

На правах рукописи



Лазарева Екатерина Николаевна

**Многоволновая рефрактометрия биологических сред и её применение в
медицинской диагностике**

1.3.6.- Оптика

1.5.2.- Биофизика

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Саратов – 2023

Работа выполнена на кафедре оптики и биофотоники федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Научный руководитель: **Тучин Валерий Викторович**,
член-корреспондент РАН, д.ф.-м.н., профессор, зав. кафедрой оптики и биофотоники ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского».

Официальные оппоненты: **Каменский Владислав Антониевич**,
доктор физико-математических наук, доцент, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики им. А.В. Гапонова-Грехова Российской академии наук» (ИПФ РАН)

Ширшин Евгений Александрович,
кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник физического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова»)

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» (БФУ им. И. Канта)

Защита диссертации состоится «21» декабря 2023 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета 24.2.392.06 при ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского» по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, корпус 11, ауд. 515.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского» и на сайте:

<https://www.sgu.ru/research/dissertation-council/24-2-392-06/kandidatskaya-dissertaciya-lazarevoy-ekateriny>

Отзыв на автореферат в двух экземплярах, заверенных гербовой печатью организации, просим направлять по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
24.2.392.06
д.ф.-м.н.



Генина Элина Алексеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Показатель преломления биологических сред является одним из основных оптических параметров, который характеризует взаимодействие света с тканью. Различные оптические методы, широко используемые для характеристики тканей, такие как видимая и ближняя инфракрасная (БИК) спектроскопия, оптическая когерентная томография, флуоресцентная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния, нуждаются в точных данных для показателя преломления тканей, крови и их компонентов для количественного описания экспериментальных данных [1]. Величина показателя преломления требует оценки для широкого спектрального диапазона, поскольку информация о дисперсии ткани также может быть использована для характеристики и определения показателей преломления компонентов ткани [2], для количественной оценки рассеяния света на отдельных длинах волн через относительный показатель преломления [3] или для дифференцирования патологических тканей [4]. Не существует экспериментального метода, который можно было бы использовать для оценки дисперсии ткани напрямую или посредством прямого расчета по измеренным спектрам. Наиболее часто показатель преломления биосред измеряют экспериментально на дискретных длинах волн, используя различные методы [2]. Распространенным оборудованием для измерения показателя преломления является рефрактометр Аббе, который позволяет получать показатель преломления твердых и жидких образцов в основном на длине волны 589 нм [5]. Однако, хорошо известно, что величина показателя преломления сильно зависит от длины волны, температуры и молекулярной структуры тканей. В настоящее время оценка показателя преломления на нескольких длинах волн возможна различными методами, что позволяет интерполировать эти дискретные экспериментальные данные в широком спектральном диапазоне [6, 7]. Альтернативный косвенный метод, основанный на соотношениях Крамерса-Кронига, позволяет рассчитывать зависимость показателя преломления биологических материалов от длины волны непосредственно из зависимости коэффициента поглощения, восстановленной из измерений спектральной интенсивности [8]. Во многих оптических исследованиях часто используется приблизительная оценка показателей преломления исследуемой ткани, основанная на том, что основной составляющей ткани являются клетки, заполненные внутриклеточной жидкостью и органеллами, что можно представить, как смесь буферного раствора и белков [9].

Показатель преломления является одной из наиболее важных оптических характеристик биологических сред, а знание дисперсии и температурных зависимостей для различных тканей и их компонентов, например основных белков крови – альбумина и гемоглобина, важно как для понимания изменений их оптических свойств, так и биологических тканей в целом [10]. В частности, количественная и качественная информация об оптических свойствах крови и о показателе преломления, представляет большой интерес для многих областей биомедицинских исследований и практической медицины, так как неинвазивные или малоинвазивные оптические технологии все чаще используются в диагностике и терапии [11]. Оптические свойства крови определяются такими физиологическими и биологическими параметрами, как гематокрит, температура, осмолярность, насыщение кислородом или другими газами, ригидность мембраны эритроцитов, и при этом сложным образом зависят от длины волны [12, 13, 14]. Видимую и БИК области спектра часто называют «терапевтическим/диагностическим» окном, так

как именно в этом диапазоне длин волн малый вклад в поглощение дает вода, которая является основным компонентом многих мягких биологических тканей [15].

В настоящее время возобновился интерес исследователей к проблеме измерения показателя преломления различных биологических тканей и крови в широком диапазоне длин волн, поскольку именно показатель преломления предлагается использовать в качестве одного из эндогенных диагностических маркеров различных заболеваний [4]. Например, Плотникова Л.В. и соавторы показали, что величина показателя преломления сыворотки крови может быть использована в качестве дополнительного критерия для оценки динамики изменений свойств сыворотки крови при прохождении курса противоопухолевой терапии [16]. Поскольку структура и состав тканей и, соответственно, их оптические свойства изменяются в процессе развития патологии, несколько исследовательских групп предложили показатель преломления в качестве маркера дифференциации нормальной и патологической ткани, в том числе экспериментального диабета у животных [15]. Одним из них, часто используемым в качестве маркера при сахарном диабете, является гликированный гемоглобин (HbA1c), образующийся в результате неферментативного гликирования (гликозилирования) гемоглобина, который подвергается воздействию свободной глюкозы в крови и, следовательно, имеет сильную корреляцию со средней концентрацией глюкозы в крови в предшествующий трехмесячный период (продолжительность жизни эритроцитов). Благодаря такой сильной корреляции уровни HbA1c используются для мониторинга долгосрочного контроля глюкозы у установленных диабетиков и сравнительно недавно были одобрены для скрининга на диабет ($HbA1c \geq 6,5\%$) и преддиабет ($5,7\% \leq HbA1c \leq 6,4\%$) [17]. Знание оптических свойств крови, её компонентов и их отличительных особенностей важно для разработки быстрых, простых и неинвазивных методов диагностики этих заболеваний. Например, *in vivo* проточная цитометрия меланомных клеток в потоке крови у пациентов с диабетом может иметь дополнительный фоновый сигнал от эритроцитов, содержащих гликированный гемоглобин [18].

Важная роль для разработки новых диагностических и терапевтических методов в медицине отводится оптическим методам, имеющим высокую чувствительность к определению содержания воды. Применительно к методике оптического просветления биологических тканей и жидкостей иммерсионным методом, где одним из основных механизмов является согласование показателей преломления, также необходима оценка дисперсии оптических просветляющих агентов [19]. Оценка показателя преломления биологических сред и их отдельных компонентов очень важна для реализации различных физических методов воздействия на оптические свойства биологических тканей, особенно для изучения процесса оптического просветления тканей. Для оптического просветления представляет интерес оценка эффективности механизма согласования показателей преломления, а это означает, что если определить кинетику показателя преломления интерстициальной жидкости и образца ткани в целом, то возможна оценка эффективности оптического просветления [20].

Таким образом, знание показателей преломления биологических сред, тканей и их компонентов в широком диапазоне длин волн требуется для описания оптических свойств различных слоев кровенасыщенных тканей, например, методом статистического моделирования Монте-Карло [21]. Также знание оптических свойств тканей и крови позволяет определять оптимальную длину волны воздействия, при которой глубина проникновения лазерного излучения максимальна. Это важно при моделировании

взаимодействия лазерного излучения с тканью, например, при планировании таких клинических процедур, как лазерный внутритканевый нагрев или фотодинамическая терапия, а также при выборе рабочих длин волн пульсовых оксиметров, которые широко используются в различных областях медицины для мониторинга насыщения крови кислородом [22, 23]. Дополнительной мотивацией для написания диссертации является множество расхождений между показателями преломлений, о которых сообщается в литературе различными исследовательскими группами.

Цели и задачи диссертационной работы

На основе анализа научной литературы были сформулированы цель и задачи диссертационной работы:

Цель: изучить в широком диапазоне длин волн и температур рефрактометрические свойства биологических тканей в норме и при патологиях, связанных с развитием сахарного диабета и раковых опухолей, а также выявить связь рефрактометрических свойств биотканей с их основными структурными компонентами.

Для достижения цели работы потребовалось решить следующие основные **задачи:**

1. Разработать методику и провести измерения показателя преломления наиболее значимых биологических сред в широком диапазоне температур и длин волн видимого и БИК диапазонов и проанализировать полученные дисперсионные зависимости.
2. Выявить связи между экспериментальными данными для показателей преломления, полученными рефрактометрическим методом, и составом, а также структурой биологических сред и их компонентов.
3. Разработать метод оценки показателя преломления крови по экспериментальным данным, полученным для гемоглобина и альбумин, как для основных белков крови.
4. Разработать метод оценки степени гликированности белков крови, гемоглобина и альбумина, на основе рефрактометрических данных широкого спектрального диапазона.
5. Разработать метод оценки степени дегидратации ткани при применении гиперосмотических оптических просветляющих агентов.

Научная новизна результатов диссертационной работы определяется следующим:

1. В работе впервые измерены показатели преломления биологических сред, таких как кожа, мышечная ткань, жировая ткань, ткани головного мозга, кровь и её компоненты, на выделенных длинах волн видимой и БИК спектральных областей в широком диапазоне температур в норме и при патологиях, связанных с сахарным диабетом и развитием модельной опухоли рака печени.

2. Предложен метод расчета показателя преломления крови с использованием данных для показателей преломления водных растворов гемоглобина и альбумина, исходя из соотношения их содержания, как основных составляющих эритроцитов и плазмы.

3. Метод многоволновой рефрактометрии применен для оценки степени гликированности основных белков крови, гемоглобина и альбумина.

4. Метод многоволновой рефрактометрии применен для оценки дегидратации ткани при использовании гиперосмотических оптических просветляющих агентов.

Научно-практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы обусловлена важностью полученных результатов для усовершенствования и развития оптических методов диагностики и терапии

социально-значимых заболеваний, таких как сахарный диабет и онкологические заболевания. Полученные результаты имеют практическую значимость, поскольку способствуют развитию направления в оптике и биофотонике, связанного с повышением эффективности и безопасности диагностики и лечения заболеваний.

Положения и результаты, выносимые на защиту:

1. База экспериментальных данных для показателей преломления наиболее значимых биологических сред, таких как кожа, мышечная ткань, жировая ткань, основные белки крови, ткани легких, почки и головного мозга, на выделенных длинах волн в видимом и БИК диапазонах (480-1550 нм) при различных температурах, от комнатной до физиологической и далее до 50°C.
2. Показатель преломления крови в видимом и БИК диапазонах (480-1550 нм) может быть рассчитан с достаточной точностью с использованием измеренных показателей преломления растворов альбумина и гемоглобина.
3. Установлена связь температурного инкремента показателя преломления растворов гемоглобина и альбумина с содержанием в них гликированных фракций. Измерение температурного инкремента показателя преломления растворов гемоглобина, полученных из цельной крови человека, позволяет оценить уровень гликированности гемоглобина.
4. Новые данные для показателя преломления опухолевой ткани в видимом и БИК диапазонах (480-1550 нм) и демонстрация возможности определения степени развития опухолевой ткани по величине изменения показателя преломления.
5. При воздействии гиперосмотического агента ассоциированная с изменением показателя преломления дегидратация участка кожи крыс в области развитой модельной опухоли рака печени в 3 раза ниже по сравнению с удаленными от опухоли участками кожи.

Личный вклад автора

Автор принимал личное участие при выполнении работ на всех этапах исследований, описанных в диссертации: начиная от реализации задач поставленных научным руководителем до обсуждения полученных результатов, их статистической и аналитической обработке, написания текста и иллюстраций статей. Автор самостоятельно проводил эксперименты по измерению показателей преломления биологических тканей, измерению оптических характеристик, а также геометрических и весовых параметров образцов. Соискатель принимал непосредственное участие в изложении полученных теоретических, экспериментальных и вычислительных результатах в материалах диссертационной работы, статьях и монографии; подготовке докладов на научных конференциях.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов, описанных в диссертационном исследовании, обсуждений, выводов и заключения обеспечивается использованием современного научно-исследовательского оборудования, адекватностью используемых теоретических моделей, применением апробированных методик измерений, объемом использованного в работе материала и применением традиционных статистических методов обработки результатов, воспроизводимостью экспериментальных и расчетных данных, а также их совпадением с результатами и выводами других авторов, полученных с помощью альтернативных методов, опубликованием результатов в рецензируемых российских и международных научных изданиях.

Работы, изложенные в диссертации, осуществлялись в соответствии с программами научно-исследовательских работ, поддерживаемых грантами: РФФИ 20-32-90058; 18-52-16025; 17-00-00275 (К) (17-00-00270); РФФИ № 21-72-10057; Грант правительства РФ (№ 14.350.31.0044).

Основные научные результаты работы были представлены на следующих конференциях: Международный симпозиум «Saratov Fall Meeting» (Саратов, Россия, 2006-2021), Всероссийский молодежный Самарский конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике (Самара, Россия, 2017 -2022), Международный симпозиум «Основы лазерных микро- и нанотехнологий» (ФЛАМН-22), 29-ая Международная конференция по передовым лазерным технологиям (ALT'22), 28-ая Международная конференция по передовым лазерным технологиям (ALT'21), VII Съезд биохимиков России (Сочи, Россия, 2021), SPIE Photonics Europe Digital Forum 2020 (Conference Tissue Optics and Photonics, Strasbourg, France, 2020), VI Съезд биохимиков России (Сочи, Россия, 2019), Международная молодежная конференция «Физика.СПб» (Санкт-Петербург, Россия, 2019), 15-ая Международная конференция молодых ученых «Разработки в области оптики и связи 2019» (DOC 2019)» (Рига, Латвия, 2019). VI Международный Симпозиум «Актуальные Проблемы Биопластики» (VI International Symposium TOPICAL PROBLEMS OF BIOPHOTONICS –2017, Нижний Новгород, Россия, 2017), 2-я Международная Конференция «Биопластика-Рига2017» (2nd International Conference «Biophotonics - Riga 2017», Рига, Латвия, 2017), 2-я Школа ADFLIM для молодых ученых, аспирантов и студентов (Санкт-Петербург, Россия, 2017), 18-я Международная конференция по лазерной оптике (ICLO 2018)» (Санкт-Петербург, Россия, 2017).

Публикации

По материалам исследований, выполненных в рамках диссертационной работы, опубликованы: глава в монографии, индексируемая библиографической базой «Scopus», и 17 статей, из них 5 статей в изданиях, входящих в список ВАК и 12 статей в зарубежных журналах, индексируемых библиографическими базами «Web of Science» и «Scopus».

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, списка цитируемой литературы и приложения, состоящего из 289 наименований. Объем диссертации без приложения составляет 175 страниц, включая 62 рисунка и 34 таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обосновывается актуальность исследований, проводимых в рамках данной диссертационной работы, формируется цель, ставятся задачи, излагается научная новизна и практическая значимость представляемой работы.

В **главе 1** рассматривается современное состояние исследований в области рефрактометрии биотканей и возможности её применения в медицине с целью выделения актуальных проблем. Рассматривается фундаментальное понятие показателя преломления и факторы, влияющие на его величину. Перечислены основные методы измерения действительной части показателя преломления. Описывается значимость показателя преломления и рефрактометрии для методов медицинской диагностики, в том числе, что показатель преломления может выступать «биологическим маркером» в исследованиях, связанных с развитием патологических процессов.

Глава 2 посвящена описанию экспериментальных исследований рефрактометрических свойств особо важных биологических тканей в широком диапазоне температур на выделенных длинах волн видимого и БИК диапазонов. Дан анализ дисперсионных и температурных зависимостей, даны коэффициенты формулы Зельмейера, позволяющей восстанавливать значение показателя преломления биотканей в области 480-1550 нм. Приведено сравнение полученных данных с литературными.

В данной работе показатель преломления измерялся на многоволновом рефрактометре Аббе DR-M2/1550 (Атаго, Япония), который может быть использован для измерения фазового показателя преломления твердых, жидких и плёночных образцов. При измерениях показателя преломления с помощью рефрактометра Аббе можно пользоваться методом полного внутреннего отражения и методом скользящего луча. При измерениях по методу скользящего луча световые лучи от источника направляются на откидную призму и данный метод применим для измерения показателя преломления сред с низкими рассеивающими и поглощающими свойствами. В то время, как при методе полного внутреннего отражения освещается основная призма и метод может быть применен для измерения показателя преломления сред с высоким поглощением, но слабым рассеянием. Для большинства случаев глубина проникновения приблизительно равна $\lambda/2$. Однако, чем ближе друг к другу показатели преломления призмы и образца, тем глубже внутрь образца проникает затухающая волна.

Основным компонентом большинства жидких и мягких биологических тканей является вода. Именно вода вносит значительный вклад в их оптические, в том числе рефрактометрические свойства. Поэтому важным этапом исследовательской работы было экспериментальное определение и анализ дисперсионной и температурной зависимостей показателя преломления воды в видимом и БИК диапазонах (480-1550 нм). В данной работе получены значения при температуре (+23) °C 1.3340 для длины волны 546 нм и 1.3174 для длины волны 1300 нм. Учитывая поправку на температуру, в видимой области экспериментальные данные хорошо согласуются с литературными. Для БИК области значение показателя преломления меньше литературных данных, это может объясняться вкладом поглощения и различиями образцов воды.

Измерение показателя преломления биологических тканей является сложной задачей, для решения которой используются дополняющие друг друга прямые и косвенные методы, использующие моделирование. Достоинством прямых методов является измерение показателей преломления ткани при наличии всех её компонентов. Однако неоднородность среды в виде клеточной суспензии, сильное поглощение и рассеяние не позволяют определить показатель преломления тканей прямым методом с высокой точностью, поэтому значения показателей преломления в таких случаях могут сильно различаться в зависимости от состояния образца и методики измерений.

Дисперсионная зависимость показателя преломления для образцов кожи крысы, кожи мыши, срезов мышечной ткани крысы и свиньи, ткани легкого крысы, почки мыши и головного мозга крысы показаны на Рисунке 1 (А) и Рисунке 1 (Б).

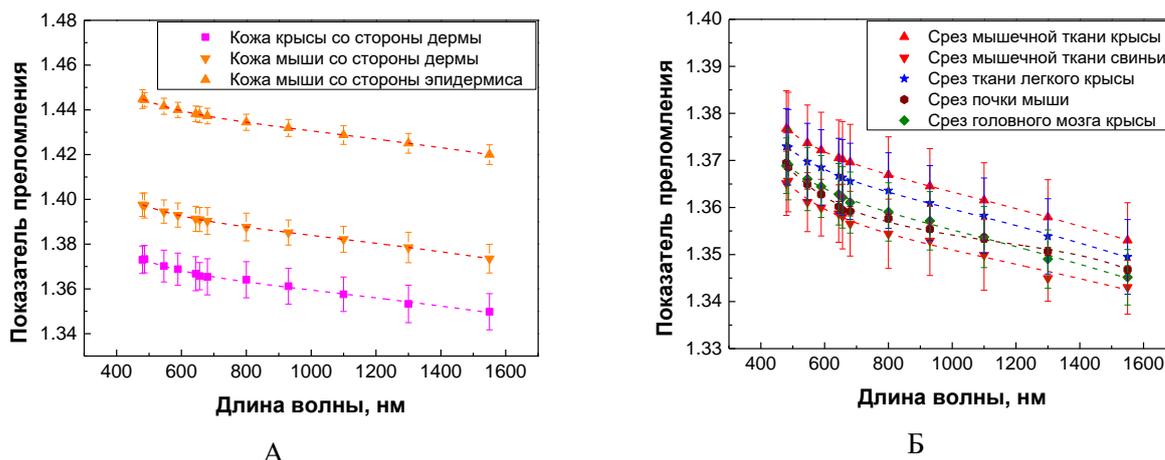


Рисунок 1 - Дисперсионная зависимость мягких тканей: А – кожа крысы и мыши со стороны дермы, кожа мыши со стороны эпидермиса; Б – срезы мышечных тканей крысы и свиньи, срез ткани легкого крысы, срез почки мыши, срез головного мозга крысы. (Символы - экспериментальные данные, пунктирные линии - аппроксимация)

Кожа относится к тканям, которые представляют наибольший интерес для исследования её оптических свойств, в том числе при разных физиологических состояниях. Значения действительной части показателя преломления для отдельных слоев и ткани кожи в целом в литературе варьируются от 1.34 до 1.56. В данной работе показатели преломления эпидермиса и дермы кожи мыши составляют $1,4400 \pm 0.0034$ и 1.3930 ± 0.0056 для длины волны 589 нм, а для кожи крысы – 1.3668 ± 0.0072 для той же длины волны. Значения показателя преломления для мышечных тканей могут быть от 1.37 до 1.46. По полученным результатам для мышечной ткани свиньи *ex vivo* показатель преломления изменяется с 1.3767 ± 0.0081 до 1.3530 ± 0.0085 в диапазоне от 480 до 1550 нм, а для мышечной ткани крысы с 1.3651 ± 0.0068 до 1.3431 ± 0.0057 . В результате измерений показатель преломления ткани легкого крысы равен 1.3685 ± 0.0080 для длины волны 589 нм, показатель преломления среза головного мозга крысы – 1.3645 ± 0.0066 , почки мыши – 1.3628 ± 0.0007 . Значительные различия могут объясняться различными методиками измерения показателя преломления, а также различным происхождением ткани, так как, например, свиной орган, крысиный и мышинный могут отличаться размерами клеточных структурных элементов, что влияет на плотность ткани.

Исследования рефрактометрических свойств жировой ткани в широком диапазоне длин волн и температур представляют интерес для многих областей современной медицины, в частности дерматологии при фотодинамической терапии подкожных новообразований, в том числе злокачественных.

На Рисунке 2(А) представлены температурные зависимости показателя преломления вытопленной капли липидов жировой ткани свиньи, а на Рисунке 2(Б) среза жировой ткани свиньи для диапазона температур от $(+25)^\circ\text{C}$ до $(+50)^\circ\text{C}$ и их линейные аппроксимации для двух различных температурных диапазонов. Аппроксимации проводились путем усреднения экспериментальных данных и нахождения первой и второй производных для определения локальных минимумов, максимумов и точек перегиба. После математического анализа для среза жировой ткани были определены удельные средние температуры $T = (+33.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ и $T = (+43.5 \pm 2.5)^\circ\text{C}$, соответствующие точкам перегиба и характерные для всех длин волн видимого и БИК диапазонов. Вторая

удельная температура отчетливо видна для длин волн 480, 930 и 1550 нм. Для капли липидов на графиках видна удельная усредненная температура $T = (33 \pm 1)^\circ\text{C}$, характерная для всех длин волн видимого и БИК диапазонов.

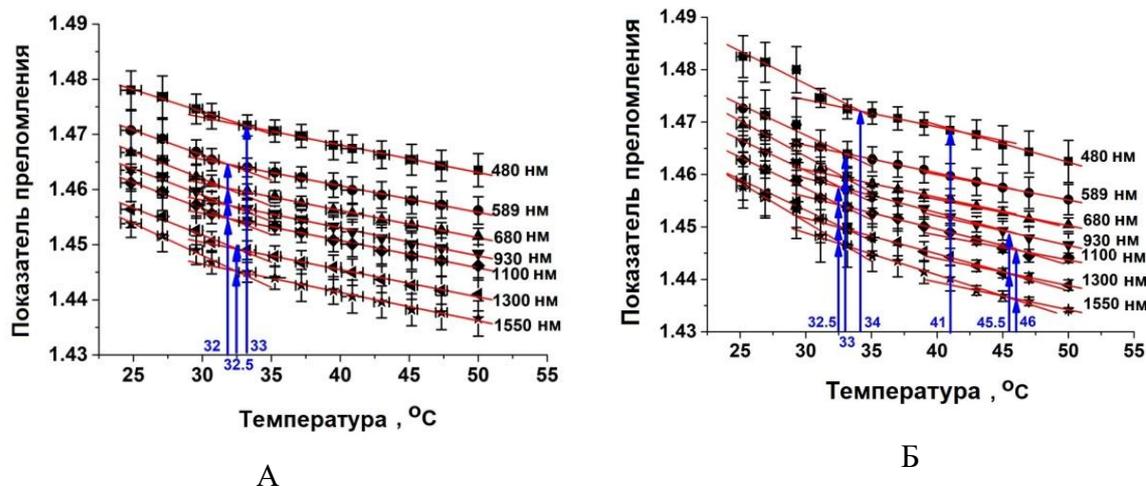


Рисунок 2 - Температурные зависимости показателя преломления расплавленной капли и срезов жировой ткани свиньи: для видимого и БИК диапазонов (символы – экспериментальные данные, линии – аппроксимация). Синие стрелки и числа представляют температуры, соответствующие перегибу (изменению наклона) средней функции $n(T)$

Локальные изменения линейной зависимости показателя преломления от температуры могут быть связаны с фазовыми переходами липидных компонентов жировой ткани. Существование фазового перехода определяется как изменение относительного наклона температурной зависимости показателя преломления. Экспериментально обнаруженные множественные фазовые переходы в жировой ткани при нагревании тканей связывают с липидами в липидных каплях клеток и фосфолипидами в клеточных мембранах.

Жировая ткань обычно состоит примерно на 92% из липидов и на 8% из воды, поэтому показатель преломления липидов $n_{\text{лип}}$ можно рассчитать по известным показателям преломления жировой ткани $n_{\text{экс}}$ и воды $n_{\text{воды}}$ по уравнению Гладстона-Дейла, согласно которому дисперсия биологических тканей определяется дисперсией её отдельных компонентов:

$$n_{\text{лип}} = \frac{(n_{\text{экс}} - 0.08n_{\text{воды}})}{0.92}, \quad (1)$$

На Рисунке 3 представлены дисперсионные зависимости для жировой ткани и воды, полученные экспериментально, а также рассчитанные данные для липидов. Из Рисунка 3 видно, что форма дисперсионных кривых липидов, жировой ткани и воды похожая.

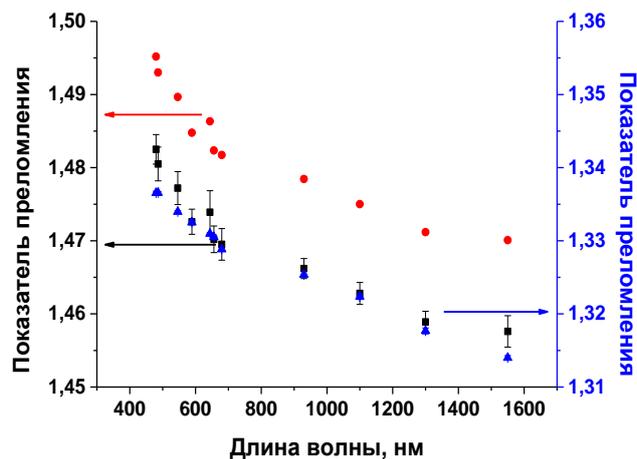


Рисунок 3 - Дисперсионная зависимость показателя преломления жировой ткани(■), жиров (●) и воды (▲). Температура 25°C для жировой ткани и воды. Столбики показывают стандартные отклонения.

Данные для жировой ткани свиньи хорошо согласуются друг с другом и показывают аналогичную тенденцию (коэффициент ранговой корреляции Спирмена равен 1.0). Различие формы кривых жировой ткани и воды при длинах волн 1100, 1300 и 1550 нм можно объяснить включением аномальной дисперсии, обусловленной полосами поглощения.

В главе 3 представляются результаты экспериментальных исследований оптических свойств компонентов крови, таких как гемоглобин и альбумин, методом рефрактометрии на выделенных длинах волн в видимом и БИК спектральных диапазонах (480-1550 нм). Изучение оптических свойств крови и её компонентов важно для разработки методов диагностики и лазерного лечения, где учет оптических свойств крови имеет решающее значение.

По полученным данным был проведен анализ зависимости показателя преломления от длины волны и концентрации, вычислены значения удельных инкрементов показателя преломления белков крови, а также коэффициенты для представления полученных дисперсионных зависимостей по формуле Зельмейера.

Хорошо известно, что показатель преломления белков нелинейно зависит от длины волны. На Рисунке 4 показаны дисперсионные кривые для растворов гемоглобина в видимой и БИК областей спектра. Символы представляют собой экспериментальные данные, а линии соответствуют аппроксимации данных по формуле Зельмейера:

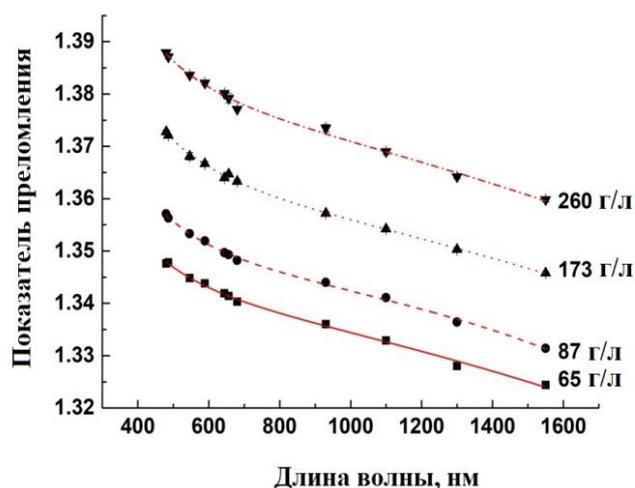


Рисунок 4 - Дисперсионная зависимость для растворов гемоглобина (символы — экспериментальные данные, линии - аппроксимации экспериментальных данных по формуле Зельмейера)

По результатам измерений установлено, что существует линейная зависимость между показателем преломления и концентрацией гемоглобина. В настоящее время в литературе очень мало данных по измерению показателей преломления растворов гемоглобина для концентраций, близких к таковым в эритроцитах, в частности, данные для БИК области практически отсутствуют. Показатель преломления раствора гемоглобина 260 г/л, полученного из цельной крови при комнатной температуре (+23°C), для длины волны 480 нм оказался равным 1.3879 ± 0.0002 , для 589 нм 1.3821 ± 0.0004 , для 1100 нм до 1.3690 ± 0.0006 , а для 1550 нм до 1.3598 ± 0.0002 . Удельный инкремент показателя преломления гемоглобина составил 0.199 ± 0.006 мл/г для длины волны 480 нм, 0.192 ± 0.005 мл/г для длины волны 589 нм, 0.183 ± 0.005 мл/г для длины волны 930 нм и 0.179 ± 0.004 мл/г для длины волны 1550 нм.

Измерение показателя преломления раствора альбумина человека в видимом и БИК диапазонах (480-1550 нм) Показатель преломления растворов альбумина с концентрациями 35, 45, 55, 100 и 200 мг/мл был измерен при комнатной температуре (+24)°C. Для измерений лиофилизированный порошок сывороточного альбумина человека (Sigma Aldrich, США) разводился буферным раствором до нужной концентрации.

На Рисунке 5 представлена зависимость показателя преломления растворов сывороточного альбумина человека от концентрации (Рисунок 5 (А)) и длины волны (Рисунок 5 (Б)).

Расхождение между литературными и экспериментальными данными в данной диссертационной работе может быть связано с различиями в протоколах подготовки проб, так как гемоглобин человека может отличаться по содержанию различных форм гемоглобина донорской крови. Специфика экспериментальных установок также может играть роль.

Далее в работе показана возможность вычисления показателя преломления крови по экспериментально измеренным значениям показателей преломления растворов альбумина и гемоглобина при использовании соотношения Гладстона-Дейла.

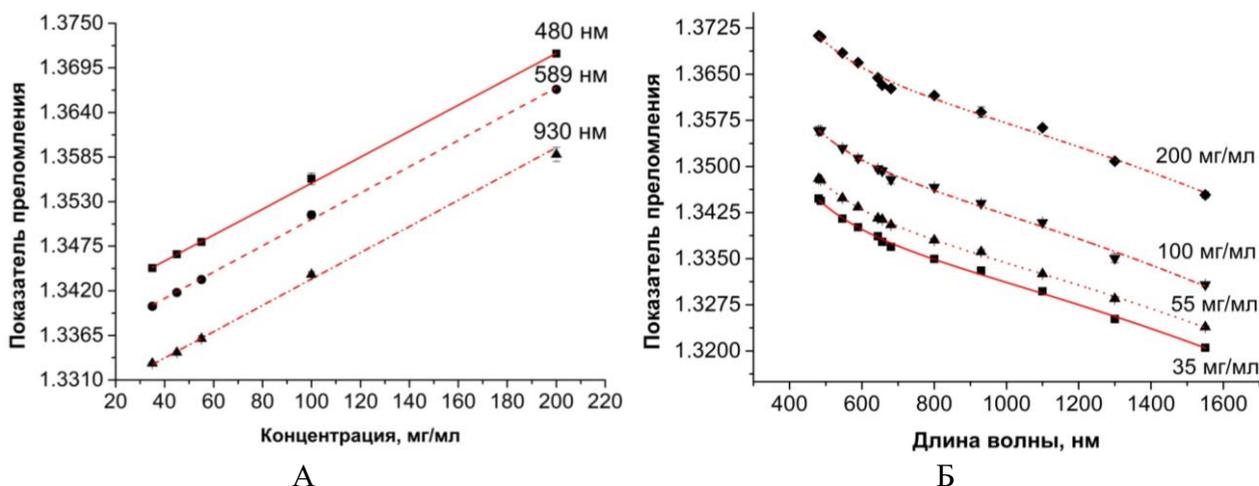


Рисунок 5 - Зависимости показателя преломления растворов сывороточного альбумина человека:

А - Зависимость показателя преломления растворов альбумина от концентрации при температуре (+24) °С. ($R^2 \geq 0.98$; средняя ошибка измерений ± 0.0003);

Б - Дисперсионная зависимость показателя преломления растворов альбумина 35, 55, 100 и 200 мг/мл при температуре (+24) °С. ($R^2 \geq 0.995$; средняя ошибка измерений ± 0.0003)

После нахождения эмпирических констант формула Зельмейера для показателя преломления крови в диапазоне 480-1550 нм имеет вид:

$$n_{\text{крови}}^2(\lambda) = 1 + \frac{0,83423 * \lambda^2}{\lambda^2 - 10775,44775} + \frac{0,04296 * \lambda^2}{\lambda^2 - 6,13587 * 10^6} \quad (1).$$

Как уже было сказано ранее, измерение показателя преломления крови является сложной задачей, для решения которой используются дополняющие друг друга прямые и косвенные методы. Достоинством прямых методов является измерение показателя преломления крови при наличии всех её компонентов. Однако неоднородность среды в виде клеточной суспензии, сильное поглощение и рассеяние не позволяют измерить показатель преломления цельной крови прямым методом с высокой точностью, поэтому в таких случаях используются косвенные методы, а значения показателя преломления могут сильно различаться в зависимости от состояния образца и методики измерений.

В главе 4 представлены результаты экспериментального исследования оптических характеристик гликированных фракций белков крови человека, таких как гемоглобин и альбумин, методами многоволновой рефрактометрии и флуоресценции. Показаны характерные особенности дисперсионных и температурных зависимостей показателя преломления растворов гемоглобина, альбумина, их гликированных фракций, а также их смесей в пределах физиологических и патологических концентраций, получены аппроксимационные формулы для дисперсионных зависимостей и температурных инкрементов показателя преломления, обеспечивающих наилучшую корреляцию с экспериментальными данными.

На Рисунке 6 представлена зависимость показателя преломления растворов гликированного и негликированного гемоглобина (Рисунок 6 (А)) и альбумина (Рисунок 6 (Б)) от длины волны при температуре (+25)°С.

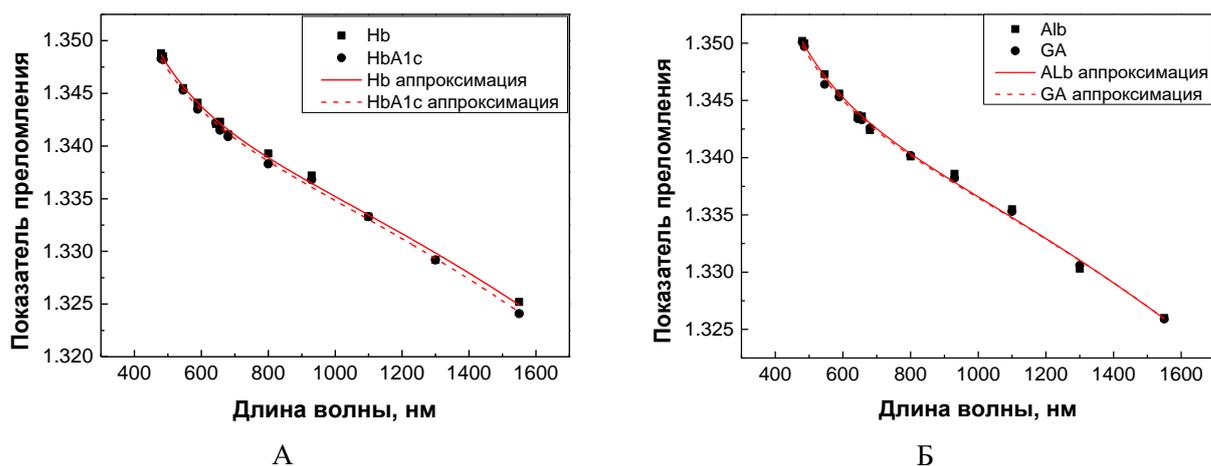


Рисунок 6 - Дисперсионная зависимость показателя преломления растворов белков крови: А - гликированного и негликированного гемоглобина; Б - гликированного и негликированного альбумина

По результатам измерений на 12-ти длинах волн была выполнена аппроксимация для показателей преломления белков крови по формуле Зельмейера. После вычисления коэффициентов для восстановления дисперсионной зависимости растворов гликированного и негликированного гемоглобина в диапазоне длин волн 480-1550 нм при температуре (+25)°C могут быть использованы формулы:

$$n_{\text{Hb}}^2(\lambda) = 1 + \frac{0.79282 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 8396.00447} + \frac{729.43254 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 4.35904}. \quad (2)$$

$$n_{\text{HbA1c}}^2(\lambda) = 1 + \frac{0.79258 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 8183.20913} + \frac{744.27896 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 4.2882}. \quad (3)$$

Для восстановления дисперсионной зависимости растворов гликированного и негликированного альбумина в диапазоне длин волн 480-1550 нм при температуре (+25)°C могут быть использованы формулы:

$$n_{\text{Alb}}^2(\lambda) = 1 + \frac{0.79727 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 8266.1298} + \frac{748.3268 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 4.2833}. \quad (4)$$

$$n_{\text{GA}}^2(\lambda) = 1 + \frac{0.797 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 8060.0164} + \frac{744.5313 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 4.3066}. \quad (5)$$

Величина среднего статистического отклонения для аппроксимации показателя преломления растворов гемоглобина и гликированного гемоглобина по формуле Зельмейера равна 0.996 и 0.997 соответственно, для аппроксимации показателя преломления растворов альбумина и гликированного альбумина - 0.995 и 0.997.

Так как показатель преломления сильно зависит от концентрации, то для удобства построения температурных зависимостей использовался нормированный показатель преломления, который был получен делением экспериментального показателя, поделенного на начальный показатель преломления при (+25) °C.

На основании полученных результатов, установлено увеличение модуля температурного инкремента нормированного показателя преломления для растворов с преобладанием в растворах гликированного гемоглобина и гликированного альбумина. Полная производная показателя преломления по температуре связана с эффектом теплового расширения и температурной зависимостью поляризуемости молекул. В связи с этим различия, полученные для негликированных и гликированных фракций белков крови, можно объяснить с учетом их различной молекулярной структуры и

поляризуемостью молекулы. Правило аддитивности справедливо для молекулярных комплексов, состоящих из молекул с различной поляризуемостью. В этом случае полная поляризуемость считается равной сумме поляризуемости каждой из молекул. Таким образом, молекулярный комплекс белка с глюкозой имеет большую молекулярную поляризуемость, и показатель преломления зависит от содержания заряженных аминокислот в молекуле.

На Рисунке 7 показана зависимость температурного инкремента нормированного показателя преломления от концентрации гликированного гемоглобина в растворе.

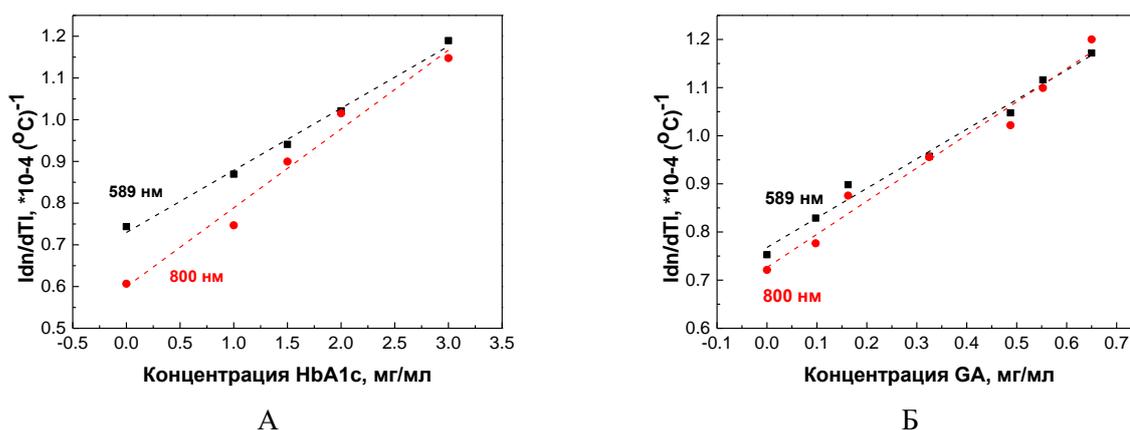


Рисунок 7 - Зависимость температурного инкремента нормированного показателя преломления от концентрации гликированного белка крови в растворе: А – раствор гемоглобина и гликированного гемоглобина; Б - раствор альбумина и гликированного альбумина

Полученная зависимость близка к линейной зависимости, что позволяет её использовать в качестве градуировочного графика для определения концентрации гликированного белка в растворе.

Дополнительно были показаны характерные особенности спектров флуоресценции растворов гемоглобина, альбумина, их гликированных фракций, а также их смесей в пределах физиологических и патологических концентраций. Длины волн 260, 270 и 280 нм возбуждения спектра флуоресценции были выбраны, так как пик спектра флуоресценции белков крови, наблюдаемый при 320 нм, соответствует флуоресценции триптофана, который поглощает УФ-излучение с максимумами при 220 нм и 280 нм и флуоресценцией в белках при 328 ÷ 350 нм. Согласно данным, имеющимся в литературе, колебательная активность составляющей белковой части изменяется при присоединении глюкозы и формировании гликированного белка и может быть связана с флуоресценцией триптофановой и тирозиновой частей молекулы. Сдвиг положения пика в коротковолновой области спектра возбуждения флуоресценции гликированных белков для разных длин волн возбуждения можно объяснить увеличением вклада флуоресценции тирозина. Таким образом, изменение положения максимума флуоресценции гемоглобина для разных длин волн возбуждения объясняется изменением вклада флуоресценции триптофана и тирозина. Усиление колебаний триптофана приводит к эмиссии тирозина. Относительное изменение интенсивности флуоресценции триптофана и тирозина приводит к формированию составных спектров и изменению положения максимумов для гликированных и негликированных форм белков. Изменение положения пика

интенсивности не изменяется у растворов альбумина, гликированного альбумина и их смесей. Полученный результат хорошо согласуется с литературными данными, так как гликирование альбумина не приводит к изменению полярности окружения триптофановых остатков и положение максимума полосы собственной флуоресценции остается неизменным. При этом полученные результаты показали, что, как и при гликировании альбумина, при увеличении содержания гликированного альбумина в растворе наблюдается заметный рост интенсивности флуоресцентной полосы.

Возможности применения метода многоволновой рефрактометрии продемонстрированы на примере экспериментального исследования оптических характеристик растворов гемоглобина, полученного из цельной крови добровольцев с сахарным диабетом I-го типа. Выбор добровольцев осуществлялся таким образом, что какие-либо сопутствующие хронические заболевания у пациентов-добровольцев отсутствовали. Забор цельной крови был выполнен из вены в вакуумную пробирку с антикоагулянтом K_2EDTA . Образцы крови были взяты в Государственной организации здравоохранения «Саратовская городская клиническая больница No 2 имени В. И. Разумовского» с разрешения добровольцев.

Чтобы исключить влияние концентрации гемоглобина на показатель преломления и для удобства построения температурных зависимостей, показатель преломления также нормировался, путем деления экспериментального показателя на величину начального показателя при температуре $(+24)^\circ C$. В дальнейшем для аппроксимации температурной зависимости нормированного показателя преломления растворов гемоглобина, полученного из цельной крови добровольцев с сахарным диабетом и без, в диапазоне температур от $(+24)$ до $(+50)^\circ C$ была использована формула линейной зависимости.

Результаты измерений и коэффициенты, найденные в результате аппроксимации, показаны на Рисунках 8 и 9.

Для количественной оценки связи температурного инкремента показателя преломления и количеством гликированного гемоглобина, полученного из цельной крови добровольцев с сахарным диабетом I-го типа, были рассчитаны коэффициенты корреляции Пирсона. Учитывая результаты, на длинах волн 546, 589, 644, 680, 930, 1100 и 1300 нм наблюдается высокая корреляция температурного инкремента показателя преломления и количества гликированного гемоглобина, полученного из цельной крови добровольцев с сахарным диабетом I-го типа, а для длин волн 480, 486, 656, 800 и 1550 нм очень высокая. Однако коэффициент корреляции Пирсона для всех длин волн больше 0.7, что свидетельствует о хорошем согласовании полученных данных, а температурный инкремент показателя преломления гемоглобина может быть использован для определения содержания гликированного гемоглобина.

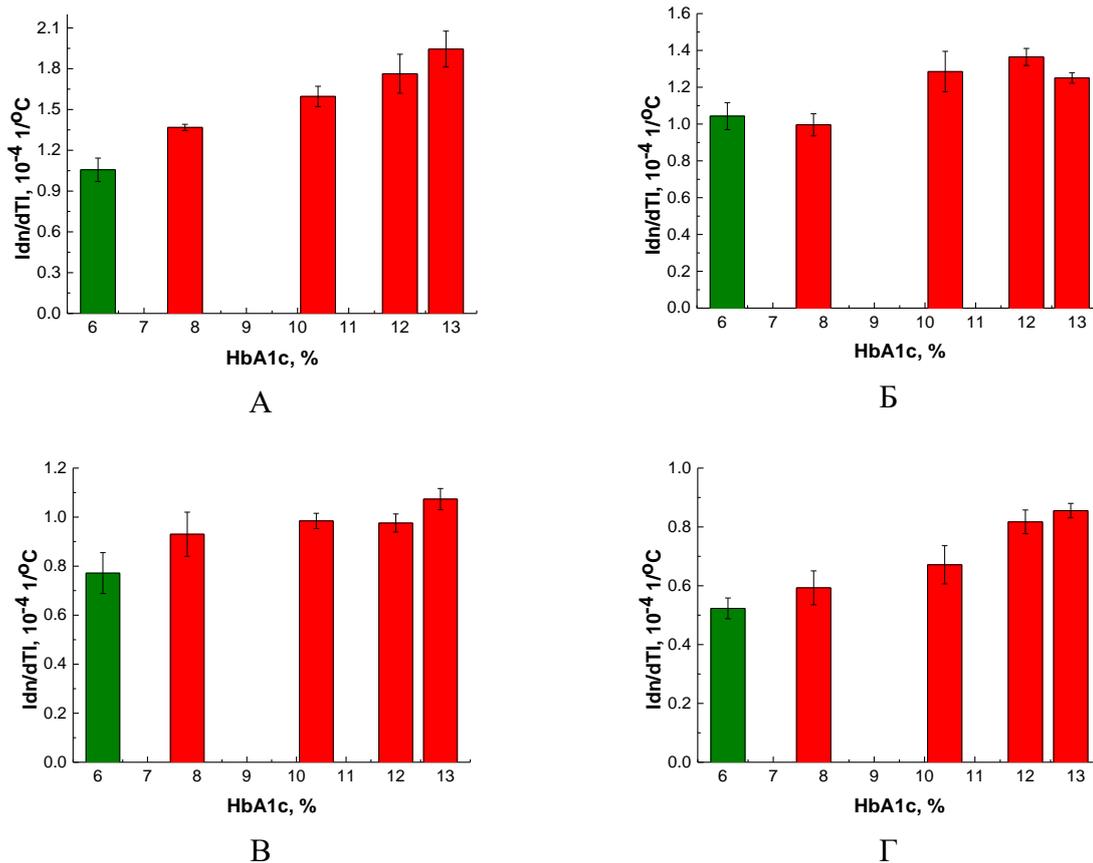


Рисунок 8 - Корреляция температурного инкремента показателя преломления раствора гемоглобина, полученного от добровольцев с сахарным диабетом I-го типа и без, и количества гликированного гемоглобина в исследуемом растворе: А – для 480 нм; Б – для 589 нм; В – для 800 нм; Г – для 1550 нм

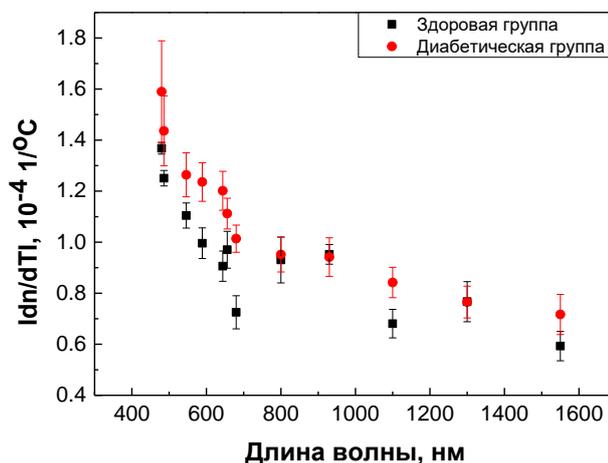


Рисунок 9 - Зависимость температурного инкремента показателя преломления раствора гемоглобина, полученного от добровольцев, от длины волны

В главе 5 представлены результаты экспериментальных исследований рефрактометрических свойств плазмы крови и опухолевой ткани, полученных от крыс с перевитой модельной опухолью альвеолярного рака печени РС1. Для показателей преломления получены дисперсионные зависимости в диапазоне длин волн 480-1550 нм и выполнено сопоставление полученных результатов с результатами биохимического анализа сыворотки крови.

На Рисунке 10 показана дисперсионная зависимость показателя преломления сыворотки крови, полученная после усреднения данных для 3-х групп животных.

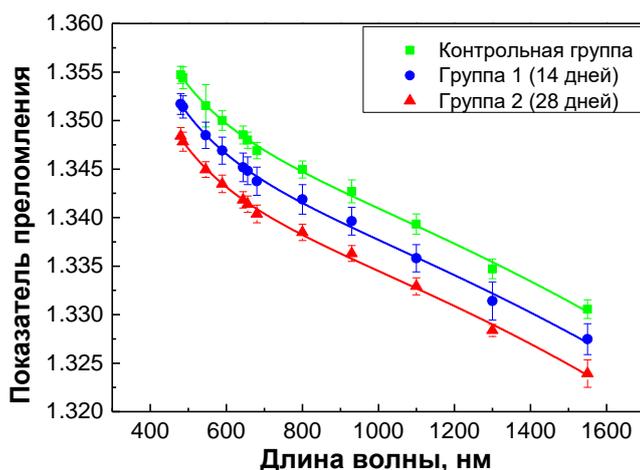


Рисунок 10 - Дисперсионная зависимость показателя преломления сыворотки крови крыс (символы – экспериментальные данные, линии – аппроксимация по формуле Зельмейера, бары – стандартное отклонение)

Для выявления связи показателя преломления сыворотки крови с развитием опухоли были построены корреляционные зависимости показателя от биохимических параметров, измеренных стандартными биохимическими методами для исследуемых образцов. По полученным данным можно отметить, что наблюдается хорошая корреляция показателя преломления сыворотки крови с усредненными значениями для таких биохимических параметров, как общий белок и альбумин. Полученная связь с биохимическими параметрами крови подтверждает влияние изменения состава крови на её оптические свойства при развитии и росте опухоли, в частности показателя преломления в видимой и БИК областях.

Далее описано экспериментальное исследование рефрактометрических свойств ткани модельной опухоли, индуцированной раковыми клетками человека, методом многоволновой рефрактометрии в спектральном диапазоне 480-1550 нм. Проведен анализ дисперсионных зависимостей и сопоставление полученных результатов с результатами биохимического анализа сыворотки крови. Для дисперсионных зависимостей получены коэффициенты для формулы Зельмейера, позволяющей восстановить значение показателя преломления в диапазоне 480-1550 нм.

Значения показателей преломления срезов опухолевой ткани рака печени, измеренные для 12-ти длин волн видимого и БИК диапазонов, показаны на Рисунке 11. Как видно из графика дисперсионная зависимость показателя преломления измеренных образцов имеет нелинейный вид, а значение показателя преломления уменьшается с увеличением длины волны.

На Рисунке 11 можно отметить большее значение показателя преломления для группы 2 (28 дней) по сравнению с группой 1 (14 дней). Это может объясняться увеличением содержания белка в опухолевой ткани при её развитии.

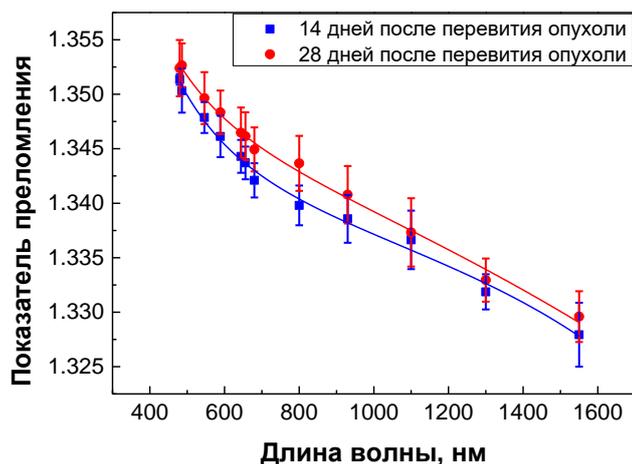


Рисунок 11 - Дисперсионная зависимость среза ткани модельной опухоли для группы 1 (14 дней после перевития опухоли) и группы 2 (28 дней после перевития опухоли) (символы – экспериментальные данные, линии – аппроксимация по формуле Зельмейера, бары – стандартное отклонение)

Для спектрального диапазона 480-1550 нм по полученным экспериментальным данным были рассчитаны коэффициенты для дисперсионной формулы Зельмейера, которая приобретает вид:

$$n_{\text{ткань модельной опухоли (группа 1)}}(\lambda) = \sqrt{1 + \frac{0.78891 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 10758.20899} + \frac{0.05988 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 7.29357 \cdot 10^6}} \quad (6)$$

$$n_{\text{ткань модельной опухоли (группа 2)}}(\lambda) = \sqrt{1 + \frac{0.80328 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 8392.62394} + \frac{691.90494 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - 4.1844 \cdot 10^{10}}} \dots \dots \dots (7)$$

По полученным результатам в данной работе показатель преломления опухолевой ткани для группы 1 изменялся от 1.3514 ± 0.0005 на длине волны 480 нм до 1.3279 ± 0.0023 на длине волны 1.550 нм, а для группы 2 от 1.3524 ± 0.0026 до 1.3296 ± 0.0029 что хорошо согласуется с уже имеющимися литературными данными.

Для количественной оценки связи показателя преломления опухолевой ткани модельного рака печени и биохимических параметров плазмы крови крыс были рассчитаны коэффициенты корреляции Пирсона. Можно отметить, что наблюдается хорошая корреляция показателя преломления с усредненными значениями для таких биохимических параметров, как общий белок, альбумин, мочевины, глюкоза, АСТ, а также массой опухоли. Полученная связь с биохимическими параметрами подтверждает влияние изменения состава опухоли на её оптические свойства, в частности показателя преломления в видимой и БИК областях. Полученный результат представляет собой новые данные, которые могут быть полезны при разработке новых и улучшения существующих методов диагностики и лечения онкологических заболеваний, в том числе связанных с жидкостной биопсией онкологических тканей.

Также показано применение метода многоволновой рефрактометрии для оценки степени дегидратации кожи и его возможности для *in vitro* и *in vivo* исследований, которые проводились на лабораторных животных с привитой опухолью альвеолярного рака печени.

На Рисунке 13 показан прирост объёмной доли экстрагированной жидкости в 70%-ом растворе глицерина и 40%-ом растворе глюкозы после 60 мин воздействия оптического просветляющего агента на образец кожи крысы.

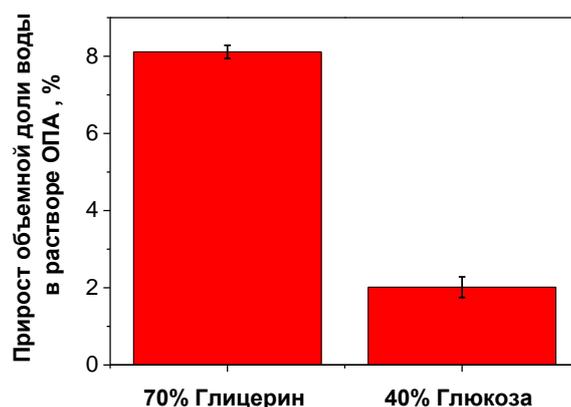


Рисунок 12 - Изменение объёмной доли экстрагированной жидкости в 70%-ом растворе глицерина и 40%-ом растворе глюкозы после просветления образца кожи крысы

На Рисунке 12 можно отметить, что прирост объёмной доли экстрагированной жидкости в 70%-ом растворе глицерина составил 8,11%, а в 40%-ом растворе глюкозы – 2,02%. Благодаря высокой гигроскопичности, глицерин является одним из наиболее эффективных гиперосмотических просветляющих агентов, что подтверждает полученный нами результат.

Измерение показателя преломления на нескольких длинах позволило выполнить расчет дисперсионной зависимости показателя преломления экстрагированного вещества и провести сравнение с дисперсией воды. Дисперсионные зависимости для воды, растворов 70%-ого глицерина, 40%-ой глюкозы и экстрагированной жидкости после взаимодействия кожи с растворами глюкозы и глицерина показаны на Рисунке 13. Представленная на Рисунке 13 дисперсионная кривая для вытесненной из кожи жидкости после воздействия 40%-го раствора глюкозы близка к дисперсионной зависимости для воды, однако несколько большие значения показателя преломления для всех длин волн, кроме 486 нм, свидетельствуют о присутствии белков и солей в экстракте.

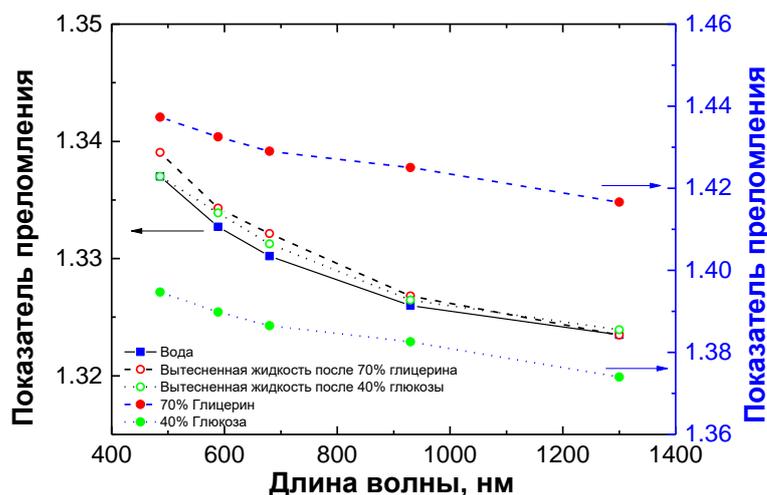


Рисунок 13 - Дисперсионные зависимости для воды, 70%-го глицерина, 40%-ой глюкозы и выделенной жидкости после взаимодействия кожи с растворами глюкозы и глицерина

Представленная на Рисунке 13 дисперсионная кривая для вытесненной из кожи жидкости после воздействия 40%-го раствора глюкозы близка к дисперсионной зависимости для воды, однако несколько большие значения показателя преломления для всех длин волн, кроме 486 нм, свидетельствуют о присутствии белков и солей в экстракте. После воздействия 70%-го раствора глицерина дисперсия завышена для всех длин волн в

видимой области и совпадает с дисперсией воды в БИК области, что также может объясняться вытеснением из ткани межклеточной жидкости, в состав которой входит не только вода, но и белки, и соли. Можно предположить, что вклад белкового компонента несколько выше при воздействии глицерина, поскольку молекулы белков имеют высокое поглощение в ультрафиолетовой области, что приводит к заметному вкладу аномальной дисперсии в ультрафиолетовой и соответствующим изменениям в коротковолновой видимой области за счет крыльев линий поглощения.

Исходя из литературных данных и полученных результатов, раствор глицерина был выбран в качестве оптического просветляющего агента для проведения *in vivo* исследований, при которых выполнено сравнение степени дегидратации биологической ткани на здоровом участке кожи и на участке кожи над опухолью. По полученным значениям показателя преломления был выполнен расчет содержания объёмных долей глицерина и воды в растворах после *in vivo* эксперимента. Полученные значения объёмных долей были усреднены для 12-ти длин волн для каждого раствора и приведены на Рисунке 14 и в Таблице 1.

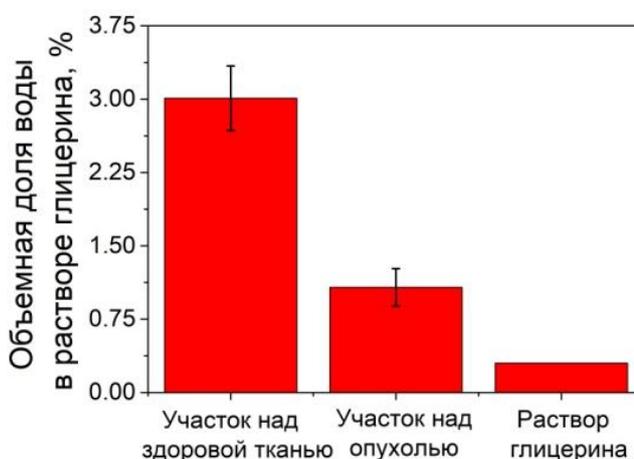


Рисунок 14. Объёмная доля воды в растворе глицерина после *in vivo* эксперимента на участках кожи над здоровой тканью и над опухолью, вычисленная по показателю преломления на 12-ти длинах волн с последующим усреднением

Таблица 1. Содержание воды в растворе глицерина после *in vivo* эксперимента по просветлению кожи крысы

Образец	Объёмная доля глицерина, %	Объёмная доля воды, %
Контрольный участок кожи	97.0±0.3	3.0±0.3
Участок кожи над опухолью	98.9±0.2	1.1±0.2
Раствор глицерина	99.3	0.7

По полученным результатам дегидратация здорового участка кожи крысы составила $3.0 \pm 0.3\%$, а для участка кожи крысы над опухолью составила $1.1 \pm 0.2\%$. Полученный результат позволяет делать детерминацию здорового участка кожи и участка кожи над опухолью, что может быть использовано для разработки оптических методов определения границ опухоли.

В приложении даны таблицы с данными по показателям преломления различных биологических сред и их компонентов, которые встречаются в литературе.

В заключении приводятся основные результаты, представленные в работе, заключаются в следующем:

1. Получены данные для показателей преломления биологических сред, таких как кожа мыши, кожа крысы, срезы мышечной ткани свиньи и крысы, срезы тканей головного мозга крысы, срезы почки мыши, в широком диапазоне температур для видимой и БИК спектральных областей (480-1550 нм). Проведен анализ их дисперсионных и температурных зависимостей. Определены коэффициенты для формулы Зельмейера, позволяющие восстанавливать показатель преломления в диапазоне 480-1550 нм.
2. Для жировой ткани свиньи получены и проанализированы дисперсионная и температурная зависимости показателей преломления среза ткани и вытопленной жировой капли. Определены температуры, которые могут соответствовать фазовым переходам.
3. Получены данные для показателей преломления растворов гемоглобина и альбумина человека. Получена зависимость от концентрации основного белкового компонента в растворе. Определены коэффициенты для дисперсионной формулы Зельмейера, позволяющие восстанавливать показатель преломления в спектральном диапазоне 480-1550 нм.
4. По экспериментальным данным измеренных показателей преломления альбумина и гемоглобина человека рассчитан показатель преломления крови для видимой и БИК спектральных областей (480-1550 нм).
5. Измерены значения показателей преломления растворов гликированных белков крови (альбумина и гемоглобина) и их смесей. Установлена возможность детерминации гликированной и негликированной фракций по величине температурного инкремента показателя преломления. Установлена зависимость, позволяющая проводить оценку уровня гликированности белков крови.
6. Показана возможность оценки степени гликированности гемоглобина методом многоволновой рефрактометрии на примере исследования рефрактометрических свойств растворов гемоглобина, полученного от цельной крови добровольцев с сахарным диабетом I-го типа.
7. Для выделенных 12-ти длин волн видимой и БИК спектральных областей (480-1550 нм) определены показатели преломления сыворотки крови крыс с опухолевой тканью модельного рака печени. Установлена корреляция показателя преломления сыворотки с биохимическими параметрами сыворотки и корреляция показателя преломления сыворотки крови со степенью развития опухолевой ткани.
8. Показатель преломления опухолевой ткани модельного рака увеличивается при развитии опухоли, что подтверждает возможность использования величины показателя преломления в качестве «биомаркера», позволяющего детерминировать здоровую ткань от патологической.
9. При действии гиперосмотического агента ассоциированная с показателем преломления дегидратация участка кожи крыс над развитой модельной опухолью рака печени в 3 раза ниже по сравнению со здоровыми участками кожи.

Представленные в данной диссертационной работе экспериментальные данные о рефрактометрических свойствах различных тканей и их компонентов в широком диапазоне длин волн и температур необходимы для наиболее полного описания оптических свойств многокомпонентных тканей, в частности, при исследованиях *in vivo*. Например, при решении прямой и обратной задач взаимодействия световых пучков со

сложноорганизованными тканями с использованием статистического моделирования Монте-Карло. Также полученные результаты важны для усовершенствования и развития оптических методов диагностики и терапии социально-значимых заболеваний, таких как сахарный диабет и онкологические заболевания.

Выражаю свою глубокую благодарность за помощь в исследованиях и обсуждение результатов руководителю коллективного центра НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии СГМУ им. В.И. Разумовского д.б.н. А.Б. Бучарской, профессору кафедры оптики и биофотоники СГУ д.ф.-м.н. В.И. Кочубею, доценту кафедры оптики и биофотоники СГУ к.ф.-м.н. И.Ю. Яниной, а также всем сотрудникам кафедры оптики и биофотоники, оказавшим поддержку и высказавшим полезные советы и замечания.

Особую благодарность выражаю своему научному руководителю – Тучину Валерию Викторовичу, д.ф.-м.н., профессору, чл.-корр. РАН., заведующему кафедрой оптики и биофотоники СГУ, за оказанную помощь в решении сложных научных задач, а также проявившему терпение и внимание за время подготовки диссертации и к её защите. Валерий Викторович способствовал моему становлению в профессии и помог в поиске своего места в научном мире. За время работы в научном коллективе под его руководством я многому научилась и особенно ценны его слова поддержки и советы, вдохновляющие на новые свершения.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах из списка рекомендованных ВАК:

1. **E.N. Lazareva**, P.A. Dyachenko, A.B. Bucharskaya, N.A. Navolokin, V.V. Tuchin, «Estimation of dehydration of skin by refractometric method using optical clearing agents» - // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. 2019. Vol.5. №2. P. 020305 (1-7).
2. **E.N. Lazareva**, V.V. Tuchin, «Blood refractive index modelling in the visible and near infrared spectral regions» - // Journal of Biomedical Photonics & Eng. 2018. Vol.4 №1. P. 010503 (1-8).
3. М.М. Назаров, О.П. Черкасова, **Е.Н. Лазарева**, А.Б. Бучарская, Н.А. Наволокин, В.В. Тучин, А.П. Шкуринов, «Комплексное изучение особенностей поглощения сыворотки крови крыс с экспериментальным раком печени» - // Оптика и спектроскопия. 2019. Т.126. Вып. 6. С. 799-808.
4. А.А. Манькова, О.П. Черкасова, **Е.Н. Лазарева**, А.Б. Бучарская, П.А. Дьяченко, Ю.В. Кистенев, Д.А. Вражнов, В.Е. Скиба, В.В. Тучин, А.П. Шкуринов, «Исследование сыворотки крови у крыс с трансплантированной холангиокарциномой с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния света» - // Оптика и спектроскопия. 2020. Т.128. Вып. 7. С. 956-963.
5. О.А. Смолянская, **Е.Н. Лазарева**, С.С. Налегает, Н.В. Петров, К.И. Зайцев, П.А. Тимошина, Д.К. Тучина, Я. Г.Торопова, О. В. Корнюшин, А.Ю. Бабенко, Ж.-П. Гийе, В.В. Тучин, «Мультимодальная оптическая диагностика гликированных биологических тканей» - // Успехи биологической химии. 2019. Т.59. С. 253–294.

Статьи в изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus:

1. I.S. Martins, H.F. Silva, **E.N. Lazareva**, N.V. Chernomyrdin, K.I. Zaytsev, L.M. Oliveira, and V.V. Tuchin, «Measurement of tissue optical properties in a wide spectral range: a review [Invited]» - // Biomed. Opt. Express. 2023. №14, P. 249-298.
2. A.B. Bucharskaya, I.Y. Yanina, S.V. Atsigaida, V.D. Genin, **E.N. Lazareva**, N.A. Navolokin, P.A. Dyachenko, D.K. Tuchina, E.S. Tuchina, E.A. Genina, Y.V. Kistenev, V.V. Tuchin, «Optical clearing and testing of lung tissue using inhalation aerosols: prospects for monitoring the action of viral infections» - // Biophys Rev. 2022. Vol.14 №4. P. 1005-1022.
3. **E.N. Lazareva**, A.Y. Zyubin, N.I. Dikht, A.B. Bucharskaya, I.G. Samusev, V.A. Slezhkin, V.I. Kochubey, V.V. Tuchin, «Optical Properties of Glycated and Non-Glycated Hemoglobin–Raman/Fluorescence Spectroscopy and Refractometry» -// J. of Biomedical Photonics & Eng. 2022. Vol.8 №2 P. 020303 (1-9).
4. P.A. Dyachenko (Timoshina), L.E. Dolotov, **E.N. Lazareva**, A.A. Kozlova, O.A. Inozemtseva, R.A. Verkhovskii, G.A. Afanaseva, N.A. Shushunova, V.V. Tuchin, E.I. Galanzha, V.P. Zharov, «Detection of Melanoma Cells in Whole Blood Samples Using Spectral Imaging and Optical Clearing» - // IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics. 2021. Vol.27 №4. P. 9310679 (1-12).
5. T. Ermatov, R.E. Noskov, A.A. Machnev, I. Gnusov, V. Atkin, **E.N. Lazareva**, S.V. German, S.S. Kosolobov, T.S. Zatsepin, O.V. Sergeeva, J.S. Skibina, P.Ginzburg, V.V. Tuchin, P.G. Lagoudakis, D.A. Gorin, «Multispectral sensing of biological liquids with hollow-core microstructured optical fibres» - // Light: Science and Applications. 2020. Vol.9. №173. P. 1-12.
6. R.E. Noskov, A.A. Zanishevskaya, A.A. Shuvalov, S.V. German, O.A. Inozemtseva, T.P. Kochergin, **E.N. Lazareva**, V.V. Tuchin, P. Ginzburg, J.S. Skibina, D.A. Gorin, «Enabling magnetic resonance imaging of hollow-core microstructured optical fibers via nanocomposite coating» - // Optics Express. 2019. Vol.27. №.7. P.9868-9878.
7. A.N. Bashkatov, K.V. Berezin, K.N. Dvoretzkiy, M.L. Chernavina, E.A. Genina, V.D. Genin, V.I. Kochubey, **E.N. Lazareva**, A.B. Pravdin, M.E. Shvachkina, P.A. Timoshina, D.K. Tuchina, D.D. Yakovlev, D.A. Yakovlev, I.Y. Yanina, O.S. Zhernovaya, V.V. Tuchin, «Measurement of tissue optical properties in the context of tissue optical clearing» - // J. Biomed. Opt. 2018. Vol.23 №9. P. 1-31.
8. I.Y. Yanina, **E.N. Lazareva**, V.V. Tuchin, «Refractive index of adipose tissue and lipid droplet measured in wide spectral and temperature ranges» - // Applied Optics. 2018. Vol.57 №17, P. 4839-4848.
9. **E.N. Lazareva**, V.V. Tuchin, «Measurement of refractive index of hemoglobin in the visible/NIR spectral range» - // Journal of Biomedical Optics, 2018. Vol.23. №3. P. 1-9
10. **E.N. Lazareva**, A.Y. Zyubin, I.G. Samusev, V.A. Slezhkin, V.I. Kochubey, and V.V. Tuchin «Refraction, fluorescence, and Raman spectroscopy of normal and glycated hemoglobin» - // Proc. SPIE. 2018. Vol.10685, P. 1068540.
11. **E.N. Lazareva** and V.V. Tuchin, «The temperature dependence of refractive index of hemoglobin at the wavelengths 930 and 1100 nm», Proc. SPIE. 2016. Vol.9917, P. 99170U (1-9).

12. **E.N. Lazareva**, V.V. Tuchin, I.V. Meglinski, «Measurements of absorbance of hemoglobin solutions incubated with glucose» - // Proc. SPIE. 2008. Vol.6791, P. 67910-67910O, Bellingham, WA, USA.

Глава в монографии:

Refractive index measurements of tissue and blood components and OCAs in a wide spectral range /**E. N. Lazareva**, L. Oliveira, I. Y. Yanina, N. V. Chernomyrdin, G. R. Musina, D. K. Tuchina, A. N. Bashkatov, K. I. Zaytsev, and V. V. Tuchin // Handbook of Tissue Optical Clearing: New Prospects in Optical Imaging, V. V. Tuchin, D. Zhu, and E. A. Genina, eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 2022. – P. 141-166.

Остальные публикации:

1. **Е.Н. Лазарева**, А.М. Мыльников, Н.А. Наволокин, Д.К. Тучина, А.А. Доронкина, Р.А. Верховский, Р.А. Анисимов, М.В. Ломова, В.И. Кочубей, И.Ю. Янина «Исследование оптических свойств модельного рака печени методами рефрактометрии и спектроскопии комбинационного рассеяния» - // Взаимодействие сверхвысокочастотного, терагерцового и оптического излучения с полупроводниковыми микро- и наноструктурами, метаматериалами и биообъектами : Сборник статей девятой Всероссийской научной школы-семинара, Саратов, 24 мая 2022 года / Под редакцией Ал.В. Скрипаля. – Саратов: Издательство “Саратовский источник”, 2022. – С. 269-273.
2. **Е.Н. Лазарева**, И.Ю. Янина, Ю.В. Кистенев, В.В. Тучин, «Рефрактометрические свойства альбумина на выделенных длинах волн при стабилизированных температурах», - // Взаимодействие сверхвысокочастотного, терагерцового и оптического излучения с полупроводниковыми микро- и наноструктурами, метаматериалами и биообъектами : Сборник статей восьмой Всероссийской научной школы-семинара, Саратов, 24 мая 2021 года / Под редакцией Ал.В. Скрипаля. – Саратов: Издательство "Саратовский источник", 2021. – С. 166-171.
3. **E.N. Lazareva**, A. Y. Zyubin, I.G. Samusev, V.V. Tuchin, «Refractive properties of glycated albumin and hemoglobin in a wide range of wavelengths and temperatures», - // Advanced Laser Technologies ALT`21: Book of abstracts the 28th International Conference, Moscow, 06–10 октября 2021 года. – Moscow: Общество с ограниченной ответственностью «МЕСОЛ», 2021. – P. 212.
4. **Е.Н. Лазарева**, А.Ю. Зюбин, Н.И. Дихт, Н.А. Шушунова, А.Б. Бучарская, И.Г. Самусев, В.В. Тучин «Исследование оптических свойств белков крови (гемоглобина и альбумина) и их гликированных фракций методами рефрактометрии, флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния», - // XIX Всероссийский молодежный Самарский конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике: Сборник трудов конференции, Самара, 09–13 ноября 2021 года. – Москва: Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук, 2021. – С. 235-238.
5. **Е.Н. Лазарева**, П.А. Тимошина, А.Б. Бучарская, Н.А. Наволокин, В.В. Тучин, «Оценка степени дегидратации кожи рефрактометрическим методом при применении оптических просветляющих агентов» - // в сборнике статей XVI Всероссийского Самарского Конкурса-конференции научных работ по оптике и

- лазерной физике, Москва: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук, 2018, с. 124-135
6. **Е.Н. Лазарева**, М.М. Назаров, П.А. Тимошина, А.Б. Бучарская, Н.А. Наволокин, А.П. Шкуринов, В.В. Тучин, «Оценка степени дегидратации кожи при применении оптических просветляющих агентов в видимой, ближней ИК и ТГц областях» - // Тезисы докладов Международной конференции Физика.СПб, ФТИ им. А.Ф. Иоффе, Санкт-Петербург, 22-24 октября, 2019, с. 279-280
 7. **Е.Н. Лазарева**, Л.И. Малинова, В.В. Тучин, «Рефрактометрические свойства микрочастиц тромбоцитарного происхождения у больных с острым инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST на фоне фармакологической супрессии агрегационной активности тромбоцитов» - // тезисы в сборнике «Научные труды. Том 2», Издательство «Перо», 2019, с. 285
 8. **E.N. Lazareva**, P.A. Dyachenko, M.M. Nazarov, A.V. Buchar'skaya, V.V. Tuchin, A.P. Shkurinov, «Refractive properties of blood serum of rats with experimental liver cancer», Сборник тезисов Китайско-российского семинара по биофотонике и биомедицинской оптике-2020, Саратов., 2020, с. 54-55
 9. **Е.Н. Лазарева**, П.А. Тимошина, А.Б. Бучарская, Н.А. Наволокин, В.В. Тучин, «Оценка степени дегидратации кожи рефрактометрическим методом при применении оптических просветляющих агентов» - // в сборнике статей XVI Всероссийского Самарского Конкурса-конференции научных работ по оптике и лазерной физике, Москва: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук, 2018.

Список литературы, цитируемой в автореферате

- [1] S. Singh, "Refractive index measurement and its applications," *Physica Scripta*, vol. 65, no. 2, pp. 167-180, 2002.
- [2] R. Khan, B. Gul, S. Khan, H. Nisar and I. Ahmad, "Refractive index of biological tissues: Review, measurement techniques, and applications," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 33, p. 102192, 2021.
- [3] N. Gomes, V. V. Tuchin and L. M. Oliveira, "UV-NIR efficiency of the refractive index matching mechanism on colorectal muscle during treatment with different glycerol solutions," *J. Biomed. Phot. & Eng.*, vol. 6, no. 2, p. 3374, 2020.
- [4] Z. Wang, K. Tangella, A. Balla and G. Popescu, "Tissue refractive index as marker of disease," *J. Biomed. Opt.*, vol. 16, no. 11, p. 116017, 2011.
- [5] J. Lai, Z. Li, C. Wang and A. He, "Experimental measurement of the refractive index of biological tissues by total internal reflection," *Appl. Opt.*, vol. 44, p. 1845–1849, 2005.
- [6] S. Cheng, H. Y. Shen, G. Zhang, C. Huang and X. J. Huang, "Measurement of the refractive

- index of biotissue at four laser wavelengths," *Proc. SPIE.*, vol. 4916, p. 172–176, 2002.
- [7] M. Daimon and A. Masumura, "Measurement of the refractive index of distilled water from the near-infrared region to the ultraviolet region," *Appl. Opt.*, vol. 46, no. 18, pp. 3811-3820, 2007.
- [8] J. Gienger, H. Groß, J. Neukammer and M. Bär, "Determining the refractive index of human hemoglobin solutions by Kramers-Kronig relations with an improved absorption model," *Appl. Opt.*, vol. 55, no. 31, pp. 8951-8961, 2016.
- [9] O. Sijilmassi, P. G. Parejo and A. Á. Herrero, "Evaluation of the refractive indices of pure organic dyes using binary mixture models," *Journal of Molecular Liquids*, no. 1, p. 122221, 2023.
- [10] H. Ding, J. Q. Lu, W. A. Wooden, P. J. Kragel and X.-H. Hu, "Refractive indices of human skin tissues at eight wavelengths and estimated dispersion relations between 300 and 1600 nm," *Phys. Med. Biol.*, vol. 51, no. 6, pp. 1479-1489, 2006.
- [11] N. Bosschaart, G. J. Edelman, M. C. G. Aalders, T. G. van Leeuwen and D. J. Faber, "A literature review and novel theoretical approach on the optical properties of whole blood," *Lasers in Medical Science*, vol. 29, no. 2, p. 453– 479, 2014.
- [12] G. M. Artmann, C. Kelemen, D. Porst, G. Buldt and S. Chien, "Temperature transitions of protein properties in human red blood cells," *Biophys. J.*, vol. 75, p. 3179–3183, 1998.
- [13] M. Friebel, M. Roggan, A. Müller, I. Meinke, A. Roggan and M. B. Gmbh, "Determination of optical properties of human blood in the spectral range 250 to 1100 nm using Monte Carlo simulations with hematocrit-dependent effective scattering phase functions," *J. Biomed. Opt.*, vol. 11, p. 034021, 2006.
- [14] S. Baar, "Osmotic resistance of heat-damaged erythrocytes," *J. Clin. Pathol.*, vol. 20, no. 3, pp. 239-243, 1967.
- [15] P. Giannios, S. Koutsoumpou, K. Toutouzas, M. Matiatou, G. Zografos and K. Moutzouris, "Complex refractive index of normal and malignant human colorectal tissue in the visible and near-infrared," *J. Biophotonics*, vol. 10, no. 2, p. 303–310, 2017.
- [16] Л. Плотникова, А. Поляничко, М. Кобелева, М. Успенская, А. Гарифуллин и С. Волошин, «Рефрактометрический метод исследования уровня протеинемии и электролитных нарушений в сыворотке крови больных множественной миеломой,» *Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики*, т. 2, pp. 263-268, 2017.
- [17] F. G. Martino, M. Vitillo, M. Pieri, G. Marrone, F. Gangeri, F. Ansali, M. Dessì, S. Bernardini, N. Di Daniele and A. Noce, "Biomarkers of Glyco-Metabolic Control in Hemodialysis Patients: Glycated Hemoglobin vs. Glycated Albumin," *Medicina (Kaunas)*, vol. 57, no. 7, p. 712, 2021.

- [18] A. Ghazaryan, M. Omar, Tserevelakis, G. J. and V. Ntziachristos, "Optoacoustic detection of tissue glycation," *Biomed. Opt. Express*, vol. 6, no. 9, p. 3149, 2015.
- [19] I. Costantini, R. Cicchi, L. Silvestri, F. Vanzi and F. Pavone, "In-vivo and ex-vivo optical clearing methods for biological tissues: review," *Biomed. Opt. Express*, vol. 10, no. 10, pp. 5251-5267, 2019.
- [20] W. Blondel, P. Rakotomanga, G. Khairallah, C. Soussen, W. Feng, D. Zhu, H. Chen, C. Daul, A. Delconte, F. Marchal and M. Amouroux, "Skin optical properties modifications using optical clearing agents: experimental and modelling results," *International Conference Laser Optics (ICLO)*, p. 507, 2018.
- [21] K. Yoshida, K. Ohkubo, N. Ojima and K. Iwata, "Application of the critical angle method to refractive index measurement of human skin in vivo under partial contact," *J. Biomed. Opt.*, vol. 18, no. 3, pp. 037002-037002, 2013.
- [22] N. Chen, M. Chen, S. Liu, Q. Guo, Z. Chen and T. Wang, "Change in refractive index of muscle tissue during laser-induced interstitial thermotherapy," *Biomed. Mater. Eng.*, vol. 24, no. 7, p. 807–813, 2014.
- [23] S. Nikitin, T. Khokhlova and I. Pelivanov, "Temperature dependence of the optoacoustic transformation efficiency in ex vivo tissues for application in monitoring thermal therapies," *J. Biomed. Opt.*, vol. 17, pp. 061214-1–9, 2012.