Проверка адекватности простой теоретической модели дегидратационного оптического просветления коллагеновых пучков: ОКТ-измерения

О.А.Зюрюкина, М.Е.Швачкина, В.И.Кочубей, Ю.П.Синичкин, Д.А.Яковлев

С помощью оптической когерентной томографии оцениваются коэффициенты рассеяния коллагеновых пучков при разных уровнях гидратации ткани. Проверяется работоспособность простой теоретической модели дегидратационного изменения оптических характеристик коллагенового пучка, который рассматривается как система параллельных цилиндров, выступающих в качестве моделей составляющих пучок коллагеновых фибрилл. Расчет характеристик рассеяния на индивидуальных рассеивателях проводится с использованием теории Ми. Для учета кооперативных эффектов, обусловленных плотной упаковкой рассеивателей, применена стандартная функция упаковки для системы идентичных цилиндров. Также в теоретической модели использован определенный эмпирический закон изменения уровня гидратации фибрилл при изменении содержания воды в ткани, предопределяющий изменения диаметра и показателя преломления фибрилл при дегидратации и регидратации ткани. Показано, что теоретические оценки, полученные с помощью этой модели, хорошо согласуются с экспериментальными данными, что позволяет рассматривать данную модель как надежную.

Ключевые слова: *рассеяние света, компрессия, оптическое просветление биологических тканей, оптическая когерентная томография, коллагеновые пучки, фибриллы.*

1. Введение

Одним из хорошо известных способов управления оптическими свойствами биологических тканей является их механическая компрессия. Прикладываемое к биоткани внешнее давление изменяет ее морфофункциональное состояние и геометрию, кровенаполненность кровеносных сосудов, вызывает перемещение воды внутри биоткани, что отражается на ее оптических свойствах – способности биоткани пропускать и отражать свет и изменять спектральный состав распространяющегося внутри биоткани излучения. Внешняя компрессия приводит к изменению коллимированного и диффузного пропускания (*in vitro*) и диффузного отражения (*in vitro*, *in vivo*). Она уменьшает диффузное отражение и увеличивает пропускание биоткани, что является результатом изменения толщины и плотности ткани и ее оптических параметров. Поэтому внешняя компрессия позволяет расширить возможности широко и эффективно используемых методов диффузионной отражательной спектроскопии [1] и оптической когерентной томографии (ОКТ) биотканей [2]. Во многих случаях для адекватного прогнозирования эффекта механической компрессии необходимо не только знание механизмов, приводящих к изменению оптических свойств биоткани, но и умение описать этот эффект на количественном уровне. Несмотря на то что имеющийся в настоящее время набор теоретических инструментов, применяемых в этих целях, широк и разнообразен, существует потребность в простых способах описания, которые позволили бы оценить результат воздействия на ткань быстро и точно.

Нередко компрессия используется как способ оптического просветления биоткани. Оптическое просветление биотканей увеличивает глубину проникновения света в ткань, повышает интенсивность света в более глубоких областях ткани, потенциально улучшая возможности различных оптических, диагностических и терапевтических методов. Эффективность просветления зависит от длины волны, поэтому оно позволяет оценивать содержание в ткани хромофоров, поглощение которых в нормальных условиях завуалировано поглощением других хромофоров и рассеянием [1, 3]. Оптическое просветление изменяет характер трансформации спектров излучения, распространяющегося из глубины биоткани, что должно учитываться при применении отражательных и люминесцентных методов диагностики [4, 5].

Среди механизмов, обусловливающих оптическое просветление биоткани при компрессии, особое внимание привлекают, как правило, два: это транспорт хромофоров и изменение свойств рассеяния ткани из-за ее дегидратации. Уменьшение рассеяния света в сжатой биоткани в результате ее дегидратации является основным механизмом компрессионного оптического просветления таких тканей, как дерма, склера, а также других коллагенсодержащих тканей [6, 7]. Именно этому механизму посвящена настоящая работа.

Рассеивающие свойства коллагенсодержащих тканей в основном определяются оптическими характеристиками коллагеновых пучков, которые состоят из коллагеновых фибрилл, цилиндрических нитей с диаметрами в диапазоне 20 – 500 нм, расположенных в пучке приблизительно параллельно друг другу. В нативном состоянии индивидуальная коллагеновая фибрилла, находящаяся во внутритканевой жидкости, является сильным рассеивателем, поскольку ее показатель преломления, несмотря на значительную долю воды в ее составе, существенно больше

О.А.Зюрюкина, М.Е.Швачкина, В.И.Кочубей, Ю.П.Синичкин, Д.А.Яковлев. Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; email: saratov_gu@mail.ru, yusin49@gmail.com

Поступила в редакцию 2 октября 2021 г.

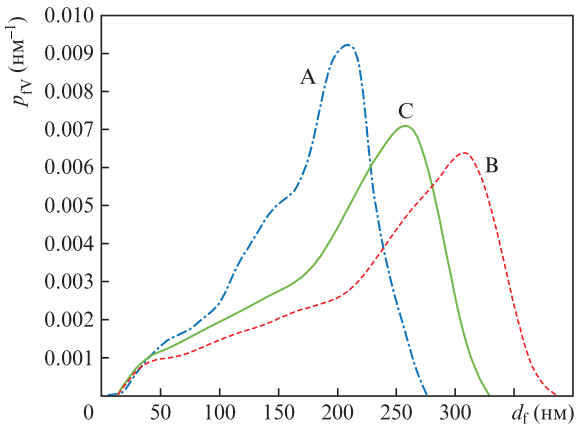

Рис.1. Типичные распределения коллагеновых фибрилл по их диаметру d_f в сухожильных пучках ($p_{fV}(d_f)$ – плотность объемного распределения фибрилл; $p_{fV}(d_f)dd_f$ – доля объема, занимаемая фибриллами с диаметрами от d_f до $d_f + dd_f$, относительно всего объема, занятого фибриллами). Распределения A и B построены по экспериментальным данным для образцов сухожилий хвоста взрослых крыс, представленным на рис.3(d) [8] и на рис.2(e) [9] соответственно. В случае распределения A среднеобъемный (среднемассовый) диаметр фибрилл $\bar{d}_f$ составляет 172 нм, в случае B $\bar{d}_f$ = 241 нм, в случае C (это гипотетическое распределение, промежуточное между распределениями A и B) $\bar{d}_f$ = 205 нм.

(более чем на 0.1) показателя преломления окружающей ее внутритканевой жидкости (последний близок к показателю преломления воды). Однако из-за относительно плотной упаковки фибрилл в коллагеновых пучках рассеяние ансамблем фибрилл в силу кооперативных интерференционных эффектов оказывается существенно более слабым, чем можно было бы ожидать, отталкиваясь от свойств рассеяния индивидуальной фибриллы. Наиболее ярко роль кооперативных эффектов проявляется в случае роговицы глаза, которая благодаря монодисперсности системы и квазикристаллическому порядку взаимного расположении фибрилл почти не рассеивает свет. В отличие от ламелей роговицы, коллагеновые пучки дермы, склеры, сухожилий и многих других тканей, как системы фибрилл, являются существенно полидисперсными – диаметры d_f фибрилл, составляющих пучок, могут различаться в несколько раз (рис.1), а кроме того, в расположении фибрилл отсутствует какая-либо трансляционная упорядоченность. Несмотря на это, роль кооперативных эффектов в оптике таких пучков остается очень важной, и именно они существенным образом определяют те изменения, которые происходят в оптических свойствах коллагенсодержащих тканей при их дегидратации [6, 10].

Цель настоящей работы – экспериментальная проверка адекватности простой теоретической модели для оценки коэффициентов рассеяния коллагеновых пучков при различных уровнях гидратации ткани. Эта теоретическая модель рассматривается в разд.2. В разд.3 описана методика эксперимента. Она опирается на применение оптической когерентной томографии для одновременного мониторинга и степени гидратации ткани, и ее рассеивающих свойств. В разд.4 представлены основные результаты и их обсуждение.

2. Теоретические модели

В качестве оптической модели коллагенового пучка при расчете его характеристик рассеяния рассматривается полидисперсная система параллельных бесконечных диэлектрических цилиндров с показателем преломления n_f, которые являются моделями коллагеновых фибрилл, находящихся в изотропной среде с показателем преломления n_m, представляющей интерстициальную жидкость. Будем считать, что n_m с хорошей точностью равен показателю преломления воды.

В коллагеновых пучках вода распределяется между интерстициальной жидкостью и фибриллами. Отношение объема воды, находящейся в фибриллах, к объему воды в интерстициальной жидкости зависит от степени гидратации ткани. В данной работе мы будем для краткости называть степенью гидратации системы, имея в виду физическую величину, объемную степень гидратации, определяемую как отношение объема воды в системе к объему неводной составляющей системы. Соответственно, под степенью гидратации ткани, для которой примем обозначение H, будем понимать отношение объема воды в ткани к объему неводной составляющей ткани, а под степенью гидратации коллагеновых фибрилл H_f – отношение объема воды в фибриллах к объему неводной составляющей фибрилл. Параметр H выражается через объемное содержание воды в ткани c_w следующим образом: $H = c_w/(1 - c_w)$. От величины H_f существенным образом зависит значение показателя преломления фибрилл. В рамках применимости правила Гладстона–Даля

$$n_f = \frac{n_{dry} + n_w H_f}{1 + H_f}, \tag{1}$$

где n_{dry} – средний показатель преломления неводной составляющей фибрилл, а n_w – средний показатель преломления воды.

В экспериментах с коллагенсодержащими тканями (роговица и сухожилие) [11–13] было установлено, что для них при уровнях гидратации ткани, близких к нативным, даже значительные изменения содержания воды в ткани не приводят к существенному изменению H_f. Изменения H_f с изменением H являются существенными только тогда, когда H становится меньше некоторого критического значения. В работе [14] было показано, что в случае сухожилий имеющиеся экспериментальные данные [11, 14] допускают использование следующей приближенной зависимости $H_f(H)$:

$$H_f(H) = \begin{cases} A_f H, \quad H \le \dfrac{P_f H_{fn}}{A_f}, \\ H_{fn} - \dfrac{A_f^2}{4H_{fn}(1-P_f)}\left[H + \dfrac{H_{fn}}{A_f}(P_f - 2)\right]^2, \quad \dfrac{P_f H_{fn}}{A_f} < H \le (2 - P_f)\dfrac{H_{fn}}{A_f}, \\ H_{fn}, \quad H > (2 - P_f)\dfrac{H_{fn}}{A_f}, \end{cases} \tag{2}$$

где $A_f = 0.9729$, $P_f = 0.1034$, $H_{fn} = 0.6404$ (рис.2,*a*). Согласно (2) H_f при $H < 0.07$ изменяется пропорционально H, а A_f

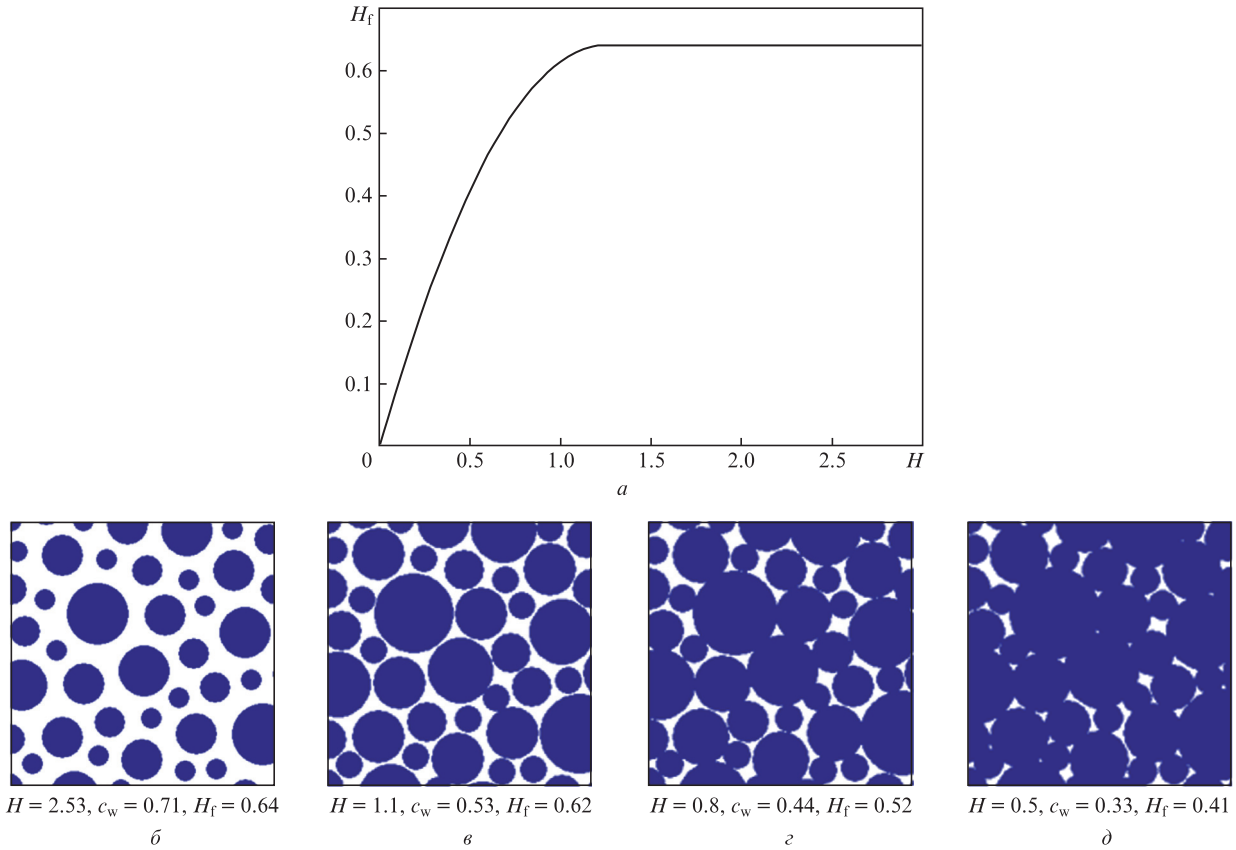

Рис.2. Функция $H_f(H)$, заданная формулой (2) (*а*), и упаковка фибрилл в коллагеновом пучке при различных уровнях гидратации ткани при $H_f(H)$ вида (2) (*б–д*).

является коэффициентом пропорциональности. При $H > 1.25$ – на этот диапазон приходится нативный уровень гидратации ткани – имеет место плато $H_f(H) = H_{fn}$. Величина параметра P_f определяет ширину зоны перехода с начального линейного участка на плато. Приведенные значения параметров A_f, P_f и H_{fn} были определены в [14] методом наименьших квадратов по большому набору экспериментальных точек (H, H_f), полученных при исследовании зависимости коэффициента двулучепреломления коллагеновых пучков от степени их гидратации. На рис.2,*б–д* представлена примерная упаковка фибрилл в коллагеновом пучке при различных уровнях гидратации ткани. На рис.3 показано, как с изменением содержания воды в ткани (в соответствии с данной моделью гидратации ткани) изменяются объемная доля фибрилл в пучке

$$f_V = \frac{1 + H_f}{1 + H} \tag{3}$$

и диаметр фибрилл d_f. Приведена зависимость от c_w параметра

$$s_d \equiv \frac{d_f}{d_{fn}} = \sqrt{\frac{1 + H_f}{1 + H_{fn}}}, \tag{4}$$

определяемого как отношение диаметра фибриллы при заданном H к диаметру этой же фибриллы d_{fn} при нативном уровне гидратации ткани.

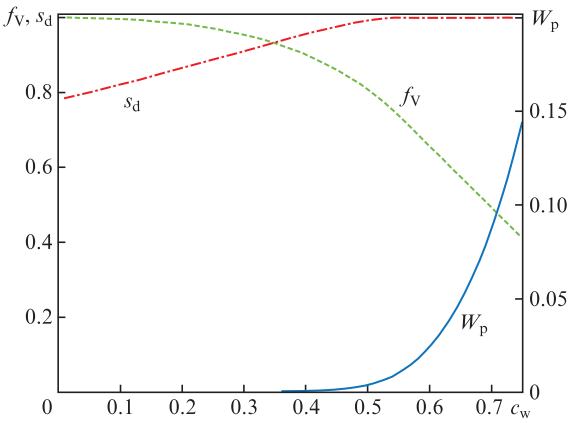

Рис.3. Зависимости объемной доли фибрилл в пучке f_V, параметра s_d и фактора упаковки W_p от содержания воды в ткани c_w для модели гидратации (2).

При падении света на цилиндр перпендикулярно его оси количество и угловое распределение излучения, рассеянного цилиндром, сильно зависят от состояния поляризации падающего света (рис.4). В силу ориентационной упорядоченности цилиндров (фибрилл) в рассматриваемой системе то же можно сказать и о рассеянии света системой цилиндров. При этом система может быть охарактеризована двумя главными коэффициентами рассеяния, $\mu_{s\parallel}$ и $\mu_{s\perp}$, первый из которых соответствует случаю, когда направление поляризации падающего света параллельно оси цилиндров, второй – когда направление поляризации перпендикулярно оси. В рассматриваемой модели с применением широко используемых в оптике биотканей приближений [15] коэффициенты $\mu_{s\parallel}$ и $\mu_{s\perp}$ представляются в виде

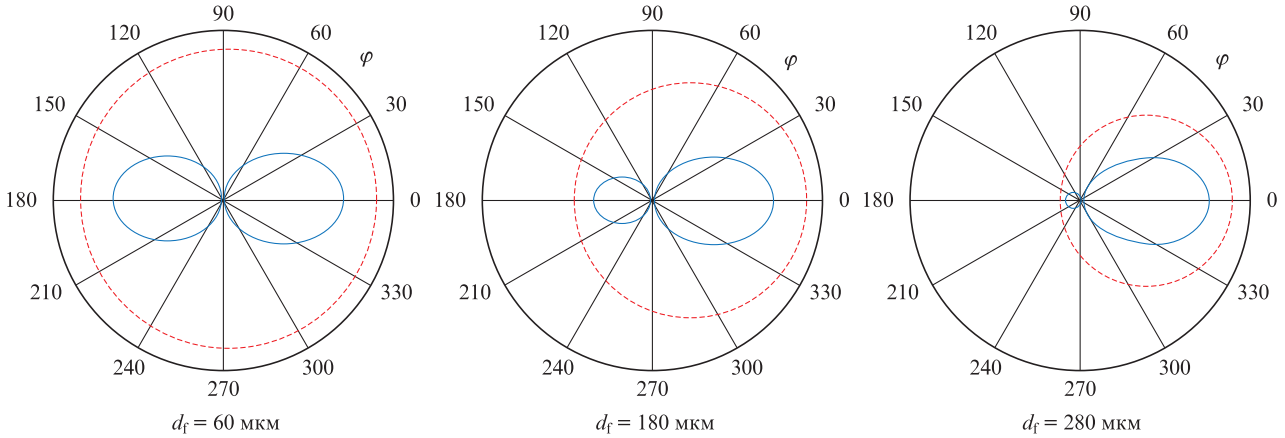

Рис.4. Индикатрисы рассеяния цилиндров различного диаметра d_f для света, линейно поляризованного параллельно (пунктирная кривая) и перпендикулярно (сплошная кривая) оси цилиндра. Свет с длиной волны 930 нм падает на цилиндр перпендикулярно его оси. Показатель преломления материала цилиндра n_f = 1.485 (фибриллы в нативном состоянии); n_m = 1.325 (вода); φ (град) – угол рассеяния.

$$\mu_{s\|} = \langle\alpha_{V\|}\rangle f_V W_p(f_V), \quad \mu_{s\perp} = \langle\alpha_{V\perp}\rangle f_V W_p(f_V), \tag{5}$$

где $\langle\alpha_{V\|}\rangle$ и $\langle\alpha_{V\perp}\rangle$ – средние объемные коэффициенты рассеяния фибрилл (цилиндров), рассчитанные для заданного распределения фибрилл по размерам (см. формулы (7)); W_p – фактор упаковки, учитывающий кооперативные эффекты [15, 16]. В данной работе мы будем использовать функцию упаковки $W_p(f_V)$ следующего вида:

$$W_p = \frac{(1-f_V)^3}{1+f_V} \tag{6}$$

[15, 16]. Формула (6) была выведена для ансамбля идентичных цилиндров [16]. При рассмотрении полидисперсных систем, как в нашем случае, она используется в качестве приближения. Зависимость W_p от c_w, соответствующая (2) и (6), приведена на рис.3.

Параметры $\langle\alpha_{V\|}\rangle$ и $\langle\alpha_{V\perp}\rangle$ вычисляются по формулам

$$\langle\alpha_{V\|}\rangle = \frac{2}{\pi}\int\frac{Q_{s\|}(d)}{d}p_{fV}(d)\,\mathrm{d}d, \qquad \langle\alpha_{V\perp}\rangle = \frac{2}{\pi}\int\frac{Q_{s\perp}(d)}{d}p_{fV}(d)\,\mathrm{d}d, \tag{7}$$

где $Q_{s\|}(d)$ и $Q_{s\perp}(d)$ – факторы эффективности рассеяния цилиндра диаметром d для падающего линейно поляризованного света с направлением поляризации, параллельным и перпендикулярным оси цилиндра соответственно; $p_{fV}(d)$ – плотность объемного распределения цилиндров (фибрилл) по диаметрам (см. рис.1). Факторы $Q_{s\|}$ и $Q_{s\perp}$ могут быть рассчитаны строго по известным формулам теории рассеяния Ми для цилиндров. Мы использовали для этих целей процедуру BHCYL, представленную в монографии [17]. На рис.5 в качестве примера показаны зависимости $\langle\alpha_{V\|}\rangle$ и $\langle\alpha_{V\perp}\rangle$ от c_w для трех распределений фибрилл по размерам (A, B и C), приведенных на рис.1 (они взяты в качестве распределений, характеризующих размер фибрилл в нативном состоянии), рассчитанные при следующих значениях параметров: λ = 930 нм, n_{dry} = 1.587, $n_m = n_w$ = 1.325 (вода) [18]. Оценка n_{dry} = 1.587 согласуется с экспериментальным экстраполяционным значением группового показателя преломления коллагеновых пучков при c_w = 0 $n_{dry(g)}$ = 1.594, полученным в [19] (см. также [20]). Значение 1.587 получено для n_{dry} по формуле

$$n_{dry} = n_{dry(g)} + \lambda\left.\frac{\mathrm{d}n_{dry}}{\mathrm{d}\lambda}\right|_{\lambda = 930\ \text{нм}}.$$

Второе слагаемое оценено по данным работы [21] для показателя преломления желатина (см. [19]). На рис.5 хорошо видна тенденция к увеличению $\langle\alpha_{V\|}\rangle$ и $\langle\alpha_{V\perp}\rangle$ с увеличением среднего диаметра фибрилл в ткани.

На рис.6 показаны рассчитанные зависимости от c_w коэффициентов рассеяния $\mu_{s\|}$ и $\mu_{s\perp}$, соответствующие распределениям A, B и C. Вид зависимостей $\mu_{s\|}(c_w)$ и $\mu_{s\perp}(c_w)$ определяется главным образом характером зависимости W_p от c_w (см. рис.3). В силу малости W_p в диапазоне $c_w < 0.4$ коэффициенты $\mu_{s\|}$ и $\mu_{s\perp}$ также очень малы, т.е. согласно данной модели при $c_w < 0.4$ независимо от распределения фибрилл по размерам ткань должна быть практически прозрачной. В диапазоне $0.4 < c_w < 0.75$ (значения $c_w > 0.75$ достигаются только в ламелях роговицы глаза, которые здесь не рассматриваются) $\mu_{s\|}$ и $\mu_{s\perp}$ монотонно возрастают с увеличением c_w. При этом, как видно из рис.6, при большем среднем диаметре фибрилл для любого фиксированного уровня гидратации достигаются более высокие значения $\mu_{s\|}$ и $\mu_{s\perp}$. Отношение

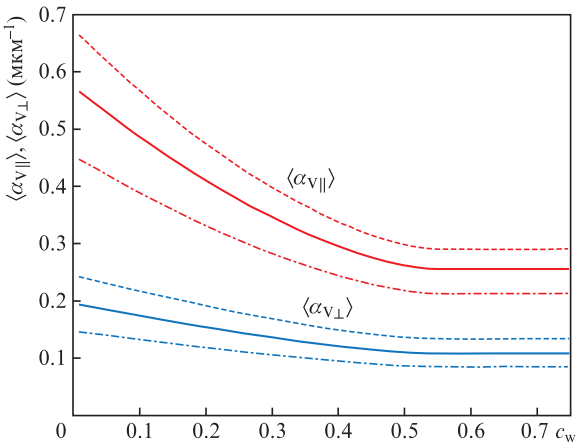

Рис.5. Коэффициенты рассеяния $\langle\alpha_{V\|}\rangle$ и $\langle\alpha_{V\perp}\rangle$, рассчитанные для распределений A (штрих-пунктирные кривые), B (штриховые кривые) и C (сплошные кривые).

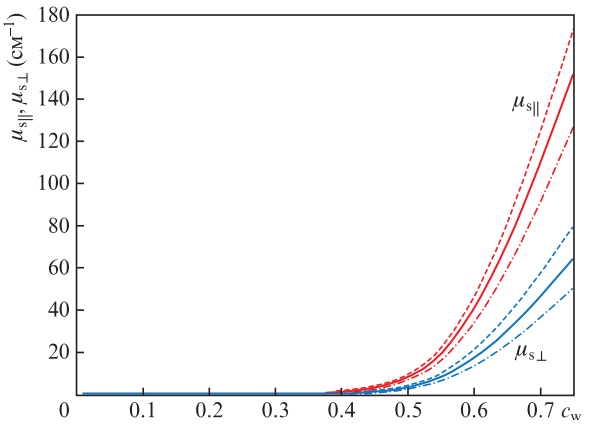

Рис.6. Коэффициенты рассеяния $\mu_{s\|}$ и $\mu_{s\perp}$, рассчитанные для распределений A (штрих-пунктирные кривые), B (штриховые кривые) и C (сплошные кривые).

$\mu_{s\|}/\mu_{s\perp}$ в области плато $H_f(H)$ ($c_w > 0.56$) не изменяется при изменении c_w и составляет 2.51 для распределения A, 2.36 для распределения C и 2.17 для распределения B.

Экспериментальная проверка адекватности такой оценки коэффициентов рассеяния коллагеновых пучков и явилась основной задачей настоящей работы.

При описании оптической части модели мы для краткости обошли вниманием возможное поглощение света в фибриллах и внутритканевой жидкости. В контексте данной работы это оправдано тем, что в спектральном диапазоне, в котором осуществлялось оптическое зондирование образцов, поглощение света в фибриллах и внутритканевой жидкости, заполняющей пространство между фибриллами, очень мало; при необходимости поглощение легко учесть. Учет наличия во внутритканевой жидкости других компонентов, помимо воды, также не составляет сложности. В области значений c_w, представляющей практический интерес, он приводит к малозначительным изменениям теоретических кривых.

3. Эксперимент

В настоящей работе и содержание воды в коллагеновых пучках, и их коэффициенты рассеяния оценивались с помощью оптической когерентной томографии. Для измерений использовался спектральный (spectral-domain) томограф ThorLabs-OCP930SR (центральная длина волны зондирующего излучения λ_0 = 930 нм, ширина полосы – 100 нм).

В качестве образцов коллагеновых пучков были взяты образцы вторичных коллагеновых пучков сухожилий хвоста крысы. Структура и состав первичных коллагеновых пучков (волокон), из которых состоят вторичные сухожильные пучки, аналогичны структуре и составу коллагеновых волокон склеры, дермы, стенок кровеносных сосудов, створок сердечных клапанов и т. п. Строение вторичных коллагеновых пучков сухожилий хорошо изучено, оно детально описано в работах [22–24]. Массовое содержание коллагена в сухожилиях в естественном состоянии составляет обычно 24%–38%, а воды – от 55% до 72% [22, 25, 26]. Вторичные сухожильные пучки, типичный диаметр которых 250–500 мкм, в десятки раз толще по сравнению с коллагеновыми пучками в других типах тканей, что делает их очень удобными для экспериментов. Благодаря своей относительно простой структуре и доступности вторичные сухожильные пучки хвоста крысы – весьма популярный модельный объект для изучения физических и физиологических свойств коллагеновых волокон и коллагенсодержащих тканей. В ненагруженном состоянии вторичным коллагеновым пучкам свойственен волнообразный ход волокон, при этом близкорасположенные волокна идут параллельно друг другу. При небольшом натяжении пучка ориентация волокон в нем становится почти однородной. По своей структуре вытянутый сухожильный пучок почти идеально соответствует оптической модели коллагенового пучка как системы параллельных цилиндров-фибрилл (см. разд.2). И это, помимо всего прочего, делает возможной оценку коэффициентов рассеяния $\mu_{s\|}$ и $\mu_{s\perp}$.

Диаметр используемых в эксперименте сухожильных пучков, взятых от взрослых крыс, составлял от 300 до 450 мкм. До момента измерений образцы хранились в физиологическом растворе (0.9%-ный водный раствор хлорида натрия) не более 7 дней.

До начала измерений поляризация зондирующего излучения устанавливалась параллельной плоскости B-сканирования и в ходе эксперимента не изменялась. Перед измерениями исследуемый коллагеновый пучок, погруженный в физиологический раствор, слегка натягивался и закреплялся зажимами на предметном стекле (см. [20]). Затем пучок, находясь в физиологическом растворе, накрывался покровным стеклом и слегка придавливался им для создания больших площадей оптического контакта ткани с предметным и покровным стеклами (оценка $\mu_{s\|}$ и $\mu_{s\perp}$ осуществлялась в областях, где образец находился в оптическом контакте как с предметным, так и с покровным стеклом). После этого часть физиологического раствора из-под покровного стекла удалялась с помощью фильтровальной бумаги. Далее образец (коллагеновый пучок) устанавливался в ОКТ-систему так, чтобы его ось была перпендикулярна плоскости B-сканирования, и регистрировался скан поперечного сечения пучка. Сканы, полученные при такой установке образца (положение 1, рис.7), использовались впоследствии для оценки содержания воды в ткани и коэффициента $\mu_{s\perp}$. Затем образец поворачивался на 90°, так чтобы ось пучка была параллельна направлению B-сканирования, и регистрировались сканы при таком положении образца (положение 2, рис.7); эти сканы использовались для оценки коэффициента $\mu_{s\|}$. На рис.7 для иллюстрации показаны ОКТ-изображения одного из образцов в положениях 1 и 2 при

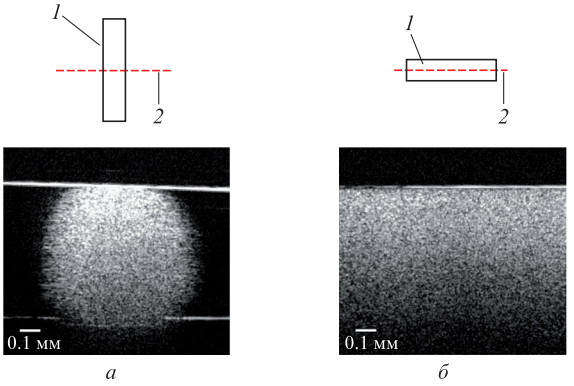

Рис.7. ОКТ-изображения образца вторичного сухожильного пучка в положениях 1 (*а*) и 2 (*б*): *1* – образец; *2* – плоскость B-сканирования.

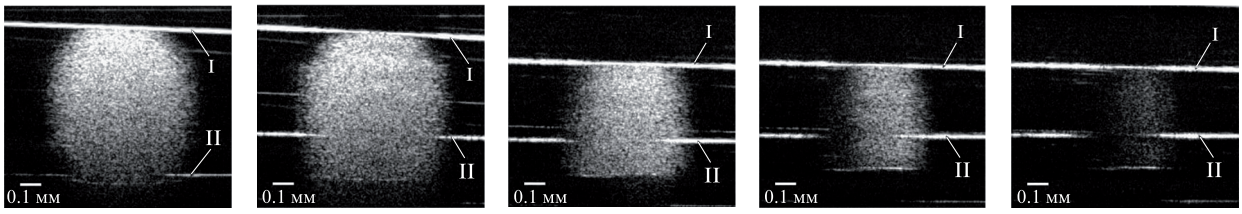

Рис.8. ОКТ-изображения образца сухожильного пучка в положении 1 на разных стадиях эксперимента (I – нижняя граница покровного стекла, II – верхняя граница предметного стекла).

уровне гидратации ткани, близком к нативному. В течение двух часов через определенные промежутки времени (по мере испарения воды из физраствора и дегидратации ткани) процедура повторялась. На рис.8 в качестве примера показана полученная таким образом серия ОКТ-изображений одного из образцов в положении 1.

Содержание воды в ткани c_w в области зондирования оценивалось по найденным по сканам образца в положении 1 значениям среднего группового показателя преломления ткани $n_{t(g)}$. Для расчета c_w использовалась формула

$$c_w = \frac{n_{dry(g)} - n_{t(g)}}{n_{dry(g)} - n_{w(g)}} \quad (8)$$

при $n_{w(g)} = 1.341$ (групповой показатель преломления воды на длине волны $\lambda = 930$ нм) и $n_{dry(g)} = 1.594$ (экстраполяционное значение группового показателя преломления коллагенового пучка при $c_w = 0$) [14, 19, 20]. Групповой показатель преломления ткани $n_{t(g)}$ определялся по смещению изображения верхней поверхности предметного стекла под образцом относительно его положения в отсутствие образца; способ определения $n_{t(g)}$ подробно описан в [14, 19, 20].

Коэффициенты рассеяния оценивались по кривым зависимости откорректированной средней амплитуды ОКТ-сигнала от глубины расположения точки зондирования, рассчитываемым следующим образом [27]:

$$A_c(z) = \frac{\langle A(z)\rangle - \langle A_{dark}(z)\rangle}{\sqrt{t(z - z_f)h(l_{opt}(z))}}, \quad (9)$$

где z – пространственная координата в направлении А-сканирования, отсчитываемая от фронтальной границы образца; $A(z)$ – амплитуда ОКТ-сигнала (скобки $\langle\ \rangle$ обозначают усреднение по соседним А-сканам); $\langle A_{dark}(z)\rangle$ – средняя амплитуда фонового сигнала, измеренная в отсутствие образца в предметном плече интерферометра; $t(z - z_f)$ – функция, учитывающая конфокальность системы оптического зондирования [28]; z_f – координата плоскости перетяжки зондирующего пучка на участке его распространения внутри образца; $h(l_{opt}(z))$ – функция, описывающая свойственный спектральным ОКТ-системам спад чувствительности с увеличением расстояния от плоскости нулевой задержки интерферометра до зондируемой области, обусловленный конечным спектральным разрешением спектрометра ОКТ-системы [29]; $l_{opt}(z)$ – оптическая длина пути света от плоскости нулевой задержки интерферометра до текущей точки зондирования, положение которой характеризуется координатой z. Параметры функций $t(z - z_f)$ и $h(l_{opt}(z))$ были определены экспериментально в результате калибровочных измерений с планарным диффузным рассеивателем в качестве образца. Все измерения проводились при одной и той же фокусировке зондирующей системы, т.е. положение перетяжки зондирующего пучка, падающего на покровное стекло, было фиксированным. Оно было определено в ходе калибровочных измерений. Положение плоскости перетяжки зондирующего пучка на участке его распространения внутри образца рассчитывалось по положению перетяжки пучка, падающего на покровное стекло, с помощью правила ABCD [30]. При расчете координаты z для точек А-скана использовалось измеренное указанным выше способом значение среднего группового показателя преломления ткани.

Для оценки коэффициентов рассеяния нами использовалось одноэкспоненциальное приближение [27]

$$A_c(z) \approx A_{c0}\exp(-\mu_{OCT}z). \quad (10)$$

Коэффициенты μ_{OCT} и A_{c0} находились с помощью метода наименьших квадратов. В работе [31] было показано, что полученное с использованием приближения (10) значение μ_{OCT} является близким к значению соответствующего коэффициента рассеяния среды, если этот коэффициент рассеяния не превышает 60 см$^{-1}$. Исключение составляют случаи, когда индикатриса рассеяния среды имеет узкую направленность ($g > 0.8$) [32–34]. В нашем случае индикатрисы рассеяния для обеих поляризаций падающего света являются широкими (см. рис.4).

Надежность данной методики оценки коэффициента рассеяния была подтверждена результатами тестовых измерений, проведенных на слое суспензии *Intralipid*® 20%, разбавленной дистиллированной водой в соотношении 1 : 16 по объему. Согласно литературным данным [35] при такой концентрации интралипида коэффициент рассеяния суспензии μ_s на длине волны 930 нм должен быть равен 22.8 см$^{-1}$. Полученное нами значение μ_{OCT} составило 21 см$^{-1}$, т.е. оказалось достаточно близким к указанному литературному значению μ_s.

В экспериментах с коллагеновыми пучками значения μ_{OCT}, полученные для образца в положении 1, рассматривались в качестве оценок $\mu_{s\perp}$, а значения, полученные при положении 2, – в качестве оценок $\mu_{s||}$.

4. Результаты и их обсуждение

На рис.9 представлены основные результаты измерений – значения μ_{OCT}, полученные при различных уровнях гидратации ткани для двух ортогональных поляризаций падающего света на шести образцах коллагеновых пучков. Данные, соответствующие положению 1 образца (падающий свет поляризован перпендикулярно направлению фибрилл), приведены на рис.9,*a*; данные для положения 2

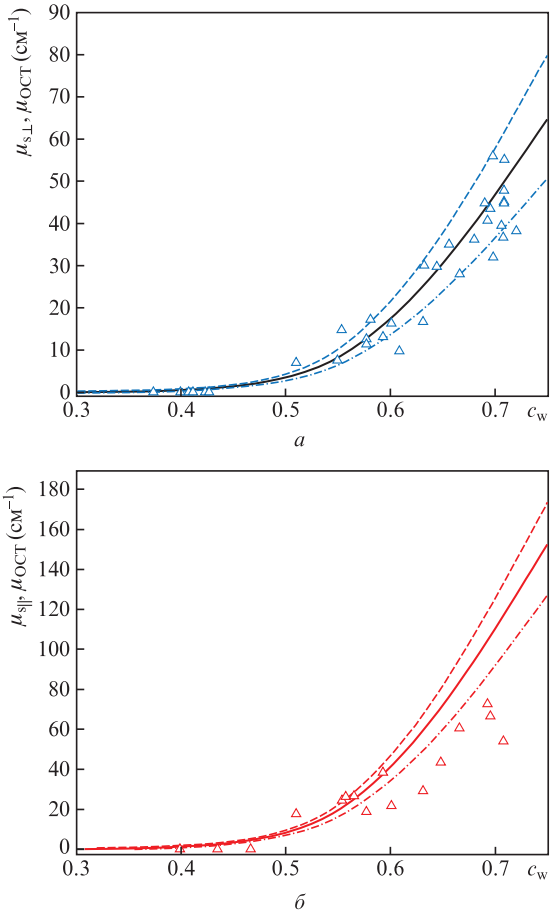

Рис.9. Теоретические зависимости $\mu_{s\perp}(c_w)$ и экспериментальные точки (c_w,$\mu_{ОСТ}$), полученные для образцов в положении 1 (*а*), теоретические зависимости $\mu_{s\|}(c_w)$ и экспериментальные точки (c_w,$\mu_{ОСТ}$) – для образцов в положении 2 (*б*) (штрих-пунктирные кривые – распределение A, штриховые – распределение B, сплошные – распределение C).

(направление поляризации падающего света параллельно направлению фибрилл) – на рис.9,*б*. Для сравнения на этих рисунках показаны также соответствующие теоретические кривые из рис.6.

Эксперимент подтвердил, что при $c_w < 0.4$ и вблизи этой области рассеяние в коллагеновых пучках является очень слабым. В этом диапазоне значений c_w и до уровня $c_w = 0.47$ ОКТ-сигнал от объема образцов находился на фоновом уровне, т.е. рассеяние было столь слабым, что совсем не проявлялось на ОКТ-сканах.

Как видно из рис.9,*а*, в случае поляризации, ортогональной направлению фибрилл, экспериментальные данные хорошо согласуются с теоретическими во всем рассматриваемом диапазоне значений c_w. Если допустить, что распределения фибрилл по размеру в рассматриваемых образцах близки к распределению C (см. рис.1) или, варьируясь от образца к образцу, являются промежуточными между распределениями A и B, что вполне правдоподобно, можно говорить о хорошем количественном соответствии теоретических и экспериментальных данных.

Для параллельной направлению фибрилл поляризации (рис.9,*б*) о хорошем количественном согласии экспериментальных значений $\mu_{ОСТ}$ и теоретических значений $\mu_{s\|}$ можно говорить лишь в отношении диапазона $c_w < 0.6$. В диапазоне $c_w > 0.6$ все экспериментальные точки (c_w, $\mu_{ОСТ}$) лежат ниже кривых $\mu_{s\|}(c_w)$ для всех трех распределений. Однако это не дает основания утверждать, что рассматриваемая модель дает в этом диапазоне неточные оценки: существуют признаки, указывающие на то, что в этом диапазоне значения $\mu_{ОСТ}$, полученные с использованием приближения (10), должны быть ниже истинных значений $\mu_{s\|}$.

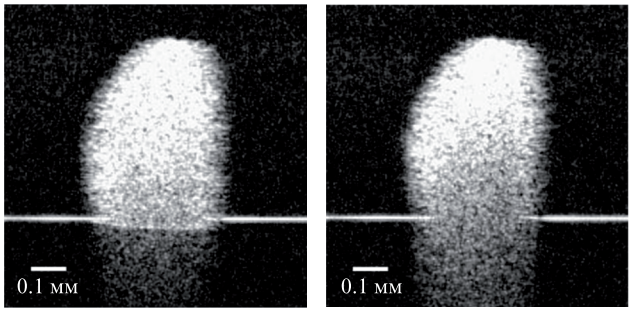

Рис.10. ОКТ-изображения образца вторичного сухожильного пучка, полученные при поляризации падающего излучения, перпендикулярной (*а*) и параллельной (*б*) направлению фибрилл.

На рис.10 приведены ОКТ-изображения сечения образца коллагенового пучка в одном и том же положении, первое из которых зарегистрировано при поляризации падающего излучения, перпендикулярной направлению фибрилл, второе – при поляризации падающего излучения, параллельной направлению фибрилл. Содержание воды в образце близко к нативному. Обращает на себя внимание то, что на втором изображении, в отличие от первого, не видна нижняя граница коллагенового пучка и под его изображением тянется длинный, ярко выраженный шлейф. Присутствие такого шлейфа указывает на существенный вклад многократного рассеяния в ОКТ-сигнал [36]. При этом отсутствие на изображении нижней границы образца свидетельствует о том, что ОКТ-сигнал от области ткани, расположенной у этой границы, формируется почти полностью за счет многократного рассеяния. Понятно, что из-за увеличения уровня ОКТ-сигнала с больших глубин за счет многократного рассеяния значения $\mu_{ОСТ}$, полученные с использованием приближения (10), будут меньше, чем истинные значения $\mu_{s\|}$. Разность вкладов многократного рассеяния в ОКТ-сигнал в двух рассматриваемых ситуациях очевидно связана и с тем, что $\mu_{s\|}$ в рассматриваемой области существенно больше, чем $\mu_{s\perp}$, и с разницей в форме индикатрис рассеяния для рассматриваемой пары состояний поляризации падающего света (см. рис.4). Отметим также, что согласно представленным теоретическим данным в случае распределения C $\mu_{s\|}$ преодолевает критический уровень 60 см$^{-1}$ [31] при $c_w \approx 0.63$, а $\mu_{s\perp}$ – при $c_w \approx 0.74$. За исключением заведомо ненадежных экспериментальных оценок $\mu_{s\|}$ в области $c_w > 0.6$, все остальные данные, полученные в представленном эксперименте, хорошо согласуются с теоретическими.

В целом результаты проведенного эксперимента позволяют утверждать, что теоретическая модель, описанная в разд.2, является адекватной и обеспечивает хорошую точность прогноза по меньшей мере в отношении относительного изменения $\mu_{s\perp}$ при уменьшении c_w и расположения верхней границы области значений c_w, при которых $\mu_{s\|}$ и $\mu_{s\perp}$ являются очень малыми.

Итак, проведена экспериментальная проверка адекватности простой теоретической модели для оценки оп-

тических характеристик коллагеновых пучков при различных уровнях гидратации ткани. Представленные экспериментальные данные дают основание считать, что эта модель является пригодной и хорошо отражает изменения оптических свойств коллагеновых пучков при их дегидратации.

Экспериментальная часть работы выполнена при поддержке РФФИ (грант №19-32-90177), теоретическая часть – при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №19-12-00118).

1. Синичкин Ю.П., Утц С.Р. *In vivo отражательная и флуоресцентная спектроскопия кожи человека* (Саратов: изд-во Саратовского ун-та, 2001).
2. Kirillin M.Y., Agrba P.D., Kamensky V.A. *J. Biophotonics*, **3** (12), 752 (2010).
3. Ermakov I.V., Gellermann W. *J. Biophotonics*, **5** (7), 559 (2012).
4. Yanina I.Yu. et al. *Proc. SPIE*, **11641**, 116410W (2021).
5. Яковлев Д.Д., Сагайдачная Е.А., Яковлев Д.А., Кочубей В.И. *Квантовая электроника*, **51** (1), 43 (2021) [*Quantum Electron.*, **51** (1), 43 (2021)].
6. Rylander C.G. et al. *J. Biomed. Opt.*, **11** (4), 041117 (2006).
7. Tuchin V.V. *Optical Clearing of Tissues and Blood* (Bellingham, WA, USA: SPIE Press, 2005).
8. Starborg T. et al. *Nat. Protoc.*, **8** (7), 1433 (2013).
9. Jones P.N. *Connective Tissue Research*, **26** (1–2), 11 (1991).
10. Hovhannisyan V. et al. *J. Biomed. Opt.*, **18** (4), 046004 (2013).
11. Meek K.M. et al. *Biophys. J.*, **60** (2), 467 (1991).
12. Morin C., Hellmich C., Henits P. *J. Theor. Biology*, **317**, 384 (2013).
13. Hayes S. et al. *J. Royal Society Interface*, **14** (131), 20170062 (2017).
14. Швачкина М.Е. Канд. дис. (Саратов, СГУ им. Н.Г.Чернышевского, 2020).
15. Schmitt J.M., Kumar G. *Appl. Opt.*, **37** (13), 2788 (1998).
16. Twersky V. *J. Opt. Soc. Am.*, **65** (5), 524 (1975).
17. Bohren C.F., Huffman D.R. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles* (New York: Wiley, 1983).
18. Daimon M., Masumura A. *Appl. Opt.*, **46** (18), 3811 (2007).
19. Shvachkina M.E., Yakovlev D.D., Pravdin A.B., Yakovlev D.A. *J. Biomed. Photonics & Engineering*, **4** (1), 010302 (2018).
20. Швачкина М.Е. и др. *Оптика и спектроскопия*, **127** (2), 337 (2019).
21. Martinez-Anton J.C., Bernabeu E. *Thin Solid Films*, **313**, 85 (1998).
22. De Aro A.A., de Campos Vidal B., Pimentel E.R. *Micron*, **43** (2), 205 (2012).
23. Kastelic J., Galeski A., Baer E. *Connective Tissue Research*, **6** (1), 11 (1978).
24. Rowe R.W.D. *Connective Tissue Research*, **14** (1), 9 (1985).
25. Kannus P. *Scand. J. of Medicine and Science in Sports*, **10** (6), 312 (2000).
26. Screen H.R.C. et al. *Acta Biomater.*, **2** (5), 505 (2006).
27. Gong P. et al. *J. Biomed. Opt.*, **25** (4), 040901 (2020).
28. Van Leeuwen T.G., Faber D.J., Aalders M.C. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, **9** (2), 227 (2003).
29. Yun S.H. et al. *Opt. Express*, **11** (26), 3598 (2003).
30. Джеррард А., Бёрч Д.М. *Введение в матричную оптику* (М.: Мир, 1978).
31. Faber D.J., van der Meer F.J., Aalders M.C.G., van Leeuwen T.G. *Opt. Express*, **12** (19), 4353 (2004).
32. Thrane L., Yura H.T., Andersen P.E. *J. Opt. Soc. Am. A*, **17** (3), 484 (2000).
33. Turchin I.V., Sergeeva E.A., Dolin L.S., Kamensky V.A. *Laser Phys.*, **13** (12), 1524 (2003).
34. Almasian M. et al. *J. Biomed. Opt.*, **20** (12), 121314 (2015).
35. Aernouts B., van Beers R., Watté R., Lammertyn J., Saeys W. *Opt. Express*, **22** (5), 6086 (2014).
36. Yadlowsky M.J., Schmitt J.M., Bonner R.F. *Appl. Opt.*, **34** (25), 5699 (1995).