

Оценка оксигенации в поверхностных слоях биотканей на основе оптической диффузионной спектроскопии с автоматизированной калибровкой измерений

М.С.Клешнин, И.В.Турчин

Для оценки кислородного насыщения (оксигенации) в поверхностных слоях биотканей (на глубине до 4 мм) предложена компактная система на основе оптической диффузионной спектроскопии (ОДС) с отражательной геометрией измерений в диапазоне длин волн 520–590 нм. Экспериментальное ОДС-устройство создано на базе широкополосного светодиодного источника зондирующего излучения и спектрометра с использованием волоконно-оптической системы доставки излучения. Для расчета оксигенации предложен оригинальный метод, основанный на измерении интенсивности рассеянного света при четырех различных расположениях источника и детектора на поверхности исследуемого объекта (метод четырех измерений). Разработанный метод позволяет учесть аппаратные параметры устройства (оптический контакт с тканью, переходные характеристики системы доставки излучения) и не требует каких-либо дополнительных калибровочных измерений. Результаты апробации ОДС-системы с использованием метода четырех измерений для мониторинга кислородного насыщения ткани при искусственной закупорке сосудов соответствовали опубликованным данным других научных групп.

Ключевые слова: оптическая диффузионная спектроскопия, кислородное насыщение, оптика биологических тканей, автоматизация измерений.

1. Введение

На сегодняшний день уже доказано, что течение целого ряда заболеваний (опухольные процессы [1, 2], сахарный диабет [3, 4], а также восстановление после ангиохирургических и пластических операций [5, 6]) в большой степени обусловлено эффективностью доставки и утилизации кислорода, поэтому задача своевременной диагностики кислородного насыщения тканей – одна из наиболее актуальных в современной медицине. Традиционным подходом к оценке кислородного насыщения (оксигенации) биоткани является полярографическое измерение парциального давления кислорода [7], однако это инвазивная и длительная процедура. Эффективным методом неинвазивного наблюдения оксигенации тканей служит позитронно-эмиссионная томография [8], но это очень дорогостоящий и технически сложный метод. В настоящее время для исследования кислородного насыщения тканей активно развивается оптическая диффузионная спектроскопия (ОДС) [9–16], которая сочетает в себе неинвазивность и сравнительно низкую стоимость.

Метод ОДС основан на расчете основных показателей (коэффициентов поглощения и транспортного рассеяния), определяющих распространение многократно рассеянного света, по измерениям спектральной интенсивности зондирующего излучения, прошедшего через исследуемый объект [9, 10]. Этим методом можно определить кислородное насыщение ткани по соотношению парциальных вкла-

дов поглощения окси- и дезоксигемоглобина в общий показатель поглощения исследуемого объекта [11, 17]. Поэтому корректное решение обратной задачи является ключевой проблемой ОДС.

В настоящее время известно несколько эффективных подходов к решению обратной задачи ОДС. Например, применение амплитудно-модулированного [12, 13] или импульсного [13, 14] зондирующего излучения позволяет разделить поглощение и транспортное рассеяние по временным параметрам регистрируемого сигнала (фазовому сдвигу или форме импульса) при фиксированном расстоянии между источником и приемником света. Однако для исследований локальной оксигенации тканей в небольшом объеме (100–1000 мм³), т. е. при небольших (менее 1 см) расстояниях между источником и приемником, использование этих подходов не оправдано, поскольку в случае модулированного зондирующего излучения фазовые сдвиги волн фотонной плотности будут существенны лишь при очень высокой частоте модуляции, превышающей 1 ГГц, а в случае импульсного излучения размытие зондирующего импульса составит не более 200 пс. Таким образом, в обоих перечисленных случаях аппаратная реализация ОДС-системы будет сложной и дорогостоящей, поэтому для оценки оксигенации в поверхностном слое ткани целесообразно использовать непрерывное зондирующее излучение, но проводить несколько измерений при различных расстояниях между источником и приемником света [15, 16]. При этом информативность может быть существенно увеличена за счет применения широкополосных источников зондирующего излучения и спектрометров, что позволит различать большое число хромофоров. Кроме того, использование отражательной геометрии измерений дает возможность оценить локальную оксигенацию поверхностных участков ткани вне зависимости от толщины исследуемого объекта. К сожалению, в этом случае задача разделения поглощения и транспортного рас-

М.С.Клешнин, И.В.Турчин. Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики РАН, Россия, 603950 Н.Новгород, ул. Ульянова, 46;
e-mail: m.s.kleshnin@gmail.com, ilya@ufp.appl.sci-nnov.ru

Поступила в редакцию 23 декабря 2018 г., после доработки – 28 января 2019 г.

сеяния уже не имеет аналитического решения, поэтому для расчета оксигенации следует применять численные методы [18].

Одной из основных сложностей технической реализации ОДС является калибровка измерений, т. е. учет аппаратных параметров (фоновое освещение, формы спектра источника света, коэффициента усиления приемного тракта, переходных характеристик системы доставки излучения, вариаций оптического контакта с тканью) при получении экспериментальных данных. Как правило, для предварительной калибровки ОДС-систем применяют тестирование на эталоне (фантоме с известными рассеивающими и поглощающими свойствами, близкими к параметрам ткани). Однако данная процедура требует времени и не учитывает изменение аппаратных параметров в ходе исследования, например, вследствие нагрева, искривления волокон, загрязнения оптоволокна или объекта и др.

В настоящей работе предлагается оригинальный метод четырех измерений, основанный на регистрации диффузно рассеянного света при четырех различных пространственных положениях источника и приемника на поверхности исследуемого объекта. Данный подход позволяет автоматически учитывать аппаратные параметры устройства в ходе измерений и не требует каких-либо дополнительных калибровочных измерений. Для его реализации создана ОДС-система на базе широкополосного светодиодного источника зондирующего излучения и спектрометра. Устройство оснащено щупом, состоящим из четырех волокон, выходные торцы которых расположены на одной прямой на равных расстояниях друг от друга. Для измерений волоконный щуп приводится в непосредственный контакт с биотканью. Для оценки точности расчета оксигенации на основе разработанного подхода применялось численное моделирование спектроскопических измерений. Апробация созданной ОДС-системы была проведена на реальных биологических объектах *in vivo*.

2. Материалы и методы

2.1. Расчет кислородного насыщения на основе спектроскопических измерений

Распространение оптического излучения в биологических тканях с высокой точностью описывается диффузионным приближением уравнения переноса излучения (УПИ) [19], которое имеет аналитическое решение для интенсивности диффузно рассеянного света I в однородной безграничной мутной среде [19, 20]:

$$I = I_0 \frac{\mu_a + \mu'_s}{r} \exp[-\sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)} r], \quad (1)$$

где μ_a и μ'_s – показатели поглощения и транспортного рассеяния света; r – расстояние до точечного источника зондирующего излучения с интенсивностью I_0 . При учете аппаратных параметров ОДС-устройства с волоконной системой доставки излучения для отражательной геометрии измерений данное выражение принимает вид

$$I = A_S A_R I_0 \frac{\mu_a + \mu'_s}{d_{S,R}} \exp[-\sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)} d_{S,R}]. \quad (2)$$

Здесь $d_{S,R}$ – расстояние между выходными торцами волокон от источника и приемника излучения, а A_S и A_R – переходные характеристики ОДС-устройства на участках

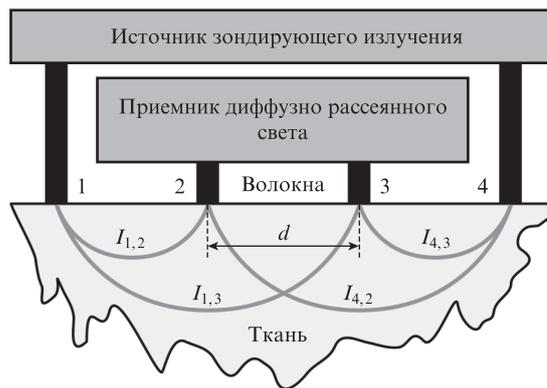


Рис.1. Схема метода четырех измерений ($I_{S,R}$ – зарегистрированная интенсивность диффузно рассеянного света при подключении источника к волокну S, а приемника – к волокну R).

соответственно от источника зондирующего излучения до исследуемого объекта и от объекта до приемника диффузно рассеянного света. Переходные характеристики зависят от таких факторов, как качество оптического контакта волокон с объектом, а также от потери и переотражения в волокнах, поэтому их сложно учесть при калибровке ОДС-устройства с помощью эталонного фантома.

В настоящей работе для учета переходных характеристик ОДС-системы предлагается использовать специальную геометрию измерений, представленную на рис.1. Идея предложенного подхода заключается в применении щупа из четырех волокон с фиксированным расстоянием d между соседними выходами. При этом каждое из волокон может быть подключено к источнику зондирующего излучения или приемнику диффузно рассеянного света, поэтому индексы S и R в выражении (2) будут соответствовать номерам волокон, соединенных с источником и приемником. Таким образом, если провести измерения при последовательном подключении источника к волокнам 1 и 4, а приемника – к волокнам 2 и 3, то линейная комбинация полученных экспериментальных данных позволит исключить аппаратные параметры из выражения (2) и привести его к виду:

$$2 \exp[\sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)} d] = \sqrt{\frac{I_{1,2} I_{4,3}}{I_{1,3} I_{4,2}}}. \quad (3)$$

Для расчета оксигенации StO_2 с помощью выражения (3) удобно использовать стандартную аппроксимацию транспортного показателя рассеяния степенной функцией длины волны λ , а показатель поглощения представить взвешенной суммой показателей поглощения компонент исследуемого объекта [20, 21]:

$$\mu'_s = \beta \left[\frac{\lambda_0}{\lambda} \right]^\alpha, \quad \mu_a = (1 - Tnb) \mu_a^{oth}(\lambda) + Tnb [StO_2 \mu_a^{HbO}(\lambda) + (1 - StO_2) \mu_a^{Hb}(\lambda)], \quad (4)$$

где Tnb – общая доля гемоглобина среди хромофоров исследуемого объекта; α , β , λ_0 – коэффициенты аппроксимации показателя транспортного рассеяния; μ_a^{HbO} , μ_a^{Hb} – нормированные табличные показатели поглощения окси- и дезоксигемоглобина; μ_a^{oth} – суммарный показатель поглощения остальных хромофоров (вода, липиды, меланин) (рис.2) [22]. Тогда кислородное насыщение ткани определяется численным решением задачи оптимизации:

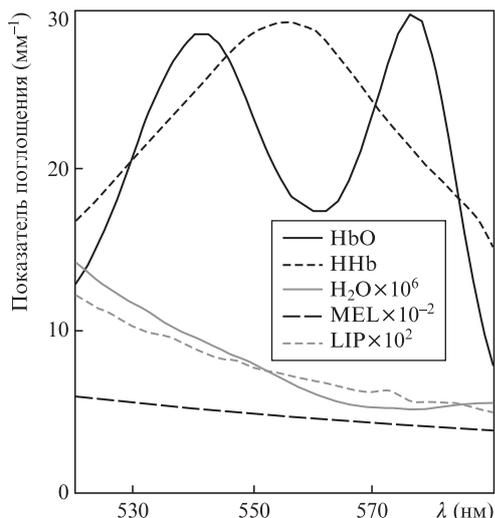


Рис.2. Спектры поглощения света для основных хромофоров биоткани: воды (H_2O), жиров (LIP), меланина (MEL), оксигемоглобина (HbO) и дезоксигемоглобина (HHb).

$$\sum_{\lambda} \left[\sqrt{\frac{I_{1,2} I_{4,3}}{I_{1,3} I_{4,2}}} - 2 \exp[\sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)} d] \right]_{\text{Тнб, SiO}_2, \alpha, \beta}^2 \rightarrow \min. (5)$$

При этом коэффициент β в (4) должен обеспечивать только выполнение условия диффузионного приближения уравнения переноса излучения (УПИ) $\mu_a \ll \mu'_s$, а его значение может быть практически произвольным, поскольку оно слабо влияет на результат расчета оксигенации по сравнению со случайными ошибками измерений [23]. Кроме того, из рис.2 видно, что влияние поглощения света молекулами воды в интервале длин волн 520–590 нм очень мало, а взвешенная сумма показателей поглощения жиров и меланина является монотонно убывающей функцией длины волны, как и транспортный показатель рассеяния света (см. (4)). Единственная немонотонная кривая – это спектр поглощения гемоглобина. Таким образом, для расчета кислородного насыщения ткани необходимо выделить только немонотонную компоненту зарегистрированных данных, а разделяя две оставшиеся монотонные кривые уже не имеет смысла; поэтому можно не учитывать форму спектра поглощения всех хромофоров, кроме компонент гемоглобина, положив $\mu_a^{\text{th}}(\lambda) \approx 1$.

Функция средней квадратичной ошибки в оптимизационной задаче ОДС (5) является дважды дифференцируемой; соответственно, для расчета кислородного насыщения можно использовать итерационные алгоритмы первого (градиентный спуск, метод Левенберга–Маркварта) и второго (метод Ньютона, метод Бройдена–Флетчера–Гольдфарба–Шанно) порядков [24]. Однако методы второго порядка весьма трудоемки (использование вторых производных функции ошибки) и максимально эффективны только вблизи предполагаемого минимума, поэтому в настоящей работе для решения обратной задачи ОДС применялся стандартный алгоритм Левенберга–Маркварта.

2.2. ОДС-система для оценки кислородного насыщения биотканей

В целях технической реализации разработанного метода четырех измерений была создана экспериментальная ОДС-система для оценки кислородного насыщения поверхностных слоев биотканей. На рис.3 представлена



Рис.3. Схема ОДС-системы для оценки кислородного насыщения биологических тканей с использованием отражательной геометрии спектроскопических измерений.

схема предложенного устройства, конструкция которого основана на использовании широкополосного источника зондирующего излучения MCWHF2 (Thorlabs Inc., USA) и спектрометра QE65000 (Ocean Optics Inc., USA). Для исследования биотканей применялся щуп из кварцевых волокон (ООО «Полироник», Россия) диаметром 250 мкм с фиксированным расстоянием 2 мм между соседними выходами. При этом входы щупа соединены с выходами источника и приемника излучения через оптический переключатель F-104-03 (Piezosystem Jena, GmbH). Для контроля силы прижима контактной поверхности щупа к исследуемому объекту применялся механический динамометр. ОДС-система полностью автоматизирована с использованием программных средств Java 1.8 (Oracle Co., USA).

2.3. Оценка глубины исследования биологических тканей

Средняя глубина исследования биотканей h для разработанной ОДС-системы может быть определена с помощью стандартного уравнения «бананообразных» траекторий распространения света в ткани от источника к приемнику [25]:

$$h = \frac{r_{S,R}^{\max}}{2\sqrt{2}}, (6)$$

где $r_{S,R}^{\max}$ – максимальное расстояние между источником и приемником в ходе измерений, которое составляет 6 мм при последовательном подключении источника к волокнам 1 и 2, а приемника – к волокнам 3 и 4. Однако такая оценка дает максимальную глубину наиболее вероятной траектории фотонов, тогда как разброс данных траекторий может быть сравним с этой величиной и фактическая глубина исследования будет больше.

В настоящей работе глубина исследования биоткани определяется положением траектории фотонов, вдоль которой происходит десятикратное уменьшение интенсивности зондирующего излучения по сравнению с уменьшением вдоль самой короткой траектории при максимальном расстоянии между источником и приемником:

$$\epsilon \exp[-3\sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)} d] = 10 \exp[-3\epsilon\sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)} d]. (7)$$

Тогда $h = 1.5\sqrt{\varepsilon^2 - 1}$. Таким образом, глубина исследования биотканей определяется параметром ε , который зависит от оптических свойств конкретного исследуемого образца и может варьироваться от 1.44 до 2.78 (экспериментально наблюдаемые величины), что соответствует $h = 2-4$ мм.

2.4. Оценка точности расчета кислородного насыщения тканей

Для оценки точности разработанного метода четырех измерений применялся статистический анализ погрешности расчета оксигенации по результатам численного моделирования спектроскопических измерений. Моделирование измерений проводилось на основе диффузионного приближения УПИ с учетом граничных условий [26] и добавлением шумов, имитирующих случайные погрешности в экспериментальных данных:

$$I = I_0 \frac{\mu'_s}{\mu'_i} \left[\frac{\rho_1^{-2}}{\mu'_i} \left(\mu_E + \frac{1}{\rho_1} \right) \exp[-\mu_E \rho_1] + \frac{1}{\rho_2^2} \left(\frac{1}{\mu'_i} + 2z_b \right) \times \left(\mu_E + \frac{1}{\rho_2} \right) \exp[-\mu_E \rho_2] \right] + \delta N;$$

$$\rho_1 = \sqrt{r^2 + \mu_i'^{-2}}; \quad \rho_2 = \sqrt{r^2 + (\mu_i'^{-1} + 2z_b)^2}; \quad (8)$$

$$z_b = \frac{1(1+k)}{3\mu'_i(1-k)}; \quad \mu_E = \sqrt{3\mu_a\mu'_i};$$

$$\mu'_i = \mu_a + \mu'_s; \quad k = 0.67 - 1.44n^{-2} + 0.71n^{-1} + 0.66n; \quad n = 1.4.$$

Здесь n – показатель преломления; z_b – экстраполированная длина Милна; N – случайная величина из равномерного распределения на отрезке $[-\max(I), \max(I)]$; δ – уровень шума. При этом спектр поглощения всех биологических хромофоров кроме компонент гемоглобина был аппроксимирован монотонно убывающей функцией:

$$\mu_a^{oth}(\lambda) = 1 - p \left[\frac{\lambda - 520}{70} \right]^q, \quad (9)$$

в которой q – случайная величина из равномерного распределения на отрезке $[0.5, 1]$, а p – варьируемый параметр, определяющий относительное изменение спектра в диапазоне 520–590 нм.

Средняя абсолютная ошибка расчета кислородного насыщения и ее 95%-ный доверительный интервал вычислялись для 5000 данных спектроскопических измерений биотканей со случайным компонентным составом. Выполнение центральной предельной теоремы [27, 28], и нормальность выборки проверялась формальным критерием Шапиро–Уилка [28]. Для оценки значимости полученных результатов использовались критерии Стьюдента и Уилкоксона [27, 29]. Моделирование спектроскопических измерений и реализация статистического анализа полученных данных были выполнены в программной среде Python 3.6.

2.5. Апробация ОДС-системы на биологических тканях

Для апробации разработанной ОДС-системы на биотканях in vivo была проведена серия экспериментов по

моделированию окклюзии [30, 31] на пальцах руки добровольца из группы авторов статьи. Спектроскопические измерения и расчет кислородного насыщения ткани проводились до, в процессе и после искусственной закупорки сосудов. Для ограничения поступления крови использовался резиновый жгут, наложенный на основание пальца.

3. Результаты и их обсуждение

На рис.4,а представлена зависимость средней абсолютной погрешности расчета оксигенации ткани от уровня случайных шумов в экспериментальных данных. Видно, что увеличение уровня случайного шума приводит к росту вычислительной погрешности, однако ее величина сравнима с уровнем шума и становится меньше него, когда шум превышает 5%. Кроме того, если доля поглощения гемоглобина в образце ткани составляет не менее 10%, то погрешность расчета оксигенации снижается более чем в 1.5 раза. При этом пренебрежение монотонной компонентой спектра поглощения приводит к значительной погрешности вычислений, только если относительное изменение этой компоненты превышает 40%, тогда как относительное изменение интенсивности спектра поглощения меланина в диапазоне 520–590 нм составляет 36%, а поглощение жиров значительно (в 1000 раз) меньше по сравнению с меланином. В случае, когда доля поглощения гемоглобина в ткани превышает 30%, погрешность расчета оксигенации будет менее 2%.

Представленные результаты являются статистически значимыми на уровне менее 10^{-20} по Стьюденту и Уилкоксона, поэтому можно предположить, что при исследовании реальных биотканей погрешность вычисления оксигенации не будет превышать погрешность спектроскопических измерений. Исходя из полученных значений погрешности вычисления оксигенации при низком уровне шума, также отметим, что учет граничных условий в предложенном методе четырех измерений может повысить точность вычислений не более чем на 1%. Это, как правило, меньше уровня наблюдаемых шумов в экспериментальных данных. Этот вывод можно экстраполировать также и для оценки влияния плоскостной структуры исследуемого объекта на вычислительную погрешность, т.е. если оксигенация ткани будет одинаковой во всех слоях, то погрешность расчета кислородного насыщения не должна превышать 1%, поскольку влияние

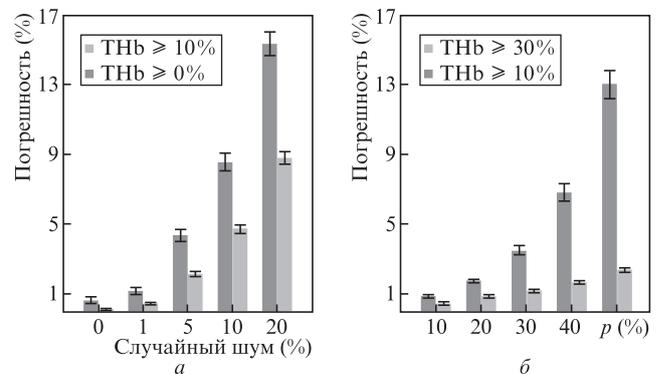


Рис.4. Средняя абсолютная погрешность расчета кислородного насыщения биотканей для разных уровней случайного шума в экспериментальных данных (а) и различных относительных изменений спектра поглощения неучтенных хромофоров (б) при ограничении минимальной доли гемоглобина.

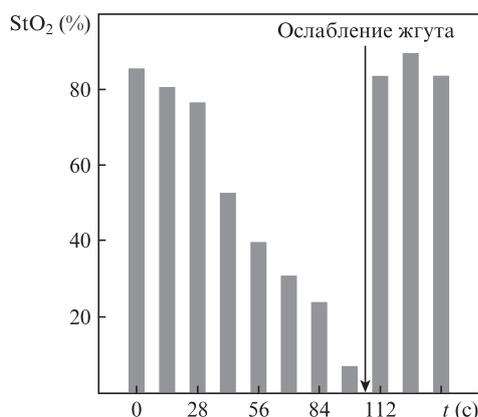
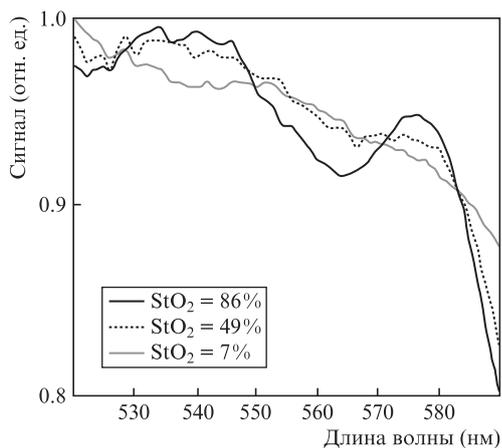


Рис.5. Примеры нормированных сигналов (правая часть (3)), полученных с использованием метода четырех измерений при мониторинге искусственной закупорки сосудов в безымянном пальце руки (а), и мониторинг оксигенации биотканей до, в процессе и после окклюзии (б).

границы воздух–ткань гораздо значительнее влияния слабых изменений оптических свойств между слоями. Однако, если каждый слой имеет собственную оксигенацию, рассчитать их значения и оценить погрешность вычислений невозможно, поскольку неясно, каким образом ее следует определить. Важно также отметить, что все утверждения о величине погрешности вычислений справедливы только для расчета кислородного насыщения тканей с использованием метода четырех измерений в диапазоне длин волн 520–590 нм.

Характерный пример полученных результатов в ходе мониторинга оксигенации ткани *in vivo* до, в процессе и после искусственной закупорки сосудов показан на рис.5, где отчетливо видна динамика снижения кислородного насыщения при окклюзии и возвращение ткани в исходное состояние после восстановления кровоснабжения. При воспроизведении данного эксперимента на похожих объектах результаты были аналогичными, но, что естественно, не идентичными (различные начальные точки, а также случайные и систематические смещения по временной шкале). Подобная динамика оксигенации биотканей при окклюзии ранее экспериментально наблюдалась и была описана также другими научными группами [31].

4. Заключение

В работе предложен оригинальный метод четырех измерений для оценки кислородного насыщения тканей. Статистический анализ точности вычисления оксигенации биотканей с использованием разработанного метода показал, что погрешность предложенного метода меньше погрешности измерений при уровне случайного шума 5% и выше. Данный метод реализован путем создания компактного устройства с отражательной геометрией измерений, которое позволяет исследовать ткани на глубине до 4 мм и автоматически учитывает аппаратные параметры в ходе экспериментальных исследований без предварительной калибровки на эталонном фантоме. Результаты апробации разработанной ОДС-системы для мониторинга кислородного насыщения ткани при искусственной закупорке сосудов соответствовали опубликованным данным других научных групп. Таким образом, можно говорить о состоятельности предложенного подхода к оценке оксигенации биотканей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-32-60093 мол_а_дк). Авторы выражают благодарность В.А.Воробьеву и Р.В.Беляеву за сборку прототипа ОДС-системы, а также А.Г.Орловой за обсуждение полученных результатов и помощь в написании статьи.

1. Cerussi A. et al. *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.*, **369**, 4512 (2011).
2. Maslennikova A. et al. *J. Biophoton.*, **3**, 743 (2010).
3. Papazoglou E. et al. *Biomed. Instrum. Technol.*, **41**, 83 (2007).
4. Sujatha N. et al. *J. Appl. Spectrosc.*, **82**, 432 (2015).
5. Scheufler O. et al. *Plast. Reconstr. Surg.*, **113**, 141 (2004).
6. Whitaker I. et al. *J. Reconstr. Microsurg.*, **28**, 149 (2012).
7. Raleigh J. et al. *Radiat. Res.*, **151**, 580 (1999).
8. Ehling J. et al. *Thromb. Haemost.*, **109**, 375 (2013).
9. Durduran T. et al. *Rep. Prog. Phys.*, **73**, 076701 (2010).
10. Турчин И.В. *УФН*, **186**, 550 (2016).
11. Lee J. et al. *Physiol. Meas.*, **27**, 757 (2006).
12. Pham T. et al. *Rev. Sci. Instrum.*, **71**, 2500 (2000).
13. O'Sullivan T. et al. *J. Biomed. Opt.*, **17**, 071311 (2012).
14. Zhao H. et al. *Appl. Opt.*, **44**, 1905 (2005).
15. Kienle A. et al. *Appl. Opt.*, **35**, 2304 (1996).
16. Nichols M. et al. *Appl. Opt.*, **36**, 93 (1997).
17. Perekatova V. et al. *Biomed. Opt. Express.*, **7**, 3979 (2016).
18. Gill P. et al. *Practical Optimization* (London: Academic Press, 1981).
19. Contini D. et al. *Appl. Opt.*, **36**, 4587 (1997).
20. Kleshnin M. et al. *Proc. SPIE.*, **10412**, 1041212 (2017).
21. Wang L., Wu H. *Biomedical Optics* (Hoboken: Wiley, 2007).
22. <http://omlc.org/spectra/index.html>
23. Клешнин М.С. и др. *Квантовая электроника*, **47**, 355 (2017) [*Quantum Electron.*, **47**, 355 (2017)].
24. Nocedal J., Wright S. *Numerical Optimization* (New York: Springer, 2006).
25. Тучин В. *Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике* (М: Физматлит, 2012).
26. Farrell T., Patterson M., Wilson B. *Med. Phys.*, **19**, 879 (1992).
27. Witte R., Witte J. *Statistics 10th Edition* (Hoboken: Wiley, 2013).
28. Rahman M., Govindarajulu Z. *J. Appl. Stat.*, **24**, 219 (1997).
29. Fay M., Proschan M. *Statistics Surveys*, **4**, 1 (2010).
30. Ogilvy C. et al. *J. Neurosurg.*, **84**, 785 (1996).
31. Casavola C. et al. *J. Biomed. Opt.*, **5**, 269 (2000).