

Ю.П.Синичкин, С.Р.Утц

IN VIVO ОТРАЖАТЕЛЬНАЯ
И ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ
КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

ИЗДАТЕЛЬСТВО САРАТОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

2018

УДК [535.39:611.77]
ББК 22.344: 55.83
С38

Синичкин Ю.П., Утц С.Р.

In vivo отражательная и флуоресцентная спектроскопия кожи
С38 человека. – 2-е изд., дополн. - Саратов: Изд-во Саратов. ун-та,
2018. - 108 с.: ил.
ISBN 5-292-02626-3

В книге изложены основные принципы *in vivo* отражательной и флуоресцентной спектроскопии кожи человека. Цель книги – сформировать у читателя представления о процессах формирования спектров отражения и флуоресценции кожи человека, о влиянии на спектры отражения и автофлуоресценции происходящих в коже морфо-функциональных изменений, показать возможности комбинированного использования отражательной и флуоресцентной спектроскопии кожи при разработке неинвазивных диагностических методик оценки ее состояния. Помимо методов спектрального анализа состояния кожи в монографии изложены основы цветовой и поляризационной визуализации структуры кожной ткани.

Для научных работников, преподавателей, аспирантов и студентов старших курсов, специализирующихся в области биомедицинской оптики; студентов медицинских вузов, врачей-дерматологов, косметологов.

Рецензент:

Доктор физико-математических наук А.В.Скипаль

УДК 535: [611.778+616.5]
ББК 22.344: 55.83

Работа издана в авторской редакции

ISBN 5-292-02626-3

© Ю.П.Синичкин
С.Р.Утц, 2018

ПРЕДИСЛОВИЕ

Оптика биотканей - одна из интенсивно развивающихся областей знаний, представляющая интерес как для физиков, так и биологов и медиков, работающих над созданием оптических медицинских технологий диагностики и лечения. Взаимодействие света и живой материи весьма разнообразно. Свет может поглощаться, отражаться, рассеиваться и переизлучаться биологической средой. Каждый из этих процессов несет информацию о микро- и макроструктуре этой среды, о движении и форме отдельных её составляющих, о происходящих в организме метаболических изменениях.

Оптика кожи как раздел оптики биотканей позволяет понять процессы, происходящие при распространении в ней света. Количественная оценка оптических параметров кожи дает возможность получать объективную информацию о содержании и пространственном распределении в ней различных биологических компонентов и успешно использовать ее для диагностики различных кожных заболеваний, изучения последствий воздействия факторов окружающей среды, оценки эффективности лечения и др. Необходимо отметить, что большинство полученных в настоящее время результатов по оптике кожи относятся к измерениям *in vitro* образцов ткани, в то время как взаимодействие света с живой тканью может вносить существенные изменения в результаты исследований.

Среди оптических методов *in vivo* исследований кожи в настоящее время наибольшее развитие получили методы отражательной и флуоресцентной спектроскопии. Отраженное кожей излучение или ее флуоресценция несет информацию о структуре эпидермиса и дермы, количестве и кровенаполненности кровеносных сосудов, пространственном распределении хромофоров и флуорофоров внутри кожи и их концентрации, интенсивности происходящих в коже метаболических процессов. При этом, хотя явление автофлуоресценции кожи известно давно, только в последнее время становится понятным механизм формирования спектра флуоресценции кожи, возбужденной излучением УФА диапазона. Объективность флуоресцентных методик диагностики состояния кожи зависит от того,

какие флуорофоры (НАД-Н и кератин эпидермиса или коллаген дермы) участвуют в происходящих в кожной ткани биохимических процессах.

Методы отражательной и флуоресцентной спектроскопии биоткани взаимно дополняют друг друга. Их комбинированное использование при *in vivo* исследованиях кожи дают определенный вклад в развитие фундаментальных представлений о происходящих в коже биофизических процессах. Сопоставление результатов экспериментальных исследований с результатами математического моделирования спектров отражения и флуоресценции кожи позволяет описать происходящие под действием различных факторов изменения в биоткани с точки зрения изменений ее функционально-морфологического состояния, что может быть положено в основу разработки неинвазивных диагностических методов оценки ее состояния.

Последние достижения в области волоконной оптики, оптоэлектроники и компьютерных технологий дают основание рассматривать отражательную и флуоресцентную спектроскопию как достаточно простые и в то же время точные методы *in vivo* количественного анализа содержания гемоглобина крови и пигмента меланина в кожной ткани, Такой анализ возможен путем определений индексов эритемы и пигментации. Индекс эритемы позволяют проводить диагностику воспалительных процессов, определять состояние кожи под влиянием внешних воздействий, проводить диагностику состояния кожного покрова в процессе лечения и т.д. Индекс пигментации определяет эффективность защиты человека от неблагоприятного воздействия ультрафиолетового излучения.

Измерения спектров отражения кожи в средней части видимого диапазона дает возможность определения одного из важнейших физиологических параметров состояния организма человека - степени оксигенации гемоглобина крови.

На цветовом восприятии спектров отражения кожи излучения в видимой области спектра основан традиционный метод хроматографии. Цветовой анализ спектров отражения и флуоресценции, проведенный на основе колориметрических систем МКО1931(XYZ) и МКО1976(L*a*b*), позволяет количественно оценивать изменение состояния исследуемой ткани по изменению ее цветовых параметров.

Несомненный интерес для научной и практической биофизики и медицины представляют спектроскопические методы изучения диффузии наносимых на кожу лекарственных и косметических препаратов. Целым направлением в дерматологии и косметологии является разработка фото-защитных композиций в виде кремов, мазей, лосьонов и др., которые защищают кожу от разрушительного воздействия на нее УФ излучения. В книге изложена разработанная авторами оригинальная флуоресцентная методика определения пропускания УФ излучения фотозащитной композицией.

Широкое внедрение в практическую биофизику и медицину компьютеризированных комплексов, позволяющих получать и обрабатывать видеоизображения исследуемых участков кожи, ставит на новый уровень степень объективности диагностики состояния кожной ткани. В книге рассмотрены методы диагностики кожи, основанные на получении компьютерного изображения исследуемого участка кожи и его цветовом анализе, а также на анализе изображения кожи при ее освещении линейно поляризованным светом, когда в качестве параметра визуализации используется ко- или кросс-компоненты отраженного света или степень его поляризации.

Приведенный в книге библиографический список позволит читателям глубже изучить физические основы взаимодействия света с биологической тканью и возможные сферы их применений. Книга может служить хорошим пособием для аспирантов и студентов старших курсов, специализирующихся по биофизике, биохимической физике и медицинской физике.

Доктор физико-математических наук,
профессор *В.В.Тучин*

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНА НЕКТОРА ПЕТРОВСКОГО

1. КОЖНАЯ ТКАНЬ КАК ПРЕДМЕТ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДАМИ ОТРАЖАТЕЛЬНОЙ И ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Структура кожи

Кожа человека представляет собой чрезвычайно сложный по своей структуре и набору функций орган. Кожа – первый и главный барьер, ограждающий внутреннюю среду организма от неблагоприятных воздействий окружающего мира (метеорологических, механических, химических, микробных и др. факторов). Сосудистая и потовыделительная системы кожи уникально приспособлены для обеспечения потребностей в поддержании температурного постоянства организма. Обширная нерорецепторная сеть кожи является тонко настроенной системой передатчиков информации приходящей из внешней среды. Велика роль кожи в формировании и модуляции иммунного ответа.

Средняя площадь кожи взрослого человека составляет около 20000 см², а масса достигает 6-7 кг, т.е. около 10% от массы всего тела [1].

Схематично структура кожи изображена на рис.1.

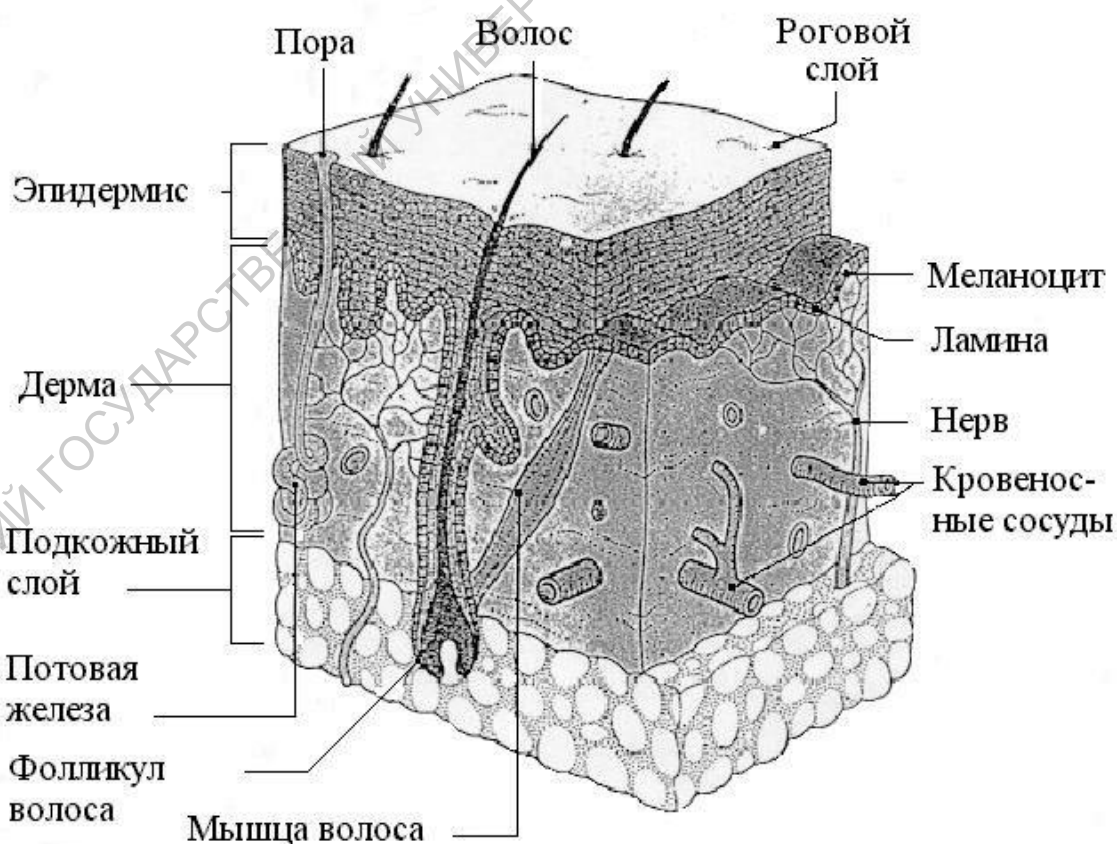


Рис. 1. Схема строения кожи

Кожа представляет собой трехкомпонентную тканевую систему, образованную эпидермисом, дермой и подкожной жировой клетчаткой, которые находятся в морфофункциональном единстве.

Внешний слой – эпидермис; или многослойный плоский ороговевающий эпителий, является пограничной тканью с выраженными барьерными функциями. Эпидермис относительно мало изменяется по толщине (50-100 мкм), за исключением ладоней и подошв, где его толщина может достигать 1 мм [1].

Под эпидермисом находится плотная волокнистая и в тоже время эластичная ткань, дерма, составляющая по объему и массе основную часть кожи. В различных областях тела толщина дермы имеет значительные вариации, составляя в среднем 1-2 мм. Дерма содержит хорошо развитую сосудистую сеть, огромное количество нервных окончаний, а также потовые и сальные железы и их выводные протоки. Производными (придатками) кожи являются также волосы и ногти.

Под эпидермисом и дермой (или собственно кожей) находится гиподерма (1- 2 мм) - подкожная ткань, которая представляет собой жировую и соединительную ткань различной толщины. Группа волокон дермы проникает в подкожную ткань, тем самым как бы разделяя ее на дольки, и формирует связь кожи с подлежащими волокнистыми компонентами.

Определяемые невооруженным взглядом локальные вариации внешнего вида и поверхностной структуры кожи обусловлены характерной для каждого анатомического участка тела степенью выраженности и глубиной залегания сосудистой сети, а также распределением и различной удельной плотностью волосяных фолликулов, сальных и потовых желез [1, 26].

Эпидермис

Эпидермис представляет собой многослойный плоский ороговевающий эпителий. Как клеточный слой, в своей целостности он прерывается только порами (окончаниями выводных протоков) железистых структур и волосами.

В эпидермисе, в свою очередь, принято выделять два слоя: поверхностный, состоящий из ороговевших высохших безъядерных клеток (роговой слой или *stratum corneum*) и внутренние слои живых клеток (*viable epidermis*). Основным типом клеток в этом эпителиальном континууме - эпидермальная клетка, или кератиноцит, названная так благодаря содержащимся в ней волокнистым протеинам - кератинам.

Организация и структура эпидермиса представлена на рисунке 2 и рисунке 3.

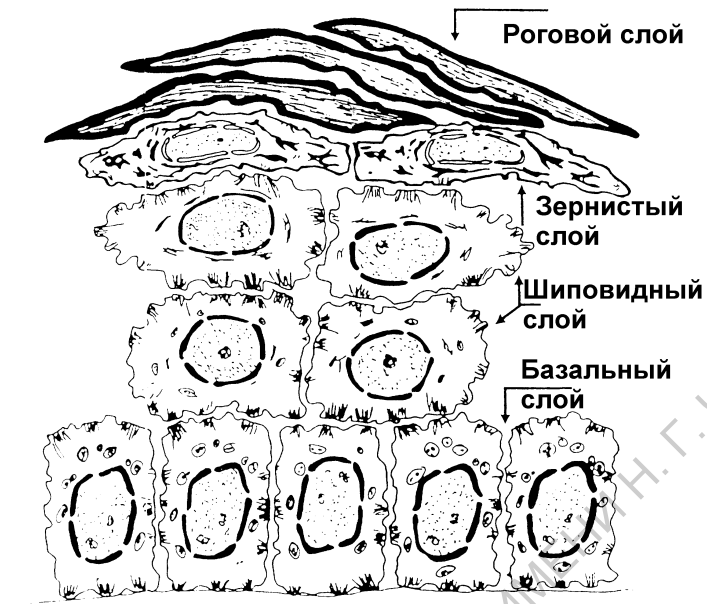


Рис. 2. Клеточный состав эпидермиса [1]

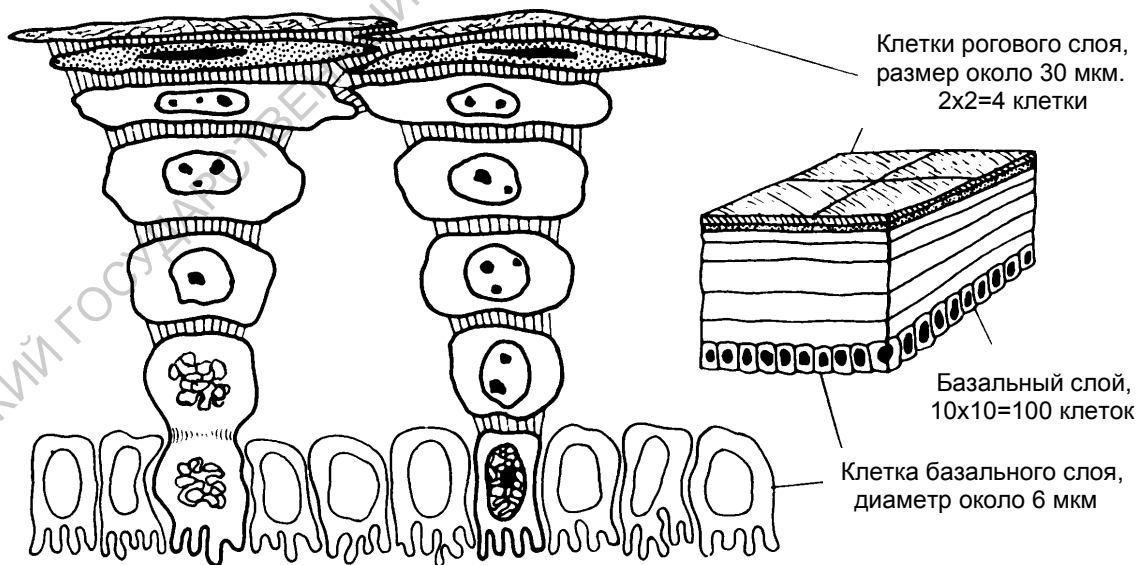


Рис. 3. Структурная организация эпидермиса [1]

Роговой слой

Клетки рогового слоя представляют собой плоские многогранные безъядерные чешуйки, толщиной 0,5 мкм и в диаметре 30-40 мкм (рис. 4). Размер клеток рогового слоя может варьировать в зависимости от участка тела, возраста и наличия факторов, стимулирующих или тормозящих пролиферацию (например, ультрафиолетового облучения).

Роговые чешуйки представляют собой результат необратимого процесса кератинизации, которому подверглись клетки нижележащих слоев эпидермиса. При нормально протекающем процессе кератинизации в роговых чешуйках не удается обнаружить присутствия каких-либо клеточных органелл или их фрагментов (см. рис. 4). Цитоплазма представляет собой гомогенную массу, состоящую из нерастворимых кератинов, белков и ковалентно связанных липидов. Межклеточное пространство также заполнено плотным аморфным веществом: в нижних слоях рогового слоя оно состоит из множества липидных элементов, разделенных десмосомальными соединениями, характерными для кератиноцитов, в верхней части слоя происходит разбиение липидных элементов на части или малозаметное разрушение десмосом, приводящее к отделению поверхностных клеток в окружающую среду (десквамации) [2].

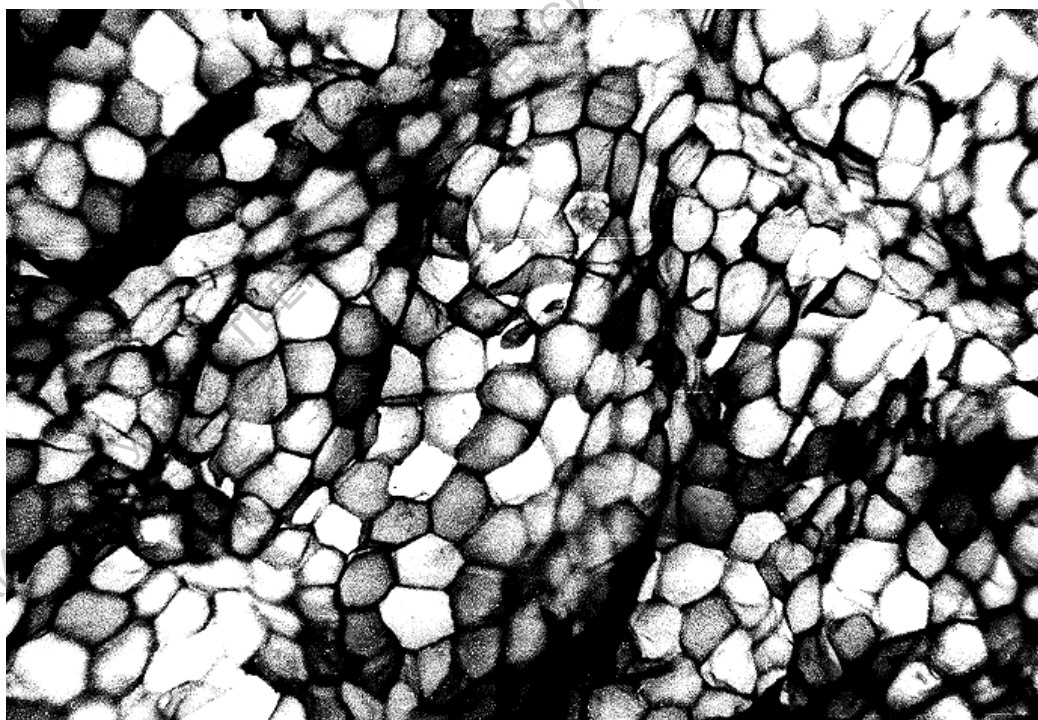


Рис. 4. Неокрашенный поверхностный отрыв эпидермиса.
Увеличение 40^x

Обычно роговой слой состоит из 15-20 клеточных слоев и лишь на участках, подвергающихся интенсивному механическому воздействию (ладони и подошвы), количество слоев увеличивается в 5-10 раз.

В пределах *stratum corneum* 3-5 поверхностных слоев клеток могут быть объединены в *stratum disjunctum* (разделительный слой). Именно клетки разделительного слоя подвергаются процессу десквамации. Следующие 6-8 рядов клеток, располагающихся под *stratum disjunctum*, могут быть объединены в *stratum compactum*. Для корнеоцитов компактного слоя характерна большая степень гидратации (до 30%, против 15% для поверхностных роговых чешуек). Различия между слоями не ограничиваются лишь степенью их гидратации, но затрагивают также аминокислотный и липидный состав, ригидность клеточных мембран и количество десмосом.

Живой эпидермис (*viable epidermis*)

Непосредственно под роговым слоем расположены 15-20 слоев эпителиальных клеток, находящихся на различных этапах кератинизации.

Условно живой эпидермис можно разделить на три слоя клеток, отличающихся количеством рядов и гистоморфологической структурой (рис. 3-4): (1) зернистый (*stratum granulosum*) слой "сглаженных" клеток, содержащих характерные цитоплазмические включения - кератогиалиновые гранулы; (2) шиповидный (*stratum spinosum*) слой, включающий несколько слоев клеток, лежащих над базальным слоем; (3) базальный (*stratum germinativum*) клеточный слой кератиноцитов, являющийся "ростковым" слоем эпидермиса.

Stratum granulosum состоит из 1-2 рядов клеток. Ширина межклеточных промежутков 20-30 нм. Ядра полиморфны, одни округлой или овальной формы, другие сильно вытянуты с очень неровными контурами ядерной мембраны. Иногда наблюдаются лишь остатки ядер. Отличительными особенностями слоя является наличие плотного аморфного материала, именуемого кератогиалиновым узлом, - субстанции, состоящей из отдельных микроскопических гранул, которая накапливается между волокнами, формируя большую плотную массу, окружающую волокна; и присутствие в цитоплазме особых структурных образований - кератиносом, имеющих округлую форму (от 15-23 до 50-60 нм) и окруженных однослойной мембраной.

Stratum spinosum состоит из шиповатых эпидермоцитов. Они окружены плазмолеммой с очень неровными контурами. Форма клетки по мере продвижения к поверхности становится более плоской, и в верхних слоях клетки представлены в виде субмикроскопических пластинчатых гранул, размер которых составляет от 100 до 300 нм. Характерной особенностью ядер шиповатых клеток является высокое содержание в них нейтральных липидов. Оболочки соседних клеток соединены с помощью многочисленных десмосом. Это особые структурные образования, специфичные для всех видов эпителия, представляют собой симметричные и строго параллельные участки уплотнения соседних плазмолемм (десмосомальные пластины) протяженностью 120-350 нм. Ядра шиповатых клеток, округлой

или слегка овальной формы, окружены ядерной мембраной с немногочисленными порами. Системе кератиновых волокон в околоядерном пространстве внутри цитоплазмы свойственно собираться в узлы. Узлы цитоплазматических волокон, называемые тонофибриллами, диаметром 7-10 нм формируют пучки различной протяженности толщиной 25-150 нм. Между тонофибриллами в пучке содержится аморфное вещество. Тонифибриллы пронизывают весь объем клетки и образуют ее внутренний каркас. Соседние клетки прочно связаны друг с другом в области десмосом, где прикрепляются пучки тонофибрилл, так что образуется как бы каркасная тонофибриллярная система клеток шиповатого слоя [1, 2].

Stratum germinativum состоит из базальных эпидермоцитов, располагающихся в один ряд. Базальные кератиноциты - это кубовидные или колоннообразные клетки эпителия, образующие базальную поверхность, соответствующую контурам базальной мембраны, опирающуюся, в свою очередь, на дермальную соединительную ткань.

Базальные клетки содержат множество промежуточных цитоплазмических волокон (7-8 нм) и органелл синтеза, таких как митохондрии, рибосомы и др. В функциональном отношении клетки базального слоя характеризуются двумя основными особенностями: в них активно протекают процессы синтеза белка, полисахаридов и липидов, и они содержат наибольшее количество ДНК и РНК-содержащих структур [3].

Эпидермис объединяет также субпопуляции мигрирующих древоподобных типов клеток: меланоцитов, являющихся производителями пигмента меланина; клеток Лангерганса, рассматриваемых как моноклетки, происходящие из костного мозга, и клеток Меркеля, рассматриваемых как производные кератиноцитов. Последние пространственно распределены реже, чем меланоциты или клетки Лангерганса, прикреплены десмосомами к базальным кератиноцитам и приближены к нервным окончаниям, находящимся под дермой [2]. Считается, что имеется тесная функциональная связь клеток Лангерганса с кератиноцитами в форме обратной зависимости между количеством этих клеток и скоростью пролиферации эпидермальных клеток.

Эпидермис человека постоянно находится в состоянии обновления: при делении базальных кератиноцитов некоторые дочерние клетки перемещаются наружу, а затем они отделяются, переходят в верхние слои и присоединяются к роговому слою. Известно, что нормальный человеческий эпидермис обновляется за период от 45 до 75 дней [3, 4].

Ведущим механизмом в сложном и многоэтапном процессе, направленном на формирование рогового слоя кожи, является образование кератина - основного белка эпидермиса. Клеточное деление в эпидермисе происходит главным образом в базальном слое. Из двух клеток, образовавшихся в результате деления, одна остается на месте, а другая как бы «выталкивается» в шиповидный слой, где превращается в кератиноцит.

При ороговении происходят последовательные изменения в клетках эпидермиса, ведущие к образованию кератина. Этот процесс начинается в базальном слое, продолжается в шиповидном и заканчивается в зернистом слое эпидермиса. Нормальная кератинизация заканчивается образованием рогового слоя.

Образование кератина является важным механизмом приспособления организма к изменяющимся условиям окружающей среды. Кератин характеризуется стойкостью по отношению к механическим, химическим и физическим воздействиям, он достаточно прочен и в тоже время эластичен. Благодаря этим свойствам кератина роговой слой успешно выполняет барьерную функцию. В состав кератина входят 18 аминокислот, основной является цистин [5], придающий кератину механическую твердость и сопротивление. Кератин подразделяется на мягкий (в роговом слое эпидермиса) и твердый (в волосах и ногтях).

Меланин образуется в меланоцитах, которые содержат большое число структурных органелл - меланосом, наполненных пигментом. Меланоциты содержат фермент тирозиназу, который активно участвует в процессе образования меланина. Когда гранулы созревают и наполняются пигментом, они теряют тирозиназную активность и выходят из клетки, после чего внедряются в базальные клетки, в которых накапливается меланин. На меланогенез оказывают влияние гормоны коры надпочечников, щитовидной и половых желез, при изменении уровня и соотношения которых в организме могут наблюдаться нарушения пигментации кожи и волос.

Дермо-эпидермальное соединение (ламина)

Зона перехода между дермой и эпидермисом представляет собой базальную мембрану толщиной 40-50 нм, непосредственно отделяющую эпидермис от дермы и имеющую неровные контуры, строго повторяющие рельеф плазмолеммы базальных клеток. Структурно базальная мембрана содержит два слоя: прозрачную пластину, лежащую на плотной тонкой пластине. Важные молекулярные компоненты базальной мембраны - коллаген IV типа (ламинин). Прочность соединения макромолекул между дермой и эпидермисом повышается за счет контуров увеличенной проекции базальных поверхностей отдельных базальных кератиноцитов, формирующихся на нижележащих дермальных структурах. Это субклеточное увеличение в областях соединения повторяет контуры, поддерживаемые эпидермальными складками на поверхности дермы.

Дерма

Дерма занимает основной объем кожи. Она отделена от эпидермиса базальной мембраной и без резких границ переходит в подкожную жировую

вую клетчатку. В состав плотной соединительной ткани дермы входят коллагеновые и эластиновые волокна, основное аморфное вещество, минеральные вещества, вода (до 70%). Соединительная ткань содержит широко разветвленную сосудистую систему, нервную сеть и секреторные железы.

Дерма произвольно делится на две анатомические области, папиллярную (*stratum papillare*) и ретикулярную (*stratum reticulare*). Более тонкая из них, папиллярная дерма является наружной частью дермальной соединительной ткани, которая формируется под эпидермисом. Папиллярная дерма содержит свободно распределенные эластиновые и коллагеновые волокна размером 0,3-3 мкм в диаметре, а также лимфатические сплетения и кровеносные сосуды.

Ретикулярная дерма представляет собой относительно бедную клеточными элементами и сосудами плотную соединительную ткань, в которой находятся эластиновые волокна и коллагеновые узлы (диаметром 10-40 мкм), а также небольшое количество межволоконного геля.

Опорно-структурными белками дермы являются коллаген, эластин и ретикулин. Коллаген является главным структурным элементом соединительной ткани и составляет основную ее массу. Для него характерны специфический аминокислотный состав и уникальное пространственное расположение полипептидных цепей. В отличие от других белков в коллагене в большом количестве содержатся аминокислоты - глицин, пролин, оксипролин, лизин, оксилизин, в виде следов - тирозин и метионин, полностью отсутствуют цистеин и триптофан.

Коллаген имеет волокнистую структуру, он состоит из отдельных волокон, которые в свою очередь состоят из микроволокон. Молекула коллагена состоит из трех полипептидных цепей, образующих структуру тройной спирали. Длина молекулы коллагена составляет 280 нм, диаметр 1,4-1,5 нм.

В молекуле коллагена можно выделить две области: кристаллическую (упорядоченную) и аморфную (неупорядоченную). Первая состоит в основном из остатков нейтральных, а вторая из остатков полярных аминокислот. Молекулы коллагена различных тканей отличаются тем, что построены из α -цепей разных видов. Их сочетание определяет тип коллагена. Самым распространенным является тип I коллагена. Кости и сосуды содержат преимущественно тип I коллагена, кожа человека содержит до 80-90% типа I и 10-15% типа III коллагена.

С нарушениями процесса метаболизма коллагена связывают старение кожи. С возрастом увеличивается число межмолекулярных связей белка. Избыточное содержание метаболически инертного коллагенового белка приводит к нарушению его обмена в тканях кожи и приводит к ее старению [6]. Основная функция коллагена связана с формированием и

поддержанием специальной структуры органов и тканей в процессе их роста и развития.

Коллаген, который составляет приблизительно 77% сухого веса кожи, определяет предел прочности дермальной ткани на разрыв. Эластичность соединительной ткани определяют эластиновые волокна, находящиеся между пучками коллагена. Эластиновые волокна включают микроволокна и аморфный эластин. Коллагеновые волокна в дерме составляют пучки, окруженные аморфным веществом. Коллагеновый каркас дермы можно представить как переплетенные нити или узлы, расположенные в плоскости, параллельной поверхности кожи. Если смотреть с поверхности кожи, то коллагеновые волокна ретикулярной дермы обнаруживают ячеистую сеть с очень растянутыми ромбовидными ячейками. Ячеистая сеть коллагеновых волокон показывает предпочтительное направление растяжимости, и когда на кожу оказывается воздействие круглым инструментом, таким как острие, ячейка волокон перемещается до тех пор, пока волокна не становятся параллельны направлению наименьшего растяжения. Дальнейшее проникновение острия приводит к повреждению волокон и оставляет впадину эллиптической формы. Упругие волокна - материал с двумя компонентами, состоящий из трубчатых микроволокон, в диаметре составляющих 10-12 нм, вставленных в аморфную матрицу, эластина. Отсутствуют анатомические связи между большим количеством свободно распределенных эластических волокон и коллагеновых узлов. Размер коллагеновых узлов и соответствующих упругих волокон максимален по всей толщине ретикулярной дермы.

Основное вещество дермальной ткани представляет собой аморфную субстанцию, пропитанную тканевой жидкостью, которая состоит из различных, преимущественно кислых мукополисахаридов, находящихся в соединении с белками. В дерме аморфное вещество существует как вязко-эластичная смесь.

Кровеносная сосудистая система

Основная масса крови в дерме располагается в поверхностном (*plexus superficialis*) и глубоком (*plexus profundus*) сосудистых сплетениях [1, 2].

Кровоснабжение кожи осуществляется собственно кожными и мышечно-кожными артериями. Выделяют три группы питающих артерий: а) кожные ветви артерий, идущих в межмышечных фасциальных перегородках; б) мышечно-кожные артерии; в) надкостнично-кожные артерии.

Число и размер кожных артерий зависят от региональных особенностей. На лице, например, они более многочисленны и среднего размера, тогда как на руках и ногах - мельче и длиннее.

Артерии, питающие кожу, образуют широкопетлистую сеть под гиподермой. Из этой сети в кожу поднимаются более мелкие ветви, которые на нижней границе дермы делятся и анастомозируют друг с другом, образуя вторую глубокую (субдермальную) артериальную сеть, параллельную первой. Здесь берут начало артерии, питающие волосяные фолликулы и клубочки потовых желез. Из субдермальной артериальной сети в собственно кожу поднимаются микроскопически малые артерии, которые делятся, образуя длинные артериолы диаметром около 50 мкм, анастомозирующие друг с другом. Под эпидермисом из них образуются артериоларные аркады.

На границе с сосочковым слоем располагается поверхностная артериальная, точнее артериоларная сеть, характеризующаяся наличием узких петель или ячеек. От этой сети отходят терминальные артериолы, идущие к кожным сосочкам. Каждая терминальная артериола питает группу сосочков, образуя сосочковые капилляры. Плотность папиллярных капилляров в коже соответствует плотности сосочков и в разных областях тела различна, меняясь в пределах 16—65 капилляров на 1 мм² кожи. Из сосочков кровь оттекает в венулы, образующие мелкопетлистую поверхностную венулярную сеть сразу, под сосочками, элементы которой можно наблюдать при биомикроскопии кожи. Несколько глубже супкапиллярной артериоларной сети выделяется вторая субпапиллярная венулярная сеть, параллельная первой. В сетчатом слое кожи располагается третья венозная сеть, а в гиподерме лежит крупноячеистая и наиболее емкая глубокая венозная сеть, в которой осуществляется теплообмен. Это венозное сплетение расположено параллельно лежащему над ним субдермальному артериальному сплетению, с которым оно соединяется множеством артериовенозных анастомозов. Рассмотренные артериальные и венозные сети представлены в схематическом виде на рис. 5.

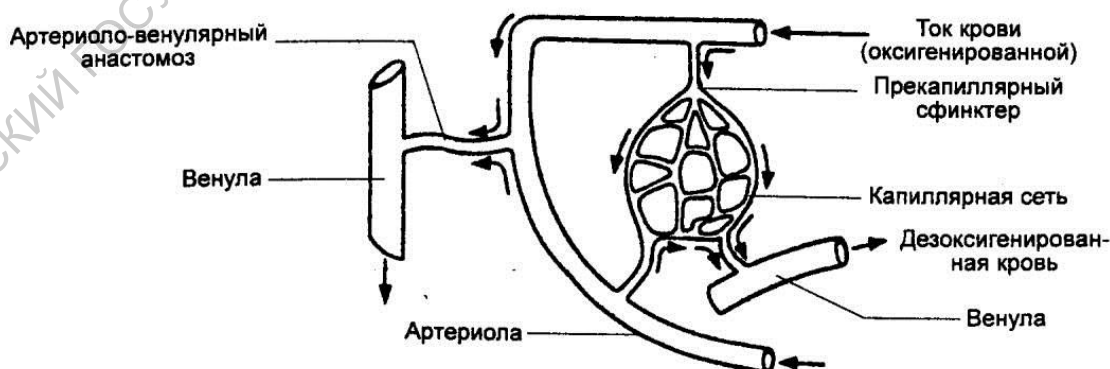


Рис. 5. Схема строения микрогемодинамической единицы кожи

В общем, сосудистое русло кожи достаточно четко делится на две системы: первая - система сосудов, обеспечивающих питание кожи, вторая - глубокие, преимущественно подкожные, артериальные и более крупные венозные сплетения, выполняющие функцию теплообменников крови с внешней средой.

Теплообменная сеть имеет крупноячеистый рисунок; она богата артериовенозными анастомозами и бедна капиллярами. Такая конструкция обеспечивает достаточно эффективный теплообмен и в то же время исключает возможность нецелесообразного здесь интенсивного обмена веществ между кровью и тканью.

Внутрикожное сосудистое русло почти целиком состоит из кровеносных сосудов микроскопического размера. Исходным строительным блоком всякой микрогемодициркуляторной сети служит микрогемодициркуляторная единица (см. рис. 5). Она включает: а) мельчайший артериальный кровеносный сосуд, способный реагировать на факторы как местной, так и центральной регуляции; б) сосуды-обменники (капилляры); в) мельчайшие венозные сосуды, собирающие кровь из соответствующих сосудов-обменников [7]. Микрогемодициркуляторная единица рассматривается как элементарный источник тканевого питания, вокруг которого формируется «органно-тканевый функциональный элемент» [7]. Микрогемодициркуляторные единицы являются фундаментальной, но не единственной структурной единицей сосудистого русла. Из объединения этих структур образуются системы (именуемые иногда модулями) 1-го, 2-го и т. д. порядков. Сам факт существования микроочаговой и мозаичной сосудистой патологии кожи является своеобразным доказательством дискретной формы организации микрогемодициркуляторного русла.

В практической работе исследователи в последние годы довольно часто используют упрощенную классификацию элементов микроциркуляторного русла, которая основана на определении порядка ветвления артериального и венозного русла, при этом артериолы диаметром около 100 мкм и соответствующие им вены, имеющие более крупные размеры (200-250 мкм), считаются ветвями 1-го порядка. До капиллярного русла эти артериолы обычно делятся 2—3 раза, в результате чего образуются ветви 2-го и т. д. порядка, которым соответствуют однопорядковые вены.

Как уже отмечалось, характерной особенностью внутрикожного сосудистого русла является высокая степень анастомозирования между однотипными и разнотипными сосудами. Вследствие этого образуются разные по длине пути циркуляции крови, в том числе и укороченные, по которым кровь из артериального русла быстро переходит в венозное. Эти укороченные пути циркуляции не имеют узаконенного названия и чаще всего именуется функциональными артериовенозными шунтами. В роли таких шунтов чаще всего выступают короткие капиллярные веточки, не

имеющие собственной мышечной или миоидной оболочки, активно изменяющей просвет сосуда.

Помимо таких функциональных шунтов, в некоторых областях тела кожа содержит многочисленные специализированные образования, связывающие артериальные и венозные сосуды и имеющие в своей стенке мышечные или миоидные элементы. Эти образования являются собственно артериовенозными анастомозами простого или сложного типа. К последним относятся так называемые гломусные анастомозы, особенностью которых является наличие вокруг шунтового канала обширного скопления эпителиоидных клеток, рассматриваемых как трансформированные гладкомышечные [7]. Мышечные артериовенозные анастомозы более характерны для подкожных, а функциональные шунты - для внутрикожных сосудистых сетей.

Многие патологические процессы в коже сопровождаются не только изменением числа обменных сосудов, но и их формы и взаимоположения. При этом опять же нередко создаются условия для внесосудистого шунтирования, снижающего эффективность микрогемодикуляции и без того сниженной патологическим процессом. Изучение этого малоисследованного феномена имеет особое значение именно для дерматологии, так как конструктивные особенности микрогемодикуляторного русла в коже благоприятствуют его возникновению, т. е. являются своеобразным фактором риска.

Биохимический состав кожи

В коже содержатся все виды органических и неорганических веществ, встречающихся в организме: белки, липиды, углеводы, аминокислоты, пигменты, нуклеиновые кислоты, витамины, вода, макро- и микроэлементы [1, 8]. Значение каждого из этих веществ определяется его специфическими свойствами и локализацией в определенных структурах кожи и сводится либо к энергетическому обеспечению процессов, либо к участию в образовании продуктов, несущих специфическую функцию.

Аминокислоты, из которых синтезируются белки, разделяются на алифатические, ароматические и гетероциклические. Алифатической кислотой является цистин, который характеризуется тем, что образует прочные связи. Ароматические аминокислоты - фенилаланин и тирозин - помимо участия в синтезе белка являются предшественниками меланина, катехоламинов, мелатонина и тироксина. Аминокислоты пролин и оксипролин - важные компоненты коллагена. Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), представляющие собой высокополимерные соединения, представлены в коже как в дерме, так и в эпидермисе, но в последнем их значительно больше, особенно в базальном и шиповидном слоях. Количество ДНК связано с процессом роста и пролиферации клеток эпидермиса.

Разнообразие составляющих кожу биохимических компонентов, неоднородно пространственно распределенных внутри различных слоев кожи, определяет особенности взаимодействия света с биотканью, в результате чего формируются ее спектры отражения и флуоресценции.

Формирование спектра отражения кожи

С оптической точки зрения кожа представляет собой поглощающую среду с ярко выраженными рассеивающими свойствами. Взаимодействие света с такой средой носит сложный характер, который начинает проявляться уже при прохождении светом границы раздела кожа-воздух.

Граница раздела воздух-кожа не является гладкой. Она представляет собой плотный слой кератиноцитов, на котором располагаются фрагменты эпидермиса, находящиеся в стадии десквамации [9-11]. Из-за разных показателей преломления воздуха и кожи (средний показатель преломления кожной ткани $n \approx 1,5$) падающее излучение частично отражается (френелевское отражение, составляющее величину порядка 5%), при этом из-за микроскопической неоднородности границы раздела кожа-воздух отраженный свет становится диффузным. Значительная часть пучка света (~95%) входит в кожу, где свет частично поглощается и рассеивается.

Поглощение света является одной из характеристик эффективности взаимодействия света с кожей [1, 9, 13]. Энергия поглощенного света переходит в тепло, тратится на протекание фотохимических реакций и т.д.

Спектры поглощения любой биологической ткани, в том числе и кожи, определяются наличием у практически всех биологически важных молекул сопряженных двойных связей (хромофорных групп) [12]. Абсолютные значения коэффициентов поглощения для типичных биотканей лежат в пределах 10^{-2} - 10^4 см⁻¹ [9, 13].

На рисунке 6 приведены спектральные диапазоны поглощения основных хромофоров кожи.

В эпидермисе роль хромофоров в коротковолновой части ультрафиолетового диапазона спектра (200-300 нм) выполняют различные фрагменты входящих в состав белков аминокислот (рис. 7). В этой же спектральной области поглощают основания нуклеиновых кислот (их хромофоры - ароматические и гетероциклические кольца азотистых оснований) (рис. 8). Чрезвычайно высокая оптическая плотность урुकаниновой кислоты вблизи $\lambda_a = 280$ нм также дает вклад в поглощение кожи в этой области спектра [10].

В спектрах поглощения окисленных форм флавиновых соединений наблюдаются три полосы с максимумами при 260, 375 и 450 нм (рис. 9). В спектрах восстановленных форм отсутствует максимум при 450 нм. При связывании флавина с белком максимумы сдвигаются в сторону больших длин волн и появляется новое «плечо» при 480-490 нм [14].

Помимо флавиновых соединений доминирующим хромофором эпидермиса, определяющим его поглощающие свойства в ближней УФ и видимой областях спектра является пигмент меланин [15- 19].

Эпидермальный меланин является уникальным и чрезвычайно активно изучаемым пигментом. Прежде всего, спектры поглощения меланина, образованного в результате облучения кожи светом УФА и УФВ диапазонов, отличаются друг от друга: в первом случае обнаруживается уменьшение поглощения в диапазоне ниже 400 нм в отличие от второго, когда поглощение с уменьшением длины волны монотонно возрастает [19]. Более того, облучение кожи человека светом видимого диапазона приводит к образованию пигмента, отличного от приведенных выше случаев.

На рисунке 10 приведены спектры поглощения найденных в естественных условиях двух форм меланина: эумеланина (нерастворимый пигмент темно коричневого цвета, содержащийся в волосах человека, сетчатке глаза) и феомеланин (растворимый желто-красно-коричневый пигмент, содержащийся в волосах человека, оперении птиц).

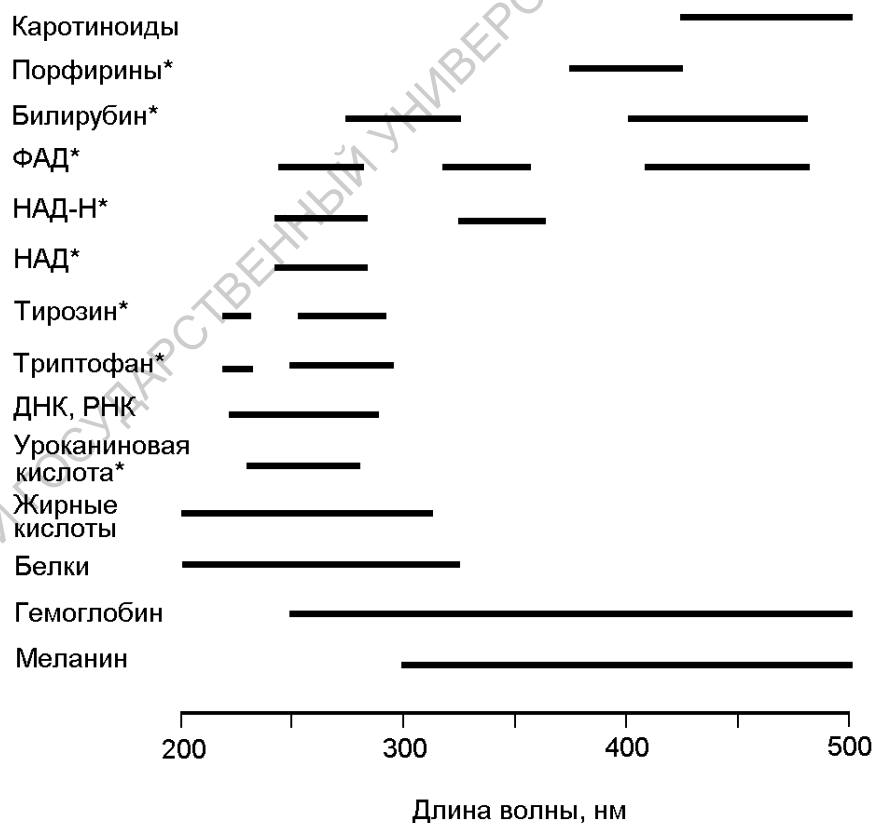


Рис. 6. Спектральные диапазоны поглощения основных хромофоров кожи. Для хромофоров, помеченных (*), области определены на уровне полуширины

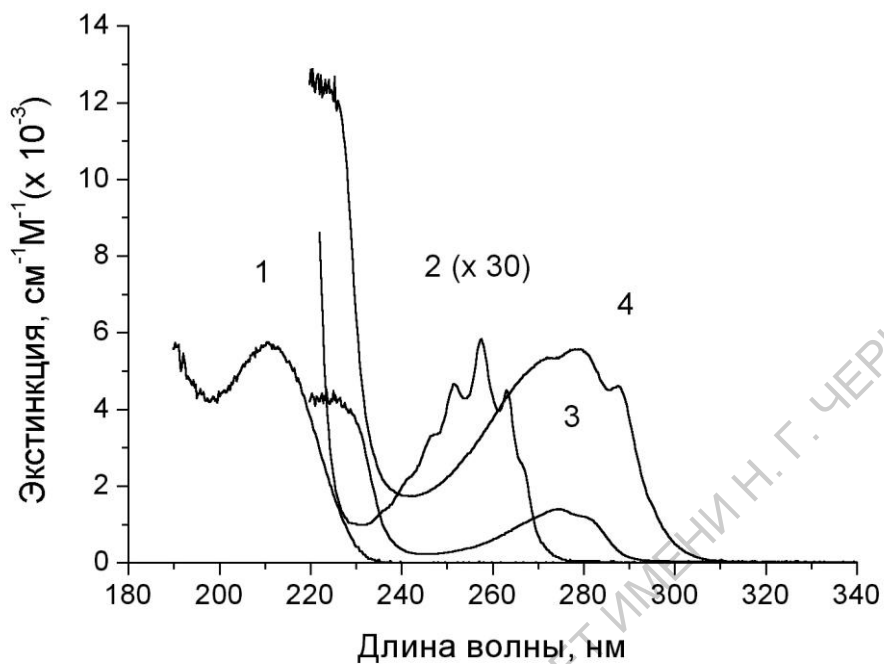


Рис. 7. Спектры поглощения ароматических аминокислот:
1 - гистидин, 2 – фенилаланин, 3 – тирозин, 4 – триптофан [20]

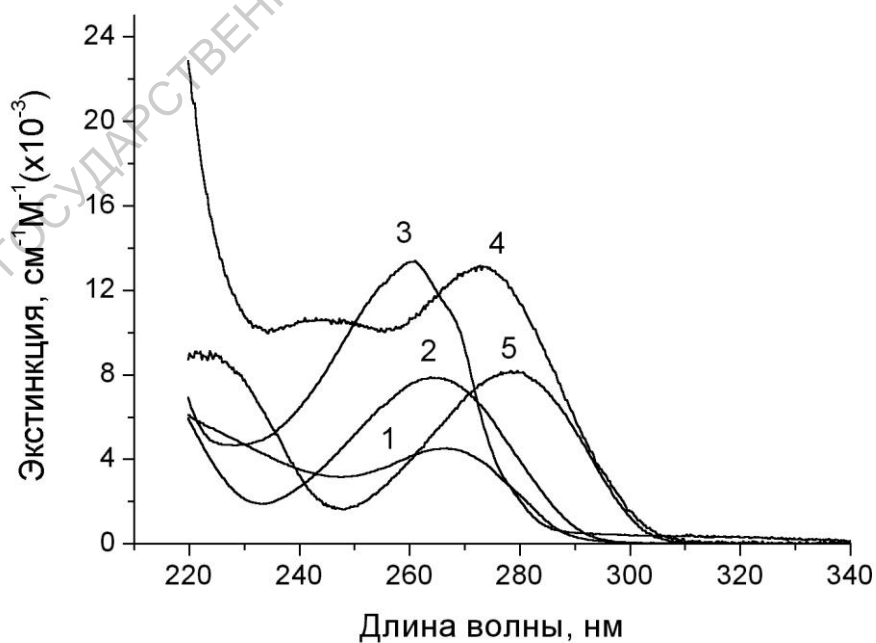


Рис. 8. Спектры поглощения оснований нуклеотидов:
1 – цитозин, 2 – тимин, 3 – аденин, 4 – гуанин, 5 – урасил [20]

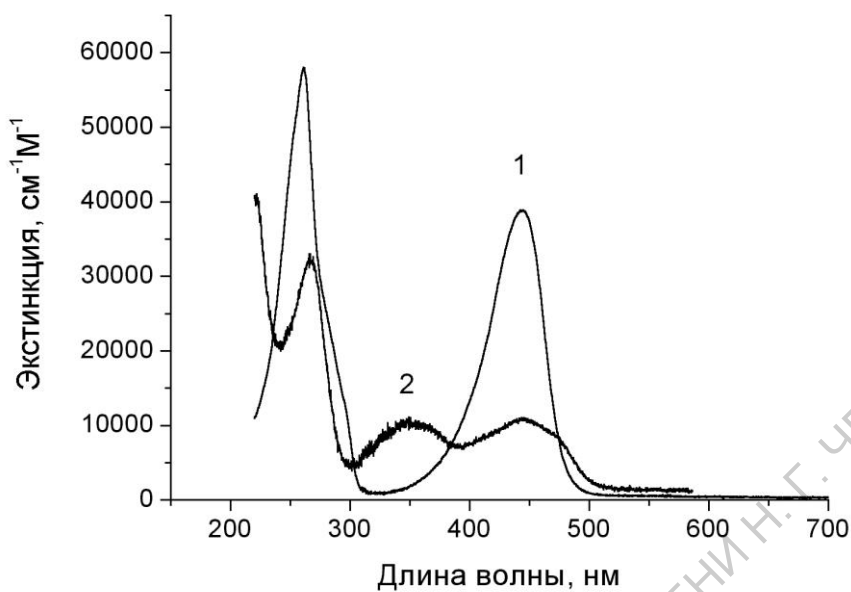


Рис. 9. Спектры поглощения флавиновых соединений:
1 – профлавин, 2 - рибофлавин [20]

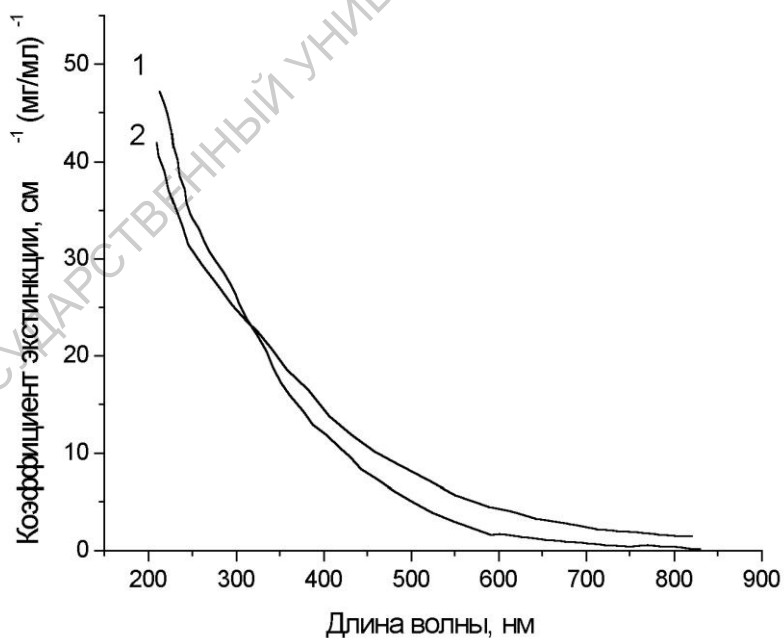


Рис. 10. Спектры поглощения эумеланина (1) и
феомеланина (2) [20]

Для меланина, обнаруженного в коже, характерен спектр поглощения, приведенный на рис. 11, полученный в виде разности оптической

плотности пигментированной и беспигментной (*vitiligo*) кожи. Спектр меланина, содержащегося в коже, характеризуется практически линейной зависимостью поглощения в области длин волн свыше 600 нм, увеличением поглощения в области коротких длин волн с максимумом около 335 нм и резким спадом в области более коротких длин волн.

Помимо меланина в поглощение эпидермиса в УФ спектральной области вносят структурный белок α -кератин и разные формы кофермента НАД (рис. 12).

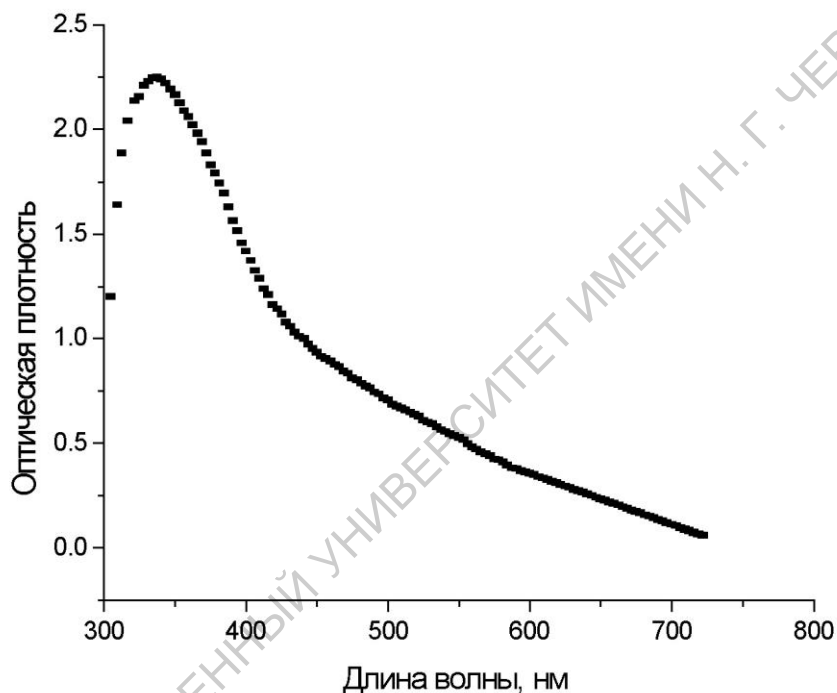


Рис. 11. Спектр поглощения эпидермального меланина.
Тип кожи – IV [19]

Основными компонентами дермы, определяющими ее поглощение в ближней УФ и видимой областях спектра, являются хромофоры дермальной крови (оксигемоглобин, деоксигемоглобин, билирубин) и подкожной основы - каротеноиды и порфирины.

Оксигенированная и деоксигенированная формы гемоглобина поглощают свет специфически (рис. 13). Оксигемоглобин наиболее сильно поглощает в области 405 нм (полоса Соре), с увеличением длины волны его поглощение уменьшается, при этом на длинах волн 535 и 575 нм имеется характерные максимумы поглощения. Деоксигемоглобин наиболее сильно поглощает в области 430 нм и менее сильно вблизи 550 нм. Поглощение обеих форм гемоглобина в области свыше 620 нм мало [10, 15, 21].

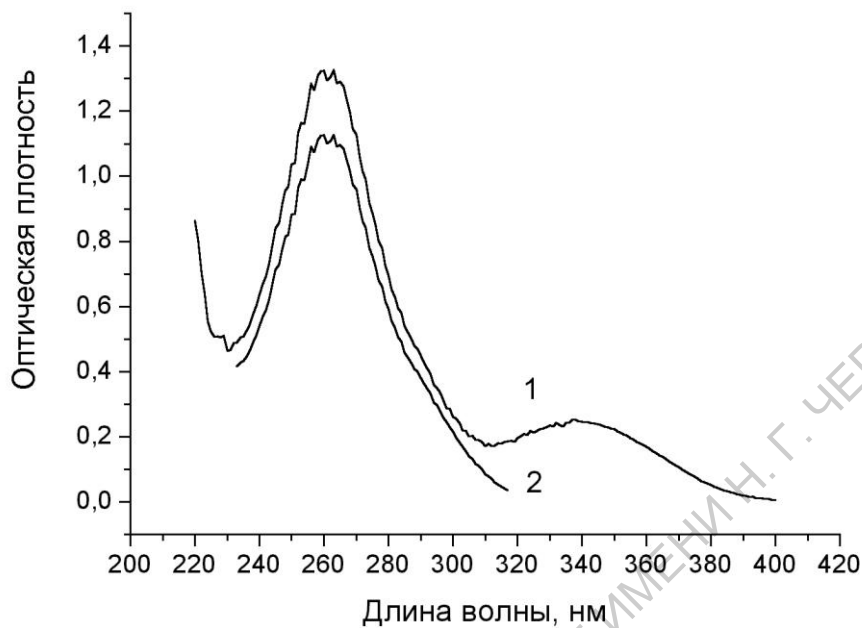


Рис. 12. Спектральная зависимость поглощения НАД-Н (1) и НАД (2) [22]

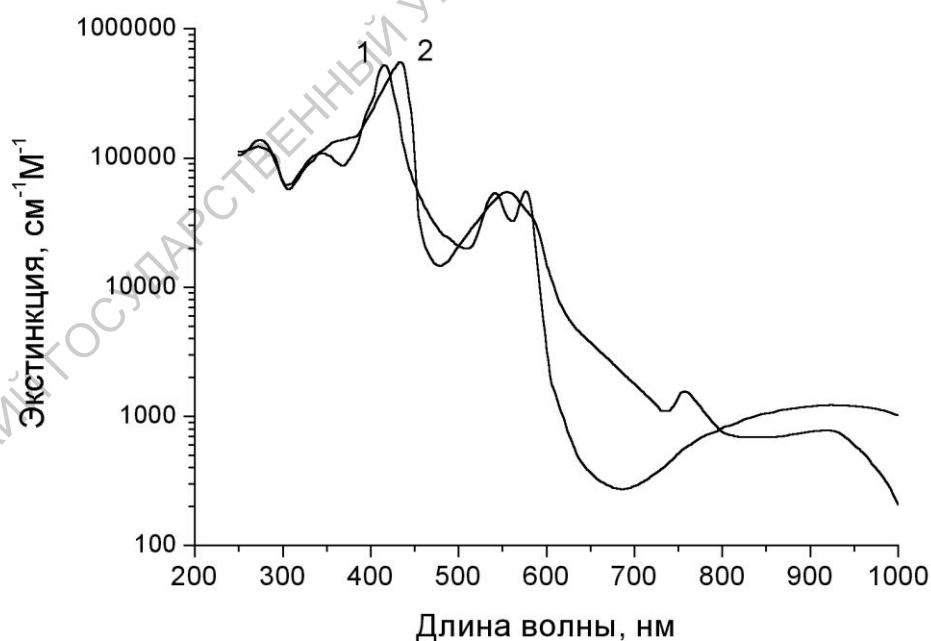


Рис. 13. Спектральная зависимость молярного коэффициента поглощения гемоглобина: 1 – оксигенированная форма, 2 – деоксигенированная форма [20]

Для билирубина характерны две достаточно широкие полосы поглощения: одна – в видимой области спектра с максимумом в диапазоне

450-460 нм, другая, менее выраженная, – в УФ диапазоне с максимумом около 330 нм (рис. 14).

Для порфиринов характерно наличие четырех полос поглощения в видимой области спектра и более интенсивной полосы Soret с максимумом около 400 нм [14, 22]. На рисунке 15 приведен спектр поглощения протопорфирина IX.

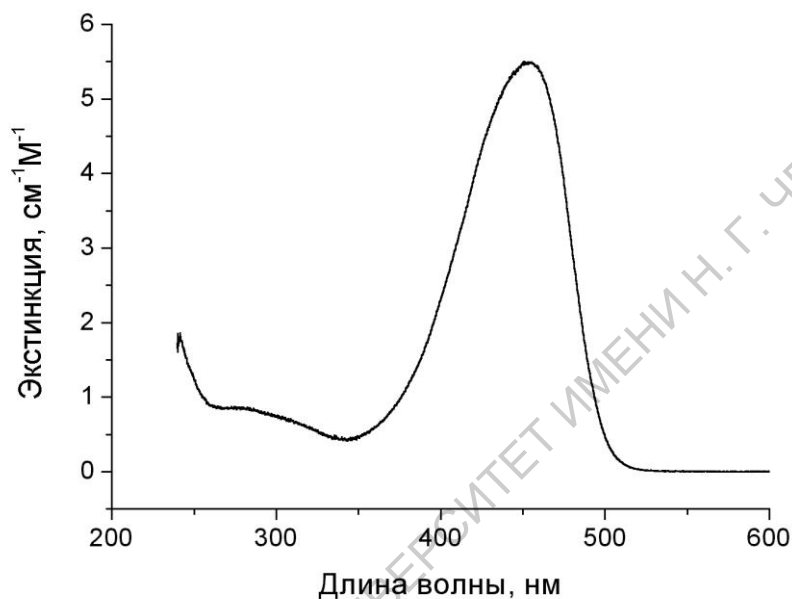


Рис. 14. Спектр поглощения билирубина [20]

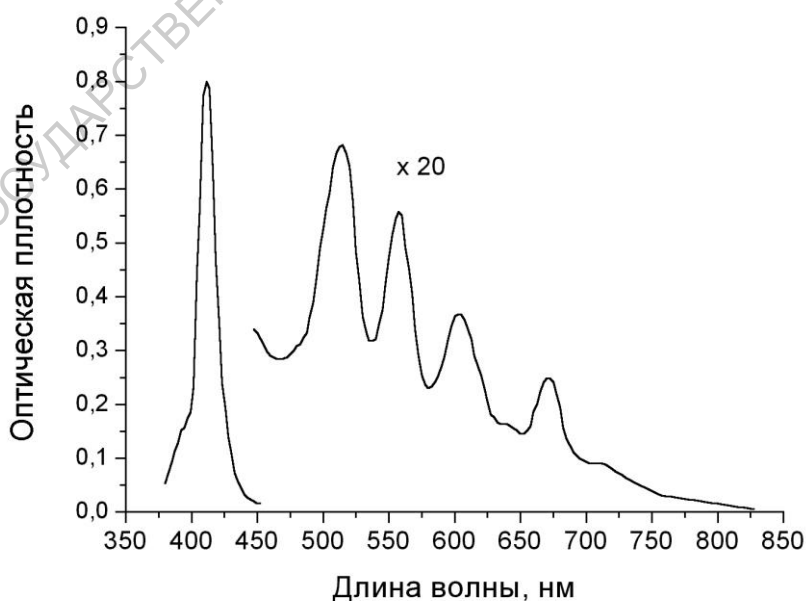


Рис. 15. Спектр поглощения протопорфирина IX [22, 23]

Помимо перечисленных выше хромофоров в ближней УФ и видимой областях спектра хромофорами кожи являются витамины, флавины, флавиновые ферменты, фикобилины, фитохромы и др., а также эластиновые и коллагеновые волокна [12, 24].

В ИК области спектра спектр поглощения кожи во многом определяется спектром поглощения воды (рис. 16) [9, 25].

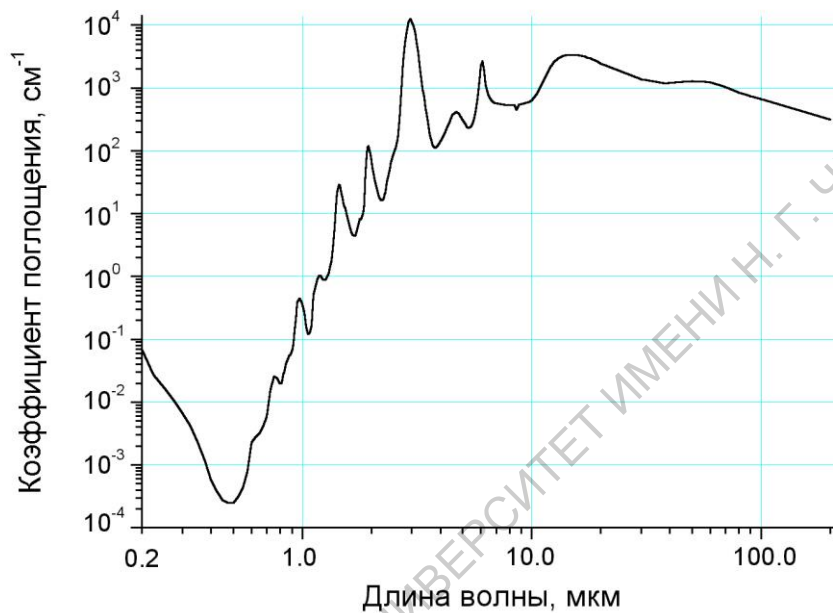


Рис. 16. Спектр поглощения воды [20]

Помимо поглощения кожная ткань характеризуется значительным светорассеянием. Причиной рассеяния является неоднородность показателя преломления в объеме биоткани, отражающая ее физическую неоднородность, при этом характер рассеяния зависит от соотношения длины волны рассеиваемого излучения и размера рассеивающих частиц [9-11, 25-27]. В кожной ткани есть рассеиватели, размеры которых меньше длины волны света, порядка длины волны, и рассеиватели, размеры которых значительно превышают длину волны света. В результате в коже имеют место различные виды рассеяния: от релеевского рассеяния до рассеяния Ми.

Однако содержащиеся в эпидермисе (кератогиалиновые гранулы) и дерме (коллагеновые волокна) структуры, размеры которых значительно превышают длину волны, определяют преимущественное рассеяние вперед [10, 15]. В результате, рассеяние света в эпидермисе является менее важным по сравнению с дермальным рассеянием в определении глубины проникновения оптического излучения в кожу. Более того, дермальная соединительная ткань практически полностью рассеивает оптическое излучение

УФ и видимого спектрального диапазона, определяет диффузное распределение света внутри кожи и формирует обратно рассеянное излучение.

Несмотря на то, что рассеяние в УФ диапазоне превалирует над рассеянием в видимом диапазоне, сильное эпидермальное поглощение является более важным фактором уменьшения обратно рассеянного излучения и, соответственно, формирования спектра отражения кожи [10, 15].

Таким образом, поглощение и рассеяние света в коже определяет количество выходящего из нее обратно рассеянного излучения, которое определяет величину измеряемого параметра – диффузного коэффициента отражения R_d .

Два фактора определяют величину и спектральный состав R_d .

Различный вклад разных слоев кожи в поглощение и рассеяние света является внутренне присущим коже фактором формирования спектра отражения кожи. Так как пигментированный (главным образом, меланином) эпидермис, бескровеная дермальная ткань и дермальные кровеносные сосуды являются основными компонентами кожи, определяющими ее поглощающие и рассеивающие свойства, то величина R_d зависит от глубины проникновения оптического излучения в кожу.

В ультрафиолетовой области спектра (< 300 нм) коэффициент отражения невелик, так как сильное поглощение эпидермальных хромофоров (меланина, липидов, белков и уроганиновой кислотой, см. рис. 6) значительно уменьшает величину обратно рассеянного излучения, и практически совпадает с френелевским отражением. Излучение неглубоко проникает в биоткань, всего на один или несколько клеточных слоев, и на спектр отражения мало влияют хромофоры эпидермиса.

В области длин волн 300 - 400 нм полный коэффициент отражения кожи превышает Френелевский, что свидетельствует о возрастании роли обратного рассеяния при отражении. Глубина проникновения составляет уже величину до сотен микрометров, поэтому на характер спектра отражения также влияют как хромофоры эпидермиса, так и хромофоры дермы, поглощающие в данном спектральном диапазоне.

В коротковолновой части видимой области спектра глубина проникновения света в кожу увеличивается до 0.5 - 2.5 мм [9, 13]. В этом случае существенную роль в формировании обратно рассеянного излучения играют как поглощение, так и рассеяние. Свет по мере распространения в коже испытывает многократное рассеяние, при этом возрастает доля обратно рассеянного излучения. Коэффициент отражения в этой области составляет величину 15-40%, а спектр отражения имеет резко выраженный минимум в области длин волн 405-430 нм, обусловленный дермальной кровью.

В области длин волн 600 - 1500 нм поглощение уменьшается, рассеяние превалирует над поглощением, поэтому глубина проникновения света увеличивается до 8 - 10 мм [9, 13]. Свет внутри ткани имеет характер

полностью диффузно рассеянного, при этом увеличивается доля обратно рассеянного излучения и значение R_d достигает 35-70%. Коэффициент отражения растет с увеличением длины волны, обнаруживая характерные провалы в области поглощения гемоглобина (535-575 нм). Могут проявиться дополнительные слабые минимумы в спектре отражения, обусловленные поглощением каротина (480 нм) и билирубина (460 нм).

В ближней инфракрасной коэффициент отражения кожи растет вплоть до диапазона 800 —900 нм, а затем уменьшается из-за поглощения воды [9, 13].

Таким образом, вклад различных слоев кожи в процессы поглощения и рассеяния света различен. Слой эпидермиса диффузно рассеивает падающее излучение, давая вклад в коэффициент отражения кожи в видимой области спектра. Излучение, прошедшее эпидермальный слой, сильно поглощается содержащимся в нем меланином практически во всем видимом спектральном диапазоне, причем поглощение света в сине-зеленой области спектра сильнее. Свет, прошедший через слой дермы, пронизанной кровеносными сосудами, частично поглощается гемоглобином. Наконец, не поглощенная часть излучения диффузно отражается от слоя кожи, содержащего коллагеновые волокна и прежде чем выйти наружу проходит еще раз через слои дермы и эпидермиса, содержащие гемоглобин и меланин. Доминирующую роль в формировании спектра отражения кожи в видимой области играет коллаген дермы. Волокна соединительной ткани практически полностью диффузно отражают дошедший до дермы свет. Специфические полосы поглощения гемоглобина (405-430 нм, 535-575 нм) определяют локальные минимумы коэффициента отражения кожи в данных спектральных областях.

Типичный спектр диффузного отражения кожи человека приведен на рис. 17.

Вторым фактором, влияющим на величину коэффициента отражения кожи и его спектральные особенности, являются условия экспериментального измерения R_d .

In vivo наиболее точные спектральные измерения коэффициента отражения кожи возможны при использовании техники интегрирующей сферы. Однако размер и локализация многих дермальных патологий ограничивает ее применение. Обычно в *in vivo* измерениях отражения кожи используют волоконно-оптический датчик, реализуя две схемы измерения.

Одна схема измерений использует Y-образный волоконно-оптический световод, имеющий два отвода. Один состоит из световода достаточно большого диаметра (порядка 400 мкм), который располагается в центре датчика и служит для подвода излучения к поверхности кожи. Другой содержит несколько световодов, расположенных вокруг центрального световода и служащих для сбора обратно рассеянного кожей излучения

[28]. Такой датчик, являющийся аналогом интегрирующей сферы, позволяет собирать рассеянное кожей излучение с разных слоев кожи и количественно оценивать коэффициент отражения в широком спектральном интервале.

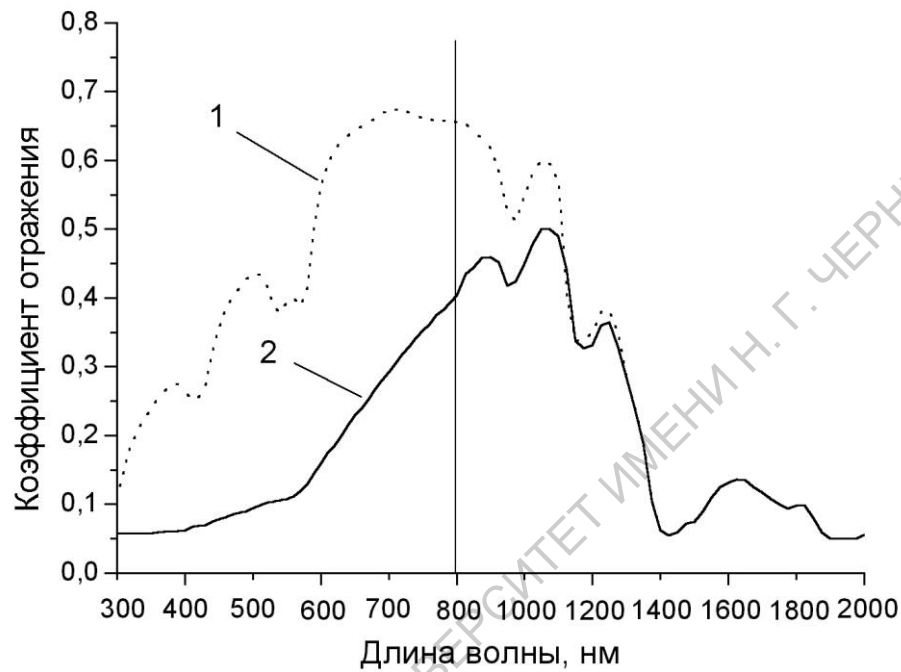


Рис. 17. Спектр диффузного отражения кожи:
1 – тип кожи III, 2 – тип кожи VI [10]

Однако результаты измерений зависят от геометрии оптического датчика, при этом необходимо принять во внимание некоторые аспекты: (1) Точность измерений обратного рассеянного излучения требует, чтобы конструкция датчика позволяла собирать отраженное кожей излучение под разными углами; (2) Торец подводящего световода должен быть расположен так относительно других световодов и поверхности кожи, чтобы площадь поверхности, с которой собирается отраженное излучение, была больше площади облучаемой поверхности. Последний аспект должен особенно быть принят во внимание при измерениях коэффициента отражения кожи в красной и ближней ИК областях спектра, где сильное рассеяние и малое поглощение кожи приводит к увеличению площади поверхности кожи, с которой выходит обратно рассеянное излучение.

Другая схема реализует технику пространственно разрешенного коэффициента отражения, когда источник и приемник разнесены на расстояние r_{sd} [29]. В этом методе величина измеряемого коэффициента отражения определяется глубиной прохождения света в коже. Эта глубина определяется функцией распределения оптических путей света от источника к

приемнику и зависит от расстояния r_{sd} . В результате вид спектра отражения также зависит от расстояния r_{sd} [13].

Формирование спектра флуоресценции кожи

Феномен собственной (авто) флуоресценции (АФ) кожи известен еще с начала XX века. Кожа человека содержит большое число разнообразных природных флуорофоров [12, 24, 22, 30], которые имеют различные спектральные области поглощения и флуоресценции, различные квантовые выходы флуоресценции, различные времена затухания флуоресценции, различные пространственные распределения по толщине кожной ткани. Некоторые флуорофоры имеют близкие или перекрывающиеся области поглощения и флуоресценции, в результате чего выходящее из кожи излучение флуоресценции имеет сложный спектральный состав. Более того, в коже содержатся также нефлуоресцирующие хромофоры, такие как гемоглобин, поглощение которыми выходящего из кожи излучения проявляется в возникновении в спектре флуоресценции специфических провалов и пиков.

Поэтому анализ содержания в коже тех или иных флуорофоров по спектрам АФ кожи достаточно сложен. С другой стороны, именно пространственная неоднородность распределения флуорофоров и хромофоров, определяющих спектр выходящего из кожи излучения, дает возможность говорить о *in vivo* флуоресцентной спектроскопии кожи как перспективном диагностическом методе исследования состояния кожи.

По мере увеличения длины волны возбуждающего света в формирование спектра флуоресценции вовлекаются новые флуорофоры, располагаемые в более глубоких слоях кожи.

Наиболее наглядно зависимость интенсивности АФ кожи от длины волны возбуждения и эмиссии можно представить в трехмерном пространстве (рис. 18). Даже беглый взгляд на приведенные спектры позволяет сделать как минимум два предварительных заключения: кожа человека обладает достаточно характерной картиной АФ и АФ кожи имеет значительные индивидуальные вариации.

Эпюры сечений пространственного распределения *in vivo* измеренной АФ кожи на плоскости параметров, в качестве которых выступают длины волн возбуждения и флуоресценции (плоскости параметров λ_{EX} , λ_{EM}), приведены на рис. 19. Совокупность таких эпюр носит название ЕЕМ матрицы (excitation-emission matrix). Одна из целей флуоресцентной спектроскопии является получение информации о наиболее подходящем диапазоне длин волн, в котором наиболее отчетливо проявляются спектральные различия между нормальной биологической тканью и тканью с патологией, и идентификация хромофоров, ответственных за такие различия.

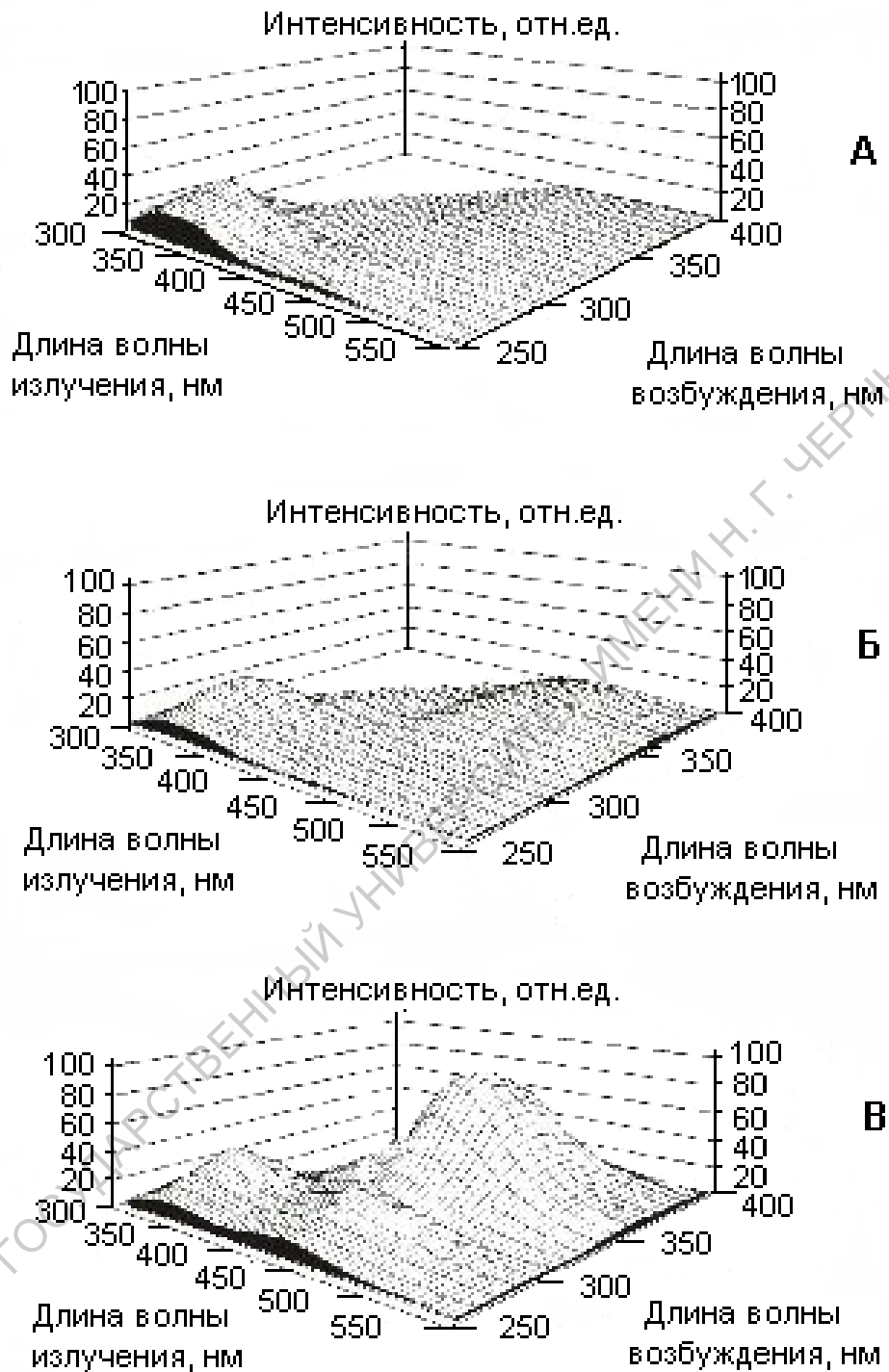


Рис. 18. 3D распределения интенсивности АФ кожи (*in vitro*) у женщин разного возраста:
 А – 40 лет, Б – 60 лет; В - 87-лет

Большая часть компонентов кожи, относящихся к ее структурным компонентам или вовлеченных в метаболический или функциональные процессы, при выборе подходящей длины волны возбуждающего излучения являются источниками флуоресценции в УФ или видимом спектраль-

ном диапазонах. В результате различные кожные морфо-функциональные изменения, приводящие к изменениям ее гистологических, биохимических или физикохимических свойств, могут быть определены, в принципе, на основе информации, представленной в ЕЕМ-матрице [31].

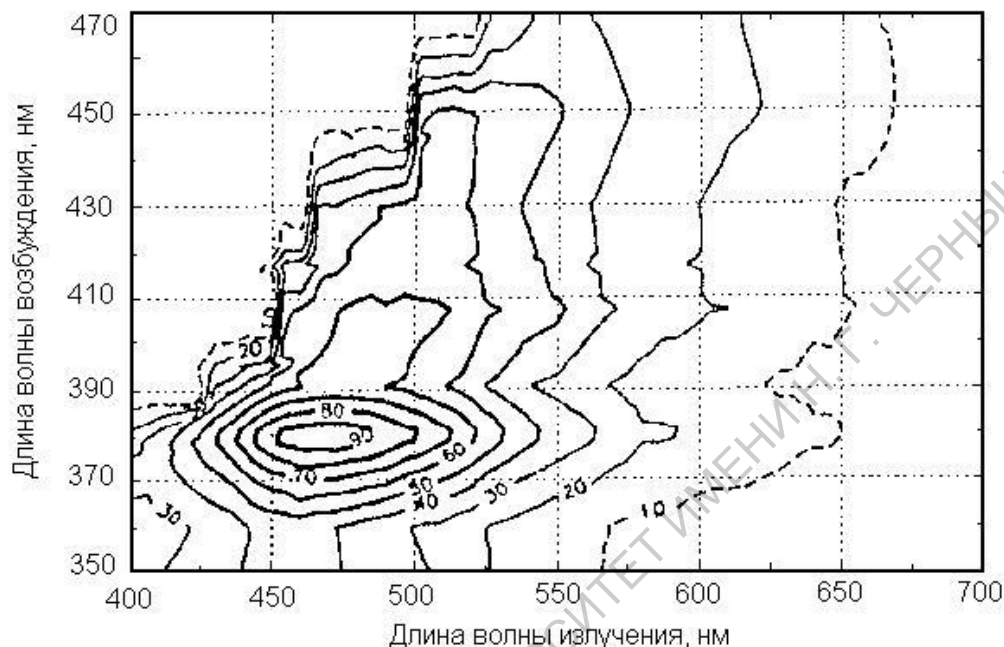


Рис. 19. ЕЕМ матрица *in vivo* кожи человека [32]

На рисунках 18 и 19 могут быть выделены спектральные области, представляющие определенный интерес. На основе анализа этих областей, а также данных по флуоресценции других биологических тканей с учетом определенного сходства биологических тканей по биохимическому составу можно выделить области флуоресценции основных флуорофоров кожи, приведенные на рис. 20.

Флуоресценция в спектральном диапазоне 320-370 нм (максимум вблизи 340 нм), возбуждаемая светом УФВ диапазона спектра (250-290 нм) (максимум возбуждения вблизи 280 нм), обусловлена ароматическими аминокислотами, прежде всего, тирозином и триптофаном (рис. 21).

Интенсивность АФ кожи в этой области мало меняется от образца к образцу, что вполне объяснимо отсутствием ослабляющего влияния на флуоресценцию меланина, расположенного преимущественно в нижних слоях эпидермиса и в верхней дерме. Содержание тирозина и триптофана в эпидермисе более чем в два раза превышает их содержание в целой коже, поэтому эпидермис обладает высокой АФ в УФ диапазоне (при псориазе флуоресценция *stratum corneum* превосходит флуоресценцию нормальной кожи [33]).

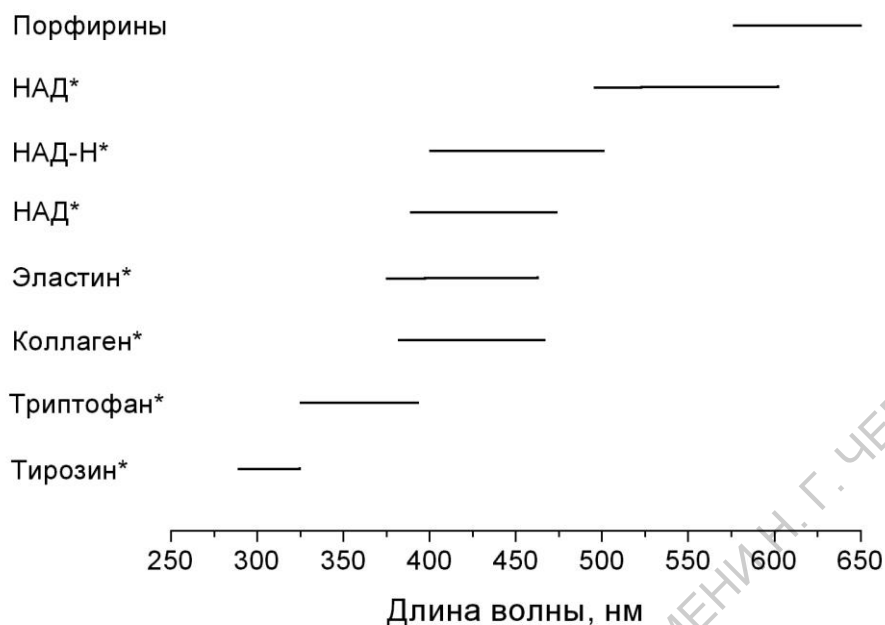


Рис. 20. Спектральные области флуоресценции основных флуорофоров кожи. Для флуорофоров, помеченных (*), области определены на уровне полуширины

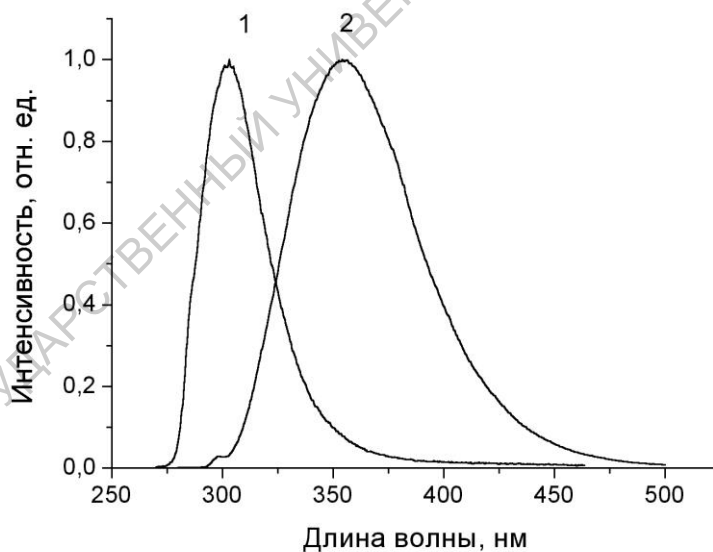


Рис. 21. Нормированные спектры флуоресценции ароматических аминокислот:
1 – триптофан, 2 – тирозин ($\lambda_{EX}=270$ нм) [20]

Определить природу АФ кожи в диапазоне 400-480 нм (с максимумом около 460 нм) (рис. 22) представляется достаточно сложным. В данном случае пик возбуждения и пик флуоресценции не являются спектральными постоянными.

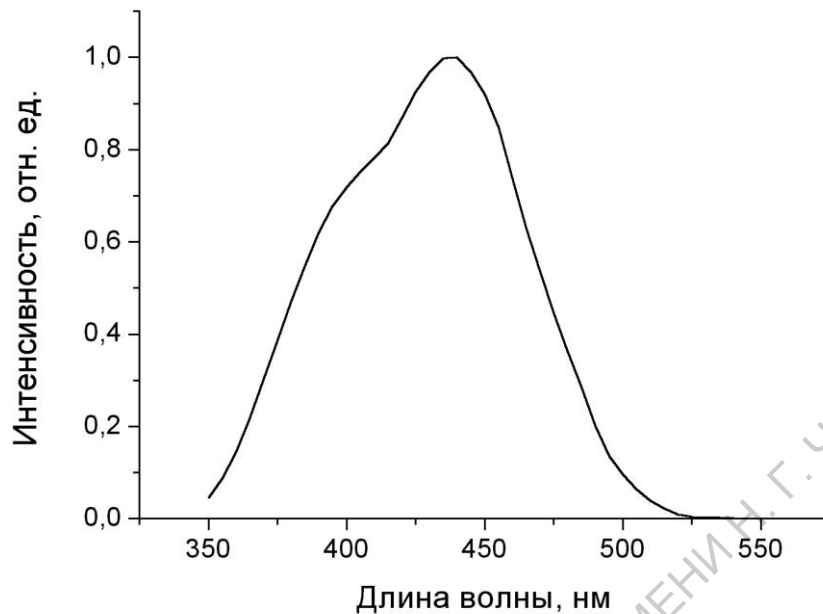


Рис. 22. Спектр АФ кожи ($\lambda_{\text{EX}} = 337 \text{ нм}$)

Вероятными претендентами для этой роли из флуорофоров эпидермиса могут быть восстановленная (НАД-Н) и связанная (НАД⁺) формы кофермента никотинамид аденин динуклеотида (НАД). Эти две формы кофермента отличаются спектральными областями флуоресценции (максимумы флуоресценции - 460 нм и 435 нм, соответственно) (рис. 23), квантовыми выходами (для НАД-Н он существенно выше) и временами затухания флуоресценции (для НАД-Н оно меньше) [34]. Поэтому интенсивность флуоресценции НАД в биологической ткани зависит от локальной клеточной концентрации этих коферментов, которая зависит от состояния метаболического процесса в биоткани. Высокая концентрация НАД-Н выявляется в активно пролиферирующих тканях, к которым принадлежит и эпидермис.

Другим возможным флуорофором, определяющим флуоресценцию эпидермиса, является кератин [35], который в больших количествах накапливается в верхних слоях эпидермиса и максимум флуоресценции которого приходится на 450 нм (рис. 23). Подобно рассмотренной выше ситуации с флуоресценцией триптофана и тирозина, флуоресценция НАД-Н и кератина практически не подвергается поглощению меланином.

Из флуорофоров дермы, дающих наибольший вклад в АФ кожи в этом спектральном диапазоне, можно выделить протеины соединительной ткани - коллаген и эластин, максимум флуоресценции которых приходится на длины волн 440 нм и 390 нм [34].

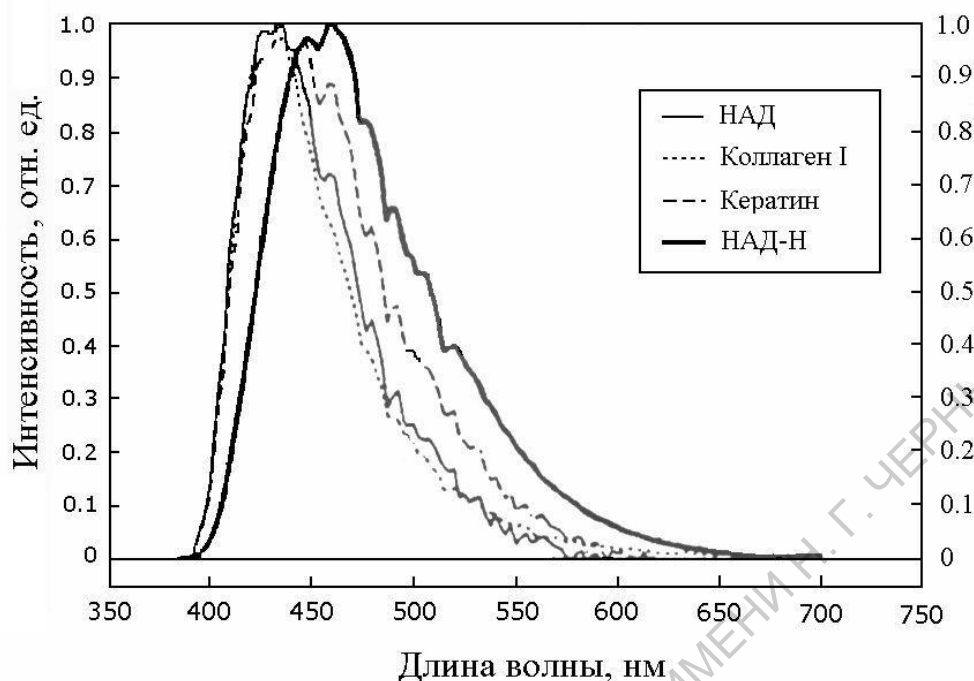


Рис. 23. Нормированные спектры флуоресценции основных флуорофоров кожи, определяющих ее АФ в видимом диапазоне спектра ($\lambda_{EX} = 365$ нм) [35]

Коллаген является наиболее привлекательным в качестве основного источника АФ кожи в рассматриваемом диапазоне длин волн по нескольким причинам. Почти 75% сухой дермальной ткани состоит из коллагеновых волокон. Коллаген является основным компонентом соединительной ткани, содержащим 90% белков дермы. В дерме найден коллаген типа I и типа III; коллаген типа IV найден в базальной мембране. В дермальных слоях распределение волокон коллагена практически однородно. Возрастное увеличение содержания коллагена в дерме коррелирует с наблюдаемым увеличением АФ кожи у пожилых людей [6, 36].

Заключение о доминирующей роли эпидермальных флуорофоров (кератина, НАД-Н) в формировании спектра АФ кожи основано на сходстве *in vitro* спектров флуоресценции кератина и НАД-Н с *in vivo* спектрами кожи человека. Максимумы флуоресценции коллагена и эластина (рис. 23) спектрально отличаются от максимума АФ кожи (рис. 24). Однако необходимо учесть, что спектры флуоресценции коллагена и эластина, которые преимущественно находятся в ламине и дерме, могут видоизмениться по мере выхода излучения из кожи из-за поглощения флуоресценции хромофорами эпидермиса. Прежде всего, как возбуждающее излучение, так и флуоресценция ослабляются из-за поглощения меланином (рис. 11), при этом возможно смещение максимума флуоресценции в длинноволновую часть спектра. Такое же действие оказывает гемоглобин (полоса Soret) (рис. 13). Другие хромофоры кожи (билирубин, порфирины, кароти-

ноиды и др. (рис. 5)) также могут вносить вклад в модификацию спектра АФ кожи в диапазоне 400-480 нм.

В результате модификации спектра в нем могут появиться дополнительные максимумы и минимумы. На рисунке 24 приведены для сравнения нормированные спектры флуоресценции кожи, кофермента НАД-Н и коллагена, при этом помимо спектра флуоресценции чистого коллагена приведены спектры флуоресценции коллагена, прошедшей через слой дермы толщиной 50 и 100 мкм, содержащие 5% крови.

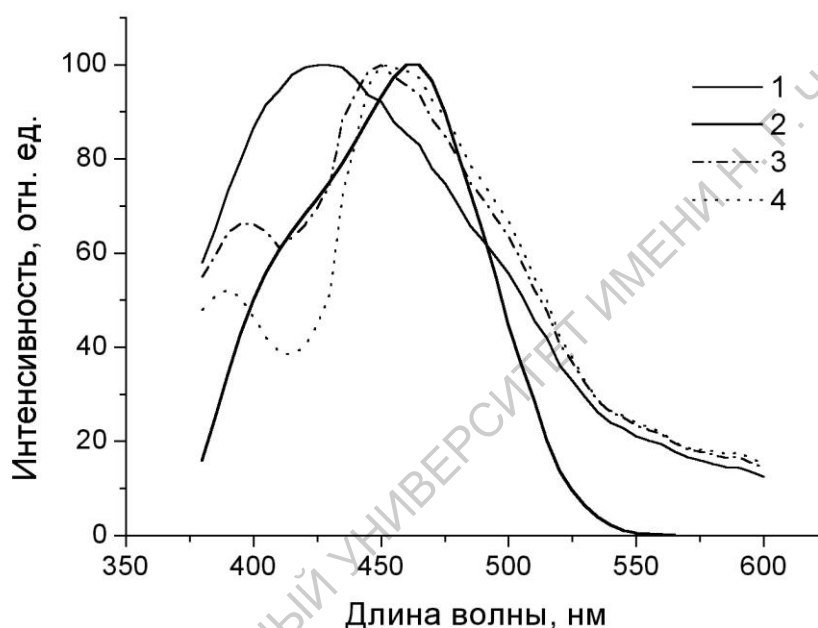


Рис. 24. АФ спектр кожи человека (1) (*in vivo*), спектры флуоресценции коллагена (2) (*in vitro*) и спектры флуоресценции коллагена после прохода через слой дермы толщиной 50 мкм (3) и 100 мкм (4) (степень оксигенации 50%; модель); $\lambda_{EX} = 337$ нм [38]

Предположение о доминирующей роли коллагена в формировании АФ кожи подтверждают экспериментальные исследования АФ кожи с разным содержанием крови [37, 38].

Рисунки 25 и 26 показывают временную динамику спектров АФ кожи в процессе развития УФА наведенной эритемы; а рис. 27 и 28 представляют АФ спектры кожи с разной степенью эритемы при разных оказываемых на кожу механических давлениях.

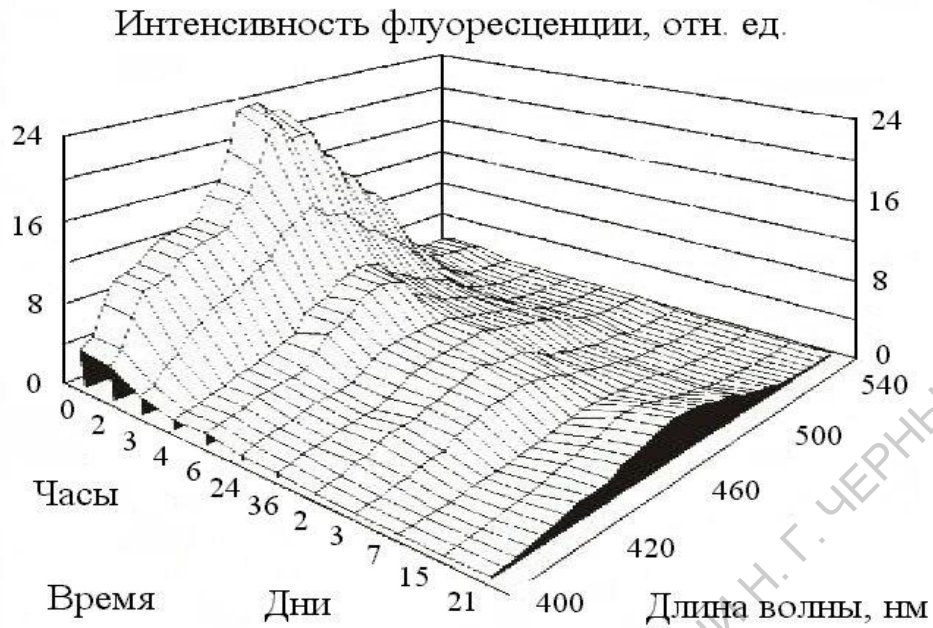


Рис. 25. Временная динамика изменения АФ кожи после ее УФ облучения с дозой 4 МЭД ($\lambda_{\text{EX}} = 337 \text{ нм}$)

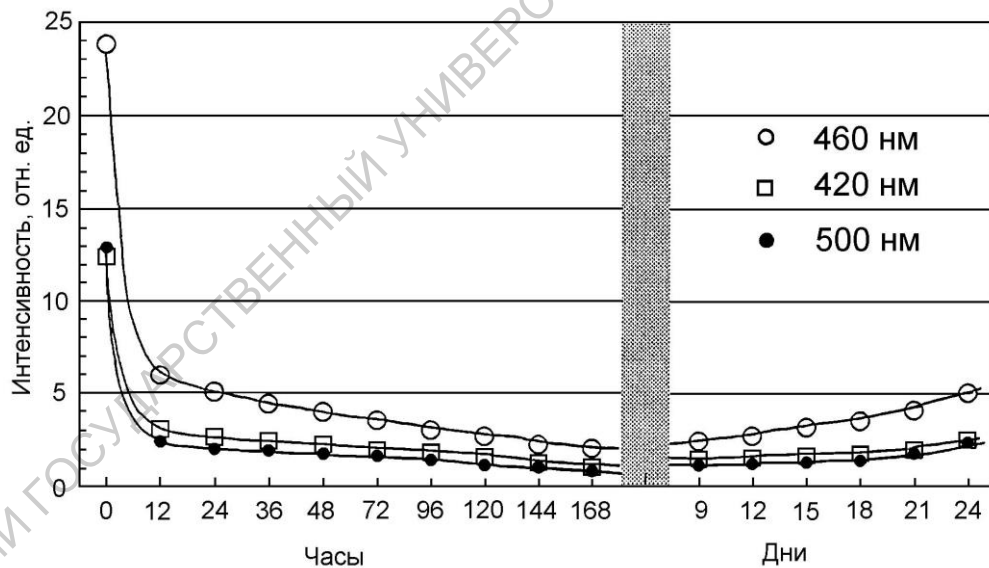
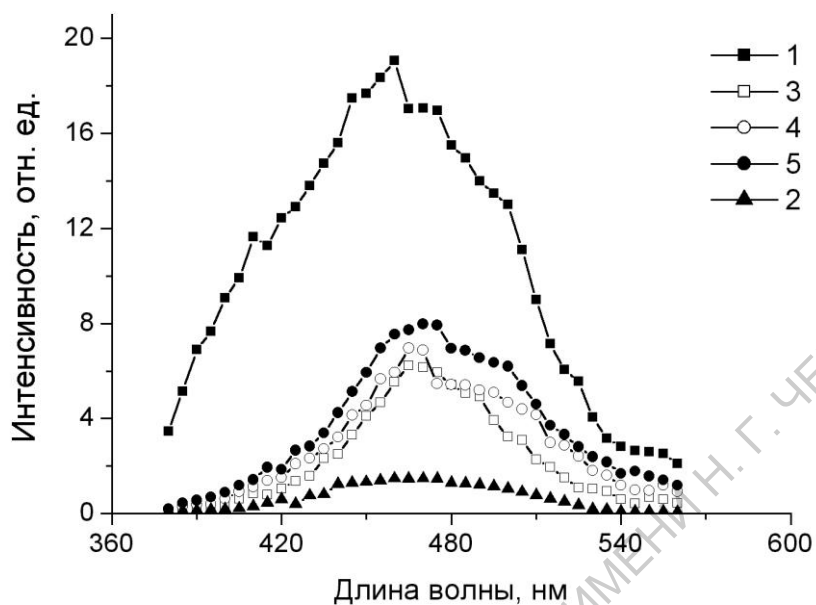
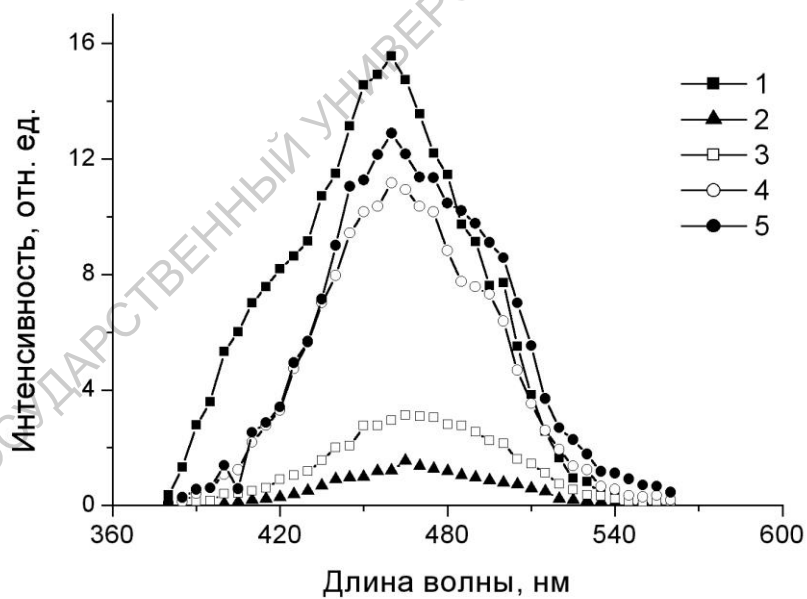


Рис. 26. Временная зависимость интенсивности АФ кожи с развивающейся эритемой ($\lambda_{\text{EX}} = 337 \text{ нм}$)

Основными особенностями в спектрах являются значительное уменьшение интенсивности АФ по мере развития эритемы и возрастание АФ при увеличении давления на кожу. Эти особенности обусловлены изменением содержания крови в поверхностном сосудистом сплетении дермы и пигмента меланина в эпидермисе.



а



б

Рис. 27. Спектры АФ кожи с УФА эритемой при разной величине внешнего механического давления: (а) - 7 дней после УФ облучения; (б) - 14 дней после облучения; 1 – нормальная кожа; 2 – кожа с эритемой без давления; 3 – $p = 1.4 \times 10^4$ Па; 4 – $p = 8.4 \times 10^4$ Па; 5 – $p = 1.4 \times 10^5$ Па ($\lambda_{EX} = 337$ нм)

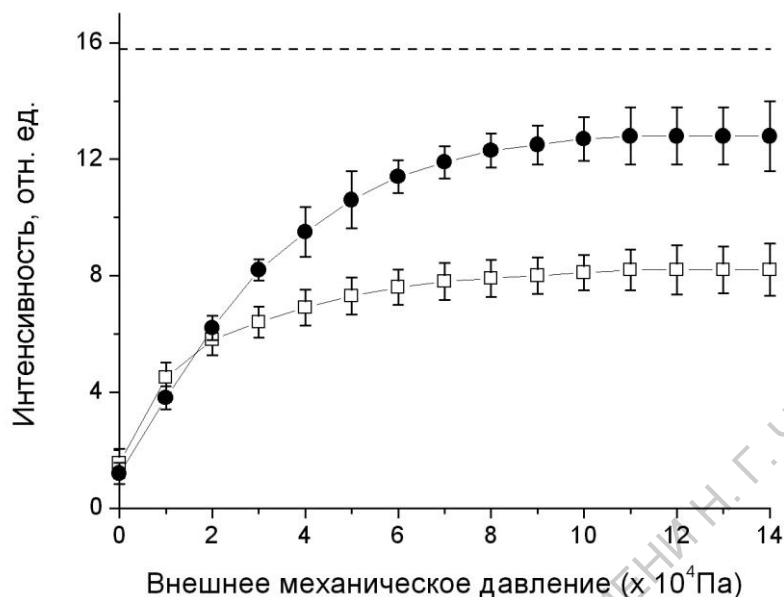


Рис. 28. Зависимость интенсивности АФ кожи ($\lambda_{FL} = 460$ нм) от величины внешнего механического давления: (□) 7 дней после УФ облучения; (●) 14 дней после облучения. Пунктирная линия - интенсивность АФ кожи без эритемы без давления ($\lambda_{EX} = 337$ нм)

Из рисунка 28 видно, что увеличение интенсивности АФ кожи при ее сжатии обусловлено уменьшением содержания крови в дерме, при этом разность в интенсивностях флуоресценции нормальной кожи и кожи с эритемой при давлениях $\geq 10^5$ Па вызвано и определяется поглощением меланина. Шелушение кожи приводит к уменьшению содержания меланина, в результате чего интенсивность АФ сдавленной кожи выше после шелушения (рис. 26).

НАД-Н и кератин дают определенный вклад в АФ кожи. Более того, результаты численного моделирования [37] показывают уменьшение интенсивности флуоресценции коллагена на поверхности кожи в 2-2.5 раз по сравнению с флуоресценцией коллагена в дерме, но тем не менее флуоресценция коллагена остается достаточной, чтобы являться доминирующим фактором в формировании АФ кожи в данном спектральном диапазоне.

При возбуждении в видимой области спектра (450-500 нм) в АФ кожи дают вклад каротиноиды и флавиновые ферменты (рис.29).

АФ кожи в красной области спектра характеризуется меньшей интенсивностью по сравнению с интенсивностью флуоресценции в УФА и коротковолновой видимой областях. Максимум возбужде-

ния расположен около 400 нм, максимум флуоресценции - около 600 нм. Кроме того, обнаруживаются менее выраженные пики флуоресценции в диапазоне 580-640 нм. Наиболее вероятным флуорофором в этом диапазоне спектра является протопорфирин IX (рис. 30), содержащийся в больших количествах в секрете сальных желез.

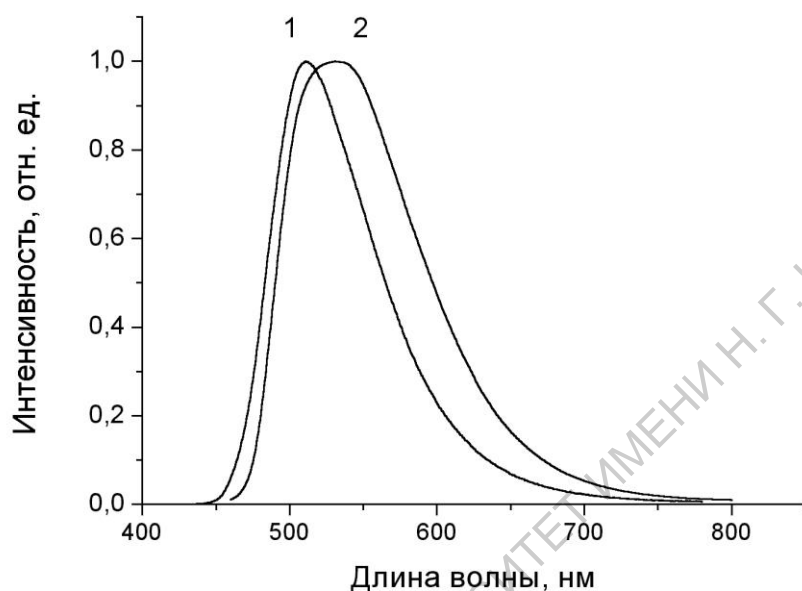


Рис. 29. Нормированные спектры флуоресценции флавиновых соединений: 1 – профлавин, 2 - рибофлавин ($\lambda_{EX} = 400$ нм) [13]

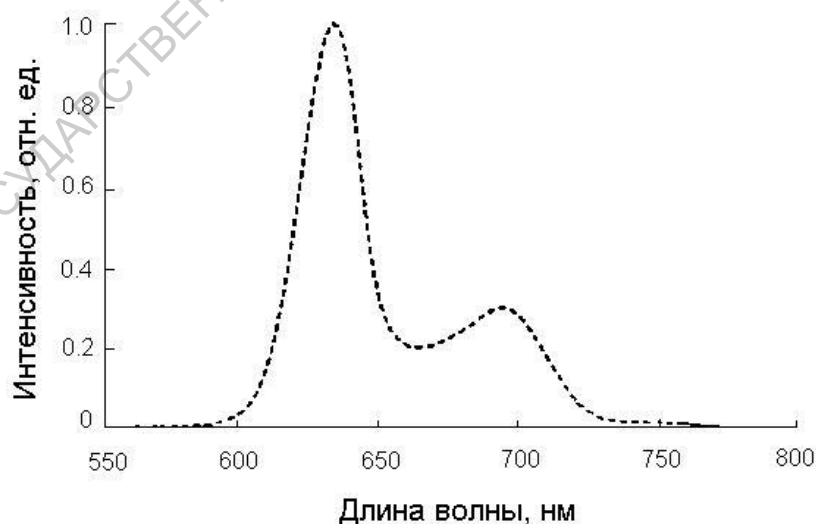


Рис. 30. Спектр флуоресценции протопорфирина IX ($\lambda_{EX} = 395$ нм) [23]

2. ПРОСТЫЕ ОПТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

Модель для анализа спектров отражения

Наиболее широко используемая простая модель для анализа спектра отражения кожи основана на следующих предположениях: кожа состоит из трех или четырех слоев, каждый из которых однородно пропускает и рассеивает свет; пропускание и рассеяние света каждым из слоев могут быть описаны формулами, обычно используемыми для объяснения диффузного рассеяния света порошками; границы между слоями не влияют существенно на пропускание и отражение света всей системой в целом [21]. Соответствие такой упрощенной модели (рис. 31) анатомической структуре кожи очевидна: stratum corneum (слой 1) диффузно отражает только ~ 5-7% (включая Френелевское отражение) нормально падающего на поверхность кожи оптического излучения и главным образом наводит диффузное рассеяние вперед; в эпидермисе свет интенсивно поглощается эпидермальным меланином (слой 2); непоглощенная часть достигает содержащую кровь сосковидную дерму (слой 3), где также частично поглощается гемоглобином; оставшаяся часть диффузно рассеивается коллагеном дермы (слой 4); диффузно рассеянный свет выходит из кожи, по пути еще раз испытывает поглощение в слоях, содержащих кровь и меланин.

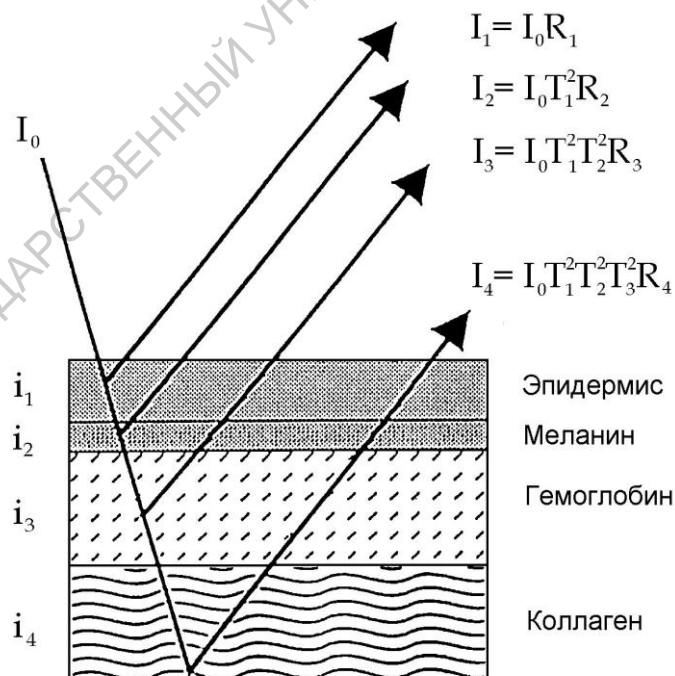


Рис. 31. Простая модель кожи

Таким образом, модельная система предполагает наличие процессов поглощения и рассеяния света в каждом из слоев однородными частицами, которые хаотически распределены в слое и чьи размеры значительно меньше толщины слоя.

При этих предположениях можно получить выражения для долей прошедшего T и отраженного R света каждым из слоев [21]. Особый интерес представляют два предельных случая: в первом случае рассеяние мало, тогда пропускание слоя описывается известным законом поглощения Беера-Ламберта, во втором случае рассеяние велико, тогда $T \sim 0$, $R \sim 1$, что соответствует полностью диффузно отражающему слою.

В рассматриваемой модели кожи предполагается, что первый случай характерен для слоев 1-3, представляющих собой эпидермис, базальный слой с меланином и дерму с гемоглобином, в то время как нижний слой 4, содержащий коллаген и жир, удовлетворяет второму условию.

В результате интенсивность света I , отраженного от четырехслойной структуры кожи, может быть представлена в следующем виде:

$$I = I_0(R_{d,1} + R_{d,2} T_1^2 + R_{d,3} T_1^2 T_2^2 + R_{d,4} T_1^2 T_2^2 T_3^2), \quad (1)$$

где I_0 - интенсивность света, падающего на кожу, $R_{d,1}$, $R_{d,2}$, $R_{d,3}$, $R_{d,4}$ - коэффициенты отражения света слоями структуры, а T_1 , T_2 и T_3 - коэффициенты пропускания света тремя верхними слоями структуры.

Предполагая, что величина обратного рассеянного света тремя первыми слоями мала по сравнению с четвертым слоем ($R_{d,1}$, $R_{d,2}$, $R_{d,3} \ll R_{d,4}$), из уравнения (1) легко получить коэффициент отражения целой кожи:

$$R = \frac{I_4}{I_0} = T_1^2 T_2^2 T_3^2 R_{d,4} \quad (2)$$

причем можно считать, что поглощение света меланином и гемоглобином является доминирующим процессом по сравнению с рассеянием света в первых трех слоях, то есть пропускание слоев T_i ($i = 1, 2, 3$) достаточно хорошо описывается законом Беера-Ламберта и $T_i \approx 1$.

Для рассеивающей среды коэффициент диффузного отражения R_d определяет «кажущуюся оптическую плотность» OD среды [27]:

$$OD = -\log R_d. \quad (3)$$

В дальнейшем под термином «оптическая плотность кожи» будем подразумевать «кажущуюся оптическую плотность» среды, определенную

согласно соотношению (3). Для кожи оптическая плотность может быть выражена следующим образом [15]:

$$OD = 2 \log e \left(\sum_i \varepsilon_i d_i \right) - \log(R_{d,4}), \quad (4)$$

где ε_i - коэффициент экстинкции i - го слоя толщиной d_i . Так как OD определяется в виде суммы, то *in vivo* измерения спектра отражения кожи дает возможность проводить *in vivo* количественную оценку хромофорного состава кожи (меланина и гемоглобина, содержащихся во втором и третьем слоях):

$$OD = 2 \log e \left[(\varepsilon_{ext} c_1 d_2)_{mel} + (\varepsilon_{ext} c_2 d_3)_{oxy} + (\varepsilon_{ext} c_3 d_3)_{deoxy} \right] - \log(R_4), \quad (5)$$

где ε_{ext} - коэффициент экстинкции, c_i - концентрация и d_i - оптическая толщина i - го слоя.

На рисунке 32 приведена временная зависимость OD для *in vivo* кожи с развивающейся эритемой, а на рис. 33 показаны спектральные распределения OD для кожи человека с эритемой при разных оказываемых на нее механических давлениях.

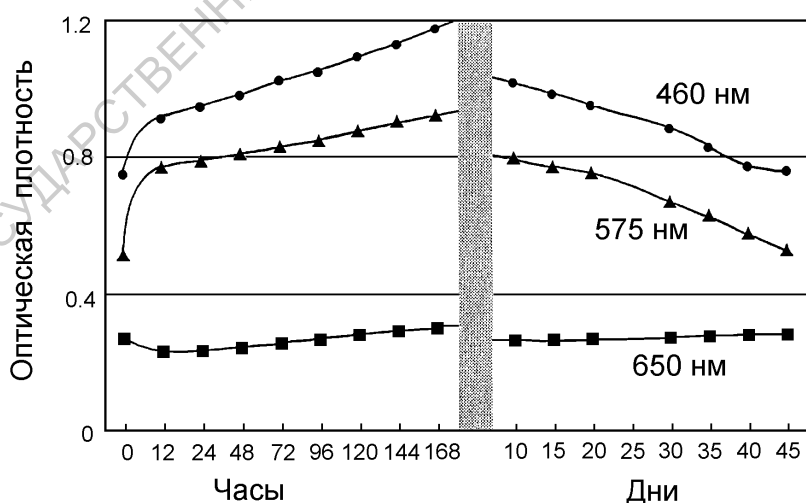


Рис. 32. Временная зависимость оптической плотности *in vivo* кожи с развивающейся эритемой

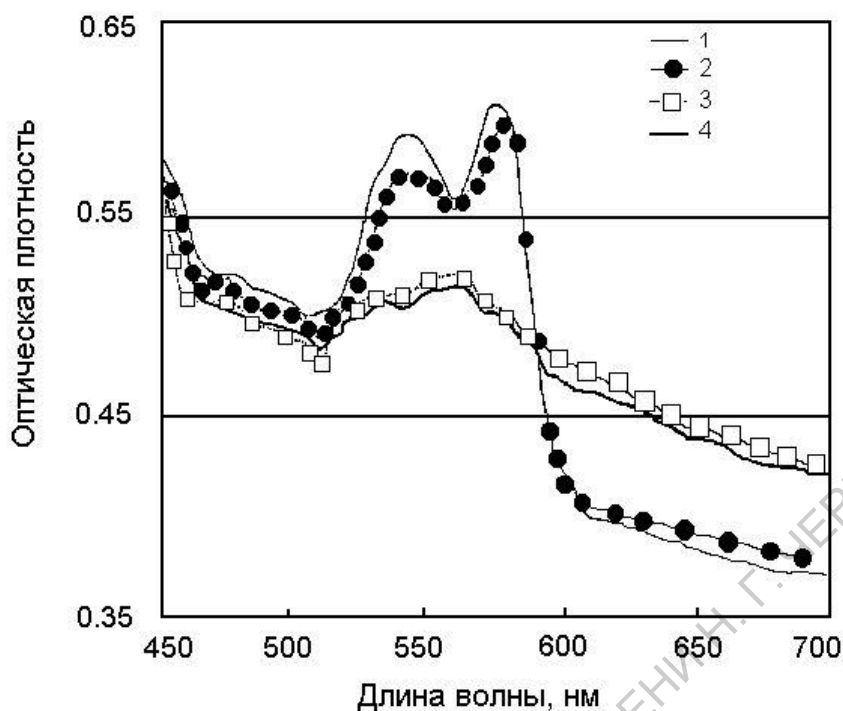


Рис. 33. Спектральное распределение оптической плотности кожи с эритемой (3 дня после УФ облучения) при разных величинах внешнего механического давления: 1 – без давления; 2 – $p = 5.6 \times 10^4$ Па; 3 – $p = 8.4 \times 10^4$ Па; 4 – $p = 1.4 \times 10^5$ Па

Кривые на рисунках 32 и 33 демонстрируют эффект эритемы и сдавливания кожи на ее поглощающие свойства. В частности, из рисунка 32 видно, что в течение первых суток после УФ облучения кожи содержание крови в коже увеличивается на 50%.

Приложение к коже *in vivo* внешней механической компрессии порядка 10^5 Па приводит к уменьшению как рассеивающих свойств кожи, так и ее поглощению, вызванным уменьшением содержания гемоглобина крови в коже. Этот процесс инерциален и продолжается в течение 3-4 минут. После снятия компрессии время восстановления кожи (порядка 40-50 минут) значительно превышает время стабилизации параметров кожи после наложения внешней компрессии. В начальный момент времени после снятия компрессии значительно возрастает кровенаполненность сосудов кожи (в 2,4 раза по сравнению с нормальной кожей [39]).

После приложения внешней компрессии на кожу человека *in vivo* влияние поглощения гемоглобина на спектры отражения значительно уменьшается и после небольшого времени оптического просветления полоса поглощения β -каротина на длинах волн 460-500 нм становится легко наблюдаемой и его оптическая плотность может быть определена с высокой точностью [40].

Модель для анализа спектров автофлуоресценции

По аналогии с простой моделью кожи для анализа спектров отражения можно рассмотреть простую модель кожи для анализа спектров ее АФ [37, 38]. Согласно этой модели кожу можно представить как трехслойную структуру, состоящую из эпидермиса, папиллярной дермы и слоя дермы под папиллярной дермой (рис. 34).

Предполагается однородное пространственное распределение флуорофоров, дающих вклад в АФ: НАД-Н и кератин - в эпидермисе, коллагена - в дерме. Вклад флуоресценции *stratum corneum* и эпидермиса в общую флуоресценцию кожи мало меняется при эритеме или внешнем механическом давлении. Как возбуждающее излучение, так и флуоресценция коллагена при распространении в коже частично поглощается слоями, содержащими кровь и меланин.

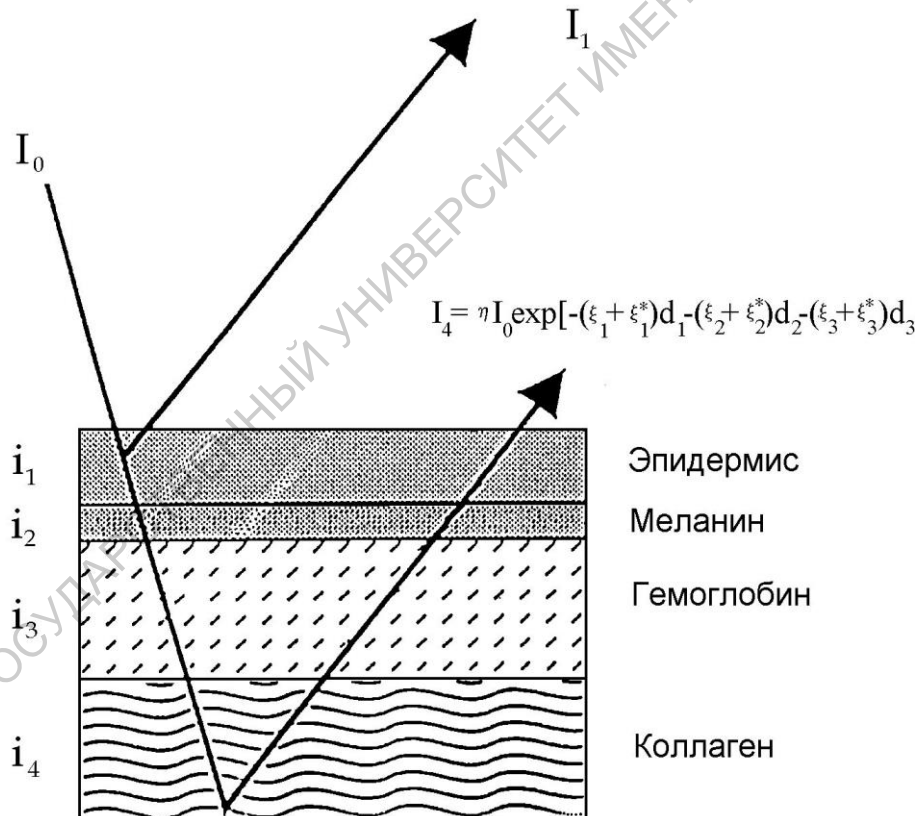


Рис. 34. Простая модель для анализа АФ кожи

Интенсивность I_{AF} АФ кожи определяется флуоресценцией I_1 эпидермиса (НАД-Н, кератин) и флуоресценцией I_4 дермы (коллаген).

В одномерном приближении интенсивность выходящей из кожи флуоресценции дермального слоя I_4 может быть представлена в виде:

$$I_4(\lambda_{FL}) = \int_z \Phi(\lambda_{EX}, z) \eta(\lambda_{FL}, \lambda_{EX}) T(\lambda_{FL}, z) dz, \quad (6)$$

где λ_{EX} и λ_{FL} - длины волн возбуждения и флуоресценции; $\Phi(\lambda_{EX}, z)$ - плотность потока возбуждающего излучения внутри 4-го слоя; $\eta(\lambda_{FL}, \lambda_{EX})$ - квантовый выход флуоресценции коллагена.

Передаточная функция $T(\lambda_{FL}, z)$ определяет распространение флуоресценции коллагена в верхних слоях и может быть представлена следующим образом:

$$T(\lambda_{FL}) = \exp\left[-\sum_i \varepsilon_i^*(\lambda_{FL}) d_i\right], \quad (7)$$

где $\varepsilon_i^*(\lambda_{FL})$ - коэффициент экстинкции i -го слоя толщиной d_i на длине волны флуоресценции.

Усредненное значение плотности потока возбуждающего излучения в 4-ом слое может быть представлено в виде:

$$I(\lambda_{EX}) = I_0(\lambda_{EX}) \exp\left[-\sum_i \varepsilon_i(\lambda_{EX}) d_i\right], \quad (8)$$

где $I_0(\lambda_{EX})$ - интенсивность возбуждающего излучения, падающего в виде коллимированного пучка на поверхность кожи, $\varepsilon_i(\lambda_{EX})$ - коэффициент экстинкции i -го слоя на длине волны возбуждающего излучения.

Тогда интенсивность выходящей из кожи флуоресценции можно выразить следующим образом:

$$I_4(\lambda_{FL}) = \eta(\lambda_{FL}, \lambda_{EX}) I_0(\lambda_{EX}) \exp\left[-\sum_i [\varepsilon_i(\lambda_{EX}) + \varepsilon_i^*(\lambda_{FL})] d_i\right]. \quad (9)$$

Нормировка интенсивности флуоресценции $I_4(\lambda_{FL})$ на величину $\eta(\lambda_{FL}, \lambda_{EX}) I_0(\lambda_{EX})$, позволяет определить величины

$$R^* = \frac{I_4(\lambda_{FL})}{\eta(\lambda_{FL}, \lambda_{EX}) I_0(\lambda_{EX})}, \quad (10)$$

$$OD^* = \log\left(\frac{1}{R^*}\right) = \log e \left(\sum_i [\varepsilon_i(\lambda_{EX}) + \varepsilon_i^*(\lambda_{FL})] d_i \right). \quad (11)$$

Величина OD^* может быть названа “кажущейся эффективной оптической плотностью» кожи, так как она прямо пропорциональна ее поглощающим свойствам. В отличие от OD изменения OD^* определяются изменением в поглощении кожи на длинах волн возбуждения и излучения, но так как поглощение хромофоров кожи (гемоглобина и меланина) пропорционально концентрации этих компонентов не зависимо от длины волны излучения, то изменение величины “кажущейся эффективной оптической плотности” однозначно определяется изменением содержания крови и меланина в коже.

Из результатов измерения спектров АФ кожи чрезвычайно трудно получить абсолютную количественную информацию о содержащихся в ней флуорофоров (и/или хромофоров), прежде всего из-за сложности определения квантового выхода флуоресценции η , поэтому флуоресцентный анализ обычно используется для определения относительных изменений содержания флуорофоров (и/или хромофоров) в биоткани. В отличие от отражательной спектроскопии, где нормировка отраженного кожей света на известный высокоотражающий эталон (типа $BaSO_4$) дает возможность определять абсолютные значения коэффициента отражения R_d и оптической плотности OD , флуоресцентная спектроскопия позволяет измерять только относительные изменения поглощающих свойств кожи.

Изменения ΔOD^* определяются только изменениями в интенсивности флуоресценции:

$$\Delta OD^* = OD_2^* - OD_1^* = \log \left(\frac{\eta I_0}{I_{FL}^2} \right) - \log \left(\frac{\eta I_0}{I_{FL}^1} \right) = \log \left(\frac{I_{FL}^1}{I_{FL}^2} \right), \quad (12)$$

где I_{FL}^1 и I_{FL}^2 - два сравниваемых значения интенсивности АФ кожи (при идентичных условиях измерения).

Так как изменения OD^* не зависят от величины ηI_0 , то ηI_0 можно выбрать таким образом, чтобы значения R^* и R_d были одного порядка.

Флуоресценция эпидермиса вносит постоянный вклад в АФ кожи и мало влияет на зависимость OD^* от содержания в коже гемоглобина и меланина.

На рис. 35 приведены спектры OD^* кожи с эритемой, полученные при разных механических давлениях, приложенных к коже (соответствующие спектры АФ приведены на рис. 26), а на рис. 35 показана зависимость OD^* кожи с семидневной эритемой от давления.

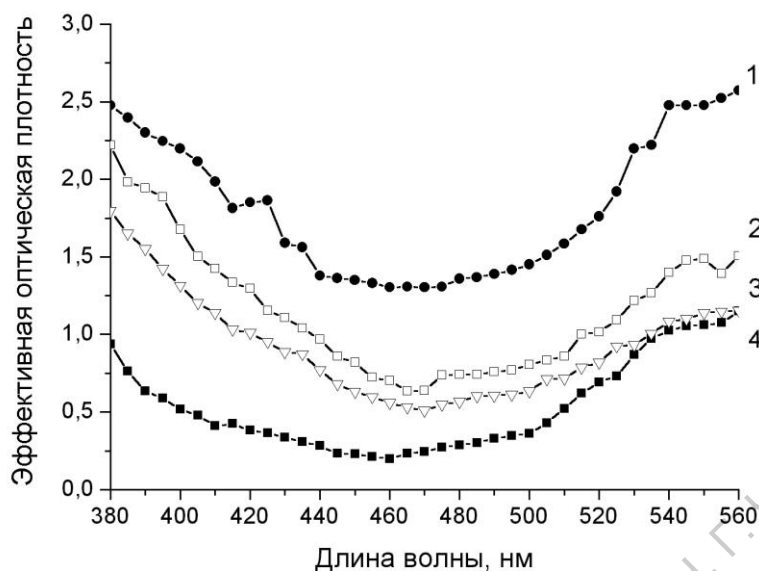


Рис. 35. *In vivo* спектральные распределения OD^* кожи с УФ эритемой (7 дней после облучения) при разных значениях внешнего механического давления: 1 – $p = 0$; 2 – $p = 2.8 \times 10^4$ Па; 3 – $p = 1.4 \times 10^5$ Па; 4 – нормальная кожа без давления ($\lambda_{EX} = 337$ нм)

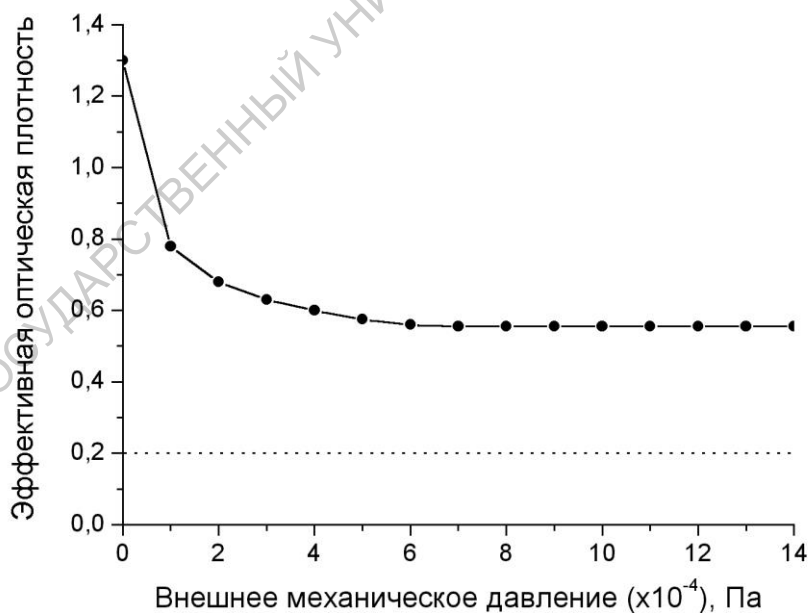


Рис. 36. Зависимость OD^* ($\lambda_{FL} = 460$ нм) кожи с эритемой (7 дней после облучения) от внешнего механического давления ($\lambda_{EX} = 337$ нм); (пунктирная линия) – нормальная кожа под давлением 10^5 Па

Уменьшение OD^* с увеличением давления обусловлено уменьшением содержания в коже крови. Различие между значениями OD^* кожи с эритемой при давлении 10^5 Па и нормальной кожи при таком же давлении

(горизонтальная линия на рис. 3б) вызвано изменением в содержании меланина.

3. КОМБИНИРОВАННЫЙ МЕТОД ОТРАЖАТЕЛЬНОЙ И ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ КОЖИ *IN VIVO*

Очевидно, что как обратное рассеяние, так и спектры АФ кожи формируются под влиянием одних и тех же рассеивающих и поглощающих свойств среды. В результате информация о поглощающих свойствах кожи (в частности, о содержании меланина и гемоглобина) может быть получена как из измерений спектра отражения, так и спектров АФ. Отражательная и флуоресцентная спектроскопия кожи дополняют друг друга и их комбинированное применение дает возможность получить больше информации о состоянии биоткани.

Определение индексов эритемы и меланина

In vivo измерения спектров отражения кожи позволяют ввести индексы пигментации, которые рассчитываются по значениям коэффициента отражения кожи в специфических спектральных интервалах, где имеются характерные полосы конкретного хромофора и отсутствуют полосы поглощения других хромофоров. Измерения коэффициента отражения в таких спектральных областях позволяют количественно оценить содержание в коже того или иного хромофора. Индексы пигментации позволяют оценить меланиновую пигментацию, билирубиновую пигментацию и степень эритемы [15, 21, 41-45].

Индекс меланиновой пигментации позволяет количественно оценить содержание в коже одного из важнейших ее хромофоров – пигмента меланина. Меланин хорошо поглощает излучение во всем видимом диапазоне с увеличением поглощения в области УФ спектра и выполняет биологическую функцию экранирования падающего на кожу излучения, особенно УФ излучения, способного вызывать всесторонние и важные воздействия на биоткани. Кроме этого, меланин является перехватчиком свободных радикалов, образующихся при облучении кожи.

Индекс меланина M может быть определен из наклона зависимости оптической плотности кожи в УФ спектральном диапазоне, где поглощение меланина определяет спектр отраженного кожей излучения [10]:

$$M = 100(OD_{365} - OD_{395}), \quad (13)$$

где индексы внизу обозначают длину волны в нм.

Однако в этой спектральной области сильно поглощает другой хромофор кожи – гемоглобин; разделить вклады гемоглобина и меланина в оптическую плотность кожи затруднительно.

Подобным образом авторы работы [50] пытались оценить содержание меланина в эпидермисе сравнением коэффициентов отражения на длинах волн 400 и 420 нм. Хотя они и предположили, что этот параметр может быть использован как фактор риска для рака кожи, нужно отметить, что коэффициенты отражений на этих длинах волн сильно зависят от полосы Соре поглощения гемоглобина.

Поэтому альтернативной спектральной областью для определения индекса меланиновой пигментации является область спектра выше 620 нм, где доминирующим хромофором является меланин, а поглощение гемоглобин имеет минимальное влияние на формирование спектра отражения. Kollias и Bager [16-17] показали, что наклон зависимости оптической плотности кожи от длины волны в спектральной области 620-720 нм прямо пропорционален количеству меланина в эпидермисе.

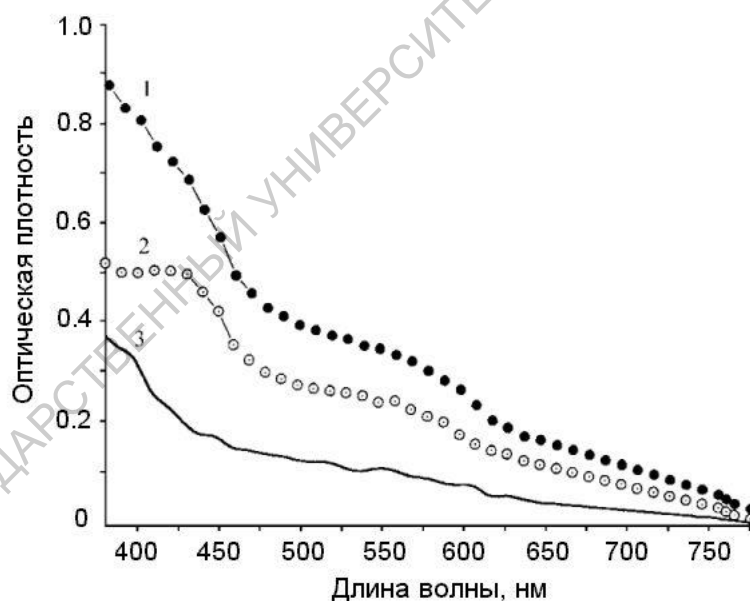


Рис. 37. Спектры оптической плотности нормально пигментированной кожи (1), кожи *vitiligo* (2) и разностный спектр (3) [27]

На рисунке 37 приведены спектры оптической плотности нормальной кожи, кожи *vitiligo* (лишенной меланина) и разностный спектр, представляющий собой спектр поглощения меланина. В области спектра 620-720 нм оптическая плотность меланина является линейной функцией длины волны, наклон которой определяется концентрацией меланина: при большей концентрации он больше; разность наклонов зависимостей $OD(\lambda)$

для пигментированной кожи и кожи *vitiligo* охватывает приблизительно область от $100 \times 10^{-6} \text{ нм}^{-1}$ до $1500 \times 10^{-6} \text{ нм}^{-1}$ для белой расы и составляет величину порядка $6000 \times 10^{-6} \text{ нм}^{-1}$ для черной расы [27].

При таком подходе индекс меланиновой пигментации (или индекс меланина) M определяется углом наклона спектра OD в спектральном диапазоне свыше 620-640 нм [21]:

$$M = 100 \left(\overline{OD}_{650} - \overline{OD}_{700} \right), \quad (14)$$

где черта означает усреднение по значениям OD на трех близких длинах волн, α - малый инструментальный член коррекции ($\alpha \sim 0,01$), необходимый для учета изменения рассеивающих свойств кожи в этом диапазоне спектра. Упрощенный вариант данного способа воплощен в компактном приборе авторами работы [46].

Изменение содержания гемоглобина в дерме (или изменение степени оксигенации гемоглобина) проявляется в изменении формы полосы поглощения в спектральной области 535-575 нм (оксигенированный гемоглобин имеет двойной пик поглощения на 535 и 575 нм, деоксигенированный – сильно поглощает на 550 нм). Поэтому величина коэффициента отражения кожи в этой спектральной области и форма провалов в спектре отражения может дать объективную информацию о содержании крови и степени оксигенации гемоглобина в коже человека. На рисунке 38а приведены спектры отражения нормальной кожи и кожи с эритемой.

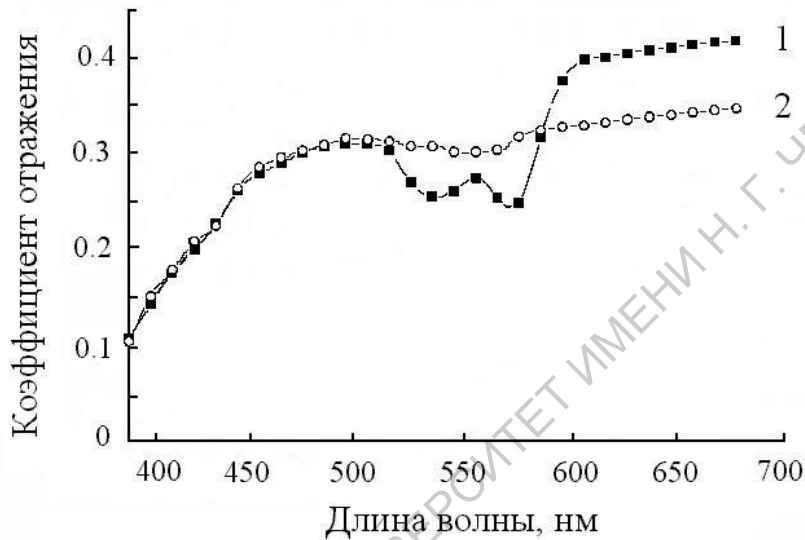
Количественная оценка содержания крови в коже можно оценить введением индекса эритемы, который большинством исследователей определяется на основании сравнения коэффициентов отражения кожи в спектральных областях, где велико поглощение гемоглобина и где оно мало. Введение индекса эритемы позволяет объективно оценивать цвет кожи, аллергические реакции кожи, возникающие в процессе лечения, степень оксигенации гемоглобина крови и др.

Методы определения индекса эритемы с привлечением *in vivo* отражательной спектроскопии хорошо известны. Наиболее широко используется определение индекса эритемы как величины, пропорциональной площади под спектральной зависимостью $OD(\lambda)$ в области длин волн, где велико поглощение крови (510-610 нм). На рис.38б приведены спектры OD для двух состояний кожи, соответствующих спектрам отражения, приведенным на рис. 38а. Площади под кривыми в спектральной области 510 - 600 нм (на рис. 38б это области, лежащие выше пунктирных линий) зависят от содержания крови в дерме. Количественный параметр, пропорциональный отмеченной выше площади и называемый индексом эритемы E , с учетом "подставки", которая в спектре OD кожи определяется поглощени-

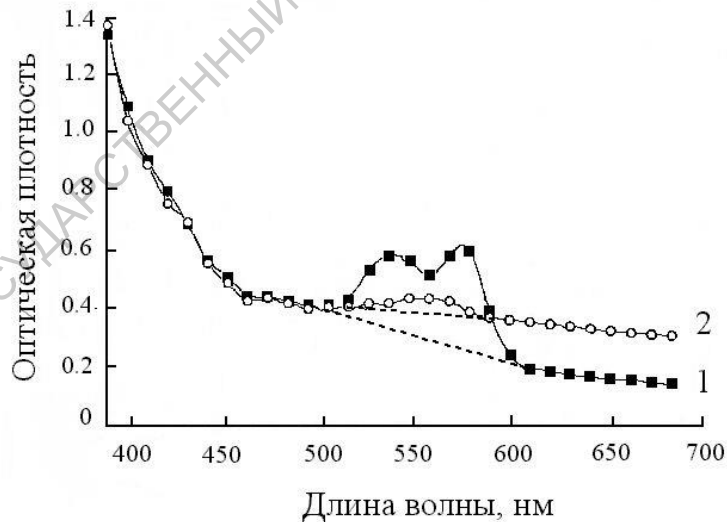
ем других хромофоров, прежде всего меланином и билирубином, может быть определен следующим образом [21]:

$$E = 100[OD_{560} + 1.5(OD_{545} + OD_{575}) - 2.0(OD_{510} + OD_{610})], \quad (15)$$

где индексы внизу обозначают длину волны в нм, на которой измеряется оптическая плотность кожи.



а



б

Рис. 38. Спектры отражения (а) и оптической плотности (б) кожи с эритемой (1) и нормальной кожи (2)

Альтернативное приближение основано на сравнении величины OD в изобестических точках, то есть на таких длинах волн, где поглощение

гемоглобина не зависит от состояния его оксигенации. В спектральной области 500-600 нм есть пять таких изобестических точек: 502, 529, 545, 570 и 584 нм (рис. 39). Если предположить, что рассеяние света влияет на значения OD в этих точках одинаково, то разности в значениях OD между двумя изобестическими точками будут пропорциональны содержанию гемоглобина в образце и не зависят от состояния оксигенации. Таким образом, используя разности в OD между двумя изобестическими точками, может быть определен индекс гемоглобина (аналог индекса эритемы) следующим образом [47, 48]:

$$H = \frac{OD_{545} - OD_{529}}{16} - \frac{OD_{570} - OD_{545}}{25}, \quad (16)$$

Как видно из выражений (15) и (16), для расчета индексов эритемы E и гемоглобина H необходимо измерение коэффициента отражения R_d кожи на нескольких длинах волн. Это возможно при использовании стационарного спектрального оборудования. Поэтому для широкого диагностического применения данного метода возникают значительные проблемы.

Тем не менее для ряда диагностических и терапевтических целей, в частности, для мониторинга изменения состояния кровообращения или развития тепловой эритемы, т.е. в случае, если количество меланина (основного хромофора, дающего вклад в поглощение света кожей в диапазоне 510-610 нм) не изменяется, возможно упростить процесс определения индексов эритемы.

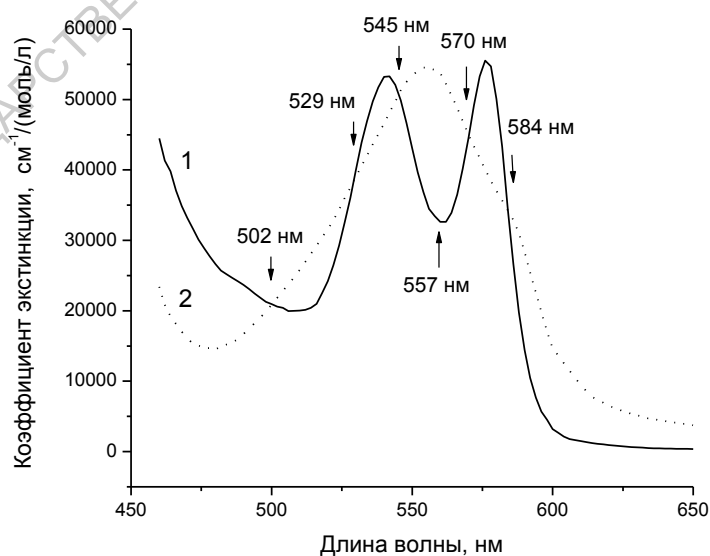


Рис. 39. Спектры экстинкции оксигемоглобина (1) и деоксигемоглобина (2)

Простой метод определения индекса эритемы основан на сравнении оптической плотности кожи в зеленой (~560 нм) (полоса поглощения гемоглобина) и красной (~650 нм) (поглощение гемоглобина мало) спектральных областях [41]:

$$E = 100(OD_{560} - OD_{650}). \quad (17)$$

Основным недостатком метода является то, что он не учитывает вклад поглощения гемоглобина в величину оптической плотности кожи, измеренной в зеленой области спектра.

Авторами работы [49] предложен трехволновый метод, позволяющий измерить индексы эритемы и меланиновой пигментации, при этом индекс эритемы определяется с учетом поглощения гемоглобина.

Метод основан на измерении коэффициентов отражения кожи и последующем определении оптической плотности кожи на трех длинах волн ($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$), две из которых ($\lambda_2 = 650$ нм, $\lambda_3 = 710$ нм) лежат в красной области спектра и служат для определения индекса меланина согласно приведенному ниже соотношению:

$$M = k \left(\frac{OD_2 - OD_3}{\Delta\lambda_{23}} \right), \quad (18)$$

где $\Delta\lambda_{23} = \lambda_3 - \lambda_2$; k - нормировочный множитель; комбинация значений оптической плотности, одно из которых (OD_1) определено в желто-зеленой области спектра ($\lambda_1 = 560$ нм), а второе (OD_2) - в красной (λ_2), позволяет определить индекс эритемы:

$$E = 100 \left[OD_1 - OD_2 - \frac{M}{k} \Delta\lambda_{12} \right], \quad (19)$$

где $\Delta\lambda_{12} = \lambda_2 - \lambda_1$.

Главным преимуществом спектров диффузного отражения кожи и «индексов пигментации» является их многосторонность и специфичность из-за высокого информативного содержания спектров. Более того, нюансы спектров диффузного отражения кожи могут быть выражены в соответствующих биологических параметрах (содержание меланина, оксигенация крови, статус крови и т.д.) [51].

Специфические особенности диффузного отражения излучения лазерных и нелазерных источников света видимого и ближнего ИК областей

спектра от различных частей кожи лица человека исследовались авторами работы [52] с целью определения локализации глазного века. В видимой области спектра кожа века может быть дискриминирована путем определения индекса меланина. Их значения для кожи века превышает значения индексов для других участков кожи лица для волонтеров с II и III типами кожи.

Кожа века может также быть дифференцирована от других участков кожи лица путем сравнения коэффициентов отражения на длинах волн ближнего ИК диапазона, соответствующих поглощению воды или его отсутствия. Коэффициенты отражения кожи века, измеренные на длинах волн поглощения воды и нормированные на отражение кожи, где поглощение минимально, значительно меньше других участков кожи лица. Это может быть объяснено большей глубиной проникновения света в ткань (в частности, ткань глазного яблока) с высоким содержанием воды [52].

Измерения интенсивности АФ кожи также дают возможность *in vivo* определения индексов эритемы и пигментации кожи. Согласно соотношениям (11) и (12), оптическую плотность нормальной кожи (OD_N^*) и кожи с эритемой (OD_E^*) можно определить следующим образом:

$$OD_N^* = \log \left(\frac{\eta I_0}{I_{FL}^N} \right); \quad (20)$$

$$OD_E^* = \log \left(\frac{\eta I_0}{I_{FL}^E} \right),$$

где интенсивности I_{FL}^N АФ нормальной кожи и I_{FL}^E кожи с эритемой измеряются на длине волны $\lambda_{FL} = 460$ нм. Очевидно, что разность

$$OD_E^* - OD_N^* = \log \left(\frac{I_{FL}^N}{I_{FL}^E} \right) \quad (21)$$

определяет изменение поглощения света кожей за счет изменения содержания крови.

Величину

$$E \equiv k(OD_E^* - OD_N^*) \quad (22)$$

можно определить как показатель содержания крови в кожной ткани (индекс эритемы). Коэффициент k введен для того, чтобы определенные данным методом индексы эритемы привести к шкале индексов, измеренных методом отражательной спектроскопии.

На рисунке 40 приведена сравнительная динамика изменения индексов эритемы кожи с развивающейся эритемой, определенных методами отражательной и флуоресцентной спектроскопии.

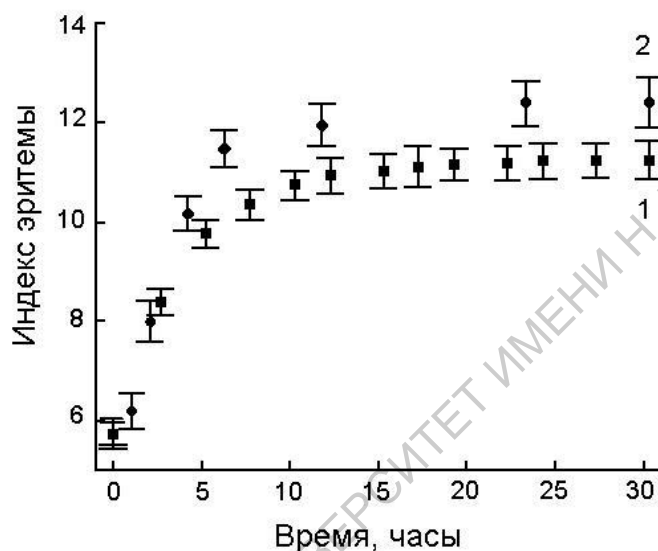


Рис. 40. Временное изменение индексов эритемы кожи с развивающейся эритемой, определенных из ее спектров АФ (2)

Индекс меланина определяется согласно выражениям, аналогичным (21) и (22), где интенсивности I_{FL}^N и I_{FL}^E измеряются в случае кожи подвергнутой давлению $\sim 10^5$ Па (бескровная дерма).

Определение степени оксигенации гемоглобина крови

Одним из важнейших параметров, определяющих жизнедеятельность биологических тканей, является степень насыщения крови кислородом, переносчиком которого является содержащийся в эритроцитах крови гемоглобин. В настоящее время разработан ряд спектральных методов, позволяющих определять степень оксигенации гемоглобина в кровеносной сосудистой системе человека. Мониторинг степени оксигенации гемоглобина артериальной крови, показывающий, какое количество кислорода поступает в организм, осуществляется с помощью метода пульс-оксиметрии [53-56]. Не менее важной является информация о насыщении кислородом венозной крови, так как она отражает баланс между доставкой и потребле-

нием кислорода в биотканях. Мониторинг оксигенации венозной крови тканей головного мозга возможен с помощью метода церебральной оксиметрии [57]. Методы пульс-оксиметрии или церебральной оксиметрии, основанные на абсорбционной спектроскопии в красной и ближней инфракрасной областях спектра, используются для измерений насыщения кислородом чисто артериальной или чисто венозной крови.

Несомненный интерес представляет состояние насыщения кислородом гемоглобина в микроциркуляторном русле биотканей, так как такие измерения затрагивают как артериальную, так и венозную капиллярные сети, которые, в свою очередь, определяют кислородный статус биоткани, в которой располагаются капиллярные кровеносные сосуды. Методы определения тканевой насыщенности кислородом в большинстве своем также основаны на абсорбционной спектроскопии в ИК диапазоне [58, 59].

Мониторинг кровенаполненности капиллярных сетей и степени оксигенации крови в сосудистых сплетениях биоткани, в частности, кожной ткани, возможен также на измерении ее спектров отражения [см., например, [15, 60, 61] Этот метод реализуется двумя путями.

Широко распространен метод мониторинга степени оксигенации гемоглобина, основанный на измерении коэффициентов отражения кожи в ближней ИК области спектра.

В спектральной области 600-900 нм, известной как терапевтическое или диагностическое окно, основными хромофорами живых биотканей являются гемоглобин (Hb) и его оксигенированная форма (HbO₂). Эти две формы имеют хорошо известные различия в спектрах поглощения (рис. 41). С другой стороны, в этом спектральном диапазоне коэффициент рассеяния μ'_s мало меняется с изменением длины волны.

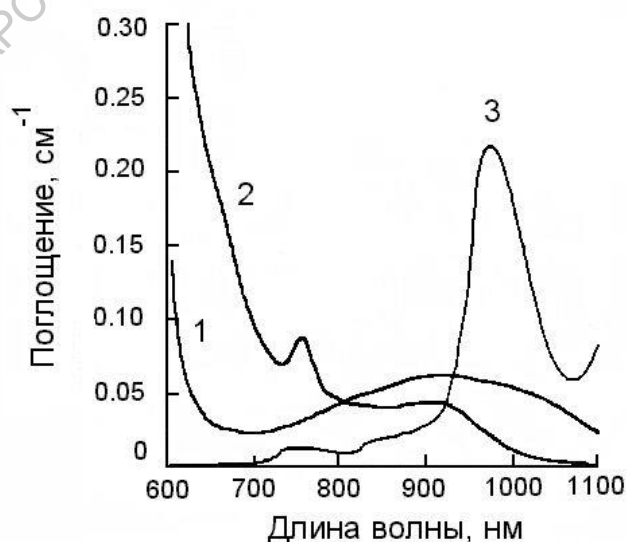


Рис. 41. Спектры поглощения оксигемоглобина (1), деоксигемоглобина (2) и воды (3); концентрация гемоглобина 210 мкМ в воде [43]

Эти два факта дают возможность определить степень оксигенации гемоглобина в биотканях используя абсолютные значения коэффициента поглощения μ_a , измеренного на двух длинах волн в ближней ИК области спектра, либо отношения этих коэффициентов поглощения (метод двух-волновой оксиметрии).

Степень оксигенации гемоглобина крови в биотканях определяется концентрациями деоксигемоглобина, c_{deoxy} , и оксигемоглобина, c_{oxy} .

$$Y = \frac{c_{oxy}}{c_{oxy} + c_{deoxy}}. \quad (23)$$

Коэффициенты поглощения биоткани на двух длинах волн (λ_1 и λ_2) можно представить в виде

$$\mu_a(\lambda_1) = \varepsilon_{deoxy}^{\lambda_1} c_{deoxy} + \varepsilon_{oxy}^{\lambda_1} c_{oxy}, \quad (24)$$

$$\mu_a(\lambda_2) = \varepsilon_{deoxy}^{\lambda_2} c_{deoxy} + \varepsilon_{oxy}^{\lambda_2} c_{oxy},$$

где ε - коэффициент экстинкции ($\text{см}^{-1}\text{М}^{-1}$).

Из (23) с учетом (24) получим соотношение для определения степени оксигенации:

$$Y = \frac{\varepsilon_{deoxy}^{\lambda_1} \mu_a(\lambda_2) - \mu_a(\lambda_1) \varepsilon_{deoxy}^{\lambda_2}}{\mu_a(\lambda_1) (\varepsilon_{oxy}^{\lambda_2} - \varepsilon_{deoxy}^{\lambda_2}) - (\varepsilon_{oxy}^{\lambda_1} - \varepsilon_{deoxy}^{\lambda_1}) \mu_a(\lambda_2)}. \quad (25)$$

Степень оксигенации Y может быть определена согласно выражению (25), если значения коэффициента экстинкции для двух форм гемоглобина на выбранных длинах волн известны *a priori*.

Другой метод основан на измерении оптической плотности биоткани. Если измерения производятся с помощью метода пространственно разрешенной отражательной спектроскопии [60], когда подводимый к коже излучение и собирающий рассеянное кожей излучение световоды разделены промежутком, то оптическая плотность кожи может быть определена как

$$OD = \frac{\mu_a L}{2.3} - \log(\alpha), \quad (26)$$

где L – оптическая длина пути света в коже, а α – неизвестный фактор, зависящий от эффективности обратного рассеяния света кожей, геометрии измерения коэффициента отражения (прежде всего, расстояния между источником и детектором) и длины волны, на которой производятся измерения R_d .

В клинических системах мониторинга степени оксигенации обычно используются длины волн 660, 805 и 940 нм, и в методе двухволновой оксиметрии измеряется отношение OD на этих длинах волн. Измерения выполняются в предположении независимости α и L от концентрации хромофоров. В этом случае соотношение (26) дает простое выражение для расчета относительного изменения концентраций окси- и деоксигемоглобина и, соответственно, относительное изменение степени оксигенации гемоглобина. Абсолютное определение степени оксигенации затруднительно прежде всего из-за многократности рассеяния света в коже (неопределенности L).

Поэтому другой путь реализации метода основан на введении дифференциального фактора наиболее вероятной оптической длины пути света в рассеивающей среде, differential pathlength factor (DPF). В рассеивающей среде распределение света между источником и детектором носит характерный “бананообразный” вид, и наиболее вероятный оптический путь света от источника к детектору длиннее геометрического расстояния между источником и детектором на поверхности кожи, причем, очевидно, его длина зависит от поглощающих и рассеивающих свойств среды. Фактор DPF вводится для компенсации увеличения оптического пути света из-за многократности его рассеяния.

В этом методе пространственно разрешенная оптическая плотность кожи связана с его коэффициентом поглощения μ_a простым линейным уравнением:

$$OD = \mu_a \sigma r_{sd} + G, \quad (27)$$

где r_{sd} – расстояние между источником и детектором, σ – фактор DPF . Предполагается, что G определяется только коэффициентом рассеяния μ_s и геометрическими факторами и либо не зависит от длины волны λ , либо зависит от нее линейно. Коэффициент поглощения μ_a можно представить как сумму парциальных вкладов поглощения хромофоров кожи, которые, в свою очередь, определяются их концентрациями c_i и коэффициентами экстинкции ε_i .

Если в оптическую плотность кожи дают вклад N хромофоров (главным образом, гемоглобина, меланин, вода (см. рис. 41)), то уравнение (27) может быть записано в виде:

$$OD(\lambda) = a + b\lambda + \sum_{i=1}^N c_i \varepsilon_i(\lambda). \quad (28)$$

Измерения OD на минимум $N+3$ длинах волн дают возможность, используя стандартные методы многолинейной регрессии, определить значения a , b и c_i .

Простой метод определения оптических свойств и степени оксигенации гемоглобина биоткани основан на измерении наклона зависимости $OD(r_{sd})$. Следуя диффузионному приближению, в случае, когда расстояние между источником и детектором r_{sd} значительно превышает среднюю транспортную длину l_t ($r_{sd} \approx 20 \div 40 l_t$), зависимость $\log[r_{sd}^2 R_d(r_{sd})]$ от расстояния между источником и детектором имеет линейный характер [62]:

$$\log[r_{sd}^2 R_d(r_{sd}, r_{sd}^0)] = -\frac{\mu_{eff}}{2.3} r_{sd} - \log(a\mu_t') + \log\left(\mu_{eff} + \frac{1}{r_{sd}^0}\right), \quad (29)$$

где r_{sd}^0 - среднее расстояние между источником и детектором в диапазоне изменения r_{sd} , в котором проводятся измерения; $\mu_t' = \mu_a + \mu_s'$; $\mu_{eff} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu_s')}$; $\mu_s' = (1-g)\mu_s$, a предполагается независимой от r_{sd} .

Наклон зависимости $\log[r_{sd}^2 R_d(r_{sd})]$ от расстояния r_{sd} определяет величину μ_{eff} , то есть произведение величин μ_a и μ_t' . В области длин волн 600-900 нм коэффициент рассеяния μ_s' мало меняется с изменением длины волны. Тогда, согласно двухволновому методу [62], имеем:

$$\frac{slope(\lambda_1)}{slope(\lambda_2)} = \frac{\mu_{eff}(\lambda_1)}{\mu_{eff}(\lambda_2)} \approx \sqrt{\frac{\mu_a(\lambda_1)}{\mu_a(\lambda_2)}}. \quad (30)$$

Уравнение (30) дает возможность определения степени оксигенации гемоглобина независимо от интенсивности падающего на биоткань излучения.

На практике значения μ_{eff} определяются из наклона зависимости от r_{sd} значений OD исследуемого образца, полученных в результате измерений коэффициентов отражения этого образца и образца сравнения с известными оптическими свойствами:

$$\begin{aligned}
 OD &= \log \left[\frac{R_d^{cal}(r_{sd}, r_{sd}^0)}{R_d(r_{sd}, r_{sd}^0)} \right] = \\
 &= \frac{\mu_{eff} - \mu_{eff}^{cal}}{2.3} r_{sd} + \log \left[\frac{\mu_t'}{\mu_t^{cal}} \right] + \log \left[\frac{\mu_{eff}^{cal} + (1/r_{sd}^0)}{\mu_{eff} + (1/r_{sd}^0)} \right].
 \end{aligned} \tag{31}$$

При увеличении концентрации оксигенированного гемоглобина суммарный коэффициент экстинкции на длине волны 760 нм уменьшается, а на 850 нм увеличивается (см. рис. 41). Так как μ_a = [коэффициент экстинкции] x [количество крови], то при условии неизменности в процессе мониторинга степени оксигенации уменьшение (увеличение) коэффициента экстинкции ведет к уменьшению (увеличению) μ_a , а следовательно, и к уменьшению (увеличению) μ_{eff} , если рассеивающие свойства среды остаются неизменными (см. (30)).

Рисунок 42а демонстрирует изменения измеренных на длинах волн 760 нм и 850 нм μ_{eff} модельного образца в процессе оксигенации и деоксигенации содержащейся в нем крови. Соответствующие изменения степени оксигенации приведены на рис. 42б.

В видимом диапазоне спектра количественная оценка содержания хромофоров ($c_i d_j$) в коже возможна с помощью соотношения (9), если известны *a priori* значения ϵ_{ext} . Для этого необходимы *in vivo* измерения поглощения меланина, каротина, оксигенированного и деоксигенированного гемоглобина и диффузного отражения коллагена ($R_{d,4}$).

Измерения OD кожи на нескольких длинах волн и применение стандартной процедуры регрессивного анализа упрощает количественное определение $c_2 d_3$, $c_3 d_3$ и степени оксигенации гемоглобина.

Подобный метод был применен при *in vivo* исследованиях изменений содержания оксигемоглобина и деоксигемоглобина в коже после УФ облучения и кожи с воспалительными процессами.

Процедура определения степени оксигенации гемоглобина включала два этапа. На первом этапе путем подбора из измеренного в диапазоне длин волн 620-720 нм спектра оптической плотности кожи исключался вклад меланина. На втором этапе осуществлялся подходящий выбор концентраций HbO_2 и Hb , при котором измеренные в трех точках (560, 577 и 630 нм) значения OD совпадали с рассчитанными с учетом стандартных спектров поглощения HbO_2 и Hb значениями OD кожи без меланина.

На рисунке 43а показаны динамика изменения спектра поглощения крови с добавленным фотосенсибилизатором в процессе лазерной фотодинамической терапии: вместо двух явно выраженных максимумов, соответствующих α - и β - полосам поглощения оксигемоглобина, появляется

одна более широкая полоса поглощения деоксигемоглобина. Видны изобестические точки, в которых поглощение крови не зависит от степени ее оксигенации.

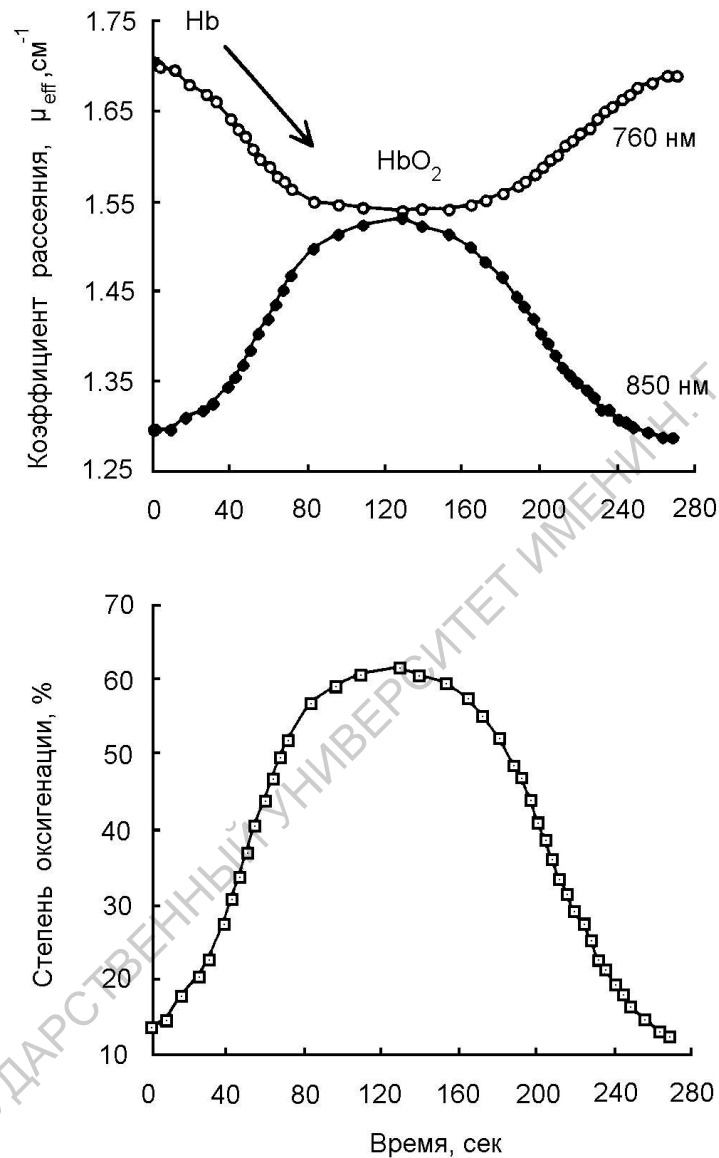


Рис. 42. Изменения эффективного коэффициента рассеяния раствора крови, измеренные на двух длинах волн в процессе цикла деокси → окси → деоксигенации гемоглобина (а) и соответствующие изменения в степени оксигенации модельного образца (б) [62]

Степень оксигенации может быть определена по значениям коэффициента поглощения на длинах волн, соответствующих максимумам поглощения оксигемоглобина и гемоглобина и изобестическим точкам.

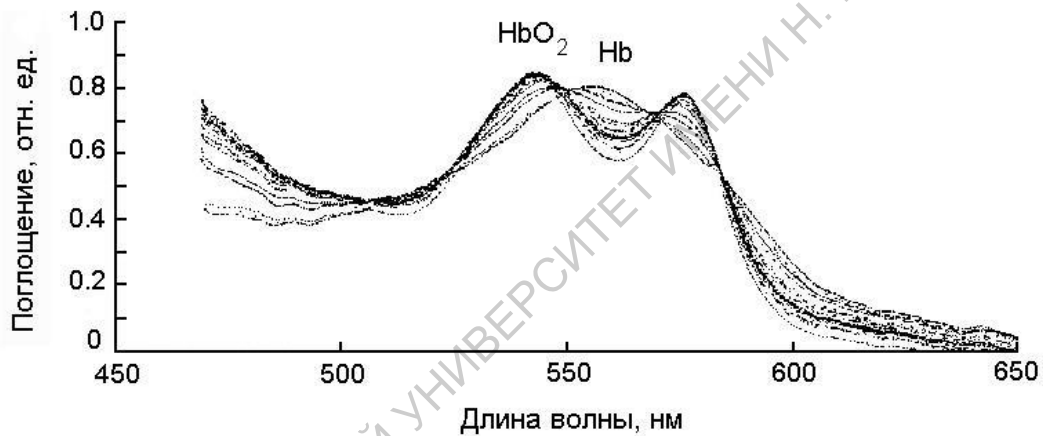
В частности, Father и др. [42, 64] получили полуэмпирические соотношения для определения индексов гемоглобина (H) и степени его окси-

генации (Y) на основе измерений градиента спектра OD области 535-575 нм:

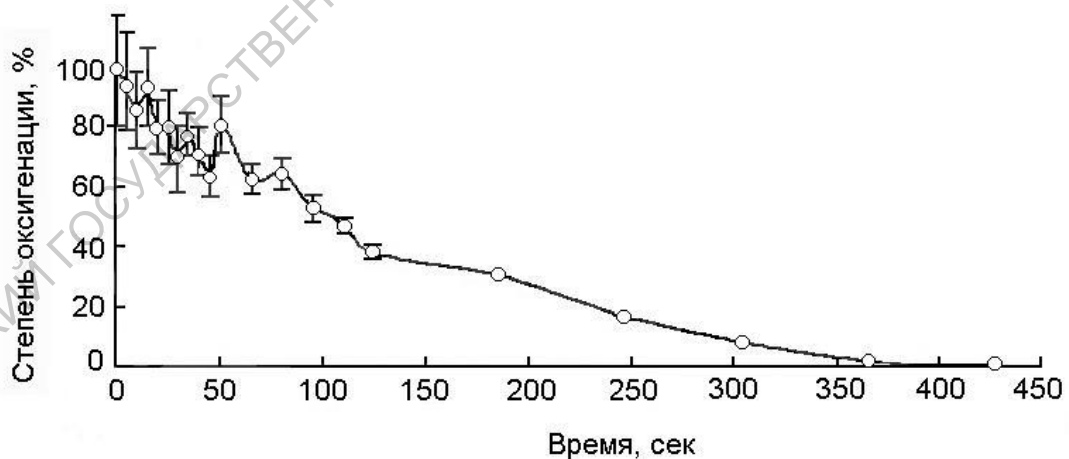
$$H = 100 \left[\frac{OD_{544} - OD_{527.5}}{16.5} - \frac{OD_{573} - OD_{544}}{29} \right]; \quad (32)$$

$$Y = \frac{5.1 \times 10^3}{H} \left[\frac{OD_{573} - OD_{558.5}}{14.5} - \frac{OD_{558.5} - OD_{544}}{14.5} \right] + 42, \quad (33)$$

где OD_λ - оптическая плотность кожи на длине волны λ [нм]. На рис. 43б приведено временное изменение степени оксигенации гемоглобина, рассчитанное по спектрам поглощения рис. 43а.



а



б

Рис. 43. Динамика изменения спектра поглощения крови с фотосенсибилизатором при ее лазерном облучении (а) и соответствующее временное изменение степени оксигенации (б) [63]

Обычно *in vivo* измеренные значения индекса гемоглобина не превышают 0.5. Рассчитанный согласно соотношению (32) индекс гемоглобина является функцией количества гемоглобина в папиллярной дерме. В предположении, что эта функция носит линейный характер и что *in vitro* модель соответствует *in vivo* оптическим свойствам кожи, из индекса гемоглобина H можно определить массу гемоглобина на единицу площади поверхности кожи [64]:

$$\text{Hemoglobin content} = H \times 3.8 \times 10^{-4} \text{ g cm}^{-2}$$

или

$$\text{Hemoglobin content} = H \times 2.3 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-2}.$$

(34)

In vitro эксперименты показывают, что точность определения степени оксигенации гемоглобина на основе отражательной спектроскопии достаточно велика, при этом индекс гемоглобина оказывается практически не чувствительным к изменениям в степени оксигенации.

Исследование эффективности фотозащитных композиций

Использование спектроскопических методов для изучения диффузии наносимых на кожу лекарственных и косметических препаратов представляет несомненный интерес для научной и практической дерматологии, прежде всего, из-за их неинвазивности, возможности выполнения большого количества измерений за короткий промежуток времени, высокой чувствительности и воспроизводимости результатов.

Целым направлением в дерматологии и косметологии является разработка специальных фотозащитных композиций в виде кремов, мазей, лосьонов и др., основные свойства которых (большое поглощение УФ излучения и большое пропускание излучения видимого диапазона) позволяют использовать их для защиты кожи от разрушительного воздействия на нее УФ излучения.

Обычно для оценки эффективности фотозащитных препаратов (ФП) используются отражательная спектроскопия и основанная на ней колориметрия (оценка цвета диффузно отраженного объектом белого света). Метод отражательной спектроскопии позволяет определять не только спектры поглощения ФП, но и в реальном масштабе времени анализировать динамику диффузии препаратов внутрь кожи, а также косвенно оценивать их характеристики путем анализа происходящих в коже изменений после ее облучения светом УФ-диапазона.

Сравнительно малая величина коэффициента отражения кожи в УФ-диапазоне (8-10%), обусловленная сильным поглощением и рассеянием в ней света этого диапазона, существенно снижают точность определения

оптических свойств ФП, даже при условии измерения спектров отражения кожи, свободных от автофлуоресценции, поэтому большинство исследователей используют для этих целей *in vitro* измерения.

Методика приготовления тонких образцов эпидермиса для оптических исследований и последующая обработка результатов измерений таит в себе немало трудностей, поэтому весьма популярным является способ оценки пропускания ФП, нанесенных на тонкие пленки. Несомненными преимуществами, в связи с этим, обладает технология спектроскопии поверхностных отрывов эпидермиса.

Однако на практике оптические свойства ФП, измеренные в *in vitro* и в *in vivo* условиях, сильно различаются. Поэтому другими широко распространенными методами оценки фотозащитных свойств композиций являются методы, основанные на визуальной оценке кожных эффектов, вызываемых УФ излучением до и после нанесения препарата на кожу, и измерении соответствующих доз облучения, вызывающих возникновение мгновенной или длительной эритемы, мгновенной или длительной пигментации, меланогенеза и др. Характерными для ФП значениями их пропускания света УФ-диапазона являются величины порядка 1 %, поэтому для реализации перечисленных выше методов возникают определенные трудности, связанные с большими временами (более семи часов) облучения кожи с нанесенным на нее ФП и опасностью повреждения кожи в случае исследования ФП с плохими защитными свойствами. Другим развивающимся направлением определения оптических свойств фотозащитных композиций является флуоресцентная спектроскопия кожи. Методы *in vivo* исследования кожи с помощью флуоресцентной спектроскопии можно разделить на две группы.

Одна из них - использование экзогенных флуоресцирующих красителей (дансил хлорид, акридиновый оранжевый, флуоресцеин и др.). В данных методах введенный в кожу экзогенный флуорофор используется в качестве «источника внутрикожного излучения» с известными спектральными характеристиками (спектром возбуждения и флуоресценции). Нанесимые на кожу ФП поглощают возбуждающее излучение, изменяя спектр и интенсивность флуоресценции введенных в кожу красителей. Результаты оценки солнцезащитного фактора (СЗФ) препарата с помощью таких методов оказались сравнимыми с традиционными биологическими методами. Вместе с тем, введенный краситель может влиять на скорость проникновения ФП в кожу, и, в свою очередь, ФП может влиять на время нахождения флуорофора в эпидермисе и его люминесцентные свойства. Поэтому точность измерений существенно зависит от их длительности: увеличение времени исследования увеличивает погрешность измерения.

Приведенную ниже методику оценки оптических свойств ФП можно отнести к другому направлению флуоресцентной спектроскопии - направлению, основанному на регистрации изменений *in vivo* АФ кожи [31, 65].

Для оценки поглощающих свойств фотозащитных препаратов вводится величина, носящая название солнцезащитного фактора (СЗФ) или эффективности солнцезащитных препаратов. Для расчета СЗФ в УФА-диапазоне длин волн (320-400 нм) принято использовать следующую формулу [66]:

$$SPF(A) = \frac{\sum_{320\text{нм}}^{400\text{нм}} (CIE_{\lambda} \times E_{\lambda})}{\sum_{320\text{нм}}^{400\text{нм}} (T_{\lambda} \times CIE_{\lambda} \times E_{\lambda})}, \quad (35)$$

где T_{λ} - коэффициент пропускания ФП на длине волны λ , CIE_{λ} - (CIE - Commission Internatinale de l'Éclairage – Международная комиссия по освещению) спектр повреждающего действия УФ излучения (спектр риска, приведенный на рис. 43), E_{λ} - спектральное распределение интенсивности солнечного излучения (или излучения, по спектру аналогичному солнечному в данном спектральном диапазоне).

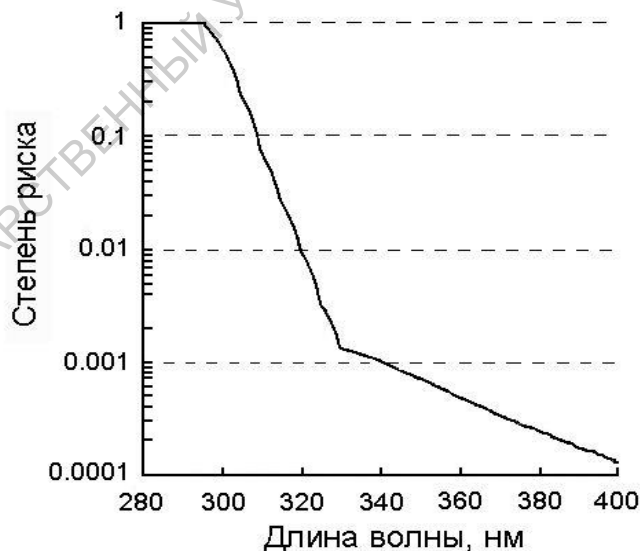


Рис. 43. Спектральная зависимость степени риска воздействия УФ излучения на кожу человека [67]

Из соотношения (35) видно, что задача определения СЗФ сводится к задаче измерения спектра пропускания ФП в УФА-диапазоне. Последний определяется по изменению интенсивности АФ кожи до и после применения ФП.

Согласно изложенной выше простой модели кожи для анализа ее АФ интенсивность флуоресценции нормальной кожи и кожи с нанесенным на нее ФП может быть выражена в следующем виде:

$$I_{FL}^{NS}(\lambda_{FL}) = I_0(\lambda_{EX}) T_1^{N,S}(\lambda_{EX}) T_2^{N,S}(\lambda_{EX}) T_3^{N,S}(\lambda_{EX}) \times \eta T_3^{N,S}(\lambda_{FL}) T_2^{N,S}(\lambda_{FL}) T_1^{N,S}(\lambda_{FL}), \quad (36)$$

где $I_0(\lambda_{EX})$ – интенсивность УФ излучения, падающего на поверхность кожи; T_1 , T_2 и T_3 – пропускание соответствующих слоев кожи на длинах волн возбуждения и флуоресценции (см. рис. 34; η – квантовый выход флуоресценции коллагена; и индексы N и S относятся к нормальной коже и коже с ФП.

Предполагая, что диффузия ФП имеет место только в эпидермисе (слой 1), имеем $T_2^N = T_2^S$ и $T_3^N = T_3^S$. В этом случае уменьшение отношение интенсивностей АФ кожи с ФП и нормальной кожи определяется пропусканием эпидермиса в видимом диапазоне спектра:

$$\frac{I_{FL}^S}{I_{FL}^N} = \frac{T_1^S(\lambda_{EX}) \times T_1^S(\lambda_{FL})}{T_1^N(\lambda_{EX}) \times T_1^N(\lambda_{FL})}. \quad (37)$$

Пропускание эпидермиса $T_1^{N,S}(\lambda_{FL})$ в видимом диапазоне спектра может быть определено из *in vivo* спектров отражения кожи.

Согласно простой модели кожи для анализа спектров отражения коэффициенты отражения нормальной кожи (R^N) и кожи с ФП (R^S) определяются следующим образом:

$$R^{N,S}(\lambda_{FL}) = \left(T_1^{N,S}(\lambda_{FL}) \right)^2 \left(T_2^{N,S}(\lambda_{FL}) \right)^2 \left(T_3^{N,S}(\lambda_{FL}) \right)^2 R, \quad (38)$$

где R – коэффициент отражения коллагена дермы.

Предполагая, что ФП изменяет оптические свойства только первого слоя, из (38) получаем:

$$\frac{R^S(\lambda_{FL})}{R^N(\lambda_{FL})} = \left[\frac{T_1^S(\lambda_{FL})}{T_1^N(\lambda_{FL})} \right]^2. \quad (39)$$

Комбинируя (37) и (39), получим:

$$T(\lambda_{EX}) = \frac{T_1^S(\lambda_{EX})}{T_1^N(\lambda_{EX})} = \frac{I_{FL}^S(\lambda_{FL}) / I_{FL}^N(\lambda_{FL})}{\sqrt{R^S(\lambda_{FL}) / R^N(\lambda_{FL})}}. \quad (40)$$

Величина T определяет уменьшение пропускания эпидермиса при нанесении ФП, то есть является пропусканием фотозащитного препарата, а величина $1/T$ - спектральным СЗФ фотозащитного препарата на длине волны λ_{EX} .

Предложенный алгоритм, основанный на измерении интенсивности АФ кожи и ее коэффициента отражения до и после нанесения ФП, позволяет определить величину $T(\lambda_{EX})$ для разных длин волн λ_{EX} спектра возбуждения флуоресценции коллагена (УФА-диапазон).

В таблице приведены рассчитанные согласно приведенной методике СЗФ ряда коммерческих ФП.

СЗФ ряда коммерческих ФП

Продукт	Торговое название ФП	Фирма-производитель	СЗФ фирмы-производителя	Расчетный СЗФ
а	pH ₅ -Eucerin (лосьон)	Beiersdorf AG (ФРГ)	(15)*	5,4 ± 0,54
б	Prido Plus (молочко)	Hermal (ФРГ)	9	7,3 ± 0,82
в	Contralum Ultra (крем)	Hermal (ФРГ)	7	6,2 ± 0,73
г	Anthelum "S" (крем)	La Roche-Posay (Франция)	10	8,9 ± 1,2
д	Ecran Total (лосьон)	RoC (Франция)	15	11,2 ± 2,1

* - Фирмой-производителем указан только СЗФ в УФВ-диапазоне.

Некоторое расхождение между полученными значениями СЗФ и значениями СЗФ, приведенными фирмами-производителями, обусловлено разными условиями определения СЗФ (*in vitro* и *in vivo*). При нанесении ФП на образец эпидермиса *ex vivo* диффузия фотозащитной композиции в эпидермисе крайне мала или не происходит вовсе. В условиях *in vivo* ФП (в виде лосьона, крема или пасты и т.п.) постепенно проникая в эпидермис не только поглощает и/или отражает падающий на поверхность кожи свет, но и приводит к снижению рассеяния уменьшения эффективного показателя преломления. Коэффициент преломления рогового слоя приблизительно равен 1,5, а коэффициент преломления минеральных масел, входящих в состав ФП, варьирует от 1,46 до 1,48. Воздействие на кожу мине-

рального масла приводит к снижению отражения и, соответственно, увеличению пропускания как падающего света, так и излучения флуоресценции.

Принимая во внимание вышесказанное, может быть не вполне корректно называть измеренные с помощью предложенной методики спектры “*in vivo* пропусканием ФП”. Если быть более точным, это “*in vivo* пропускание ФП, нанесенного на кожу”.

Результаты определения СЗФ с помощью предложенного метода следует с осторожностью сравнивать с традиционной методикой, базирующейся на определении минимальной эритемной дозы (в нашем случае - СЗФ, указанным фирмами - производителями ФП). Считается, что в основе замедленной эритемы лежат два механизма: 1) расширение кровеносных сосудов, вследствие прямого воздействия УФ излучения; и 2) диффузия вазоактивных субстанций, освобождающихся в эпидермисе. Поскольку предложенная методика оценивает степень блокирования УФА излучения с помощью ФП в отношении возбуждения флуоресценции коллагена и не дает описания распределения света в эпидермисе, то было бы более корректным сравнивать наши результаты с данными СЗФ, определяемым при выборе в качестве конечной точки мгновенную эритему. Мгновенная эритема, называемая также “тепловой эритемой”, обусловлена исключительно преобразованием световой энергии в тепловую на уровне кровеносных сосудов папиллярной дермы.

На рисунке 44 приведены рассчитанные с помощью предложенного алгоритма *in vivo* спектры пропускания ФП (отмеченные в Таблице как *a*, *б* и *в*) через 30 минут после нанесения на кожу.

Рассматриваемый метод позволяет исследовать временную динамику изменения СЗФ после нанесения ФП на кожу. Динамика удобно анализировалась путем сравнения интегрального пропускания T нанесенного на кожу ФП, определенного следующим образом:

$$T = \sum_{320 \text{ нм}}^{400 \text{ нм}} T(\lambda_{EX}), \quad T(\lambda_{EX}) = \frac{I_{FL}^S(\lambda_{EX})}{I_{FL}^N(\lambda_{EX})}. \quad (41)$$

На рисунке 45 приведена временная динамика T ($\lambda_{EX} = 320-400$ нм, $\lambda_{EM} = 500$ нм) для некоторых ФП. Для всех изученных ФП максимум паде-ния флуоресценции (т.е. максимум защиты кожи) наблюдается через час после нанесения. Через 6 часов интенсивность АФ кожи увеличивается, что соответствует снижению фотозащитного эффекта препарата.

К факторам, определяющим границы применимости метода, можно отнести спектральную зависимость квантового выхода флуоресценции коллагена, спектральную зависимость поглощения УФА возбуждающего излучения хромофорами эпидермиса и наличие в роговом слое флуорофоров, вносящих дополнительный вклад в общую АФ кожи.

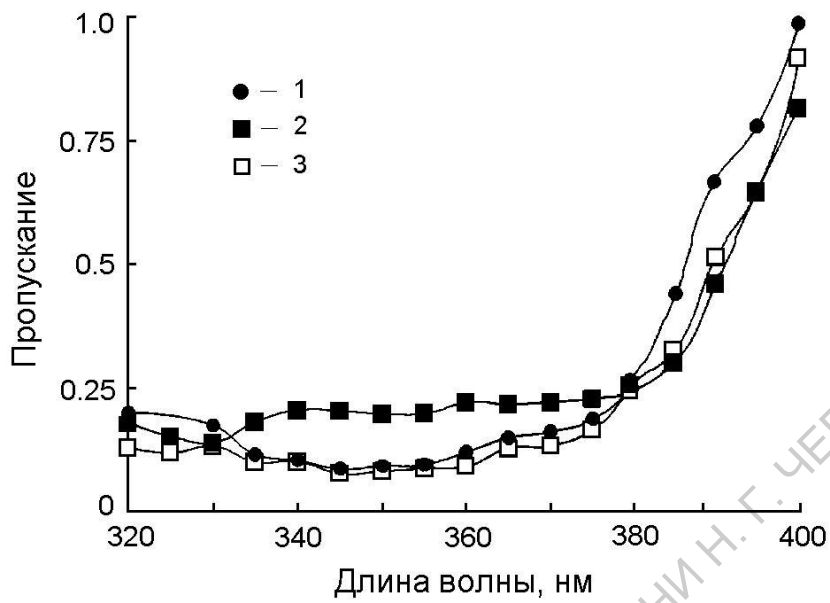


Рис. 44. *In vivo* спектры пропускания тестируемых ФП через 20 мин после нанесения на кожу:
1 - Contralum Ultra; 2 - pH₅-Eucerin; 3 - Irido Plus

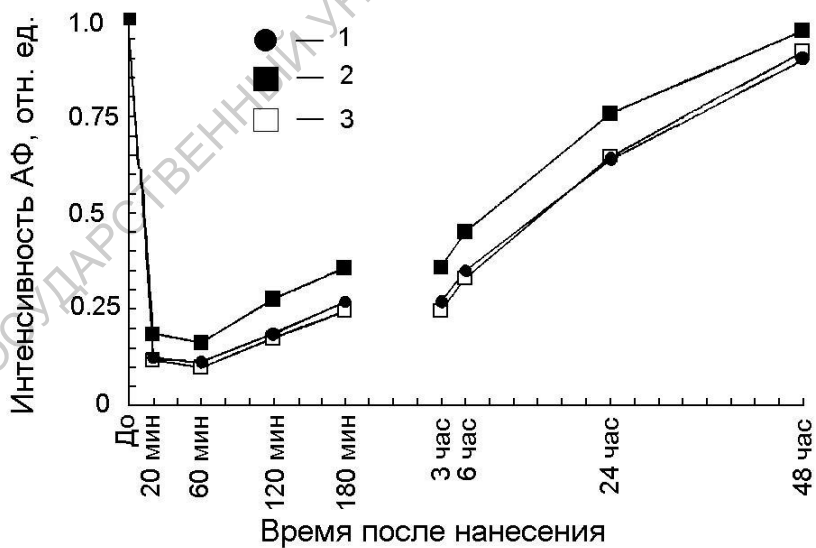


Рис. 45. Временное изменение интенсивности АФ кожи после нанесения ФП: 1 - Contralum Ultra; 2 - pH₅-Eucerin; 3 - Irido Plus; $\lambda_{FL} = 500$ нм

Коррекция спектров флуоресценции на эффект внутреннего поглощения

В отражательной спектроскопии информация об изменениях в морфо-функциональном состоянии кожи может быть получена при сравнении спектров отражения нормальной кожи и кожи с патологией.

Диагностика состояния кожи с помощью флуоресцентной спектроскопии основана на идентификации флуорофоров, ответственных за аномальную флуоресценцию патологической биоткани, или на детектировании аномального распределения эндогенных флуорофоров в коже.

Идентификация флуорофоров требует коррекции спектров АФ биоткани на поглощающие и рассеивающие свойства среды, необходимость которой очевидна из представленного выше рис. 24.

Привлечение спектров отражения кожи для коррекции спектров ее АФ позволяет правильно интерпретировать результаты измерений АФ кожи.

В качестве первого приближения фактором коррекции может быть использован спектр R_d [68-70]: скорректированный спектр флуоресценции определяется путем деления измеренного спектра на фактор коррекции. На рисунке 46 приведены измеренный и скорректированный указанным способом спектры АФ кожи. Видно, что восстановленный спектр АФ кожи практически идентичен спектру флуоресценции коллагена.

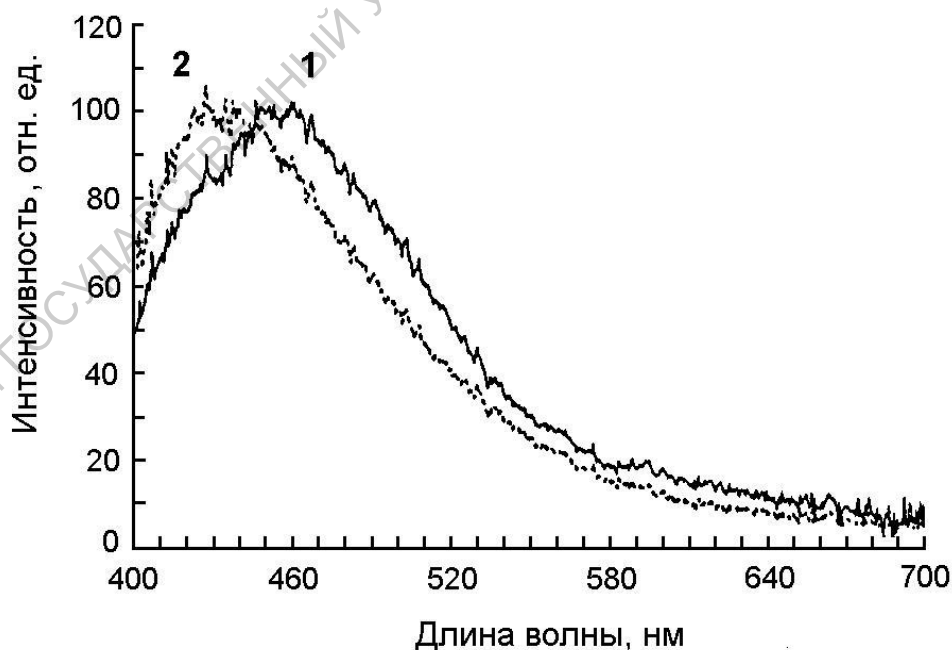


Рис. 46. Измеренный (1) и скорректированный (2) спектры АФ кожи ($\lambda_{EX} = 365$ нм) [70]

Как следует из предыдущего раздела, в качестве фактора коррекции возможно использование величины $\sqrt{R_d}$.

4. ЦВЕТОВОЕ ВОСПРИЯТИЕ ОТРАЖЕННОГО КОЖЕЙ БЕЛОГО СВЕТА И АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ КОЖИ

Кожа является уникальным органом, который доступен непосредственному визуальному осмотру. Основной акцент в таких осмотрах направлен на анализ изменения цвета кожи и классификацию морфологических проявлений ("текстуру" кожной поверхности), вызванных различными процессами, происходящими в коже. Визуальное обследование кожной морфологии является опорой клинической дерматологии, однако оно является чисто субъективным процессом, и его результаты сильно зависят от опыта и квалификации дерматолога.

Объективность оценки восприятия цвета кожи и особенностей ее поверхностной и субповерхностной структур основана на физических принципах формирования и оценки воспринимаемого цвета кожи, воплощенных в колориметрических методах измерения цвета и компьютерных методах цифровой визуализации кожной поверхности.

Цветовой анализ спектров отражения и флуоресценции кожи

Воспринимаемый цвет кожи зависит от многих факторов, включающих ее структуру и компонентный состав, характеристики источника освещения кожи и приемника (глаз человека, фото- и видеокамера, фотопленка) излучения, с помощью которого воспринимается цвет кожи [71-73].

Кожа характеризуется: (1) своей поверхностной структурой, в частности, поверхностными чешуйками, морщинами и волосяным покровом (цветом и текстурой); (2) концентрацией и пространственным распределением хромофоров в *stratum corneum* (меланин), в эпидермисе (меланин) и дерме (гемоглобин, меланин, билирубин и т. д.); (3) концентрацией и пространственным распределением рассеивателей в *stratum corneum* (меланин), эпидермисе (меланин, клеточные структуры) и дерме (коллаген, меланин в макрофагах, эритроциты т. д.).

Отраженный на границе раздела воздух/*stratum corneum*, интенсивность которого составляет около 5% интенсивности падающего на кожу излучения, имеет спектральные характеристики источника освещения, так как отражение происходит до того, как свет проникает внутрь кожи. Увеличение чешуйчатости поверхности кожи, возникающее при таких патологиях, как псориаз, приводит к многократным отражениям света от чешуек

и общему увеличению интенсивности зеркального отраженного компонента. Это приводит к белесому оттенку участков кожи с увеличенным количеством чешуек. При таких патологиях происходит уменьшение интенсивности проникающего в кожу света, что затрудняет определение того, что лежит под чешуйками [73].

Пронизывающие *stratum corneum* волосы поглощают и рассеивают падающий свет, затрудняя детальную оценку цвета кожи. К примеру, наличие очень темных волос на мало пигментированной коже приводят к тому, что кожа кажется более темной, чем она есть на самом деле.

Stratum corneum представляет собой тонкий (порядка 10 мкм) слой омертвевших кератиноцитов, содержащий меланиновую пыль (диаметром менее 0.1 мкм). Иначе говоря, он похож на прозрачную пластиковую обертку для светлой кожи и имеет слегка желтоватый оттенок для темной кожи.

Основным хромофором эпидермиса в видимом диапазоне спектра является меланин в различных стадиях своей полимеризации. Пространственное распределение меланиноцитов зависит от диапазона УФ излучения, которое стимулировало их образование: УФА излучение увеличивает образование меланосом в кератиноцитах и меланиноцитах в базальной мембране, тогда как УФВ излучение способствует образованию меланосом во всем объеме эпидермиса. Цвет этих пигментов в видимом диапазоне спектра несколько различен: УФВ пигмент более коричневый, а УФА - более серый.

Таким образом, цвет нормальной кожи существенно зависит от содержания эпидермального меланина. Привлекая для объяснения цвета кожи только меланиновую пигментацию, можно понять вариации цвета кожи от слабого желтого до темного черного. В эпидермисе происходит рассеяние света в видимом диапазоне, но хотя эпидермис значительно толще *stratum corneum* и в нем содержится больше рассеивателей, рассеяние мало влияет на цветовое восприятие кожи.

Дерма является сильно рассеивающим компонентом кожи, содержащим несколько хромофоров, существенно влияющих на цвет кожи. Толщина дермы (1-3 мм) значительно превосходит толщину эпидермиса (100-150 мкм), поэтому большая часть обратно рассеянного кожей излучения формируется в дерме. Спектральный состав этого излучения является важным фактором, определяющим цвет кожи.

Рассеивающие свойства дермы в видимом диапазоне спектра определяются коллагеновыми волокнами: бескровная дерма *ex vivo* на вид очень белая.

Основным хромофором дермы нормальной кожи человека является гемоглобин, имеющий независимо от формы отчетливый максимум поглощения в видимой области спектра. Гемоглобин имеет неоднородное распределение по объему дермы, проявляясь в больших концентрациях

только в определенных объемах дермы (кровеносных сосудах). Наблюдаемый красноватый оттенок кожи обусловлен поглощением прошедшего в дерму света гемоглобином в капиллярах верхнего поверхностного артериального и венозного сплетения.

Внешний вид и цветовое восприятие дермы зависит от условий наблюдения. Если кожу рассмотреть под большим увеличением (порядка $100\times$) устранив поверхностное отражение, то можно отчетливо наблюдать капиллярные сосуды. Визуализируются капилляры при их освещении светом, идущим из глубины дермы к поверхности кожи; освещение их светом, идущим внутрь дермы, мало влияет на визуализацию капилляров, так как этот свет диффузно рассеивается в дерме. При этом изменяется воспринимаемый цвет дермы: дерма приобретает бледно розовый оттенок.

Наглядно дерму с капиллярами можно представить как "сито": в сильно рассеивающую и слабо поглощающую среду помещаются сильно поглощающие эритроциты (отверстия в "сите"), имеющие ярко красный цвет.

Нормальные капиллярные сосуды обеспечивают перемещение эритроцитов в коже, и чем больше тканям требуется кислорода, тем больше сосудов вовлекаются в перенос эритроцитов, что проявляется в большем покраснении кожи - эритеме кожи. Эритема является результатом увеличения размеров кровеносных капилляров и увеличения потока крови через каждый капилляр. При псориазе капилляры становятся крупными и извилистыми, что делает участок псориатической кожи достаточно твердым. Капилляры в таких областях всегда хорошо выражены и имеют интенсивный темно красный цвет.

Поверхностное венозное и артериальное сплетение кровеносных сосудов обычно не проявляется в нормальной коже человека. Восприятие венозных сосудов, лежащих выше к поверхности кожи, можно обеспечить наложением стягивающего жгута. Крупные вены видны через кожу и имеют темно голубую окраску.

Есть несколько точек зрения, объясняющих этот голубой цвет. Одна основывается на предположении, что голубой цвет вен происходит из-за Релеевского рассеяния света при его распространении от вены к поверхности кожи (аналогично объяснению голубого цвета неба). Другая модель вовлекает в рассмотрение субъективность восприятия цвета человеком, когда воспринимаемый цвет объекта зависит от цвета окружающей области [74, 75].

В спектральной области свыше 620 нм помимо слабого поглощения меланина на цвет кожи определенное влияние оказывает вода, являющаяся доминирующим хромофором в этой спектральной области (максимум поглощения кожи вблизи 760 нм обусловлен наличием в ней воды) [73]. Это ослабление красного света вызывает голубоватый оттенок кожи типа I.

Голубой оттенок кожи может быть вызван другими причинами. Иногда при патологиях кожи в нижней части дермы находится слой, сильно пигментированный меланином, (дермальная пигментация, пигментация *nevus* и др.). Лежащий выше него слой нормальной дермы имеет относительно небольшую оптическую толщину. Поэтому красный свет проникает в дерму и поглощается в слое с высоким содержанием меланина, в то время как свет коротковолновой части видимого диапазона спектра не проникает столь глубоко, рассеивается в верхней части дермы и выходит из кожи, определяя ее голубую окраску.

Способы измерения цвета, составляющие основу колориметрии, обычно принято разделять на три группы: спектральные (с последующим расчетом координат цвета), фотоэлектрические и визуальные [76].

Традиционно цвет кожи определяется по спектральному составу отраженного кожей излучения стандартного источника белого света, спектр излучения которого близок спектру излучения солнца. В целях минимизации зеркального отражения от *stratum corneum* источник располагаемого под фиксированным углом относительно исследуемой области поверхности кожи.

Альтернативным методом является спектральный метод определения цвета АФ кожи.

В колориметрической системе МКО1931(XYZ), принятой МКО (Международная комиссия по освещению) в 1931г. (система CIE1931(Yxy)), цвет диффузно отраженного кожей белого света, имеющего спектральное распределение $R_d(\lambda)$, рассчитывается следующим образом [48].

Сначала рассчитываются три координаты цвета согласно приведенным ниже соотношениям:

$$\begin{aligned}
 X &= \sum_{380\text{нм}}^{780\text{нм}} R_d(\lambda_i) \bar{x}(\lambda_i) \Delta\lambda; \\
 Y &= \sum_{380\text{нм}}^{780\text{нм}} R_d(\lambda_i) \bar{y}(\lambda_i) \Delta\lambda; \\
 Z &= \sum_{380\text{нм}}^{780\text{нм}} R_d(\lambda_i) \bar{z}(\lambda_i) \Delta\lambda,
 \end{aligned}
 \tag{42}$$

где $\bar{x}(\lambda_i)$, $\bar{y}(\lambda_i)$, $\bar{z}(\lambda_i)$ - удельные координаты цвета монохроматического излучения на длине волны λ_i , средней в интервале $\Delta\lambda$ ($\Delta\lambda = 5$ нм). Спектральные зависимости удельных координат цвета максимально приближе-

ны к чувствительности трех различных световых рецепторов сетчатки глаза человека (рис. 47).

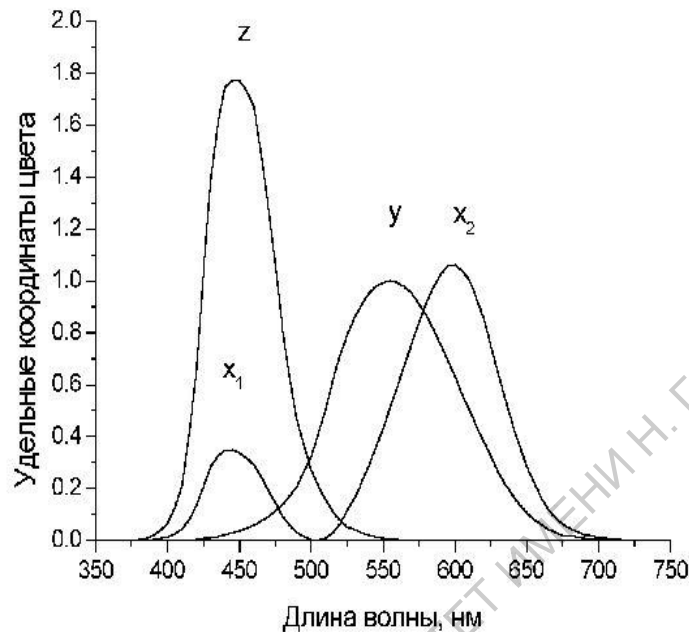


Рис. 47. Спектральные распределения чувствительности стандартного (по МКО) колориметрического наблюдателя. Добавление кривой $x_1(\lambda)$ необходимо для переноса цветового треугольника системы XYZ в положительный квадрант координатной системы [76]

Координата цвета Y определяет яркость цвета (в процентном отношении к яркости цвета белого света, диффузно отраженного от стандартного отражающего объекта (типа $BaSO_4$), принятой за 100%).

Цветовые координаты X, Y, Z определяют две координаты цветности x, y :

$$x = \frac{X}{X + Y + Z},$$

$$y = \frac{Y}{X + Y + Z}.$$
(43)

Координаты цветности x, y позволяют определить цвет (цветность) отраженного кожей белого света в виде точки на диаграмме цветности (x, y) , но не позволяют количественно оценить цветовое различие двух участков кожи или изменение цвета кожи в результате тех или иных воздействий. Это является следствием того, что в колориметрической системе МКО1931(Yxy) равные расстояния между двумя точками по разным направлениям на диаграмме цветности не соответствуют равным цветовым различиям, воспринимаемым глазом человека.

Два световых потока, характеризующиеся разными цветовыми координатами, воспринимается глазом по-разному, если разница в цвете больше порога цветоразличия (порогового цветового контраста, цветового порога) [76]. Количественно цветовое различие между двумя цветами (естественно, сверхпороговое различие) определяется величиной, выраженной минимальным числом цветовых порогов и называемой цветовым контрастом. В цветовом пространстве системы МКО1931(Y_{xy}) кратчайший по числу порогов путь не является кратчайшим по расстоянию между точками на диаграмме цветности.

Этот недостаток устранен в равноконтрастных системах, в частности, в равноконтрастной системе МКО1976($L^*a^*b^*$). В этой системе цвет представляется в виде вектора в пространстве, где параметры L^* , a^* и b^* образуют декартову систему координат [72, 76] (рис. 48):

$$\begin{aligned} L^* &= 116 \left(\frac{Y}{Y_0} \right)^{1/3} - 16 ; \\ a^* &= 500 \left[\left(\frac{X}{X_0} \right)^{1/3} - \left(\frac{Y}{Y_0} \right)^{1/3} \right] ; \\ b^* &= 200 \left[\left(\frac{Y}{Y_0} \right)^{1/3} - \left(\frac{Z}{Z_0} \right)^{1/3} \right] . \end{aligned} \quad (44)$$

Здесь X_0 , Y_0 , Z_0 - координаты цвета стандартного источника белого цвета C (по классификации МКО); $Y_0 = 100$. Соотношения (48) применимы при $X/X_0 > 0.008856$, $Y/Y_0 > 0.008856$, $Z/Z_0 > 0.008856$.

Параметр L^* определяет равноконтрастную шкалу светлоты ("психометрическую светлость", относительную яркость, "градацию серого" цвета). Параметры a^* и b^* являются координатами цветности (a^* меняется от зеленого цвета к красному, b^* - от синего к желтому). Они определяют основной цвет (*hue*) и его насыщенность (*chroma*):

$$Hue = \arctan \left[\frac{b^*}{a^*} \right], \quad (45)$$

$$Chroma = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} .$$

Цветовое различие ΔE^* в системе МКО1976($L^*a^*b^*$) определяется как геометрическое расстояние между сравниваемыми цветами ($(L, a, b)_i$ и $(L, a, b)_j$) в пространстве ($L^*a^*b^*$) (см. рис. 48):

$$\Delta E_{ij}^* = \sqrt{(\Delta L_{ij}^*)^2 + (\Delta a_{ij}^*)^2 + (\Delta b_{ij}^*)^2}, \quad (46)$$

где $\Delta L_{ij}^* = L_i^* - L_j^*$, $\Delta a_{ij}^* = a_i^* - a_j^*$ и $\Delta b_{ij}^* = b_i^* - b_j^*$.

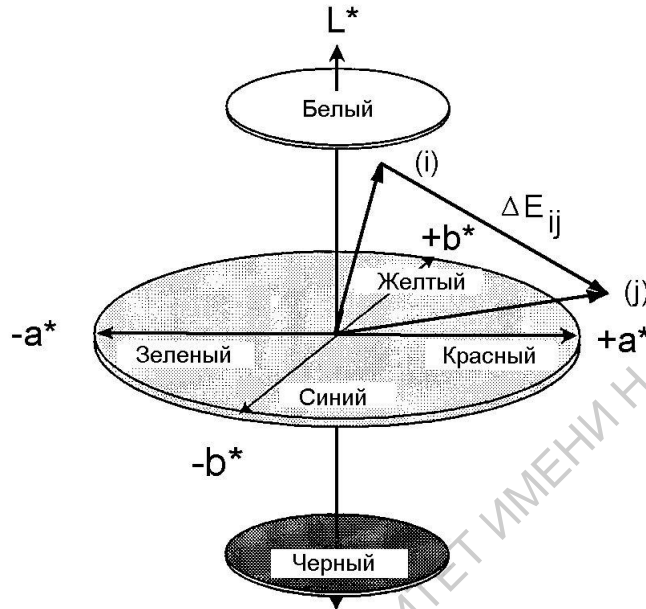


Рис. 48. $L^*a^*b^*$ цветовое пространство

Эритема часто оценивается величиной параметра a^* , в то время как для оценки пигментации используются параметры L^* и b^* или их комбинацией, то есть ΔE [77-83].

Хотя обычно параметр a^* коррелирует с индексом эритемы узкополосных приборов, L^* и b^* показывают слабую корреляцию с индексом меланина [80, 84]. В частности, увеличение содержания гемоглобина может уменьшить оба значения параметров L^* и b^* при отсутствии каких-либо изменений в меланиновой пигментации [85], в частности, в течение применения суб-диастолического давления с помощью манжеты [86]. Более того, значения a^* подвержены влиянию меланиновой концентрации [77, 87, 88]. Обнаружено, что при УФА-наведенном стойком пигментном потемнении значения b^* сначала уменьшаются, а затем возрастают, как только желтый компонент вновь образованный пигмент становится видимым [82].

Параметры $L^*a^*b^*$ описывают измерения по восприятию цвета кожи и поэтому могут показать, как дерматолог или средний человек воспринимает кожу. С другой стороны, такая система параметров не может быть ожидаемой для модулирования аналитического прибора, который мог бы объяснить физиологические причину внешнего вида кожи.

Chardon с коллегами предложил использовать векторное представление для реакции проявления УФ-наведенного загара в пространстве

$L^*a^*b^*$ [82, 89]. Те же авторы показали, что в пространстве $L^*a^*b^*$ все цвета кожи, определяющие цвет лиц субъектов, попадают в пределы объема, имеющего форму «банана» и который называется объемом цвета кожи. Увеличение пигментации кожи может быть рассмотрен графически как сдвиг в плоскости L^*-b^* , в то время как покраснение кожи (реакция эритемы) представляется как сдвиг в плоскости L^*-a^* . В попытке количественно оценить пигментацию кожи был предложен «угол индивидуальной типологии (ИТА)» или «характеристический угол альфа», определенный как направление вектора в плоскости L^*-b^* :

$$ITA = \left[\arctan \left(\frac{L^* - 50}{b^*} \right) \right] \times \frac{180}{\pi}, \quad (47)$$

где ИТА дается в градусах. Этот параметр был определен как параметр для оценки пигментации кожи при анализе измерений диффузного отражения. Однако было найдено, что увеличение локальной концентрации деоксигемоглобина (т.е. при применении манжеты) имеет точно такой же эффект на ИТА, как и увеличение меланиновой пигментации, и поэтому может быть визуально моделированной пигментации [86]. Поэтому, хотя ИТА может быть мерой воспринимаемой пигментации кожи, он не дает информации о молекулярной причине цвета кожи (то есть является ли восприятие пигмента следствием увеличения содержания меланина или деоксигемоглобина [51]).

Цветовой анализ может быть расширен на восприятие цвета АФ кожи. Флуоресценция кожи, возбужденная УФА излучением, происходит в видимом диапазоне спектра, что дает основание проводить количественную оценку цвета АФ кожи, происходящего в результате изменения состояния кожи. Цветовое различие АФ кожи, обусловленное происходящими в ней процессами, определяется по приведенной выше схеме, где вместо спектра диффузного отражения R_d в соотношениях (46) рассматривается спектр $I_{FL}(\lambda)$ АФ кожи.

Для сравнения на рис. 49 приведены изменения цвета АФ кожи и отраженного ей белого света в процессе развития наведенной УФА эритемы и при внешнем механическом сдавливании кожи. Как изменение цвета АФ кожи, так и изменение цвета отраженного ей белого света обусловлены изменением количества содержащейся в коже крови и меланина.

В случае отраженного света по мере развития эритемы параметр *hue* уменьшается, а при увеличении оказываемого на кожу давления - увеличивается. Эти результаты очевидны, так как при эритеме кожа краснеет, а при надавливании она приобретает светлый желто-коричневый оттенок.

Параметры *chroma* и L^* изменяются незначительно, и цветовое различие ΔE разных состояний кожной ткани определяется изменением параметра *hue*.

Изменение цвета АФ кожи, происходящее в результате этих двух процессов, носит иной характер. Из рисунков 50 и 51 видно, что изменение параметров *hue* и *chroma* не столь значительно (*chroma* уменьшается по мере уменьшения содержания крови) и цветовое различие ΔE разных состояний кожной ткани определяется изменением параметра L^* (отметим, что цветовые параметры АФ кожи зависят от интенсивности $I_{FL}(\lambda)$, поэтому при расчете цветовых параметров использовались значения $I_{FL}(\lambda)$, нормированные таким образом, чтобы значения параметров L^* для отраженного света и АФ были одного порядка). Этот результат также является ожидаемым, так как количество крови в дерме сравнительно мало меняет спектральный состав АФ, но сильно меняет ее интенсивность.

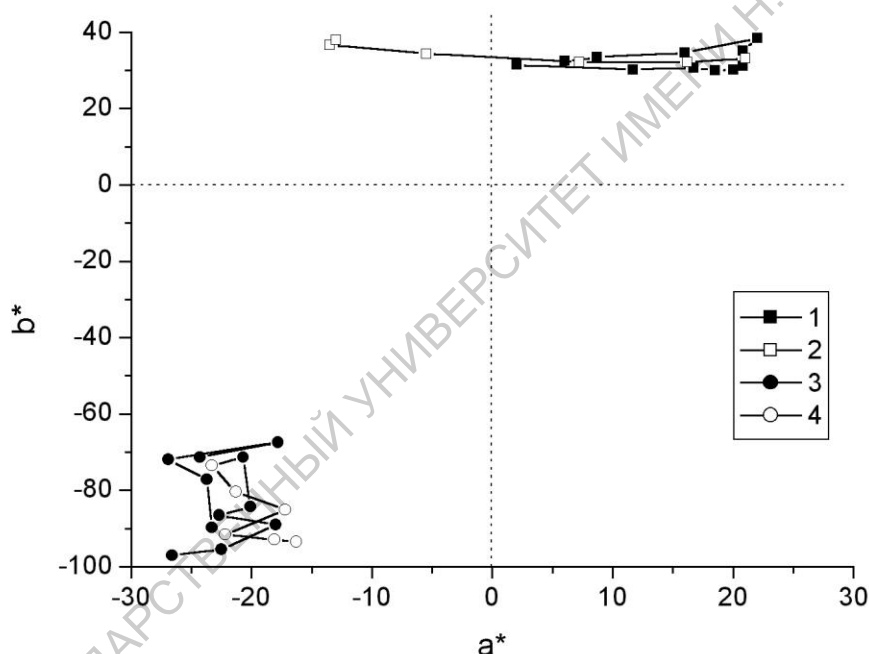


Рис. 49. Изменение цвета АФ (3,4) и отраженного белого света (1,2) кожи с развивающейся эритемой (1,3) и кожи с приложенным внешним давлением (2,4). $L^*a^*b^*$ -цветовое пространство

Основу фотоэлектрической колориметрии составляет измерение цвета кожи с помощью специальных приборов, получивших название колориметров.

Конструктивно такие приборы включают источник белого света, свет от которой диффузно освещает поверхность кожи, и трехканальную приемную систему, каждый канал которой имеет спектральный отклик, соответствующий одной из кривых спектральной чувствительности, приведенных на рис. 47.

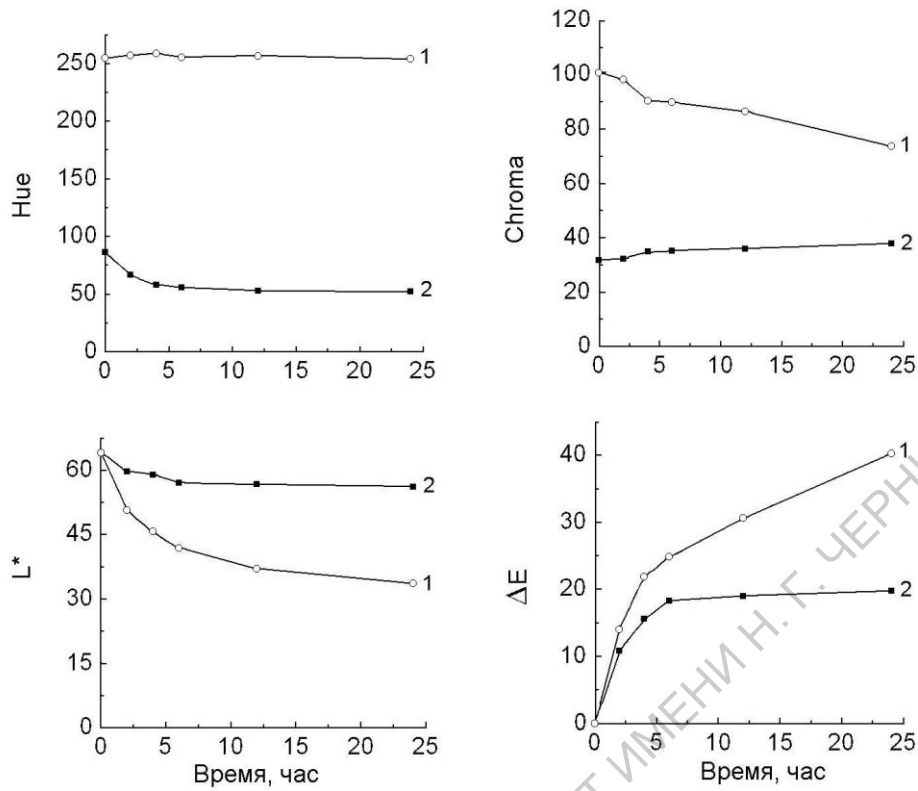


Рис. 50. Изменение цветовых параметров кожи с развивающейся УФ эритемой, определенных по спектрам ее АФ (1) и отражения (2)

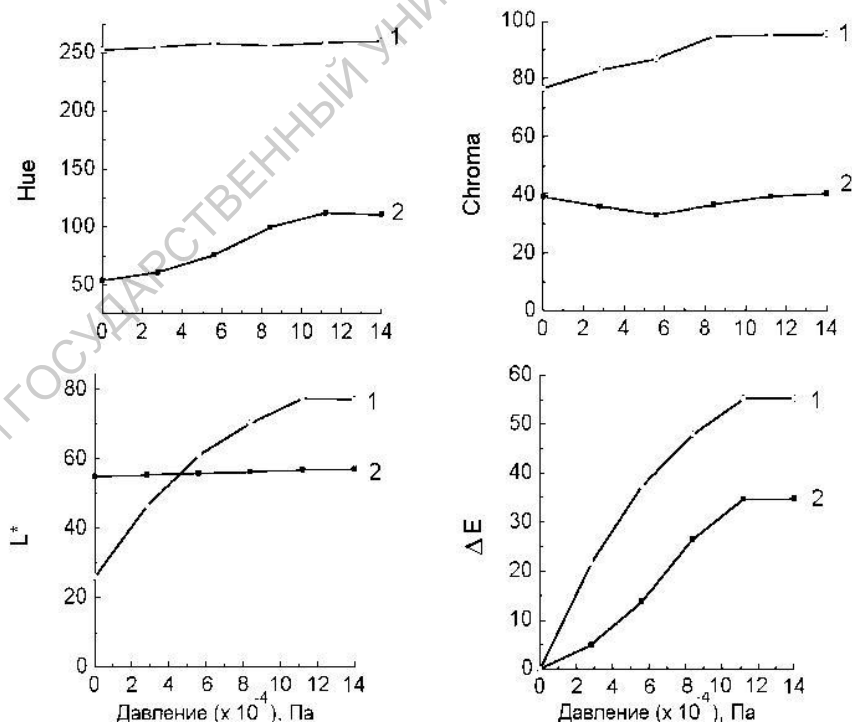


Рис. 51. Изменение цветовых параметров кожи с приложенным к ней механическим давлением, определенных по спектрам ее АФ (1) и отражения (2)

Основные требования, предъявляемые к колориметрам, кратко можно свести к следующим: приборы должны воспринимать цвет кожи так, как это делает глаз человека; должны быть доступны различные стандартные цветовые системы; они должны иметь стабильный источник белого света; измеряемая площадь кожной поверхности должна быть малой и не подвергаться давлению со стороны измерительного устройства; на измерения не должна влиять температура окружающей среды; измерения должны проводиться быстро и автоматически.

Современные колориметры вполне соответствуют данным требованиям и успешно применяются при оценке цвета кожи различных типов, при измерении цветовых изменений кожи, связанных с эритемой и пигментацией, при оценке цветовых изменений кожи, вызванных применением кожных препаратов, при анализе изменения цвета кожи в процессах возрастного и фотостарения и др.

Цветовой анализ видеоизображения кожи

Кроме цвета, в постановке диагноза важную роль играет форма характерных признаков болезни. Вопросы визуализации, документирования, мониторинга, измерения и классификации морфологических проявлений различных кожных процессов являются областью использования метода цифровой визуализации [90], основанного на компьютерной обработке экспериментально полученных изображений поверхности кожи. В последние годы метод цифровой цветной визуализации нашел различные применения в дерматологии, в частности, при выявлении меланомы, при мониторинге псориаза и эритемы, мониторинге аллергических воспалительных реакций и т.д.

Метод цифровой визуализации основан на компьютерной обработке изображения поверхности кожи, при этом изображение объекта формируется последовательностью цифр, каждая из которых несет информацию об энергии света, испускаемого элементарными площадками структуры, изображение которой регистрируется. Цифровые изображения могут быть получены с помощью аналоговой видеокамеры, чей сигнал может быть преобразован в последовательность цифр с помощью аналого-цифрового преобразователя на компьютерной плате захвата изображения, или с помощью цифровой видеокамеры, цифровая информация об изображении с которой напрямую поступает в память компьютера.

Широкое использование метода стало возможным благодаря современной компьютерной технике и успехам в разработке ПЗС-структур, составляющих приемную систему современных фото и видеокамер.

Типичные современные цветные видеокамеры обладают пространственным разрешением от 500 до 800 пикселей по горизонтали и от 400 до

600 пикселей по вертикали (последние модели фотокамер обладают пространственным разрешением порядка 1000 x 1000).

Каждый пиксель несет информацию о градациях яркости черно-белого изображения или о цветовом составе цветного изображения. Обычно 8-битовая информация ($2^8 = 256$) используется для градации яркости черно-белого компьютерного изображения. 24-битовая информация ($2^{24} \approx 16.7$ миллионов) является минимальным стандартом, который требуется для получения цветного изображения: каждый из трех 8-бит несет информацию об одном из базисных цветов изображения (обычно красном, зеленом и синем, поэтому метод называют методом RGB-изображений), имеющих 256 градаций яркости.

Цветное изображение поверхности кожи в дальнейшем используется для компьютерного анализа "текстуры" картинку путем выбора отдельных цветовых составляющих изображения (R, G или B-компонента) или их аддитивной смеси. Выбор цветовой составляющей производится с учетом спектральных различий между нормальной кожей и кожей с патологией.

В частности, для контрастного выделения области кожной поверхности с патологией выбирается цветовая координата (или их аддитивная комбинация) изображения, при которой наиболее отчетливо проявляются различия между участками нормальной кожи и кожи с патологией. Затем создается новое монохромное изображение кожи, в котором всем пикселям, соответствующим значениям цветовой координаты нормальной кожи, присваивается максимальное значение градации яркости, равное 255 (отмечаются на изображении белым цветом), а остальным - минимальное значение, равное 0 (отмечаются черным цветом).

К примеру, зеленый компонент видеоизображения удобен для выделения областей кожной поверхности, приобретающих красный оттенок в результате эритемы, воспалительных реакций, аллергических реакций и т. д.

Контрастное выделение измененного участка кожной поверхности позволяет определить его форму, рассчитать его площадь и проследить динамику изменения его формы и размеров. Если патологическая область имеет однородный цвет (эритема, воспалительные реакции), то его площадь определяется путем простого подсчета числа пикселей, которым присвоено значение "0" (темные участки). В противном случае, когда патологическая область не является однородной по цвету (примером является очаг псориаза) изменение размеров участка патологии можно оценить по границам области.

Пример компьютерной обработки изображения кожи с очагом псориаза приведен на рис. 52. Псориатическая кожа имеет, по крайней мере, две отличительные от нормальной кожи особенности: в очаге псориаза доля отраженного от поверхности кожи света больше, поэтому изображение этого участка более яркое, при этом имеет явно выраженный желтоватый

оттенков. В связи с этим на контрастном изображении (рис. 52, внизу) в очаге псориаза видны участки, отмеченные белым цветом (как нормальные), что вносит неопределенность в оценку площади пораженного участка кожи. Помимо этого, возникает сложность с дифференциацией участков кожи с воспалением (на рис. 52 такие участки располагаются на периферии изображения) и участков с псориазом.

Одним из путей преодоления этих трудностей является использование для анализа изображения комбинации цветов.

Другой путь предусматривает получение монохромного изображения поверхности кожи в узком диапазоне спектра, соответствующего поглощению того или иного хромофора, доминирующего в этой области спектра. Так, использование фильтра с полосой пропускания между 650 и 700 нм дает возможность оценивать изменение содержания меланина в коже, а фильтры со спектральной полосой пропускания вблизи 585 нм (в этой области поглощение двух форм гемоглобина одинаково сильное) и 577 нм (сильное поглощение оксигемоглобина) дают возможность оценивать изменение степени оксигенации.

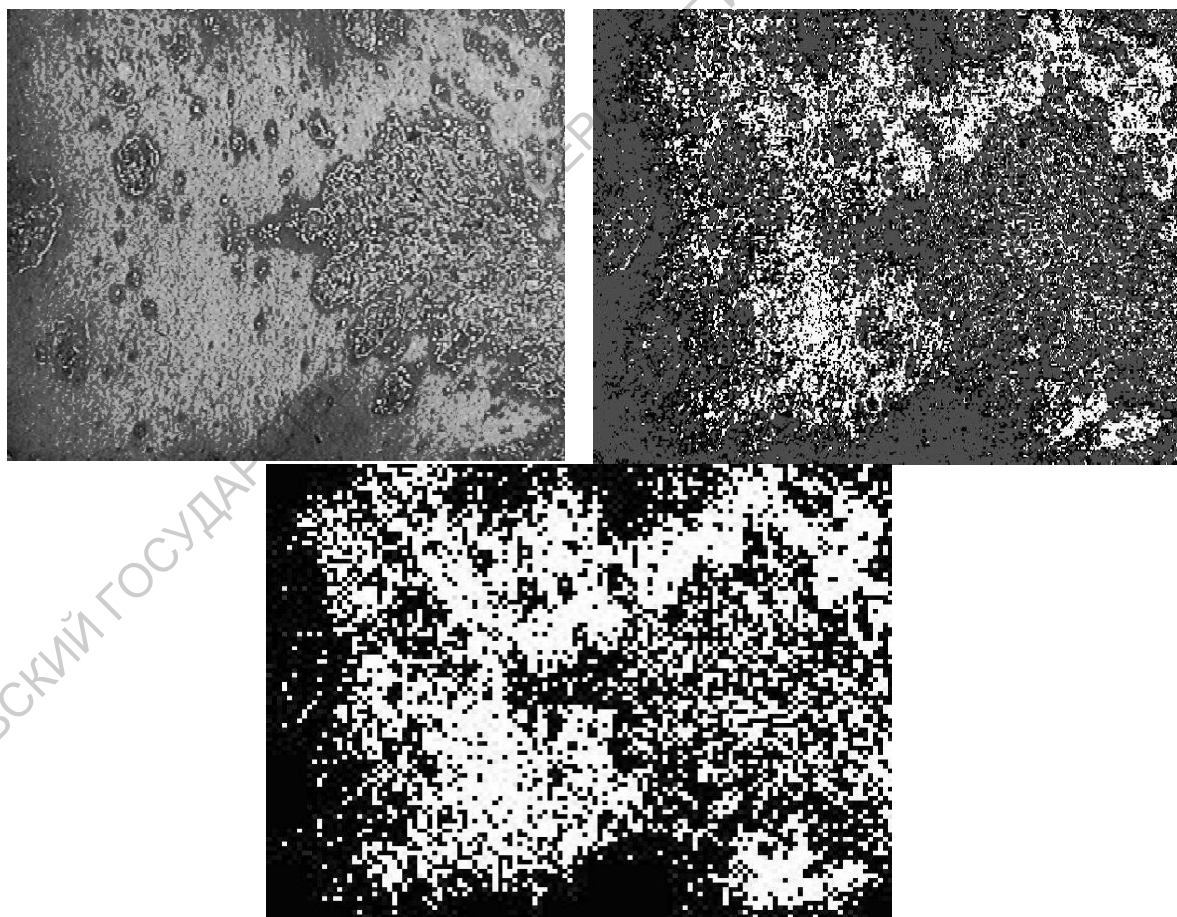


Рис. 52. Цветное изображение кожи с очагом псориаза (в монохромном восприятии) (слева), зеленый (G) компонент изображения (справа) и результат компьютерной обработки (внизу)

Оценка содержания меланина и гемоглобина в коже возможна и путем анализа цветного изображения тестируемого участка кожи с помощью координат цветности [91].

Используя средние значения яркости белого стандарта ($W_{R,G,B}$) и тестируемого участка кожи ($S_{R,G,B}$), в каждой спектральной полосе (R , G , и B) могут быть определены интегральный коэффициент отражения ($R_{R,G,B}$) и оптическая плотность кожи ($OD_{R,G,B}$):

$$R_{R,G,B} = \frac{S_{R,G,B}}{W_{R,G,B}}; \quad (48)$$

$$OD_{R,G,B} = 100 \log \left(\frac{1}{R_{R,G,B}} \right). \quad (49)$$

Далее, разделяя зеленую (G) и красную (R) спектральные полосы в соответствии с простой моделью кожной ткани можно получить следующие соотношения [91]:

$$OD_R \approx 2\varepsilon_{ext,R}^{mel} d_2 c^{mel} + \log \left(\frac{1}{R_{4,R}} \right), \quad (50)$$

$$OD_G - 1.44D_R \approx 2\varepsilon_{ext,G}^{hemo} d_3 c^{hemo} + \left(\log \left(\frac{1}{R_{4,G}} \right) - 1.44 \log \left(\frac{1}{R_{4,R}} \right) \right). \quad (51)$$

Соотношения (50) и (51) практически использовались для оценки пространственного распределения меланина и гемоглобина в коже с наведенной УФВ эритемой и пигментацией [91].

Новый метод количественной оценки 2D-распределений эритемы и пигментации в коже человека с помощью компьютерных изображений предложен авторами работы [92]. Изображения кожи регистрировались с помощью двух интерференционных фильтров на длинах волн 650 нм и 700 нм, что давало возможность сформировать согласно соотношению (18) новое компьютерное изображение кожи, где параметром визуализации является индекс меланиной пигментации. Аналогично, регистрация трех изображений кожи с использованием интерференционных фильтров на длинах волн 560 нм, 650 нм и 700 нм дает возможность сформировать с помощью соотношения (19) новое изображение кожи, где параметром визуализации является индекс эритемы.

Контраст изображения кожи с эритемой, когда индекс эритемы используется в качестве параметра визуализации, а также контраст изобра-

жения кожи с меланиновой пигментации при использовании индекса пигментации в качестве параметра визуализации, оказался в три раза выше по сравнению с цветным (RGB) изображением [92].

Метод цифровой визуализации дает возможность оценки цветовых параметров кожи в системе МКО1976 ($L^*a^*b^*$) при использовании цветной видеокамеры [93]. Для этого необходимо интегральные коэффициенты отражения $R_{R,G,B}$ в каждой из трех спектральных полос преобразовать в значение квазипараметров L^* , a^* , b^* , используя соотношения, аналогичные (44), где $\frac{X}{X_0} \equiv R_R$, $\frac{Y}{Y_0} \equiv R_G$, $\frac{Z}{Z_0} \equiv R_B$.

Varel с коллегами исследовали процесс изменения цвета кожи после применения коммерческого крема для загара с помощью визуализирующей системы (Visi-Chroma VC-100; Biophotonics, Lessines, Belgium), которая могла регистрировать типичные RGB изображения и преобразовать изображения в несколько CIE стандартных систем, включая системы $L^*a^*b^*$ и Yxy [94].

Оценка эритемы и меланиновой пигментации в портвейновом пятне проводилась подобным образом путем преобразований RGB изображений в пространство $L^*a^*b^*$ в предположении, что индекс изображения a^* представляет карту распределения эритемы, а индекс изображения L^* определяет обратную карту распределения меланина [95].

Метод цифровой визуализации, который традиционно, как и метод колориметрии, применяется для анализа отраженного кожей белого света, может быть расширен и на АФ кожи.

Максимум флуоресценции коллагена, возбужденной УФА излучением, наблюдается вблизи 420 нм. В этой области поглощение содержащегося в коже меланина в 2 раза больше, а в УФА области - в 5 раз больше, чем в зеленой (540 нм) области спектра. Поэтому флуоресцентная фотография является в 10 раз более чувствительным методом обнаружения эпидермального меланина по сравнению с видимым диапазоном спектра.

Флуоресцентная фотография оказывается полезным инструментом для оценки эффективности лечения воспаления сальных желез. Бактерии, вызывающие прыщи на коже человека, имеют характерное свечение в красной области спектра, обусловленное флуоресценцией порфиринов (в частности, протопорфирина IX) [96], максимум возбуждения которой приходится на фиолетовую область спектра. В этом случае монохромное изображение освещаемой фиолетовым светом поверхности кожи, полученное при использовании фильтра, пропускающего излучение красной области спектра, позволяет оценить наличие бактерий и пространственное распределение их плотности.

Рисунок 53 иллюстрирует эффективность фотозащитных препаратов: так как ФП не пропускает УФ излучение, то на участке кожи с нанесенным ФП флуоресценция кожи отсутствует.



Рис. 53. Изображение поверхности кожи с нанесенным фотозащитным препаратом: (а) - белый свет; (б) - УФА возбужденная флуоресценция

5. ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ КОЖНОЙ ТКАНИ

Несмотря на то, что развитие метода отражательной спектроскопии биологических тканей позволяет разработать многочисленные диагностические методы и устройства, которые находят широкое применение в экспериментальной и клинической медицине, возможности этого метода далеко полностью не реализованы. Зондирование тканей поляризованным излучением с последующим анализом спектральных ко- и кросс-поляризованных компонентов обратно рассеянного тканями излучения позволяют не только количественно оценивать хромофорный состав среды, но и оценивать глубину расположения хромофоров. Анализ поляризационных характеристик рассеянного света позволяет в некоторых случаях получить совершенно новые результаты при изучении морфологического и функционального состояния биологической ткани, что является одним из важнейших направлений современной медицинской диагностики [97].

***Распространение линейно поляризованного излучения
в рассеивающей среде: феноменологический подход***

Когда линейно поляризованный свет падает на поверхность кожи, то свет, отраженный от *stratum corneum* (~ 5%) остается статистика линейно поляризованным в той же плоскости, что и падающее излучение. Проникшее в кожную ткань линейно поляризованное излучение по мере увеличения глубины проникновения теряет информацию о своей первоначальной поляризации: увеличение числа актов рассеяния приводит к экспоненциальному уменьшению степени поляризации распространяющегося в биоткани излучения [98-100].

Одним из основных свойств оптических полей, возникающих в результате многократного рассеяния световых пучков случайно-неоднородными средами, является существование сложной мелкомасштабной пространственной поляризационной структуры рассеянных полей, формируемой в результате суперпозиции парциальных составляющих рассеянного поля с различными состояниями поляризации;

При этом если рассеивающая среда возбуждается линейно поляризованным когерентным световым пучком, то в качестве составляющих рассеянного поля обычно рассматриваются линейно поляризованная составляющая, совпадающая по направлению поляризации с зондирующим пучком («ко-поляризованный» компонент рассеянного поля) и линейно поляризованная составляющая с ортогональным направлением поляризации («кросс-поляризованный» компонент).

При использовании линейно поляризованного освещающего пучка «деполяризующие» свойства рассеивающей среды могут быть описаны таким параметром, как степень поляризации рассеянного излучения, вводимой в форме:

$$P = \frac{\langle I_{\parallel} \rangle - \langle I_{\perp} \rangle}{\langle I_{\parallel} \rangle + \langle I_{\perp} \rangle}, \quad (52)$$

где $\langle I_{\parallel} \rangle$ и $\langle I_{\perp} \rangle$ - средние значения интенсивности линейно поляризованных составляющих рассеянного поля с взаимно ортогональными направлениями вектора поляризации.

С позиций феноменологического описания процесса многократного рассеяния, возникновение составляющей рассеянного поля с альтернативным состоянием поляризации (кросс-поляризованной в случае линейной поляризации освещающего пучка) может быть интерпретировано как результат перераспределения потока энергии между составляющими рассеянного поля, характеризуемыми различными значениями эффективного оптического пути s в случайно-неоднородной среде. При этом скорость релаксации исходного состояния поляризации определяется характерным

масштабом рассеивающей среды ("длиной деполяризации"), зависящим от оптических характеристик рассеивающих центров и их концентрации [98-100].

Максимальное различие наблюдаемых характеристик составляющих рассеянного поля с различными состояниями поляризации в случае оптически плотных сред имеет место в случае детектирования рассеянного назад излучения, что является очевидным проявлением различия эффективных оптических путей s для парциальных составляющих, соответствующих двум состояниям поляризации: ко-поляризованный компонент формируется в результате суперпозиции составляющих с малыми значениями s , в то время как кросс-поляризованный - благодаря "диффузионному" режиму распространения излучения в среде.

Феноменологический подход к статистическому описанию ансамблей парциальных составляющих оптических полей, формируемых при многократном рассеянии излучения в неупорядоченных средах, предполагает использование функции плотности вероятности эффективных оптических путей $\rho(s)$ парциальных составляющих рассеянного поля как универсальной характеристики рассеивающей среды, определяемой ее оптическими параметрами и геометрией рассеяния.

В рамках феноменологического подхода интенсивности ко-поляризованной и кросс-поляризованной составляющих рассеянного поля могут быть представлены в форме интегральных преобразований $\rho(s)$:

$$\begin{aligned} \langle I_{\parallel} \rangle &\sim \frac{1}{2} \int_0^{\infty} \left[1 + \exp\left(-\frac{s}{\xi}\right) \right] \rho(s) ds; \\ \langle I_{\perp} \rangle &\sim \frac{1}{2} \int_0^{\infty} \left[1 - \exp\left(-\frac{s}{\xi}\right) \right] \rho(s) ds, \end{aligned} \quad (53)$$

где ξ - длина деполяризации. Данный параметр характеризует пространственный масштаб («длину деполяризации») многократно рассеивающей среды и определяет скорость релаксации исходного состояния поляризации зондирующего пучка при его распространении в среде [100-102].

Таким образом, в рамках рассматриваемого феноменологического подхода степень поляризации рассеянного излучения может быть представлена в форме:

$$P = \frac{\int_0^{\infty} \exp(-s/\xi) \rho(s) ds}{\int_0^{\infty} \rho(s) ds}. \quad (54)$$

В качестве обобщенной оптической характеристики рассеивающей среды, от которой зависит функция плотности вероятности $\rho(s)$, обычно рассматривается транспортная длина l^* ($l^* = l/(1-g)$, где l - длина рассеяния, обратно пропорциональная коэффициенту рассеяния μ_s , g - параметр анизотропии рассеяния). В случае, когда характерный размер рассеивающей среды существенно превышает транспортную длину ($L \gg l^*$), анализ статистики эффективных оптических путей может быть осуществлен в рамках так называемого диффузионного приближения.

Увеличение рассеивающих свойств среды (уменьшение транспортной длиной рассеяния l^*) приводит к увеличению вклада в прошедшее через среду излучение парциальных составляющих с большими оптическими путями. Следствием этого является уменьшение интенсивности кополяризованной составляющей и увеличение интенсивности кросс-поляризованной составляющей прошедшего через среду излучения и, как результат, уменьшение его степени поляризации.

Скорость релаксации исходного состояния поляризации зондирующего пучка при его распространении в среде определяется параметром ξ , который сложным образом зависит от транспортной длины рассеивающей среды.

В случае детектирования обратно рассеянного излучения при освещении многократно рассеивающих сред линейно поляризованным светом максимальное значение ξ наблюдается для систем рассеивающих частиц с дифракционным параметром $ka \ll 1$. С ростом дифракционного параметра рассеивающих центров длина деполяризации ξ уменьшается, т.е. многократное рассеяние системами крупных частиц приводит к более эффективной деполяризации распространяющегося линейно поляризованного излучения по сравнению с "релеевскими" рассеивающими системами. При обратном рассеянии плоской линейно поляризованной монохроматической волны полубесконечной неупорядоченной средой, состоящей из диэлектрических сферических частиц с существенно различающимися значениями дифракционного параметра ka и относительным показателем преломления, равным 1.2, значения нормированной длины деполяризации ξ/l^* приняты равными: $\xi/l^* \approx 1$ для крупных рассеивающих частиц (режим рассеяния Ми, $ka \gg 1$) и $\xi/l^* \approx 4$ для "релеевских" частиц с $ka \ll 1$.

Объяснение поляризационных свойств рассеянного излучения на основе статистики эффективных оптических путей позволяет установить

фундаментальный факт существования остаточной поляризации при обратном рассеянии поляризованного излучения. Наличие остаточной поляризации обусловлено специфическими условиями формирования рассеянного оптического поля в случае обратного рассеяния, когда весьма существенен вклад многократно рассеянных парциальных составляющих с характерными расстояниями распространения в среде порядка $s \sim l^*$ [103-104].

Дополнительное поглощение зондирующего излучения в рассеивающей среде будет приводить к отсечке парциальных составляющих рассеянного поля, характеризующихся значениями оптического пути $s > \mu_a^{-1}(\lambda)$, где $\mu_a(\lambda)$ - значение коэффициента поглощения рассеивающей среды на длине волны зондирующего излучения [104].

Таким образом, дополнительное возрастание относительных вкладов парциальных составляющих с $s < \mu_a^{-1}(\lambda)$ должно проявляться в возрастании степени остаточной поляризации обратного рассеянного излучения при увеличении μ_a . При использовании некогерентного поляризованного излучения для зондирования сред, характеризующихся селективным поглощением, спектральная зависимость степени остаточной поляризации должна характеризоваться существованием максимумов в полосах поглощения рассеивающей среды.

Приближенная формула для степени остаточной поляризации обратного рассеянного излучения в условиях многократного рассеяния плоской линейно поляризованной волны неупорядоченной средой [105-106]:

$$P(\mu_a) \approx 1.5 \exp \left\{ -\gamma \left(\sqrt{\frac{3l^* (1 + \mu_a \xi)}{\xi}} - \sqrt{3l^* \mu_a} \right) \right\}. \quad (55)$$

где γ - параметр, зависящий от так называемой длины экстраполяций для рассеивающей среды ($\gamma \approx 2$).

Применительно к коже основные выводы из рассмотренной феноменологической модели распространения поляризованного излучения можно сформулировать в следующем виде:

1. В видимом диапазоне спектра среднее значение коэффициента рассеяния составляет величину порядка $\mu_s \cong 60 \text{ мм}^{-1}$, параметр анизотропии $g \cong 0.85$. Это позволяет оценить транспортную длину l^* как величину порядка 100 мкм. Несмотря на то, что в каждой ткани есть рассеиватели, размеры которых меньше, порядка и значительно больше длины волны света, результатом чего имеют место различные виды рассеяния (от релеевского рассеяния до рассеяния Ми), доминирующими являются структуры, размеры которых превышают длину волны, которые определяют преобладающее рассеяние вперед. Принимая во внимание, что размеры

рассеивателей в эпидермисе превышают длину волны излучения видимого диапазона ($ka > 1$), можно сделать вывод, что максимальное значение длины деполяризации ξ может составлять величину порядка 300 мкм и более.

2. В случае детектирования обратно рассеянного кожей излучения при освещении ее линейно поляризованным светом максимальное значение ξ уменьшается до величины порядка l^* .

3. При зондировании кожи линейно поляризованным излучением имеет место факт существования остаточной поляризации при обратном рассеянии поляризованного излучения.

4. Наличие в кожной ткани сильных хромофоров (меланина в эпидермисе и гемоглобина дермальной крови) должно приводить к возрастанию степени остаточной поляризации обратно рассеянного излучения в спектральных интервалах, соответствующих полосам поглощения хромофоров.

Поляризационная отражательная спектроскопия

В результате излучение, обратно рассеянное разными слоями кожи, также имеет разную степень поляризации: излучение, рассеянное приповерхностными слоями кожи, остается поляризованным, в то время как излучение, выходящее из глубоких слоев, деполяризовано. Отраженный кожей свет является частично поляризованным, причем поляризацию обеспечивает свет, отраженный от поверхности и подповерхностного слоев кожи.

Излучение, отраженное от поверхности кожи и непосредственно прилегающему к ней слою, характеризующемуся малократным рассеянием, преимущественно сохраняет ориентацию поляризации падающего излучения. Спектральный состав этого излучения обусловлен объемом этого слоя, толщина которого не превышает длины деполяризации падающего на кожу линейно поляризованного излучения и для нормальной кожи не превышает толщины эпидермиса. Поэтому спектр данного компонента обусловлен в основном хромофорным составом эпидермального слоя кожи.

Излучение, обратно рассеянное глубоко залегающими слоями кожи, которые характеризуются многократным рассеянием света (диффузный компонент), является полностью деполяризованным. Так как это излучение формируется в глубине кожной ткани, то его спектральный состав сохраняет все особенности спектра отражения кожи при ее зондировании неполяризованным светом.

Это дает основание проводить исследование кожи с помощью простой техники путем отдельного измерения спектрального состава двух составляющих отраженного кожей излучения [107].

Степень поляризации P выходящего из кожи излучения определяется комбинацией двух компонентов обратно рассеянного кожей компонентов, поляризация которых параллельна поляризации падающего излучения (кополяризованный компонент, R_{PAR}) и перпендикулярна ей (кроссполяризованный компонент, R_{PER}):

$$P = \frac{R_{\text{PAR}} - R_{\text{PER}}}{R_{\text{PAR}} + R_{\text{PER}}}. \quad (56)$$

Кополяризованный компонент определяется суммарным вкладом излучения, отраженного от поверхности кожи и непосредственно прилегающему к ней слою, характеризующемуся малократным рассеянием и сохраняющим поляризацию падающего излучения, и излучения, обратно рассеянного глубоко залегающими слоями кожи, которые характеризуются многократным рассеянием света, результатом чего является его деполяризация. Кроссполяризованный компонент определяется только диффузным компонентом обратно рассеянного излучения, которое является полностью деполяризованным.

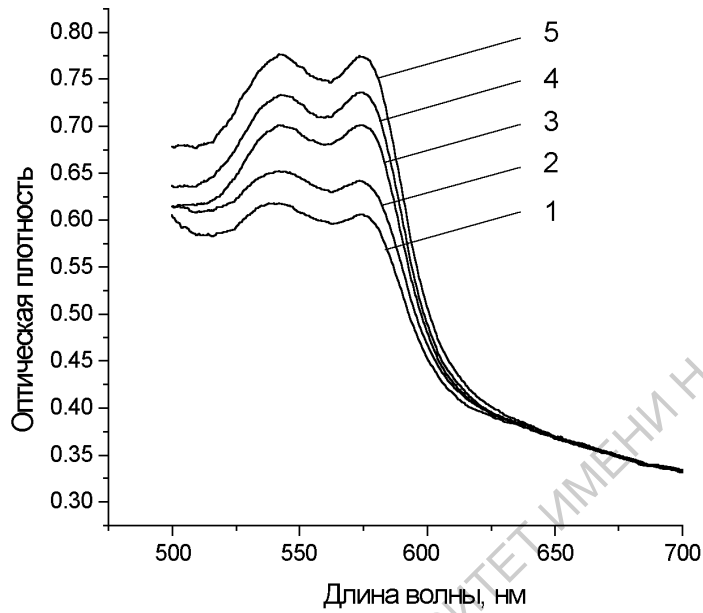
В рассеивающей среде, характеризующейся малым поглощением, вклад диффузного компонента как в R_{PAR} , так и в R_{PER} является доминирующим, поэтому степень остаточной поляризации обратно рассеянного излучения имеет малую величину. Увеличение поглощения среды приводит к тому, что длина оптического пути распространяющегося в среде света уменьшается, результатом чего является уменьшение вклада диффузного компонента в обратно рассеянное излучение. Это, в свою очередь, ведет к увеличению разности $R_{\text{PAR}} - R_{\text{PER}}$ в выражении (56) и соответствующему увеличению степени поляризации обратно рассеянного излучения.

Поглощающие свойства кожи в видимом диапазоне спектра определяются двумя доминирующими хромофорами: эпидермальным меланином и гемоглобином дермальной крови. Эти хромофоры являются доминирующими в формировании особенностей спектра $R(\lambda)$ диффузного отражения кожи и спектра ее оптической плотности $OD(\lambda)$.

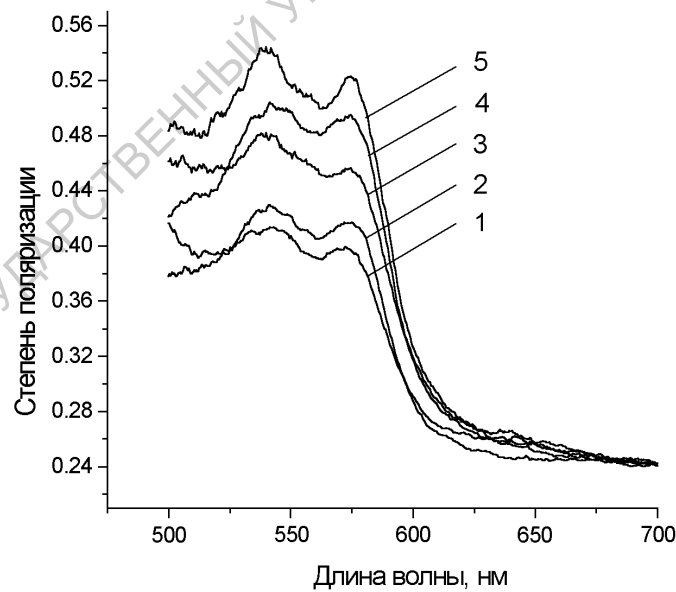
На рисунке 54а приведены спектры оптической плотности кожи с эритемой разной степени (E – индекс эритемы). Степень эритемы количественно оценивалась с помощью прибора эритема-меланино-метра [108]. Вызванное эритемой увеличение поглощения в спектральной области поглощения гемоглобина приводит к увеличению степени поляризации обратно рассеянного кожей излучения, что наглядно иллюстрирует рис. 54б. Более того, увеличение степени поляризации с уменьшением длины волны зондирующего излучения обусловлено наличием эпидермального меланина.

Таким образом, из рисунков 54 видно, что спектральное распределение степени поляризации $P(\lambda)$ обратно рассеянного кожей линейно поля-

ризованного излучения аналогично спектру оптической плотности кожи и может служить характеристикой изменения хромофорного состава кожи.



а



б

Рис. 54. Спектры оптической плотности кожи (а) и спектры степени остаточной поляризации излучения, отраженного кожей (б) с эритемой разной степени.

1 – $E = 137$; 2 – $E = 157$; 3 – $E = 213$; 4 – $E = 249$; 5 – $E = 288$

Спектральный состав ко-поляризованного (R_{PAR}) и кросс-поляризованного (R_{PER}) компонентов выходящего из кожи излучения позволяет выделить информацию о хромофорном составе приповерхностного слоя кожной ткани. Эта информация содержится в поляризационном разностном спектре $\Delta R(\lambda)$, определяемом как разность спектров $R_{\text{PAR}}(\lambda)$ и $R_{\text{PER}}(\lambda)$:

$$\Delta R(\lambda) = R_{\text{PAR}}(\lambda) - R_{\text{PER}}(\lambda), \quad (57)$$

в формировании которого не участвует диффузный деполяризованный компонент.

Таким образом, разностная комбинация измеренных спектров двух компонентов отраженного кожей излучения позволяет судить о хромофорном составе приповерхностного слоя кожи, толщина которого определяется глубиной проникновения в кожу поляризованного света. Глубина проникновения поляризованного излучения внутрь кожи определяется ее рассеивающими и поглощающими свойствами и составляет величину порядка 150 - 200 мкм [95], что сравнимо с толщиной эпидермиса.

На рисунке 55 приведены поляризационные разностные спектры $\Delta R(\lambda)$ для участков нормальной кожи внутренней стороны предплечья и подногтевого ложа. Видно, что для кожи предплечья в разностном спектре поглощающие свойства крови не проявляются в отличие от кожной ткани ногтевого ложа, где эпидермис имеет меньшую толщину, следствием чего является проявление поглощения гемоглобина в разностном спектре.

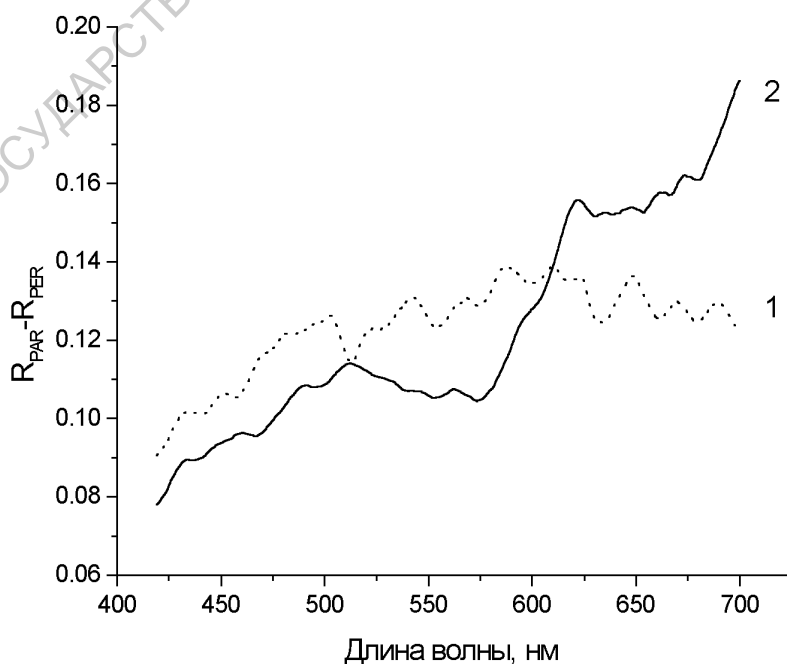


Рис. 55. Поляризационные разностные спектры участков кожи

внутренней поверхности предплечья (1) и ногтевого ложа (2)

К аналогичному эффекту приводит послойное удаление эпидермиса. На рисунке 56 показана динамика изменения поляризационных разностных спектров кожи в процессе послойного удаления поверхностных слоев эпидермиса с использованием адгезионной пленки. Толщина оторванного слоя эпидермиса составляет величину порядка 2-3 мкм. Полосы поглощения оксигемоглобина (545 и 575 нм) проявляются в спектрах после осуществления 15-25 отрывов, что соответствует толщине удаления поверхностного слоя эпидермиса порядка 50-70 мкм.

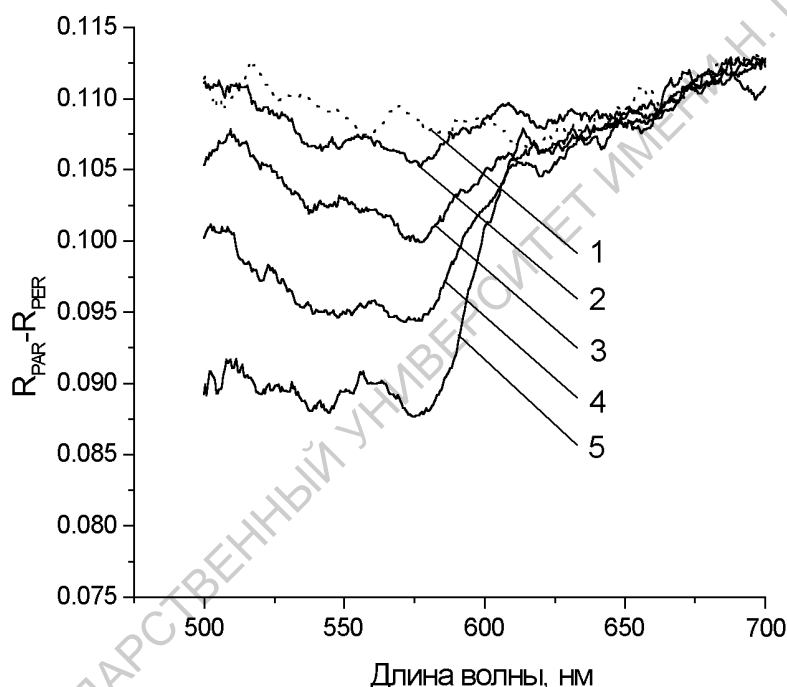


Рис. 56. Изменение разностных поляризационных спектров кожи по мере послойного удаления поверхностных слоев эпидермиса: 1 – нормальная кожа; 2 – 40 мкм; 3 – 50 мкм; 4 – 60 мкм; 5 – 70 мкм

По проявлению в разностном поляризационном спектре полос поглощения гемоглобина можно судить о толщине эпидермального слоя кожи, а точнее, о глубине залегания кровеносных сосудов в кожной ткани. В качестве количественной характеристики толщины эпидермиса (глубины залегания кровеносных сосудов) возможно использование параметра V , который показывает контраст проявления полос поглощения гемоглобина в разностном спектре:

$$V = \frac{\Delta R_{650} - \Delta R_{545}}{\Delta R_{650} + \Delta R_{545}} \quad (57a)$$

или

$$V = \frac{\Delta R_{650} - \Delta R_{575}}{\Delta R_{650} + \Delta R_{575}}. \quad (57b)$$

В соотношениях (57) индексы обозначают длины волн в нм, соответствующие полосам поглощения оксигемоглобина (545 и 575 нм) и области, где поглощение гемоглобина мало (650 нм).

Представленные результаты демонстрируют перспективность использования метода поляризационной отражательной спектроскопии для диагностики состояния кожной ткани, в частности, для оценки глубины залегания и кровенаполненности дермальных кровеносных сосудов.

Поляризационная визуализация кожной ткани

Метод поляризационной визуализации кожи основан на анализе пространственного распределения поляризационных характеристик отраженного кожей линейно поляризованного излучения.

Реализация этого метода достаточно проста. Один поляризационный фильтр помещается непосредственно перед источником освещения, а другой - перед регистрирующим устройством (фото- или видеокамера), при этом ориентация второго поляроида либо параллельна, либо перпендикулярна ориентации первого поляроида.

В качестве параметра визуализации возможно использование интенсивности компонентов обратно рассеянного излучения, измеренных при параллельной или ортогональной ориентации поляроидов, их разности или степени поляризации отраженного света. Соответственно и практическая реализация метода имеет вариации.

Полученное при параллельно ориентированных поляроидах изображение кожи позволяет получить информацию о состоянии кожной поверхности и приповерхностном слое, которая не искажена пигментацией и эритемой нижележащих слоев [109, 110].

Ортогональная ориентация поляроидов устраняет на изображении кожи особенности ее поверхности (чешуйчатость, морщины, поры и т.д.), в результате чего возможна оценка пространственного распределения пигмента.

Поляризационный метод оказывается более чувствителен по сравнению со стандартным методом цифровой визуализации при оценке пространственного распределения эритемы или области распространения воспалительного заболевания кожи [111-112]. Метод успешно используется при оценке распространения воспаления сальной железы, фоторазрушения кожи, эффективности лечения псориаза и т.д. [113-114].

Основным преимуществом поляризационной визуализации является то, что изображения кожи, в которых акцент сделан на выявление особенностей кожной поверхности или особенностей подповерхностных слоев кожи, могут быть получены без изменения условий эксперимента. Для достижения хорошего качества изображений нет необходимости менять источник освещения, угол освещения кожи или угол наблюдения.

Компьютерное комбинирование двух изображений поверхности кожи, полученных при параллельно ($I_{\parallel}(x,y)$) и ортогонально ($I_{\perp}(x,y)$) ориентированных поляроидах, дает возможность получить изображение кожи $P(x,y)$, где в качестве параметра визуализации используется степень поляризации отраженного кожей линейно поляризованного излучения [92, 99]:

$$P(x,y) = \frac{I_{\parallel}(x,y) - I_{\perp}(x,y)}{I_{\parallel}(x,y) + I_{\perp}(x,y)}. \quad (58)$$

Преимуществом такой визуализации является то, что числитель выражения (58) чувствителен только к поляризованному компоненту отраженного кожей света, поэтому из изображения убираются детали кожной ткани, сформированные диффузно рассеянным компонентом.

К примеру, веснушки представляют собой области подповерхностной пигментации, которые проявляют себя как поглощающие фильтры для света, входящего в кожу или выходящего из нее. Каждый такой фильтр в равной степени влияет как на $I_{\parallel}(x,y)$, так и на $I_{\perp}(x,y)$. Поэтому при формировании изображения, где в качестве параметра визуализации используется степень поляризации, ослабляющий фактор меланина является общим для всех слагаемых выражения (58) и уничтожается. В результате в изображении меланосомы веснушки не проявляются (рис. 57).

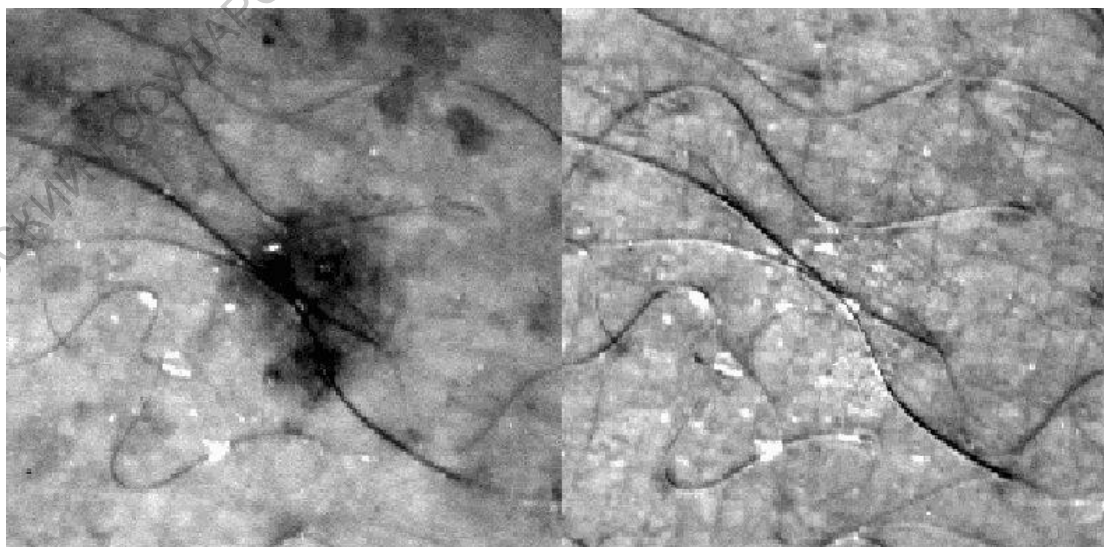


Рис. 57. Изображение веснушки в неполяризованном свете (слева) и ее изображение, где в качестве параметра визуализации использована степень

поляризации. Поляризационная визуализация удаляет меланин из веснушки. Меланосомы веснушки не проявляются в изображении [99]

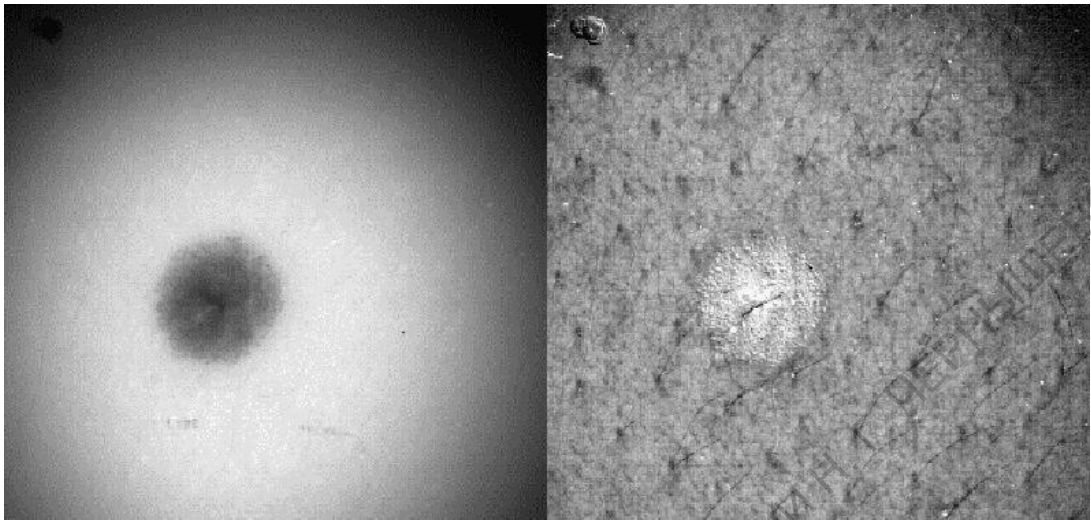


Рис. 58. Доброкачественная пигментированная *nevus*. На поляризационном изображении отсутствует меланин, но видна структура *nevus* [99]

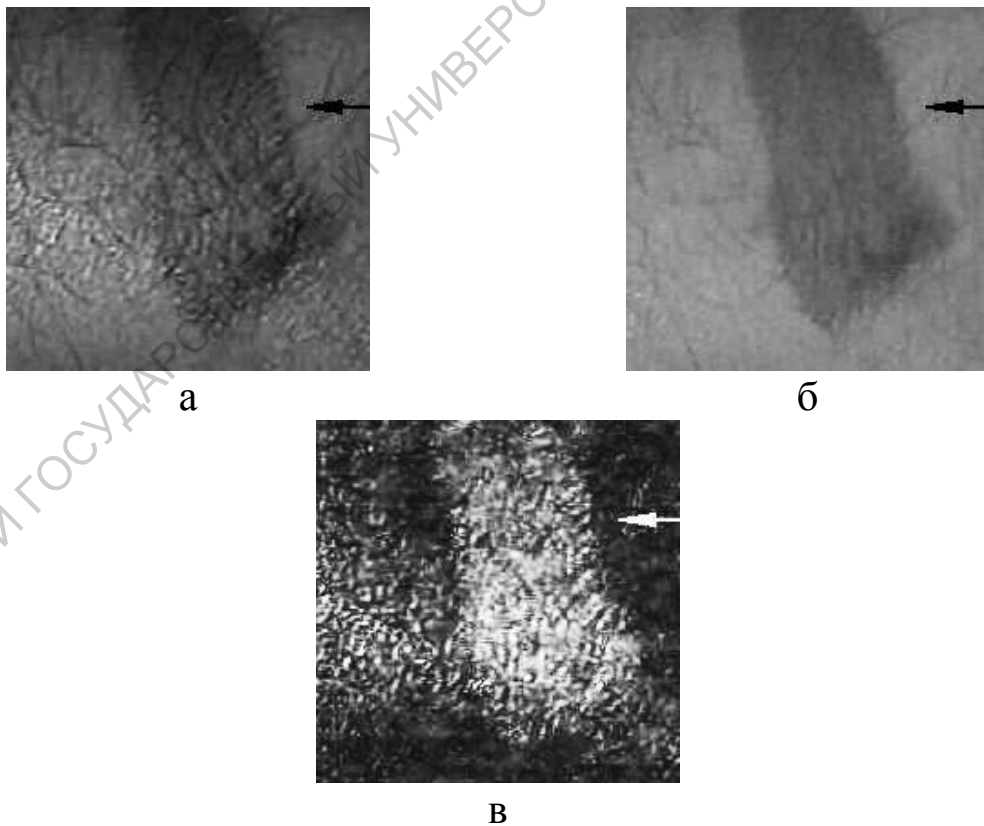


Рис. 59. Поляризационные изображения участка кожи с ожогом при разных параметрах визуализации: (а) ко-поляризованный компонент диффузно отраженного света; (б) кросс-поляризованный компонент; (в) степень остаточной поляризации

С другой стороны, пигментированная *nevus* может рассматриваться как содержащая меланин область, располагаемая на некоторой глубине внутри кожной ткани. Меланин, лежащий в более глубоких слоях кожи, уже не может рассматриваться как поглощающий фильтр, одинаково ослабляющий $I_{\parallel}(x,y)$ и $I_{\perp}(x,y)$ компоненты. Поэтому в поляризационном изображении, сформированном с использованием в качестве параметра визуализации степени поляризации, меланин присутствует (рис. 58).

Глубина поляризационной визуализации кожи оценивается как 100-150 мкм [95].

Рисунки 59 представляют монохроматические изображения участка кож с ожогом, полученные в спектральной полосе поглощения гемоглобина (в этом случае перед объективом видеокамеры помещался интерференционный фильтр с длиной волны 550 нм), для поляроидов с параллельной (рис. 59а) и ортогональной (рис. 59б) ориентацией, а также изображение, где параметром визуализации служит степень остаточной поляризации (рис. 59в). Нужно отметить, что контраст последнего изображения (приблизительно 0.49) значительно превышает контраст других изображений (0.08-0.13), что показывает высокую эффективность этого метода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на сложность процессов распространения и взаимодействия света с кожей, результатом которых является формирование спектрального состава обратно рассеянного кожей излучения или ее автофлуоресценции, являются вполне оправданными определенные упрощения, позволяющие количественно оценивать происходящие в коже морфофункциональные изменения. Простые модели кожи эффективны при анализе спектров отражения и АФ кожи, измеренных в определенных диапазонах спектра, где в процессе формирования спектров доминируют хромофоры с *a priori* известными оптическими характеристиками (меланин, гемоглобин, билирубин, вода). Эти модели позволяют с большой точностью количественно оценить содержание хромофоров в реальном масштабе времени.

Дополнительная информация о состоянии кожи может быть получена, если измерения спектров отражения кожи дополняются измерением спектров ее АФ. В частности, очень перспективным является привлечение спектров отражения кожи для коррекции спектров ее АФ.

Цветовая и поляризационная визуализация кожи являются одними из перспективных методов диагностики кожи, позволяющих анализировать пространственные изменения кожной ткани.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Кожа (строение, функция, общая патология, терапия) / Под ред. А. М. Чернуха, Е. П. Фролова. – М.: Медицина, 1982. – 336 с.
2. Odland G. F. Structure of the skin // *Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin* / Ed. L. A. Goldsmith. Oxford: Univ. Press, 1991. P. 3-62.
3. Нобл У.К. Микробиология кожи человека. – М.: Медицина, 1986. - 493 с.
4. Довжанский С.И., Утц С.Р. Псориаз или псориатическая болезнь. – Саратов: Изд-во Саратов ун-та, 1992. - Ч. 1, 2. – 280 с.
5. Elias P.M. Epidermal lipid, membranes, and keratinization // *Int. J. Dermatol.* 1981. Vol. 20. P. 1-19.
6. Oikarinen A. Aging of the skin connective tissue: how to measure the biochemical and mechanical properties of aging dermis // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 1994. Vol. 10. P. 603-608.
7. Чернух А.М., Александров П.Н., Алексеев О.В. Микроциркуляция.—М.: Медицина, 1975.— 452 с.
8. Калантаевская К.Л. Морфология и физиология кожи человека. – Киев: Здоровье, 1972. – 266 с.
9. Тучин В.В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. 2-е издание. – М.: Физматлит, 2010.
10. Anderson R.R., Parrish J.A. The optics of the human skin // *J. Invest. Dermatol.* 1981. Vol. 77. P. 13-19.
11. Van Gemert M.J.C., Jacques S.L., Sterenborg H.J.C.M., Star W. Skin optics // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1989. Vol. 36. N 12. P. 1146-1154.
12. Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. – М.: Высш. шк., 1989. – 189 с.
13. Tuchin V.V. *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis.* - Bellingham WA: SPIE Press, 2000. Vol. TT38.
14. Кочубей В.И., Конюхова Ю.Г. Методы спектральных исследований крови и костного мозга. – Саратов: Изд-во Саратов ун-та, 2000. – 72 с.
15. Andersen P.H., Bjerring P. Remittance spectroscopy: hardware and measuring principle // *Bioengineering of the skin: cutaneous blood flow and erythema* / Eds. E. Berardesca, P. Elsner, H. I. Maibach. New York: CRC Press. 1995. P. 231-241.

16. Kollias N., Bager A.N. Spectroscopic characteristics of human melanin in vivo // *J. Invest. Dermatol.* 1985. Vol. 85. P.38-42.
17. Kollias N., Bager A.N. On the assessment of melanin human skin in vivo // *Photochem. Photobiol.* 1986. Vol. 43. P. 49-54.
18. Kollias N., Bager A.N. Absorption mechanisms of human melanin in the visible, 400-720 nm // *J. Invest. Dermatol.* 1987 Vol. 89. P. 384-388.
19. Kollias N. The spectroscopy of human melanin pigmentation // *Melanin: Its Role in Human Photoprotection.* KS, Valdenmar Publishing Co., 1995. P. 31-38.
20. Prahl S. <http://omlc.ogi.edu>.
21. Dawson J. B., Barker J. W., Ellis D. J. et al. A theoretical and experimental study of light absorption and scattering by in vivo skin // *Phys. Med. Biol.* 1980. Vol. 25. P. 695-709.
22. Черницкий Е.А., Слобожанина Е.И. Спектральный анализ в медицине. – Минск: Наука и техника, 1980. – 141 с.
23. Konig K., Ruck A., Scheckenburger H. Fluorescence detection and photodynamic activity of endogeneous protoporphyrin in human skin // *Opt. Eng.* 1997. Vol. 31. N 7. P. 1470-1474.
24. Оптическая биомедицинская диагностика: Учеб. пособие: в 2 томах / пер. с англ. под ред. В.В. Тучина. – М.: Физматлит, 2007.
25. Cheong W.-F., Prahl S.A., Welch A.J. A review of the optical properties of biological tissues // *IEEE Quant. Electr.* 1990. Vol. 26. N 12. P. 2166-2185.
26. Кузьмин В.В., Жаров В.П. Основные принципы и особенности транскутанной «отражательной» оксиметрии // *ЖПС.* 1993. № 3. С. 36-42.
27. Jacques S.L. The role of skin optics in diagnostic and therapeutic uses of lasers // *Lasers in Dermatology* / Ed. R. Steiner. Berlin: Springer-Verlag. 1991. P. 1-21.
28. Долотов Л.Е., Синичкин Ю.П. Особенности применения волоконно-оптических датчиков в спектральных измерениях биологических тканей // *Оптика и спектр.* 2013. Т. 115. № 2. С. 187-193..
29. Farrell T.J., Patterson M.S., Wilson B. A diffuse theory model of spatially resolved, steady-state diffuse reflectance for the noninvasive determination of tissue optical properties in vivo // *Med. Phys.* 1992. Vol. 19. P. 879-888.
30. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии / Пер. с англ. – М.: Мир, 1986. – 496 с.
31. Utz S. R., Knuschke P., Sinichkin Yu.P. In vivo evaluation of sunscreens by spectroscopic methods // *Skin Res. Technol.* 1996. Vol. 2. N 3. P. 114-121.
32. Zeng H., MacAulay C., McLean D.I., Palcic B. Spectroscopy and microscopy studies of skin tissue autofluorescence emission // *Proc. SPIE.* 1995. Vol. 2324. P.198-207.
33. Утц С.Р., Барт Й., Кнушке П. Флуоресцентная спектроскопия в дерматологии // *Изв. АН, Сер. Физич.* 1995. Т. 59. № 6. С. 156-160.

34. Lakowicz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2nd ed. - New York: Kluwer Academic / Plenum Press, 1999.
35. Sterenborg H.J.C.M., Motamedi M., Wagner R.F. et al. In vivo fluorescence spectroscopy for diagnosis of skin diseases // Proc SPIE. 1995. Vol. 2324. P. 32-38.
36. Odetti P.R., Borgoglio A., Rolandi R. Age-related increase of collagen fluorescence in human subcutaneous tissue // Metabolism. 1992. Vol. 41. N 6. P. 655-658.
37. Синичкин Ю.П., Утц С.Р., Пилипенко Е.А. Спектроскопия кожи человека in vivo: 2. Спектры флуоресценции // Оптика и спектр. 1996. Т. 80. № 3. С. 431-438.
38. Sinichkin Yu.P., Utz S.R., Mavlutov A.H., Pilipenko H.A. In vivo fluorescence spectroscopy of the human skin: experiments and models // J. Biomed. Opt. 1998. Vol. 3. P. 201-211.
39. Нахаева И.А., Мохаммед Р.М., Зюрюкина О.А., Синичкин Ю.П. Влияние внешней механической компрессии на оптические свойства кожной ткани in vivo // Оптика и спектроскопия. 2014. Т. 117. № 3. С. 522-528.
40. Ermakov I.V., Gellermann W. Dermal carotenoid measurements via pressure mediated reflection spectroscopy // J. Biophotonics. 2012. Vol. 5(7). P. 559-570.
41. Differ B.L., Oliver R.J., Farr P.M. A portable instrument for quantifying erythema induced by ultraviolet radiation // Br. J. Dermatol. 1984. Vol. 111. P. 663-672.
42. Feather J.W., Haijzadeh M., Dawson J.B. et al. A portable scanning reflectance spectrophotometer using visible wavelengths for rapid measurement of skin pigments // Phys. Med. Biol. 1989. Vol. 34. P. 807-820.
43. Kopola H., Lahti A., Myllyla R.A., Hannuksela M. Two-channel fiber optic skin erythema meter // Opt. Eng. 1993. Vol. 32. N 2. P. 222-226.
44. Strange M., Cassady G. Neonatal transcutaneous bilirubinometry // Clin. Perinatol. 1985. Vol. 12. P. 51-62.
45. Wan S., Parrish J.A., Jaenicke K.F. Quantitative evaluation of ultraviolet induced erythema // Photochem. Photobiol. 1983. Vol. 37. P. 643-648.
46. Edwards C., Heggie R. A small state meter for measuring melanin pigmentation // The Environmental Threat to the Skin / Eds. R. Marks, G. Plewig. M. Dunitz, 1992. P. 149-154.
47. Feather J.W., Ryatt K.S., and Dawson J.B. Reflectance spectrophotometric quantification of skin color changes induced by topical corticosteroid preparations // Br J. Dermatol. 1982. Vol. 106. 3. 436-443.
48. Ryatt K S., Feather J.W., Dawson J.B., and Cotrell J.A. The usefulness of reflection spectrophotometric measurements during psoralens and ultraviolet A therapy for psoriasis // J. Am. Acad. Dermatol. 1985. Vol. 85. 3. 558-562.

49. Синичкин Ю. П., Утц С. Р., Долотов Л.Е. и др. Методика и прибор для оценки степени эритемы и меланиновой пигментации кожи человека // Радиотехника. 1997. № 4. С. 77-81.
50. Dwyer T., Blizzard L., Ashbolt R., et al. Cutaneous melanin density of Caucasians measured by spectrophotometry and risk of malignant melanoma, basal cell carcinoma, and squamous cell carcinoma of the skin // *Am. J. Epidemiol.* 2002. Vol. 155. P. 614–621.
51. Stamatias G.N., Zmudzka B.Z., Kollias N., and Beer J.Z. Non-invasive measurements of skin pigmentation in situ // *Pigment Cell Res.* 2004. Vol. 17. P. 618–626.
52. Долотов Л.Е., Синичкин Ю.П., Тучин В.В., Альтшулер Г.Б., Ярославский И.В. Особенности диффузного отражения кожи лица человека для лазерных и нелазерных источников в видимой и ближней инфракрасной области спектра // *Квантовая электроника.* 2011. Т. 41. № 4-5. С. 329-334.
53. Millikan G.A. The oxymeter, an instrument for measuring continuously the oxygen saturation of arterial blood in man // *Rev. Sci. Instr.* 1942. Vol. 13. P. 434-444.
54. Nakajima S., Hirai Y., Takase H., et al. New pulsed type earpiece oximeter // *Kokyu To Junkan.* 1975. Vol. 23. P. 709-713.
55. Kelleher J.F. Pulse oximetry // *J. Clin. Monit.* 1989. Vol. 5. P. 37-62.
56. Mendelson Y. Pulse oxymetry: theory and applications for noninvasive monitoring // *Clin. Chem.* 1992. Vol. 38. P. 1601-1607.
57. Yoxall C.W., Weindling A.M. Measurement of venous saturation in the adult human forearm by near infrared spectroscopy with venous occlusion // *Med. & Biol. Eng. & Comput.* 1997. Vol. 35. P. 331-336.
58. Suzuki S., Takasaki S., Ozaki T., Kobayashi Y. A tissue oxygenation monitor using NIR spatially resolved spectroscopy // *Proc. SPIE.* 1999. Vol. 3597. P. 582-592.
59. De Blasi R.A., Ferrary M., Natali A., et al. Non-invasive measurement of forearm blood flow and oxygen consumption by near infrared spectroscopy // *J. Appl. Physiol.* 1994. Vol. 76. P. 1388-1393.
60. Matcher S.J., Cooper C.E. Absolute quantification of deoxyhaemoglobin concentration in tissue near infrared spectroscopy // *Phys. Med. Biol.* 1994. Vol. 39. P. 1-17.
61. Mendelson Y., Ochs B.D. Noninvasive pulse oximetry utilizing skin reflectance photoplethysmography // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1988. Vol. 35. P. 798-805.
62. Liu H., Boas D.A., Zhang Yu. et al. Determination of optical properties and blood oxygenation in tissue using continuous NIR light // *Phys. Med. Biol.* 1995. Vol. 40. P. 1983-1993.
63. Douplik A.Yu., Loschenov V.B., Stratonnikov A.V. The study of photodynamic session in whole human blood in vitro // *Proc. OSA.* 1998. TMC4-71-74.

64. Haijzahan M., Feather J.W., Dawson J.B. An investigation of factors affecting the accuracy of in vivo measurements of skin pigments by reflectance spectroscopy // *Phys. Med. Biol.* 1990. Vol. 35. P. 1301-1315.
65. Утц С.Р., Кнушке П., Синичкин Ю.П. Оценка фотозащитных препаратов с помощью in vivo флуоресцентной спектроскопии // *Вестн. дерматологии.* 1996. № 2. С. 15-21.
66. Sayre R.M., Agin P.P. A method for determination of UVA protection for normal skin // *J. Am. Acad. Dermatol.* 1990. Vol. 23. P. 429-440.
67. Pathak M.A, Fitzpatric T.B., Parrish J.A. Topical and systematic approaches to protection of human skin against harmful effects of solar radiation // *The Science of Photomedicine* / Eds. J. D. Regan and J A. Parish. New York: Plenum Press, 1982.
68. Zeng H., MacAulay C., McLean D.I., Palcic B. A novel microspectrophotometer and its biomedical application // *Opt. Eng.* 1993. Vol. 32. N 8. P. 1809-1814.
69. Zeng H., MacAulay C., Palcic B., McLean D.I. A computerized autofluorescence and diffuse reflectance spectroanalyser system for in vivo skin studies // *Phys. Med. Biol.* 1993. Vol. 38. P. 231-240.
70. Zeng H., MacAulay C., McLean D.I., Palcic B. Spectroscopic and microscopic characteristics of human skin autofluorescence emission // *Photochem. Photobiol.* 1995. Vol 61. N 6. P. 639-645.
71. Edwards E.A., Duntley S.Q. The pigments and color of human living skin // *Amer. J. Anat.* 1939. Vol. 65. P. 1-33.
72. Elsner P. Chromametry: hardware, measuring principles, and standardization of measurements // *Bioengineering of the Skin: Cutaneous Blood Flow and Erythema* / Eds. E. Berardesca, P. Elsner, H. I. Maibach. New Work: CRC Press. 1995. P. 247-252.
73. Kollias N. The physical basis of skin color and its evaluation // *Clin. Dermatol.* 1995. Vol. 13. P. 361-367.
74. Kienle A., Lilge L., Vitkin I. A. et al. Why do veins appear blue? A new look at an old question // *Appl. Opt.* 1998. Vol. 35. N 7. P. 1151-1160.
75. Land E.H. Recent advances in retinex theory // *Vision Res.* 1986. Vol. 26. P. 7-21.
76. Мещков В.В., Матвеев А.Б. Основы светотехники: Учеб. пособие для вузов: В 2 ч. Ч. 2. Физиологическая оптика и колориметрия. – М.: Энергоатомиздат, 1989. – 432 с.
77. Seitz J.C., Whitmore C.G. Measurement of erythema and tanning responses in human skin using a tri-stimulus colorimeter // *Dermatologica*, 1988. Vol. 177. No. 2. P. 70-75.
78. el-Gammal S., Hoffman K., Steiert P. et al. Objective assessment of intra- and inter-individual skin color variability: an analysis of human skin reaction to sun and UVB / in *The Environmental Threat to the Skin*, R. Marks, and G. Plewig (eds), pp. 99-115, Martin Dunitz (1992).

79. Takiwaki H., Miyamoto H., and Ahsan K. A simple method to estimate CIE- $L^*a^*b^*$ values of the skin from its videomicroscope image // *Skin Res. Technol.* 1997. Vol. 3. P. 42-44.
80. Takiwaki H., Ovengaard L., Serup J. Comparison of narrow-band reflectance spectrophotometric and tristimulus colorimetric measurements of skin color // *Skin Pharmacol.* 1994. Vol. 7. P. 217–225.
81. Clarys P., Alawaeters K., Lambrecht R., Barel A.O. Skin color measurements: comparison between three instruments: the Chromameter, the DermaSpectrometer, and the Mexameter // *Skin Res. Technol.* 2000. Vol. 6. P. 230-238.
82. Park S.B., Suh D.H., Youn J.I. A long-term time course of colorimetric evaluation of ultraviolet light-induced skin reactions // *Clin. Exp. Dermatol.* 1999. Vol. 24. P. 315-320.
83. Alaluf S., Atkins D., Barrett K., et al. The impact of epidermal melanin on objective measurements of human skin color // *Pigment. Cell Res.* 2002. Vol. 15. P. 119-126.
84. Shriver M.D., Parra E.J. Comparison of narrow-band reflectance spectroscopy and tristimulus colorimetry for measurements of skin and hair color in persons of different biological ancestry // *Am. J. Phys. Anthropol.* 2000. Vol. 112 P. 17-27.
85. Stamatias G.N., Zmudzka B.Z., Kollias N., and Beer J.Z. Non-invasive measurements of skin pigmentation in situ // *Pigment Cell Res.* 2004. Vol. 17. P. 618–626.
86. Stamatias G.N., Kollias N. Blood stasis contributions to the perception of skin pigmentation // *J. Biomed. Opt.* 2003. Vol. 9. P. 315-322.
87. Takiwaki H., Miyaoka Y., Kohno H., Arase S. Graphic analysis of the relationship between skin colour change and variations in the amounts of melanin and haemoglobin // *Skin Res. Tech.* 2002. Vol. 8. P. 78-83.
88. Adhoute H., Grossman R., Cordier M., Soler B. Chromametric quantification of pigmentary changes in the solar lentigo after sunlight exposure // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 1994. Vol. 10. P. 93-96.
89. Chardon A., Cretoi I., Hourseau C. Skin colour typology and suntanning pathways // *Int. J. Cosm. Sci.* 1991. Vol. 13. P. 191-208.
90. Kenet R.D. Digital imaging in dermatology // *Clinics Dermatol.* 1995. Vol. 13. P. 381-392.
91. Takiwaki H., Shirai S., Kanno Y. et al. Quantification of erythema and pigmentation using a videomicroscope and a computer // *Brit. J. Dermatol.* 1994. Vol. 131. P. 85-92.
92. Долотов Л.Е., Зимняков Д.А., Синичкин Ю.П. Компьютерная визуализация пространственного распределения хромофоров кожной ткани // *Биомедицинские технологии и радиоэлектроника.* 2004. № 5-6. С. 89-95.
93. Tur E. Skin pharmacology. / in *Bioengineering of the Skin: Cutaneous Blood Flow and Erythema*, E. Berardesca, P. Elsner, and H. I. Maibach (eds), pp. 259-268, CRC Press, New Work (1995).

94. Barel A.O., Clarys P., et al. The Visi-Chroma VC-100: a new imaging colorimeter for dermatocosmetic research // *Skin Res. Tech.* 2001. Vol. 7. P. 24-3.
95. Jung B., Choi B., Durkin A.J., et al. Characterization of port wine stain skin erythema and melanin content using cross-polarized diffuse reflectance imaging // *Lasers Med. Sci.* 2004. Vol. 34. P. 174-181.
96. Lucchina L.C., Kollias N., Gillies R., et al. Fluorescence photography in the evaluation of acne // *J. Amer. Acad. Dermatol.* 1996. Vol. 35. P. 58-63.
97. Tuchin V.V., Wang L., and Zimnyakov D.A. *Optical Polarization in Biomedical Applications.* - Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, N.Y., 2006.
98. Kollias N. Polarized light photography of human skin / in *Bioengineering of the Skin: Skin Surface Imaging and Analysis*, K.-P. Wilhelm, P. Elsner, E. Berardesca, and H. I. Maibach (eds), pp. 95-106, CRC Press, New York (1997).
99. Jacques S.L., Ramella-Roman J.C., and Lee K. Imaging skin pathology with polarized light // *J. Biomed. Optics.* 2002. Vol. 7(3). P. 329-340.
100. Zimnyakov D.A., and Sinichkin Yu.P. A study of polarization decay as applied to improved imaging in scattering media // *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* 2000. Vol. 2. P. 200-208.
101. Зимняков Д.А., Синичкин Ю.П. Поляризационная визуализация рассеивающих сред с помощью непрерывного лазерного излучения // *Оптика и спектроскопия.* 2000. Т. 88. №6. С. 1015-1022.
102. Zimnyakov D.A., Sinichkin Yu.P. Location of hidden inhomogeneities by measuring the polarization degree: potentialities and restrictions // *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* 2000. Vol. 2. P. 200-208.
103. Зимняков Д.А., Синичкин Ю.П. О предельном значении степени остаточной поляризации некогерентно обратно рассеянного излучения при многократном рассеянии линейно поляризованного света // *Оптика и спектроскопия.* 2001. Т. 91. № 1. С. 113-119.
104. Zimnyakov D.A., Sinichkin Yu.P., Zakharov P.V., Agafonov D.N. Residual polarization of non-coherently backscattered linearly polarized light: the influence of the anisotropy parameter of scattering medium // *Waves in random media.* 2001. Vol. 11. P. 395-412.
105. Зимняков Д.А., Синичкин Ю.П., Киселева И.В., Агафонов Д.Н.. О влиянии поглощения многократно рассеивающих сред на степень остаточной поляризации обратно рассеянного излучения // *Оптика и спектроскопия.* 2002.
106. Синичкин Ю.П., Зимняков Д.А., Агафонов Д.Н., Кузнецова Л.В. Визуализация рассеивающих сред при обратном рассеянии линейно поляризованного немонахроматического света // *Оптика и спектроскопия.* 2002. Т. 93. №1. С.
107. Зимняков Д.А., Синичкин Ю.П., Тучин В.В. Поляризационная отражательная спектроскопия биотканей: диагностические приложения // *Известия Вузов. Радиофизика.* 2004. № 10-11. С. 957-975.

108. Dolotov L.E., Sinichkin Yu.P., Tuchin V.V., Utz S.R., Altshuler G.B., Yaroslavsky I.V. Design and evaluation of a novel portable erythema-melanin-meter // *Lasers Surg. Med.* 2004. Vol. 34(2). P. 127-135.
109. Kollias N. Polarized light photography of human skin / in *Bioengineering of the Skin: Skin Surface Imaging and Analysis*, K.-P. Wilhelm, P. Elsner, E. Berardesca, and H. I. Maibach (eds), pp. 95-106, CRC Press, New York (1997).
110. Anderson R. R. Polarized light examination and photography of the skin // *Arch Dermatol.* 1991. Vol. 127. P. 1000-1005.
111. Phillips S.B., Muccini J.A., Bilden P.F., et al. Spectroscopic evaluation of the change in erythema accompanying treatment of psoriatic plaques with a topical steroid // *J. Invest. Dermatol.* 1993. Vol. 100. P. 543.
112. Muccini J.A., Kollias N., Phillips S.B., et al. Polarized light photography in the evaluation of photoaging // *J. Am. Acad. Dermatol.* 1`995. Vol. 33. P. 765-769.
113. Muccini J.A., Kollias N., Phillips S.B., et al. // Polarized light photography in the evaluation of photoaging // *J. Am. Acad. Dermatol.* 1`995. Vol. 33. P. 765-769.
114. Bilden P.F., Phillips S.B., Kollias N., Muccini J.A., and Drake L.A. Polarized light photography of acne vulgaris // *J. Invest. Dermatol.* 1992. Vol. 98. P. 606.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	3
1. КОЖНАЯ ТКАНЬ КАК ПРЕДМЕТ ИСЛЕДОВАНИЯ МЕТОДАМИ ОТРАЖАТЕЛЬНОЙ И ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ	6
Структура кожи	6
Формирование спектров отражения кожи	18
Формирование спектров флуоресценции кожи	29
2. ПРОСТЫЕ ОПТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА	40
Модель для анализа спектров отражения	41
Модель для анализа спектров автофлуоресценции	44
3. КОМБИНИРОВАННЫЙ МЕТОД ОТРАЖАТЕЛЬНОЙ И ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КОЖИ IN VIVO.	48
Определение индексов эритемы и меланина	48
Определение степени оксигенации гемоглобина крови	55
Исследование эффективности фотозащитных композиций	63
Коррекция спектров флуоресценции на эффект внутреннего поглощения	70
4. ЦВЕТОВОЕ ВОСПРИЯТИЕ ОТРАЖЕННОГО КОЖЕЙ БЕЛОГО СВЕТА И АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ КОЖИ	71
Цветовой анализ спектров отражения и флуоресценции кожи	71
Цветовой анализ видеоизображения кожи	81
5. ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ КОЖНОЙ ТКАНИ	86
Распространение линейно поляризованного излучения в рассеивающей среде: феноменологический подход	87
Поляризационная отражательная спектроскопия	91
Поляризационная визуализация кожной ткани	96
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	101

Научное издание

Синичкин Юрий Петрович
Утц Сергей Рудольфович

**IN VIVO ОТРАЖАТЕЛЬНАЯ И ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ
СПЕКТРОСКОПИЯ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА**

Оригинал-макет подготовлен Ю. П. С и н и ч к и н ы м
Работа издана в авторской редакции

Изд. лиц. ЛР № 020305 от 10.01.18. Подписано в печать 15.01.18
Формат 60x90 ¹/₁₆. Бумага Сыктывкарская. Печать офсетная.
Гарнитура Times New Roman Усл. печ. л. 6,75.

Издательство Саратовского государственного университета.
410026, Саратов, Астраханская, 83



Юрий Петрович Синичкин, доктор физико-математических наук, профессор кафедры оптики и биофотоники Саратовского государственного университета, Член международного общества по оптической технике SPIE.

Его научные и педагогические интересы лежат в области биомедицинской оптики, лазерной медицины, нелинейной динамики лазерных и оптических систем, физики лазерных и оптических измерений. Он автор более 150 научных статей и изобретений, пяти учебных пособий.

Сергей Рудольфович Утц, профессор, доктор медицинских наук, зав. кафедрой дерматовенерологии и косметологии Саратовского государственного медицинского университета, главный врач Клиники кожных и венерологических болезней СГМУ. Член международного общества по оптической технике SPIE. Член Всероссийского общества дермато-венерологов.

Его научные интересы лежат в области биомедицинской оптики, лазерной медицины, разработки и применения новых методов диагностики и терапии в дерматологии и косметологии. Он автор и соавтор более 150 научных статей и изобретений, четырех научных монографий



ИЗДАТЕЛЬСТВО
САРАТОВСКОГО
УНИВЕРСИТЕТА