Методы нелинейной оптики для диагностики меланина: мини-обзор

Е.А.Ширшин, Б.П.Якимов, Г.С.Будылин, К.Е.Буянкин, А.Г.Армаганов, В.В.Фадеев, А.А.Камалов

Оптические методы находят широкое применение в фундаментальных исследованиях живых систем и в задачах биомедицинской диагностики. Наряду с методами классической спектроскопии в биофотонике используются методы нелинейной оптики, например многофотонная микроскопия. В настоящем мини-обзоре рассматриваются возможности использования методов нелинейной оптики для визуализации и анализа свойств эндогенных молекул-хромофоров. На примере меланина – пигмента, обладающего спектральными особенностями фотофизических свойств в видимом и ближнем ИК диапазонах, обсуждается, какую информацию о его локализации в тканях и структурной организации можно извлечь с помощью методов нелинейной оптики: многофотонной флуоресцентной микроскопии (в том числе времяразрешенной), генерации третьей оптической гармоники, спектроскопии накачка – зондирование и комбинационного антистоксова рассеяния света.

Ключевые слова: *меланин, нелинейные процессы, многоквантовые процессы, многофотонная микроскопия, визуализация времени затухания флуоресценции, FLIM, КАРС, спектроскопия накачка – зондирование.*

1. Введение

Методы оптической спектроскопии и микроскопии широко применяются как в фундаментальных биофизических, так и в прикладных биомедицинских исследованиях. Обладая молекулярной специфичностью, оптическая спектроскопия позволяет анализировать изменения структуры макромолекул, характеризовать межмолекулярные взаимодействия, а также анализировать сложные системы – биожидкости, клетки или ткани. Типичными применениями оптической спектроскопии в биомедицинской диагностике являются «прикроватная» (point-of-care) диагностика – например, экспресс-анализ на COVID-19 по спектрам слюны [1] – и интраоперационная диагностика, например в эндокринологии и урологии [2]. Оптическая микроскопия, в свою очередь, позволяет визуализировать биохимические процессы и строение биообъектов практически с субмикронным (т. е. субклеточным) разрешением [3]. Комбинация методов оптической микроскопии и спектроскопии является, таким образом, мощным инструментом исследования живых систем.

По ряду естественных причин, включающих простоту и дешевизну, большее распространение в биомедицинской диагностике получили «линейные» оптические методы, в которых напряженности электромагнитного поля малы. В числе этих методов спектроскопия комбинационного рассеяния (КР), спектроскопия поглощения и отражения в видимом и ИК спектральных диапазонах, флуоресцентная спектроскопия, в том числе с временным разрешением (кинетическая). Из методов нелинейной оптики наибольшее распространение получила, по всей видимости, многофотонная микроскопия (МФМ), в рамках которой измеряются сигналы двух- и трехфотонной флуоресценции и генерации второй и третьей оптических гармоник (ГВГ, ГТГ) [3]. Причина такой популярности заключается в увеличении глубины сканирования образца за счет смещения длины волны возбуждающего излучения в область прозрачности биотканей, уменьшение фотоповреждения и увеличение пространственного разрешения. В то же время существуют работы, в которых демонстрируются уникальные возможности биомедицинской диагностики, открывающиеся при использовании других методов нелинейной оптики, например вынужденного комбинационного рассеяния (ВКР), комбинационного антистоксова рассеяния света (КАРС) и метода накачки – зондирования (pump-probe). Цель на-

Е.А.Ширшин, К.Е.Буянкин. Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, физический факультет, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2; Медицинский научно-образовательный центр МГУ им. М.В.Ломоносова, Россия, 119192 Москва, Ломоносовский просп., 27, к. 10;
e-mail: shirshin@lid.phys.msu.ru
Б.П.Якимов. Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, физический факультет, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2; Медицинский научно-образовательный центр МГУ им. М.В.Ломоносова, Россия, 119192 Москва, Ломоносовский просп., 27, к. 10; НЦМУ «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» Первого МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2
Г.С.Будылин. НЦМУ «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» Первого МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2; Институт спектроскопии РАН, Россия, 108840 Москва, Троицк, ул. Физическая, 5
А.Г.Армаганов, А.А.Камалов. Медицинский научно-образовательный центр МГУ им. М.В.Ломоносова, Россия, 119192, Москва, Ломоносовский просп., 27, к. 10
В.В.Фадеев. Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, физический факультет, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2

Поступила в редакцию 21 октября 2021 г.

стоящего мини-обзора – выявление параметров исследуемой системы, которые можно измерить, если использовать нелинейно-оптические методы в биофотонике. Для общности, в качестве исследуемой системы мы рассмотрим меланин – пигмент, ответственный за цвет кожи, волос и глаз, который вовлечен в ряд патологических процессов в организме [4] и используется для изготовления широкого класса наноматериалов [5], а затем обсудим, какую информацию о структуре, свойствах и локализации меланина в организме можно извлечь, применяя арсенал оптических методов.

Помимо своей значимости в биологии и медицине, меланин был выбран нами в качестве рассматриваемой системы из-за своих необычных спектральных свойств, прежде всего абсорбционных [6, 7]. В отличие от стандартных хромофоров, у которых в спектрах поглощения имеются колоколообразные полосы, соответствующие электронно-колебательным переходам, спектр поглощения меланина не имеет выраженных особенностей и монотонно спадает с длиной волны от видимого к ИК спектральному диапазону. В диапазоне 300–1000 нм зависимость поглощения меланина A от длины волны λ может быть описана экспоненциальным законом: $A \sim \exp(-\lambda/\Lambda)$, где Λ – наклон спектральной кривой поглощения в полулогарифмическом масштабе. Этот показатель как для синтетических и естественных меланинов, так и для различных видов меланина может варьироваться приблизительно от 80 до 160 нм. Наличие у меланина поглощения в ИК области, а также особенности протекания в нем фотофизических процессов, рассмотренных в разд.2, делают его интересным для исследования оптическими методами, в том числе нелинейными. В разд.3 представлены примеры применения методов нелинейной оптики (МФМ, КАРС, ВКР, накачки–зондирования) для анализа меланина в различных системах, на основе чего сделаны заключения об особенностях информации, которую каждый из этих методов позволяет получить о биосистеме.

2. Оптические свойства меланина: нестандартный хромофор

2.1. Особенности спектральных свойств меланина

Меланин является пигментом, т. е. представляет собой смесь различных соединений, образующихся в организме в результате окисления молекул-прекурсоров [4]. В зависимости от химического состава можно выделить различные подвиды меланинов с разными свойствами, в том числе оптическими; это эумеланин, феомеланин, нейромеланин и пиомеланин [8]. Так, например, наиболее часто встречаемые в коже эумеланин и феомеланин имеют следующие различия: эумеланин в основном состоит из индолов, содержащих азот, а феомеланин – из бензотиазинов и бензотиазонов, содержащих атомы серы. Оптические свойства различных подвидов меланина в основном схожи, поэтому строгого дифференцирования различных видов меланинов мы проводить не будем. По своим спектральным характеристикам меланин значительно отличается от других хромофоров: он имеет широкий «экспоненциальный» спектр поглощения, его флуоресценцию можно возбудить в широком диапазоне длин волн, в том числе в ИК области спектра [9], а в кинетике затухания его флуоресценции присутствует сверхбыстрая компонента (~1 пс) [10], что обусловлено высокой безызлучательной скоростью релаксации возбужденного состояния [11].

Механизм формирования спектральных свойств меланина до сих пор является предметом дискуссий. Так, в работе [6] была предложена модель, описывающая формирование спектра поглощения меланина с помощью экситонного взаимодействия в неупорядоченных агрегатах молекулярных структур. В данной модели предполагается, что в результате синтеза меланина могут образовываться различные структурные единицы (олигомеры), которые затем взаимодействуют между собой. Электронное взаимодействие приводит к сдвигам и уширению спектров, а величина этого взаимодействия зависит от расстояния между олигомерами и взаимной ориентации их дипольных моментов.

Заметное отличие спектральных свойств меланина от свойств других хромофоров кожи привело к тому, что задачу количественного анализа меланина пытались решить всеми доступными спектральными методами. В первую очередь интерес к меланину связан с диагностикой меланомы, наиболее опасного рака кожи [12]. Так, для исследования меланина непосредственно в коже *in vivo* применялись:

1. Спектроскопия диффузного отражения света (панель 1 на рис.1) [13, 14]. Присутствие в коже меланина определяет ее цвет и, соответственно, спектры поглощения и отражения. Поскольку спектр меланина значительно отличается от спектров других основных хромофоров кожи, можно однозначным образом установить его вклад в формирование отраженного оптического сигнала в видимой и ближней ИК спектральных областях. Данный подход применяется также для оценки фактора защиты от солнечного излучения (sun protection factor (SPF)) [15], а также для планирования дозы излучения при воздействии на кожу [16].

2. Флуоресцентная спектроскопия меланина в ближнем ИК диапазоне при возбуждении в красной и ИК областях (панель 2 на рис.1) [17, 18]. Наличие у меланина длинноволнового хвоста поглощения позволяет осуществлять его прямое однофотонное возбуждение, приводящее к эмиссии в ИК области спектра – например, при длине волны возбуждения 785 нм, часто используемой в спектроскопии КР биотканей, меланин в коже ответственен за широкий флуоресцентный фон в области 900–1000 нм, частично маскирующий слабые колебательные полосы [19]. В организме человека (в первом приближении) нет других эндогенных флуорофоров в данной спектральной области, что позволяет использовать красную и ИК флуоресценцию меланина для его диагностики [20–22].

3. Оптоакустическое детектирование (панель 3 на рис.1). Тот факт, что меланин может поглощать свет в ближней ИК области спектра, позволяет детектировать его с использованием оптоакустики: селективное поглощение им импульсного излучения накачки приводит к локальному нагреву, сопровождающемуся генерацией акустического сигнала, по временному профилю которого можно локализовать меланин в тканях по глубине. Помимо этого оптоакустическое детектирование меланина было реализовано в формате *in vivo* цитометрии, а именно при облучении сосудов на длине волны 1064 нм детектировался оптоакустический сигнал, который гене-

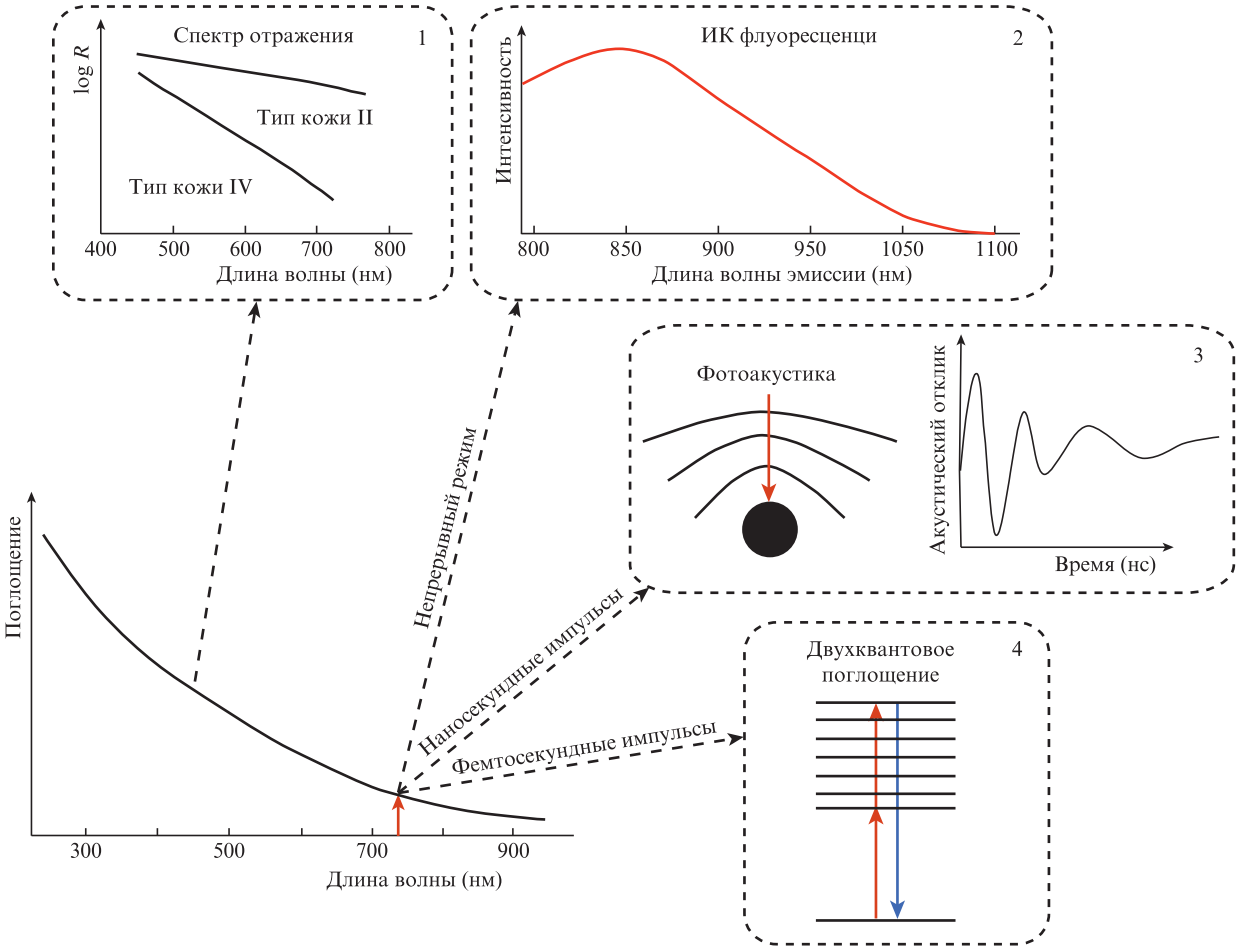


Рис.1. Особенности оптических свойств меланина: схематическое изображение спектра поглощения меланина в видимой и ближней ИК областях спектра, а также оптических методов, использующих наличие у меланина длинноволнового хвоста поглощения.

рировался единичными клетками – меланоцитами. Таким образом, удавалось достичь чувствительности детектирования единичных меланоцитов в потоке крови *in vivo* [23], что может быть использовано для выявления метастазов у пациентов с меланомой.

4. Спектроскопия и микроспектроскопия КР. Гетерогенность молекулярного состава и структурной организации меланина определяет его характерный спектр КР. Так, для наиболее распространенного вида меланина – эумеланина – в диапазоне частот 1000–1800 см$^{-1}$ в спектре присутствуют полосы на частотах 1220 см$^{-1}$ (валентные колебания C – OH фенольных и C – O карбоксильных групп), 1340 см$^{-1}$ (колебания индола C – N), 1390 см$^{-1}$ (колебания в ароматических фрагментах C = C, симметрия A_{1g} аналогична D-полосе в неупорядоченном графите), а также полосы на частотах 1562 и 1598 см$^{-1}$, соответствующие C = C-колебаниям sp2-гибридизированного углерода и C – C-колебаниям индола (симметрия E_{2g}) [24–26]. В связи с гетерогенностью молекулярного состава и окружения указанные полосы «сливаются» в две широкие полосы с максимумами примерно на ~1380 и ~1570 см$^{-1}$ с полуширинами ~200 и 150 см$^{-1}$ соответственно. В зависимости от длины волны возбуждения, химического состава и структурной организации амплитуды и положения этих полос могут варьироваться, что позволяет проводить анализ меланина *in vitro* [27] и *in vivo* [18]. Так, в работе [19] с помощью микроспектроскопии КР получены спектры кожи с разрешением 2 мкм по глубине, в которых был выделен вклад меланина. Было установлено, что интенсивность ИК флуоресценции кожи коррелирует с амплитудой вклада меланина в спектр КР, а также определено распределение меланина в коже по глубине, в том числе в поверхностном (роговом) слое. Схематическое изображение структуры кожи и областей локализации в ней меланина приведены на рис.2,*а*, В роговом слое могут наблюдаться остатки меланиновых частиц – меланосом, концентрация и размер которых растут с увеличением глубины эпидермиса. На границе раздела живого эпидермиса и папиллярной дермы, в области локализации клеток, синтезирующих меланин (меланоцитов), концентрация меланина имеет локальный максимум. Спектр КР эумеланина, измеренный в коже *in vivo*, приведен на рис.2,*б*. Другие виды меланина также обладают широкими полосами КР: например, феомеланин – подвид меланина, ответственный за рыжую окраску волос, имеет три характерные полосы КР: на частотах 500, 1440 и 2000 см$^{-1}$ [28].

Таким образом, детектирование меланина можно успешно проводить с помощью методов классической спектроскопии и микроскопии, в основе чего лежат особенности его спектральных свойств. В то же время оказывается, что возможности оптической диагностики структуры и свойств меланина можно значительно расширить, если обратиться к нелинейно-оптическим методам.

3. Применение методов нелинейной оптики для исследования структуры и свойств меланина, а также его локализации в теле человека

3.1. Многофотонная флуоресценция и картирование времени жизни флуоресценции в *in vivo* диагностике меланина в коже

3.1.1 О механизме возбуждения флуоресценции меланина в видимой области: двухфотонное или двухквантовое поглощение? Многофотонная микроскопия достаточно активно используется в биомедицинской диагностике, что обусловлено рядом ее преимуществ по сравнению с традиционной конфокальной микроскопией. Эти преимущества включают в себя бóльшую глубину проникновения в ткань (за счет использования накачки с длиной волны в области окон прозрачности биотканей), меньшее фотоповреждение образца (фотохимические процессы, первой стадией которых является поглощение фотонов, происходят только в перетяжке пучка), возможность детектирования не только сигнала флуоресценции, но и сигналов генерации оптических гармоник и кинетики релаксации флуоресценции, что обусловлено обычным использованием в качестве накачки фемтосекундных лазерных импульсов [3].

В МФМ флуоресценция возникает в результате перехода молекул-флуорофоров в возбужденное состояние после многофотонного поглощения. Рассмотрим случай двухфотонного поглощения. В ряде работ меланин в коже детектируется по сигналу его двухфотонной флуоресценции (т. е. возбуждение флуоресценции осуществляется в ИК области спектра, а сигнал детектируется в области 400–500 нм), интенсивность которой оказывается значительно выше, чем у других эндогенных флуорофоров. Teuchner с коллегами обратили внимание на тот факт, что возбуждение флуоресценции при этом является, по всей видимости, не истинно двухфотонным, а двухквантовым (панель 4 на рис.1). Имеется в виду то обстоятельство, что меланин обладает реальным поглощением в области возбуждения ИК излучением накачки, поэтому поглощение им второго фотона может происходить не через виртуальный уровень, а через реальный. Наличие реального уровня должно приводить к резонансному усилению нелинейной восприимчивости третьего порядка и увеличению сечения двухфотонного поглощения. Обсуждению данного вопроса посвящена серия статей [30–32]. Для определения типа процесса возбуждения были предложены эксперименты с различной длительностью импульсов накачки: при большей длительности импульса вероятность двухфотонного поглощения должна снижаться (т. к. уменьшается плотность потока фотонов), и процесс должен смещаться в сторону двухступенчатого возбуждения [33]. Интересно, что двухфотонную флуоресценцию меланина удалось зарегистрировать в широком диапазоне длительности импульсов накачки – от фемто- [30] до наносекунд [34]. Более того, в работе [35] утверждается, что многофотонную флуоресценцию меланина можно возбудить и при использовании непрерывной накачки.

3.1.2 МФМ для визуализации меланина в коже. Вне зависимости от механизма возбуждения двухфотонной флуоресценции меланина остается неоспоримым то, что МФМ и, в частности, ДФМ прекрасно подходят для его визуализации. Этому способствуют три факта:

1. Флуоресценцию меланина в коже можно возбудить селективно, например на длине волны 800 нм. Эта длина волны попадает в минимум спектра возбуждения основного эндогенного флуорофора клеток, НАД(Ф)Н, поэтому флуоресценция меланина доминирует в детектируемом сигнале [36–38],

2. Даже при использовании более коротковолнового многофотонного возбуждения, попадающего в максимум поглощения других флуорофоров кожи, например НАД(Ф)Н (700–750 нм), флуоресценция меланина при конфокальном детектировании в базальном слое в разы превышает сигнал от других структур в коже [29].

3. Кинетика релаксации флуоресценции меланина является сверхбыстрой, т. е. она короче характерной длительности аппаратной функции при измерениях методом FLIM (десятки пикосекунд) [39, 40].

Рассмотрим вышеприведенные факторы на примере измерения характеристик кожи здорового добровольца с использованием МФМ-FLIM и длины волны возбуждения 760 нм (система DermaInspect, JenLab). На рис.2,*в* приведены изображения, полученные в работе [29] методом ДФМ для кожи здорового добровольца – типичное флуоресцентное изображение базального слоя кожи, полученное на глубине 60 мкм; яркие области при этом соответствуют меланину, что подтверждается параметрами затухания их флуоресценции (области с меланином характеризуются сверхбыстрым затуханием флуоресценции). Изображение на рис.2,*в* получено методом FLIM, т. е. в каждом его пикселе измерена кинетика релаксации флуоресценции, из которой определено среднее время затухания возбужденного состояния [3, 29]. Далее время затухания флуоресценции кодируется на изображении цветом: красный соответствует более быстрой релаксации (~100 пс), синий – более длительной.

Отметим, что сигнал флуоресценции меланина в базальном слое обычно превышает сигнал от других флуорофоров кожи (при возбуждении на 760 нм основным флуорофором является молекула НАД(Ф)Н [41]). Хотя в случае меланина говорить о концентрации сложно в связи со спецификой его молекулярной организации, наличие длинноволнового хвоста в спектре поглощения меланина позволяет достигнуть контраста его детектирования с помощью метода МФМ-FLIM не хуже, чем в один порядок.

3.2. Микроскопия наведенного поглощения для анализа структуры меланина и диагностики меланомы

Еще одним способом визуализации меланина и анализа его молекулярной организации является метод накачки–зондирования. Данный подход основан на том, что на систему сначала подается излучение накачки, переводящее ее в возбужденное состояние, а затем, с некоторой временной задержкой, – зондирующее излучение; при этом наблюдается изменение поглощения зондирующего импульса в сравнении с поглощением невозбужденной системой. Идея применения данной методики для исследования меланина основана на модели формирования его оптических свойств, а именно спектра поглощения.

Как указано в ряде работ [6, 42–45], предполагается, что длинноволновый бесструктурный хвост поглощения меланина частично формируется в результате взаи-

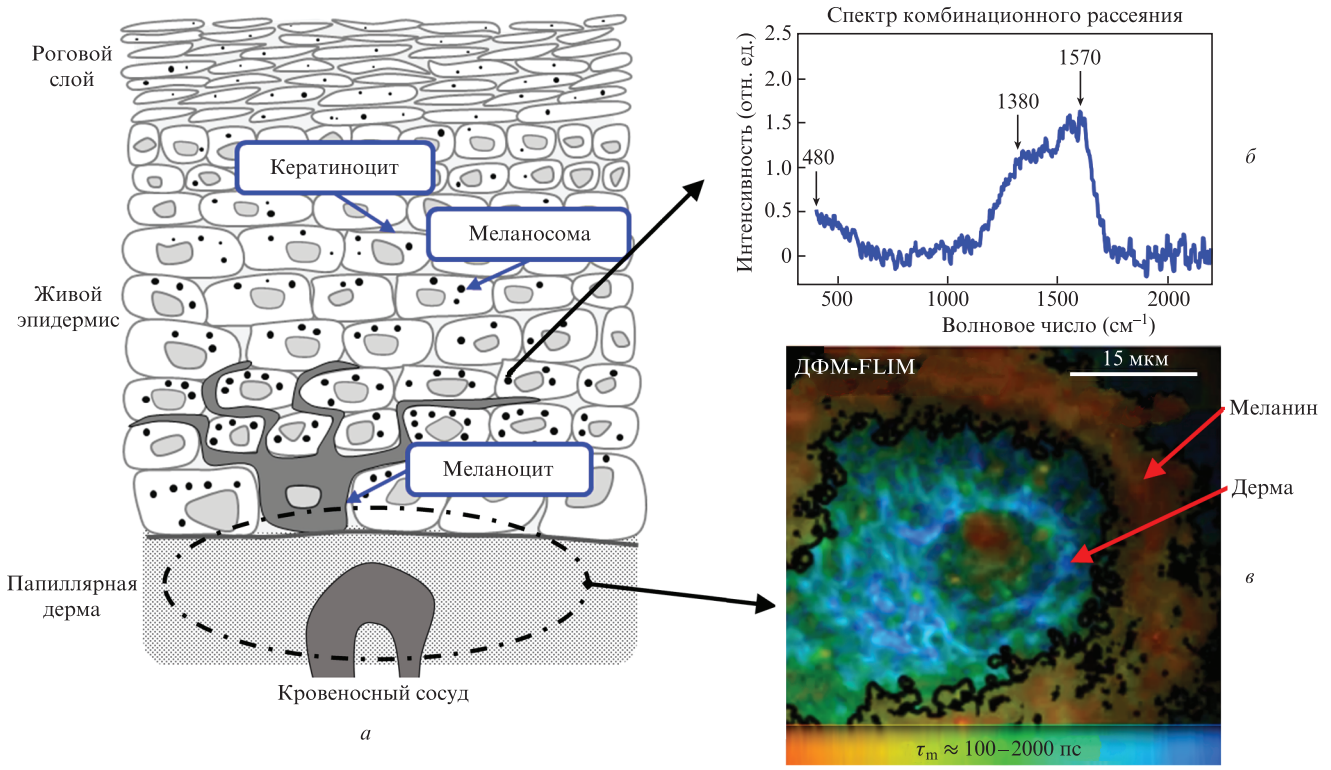


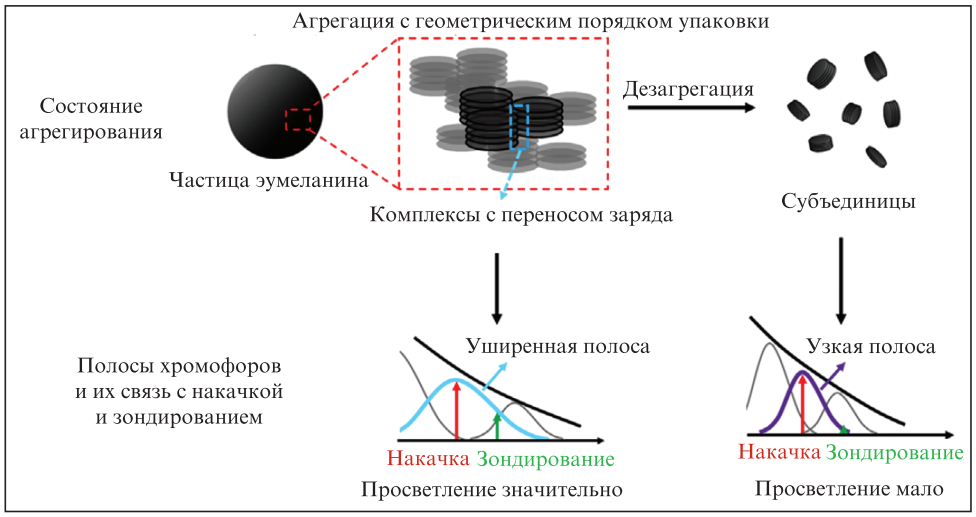
Рис.2. Схематическое изображение верхних слоев структуры кожи и локализации в ней меланина (*а*); *б* – спектр КР в коже, измеренный *in vivo* в области базального слоя клеток (для данных спектров КР типично наличие трех широких линий вблизи 500, 1380 и 1570 см$^{-1}$, связанных с сигналом КР эумеланина); *в* – изображение кожи в области базального слоя, полученное с помощью двухфотонной томографии (ДФМ-FLIM) (цветом кодировано среднее время жизни флуоресценции), меланин на данном изображении характеризуется быстрым затуханием флуоресценции (оранжевый цвет), тогда как сигнал от коллагеновых и эластиновых волокон дермы – более длительным временем затухания жизни (голубой цвет). Рис.*а* и *б* адаптированы из работы [19], рис.*в* – из работы [29].

модействия между олигомерами меланина в агрегатах пигмента. Тогда можно предположить, что при различном взаимодействии между отдельными олигомерами в агрегатах наночастиц должны наблюдаться различия в спектрах поглощения основного и возбужденного состояний.

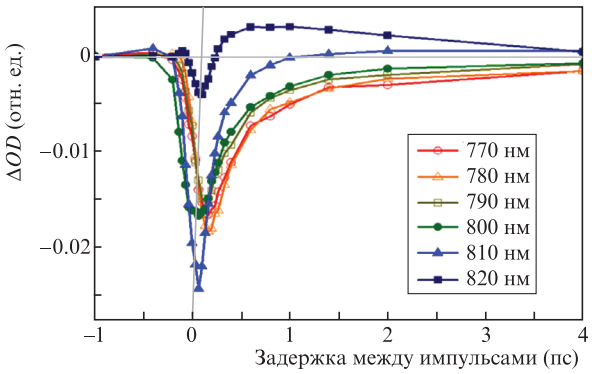
Аналогично рассуждениям в [42, 44] рассмотрим случаи «упорядоченного» и «хаотичного» расположений олигомеров. Авторы [42] предполагают, что наблюдаемый спектр поглощения меланина является суперпозицией линий поглощения, спектральные оптические свойства которых (положение максимума, полуширина, относительный вклад) зависят от характера взаимодействия. В случае более упорядоченного расположения олигомеров эффективность электронного взаимодействия между ними выше, что должно приводить к уширению спектральных линий поглощения, формирующих спектр. Напротив, при хаотичном расположении мономеров взаимодействие между ними меньше, а соответствующие отдельные линии поглощений уже (рис.3,*а*).

Эти предположения могут быть верифицированы с использованием спектроскопии накачки–зондирования с фемтосекундным временным разрешением. Рассмотрим процесс, в котором на данную систему подается сначала излучение с длиной волны λ_1, а затем с $\lambda_2 = \lambda_1 + \Delta\lambda$. Если $\Delta\lambda$ меньше характерной ширины линии поглощения меланина, связанной со взаимодействием олигомеров, после поглощения излучения с длиной волны λ_1 излучение с длиной волны λ_2 не может поглотиться из основного состояния, т. к. система уже находится в возбужденном состоянии – возникает эффект просветления (ground state bleaching (GSB)), который проявляется в отрицательной амплитуде поглощения зондирующего излучения с длиной волны λ_2. Если же $\Delta\lambda$ превышает характерную ширину спектра поглощения агрегатов олигомеров в составе меланина, зондирующее излучение с длиной волны λ_2 будет поглощаться другим агрегатом олигомеров с более длинноволновым поглощением. Типичные кинетики поглощения зондирующего излучения после воздействия на меланин излучения накачки приведены на рис.3,*б* и *в*. В цельных частицах меланина наблюдается интенсивное взаимодействие между отдельными молекулярными компонентами, приводящее к выраженному отрицательному отклику в кинетике наведенного поглощения, связанного с просветлением основного состояния (рис.3,*б*), которое не наблюдается для отдельных молекулярных фрагментов (рис.3,*в*).

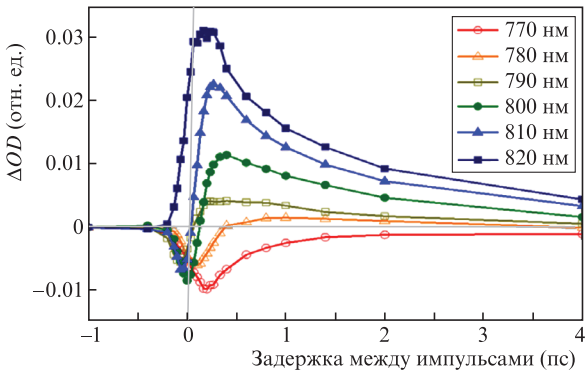
Таким образом, в серии работ [43–47] было показано, как с помощью кинетики поглощения зондирующего излучения из возбужденного состояния можно исследовать молекулярную организацию меланина, что представляет не только фундаментальный интерес, но и имеет непосредственную практическую значимость, поскольку молекулярная организация меланина связана с риском метастазирования меланомы [44]. Помимо этого методика накачки–зондирования позволяет разделять типы меланина, а именно феомеланин и эумеланин. Спектры однофотонного поглощения обоих меланинов похожи, но при этом временная динамика их возбужденного состояния различается, что и лежит в основе их селективной визуализации методами нелинейной оптики [47].



а



б



в

Рис.3. Схематическое изображение механизма формирования спектра поглощения меланина (*а*), а также кинетики наведенного поглощения (ΔOD) для различных длин волн зондирования при длине волны накачки 700 нм, измеренные для цельных частиц (*б*) и отдельных молекулярных фрагментов меланина (*в*), экстрагированного из чернил каракатицы. Рис.3 адаптирован из работы [46].

3.3. Спектроскопия ВКР и КАРС для диагностики меланина

Для визуализации меланина в ткани и селективного картирования эумеланина и феомеланина также применяются методы нелинейной колебательной спектроскопии – КАРС и ВКР.

Возможность разделения эумеланина и феомеланина по спектрам их КР была показана в работах [26, 48], где на выделенных образцах меланинов было показано, что эумеланин имеет три широкие колебательные полосы на 500, 1380 и 1580 см$^{-1}$, а феомеланин – на 500, 1490 и ~2000 см$^{-1}$, что позволяет различить их в тканях.

При решении задач визуализации метод спектроскопии спонтанного КР имеет несколько недостатков. Прежде всего, спонтанное КР обладает низким сечением взаимодействия, в результате чего требуется достаточно большое время накопления сигнала, что затрудняет возможность сканирования образца за разумное время. Помимо этого длительное облучение меланина может приводить к заметному локальному нагреву и нарушению структуры пигмента.

Альтернативами спектроскопии и микроскопии спонтанного КР являются методы нелинейной оптики – КАРС и ВКР, которые позволяют значительно повысить чувствительность исследования меланина. При этом в эксперименте на образец обычно подаются два лазерных импульса, длины волн излучения которых выбираются такими, чтобы разность их частот накачки ω_p и стоксовой компоненты ω_S соответствовала интересующей колебательной частоте $\Omega = \omega_p - \omega_S$. В таком случае происходит резонансное возбуждение колебательных мод, и эффективность отклика на частоте колебаний может увеличиться более чем в 10000 раз по сравнению со случаем сигнала нерезонансного спонтанного КР [49]. Это позволяет картировать распределение молекул, обладающих выделенной колебательной линией, например липидов или белков, с высоким пространственным разрешением и частотой обновления кадров 1–10 Гц. Для биомедицинской визуализации используются два основных когерентных рамановских процесса – КАРС [50] и ВКР [51, 52], которые происходят одновременно. В случае КАРС генерация фотонов идет на антистоксовой частоте, при этом имеет место взаимодействие двух фотонов: одного – на частоте накачки ω_p, другого – на стоксовой частоте ω_S, так что излучение регистрируется на частоте $\omega_{as} = \omega_p - \omega_S + \omega_p = \Omega + \omega_p$, превышающей частоту накачки, и сигнал свободен от шумовой засветки, например, сигнала флуоресценции [53]. В случае ВКР сигнал детектируется либо на частоте ω_S, либо на частоте ω_p, интенсивности которых изменяются за счет процесса вынужденного излучения с виртуального уровня, образующегося в результате возбуждения молекулы на частоте накачки.

Для детектирования отклика от феомеланина было предложено использовать КАРС-микроскопию с разностью частот накачек, настроенной на частоту 2000 см$^{-1}$, для которой у большинства молекул нет ярко выраженных колебательных полос, однако наблюдается интенсивная линия КР феомеланина. В работе [54] была продемонстрирована возможность детектирования феомеланина *in vivo*. КАРС-микроскопия была также успешно применена для обнаружения меланинов при так называемой амеланотической (т.е. не обладающей ярко выраженной окраской и пигментацией) форме меланомы.

Следует отметить, что интенсивность сигнала КАРС, генерируемого феомеланином, значительно выше, чем у сигнала КАРС, оцененного по сечениям спонтанного КР. Одним из возможных объяснений этого является то обстоятельство, что сигнал КАРС возбуждается в области реального поглощения меланина (длинноволнового хвоста поглощения в ближнем ИК диапазоне): в типичных экспериментах диапазон длин волн накачки на частоте стоксовой компоненты варьируется от 1040 до 1064 нм, а длина волны накачки – в диапазоне 850 – 870 нм, что соответствует длине волны антистоксовой компоненты в диапазоне 718 – 735 нм. Наличие реального поглощения приводит к резонансному усилению оптического отклика [55]. Метод КАРС пытаются внедрить в клиническую практику, например компания JenLab представила КАРС-микроскоп в составе перевозной платформы с подвижной сканирующей частью, которую можно легко подвести к нужной части тела пациента [56].

3.4. Метод генерации третьей оптической гармоники для анализа меланина в клетках

Метод ГТГ достаточно широко используется в нелинейной микроскопии клеток и тканей. Из-за отсутствия фазового синхронизма внутри объемной среды ГТГ в случае жесткой фокусировки не возникает, однако на границе раздела двух сред с различающимися показателями преломления в результате изменения фазы полей возникает фазовый синхронизм, приводящий к эффективной ГТГ [57]. Таким образом, с помощью микроскопии ГТГ возможна эффективная визуализация границ разделов сред с различными показателями преломления. В то время как основной областью использования метода ГВГ в биофизике и биомедицине является всесторонний анализ коллагеновых волокон [58], ГТГ находит применения в *in vivo* цитометрии [59, 60], детектировании липидных капель в клетках [61], для нейроимиджинга [62]. Совместное использование ГТГ и ГВГ, лежащее в основе метода SLAM (simultaneous label-free multiharmonic microscopy), оказалось плодотворным для оптической биопсии *ex vivo* [63]. Применительно к меланину ГТГ также применяется в ряде случаев, основанных на особенностях фотофизики данной системы.

В ряде работ было показано, что меланин является наиболее эффективным источником ГТГ в коже. В работе [64] исследовалась ГТГ для модельной системы – гидроколлоидов меланина, частиц диаметром 100 – 200 нм. Установлено, что интенсивность ГТГ линейно зависит от концентрации гидроколлоидов в растворе; это было объяснено конструктивной интерференцией от отдельных частиц и эффектом некогерентного гиперрэлеевского рассеяния. По оценке нелинейная восприимчивость третьего порядка $\chi^{(3)}$ оказалась на три порядка выше, чем у воды. Дальнейшие исследования, проведенные на культурах клеток, показали, что зависимость интенсивности ГТГ от концентрации меланина (массовой доли (МД)) описывается полиномом с показателем 3.5 при МД менее 11 мг/мл [65]. В то же время при больших МД эта зависимость становится линейной, что объясняется авторами переходом от режима резонансной ГТГ к гиперрэлеевскому рассеянию излучения накачки меланосомами внутри возбуждаемого субфемтолитрового объема. ГТГ-визуализация затем была использована в ряде работ для количественной характеризации содержания меланина *in vivo* и на гистологических срезах [66, 67].

4. Заключение

Методы нелинейной оптики позволяют получить дополнительную информацию о структурных характеристиках системы в сравнении с классическими методами: так, в случае меланина это информация о его молекулярной организации. Помимо этого, нелинейно-оптические методы позволяют реализовать визуализацию с молекулярным контрастом в тканях с большей чувствительностью, разрешением и на большей глубине, что также было продемонстрировано в данном мини-обзоре на примере меланина. Развитие элементной и приборной базы способствует все большему внедрению методов нелинейной оптики в биомедицинские исследования. Совокупность представленных факторов позволяет надеяться на прогресс в области клинических применений нелинейной микроскопии и спектроскопии в ближайшие годы.

Работа поддержана РФФИ (грант № 19-02-00947). Исследование выполнено в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина».

1. Wood B.R., Kochan K., Bedolla D.E., Salazar-Quiroz N., Grimley S.L., Perez-Guaita D., Baker M.J., Vongsvivut J., Tobin M.J., Bambery K.R., Christensen D., Pasricha S., Eden A.K., Mclean A., Roy S., Roberts J.A., Druce J., Williamson D.A., McAuley J., Catton M., Purcell D.F.J., Godfrey D.I., Heraud P. *Angewan.Chem. Internat. Edit*., **60**, 17102 (2021).
2. Solórzano C.C., Thomas G., Berber E., Wang T.S., Randolph G.W., Duh Q.Y., Triponez F. *Surgery*, **169**, 868 (2021).
3. Shirshin E.A., Yakimov B.P., Darvin M.E., Omelyanenko N.P., Rodionov S.A., Gurfinkel Y.I., Lademann J., Fadeev V.V., Priezzhev A.V. *Biochem. (Moscow)*, **84**, 69 (2019).
4. Simon J.D., Peles D., Wakamatsu K., Ito S. *Pigm. Cell Melanoma Resear*., **22**, 563 (2009).
5. Caldas M., Santos A.C., Veiga F., Rebelo R., Reis R.L., Correlo V.M. *Acta Biomater*., **105**, 26 (2020).
6. Chen C.-T., Chuang C., Cao J., Ball V., Ruch D., Buehler M.J. *Nature Commun*., **5**, 1 (2014)..
7. Micillo R., Panzella L., Iacomino M., Prampolini G., Cacelli I., Ferretti A., Crescenzi O., Koike K., Napolitano A., d'Ischia M. *Sci. Rep*., **7**, 1 (2017).
8. Cao W., Zhou X., McCallum N.C., Hu Z., Ni Q.Z., Kapoor U., Heil C.M., Cay K.S., Zand T., Mantanona A.J., Jayaraman A., Dhinojwala A., Deheyn D.D., Shawkey M.D., Burkart M.D., Rinehart J.D., Gianneschi N.C. *J. Am. Chem. Soc*., **143**, 2622 (2021).
9. Zonios G., Dimou A., Bassukas I., Galaris D., Tsolakidis A., Kaxiras E. *J. Biomed. Opt*., **13**, 014017 (2008).
10. Corani A., Pezzella A., Pascher T., Gustavsson T., Markovitsi D., Huijser A., d'Ischia M., Sundström V. *J. Phys. Chem. Lett*., **4**, 1383 (2013).
11. R.Kohl F., Christopher Grieco, Bern Kohler. *Chem. Sci*., **11**, 1248 (2020).

12. Schadendorf D., Fisher D.E., Garbe C., Gershenwald J.E., Grob J.-J., Halpern A., Herlyn M., Marchetti M.A., McArthur G., Ribas A., Roesch A., Hauschild A. *Nat. Rev. Disease Prim.*, **1**, 15003 (2015).
13. Zonios G., Bykowski J., Kollias N. *J. Investigat. Dermatol.*, **117**, 1452 (2001).
14. Yudovsky D., Pilon L. *Appl. Opt.*, **49**, 1707 (2010).
15. Throm C.M., Wiora G., Reble C., Schleusener J., Schanzer S., Karrer H., Kolbe L., Khazaka G., Meinke M.C., Lademann J. *J. Biophoton.*, **14**, e202000348 (2021).
16. Dolotov L.E., Sinichkin Yu.P., Tuchin V.V., Utz S.R., Altshuler G.B., Yaroslavsky I.V. *Lasers Surg. Medic.*, **34**, 127 (2004).
17. Huang Z., Zeng H., Hamzavi I., Alajlan A., Tan E., McLean D.I., Lui H. *J. Biomed. Opt.*, **11**, 034010 (2006).
18. Huang Z., Lui H., Chen X.K., Alajlan A., McLean D.I., Zeng H. *J. Biomed. Opt.*, **9**, 1198 (2004).
19. Yakimov B.P., Shirshin E.A., Schleusener J., Allenova A.S., Fadeev V.V., Darvin M.E. *Sci. Rep.*, **10**, 14374 (2020).
20. Borisova E.G., Bratchenko I.A., Khristoforova Y.A., Bratchenko L.A., Genova T.I., Gisbrecht A.I., Moryatov A.A., Kozlov S.V., Troyanova P.P., Zakharov V.P. *Opt. Eng.*, **59**, 1 (2020).
21. Bratchenko I.A., Artemyev D.N., Myakinin O.O., Khristoforova Y.A., Moryatov A.A., Kozlov S.V., Zakharov V.P. *J. Biomed. Opt.*, **22** (2), 027005 (2017).
22. Khristoforova Y.A., Bratchenko I.A., Myakinin O.O., Artemyev D.N., Moryatov A.A., Orlov A.E., Kozlov S.V., Zakharov V.P. *J. Biophoton.*, **12**, e20180040 (2019).
23. Galanzha E.I., Menyaev Y.A., Yadem A.C., Sarimollaoglu M., Juratli M.A., Nedosekin D.A., Foster S.R., Jamshidi-Parsian A., Siegel E.R., Makhoul I., Hutchins L.F., Suen J.Y., Zharov V.P. *Sci. Translat. Med.*, **11**, eaat5857 (2019).
24. Saha A., Arora R., Yakovlev V.V., Burke J.M. *J. Biophoton.*, **4**, 805 (2011).
25. Galván I., Jorge A., Solano F., Wakamatsu K. *Spectrochim. Acta Pt A: Molec. Biomolec. Spectros.*, **110**, 55 (2013).
26. Galván I., Jorge A. *Ecol. Evolut.*, **5**, 1425 (2015).
27. Kim Y.J., Wu W., Chun S.-E., Whitacre J.F., Bettinger C.J. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **110**, 20912 (2013).
28. Galván I., Jorge A., Ito K., Tabuchi K., Solano F., Wakamatsu K. *Pigment Cell Melan. Res.*, **26**, 917 (2013).
29. Shirshin E.A., Gurfinkel Y.I., Priezzhev A.V., Fadeev V.V., Lademann J., Darvin M.E. *Sci. Rep.*, **7**, 1 (2017).
30. Teuchner K., Freyer W., Leupold D., Volkmer A., Birch D.J.S., Altmeyer P., Stucker M., Hoffmann K. *Photochem. Photobiol.*, **70**, 146 (1999).
31. Teuchner K., Ehlert J., Freyer W., Leupold D., Altmeyer P., Stücker M., Hoffmann K. *J. Fluores.*, **10** (3), 275 (2000).
32. Teuchner K., Mueller S., Freyer W., Leupold D., Altmeyer P., Stuecker M., Hoffmann K. *Multiphot. Absorp. Nonlin.Transmis. Proces.: Mater., Theory, Applicat.*, **4797**, 211 (2003).
33. Gel'mukhanov F., Baev A., Ågren H., Macák P., Luo Y. *J. Opt. Soc. Am. B*, **19**, 937 (2002).
34. Eichhorn R., Wessler G., Scholz M., Leupold D., Stankovic G., Buder S., Stuecker M., Hoffmann K. *J. Biomed. Opt.*, **14**, 034033 (2009).
35. Kerimo J., Rajadhyaksha M., DiMarzio C.A. *Photochem. Photobiol.*, **87**, 1042 (2011).
36. Dimitrow E., Riemann I., Ehlers A., Koehler M.J., Norgauer J., Elsner P., König K., Kaatz M. *Experiment. Dermatol.*, **18**, 509 (2009).
37. Sugata K., Sakai S., Noriaki N., Osanai O., Kitahara T., Takema Y. *Skin Resear. Technol.*, **16**, 55 (2010).
38. Seidenari S., Arginelli F., Dunsby C., French P.M.W., König K., Magnoni C., Talbot C., Ponti G. *PLoS One*, **8**, e70682 (2013).
39. Seidenari S., Arginelli F., Bassoli S., Cautela J., French P.M.W., Guanti M., Guardoli D., König K., Talbot C., Dunsby C. *Dermatol. Res. Pract.*, **2012**, 810749 (2012).
40. Dancik Y., Favre A., Loy C.J., Zvyagin A.V., Roberts M.S. *J. Biomed. Opt.*, **18**, 1 (2013).
41. Koenig K., Riemann I. *J. Biomed. Opt.*, **8**, 432 (2003).
42. Ju K.-Y., Degan S., Fischer M.C., Zhou K.C., Jia X., Yu J., Warren W.S. Https://Doi.Org/10.1117/1.JBO.24.5.051414, 24, 051414 (2019).
43. Ju K.-Y., Fischer M.C., Warren W.S. *ACS Nano*, **12**, 12050 (2018).
44. Robles F.E., Deb S., Wilson J.W., Gainey C.S., Selim M.A., Mosca P.J., Tyler D.S., Fischer M.C., Warren W.S. *Biomed. Opt. Express*, **6**, 3631 (2015).
45. Simpson M.J., Wilson J.W., Robles F.E., Dall C.P., Glass K., Simon J.D., Warren W.S. *J. Phys. Chem. A*, **118**, 993 (2014).
46. Ju K.-Y., Degan S., Fischer M.C., Zhou K.C., Jia X., Yu J., Warren W.S. *J. Biomed. Opt.*, **24**, 051414 (2019).
47. Robles F.E., Deb S., Vajzovic L., Vora G.K., Mruthyunjaya P., Warren W.S. *Translat. Vis. Sci. Technol.*, **8**, 33 (2019).
48. Galván I., Jorge A., Ito K., Tabuchi K., Solano F., Wakamatsu K. *Pigment Cell Melan. Res.*, **26**, 917 (2013).
49. Evans C. *Photochem. Photobiol.*, **94** (4),624 (2018).
50. Ji-Xin C., Xie X.S. *J. Phys. Chem. B*, **108**, 827 (2003).
51. Freudiger C.W., Min W., Saar B.G., Lu S., Holtom G.R., He C., Tsai J.C., Kang J.X., Xie X.S. *Science*, **322**, 1857 (2008).
52. Hu F., Shi L., Min W. *Nature Meth.*, **16**, 830 (2019).
53. Evans C.L., Xie X.S. *Ann. Rev. Analyt Chem.*, 1, 883 (2008).
54. Wang H., Osseiran S., Igras V., Nichols A.J., Roider E.M., Pruessner J., Tsao H., Fisher D.E., Evans C.L. *Sci. Rep.*, **6**, 1 (2016).
55. Hudson B., Hetherington W., Cramer S., Chabay I., Klauminzer G.K. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 3798 (1976).
56. Weinigel M., Breunig H.G., König K. *Multiphot. Microscopy Biomed. Sci. XIV*, **8948**, 185 (2014).
57. Barad Y., Eisenberg H., Horowitz M., Silberberg Y. *Appl. Phys. Lett.*, **70**, 922 (1998).
58. Chen X., Nadiarynkh O., Plotnikov S., Campagnola P.J. *Nat. Protocols*, **7**, 654 (2012).
59. Wu C.-H., Wang T.-D., Hsieh C.-H., Huang S.-H., Lin J.-W., Hsu S.-C., Wu H.-T., Wu Y.-M., Liu T.-M. *Sci. Rep.*, **6**, 1 (2016).
60. Chen C.-K., Liu T.-M. *Biomed. Opt. Express*, **3**, 2860 (2012).
61. Débarre D., Supatto W., Pena A.-M., Fabre A., Tordjmann T., Combettes L., Schanne-Klein M.-C., Beaurepaire E. *Nat. Meth.*, **3**, 47 (2005).
62. Lanin A.A., Pochechuev M.S., Chebotarev A.S., Kelmanson I.V., Bilan D.S., Kotova D.A., Tarabykin V.S., Ivanov A.A., Fedotov A.B., Belousov V.V., Zheltikov A.M. *Opt. Lett.*, **45**, 836 (2020).
63. You S., Tu H., Chaney E.J., Sun Y., Zhao Y., Bower A.J., Liu Y.-Z., Marjanovic M., Sinha S., Pu Y., Boppart S.A. *Nature Commun.*, **9** (1), 1 (2018).
64. Su T.-Y., Liao C.-S., Yang C.-Y., Zhuo G.-Y., Chen, S.-Y., Chu S.-W. *Appl. Phys. Lett.*, **99**, 113702 (2011).
65. Sun C.-K., Liu W.-M., Liao Y.-H., Y.-H. *Biomed. Opt. Express*, **10**, 5716 (2019).
66. Liao Y.-H., Su Y.-H., Shih Y.-T., Chen W.-S., Jee S.-H., Sun C.-K. *J. Biomed. Opt.*, **25**, 1 (2019).
67. Sun C.-K., Wu P.-J., Chen S.-T., Su Y.-H., Wei M.-L., Wang C.-Y., Gao H.-C., Sung K.-B., Liao Y.-H. *Biomed. Opt. Expres*s, **11**, 3009 (2020).