistry, 2015. Vol. 140, № 18. P. 6260–6268.
48. Mogensen M. et al. In vivo thickness measurement of basal cell carcinoma and actinic keratosis with optical coherence tomography and 20-MHz ultrasound // *British Journal of Dermatology*. Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, 2009. Vol. 160, № 5. P. 1026–1033.
49. Shirshin E.A. et al. Two-photon autofluorescence lifetime imaging of human skin papillary dermis in vivo: assessment of blood capillaries and structural proteins localization // *Sci Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 1171.
50. Shirshin E.A. et al. In vivo optical imaging of the viable epidermis around the nailfold capillaries for the assessment of heart failure severity in humans // *J Biophotonics*. John Wiley & Sons, Ltd, 2018. Vol. 11, № 9. P. e201800066.
51. Wilson R.H. et al. Review of short-wave infrared spectroscopy and imaging methods for biological tissue characterization // *J Biomed Opt.* 2015. Vol. 20, № 3. P. 030901.
52. Iwasaki H., Miyazawa K., Nakauchi S. Visualization of the human face skin moisturizing ability by spectroscopic imaging using two near-infrared bands // *Proc.SPIE*. 2006. Vol. 6062. P. 606203.
53. Egawa M. et al. Regional Difference of Water Content in Human Skin Studied by Diffuse-Reflectance Near-Infrared Spectroscopy: Consideration of Measurement Depth // *Appl Spectrosc. Optica Publishing Group*, 2006. Vol. 60, № 1. P. 24–28.
54. Lucassen G.W., Caspers P.J., Puppels G.J. Water content and water profiles in skin measured by FTIR and Raman spectroscopy // *Proc.SPIE*. 2000. Vol. 4162. P. 39–45.
55. Caspers P.J., Lucassen G.W., Puppels G.J. Combined In Vivo Confocal Raman Spectroscopy and Confocal Microscopy of Human Skin // *Biophys J*. Elsevier, 2003. Vol. 85, № 1. P. 572–580.
56. Nakagawa N., Matsumoto M., Sakai S. In vivo measurement of the water content in the dermis by confocal Raman spectroscopy // *Skin Research and Technology*. John Wiley & Sons, Ltd, 2010. Vol. 16, № 2. P. 137–141.

57. Caspers P.J. et al. In Vivo Confocal Raman Microspectroscopy of the Skin: Noninvasive Determination of Molecular Concentration Profiles // Journal of Investigative Dermatology. 2001. Vol. 116, № 3. P. 434–442.
58. Chung S.H. et al. In vivo water state measurements in breast cancer using broadband diffuse optical spectroscopy // Phys Med Biol. 2008. Vol. 53, № 23. P. 6713.
59. Cross K.M. et al. Noninvasive Measurement of Edema in Partial Thickness Burn Wounds // Journal of Burn Care & Research. 2009. Vol. 30, № 5. P. 807–817.
60. Xu X., Wang R.K. The role of water desorption on optical clearing of biotissue: Studied with near infrared reflectance spectroscopy // Med Phys. John Wiley & Sons, Ltd, 2003. Vol. 30, № 6. P. 1246–1253.
61. Arimoto H., Egawa M., Yamada Y. Depth profile of diffuse reflectance near-infrared spectroscopy for measurement of water content in skin // Skin Research and Technology. John Wiley & Sons, Ltd, 2005. Vol. 11, № 1. P. 27–35.
62. Ivankovic I. et al. Multispectral Optoacoustic Tomography Enables In Vivo Anatomical and Functional Assessment of Human Tendons // Advanced Science. John Wiley & Sons, Ltd, 2024. Vol. 11, № 18. P. 2308336.
63. Кочубей В.И., Башкатов А.Н. Спектроскопия рассеивающих сред. Новый ветер, 2014.
64. Cui W., Kumar C., Chance B. Experimental study of migration depth for the photons measured at sample surface // Proc.SPIE. 1991. Vol. 1431. P. 180–191.
65. Sekar S.K.V. et al. Diffuse optical characterization of collagen absorption from 500 to 1700 nm // J Biomed Opt. 2017. Vol. 22, № 1. P. 015006.
66. Bashkatov A.N. et al. Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm // J Phys D Appl Phys. 2005. Vol. 38, № 15. P. 2543.
67. Suzuki H. et al. Water and lipid contents measured at various parts of the human body with a six-wavelength time-resolved spectroscopy system // Proc.SPIE. 2019. Vol. 10874. P. 108740A.
68. Hull E.L., Foster T.H. Noninvasive near-infrared hemoglobin spectroscopy for in vivo monitoring of tumor oxygenation and response to oxygen modifiers // Optical Tomography and Spectroscopy of Tissue: Theory,

- Instrumentation, Model, and Human Studies II. SPIE, 1997. Vol. 2979. P. 355–364.
69. Saknite I., Spigulis J. Determination of in vivo skin moisture level by near-infrared reflectance spectroscopy // Proc.SPIE. 2015. Vol. 9332. P. 93320Y.
 70. Inga S. et al. Comparison of a near-infrared reflectance spectroscopy system and skin conductance measurements for in vivo estimation of skin hydration: a clinical study // J Biomed Photonics Eng. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего ..., 2017. Vol. 3, № 1. P. 10310.
 71. Egawa M. et al. Extended Range Near-Infrared Imaging of Water and Oil in Facial Skin // Appl Spectrosc. Optica Publishing Group, 2011. Vol. 65, № 8. P. 924–930.
 72. Arimoto H., Egawa M. Imaging wavelength and light penetration depth for water content distribution measurement of skin // Skin Research and Technology. John Wiley & Sons, Ltd, 2015. Vol. 21, № 1. P. 94–100.
 73. Pifferi A. et al. Spectroscopic time-resolved diffuse reflectance and transmittance measurements of the female breast at different interfiber distances // J Biomed Opt. Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, 2004. Vol. 9, № 6. P. 1143–1151.
 74. Arimoto H., Egawa M. Non-contact Skin Moisture Measurement Based on Near-Infrared Spectroscopy // Appl Spectrosc. Optica Publishing Group, 2004. Vol. 58, № 12. P. 1439–1446.
 75. Geldof F. et al. Layer thickness prediction and tissue classification in two-layered tissue structures using diffuse reflectance spectroscopy // Sci Rep. 2022. Vol. 12, № 1. P. 1698.
 76. Rudraiah P.S., Duadi H., Fixler D. Bottom layer absorption coefficients extraction from two-layer phantoms based on crossover point in diffuse reflectance // J Biomed Opt. 2021. Vol. 26, № 11. P. 117001.
 77. Rudraiah P.S., Duadi H., Fixler D. Extraction of optical properties from a turbid medium using fiber probe for spectral and spatial diffuse reflectance measurement // OSA Contin. Optica Publishing Group, 2021. Vol. 4, № 2. P. 762–773.
 78. Davydov D. et al. Water, Collagen, and Lipid Content in the Human Skin and Muscles Assessed with Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectroscopy and Multi-Spectral Optoacoustic Tomography // Advanced Science. John Wiley & Sons, Ltd, 2025. Vol. n/a, № n/a. P. e05619.

79. National Center for Biotechnology Information [Electronic resource]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed: 19.03.2025).
80. Zherebtsov E. et al. Hyperspectral imaging of human skin aided by artificial neural networks // Biomed Opt Express. Optical Society of America, 2019. Vol. 10, № 7. P. 3545–3559.
81. Alerstam E., Svensson T., Andersson-Engels S. Parallel computing with graphics processing units for high-speed Monte Carlo simulation of photon migration // J Biomed Opt. 2008. Vol. 13, № 6. P. 060504.
82. Sadovnichy V. et al. “Lomonosov”: supercomputing at Moscow state university // Contemporary High Performance Computing. Chapman and Hall/CRC, 2017. P. 283–307.
83. Du Y. et al. Optical properties of porcine skin dermis between 900 nm and 1500 nm // Phys Med Biol. 2001. Vol. 46, № 1. P. 167.
84. Choe C. et al. Human skin *in vivo* has a higher skin barrier function than porcine skin *ex vivo*—comprehensive Raman microscopic study of the stratum corneum // J Biophotonics. Wiley Online Library, 2018. Vol. 11, № 6. P. e201700355.
85. Egawa M. et al. Regional Difference of Water Content in Human Skin Studied by Diffuse-Reflectance Near-Infrared Spectroscopy: Consideration of Measurement Depth // Appl Spectrosc. Optica Publishing Group, 2006. Vol. 60, № 1. P. 24–28.
86. Taruttis A., van Dam G.M., Ntziachristos V. Mesoscopic and macroscopic optoacoustic imaging of cancer // Cancer Res. American Association for Cancer Research, 2015. Vol. 75, № 8. P. 1548–1559.
87. Dolotov L.E. et al. Design and evaluation of a novel portable erythema-melanin-meter // Lasers Surg Med. Wiley Online Library, 2004. Vol. 34, № 2. P. 127–135.
88. Prahl S., Jacques S.L. Monte Carlo light scattering programs. 2021.
89. Puppels G.J. et al. Non-invasive assessment of hydration status by *in-vivo* Raman spectroscopy // Proc.SPIE. 2023. Vol. PC12375. P. PC1237507.
90. Barroso E.M. et al. Characterization and subtraction of luminescence background signals in high-wavenumber Raman spectra of human tissue // Journal of Raman Spectroscopy. John Wiley & Sons, Ltd, 2018. Vol. 49, № 4. P. 699–709.

91. Stratonnikov A.A., Loschenov V.B. Evaluation of blood oxygen saturation in vivo from diffuse reflectance spectra // J Biomed Opt. 2001. Vol. 6, № 4. P. 457–467.
92. Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // Nat Methods. 2012. Vol. 9, № 7. P. 671–675.
93. Richardson M. Understanding the structure and function of the skin // Nurs Times. University of Hertfordshire., 2003. Vol. 99, № 31. P. 46–48.
94. Shibasaki M., Wilson T.E., Crandall C.G. Neural control and mechanisms of eccrine sweating during heat stress and exercise // J Appl Physiol. American Physiological Society, 2006. Vol. 100, № 5. P. 1692–1701.